



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, INGENIERÍA Y MEDICINA

PROGRAMAS MULTIDISCIPLINARIOS DE POSGRADO EN CIENCIAS
AMBIENTALES

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES

**“RECUPERACIÓN DE PARTÍCULAS Y NANOPARTÍCULAS DE PLATA CON
SISTEMAS BIOLÓGICOS ANAEROBIOS DE LODO GRANULAR Y BIOPELÍCULA”**

PRESENTA:

ANA LAURA RUIZ CASTILLO

DIRECTOR DE TESIS:

MARISOL GALLEGOS GARCÍA

ASESORES:

ROBERTO BRIONES GALLARDO

ISRAEL RAZO SOTO

MARÍA GUADALUPE SÁNCHEZ LOREDO

MARZO 2016

Dedicatoria:

A mis padres por su amor incondicional, por sus enseñanzas y consejos. Ustedes son mi fuerza y mi mayor motivación, gracias por ayudarme a alcanzar mis sueños. Los quiero con todo mi corazón.

A mi hermano por ser un ejemplo a seguir y por despertar en mí la curiosidad de siempre querer descubrir cosas nuevas.

A mis tías Castillo porque aunque algunas están lejos siempre las siento cerca de mí. Gracias por cada uno de sus consejos y por enseñarme a ser fuerte.

A Rubén Reyna por todo su apoyo y cariño. Gracias por tantos años de caminar a mi lado y por compartir esta etapa conmigo. Me inspiras a esforzarme y ser mejor cada día.

A mis amigos por siempre estar ahí para escucharme. Por nuestras vivencias y todos los momentos en que me ayudaron a salir adelante.

CRÉDITOS INSTITUCIONALES

Proyecto realizado en:

Programas Multidisciplinarios de Posgrado en Ciencias Ambientales (PMPCA).
Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto (FEUP)
Universidade do Porto.

Financiamiento:

No. De Convenio: C15-PIFI-06-10.10

**Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) el otorgamiento
de la beca-tesis
CVU: 553812
Becario No.: 295579**

**La maestría en ciencias ambientales recibe apoyo a través del programa nacional de
posgrados de calidad (PNPC)**

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis la Dra. Marisol Gallegos García que me permitió realizar este proyecto de investigación. Gracias por apoyarme en todo momento, por brindarme todas las herramientas necesarias para la culminación de mi maestría y por compartirme no solo su conocimiento sino también su tiempo. Le expreso mi admiración.

Al Dr. Roberto Briones, al Dr. Israel Razo Soto y a la Dra. María Guadalupe Sánchez Loredo por sus contribuciones a mi trabajo y por su disponibilidad para las correcciones.

Al Dr. Anthony Danko por permitirme realizar mi estancia de investigación en Portugal. Le agradezco haberme brindado su confianza y su apoyo constante. Gracias también por su dedicación y enseñanzas.

Al Dr. Manuel Simões por integrarme a su equipo de investigación en la Universidad de Porto. A Inês Gomes por su paciencia y apoyo en la capacitación.

Por la asistencia técnica de M.C. Claudia Guadalupe Alfaro, encargada del Laboratorio de Microscopía de Transmisión. Al Ing. Fernando Rodríguez Juárez encargado del Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido del Área de Materiales del Instituto de Metalurgia. Al M.C. Saúl Escoto Chávez encargado del Laboratorio de Ciencias Ambientales de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

ÍNDICE GENERAL

	Página
Créditos Institucionales	ii
Agradecimientos	iii
Índice General	iv
Índice de Figuras	viii
Índice de Tablas	x
Nomenclatura	xi
Resumen	xii
Capítulo 1. Introducción	1
1.1 Contaminación del agua por metales	1
1.2 Toxicidad	2
1.3 Normatividad	2
1.4 La química de la plata en solución	3
1.5 Diversos procesos para la recuperación de plata	5
1.6 Proceso anaerobio	6
1.6.1 Bacterias Metanogénicas	9
1.6.2 Bacterias Sulfato reductoras	10
1.6.3 Bacterias Desnitrificantes	11
1.7 Recuperación de metales en reactores anaerobios con lodo granular	12
1.8 Recuperación de metales en reactores de biopelícula con distintos tipos de soporte	13
1.9 Recuperación de metales a partir de la reducción del potencial óxido-reducción por bacterias anaerobias.	15
1.10 Recuperación de nanopartículas metálicas por métodos biológicos	17
1.11 Caracterización de la comunidad microbiana en cultivos anaerobios	18
1.12 Justificación	19
1.13 Objetivo	20
1.14 Estructura de la tesis	20
Capítulo 2. Metodología	22

2.1 Reactor de lecho fluidificado inverso	22
2.2 Inóculo	23
2.3 Medios de cultivo	23
2.3.1 Medio mineral para el reactor LFI	23
2.3.2 Solución de elementos traza	23
2.3.3 Medio mineral basal para la actividad metanogénica	24
2.4 Actividad metanogénica específica	24
2.4.1 Velocidad de producción de CH ₄	25
2.5 Desempeño del reactor LFI	26
2.6 Análisis	26
2.6.1 Demanda química de oxígeno	26
2.6.2 Alcalinidad y pH	26
2.6.3 Potencial óxido-reducción	27
2.6.4 Determinación de sólidos suspendidos volátiles y sólidos volátiles inmovilizados	27
2.6.5 Eficiencia de remoción de nitratos	28
2.7 Caracterización del efluente	28
2.8 Caracterización del residuo recuperado: microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión	28
2.9 Caracterización de la biopelícula	29
2.9.1 Extracción de ADN de la biopelícula anaerobia	29
2.9.2 Reacción en cadena de la polimerasa	29
2.9.3 Pirosecuenciación	30
2.10 Síntesis y actividad antimicrobiana de nanopartículas de plata biogénicas	30
2.10.1 Biosíntesis y caracterización de las nanopartículas de plata	30
2.10.2 Actividad antimicrobiana de las nanopartículas de plata biogénicas	31
2.10.2.1 Cepas bacterianas	31
2.10.2.2 Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida	31
2.10.2.3 Formación de biopelículas de <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	33
2.10.2.4 Actividad de control de biopelículas de <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	33
2.11 Cálculos	34
2.11.1 Eficiencia de remoción de DQO	34
2.11.2 Actividad metanogénica específica	34
2.11.3 Velocidad máxima de producción de CH ₄	34
2.11.4 Determinación de la alcalinidad	34
2.11.5 Cálculo de los sólidos suspendidos totales, fijos y volátiles	35
2.11.6 Cálculo de los sólidos volátiles inmovilizados	35
2.11.7 Cálculo de las unidades formadoras de colonias	36

Capítulo 3. Evaluación del efecto tóxico de la plata sobre un lodo granular y una biopelícula metanogénica	37
Resumen	37
3.1 Introducción	38
3.2 Métodos y metodología	40
3.2.1 Lodo granular metanogénico	40
3.2.2 Formación de la biopelícula	40
3.2.3. Determinación de la actividad metanogénica de los sistemas biológicos expuestos a plata.	41
3.2.4 Medio de cultivo	41
3.2.5 Análisis	41
3.3 Resultados y discusión	41
3.3.1 Cinética de producción de CH ₄ en presencia de Ag ⁺	41
3.3.2 Estimación de las velocidades de producción de CH ₄	49
3.3.3 Desempeño de los sistemas biológicos al finalizar la cinética	56
3.3.4 Caracterización del residuo recuperado	62
3.3.5 Recuperación de los sistemas biológicos	63
3.4 Conclusiones	68
Capítulo 4. Recuperación de plata a partir de una biopelícula anaerobia en un reactor de lecho fluidificado inverso	70
Resumen	70
4.1 Introducción	71
4.2 Métodos y metodología	73
4.2.1 Condiciones de operación del reactor LFI	73
4.2.2 Medios de cultivo	74
4.2.3 Ensayos de actividad metanogénica específica	74
4.2.4 Análisis	75
4.2.5 Extracción de ADN	75
4.2.6 Pirosecuenciación	75
4.3 Resultados y discusión	75
4.3.1 Desempeño del reactor LFI	75
4.3.2 Remoción y recuperación de plata	80
4.3.3 Actividad metanogénica específica de la biopelícula	84
4.3.4 Caracterización de la biopelícula	87
4.3.4.1 Tinción de Gram	87
4.3.4.2 Microscopía electrónica de barrido	88
4.3.4.3 Pirosecuenciación	89
4.4 Conclusiones	93

Capítulo 5. Efecto antibacteriano de AgNPs biogénicas formadas a partir de una biopelícula anaerobia sobre <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	94
Resumen	94
5.1 Introducción	95
5.2 Métodos y metodología	98
5.2.1 Biosíntesis y caracterización de nanopartículas de plata	98
5.2.2 Cepas bacterianas	98
5.2.3 Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida	98
5.2.4 Formación de biopelículas de <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	98
5.2.5 Actividad de control de las biopelículas de <i>Escherichia coli</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	98
5.3 Resultados y discusión	99
5.3.1 Síntesis y caracterización de las nanopartículas de plata	99
5.3.2 Actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata biogénicas	102
5.4 Conclusiones	108
Capítulo 6. Conclusiones generales	110
Referencias bibliográficas	112
Anexos	131

ÍNDICE DE FIGURAS

		Página
Figura 1.1	Diagrama de Pourbaix agua-plata	4
Figura 1.2	Etapas de la digestión anaerobia	8
Figura 1.3	Perfil vertical del potencial redox (mV) en sedimentos	16
Figura 2.1	Reactor de lecho fluidificado inverso	22
Figura 2.2	Ensayo de actividad metanogénica específica	25
Figura 3.1	a) Producción de CH ₄ en experimentos en lote con lodo granular metanogénico expuesto a Ag ⁺ ; b) acercamiento de las primeras 40 h de la producción de CH ₄ . Donde control (□), 0 mg/L (■), 50 mg/L (*), 100 mg/L (▲), 500 mg/L (◆), 1000 mg/L (●) y 2000 mg/L (Δ).	45
Figura 3.2	a) Producción de CH ₄ en experimentos en lote con biopelícula expuesta a Ag ⁺ ; b) acercamiento de las primeras 40 h de la producción de CH ₄ . Donde control (□), 0 mg/L (■), 50 mg/L (*), 100 mg/L (▲), 500 mg/L (◆), 1000 mg/L (●) y 2000 mg/L (Δ).	46
Figura 3.3	Ajustes con el modelo de crecimiento sigmoidal de Gompertz del lodo granular en presencia de Ag ⁺ . Donde control (□), 0 mg/L (■), 50 mg/L (*), 100 mg/L (▲), 500 mg/L (◆), 1000 mg/L (●) y 2000 mg/L (Δ).	52
Figura 3.4	Ajustes con el modelo de crecimiento sigmoidal de Gompertz de la biopelícula en presencia de Ag ⁺ . Donde control (□), 0 mg/L (■), 50 mg/L (*), 100 mg/L (▲), 500 mg/L (◆), 1000 mg/L (●) y 2000 mg/L (Δ).	53
Figura 3.5	Evolución de la biopelícula. a) soporte de polietileno de baja densidad. b) formación de la biopelícula tras la inoculación. c) biopelícula después de la adición de Ag ⁺	60
Figura 3.6	Micrografía y microanálisis del residuo recuperado de las pruebas en lote con lodo granular mediante MEB-EDAX.	62
Figura 3.7	Micrografía y microanálisis del residuo recuperado de las pruebas en lote con biopelícula mediante MEB-EDAX.	62
Figura 3.8	Producción de CH ₄ en experimentos en lote con lodo granular metanogénico sin metal para evaluar su recuperación. Donde control (□), 0 mg/L (■), 50 mg/L (*), 100 mg/L (▲), 500 mg/L (◆), 1000 mg/L (●) y 2000 mg/L (Δ).	66
Figura 3.9	Producción de CH ₄ en experimentos en lote con biopelícula sin metal para evaluar su recuperación. Donde control (□), 0 mg/L (■), 50 mg/L (*), 100 mg/L (▲), 500 mg/L (◆), 1000 mg/L (●) y 2000 mg/L (Δ).	67
Figura 4.1	Desempeño del reactor LFI. a) (○) DQO en el afluente (■) % de remoción de DQO. b) (—) pH en la alimentación, (▲) pH en el efluente, (◇) Alcalinidad por bicarbonatos. c) (◆) ORP.	77
Figura 4.2	(◆) Velocidad de carga de Ag ⁺ y (●) eficiencia de remoción de Ag ⁺ (%)	82

Figura 4.3	Imágenes por MEB del residuo recuperado del reactor LFI y su respectivo microanálisis por EDAX	83
Figura 4.4	Imágenes por MET de AgNPs recuperadas del reactor LFI y su respectivo microanálisis por EDAX	84
Figura 4.5	AME y biomasa adherida al soporte a diferentes tiempos de operación del reactor LFI	85
Figura 4.6	Imagen de las bacterias anaerobias en la biopelícula tras el método de tinción de Gram	88
Figura 4.7	Inmovilización de las bacterias anaerobias en el soporte. a) micrografía de un pellet. b) superficie del soporte de la biopelícula. c) y d) colonización microbiana sobre el soporte	89
Figura 4.8	Resultados de la pirosecuenciación visualizados por Krona, composición total de la biopelícula	90
Figura 4.9	Resultados de la pirosecuenciación visualizados por Krona, géneros Archaea presentes en la biopelícula	92
Figura 5.1	Fotografía del cambio en la coloración del líquido proveniente del reactor durante la síntesis de AgNPs. a) Antes de la adición de Ag ⁺ . b) al instante de añadir Ag ⁺ . c) después de 24 h de reacción	99
Figura 5.2	Espectro UV-visible de AgNPs sintetizadas biológicamente	100
Figura 5.3	Imágenes por MET de las AgNPs biogénicas	101
Figura 5.4	Reducción log ₁₀ de UFC/cm ² , obtenida como la diferencia entre el control y las biopelículas tratadas con AgNPs. Resultados obtenidos para biopelículas de <i>E. coli</i> y <i>S. aureus</i> de 24 y 72 horas, así como para biopelículas mixtas de 24 horas, a CMI, 2CMI y 3CMI de las AgNPs.	105
Figura 5.5	a) espectro UV-visible de las AgNPs en agua desionizada. b) espectro UV-visible de las AgNPs con H ₂ O ₂	107
Figura A.1	Aspecto visual del reactor de lecho fluidificado inverso A. Antes de la adición de metales. B. Durante la inoculación.	131
Figura A.2	Aspecto visual de las pruebas en lote para evaluar el efecto tóxico de la plata sobre la AME del lodo granular y la biopelícula.	132
Figura A.3	Fotografía del aspecto visual del ensayo de AME.	133
Figura A.4	Fotografías de los ensayos de actividad antimicrobiana de las AgNPs	134
Figura A.5	Gráficas de r _{max} vs. Concentración inicial de Ag ⁺ en mg/L en escala logarítmica. a) lodo granular expuesto a Ag ⁺ . b) biopelícula expuesta a Ag ⁺ . c) comparación entre ambos sistemas expuestos a Ag ⁺ . d) comparación entre ambos sistemas biológicos durante la recuperación.	135

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1.1 Reacciones metanogénicas	10
Tabla 2.1 Concentración inicial de NO_3^- en cada botella	28
Tabla 3.1 Parámetros cinéticos obtenidos del modelo de crecimiento sigmoidal de Gompertz en presencia de Ag^+ para el lodo granular y la biopelícula metanogénica.	54
Tabla 3.2 Resultados de las pruebas en lote con lodo granular y biopelícula expuestos a diferentes concentraciones de plata.	61
Tabla 3.3 Parámetros cinéticos obtenidos del modelo de crecimiento sigmoidal de Gompertz en presencia de Ag^+ para el lodo granular y la biopelícula metanogénica.	68
Tabla 4.1 Condiciones de operación en continuo del reactor LFI a temperatura ambiente (20-27°C)	74
Tabla 4.2 Desempeño del reactor LFI durante su operación en continuo para la reducción de Ag^+ a Ag^0 .	78

NOMENCLATURA

AME	Actividad metanogénica específica
BM	Bacterias metanogénicas
BSR	Bacterias sulfato reductoras
CMB	Concentración mínima bactericida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DQO	Demanda química de oxígeno
LFI	Lecho fluidificado inverso
CH ₄	Metano
MET	Microscopía electrónica de transmisión
MEB	Microscopía electrónico de barrido
AgNPs	Nanopartículas de plata
NO ₃ ⁻	Nitrato
Ag ⁰	Plata metálica
Ag ⁺	Plata soluble
ORP	Potencial óxido-reducción
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SSV	Sólidos suspendidos volátiles
SVI	Sólidos volátiles inmovilizados
SO ₄ ²⁻	Sulfato
r _{max}	Velocidad máxima de producción de metano
TRH	Tiempo de retención hidráulico
UFC	Unidades formadoras de colonias
UASB	Upflow anaerobic sludge blanket (lecho de lodo anaerobio de flujo ascendente)

RESUMEN

La disponibilidad de agua dulce de buena calidad ha disminuido significativamente debido a diversas actividades humanas que han incrementado los flujos de plata y otros metales potencialmente tóxicos, envenenando los ecosistemas acuáticos. Los métodos utilizados tradicionalmente para el tratamiento de aguas que contienen metales, se basan en la neutralización y precipitación química, sin embargo estos tratamientos conllevan el alto costo de los reactivos químicos y la producción excesiva de lodos, por lo que se ha buscado una alternativa en los procesos biológicos.

El proceso de digestión anaerobia se basa en la oxidación de la materia orgánica a partir de diversos tipos de bacterias, entre las cuales se encuentran las metanogénicas y acetogénicas, que son capaces de reducir el potencial óxido-reducción del medio acuoso a valores por debajo de los -200 mV. Bajo estas condiciones la plata soluble puede ser reducida a plata metálica, por lo que el uso de estas bacterias podría ser una alternativa viable para la recuperación de diversos metales de aguas residuales.

El objetivo general de este trabajo fue evaluar el efecto que ejerce la plata soluble sobre la actividad anaerobia de distintos sistemas biológicos, así como asegurar la reducción de plata soluble a plata metálica. Con el fin de desarrollar un proceso económicamente viable para la recuperación del metal y la reutilización del agua.

En la primera etapa del proyecto se estudió el efecto tóxico que ejerce la plata soluble sobre un lodo granular a concentraciones entre 0 y 2000 mg/L Ag^+ , con su respectiva cantidad de nitratos debido a que se añadió como AgNO_3 . El lodo fue previamente acondicionado a metanogénesis y resistió hasta 1000 mg/L Ag^+ -575 mg/L NO_3^- . Se evaluó también el efecto de la plata sobre una biopelícula anaerobia, la cual fue formada sobre un soporte de polietileno de baja densidad, en un reactor de lecho fluidificado inverso durante 94 días. La biopelícula resistió hasta 500 mg/L Ag^+ -288 mg/L NO_3^- , el efecto inhibitoria a mayores concentraciones podría deberse tanto a la presencia de Ag^+ como a la de NO_3^- . En ambos sistemas biológicos hubo una disminución del potencial óxido-reducción (< -100 mV) que

permitió la reducción de la plata soluble, la eficiencia de remoción de plata promedio fue de 97%.

En la siguiente etapa se utilizó un reactor de lecho fluidificado inverso para la remoción de plata soluble de un agua residual sintética a partir de una biopelícula anaerobia. El reactor se operó en continuo durante 293 días con etanol como sustrato (1 g DQO/L). La eficiencia de remoción de plata fue superior al 96% y fue recuperada en su estado metálico. El incremento gradual en las concentraciones de plata, de 20 mg/L Ag^+ - 11.5 mg/L NO_3^- a 300 mg/L Ag^+ - 172.4 mg/L NO_3^- , favoreció el desempeño del reactor de lecho fluidificado inverso, lo cual se vio reflejado en el incremento de su eficiencia de remoción de la materia orgánica (de hasta 94%) y en el potencial óxido-reducción que permaneció inferior a -200 mV. La alcalinidad producida por la oxidación del sustrato mantuvo un pH cercano a 7.0 dentro del reactor. La caracterización de la biopelícula por biología molecular indicó la presencia de bacterias gram-negativas, principalmente *Proteobacterias* y *Euryarchaeota.*, entre las que se encuentran bacterias desnitrificantes y metanogénicas.

Al detectar la presencia de nanopartículas de plata en el efluente del reactor de lecho fluidificado inverso se decidió realizar la síntesis extracelular de nanopartículas de plata a partir del líquido proveniente del reactor. Se obtuvieron nanopartículas de plata con morfología irregular y tamaños entre 2 y 45 nm.

Finalmente se realizaron pruebas para evaluar el efecto antibacteriano de las nanopartículas de plata biogénicas sobre células plantónicas y biopelículas de *E. coli* y *S. aureus*. El efecto antibacteriano fue más pronunciado ante *E. coli* que es un bacteria gram-negativa, sin embargo se observó que al combinarlas con otros compuestos como el peróxido de hidrógeno, su actividad antibacteriana aumenta. Durante esta investigación se observó también que la resistencia bacteriana incrementó con el tiempo, por lo que el efecto antibacteriano de las nanopartículas de plata fue menor en biopelículas con mayor madurez. Este trabajo es el primero en evaluar la recuperación de plata metálica en un reactor de lecho fluidificado inverso en una sola etapa, así como el primero en sintetizar nanopartículas de plata a partir de una biopelícula conformada por bacterias de digestión anaerobia.

CAPITULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 Contaminación del agua por metales

El tratamiento de aguas residuales se ha vuelto imperativo en la actualidad debido a la escasez de agua dulce y a la disminución en la calidad de la misma. Es de particular importancia la contaminación del agua por metales pesados debido a los impactos que tiene no solo en el ambiente y en la economía, sino también en la salud de los seres vivos. Los metales pesados son elementos de alta densidad que se encuentran de forma natural en la corteza terrestre, sin embargo se convierten en contaminantes cuando su concentración aumenta como consecuencia de diversas actividades humanas que afectan su distribución.

La plata es un metal pesado que cuenta con propiedades únicas de conductividad, maleabilidad, ductilidad, resistencia y reflexión, además de propiedades antisépticas que la convierten en un metal insustituible en el mercado global. En México, la importancia que la industria minera tiene para la economía nacional, y dentro de ella, la explotación de la plata, ha impulsado a tratar los distintos problemas relacionados con este metal. México fue el productor de plata más importante del mundo en el 2014 con 193 millones de onzas (O'Connell et al., 2015) y la demanda global de plata continúa en aumento, sin embargo una vez que ha sido utilizada en un proceso específico se genera un residuo o desecho que termina como desperdicio sólido o en solución y que representa el 60% de la plata que fue producida a nivel mundial (Reyes y Ramírez, 2004).

La plata se utiliza en la producción de espejos, aleaciones dentales, acuñación, manufactura de vajillas, galvanoplastia, manufactura de tintas y colorantes, soldaduras, baterías de alta capacidad, celdas solares, fotografía, medicina y en el procesamiento de bebidas y comidas. Compuestos como el nitrato de plata (AgNO_3) y el acetato de plata se utilizan en el tratamiento de verrugas, para la prevención de infecciones asociadas con quemaduras extensivas y en remedios para dejar de fumar. La plata coloidal es uno de los antibióticos universales más efectivos que se han conocido en toda la historia (EPA, 1992).

Adicionalmente, el uso creciente de nanopartículas de plata (AgNPs), las cuales alcanzaron el primer lugar en el estudio de tecnologías emergentes en 2009 por ser las más utilizadas en

productos para los consumidores (Woodrow Wilson Center, 2011), ha contribuido a la generación de nuevos residuos con altos contenidos de nano-plata.

1.2 Toxicidad

Las concentraciones de plata en el agua son mínimas, ciertas declaraciones sobre los criterios de la calidad del agua, documentan que los niveles de plata en las aguas superficiales son de entre 0.1-0.5 $\mu\text{g/L}$. Sin embargo, en ocasiones los niveles de plata aumentan por encima de este valor debido a las descargas de diversos efluentes (Hartl, 2013). De acuerdo con Shafer et al. (1998), la concentración total de plata en agua residual puede variar de 1.78 a 105 mg/L aproximadamente.

De acuerdo con reportes de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA, 1992), la plata puede ser absorbida en los pulmones y el tracto gastrointestinal. Cuando se absorbe una cantidad excesiva de plata los tejidos se impregnan de sulfito de plata, el cual le da una coloración azul a la piel, o en casos extremos negruzca, esto es conocido comúnmente como argirina. Su absorción puede ocasionar arterioesclerosis, y lesiones en los pulmones y riñones. La exposición al polvo puede causar problemas respiratorios, infecciones en la garganta y dolor abdominal. El contacto con la piel puede producir reacciones alérgicas como irritaciones e inflamación. Otras consecuencias de la exposición a plata son la neumonitis química, ulceraciones en la piel y en el tabique nasal, anomalías cardíacas, daños cerebrales y daños al sistema nervioso; concentraciones extremadamente altas pueden causar espasmos, coma o incluso la muerte. Adicionalmente, la plata en solución (Ag^+) es altamente tóxica para plantas y animales acuáticos, por lo que puede ocasionar la muerte de diversas especies (Hogstrand y Wood, 1998).

1.3 Normatividad

La plata es considerada un contaminante secundario. Actualmente cerca de 80 productos pesticidas contienen plata como un ingrediente activo. Está clasificada en el grupo de D de carcinógenos (no siendo carcinógena en humanos). Los organismos operadores que establecen los límites permisibles de plata varían y dependen de cada nación.

En Estados Unidos la EPA estableció un límite máximo de consumo diario de 0.005 mg/kg/día de plata, la máxima concentración de plata en el agua potable en 0.05 mg/L y la máxima

concentración permitida para su descarga a redes cloacales en 0.1 mg/L. En México, la norma NOM-CCA-017-ECOL-1993 establecía los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales provenientes de la industria de acabados metálicos a cuerpos receptores, de acuerdo a lo estipulado en esta norma los límites máximos permisibles de plata eran de 0.1 mg/L para el agua potable y 0.2-0.4 mg/L para aguas residuales, sin embargo fue sustituida por la NOM-001-SEMARNAT-1996, en la cual los límites máximos permisibles de plata en aguas residuales no son contemplados. El límite máximo permisible de plata en agua potable permanece en 0.1 mg/L, de acuerdo con la norma NOM-201-SSAI-2002; y el límite máximo permisible para la recarga artificial de acuíferos con agua residual tratada es de 0.1 mg/L, de acuerdo con la norma NOM-014-CONAGUA-2003.

La concentración de plata en el aire en el sitio de trabajo está regulada por la Administración de Seguridad y Salud Ocupacionales (OSHA), que establece los límites máximos permisibles de plata en el aire del lugar de trabajo para un día laboral de 8 horas, en 0.01 mg/m³; y la Conferencia Americana de Higienistas Industriales Gubernamentales (ACGIH), la cual recomienda que el aire en el sitio de trabajo no contenga más de 0.1 mg/m³ de plata y 0.01 mg/m³ de compuestos de plata soluble.

1.4 La química de la plata en solución

Los metales pesados tienden a formar complejos con sustancias minerales y orgánicas mediante procesos químicos como el intercambio iónico, adsorción, quelación, etc. Esto provoca que se acumulen en el ambiente, particularmente en los sedimentos de ríos, lagos y mares (Förstner y Wittmann, 2012).

La plata se encuentra en la naturaleza principalmente en estado de oxidación 1+, con menos frecuencia en estado de oxidación 2+ y rara vez con un grado de oxidación mayor. En soluciones acuosas la plata es completamente estable a cualquier pH, siempre y cuando no estén presentes agentes oxidantes o sustancias complejantes (EPA, 1992). La plata que se libera al ambiente puede ser transportada grandes distancias en el aire y en el agua, la lluvia por ejemplo lava los compuestos de plata presentes en los suelos y eventualmente los transporta al agua subterránea.

La presencia de plata en las aguas naturales es de gran interés, particularmente cuando se encuentra como ion libre Ag⁺, debido a que forma complejos o precipitados con diversos

materiales orgánicos e inorgánicos (Wang et al., 2003). En ambientes marinos, donde abundan los sulfatos (SO_4^{2-}) y el consumo de oxígeno, se favorecen las condiciones para la presencia de bacterias sulfato reductoras (BSR), las cuales utilizan el SO_4^{2-} disponible. En estas condiciones anaerobias forman sulfuro de hidrógeno (H_2S), el cual reacciona con la plata presente y forma sulfuro de plata (Ag_2S), que es altamente insoluble y permite inmovilizar el metal (Hartl, 2013). Este metal puede reaccionar también con los grupos tioles de materiales orgánicos, los cuales contribuyen a la remoción de Ag^+ de la fase acuosa en sedimentos acuáticos.

La Figura 1.1 muestra un diagrama de estabilidad para el sistema plata-agua. A pH entre 6 y 7, al cual se operó el reactor anaerobio en este experimento, y condiciones reductoras de ORP ($< 0 \text{ mV}$) es posible reducir la Ag^+ a Ag^0 , una vez reducida puede ser recuperada en su forma metálica del fondo del reactor.

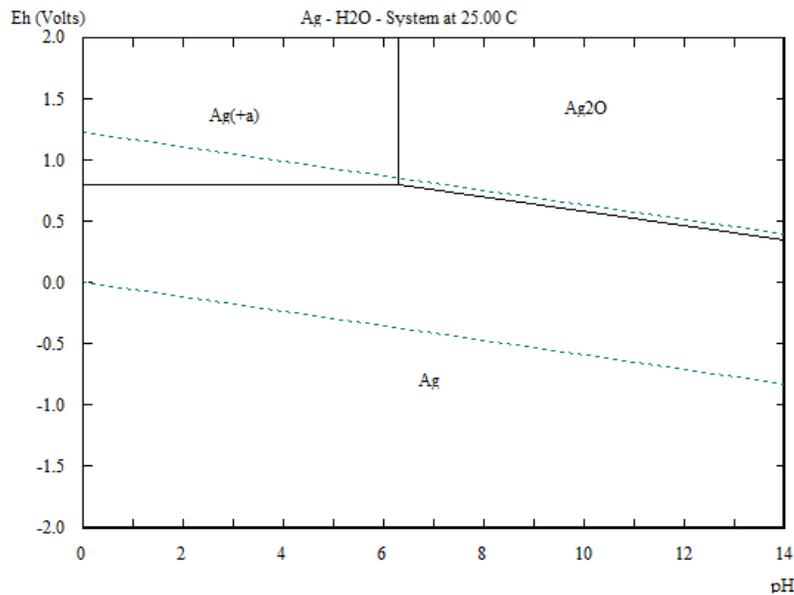


Figura 1.1. Diagrama de Eh-pH, a 25°C y una atmósfera de presión. Para una concentración total de Ag igual a 1 M (Thompson et al., 2000).

Factores como el pH y el potencial óxido-reducción (ORP) determinan el estado de oxidación del metal y por lo tanto influyen en el destino de estos contaminantes. Los diagramas de estabilidad de Pourbaix son una herramienta fundamental para interpretar fenómenos químicos de un elemento y su especiación, proporcionan un método sencillo para predecir el

comportamiento de los metales pesados frente a un cambio en las condiciones ambientales. Esta información puede ser utilizada como medida de control cuando se requiere remover o recuperar metales específicos durante el tratamiento de aguas residuales. Por ejemplo se ha reportado que un incremento del ORP genera la inestabilidad de los compuestos reducidos, poniendo el metal en solución; mientras tanto la disminución del pH induce la disolución de compuestos metal-carbonato y aumenta la solubilidad de los metales disueltos, dificultando su precipitación (Stumm et al., 1996).

1.5 Diversos procesos para la recuperación de plata

Existen diversos procesos fisicoquímicos para la recuperación de plata, tales como: electrólisis, precipitación química, reemplazo metálico, intercambio iónico, adsorción y ósmosis inversa. En la depuración de aguas residuales urbanas dominan los procesos de coagulación-floculación. Sin embargo estos métodos presentan ciertas desventajas como son el alto costo de los reactivos químicos y la producción excesiva de lodos, que después deben ser tratados y eliminados (Gallegos-García et al., 2008). Es por ello que la inmovilización de metales a través de la reducción y precipitación microbiana es de gran interés en la actualidad. Entre los procesos biológicos desarrollados se encuentran la fitorremediación, los procesos aerobios y los anaerobios (Ruiz et al., 2001).

Las bacterias han sido los microorganismos más estudiados y utilizados para las estrategias de bioremediación debido a que pueden obtener energía de prácticamente cualquier compuesto, son abundantes, tienen la habilidad de transferir sus genes, y cuentan con altas tasas de crecimiento, las cuales les permiten evolucionar y adaptarse rápidamente a las condiciones cambiantes del ambiente (Díaz, 2004). Además los cationes de algunos metales tienen un efecto estimulador en la actividad de las bacterias a bajas concentraciones. Sin embargo a partir de cierto nivel de concentración pueden ser tóxicos, provocando una disminución en la velocidad de crecimiento bacteriano (Martínez y Calle, 2012).

La plata metálica (Ag^0) y los compuestos de plata tienen propiedades germicidas, que les confieren un efecto letal en algunas bacterias y otras formas de vida. Sus efectos antimicrobianos pueden atribuirse a su capacidad para alterar las funciones de la membrana celular, a la capacidad de unirse a material intracelular como proteínas o ADN y a la liberación de iones Ag^+ que pueden atacar los grupos tioles de las enzimas, detener la replicación del

ADN y causar muerte celular. Además el incremento en el uso de productos que contienen AgNPs ha aumentado su disposición en los sistemas de alcantarillado y en las plantas de tratamiento de aguas residuales, esto ha conducido a realizar diversos estudios para analizar los efectos tóxicos de Ag^+ y AgNPs en las comunidades bacterianas de las plantas de tratamiento.

Liang et al. (2012) realizaron ensayos batch que posteriormente transfirieron a un bioreactor para estudiar la toxicidad de las AgNPs, y encontraron que las AgNPs son más tóxicas para las bacterias nitrificantes que la Ag^+ , mientras que las bacterias heterótrofas no fueron afectadas por ninguno de estos compuestos. Mientras tanto Chen et al. (2012) estudiaron el efecto de las AgNPs y de la Ag^+ (0-5 mg/L) en la remoción biológica del fósforo de agua residual, en un reactor secuencial en lote con fases anaerobias y aerobias, ellos reportaron que las eficiencias de remoción de fósforo se mantuvieron en 99% sin importar la concentración de AgNPs, mientras que con un 1 mg/L de Ag^+ la eficiencia se redujo a 48% y fue nula con 2 mg/L de Ag^+ . Existen diversas investigaciones sobre los efectos tóxicos de Ag^+ en bacterias aerobias, sin embargo los efectos en comunidades anaerobias han sido poco estudiados. Yang et al. (2013) compararon los efectos de Ag^+ y las AgNPs en bacterias metanogénicas (BM), en bioreactores de vertederos con recirculación de lixiviados, si bien no hubo grandes diferencias en la producción de metano (CH_4) entre el grupo de control y el grupo con ion Ag^+ , el grupo con AgNPs tuvo una producción de CH_4 reducida (alrededor de un 80%) y se observó una reducción en el crecimiento metanogénico. Sheng y Liu (2011) observaron que las biopelículas, en este caso de bacterias heterótrofas, son altamente tolerantes a las AgNPs, en sus experimentos éstas resistieron hasta 200 mg Ag/L, sin embargo su resistencia disminuyó al remover las sustancias exopoliméricas, en cambio las bacterias planctónicas fueron altamente vulnerables a la nanoplata pues murieron después de una hora de exposición a 1 mg Ag/L. Las interacciones de la comunidad microbiana en la biopelícula, la protección física brindada por sustancias poliméricas extracelulares (EPS) y la tasa de crecimiento lento de ciertos microorganismos de la biopelícula, juegan un papel importante en la resistencia bacteriana a la presencia de Ag^+ .

1.6 Proceso anaerobio

La digestión anaerobia es un proceso en el cual interactúan diversos grupos o comunidades bacterianas para la degradación de materia orgánica contenida en residuos orgánicos o agua residual, la cual se expresa como demanda química de oxígeno (DQO), como resultado se produce biogás que contiene principalmente CH_4 y CO_2 . Este proceso biológico presenta ventajas frente a los procesos fisicoquímicos actualmente en uso, como son menores costos de operación y una baja producción de lodos (Cresson et al., 2006). La digestión anaerobia consta de varias etapas consecutivas, que se muestran en la Figura 1.2, en las cuales intervienen poblaciones de microorganismos que poseen funciones específicas y se describen a continuación:

1. **Hidrólisis:** las bacterias hidrolíticas producen enzimas que permiten transformar compuestos complejos e insolubles como proteínas, polisacáridos y lípidos, en moléculas de bajo peso molecular como azúcares, aminoácidos y ácidos grasos de cadena larga.
2. **Acidogénesis:** las bacterias acetogénicas se encargan de transformar los productos de la hidrólisis en ácidos grasos volátiles como ácido acético, fórmico, propiónico y butírico, además de producir hidrógeno, CO_2 y etanol.
3. **Acetogénesis:** las bacterias acetogénicas transforman los productos de la acidogénesis en iones acetato, hidrógeno y CO_2 .
4. **Metanogénesis:** es la etapa final de la digestión anaerobia, en la cual se produce CH_4 y CO_2 mediante la decarboxilación del acetato y la hidrogenación del CO_2 , producidos durante la etapa anterior.

En presencia de iones SO_4^{2-} ocurre la sulfato reducción, etapa en la cual suceden las reacciones de oxidación de ácidos grasos volátiles con más de dos átomos de carbono, así como la oxidación de acetato y de hidrógeno, mediadas por BSR. En presencia de nitratos (NO_3^-) ocurre la desnitrificación, proceso metabólico que utiliza el NO_3^- como aceptor de electrones en condiciones anóxicas para su reducción hasta nitrógeno gas (N_2).

En el proceso anaerobio sólo una pequeña cantidad de la energía contenida en el sustrato se utiliza para el mantenimiento y crecimiento celular, por lo que gran parte queda en los

productos en forma de biogás. Esto hace que el tiempo de crecimiento de las bacterias anaerobias sea lento, lo que condiciona el diseño y la operación de los digestores anaerobios, haciendo que el tiempo de arranque del reactor sea más largo (Rittman y McCarty, 2001).

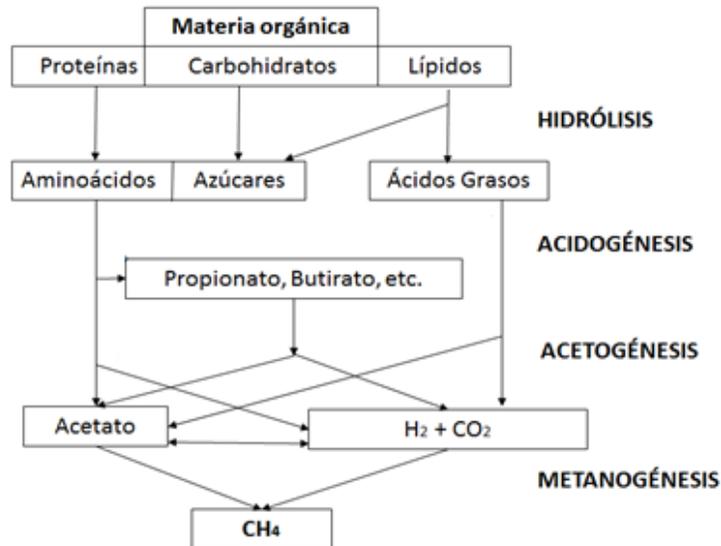


Figura 1.2. Etapas de la digestión anaerobia. Rodríguez J (2003).

Como en todos los procesos biológicos, las condiciones ambientales óptimas son esenciales para la operación exitosa de la digestión anaerobia. Los procesos de metabolismo microbiano dependen de diversos parámetros que deben ser considerados y controlados. El pH es uno de los parámetros que más afectan la etapa metanogénica del proceso, se requiere un equilibrio entre la etapa acetogénica y la metanogénica para evitar la acidificación del sistema y por ende la inhibición de las BM. La digestión anaerobia puede ser operada en un amplio rango de temperatura, entre los 5 y 65°C, generalmente el incremento en la temperatura acelera la degradación de la DQO, sin embargo su operación en rangos ambientales (15-20°C) permite economizar en costos operacionales y energéticos. El ORP puede aumentar hasta 0 mV en el sistema, sin embargo se debe mantener en el rango reductor óptimo para que las bacterias anaerobias de interés continúen con su actividad (Zupančič y Grilc, 2012). Se requiere además que las bacterias tengan tiempo suficiente para reproducirse y metabolizar los sólidos volátiles, los parámetros clave para ello son el tiempo de retención de sólidos, que es el tiempo promedio en que las bacterias están en el digestor, y el tiempo de retención hidráulico (TRH). En los sistemas anaerobios se puede observar un fenómeno característico en el cual algunas

sustancias que son necesarias para el crecimiento microbiano en pequeñas concentraciones, pueden inhibir la digestión cuando aumenta su concentración, este comportamiento ha sido observado con los ácidos grasos volátiles y algunas sales inorgánicas como el sodio. Los metales pesados pueden tener efectos estimulatorios en la digestión anaerobia a bajas concentraciones, sin embargo concentraciones mayores pueden ser tóxicas, particularmente el plomo, cadmio, cobre, zinc, níquel y cromo pueden causar perturbaciones en el proceso (Mudhoo y Kumar, 2013). La resistencia de los microorganismos ante los metales pesados varía con las especies al desarrollar una variedad de mecanismos de resistencia específicos, de tal forma que la gran versatilidad de microorganismos ofrece una estrategia simple y económica para reducir la contaminación ambiental (Bruins y Kapil, 2000). Aunque los microorganismos representan la mitad de la biomasa de nuestro planeta, solo conocemos el 5% de la diversidad microbiana de la biósfera, por lo que existe un mundo microbiano enorme aún sin explorar.

1.6.1 Bacterias Metanogénicas

Las BM son un grupo grande y diverso que está unido por tres características principales: generan CH_4 como producto principal de su metabolismo, son anaerobios estrictos que trabajan a ORPs menores a -250 mV (McBride y Wolfe, 1971), y son miembros del dominio Archaea. Los metanógenos convierten un rango relativamente angosto de sustratos simples a CH_4 , como se muestra en la Tabla 1.1, por lo tanto en ecosistemas que contienen sustratos orgánicos complejos, deben interactuar con otros anaerobios capaces de transformar dichos sustratos en otros más simples que puedan degradar. La lista de sustratos utilizados para la metanogénesis puede ser dividida en tres grupos: En el primer grupo el sustrato es hidrógeno, iones formiato o algunos alcoholes como el etanol, y el aceptor de electrones es el CO_2 que es reducido a CH_4 , la mayoría de los metanógenos pueden producir CH_4 a partir de CO_2 e H_2 , sin embargo la habilidad para utilizar alcoholes es menos común. En el segundo grupo, compuestos metílicos como el metanol y tioles metílicos, pueden ser metabolizados para la producción de CH_4 mediante la vía metilotrófica, en este proceso algunas moléculas del sustrato son oxidadas a CO_2 y los aceptores de electrones son los grupos metilo remanentes que son reducidos directamente a CH_4 . En el tercer grupo, el ion acetato es la principal fuente de CH_4 , sin embargo la habilidad para catabolizar éste sustrato está limitada a los géneros

Methanosarcina y *Methanotrix*, que son responsables de aproximadamente dos tercios del CH₄ producido en sedimentos de agua dulce y bioreactores anaerobios (Whitman et al., 2006). Otros géneros de BM comunes son: *Methanococcus*, *Methanobacterium*, *Methanospirillum*, *Methanobacillus* y *Methanobrevibacter* (Zeikus, 1977). Los requerimientos nutricionales de los microorganismos metanogénicos son muy variados, algunos de ellos son autótrofos, y otros, en cambio, necesitan factores de crecimiento muy complejos o trazas minerales muy concretas (Ni, Co y Mo) (Rittman y McCarty, 2001).

Tabla 1.1. Reacciones metanogénicas (Burlage et al., 1998)

Reactivos	Productos	ΔG (kJ/mol CH ₄)
4H ₂ + HCO ₃ ⁻ + H ⁺	CH ₄ + 3H ₂ O	-135
4HCO ₂ ⁻ + H ⁺ + H ₂ O	CH ₄ + 3HCO ₃ ⁻	-145
2CH ₃ CH ₂ OH + HCO ₃ ⁻	2CH ₃ COO ⁻ + H ⁺ + CH ₄ + H ₂ O	-116
CH ₃ COO ⁻ + H ₂ O	CH ₄ + HCO ₃ ⁻	-31
4CH ₃ OH	3CH ₄ + HCO ₃ ⁻ + H ₂ O + H ⁺	-105
4(CH ₃) ₃ -NH ⁺ + 9H ₂ O	9CH ₄ + 3HCO ₃ ⁻ + 4NH ₄ ⁻ + 3H ⁺	-76
2(CH ₃) ₂ -S + 3H ₂ O	3CH ₄ + HCO ₃ ⁻ + 2H ₂ S + H ⁺	-49
CH ₃ OH + H ₂	CH ₄ + H ₂ O	-113

Las BM poseen propiedades únicas que permiten que el estudio de su ecología sea relativamente simple, a comparación de otros microorganismos. Entre estas propiedades se encuentran la producción obligatoria de un producto único (CH₄) a partir de un rango relativamente angosto de sustratos, y la presencia de marcadores bioquímicos únicos, como el cofactor F₄₂₀, que está presente en todas las familias metanógenas y les confiere fluorescencia al ser observadas en microscopios de fluorescencia (Burlage et al., 1998).

1.6.2 Bacterias Sulfato Reductoras

Las BSR son un grupo metabólicamente versátil de microorganismos que pertenecen a diversas familias y géneros, presentan una actividad óptima a un ORP por debajo de -100 mV, temperaturas entre 28°C-38°C y pH entre 7 y 8 (Santini et al., 2010). En general las BSR utilizan SO₄²⁻ como aceptor de electrones para oxidar compuestos orgánicos e hidrógeno (donadores de electrones), y producir H₂S. A partir del H₂S biogénico se forman los sulfuros metálicos, los cuales precipitan por ser altamente insolubles. El ion bicarbonato (HCO₃⁻)

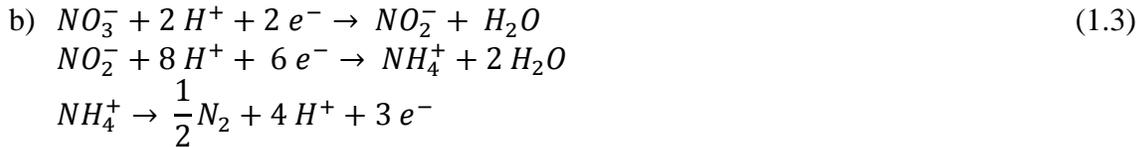
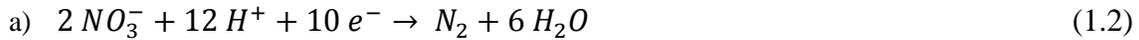
contribuye a la alcalinidad del sistema y amortigua los cambios de pH en el influente de las aguas residuales (Gallegos-García et al., 2008). El uso de sulfuro para formar precipitados de sulfuros metálicos ha sido un éxito en el tratamiento de aguas residuales que contienen metales. Sin embargo, una desventaja práctica de la producción de azufre en condiciones anaerobias es que puede reaccionar y producir polisulfuros altamente tóxicos, además algunas BSR oxidan el sustrato de forma incompleta a acetato y CO_2 . Algunas BSR pueden obtener energía de la fermentación de sustratos orgánicos en ausencia de SO_4^{2-} , esta habilidad les permite sobrevivir en reactores anaerobios bajo condiciones privadas de SO_4^{2-} .

Durante la degradación anaerobia de la DQO la sulfato reducción puede interferir con la metanogénesis, esto ocasiona competencia por los sustratos, disminución en la producción del CH_4 , así como la inhibición de grupos bacterianos por la presencia de H_2S . Si se conocen los requerimientos de un grupo específico se pueden imponer condiciones selectivas que permitan la proliferación del grupo trófico deseado. Sin embargo esto no siempre es sencillo, la competencia entre BM y BSR puede ser dirigida utilizando las diferencias en sus propiedades fisiológicas. Por ejemplo alimentar un exceso de SO_4^{2-} provocará la proliferación de BSR. Otra manera de seleccionar las bacterias deseadas es haciendo uso de los criterios del reactor, por ejemplo las BSR tienen propiedades pobres de fijación, por lo que una velocidad del líquido elevada las eliminaría del reactor. Debido a que ambos tipos de bacterias tienen constantes cinéticas y parámetros de crecimiento comparables, tomaría un largo tiempo para que una especie predomine sobre la otra (Lens et al., 2002).

1.6.3 Bacterias Desnitrificantes

Diversos inóculos de plantas de tratamiento de aguas residuales domésticas e industriales pueden contener bacterias desnitrificantes. En la desnitrificación, bajo condiciones anaerobias, diversas fuentes de carbono actúan como donadores de electrones y reducen el NO_3^- a gas nitrógeno mediante la respiración anóxica (Canto et al., 2008). Las bacterias desnitrificantes forman parte del ciclo del nitrógeno y su propósito principal es metabolizar óxidos de nitrógeno, con la asistencia de la enzima nitrato reductasa. La mayoría pertenece al filo de las Proteobacterias y son facultativas. Estas bacterias pueden utilizar una gran variedad de compuestos orgánicos como sustratos, sin embargo el metanol, etanol y ácido acético son los más utilizados en la literatura (Park y Yoo, 2009). La desnitrificación procede de manera

escalonada, de tal modo que el NO_3^- es reducido a NO_2^- y finalmente a N_2 . Los procesos más comunes de desnitrificación son los siguientes:



Las bacterias desnitrificantes utilizadas en biotecnología ambiental, son quimiótrofos que pueden utilizar donadores de electrones orgánicos e inorgánicos. Los que utilizan donadores de electrones orgánicos son heterótrofos y están ampliamente distribuidos entre las Proteobacterias, un grupo más limitado de autótrofos puede utilizar hidrógeno y azufre.

Diversas interacciones entre BM y desnitrificantes pueden ocurrir en un sistema con cultivos mixtos. En general se cree que la desnitrificación ocurre con preferencia a la metanogénesis, siempre que existan iones NO_3^- en el medio (Lin y Chen, 1995). Tal es el caso de Barker (1941), quien observó que la formación de CH_4 comenzó una vez que desaparecieron los NO_3^- del sistema. El ORP tiene una influencia significativa en la metanogénesis, ante la presencia de óxidos de nitrógeno el ORP aumenta, esto puede contribuir a la inhibición de las BM, aunque se sabe que no es la única causa. La formación de NO_2^- contribuye al fallo en la producción de CH_4 (Clarens et al., 1998). A pesar de que las BM y desnitrificantes pueden competir por sustratos como el acetato, también puede existir sintrofia entre las bacterias desnitrificantes productoras de hidrógeno y los metanógenos consumidores de hidrógeno (Zellner et al., 1995).

1.7 Recuperación de metales en reactores anaerobios con lodo granular

Para una implementación exitosa de la tecnología anaerobia se requieren altos niveles de biomasa activa en el sistema, esto se consigue ya sea por inmovilización en portadores inertes o por auto-inmovilización de los microorganismos en agregados de lodos o gránulos. Cada gránulo es una unidad funcional que comprende los diferentes microorganismos necesarios para la degradación metanogénica de la DQO. La granulación puede ser iniciada por la adsorción y adhesión bacteriana a materia inerte, a precipitados inorgánicos y/o entre sí a

partir de interacciones fisicoquímicas y asociaciones sintotróficas; estas sustancias sirven como percusores iniciales para el crecimiento bacteriano posterior. Las bacterias filamentosas tienen también un papel importante en la formación de matrices que posteriormente incrustan otras células, este es el caso de los reactores anaerobios de lecho de lodos de flujo ascendente (UASB). La retención de una alta concentración de biomasa activa, permite la aplicación de altas cargas orgánicas, esto facilita el uso de plantas de tratamiento de aguas residuales económicas y compactas. La mayoría de estas instalaciones están basadas en la formación y mantenimiento de lodos granulares con buena sedimentación en el reactor (McHugh et al., 2004).

La granulación es lenta en este tipo de reactores y el lodo granular se puede disgregar rápidamente bajo ciertas condiciones (Cresson et al., 2006). Más de 1000 unidades UASB están siendo operadas en la actualidad alrededor de todo el mundo, particularmente para el tratamiento de aguas residuales industriales provenientes de residuos de la industria del azúcar, de destilerías y cervecías (Tiwari et al., 2006). Se han realizado diversos proyectos para la recuperación de compuestos a partir de lodo granular en reactores UASB. Lenz et al. (2008) estudiaron la remoción de oxoaniones de selenio de aguas contaminadas (790 $\mu\text{g Se/L}$), tanto en condiciones metanogénicas como sulfato reductoras, con eficiencias de remoción de selenio de 99% en condiciones metanogénicas y 97% en sulfato reductoras, adicionalmente el selenio quedó retenido en la biomasa como selenio elemental y como sulfuro de selenio respectivamente. Hoa et al. (2007) estudiaron la factibilidad de remover plomo a través de un proceso de sulfato reducción en un reactor UASB, la eficiencia de remoción de la DQO fue de 78% y la remoción de SO_4^{2-} de 50%, las eficiencias de remoción de plomo (45-50 mg/L) fueron de entre 85% y 95%.

1.8 Recuperación de metales en reactores de biopelícula con distintos tipos de soporte

Una biopelícula es un ecosistema microbiano asociado a una superficie viva o inerte, ésta ocurre cuando las células planctónicas se adhieren a una superficie o sustrato, formando una comunidad que excreta sustancias exopoliméricas para su protección. Los microorganismos sufren diversos cambios durante su transición de organismos planctónicos a células que son parte de una comunidad compleja. Los microorganismos formadores de biopelículas poseen algunas ventajas sobre los microorganismos suspendidos como son: mayor persistencia dentro

del sistema, mayores tasas de crecimiento, mayor incremento en la actividad metabólica, y mayor resistencia a la toxicidad. Su desarrollo implica cinco etapas: la adsorción inicial de las células a la superficie sólida; la producción de sustancias poliméricas extracelulares; el desarrollo temprano de la arquitectura de la biopelícula; maduración y finalmente la dispersión de las células individuales de la biopelícula (Fernández et al., 2008). Su estructura se ve afectada por una combinación de diversos factores como la disponibilidad de nutrientes, la fuerza de atracción entre la superficie y los microorganismos, la producción de sustancias exopoliméricas y su adhesión intracelular, el crecimiento de los microorganismos, la fuerza de cizallamiento, la temperatura y el pH. Las biopelículas son consideradas como el estilo de vida predominante de los microbios en la mayoría de los ambientes (Ansari et al., 2012). Pueden ser utilizadas en diversas aplicaciones como la purificación de agua, tratamiento de desechos, remediación y remoción de contaminantes tóxicos (Fernández et al., 2008).

Dentro de una biopelícula pueden coexistir distintos ambientes, lo cual puede ser aprovechado para conseguir por ejemplo una nitrificación y desnitrificación simultáneas; además tienen costos energéticos y operacionales menores a los procesos con lodos granulares, debido a que requieren reactores con menor volumen y su operación es simple. Los reactores de biopelícula no requieren un decantador para retener la biomasa ya que ésta no es arrastrada por el paso del agua.

El tipo de soporte de la biomasa influye en la concentración de la misma y en la carga orgánica que se puede alimentar al reactor; se han utilizado como soporte chips de hierro, gránulos poliméricos sintéticos cubiertos con polvo de hierro, partículas de piedra pómez, cuentas porosas de vidrio, polvo de carbón y minerales de silicato (Kaksonen y Puhakka, 2007). Biopelículas en diversos tipos de soporte han sido utilizadas para el tratamiento de aguas residuales que contienen metales pesados, en general las biopelículas que se desarrollan sobre materiales porosos suelen ser más estables y resistentes. Kaksonen et al. (2003) desarrollaron una biopelícula sulfato reductora sobre un soporte de minerales de silicato en un reactor de lecho fluidificado y en un reactor de manto de lodos, para el tratamiento de un agua residual con SO_4^{2-} , zinc y hierro. Sahinkaya y Gungor (2010) desarrollaron una biopelícula sobre soportes de zeolitas en un reactor de lecho fluidificado y una biopelícula sobre un soporte de partículas cuadradas de esponja en un reactor de lecho fluidificado inverso (LFI), para tratar un agua residual sintética con Cu y Zn.

De igual manera se han utilizado distintas configuraciones de reactores para la remoción de metales pesados de aguas residuales. El reactor de lecho fijo por ejemplo, el cual consta de uno o más tubos empacados con partículas de catalizador para mejorar el contacto entre dos fases en un proceso químico. Kousi (2011) utilizó un reactor de lecho fijo y BSR para remover hierro, zinc, cobre y níquel (100-200 mg/L) de un agua residual, con eficiencias de remoción entre el 90-98%. Los reactores de lecho fluidificado evitan la canalización y obstrucción, al fluidificar el soporte en el cual se forma la biopelícula por medio de una recirculación. Se ha reportado que este tipo de reactores retienen la biomasa y permiten altas transferencias de masa y grandes velocidades de reacción. Son adecuados para la remoción de metales, acidez y SO_4^{2-} de un agua residual debido a que la recirculación diluye las concentraciones de la alimentación (Nagpal et al., 2000). Los reactores LFI, además de contar con las ventajas del reactor de lecho fluidificado, permiten recuperar el metal del fondo del reactor separado de la biomasa en una sola etapa. Gallegos-Garcia et al. (2008) utilizaron un reactor LFI con un soporte de polietileno de baja densidad para el desarrollo de una biopelícula sulfato reductora, alimentaron cantidades crecientes de Fe, Cd y Zn con eficiencias de precipitación de 99.7%, 99.3% y 99.4% respectivamente, adicionalmente obtuvieron una eficiencia de remoción de la DQO del 54%. Diversos estudios han demostrado la factibilidad de utilizar reactores UASB, de lecho empacado, lecho fluidificado y LFI para la recuperación de metales pesados.

1.9 Recuperación de metales a partir de la reducción del potencial óxido-reducción por bacterias anaerobias.

El ORP es una medida de la actividad de los electrones, indica además el equilibrio entre especies oxidantes y reductoras, cuanto menor sea la cantidad de agentes oxidantes en el medio, menor o más bajo será el ORP. La distribución espacial de microorganismos aerobios y anaerobios está determinada principalmente por el ORP del ambiente. Los microorganismos aerobios son metabólicamente activos a ORPs positivos, mientras que las bacterias anaerobias sólo pueden desarrollarse en ausencia de cantidades significativas de oxígeno (O_2) y bajo condiciones de ORPs muy reducidos. Algunas formas mueren cuando son expuestas al oxígeno molecular libre en la atmósfera, aunque el grado de resistencia bajo estas condiciones es variable (aerotolerancia).

Cuando se tiene oxígeno en el medio, éste suele ser el receptor final de electrones durante la respiración, sin embargo según disminuye la concentración de oxígeno disuelto, se favorece la reducción de aceptores de electrones alternos, con ORP menor al de oxígeno (Stumm y Morgan, 1996). Las poblaciones que integran una comunidad microbiana transferirán los electrones provenientes de la oxidación del sustrato al aceptor de electrones con el carácter más oxidante disponible. Es decir, seleccionarán de los aceptores de electrones disponibles aquel que les permita mayor ganancia energética de la oxidación del sustrato orgánico. En la Figura 1.3 se observa que bajo condiciones anaerobias el NO_3^- es el aceptor de electrones más oxidante. Al agotarse, el SO_4^{2-} se convierte en el aceptor de electrones. En consecuencia las BM demuestran menor eficiencia de utilización y mayor demanda de consumo del sustrato que las bacterias desnitrificantes y que las BSR, pero trabajan a ORPs menores. Si se tiene un reactor anaerobio para el tratamiento de aguas residuales, las bacterias anaerobias se encargarán de tener un ambiente con un ORP reductor ($\text{Eh} < 0$).

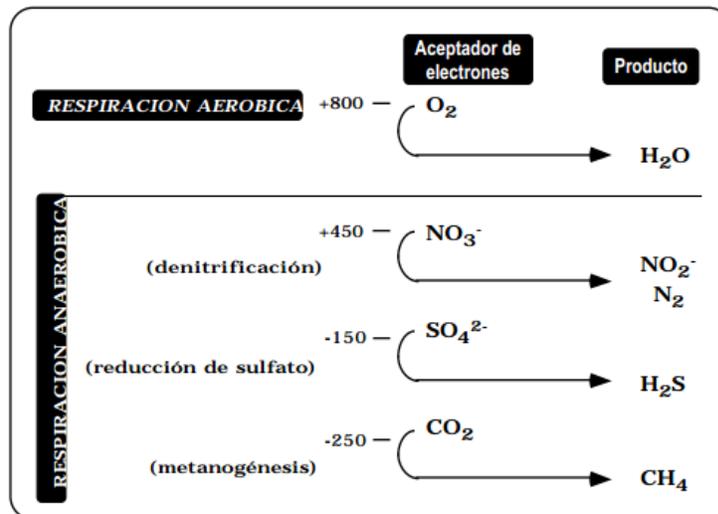


Figura 1.3. Perfil vertical del potencial redox (mV) en sedimentos (Fuentes y Massol-Deyá, 2002)

En sistemas naturales anaerobios, las condiciones reductoras están ligadas a la actividad microbiana de los sedimentos, y la combinación de estos factores controla el destino de diversos contaminantes. En algunos sistemas, las condiciones oxidantes o reductoras son creadas para lograr la remediación de sitios contaminados.

Los microorganismos anaerobios llevan a cabo su actividad metabólica a ORPs (-100 a -300 mV) en los cuales diversos metales pueden ser encontrados en su forma metálica. Existen algunos estudios que han evaluado la remoción de metales pesados a través de procesos biológicos, en donde el ORP tiene un papel importante. Tal es el caso de Couillard et al. (1994), quienes estudiaron el efecto del ORP en la solubilización del cobre y zinc proveniente de lodos residuales, en tanques de mezcla perfecta. Suzuki et al. (2014) estudiaron cómo diferentes condiciones redox pueden afectar la cinética de remoción de cobalto y zinc, de agua de mareas a partir de sedimentos de manglares. Anderson y Lovley (2002) discutieron las interacciones microbianas con el uranio, enfatizando las implicaciones de su reducción. A partir de los diagramas de Pourbaix (Sección 1.4) se pueden tomar decisiones sobre parámetros a modificar para obtener el metal en el estado de oxidación deseado, ya sea mediante una modificación del pH o una modificación del ORP.

Pat-Espadas et al. (2014) realizaron pruebas en lote para estudiar los mecanismos involucrados en la reducción de Pd^{2+} a Pd^0 mediante *Geobacter sulfatorreducens*, una vez que el complejo de paladio interactuó con la membrana celular ocurrió el paso de la reducción y el citocromo reducido entregó electrones para convertirse en oxidado, los análisis por MET y difracción por rayos X confirmaron la formación de Pd^0 NPs con un diámetro promedio de 8.54 nm, la tasa de reducción de Pd^{2+} fue impulsada aplicando cantidades catalíticas de mediadores redox.

La ventaja de utilizar BM en el tratamiento de aguas residuales que contienen Ag^+ , además de la producción de biogás, es que pueden disminuir el ORP a valores negativos, con lo cual la Ag^+ puede transformarse a Ag^0 , mientras que las BSR precipitan la Ag^+ como Ag_2S que requiere tratamientos posteriores para obtener Ag^0 (Vera, 1996).

1.10 Recuperación de nanopartículas metálicas por métodos biológicos

El término nanopartícula hace referencia a todo material o elemento con al menos una de sus dimensiones en un rango de tamaño de 1 a 100 nm (Auffan et al., 2009). Las AgNPs son ampliamente utilizadas debido a que poseen propiedades térmicas, eléctricas, ópticas y bactericidas que las hacen indispensables en el desarrollo tecnológico.

Los métodos biológicos para la síntesis de nanopartículas metálicas han tomado importancia debido a que conllevan menores costos y son más amigables con el ambiente que los métodos

físicos y químicos. Entre la amplia gama de recursos biológicos disponibles en la naturaleza, las bacterias procariotas han sido las más investigadas para la síntesis de nanopartículas metálicas, esto debido a su relativamente fácil manipulación. Bacterias como *Pseudomonas stutzeri*, cepas de *Lactobacillus*, *Morganella sp.*, y *Plectonema boryanum* han sido utilizadas para la síntesis intracelular y extracelular de partículas finas de plata en rangos que van desde 1 hasta 200 nm (Thakkar et al., 2010).

En estudios de tratamiento de aguas residuales con metales pesados mediante digestión anaerobia se han encontrado AgNPs tanto en el efluente como en el lodo granular (Chen et al., 2012). Borja-Maldonado (2014) encontró AgNPs y Ag₂S en el efluente de un reactor LFI, utilizado para el tratamiento de un agua residual con SO₄²⁻ y Ag⁺ por medio de una biopelícula sulfato reductora. Esto demuestra la posibilidad de utilizar el método de digestión anaerobia no solo para la recuperación de metales, sino también para la síntesis de nanopartículas metálicas.

1.11 Caracterización de la comunidad microbiana en cultivos anaerobios

En el proceso de degradación anaerobia de la DQO la biodiversidad es muy compleja, tanto, que se han reportado más de 130 especies en un digestor anaerobio (Magaly et al., 2003). Debido a esto, es de interés establecer la identidad de los grupos fisiológicos presentes en el lodo granular y/o en la biopelícula utilizada en un reactor anaerobio, con la finalidad de identificar las principales especies responsables por la degradación de la DQO, la reducción de los iones metálicos, la disminución del ORP, entre otras. Además es importante identificar las bacterias presentes para un mejor entendimiento y optimización de la actividad metabólica de los diferentes grupos tróficos, para la operación exitosa de los bioreactores anaerobios (Keyser et al., 2007).

Es posible sacar conclusiones en relación con la morfología de una bacteria, examinando una lámina que fue sometida a un proceso de tinción diferencial. Estos criterios morfológicos forman parte de las primeras etapas del proceso de identificación bacteriana, tal es el caso del método de tinción de Gram que permite diferenciar a las bacterias gram-positivas de las gram-negativas, característica ligada a la estructura de su envoltura celular. Actualmente adquiere mayor importancia el uso de métodos basados en biología molecular que a partir de procedimientos y reactivos permiten detectar determinadas secuencias de ADN que son

propias de un determinado agente microbiano. Uno de los más utilizados es el PCR (reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés), que permite aumentar la cantidad de ADN a niveles detectables. Este proceso consta de cuatro etapas que se repiten: 1) Separación de las cadenas de ADN, 2) Adición de cadenas cortas de cebadores o primers que se unen por complementariedad de bases a cada una de las cadenas del fragmento de ADN que se desea amplificar, 3) Disminución de la temperatura para que los primers hibridicen con las cadenas de ADN de la muestra problema y 4) Adición de la ADN polimerasa para que tenga lugar la síntesis de la cadena complementaria. Esto permite la duplicación de la región del ADN deseada. Una vez que se amplifican las secuencias, se detectan por electroforesis o sondas de ADN, y posteriormente se realizan análisis comparativos de la secuencia con bases de datos de ADN para identificar a los microorganismos (Hadidi y Candresse, 2003).

Como alternativa existe la pirosecuenciación, tecnología que permite determinar secuencias de ADN a gran escala, aplicable a genomas completos mediante luminiscencia. Está basado en la monitorización a tiempo real de la síntesis de ADN y es una técnica en la que todos los pasos se realizan “in vitro”. La posibilidad de automatizar y paralelizar el proceso de secuenciación que ofrece esta técnica es una de sus principales ventajas frente a otros métodos de secuenciación, pues permite la secuenciación de grandes cantidades de ADN en menos tiempo que otras técnicas y con un coste menor (Ahmadian et al., 2006).

1.12 Justificación

Existe una demanda creciente para el tratamiento de aguas residuales que ha conducido al desarrollo de nuevas tecnologías para su purificación, siendo de particular importancia las aguas que contienen metales pesados debido a su persistencia en el ambiente (no son biodegradables) y a que diversos iones metálicos son tóxicos o cancerígenos. Frente a regulaciones cada vez más estrictas, los metales pesados son actualmente contaminantes prioritarios. Entre estos metales se encuentra la plata, la cual es vertida a los cuerpos de agua a través de diversas actividades antropogénicas.

Este proyecto representa una alternativa para el tratamiento de aguas residuales que contienen plata mediante la utilización de bacterias anaerobias que degradan sustratos orgánicos como parte de su metabolismo, dicho proceso presenta ventajas frente a los procesos fisicoquímicos comunes como son una baja producción de lodos y menores costos. Por medio de esta

investigación se pretende desarrollar un método económicamente viable que permita no solo disminuir los contaminantes del agua residual, permitiendo su reutilización, sino también la recuperación de Ag^0 que tiene múltiples aplicaciones. Este proceso se basa en la reducción de Ag^+ a su estado elemental por medio de la reducción del ORP, tomando en cuenta que las bacterias anaerobias trabajan en rangos de ORP negativos.

Estudios anteriores reportan la factibilidad de recuperar sulfuros metálicos a partir de BSR, sin embargo la precipitación de sulfuros metálicos tiende a formar precipitados coloidales que causan algunos problemas de separación ya sea en los procesos de filtración o sedimentación. Este proyecto pretende evaluar la recuperación de Ag^0 , en un reactor LFI, favoreciendo el crecimiento de BM; evitando así procesos posteriores para separar el metal del azufre. Este proceso presenta ventajas no solo ambientales, sino también económicas.

1.13 Objetivo

El objetivo principal de esta investigación es evaluar la reducción de Ag^+ a Ag^0 proveniente de un agua residual sintética a partir de una biopelícula anaerobia formada en un reactor LFI. Esto con el fin de desarrollar un proceso económicamente viable para la recuperación del metal y la reutilización del agua.

1.14 Estructura de la tesis

La tesis está dividida en 7 capítulos, los cuales se describen a continuación:

En el capítulo 1 se presenta el origen de la plata, sus características químicas y físicas, su toxicidad y normatividad, así como los procesos biológicos para su recuperación e identificación de microorganismos a partir de pruebas bioquímicas.

En el capítulo 2 se describe la metodología general aplicada en el desarrollo del trabajo experimental.

En el capítulo 3 se presentan los resultados obtenidos de las pruebas en lote donde se expuso a un lodo granular y una biopelícula anaerobia a diferentes concentraciones de Ag^+ , con la finalidad de evaluar si dicho metal puede llegar a causar algún efecto tóxico sobre ellas, así como evaluar la máxima concentración de Ag^+ que pueden soportar.

En el capítulo 4 se presenta el desempeño de un reactor LFI para la reducción de Ag^+ a Ag^0 , en una sola etapa a partir de una biopelícula anaerobia. Y se presenta la identificación de los diferentes tipos de microorganismos adheridos al soporte a partir de pruebas de biología molecular.

En el capítulo 5 se presenta la posible aplicación de las AgNPs biogénicas para su utilización como antibacteriano sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.

Finalmente, en el capítulo 6 se presentan las conclusiones y recomendaciones generales de la investigación realizada en esta tesis.

CAPITULO 2. METODOLOGÍA

2.1 Reactor de lecho fluidificado inverso

Se utilizó un reactor LFI a escala laboratorio (Figura 2.1), el cual está formado por una columna de poliacrílico de 47 cm de longitud y 4 cm de diámetro, con un fondo cónico de 7 cm de longitud y 4 cm de diámetro, la columna tiene un volumen de 725 mL. El reactor fue alimentado (A) por la parte superior de la columna (B) con una bomba peristáltica (F), la solución de AgNO_3 y el medio mineral se alimentaron por separado para evitar la precipitación de la Ag^+ con los iones presentes en el medio. Se utilizó una bomba (G) para la recirculación, la cual permitió fluidificar la biopelícula (C) que se encontraba suspendida en la parte superior del reactor. Junto a la columna se colocó un separador trifásico o bulbo (D), para separar las fases sólida, líquida y gaseosa, y nivelar el flujo del reactor, el cual contenía una salida para recuperar el efluente tratado (E). El fondo cónico del reactor permitió recuperar la plata sedimentada.

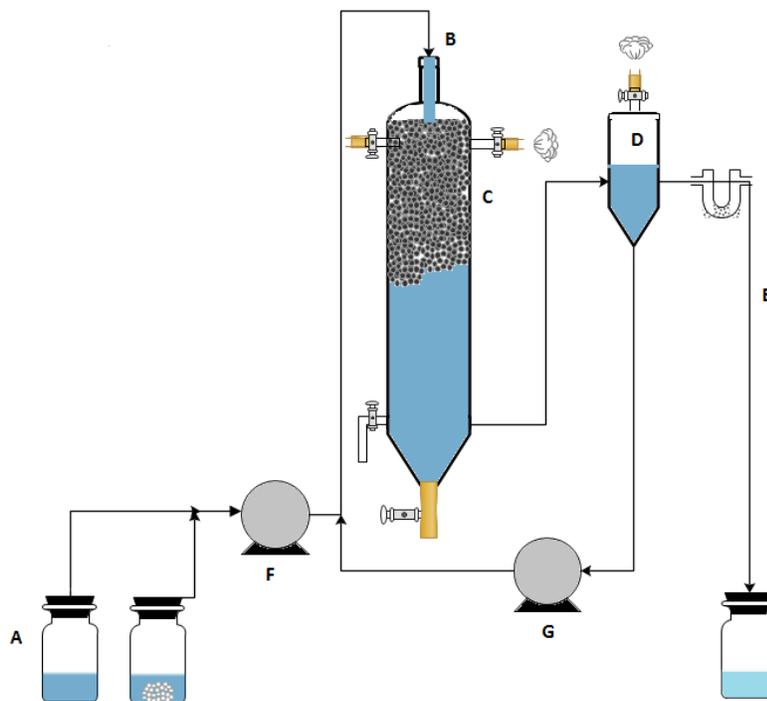


Figura 2.1. Reactor de lecho fluidificado inverso.

El volumen total del reactor, incluyendo el bulbo, mangueras, líneas de alimentación y recirculación fue de 1,120 mL; este reactor fue operado de manera continua a temperatura ambiente (18-28°C), con un TRH de un día.

2.2 Inóculo

El reactor LFI fue inoculado con 60 mL de lodo granular proveniente de la planta de tratamiento de agua residual de Ricolino de la ciudad de San Luis Potosí, México; el cual fue previamente adaptado a condiciones metanogénicas en un reactor UASB. La biopelícula se desarrolló sobre 100 mL de soporte de polietileno de baja densidad (con un diámetro de 0.05 a 0.6 mm) y densidad aparente de 400 kg/m³, el cual fue fluidificado por medio de una velocidad de recirculación de 200 mL/min, hasta alcanzar una expansión de aproximadamente el 40% de la altura total del reactor. El material de soporte fue previamente lijado, hidratado y acondicionado con 0.2 g/L de extracto de levadura y 0.2 g/L de peptona de caseína durante 48 horas, para favorecer la formación de la biopelícula mediante la adhesión de los microorganismos al soporte.

2.3 Medios de cultivo

2.3.1 Medio mineral para el reactor LFI

El reactor se alimentó diariamente con medio mineral basal con la siguiente composición (g/L): (0.43) CH₃COONH₄, (0.015) CaCl₂·2H₂O, (0.2) KH₂PO₄, (0.12) MgSO₄·7H₂O, (0.34) KNO₃, (0.02) extracto de levadura y 1 mL/L de solución de elementos traza. Como donador de electrones se utilizó 1 g DQO/L a partir de una mezcla de etanol y acetato con proporción 80:20. El pH del medio se ajustó a 6.5 con NaHCO₃, debido a que las BM trabajan a pH cercano al neutro y para asegurar la solubilización de los metales.

2.3.2 Solución de elementos traza

La solución de elementos traza tenía la siguiente composición (g/L): (1.50) FeCl₂·4H₂O, (0.10) MnCl₂·4H₂O, (0.50) EDTA, (0.062) H₃BO₃, (0.07) ZnCl₂, (0.036) NaMoO₄·2H₂O, (0.04) AlCl₃·6H₂O, (0.024) NiCl₃·6H₂O, (0.07) CoCl₂·6H₂O, (0.020) CuCl₂·2H₂O, 1 mL de HCl al 36%, (0.10) Na₂SeO₃ y (0.50) de rezasurina como indicador de condiciones redox.

2.3.3 Medio mineral basal para la actividad metanogénica

El medio mineral basal para determinar la actividad metanogénica específica (AME) tenía la siguiente composición (g/L): (0.70) $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, (0.6) K_2HPO_4 , (0.13) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, (0.4) $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, (0.006) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, (0.02) extracto de levadura y 1 mL/L de solución de elementos traza. El pH del medio se ajusta a 6.5 con bicarbonato de sodio (NaHCO_3).

2.4 Actividad metanogénica específica

La AME permite cuantificar la máxima capacidad de producción de CH_4 por el grupo de microorganismos metanogénicos presente en los lodos anaerobios, es utilizada para monitorear la calidad del lodo en reactores anaerobios y para determinar la carga orgánica máxima que puede aplicarse a un sistema. Se define como la velocidad de producción de CH_4 del lodo granular o de la biopelícula, expresado como DQO, bajo condiciones óptimas y con respecto a la biomasa adherida al soporte (SVI) o al contenido de sólidos suspendidos volátiles (SSV) en el lodo granular (g DQO- CH_4 /g SSV-día) (Gallegos-García et al., 2008). Este procedimiento se realizó tanto para el lodo granular como para la biopelícula. Las pruebas se realizaron en botellas serológicas de 60 mL. Cada botella contenía 40 mL de medio mineral basal (Sección 2.3.3), con 1 g de DQO/L de etanol como sustrato. A cada botella se le añadieron (0, 50, 100, 500, 1000 o 2000 mg/L de Ag^+) como AgNO_3 , y el pH del medio se ajustó a 6.5 con bicarbonato de sodio (NaHCO_3). Se adicionó 1 g SSV/L de lodo granular o 5 mL de biopelícula extraída del reactor LFI, de acuerdo con lo que se quisiera monitorear. Las botellas se sellaron con tapones de hule y anillos de aluminio, para equilibrar la fase gaseosa de las botellas a la presión atmosférica se eliminó el exceso de gas de la botella mediante una aguja conectada a una manguera cuyo extremo se encontraba sumergido en un recipiente con agua. Las botellas se incubaron a 30°C y los ensayos se realizaron por duplicado, incluyendo un control sin la adición de sustrato para corregir la producción de CH_4 endógena.

El volumen de CH_4 producido se cuantificó dos veces al día, siempre a la misma hora, hasta que la AME permaneció constante. Para ello se utilizó una botella con solución de NaOH al 3% colocada boca abajo, la cual se conectó mediante una aguja con una manguera a la botella serológica, esto permitió que el biogás producido en la botella desplazara el NaOH a una

probeta graduada que medía los mL producidos (Figura 2.2). La AME se calculó con la pendiente obtenida al graficar el volumen de CH_4 producido con respecto al tiempo, dividida entre la concentración de SVI de la biopelícula o entre la concentración de SSV del lodo granular contenido en la botella.

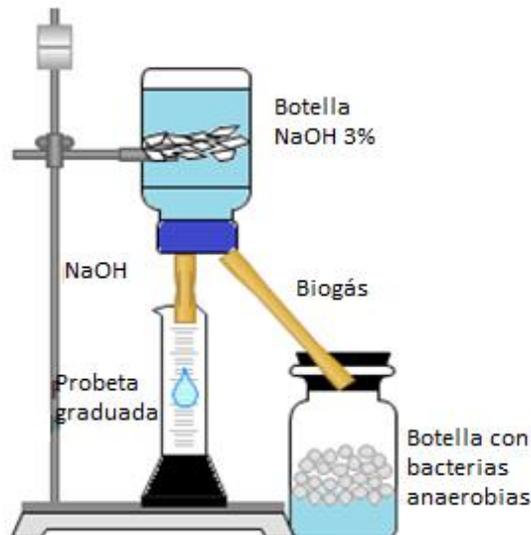


Figura 2.2. Ensayo de actividad metanogénica específica.

2.4.1 Velocidad de producción de CH_4

Las cinéticas de producción de CH_4 de las BM en sistemas en lote, siguen una curva característica similar a la del crecimiento microbiano. Esta curva está constituida por tres fases: la de retardo, otra exponencial y una estacionaria. Dichas curvas caracterizadas por forma de S, permiten establecer la máxima tasa de cambio o velocidad de producción de CH_4 entre la fase de retardo y el estado estacionario. Para calcular la tasa de cambio, los datos experimentales se ajustaron con el modelo de crecimiento sigmoideal de Gompertz que ha sido ampliamente utilizado para crecimiento poblacional, esto mediante el software Origin. Este modelo considera las tres fases de crecimiento, permitiendo disminuir el error y la incertidumbre de cálculo de otros modelos; ha sido utilizado en procesos de fermentación, en la industria alimenticia y en biotecnología ambiental (Labastida, 2007). El modelo de Gompertz que representa la producción de CH_4 en función del tiempo puede ser representado por la siguiente expresión:

$$y = ae^{-e^{-k(x-xc)}} \quad (2.0)$$

2.5 Desempeño del reactor LFI

El desempeño del reactor LFI se monitoreó 3 veces por semana durante su periodo de operación, tomando muestras del afluente y del efluente para determinar las concentraciones de DQO y Ag^+ , la alcalinidad y pH producidos en el sistema, y la disminución del ORP.

2.6 Análisis

2.6.1 Demanda química de oxígeno

La DQO es un parámetro importante para determinar la cantidad de contaminación orgánica en el agua, se define como una medida del equivalente de oxígeno del contenido de materia orgánica de una muestra que es susceptible de ser oxidado. La determinación de la DQO debe realizarse rápidamente después de la toma de muestras para evitar la oxidación natural. El análisis de DQO se determinó por el método de reflujo cerrado, se utilizaron 2 mL de muestra previamente filtrada para eliminar los sólidos (APHA, 1998). En este método se utiliza dicromato de potasio como agente oxidante y Ag_2S como catalizador, con el propósito de cuantificar la muestra oxidada; una vez agregados dichos químicos, la muestra se colocó en un digestor a una temperatura de $150^{\circ}C$ por 2 horas en tubos de vidrio cerrados marca HACH. La concentración de DQO se midió en un espectrofotómetro UV visible (HACH modelo DR/4000) a una longitud de onda de 600 nm, la absorbancia leída se relacionó con la cantidad de DQO presente en la muestra mediante una curva de calibración estándar de 0 a 1 g DQO/L. Estos ensayos se realizaron por duplicado y se incluyó un control con únicamente agua destilada.

2.6.2 Alcalinidad y pH

Para determinar el pH y la alcalinidad se tomó una muestra de 20 mL del efluente del reactor. El pH se midió con un potenciómetro marca HANNA modelo hi 223m equipado con un electrodo, el cual fue previamente calibrado con soluciones buffer de pH 4.0 y 7.0. La alcalinidad se determinó titulando los 20 mL de la muestra con ácido clorhídrico (HCl) 0.1

M, se llevó hasta un pH de 5.8 para cuantificar la alcalinidad por bicarbonato ($\text{mg CaCO}_3/\text{L}$), y posteriormente hasta un pH de 4.3 para determinar la alcalinidad por ácidos grasos volátiles. (APHA, 1998).

2.6.3 Potencial óxido-reducción

La medición del ORP se realizó con un potenciómetro equipado con un electrodo de potencial marca Cole-Parmer modelo Oakton Ion 700, para ello se tomó la muestra de un lado de la columna del reactor y se midió inmediatamente, sin permitir la entrada de oxígeno en la muestra para evitar interferencias en los resultados.

2.6.4 Determinación de sólidos suspendidos volátiles y sólidos volátiles inmovilizados

Los SSV, sólidos suspendidos totales (SST) y sólidos suspendidos fijos (SSF) en el lodo granular se determinaron por el método gravimétrico de acuerdo con el método estándar (APHA, 1998). Se utilizaron cápsulas de porcelana a peso constante, a las cuales se les agregaron entre 2 y 3 gramos de lodo granular, los SST se midieron después de secar las cápsulas en la estufa a 102°C durante 12 horas, los SSF se determinaron después de estar 30 minutos adicionales en la estufa a 550°C , tiempo en el cual se calcina el residuo seco. Los SSV se calcularon mediante la diferencia entre los SST y los SSF.

La cantidad de sólidos volátiles adheridos al soporte se determinaron por gravimetría, de acuerdo con el método estándar (APHA, 1998), estos se reportan como masa de sólidos volátiles inmovilizados (SVI) por volumen de soporte (g SVI/Ls). La biopelícula utilizada para la AME en las botellas serológicas, se desprendió del soporte al colocar las botellas con biopelícula y agua desionizada sin el anillo de aluminio en un baño sónico. Una vez finalizada la sonicación, se sustrajo el líquido de la botellas y se filtró a vacío, haciendo pasar el líquido por un filtro de fibra de vidrio de 0.1 μm de tamaño de poro colocado sobre un crisol gooch a peso constante. Este procedimiento se repitió hasta que el soporte quedó completamente limpio. Los crisoles se secaron en la estufa a 105°C durante 1 hora y se calcinaron en la mufla a 550°C para determinar los gramos de SVI por litro de soporte.

2.6.5 Eficiencia de remoción de nitratos

La medición de la remoción de NO_3^- se realizó por medio del método normalizado para el análisis de aguas potables y residuales (APHA, 1998), las cantidades iniciales se obtuvieron de forma estequiométrica a partir de la cantidad de Ag^+ añadida a cada botella como AgNO_3 (por cada 107.87 g de Ag^+ se tienen 62 g de NO_3^-), los datos se muestran en la Tabla 2.1

Tabla 2.1 Concentración inicial de NO_3^- en cada botella.

Iones	Concentración mg/L				
Ag^+	50	100	500	1000	2000
NO_3^-	28.7	57.5	287.4	574.8	1149.5

2.7 Caracterización del efluente

Se determinó la concentración de Ag^+ en el efluente con un potenciómetro equipado con un electrodo de ion selectivo de plata marca Cole-Parmer modelo Oakton Ion 700, la muestra se cubrió con papel aluminio para evitar que la Ag^+ se oxidara con la luz para evitar interferencias en la lectura. La concentración de metales en solución se determinó además con un espectrofotómetro de absorción atómica marca Varian spectra AA220, utilizando soluciones estándar de Ag^+ .

2.8 Caracterización del residuo recuperado: microscopía electrónica de barrido y microscopía electrónica de transmisión.

El precipitado metálico se caracterizó por microscopía electrónica de barrido (MEB), las muestras se observaron y analizaron en un microscopio electrónico marca JEOL modelo JSM-6610lv, equipado con un espectrómetro de rayos-X por dispersión de energía (EDAX), para ello se colocaron en un porta-muestras de aluminio recubierto con oro. Las micrografías se realizaron con el uso de un detector de electrones disperso a 20 kV. El efluente del reactor fue caracterizado por microscopía electrónica de transmisión (MET) a 100 kV, en un

microscopio marca JEOL modelo JEM-1230 equipado con EDAX, para el análisis se utilizó una rejilla de cobre.

2.9 Caracterización de la biopelícula

2.9.1 Extracción de ADN de la biopelícula anaerobia

El ADN aislado tiene un alto nivel de pureza que permite obtener una amplificación PCR exitosa de los organismos de una muestra. Para el aislamiento del ADN genómico de la biopelícula anaerobia se utilizó el kit de extracción Powersoil®DNA (Mobio, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para confirmar la extracción del ADN se utilizó electroforesis en gel de agarosa; para ello se pesaron 1.5 g de agarosa y se disolvieron en 100 mL de buffer TAE 1x, la solución se introdujo al microondas por dos minutos, se enfrió y posteriormente se le añadieron 0.4 ul de SYBR®Safe, una vez hecho esto se dejó solidificar. A continuación se añadieron 4 ul del ADN extraído y el gel se corrió a 90 V durante 20 minutos. El gel se analizó en el transiluminador y fotodocumentador Gel Doc™ XR+ System con Image Lab Software (Bio-Rad, USA).

2.9.2 Reacción en cadena de la polimerasa

La PCR se ha realizado para detectar una gran variedad de organismos incluyendo bacterias, hongos, algas y actinobacterias. Para la amplificación bacteriana y archaea 16S (V3-V4), se utilizaron 1 uL de los primers 342F y 806R, 12.5 uL de DreamTaq ADN polimerasa, 0.5 uL de buffers P1 y P2, 9.5 uL de H₂O, 1 uL de albúmina de suero bovino (2mg/mL) y 1 uL de ADN. La amplificación comienza con la etapa de desnaturalización, la cual se llevó a cabo a 95°C por 30 segundos, posteriormente se ejecutaron 25 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, hibridación a 55°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 15 segundos. Por último se realizó la extensión final a 72°C por 7 minutos, para asegurar que cualquier ADN de cadena simple restante fuera totalmente ampliado; estas operaciones se realizaron en un termociclador Veriti™ de 96 pocillos (Applied Biosystems, USA), y se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% a 90V por 20 minutos.

2.9.3 Pirosecuenciación

El ADN aislado se utilizó para la identificación de microorganismos mediante pirosecuenciación, un método de secuenciación automática. Se basa en la detección en tiempo real de la síntesis de ADN por bioluminiscencia, utilizando una cascada que tras la incorporación de un nucleótido arroja una señal luminosa detectable, el sistema de detección se basa en la liberación de pirofosfato liberado cuando un nucleótido es introducido en la hebra de ADN. La señal se puede conectar cuantitativamente al número de bases añadidas para obtener la secuencia, posteriormente ésta se compara con una base de datos para identificar las especies bacterianas.

La pirosecuenciación se realizó en el laboratorio EcoBioTec del centro CIIMAR (Centro de Investigación Marina y Ambiental) en la Universidad de Porto en Portugal. Para ello se utilizó SILVAngs analysis pipeline (Quast et al., 2013), un servicio de análisis de datos que se dirige principalmente al análisis en gran escala de subunidades pequeñas y grandes (LSU/SSU), ARN ribosomal (rRNA), proyectos de secuenciación de identificación de genes y estudios de metagenoma. El procesamiento de los datos se llevó a cabo en cinco módulos básicos que fueron: alineación, control de calidad, dereplicación, agrupación y clasificación; haciendo uso de las siguientes herramientas: SINA para la alineación de secuencias (Pruesse et al., 2012), CD-HIT para el agrupamiento de las secuencias (Li y Godzik, 2006), BLAST para la clasificación (Camacho et al., 2009) y KRONA para la visualización de los resultados (Ondov et al., 2011).

2.10 Síntesis y actividad antibacteriana de nanopartículas de plata biogénicas.

2.10.1 Biosíntesis y caracterización de las nanopartículas de plata

Para la síntesis de las AgNPs se tomaron 100 mL de líquido proveniente del reactor tras un TRH de 1 día, el cual tenía un valor de ORP de -380 mV y pH de 7.3. Al líquido del reactor se le agregó una solución acuosa de AgNO_3 , lentamente y con agitación, hasta alcanzar una concentración de 2.5 mM de Ag^+ . Para la síntesis se utilizaron botellas selladas a las cuales se les eliminó el exceso de gas mediante una aguja conectada a una manguera, cuyo extremo se encontraba sumergido en un recipiente con agua; la reacción se llevó a cabo durante 24 horas, en ausencia de luz, a temperatura ambiente y con agitación a 120 rpm para asegurar

la reducción completa de los iones Ag^+ . Una vez finalizada la síntesis, la suspensión se centrifugó a 12 000xg por 1 hora y las nanopartículas se resuspendieron en agua desionizada, esto se realizó por duplicado. La concentración de las AgNPs sintetizadas se determinó por espectroscopia de absorción atómica (AAS) en el Laboratorio Nacional de Energía y Geología (LNEG) del Gobierno de Portugal, en la ciudad de Porto. Las AgNPs sintetizadas fueron caracterizadas por espectroscopia UV-Visible en celdas de cuarzo, MEB y MET con la finalidad de visualizar el tamaño y forma de las nanopartículas. En MET las muestras se prepararon agregando una gota de la solución con AgNPs en una gradilla de cobre recubierta de carbón, el microscopio se operó a un voltaje de 100 kV. Antes de utilizar las AgNPs en las pruebas antibacterianas, la solución se filtró con filtros de jeringa (Whatman, UK) de 0.25 μm con la finalidad de eliminar cualquier residuo que pudiera interferir en los resultados. La solución con AgNPs se almacenó en frascos ámbar, lejos de la luz a 4°C y otra parte fue liofilizada en el Instituto de Metalurgia de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

2.10.2 Actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata biogénicas

2.10.2.1 Cepas bacterianas

Para evaluar la actividad antibacteriana de las AgNPs se utilizaron dos tipos de bacterias *Escherichia coli* CECT 434 (gram-negativa) y *Staphylococcus aureus* CECT 976 (gram-positiva), las cuales fueron tomadas de cultivos de una noche en matraces de 250 mL con 100 mL de caldo Mueller-Hinton (MHB, Merck, Alemania), incubadas a 30°C a 150 rpm (AGITORB 200 ICP, Portugal). Las cepas bacterianas, el material y los reactivos utilizados para las pruebas antibacterianas fueron proporcionados por el Laboratorio de Ingeniería de Procesos, Ambiente, Biotecnología y Energía (LEPABE) de la Universidad de Porto, en Portugal. *E. coli* y *S. aureus* son cepas que han sido comúnmente utilizadas como cepas rutinarias de control de calidad y como referencia para pruebas antimicrobianas y de resistencia bacteriana (Borges et al., 2014).

2.10.2.2 Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida

La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue determinada por el método de microdilución en caldo (Borges et al., 2013). La suspensión bacteriana se obtuvo a partir de las bacterias

cultivadas durante una noche en medio Mueller-Hinton, éstas se ajustaron a una densidad óptica de 0.1 a una longitud de onda de 610 nm en un espectrofotómetro UV-Visible (VWR® V-1200, USA). Se utilizaron placas de microtitulación de 96 pocillos para cada bacteria, a los pocillos se les añadió suspensión bacteriana (180 µL) y solución de AgNPs (20 µL). Para los experimentos se utilizaron distintas concentraciones de AgNPs biogénicas (entre 1.5 y 25 µg/L), con la finalidad de encontrar la mínima concentración que puede causar inhibición en el crecimiento de los microorganismos. Se incluyó un control negativo (medio MH sin bacterias) para descartar contaminación y un control positivo (suspensión bacteriana sin nanopartículas) como referencia del crecimiento bacteriano. Las placas de microtitulación se incubaron durante 24 horas a 30°C en agitación a 150 rpm. Se midió la absorbancia a 610 nm en un lector de microplacas (Synergy™ HT, Biotek, USA) a las 0 horas y a las 24 horas para comparar el crecimiento bacteriano entre el control y los tratamientos con AgNPs. La CMI fue determinada como la menor concentración de AgNPs en la cual no se observó crecimiento bacteriano. Todos los experimentos se realizaron por triplicado para cada bacteria y condición. Para determinar la concentración mínima bactericida (CMB) se tomaron 10 µL de cada pocillo donde se inhibió el crecimiento bacteriano durante la determinación de la CMI y se colocaron en placas de agar (PCA) a 30°C por 24 horas sin agitación, la CMB se definió como la mínima concentración de AgNPs en la cual no hubo formación de colonias en medio sólido, es por tanto aquella concentración donde se inhibió al menos el 99% del crecimiento microbiano. Con este método se evaluó también la interacción entre las AgNPs y un antiséptico, peróxido de hidrógeno (H₂O₂), al utilizarlos simultáneamente en *S. aureus*. El H₂O₂ es un antiséptico general cuyo mecanismo de acción se debe a sus efectos oxidantes ya que produce radicales oxidrilo y radicales libres que pueden atacar los lípidos y proteínas de las membranas celulares de los microorganismos. El objetivo de esta prueba fue observar si al combinar estas sustancias se incrementa su capacidad para inhibir y matar bacterias en comparación con el efecto que tiene cada sustancia por separado. Para ello se determinó la CMI de las AgNPs y del H₂O₂ de manera individual para *S. aureus*, a partir de estos valores se realizaron diluciones y se colocó el 10% de la CMI de las AgNPs con el 10% de la CMI del H₂O₂ en relación 1:1, posteriormente el 20%, 30% y así sucesivamente hasta colocar 80% de la CMI de ambas sustancias en los pocillos de la microplaca, y se procedió a determinar la nueva CMI. Posteriormente se

tomaron 10µl de aquellos pocillos donde no se observó crecimiento bacteriano para determinar la CMB. Esto se realizó para comprobar si su interacción permite disminuir la cantidad de AgNPs y H₂O₂ necesaria para causar daños en las bacterias.

2.10.2.3 Formación de biopelículas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

Las biopelículas fueron desarrolladas de acuerdo con el método para placas de microtitulación modificado por Stepanovic et al. (2000). Para cada bacteria se llenaron al menos 16 pocillos de la placa de microtitulación de 96-pocillos con 200 µL de suspensión bacteriana, formada a partir de cultivos batch de una noche en MHB, la cual fue ajustada a una densidad de 1×10^8 células/mL. La microplaca fue incubada por 24 horas a 30°C y 150 rpm. Se incluyeron pocillos de control negativos con MHB sin suspensión bacteriana.

2.10.2.4 Actividad de control de biopelículas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

Se utilizaron cultivos de una noche con medio Mueller-Hinton (1×10^8 células/mL) que se añadieron a microplacas de titulación durante 24 horas para la formación de biopelículas. Posteriormente el medio fue removido y las biopelículas expuestas a las AgNPs durante 1 hora, a la CMI, 2CMI y el 100% de la solución de AgNPs. De acuerdo con Simões et al. (2010) esto permite evaluar la capacidad de las AgNPs para remover e inactivar biopelículas de *E. coli* y *S. aureus*. Para su análisis las biopelículas fueron raspadas y diluidas en solución salina (10^{-1} - 10^{-6}), la cultivabilidad de las células de las biopelículas fue evaluada en PCA. Se contó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) para platos con >10 y <300 colonias. El total de UFC por muestra se determinó tras incubar los platos de agar durante una noche a 30°C, corrigiendo el conteo de colonias por el factor de dilución. Los resultados fueron expresados como la reducción logarítmica, definida como el log₁₀ negativo del cociente del número de UFC/células viables, antes y después de la exposición a las AgNPs. Una reducción logarítmica positiva representa una disminución en el número de UFC. Para evaluar el efecto que tienen las AgNPs sobre biopelículas más maduras, se realizó el mismo experimento sobre biopelículas de *E. coli* y *S. aureus* de 72 horas. Se realizó también la evaluación del control que tienen las AgNPs sobre biopelículas mixtas (50% *E. coli* y 50% *S. aureus*) para observar si la interacción entre ambas cepas tiene algún efecto sobre la actividad antibacteriana de las AgNPs, en comparación con las biopelículas puras.

2.11 Cálculos

2.11.1 Eficiencia de remoción de DQO

$$\% \text{ Remoción de DQO} = \frac{(DQO_{\text{afluente}} - DQO_{\text{efluente}})}{DQO_{\text{afluente}}} \times 100 \quad (2.1)$$

2.11.2 Actividad metanogénica específica

$$\text{Actividad Metanogénica Específica (AME)} = \frac{m}{V_B * SVI * fc} \quad (2.2)$$

Donde:

m= pendiente de la tasa de producción de CH₄ (L/d)

V_B= volumen de líquido en la botella (L)

SVI=concentración de sólidos volátiles inmovilizados (g SVI/Ls)

fc= factor de conversión de CH₄ a DQO= 0.35 L CH₄/ g DQO

2.11.3 Velocidad máxima de producción de CH₄ (modelo de Gompertz)

$$r_{\text{max}} = 0.386Ak \quad (2.3)$$

Donde:

r_{max}= velocidad máxima de producción de CH₄ (mL/h)

A= máxima concentración de CH₄ producido (mL)

k= constante cinética de primer orden

2.11.4 Determinación de la alcalinidad

$$\text{Alcalinidad por } \frac{\text{CaCO}_3}{L} = \frac{V_{\text{pH } 5.75} * EQ * N}{V_m} \quad (2.3)$$

$$\text{Alcalinidad total} = \frac{V_{\text{pH } 4.3} * EQ * N}{V_m} \quad (2.4)$$

Donde:

V_{pH 5.75} = mL de HCL gastados para obtener un pH de 5.75

$V_{pH\ 4.3}$ = mL de HCL gastados para obtener un pH de 4.3

EQ= peso equivalente de el bicarbonato (50, 000 eq.)

N= normalidad del HCl

V_m = volumen de la muestra (mL)

2.11.5 Cálculo de los sólidos suspendidos totales, fijos y volátiles

$$\text{Sólidos suspendidos totales (SST)} = \frac{B-A}{X} \quad (2.5)$$

$$\text{Sólidos suspendidos fijos (SSF)} = \frac{C-A}{X} \quad (2.6)$$

$$\text{Sólidos suspendidos volátiles (SSV)} = \frac{B-C}{X} \quad (2.7)$$

Donde:

A= Peso constante de la cápsula (g)

B= Peso de la cápsula con el residuo seco (g)

C= Peso de la cápsula con el residuo calcinado (g)

X= Peso del lodo colocado en la cápsula de porcelana (g)

2.11.6 Cálculo de los sólidos volátiles inmovilizados

$$\text{Sólidos suspendidos totales (SST)} = \frac{(G2-G1)}{V} * 1000 \quad (2.8)$$

$$\text{Sólidos suspendidos volátiles (SSV)} = \frac{(G2-G3)}{V} * 1000 \quad (2.9)$$

$$\frac{g_{SVI}}{L} \text{ soporte} = \frac{\left(\frac{g_{SSV}}{L}\right) * (VLB)}{L \text{ soporte}} \quad (2.10)$$

G1= Peso del crisol con el filtro a peso constante (g)

G2= Peso del crisol con el filtro y el residuo seco (g)

G3= Peso del crisol con el filtro y el residuo calcinado (g)

V= volumen de la muestra de soporte (mL)

VLB= volumen de líquido de la botella

2.11.7 Cálculo de las unidades formadoras de colonias

$$\frac{CFU}{mL} = \frac{\#UFC}{d*Vg} \quad (2.11)$$

$$\text{Log} \frac{CFU}{m^2} = \log\left(\frac{CFU/mL}{Ap}\right) \quad (2.12)$$

UFC= número de colonias contadas manualmente en los platos de Agar (>10 y <300).

d= dilución de las biopelículas previamente expuestas al antibacteriano (10^{-1} a 10^{-6})

Ap= Área de cada pocillo de la microplaca de titulación (2.83 cm^3)

Vg= volumen de la gota colocada en el plato de agar (0.01 mL)

CAPITULO 3. EVALUACIÓN DEL EFECTO TÓXICO DE LA PLATA SOBRE UN LODO GRANULAR Y UNA BIOPELÍCULA METANOGENICA.

Resumen

En este trabajo se evaluó el efecto tóxico que ejerce la Ag^+ sobre la producción de CH_4 de un lodo granular y una biopelícula metanogénica. Se realizaron pruebas en lote a diferentes concentraciones de Ag^+ que fueron desde 50 hasta 2000 mg/L, se utilizó etanol como sustrato orgánico y se evaluó la capacidad de las BM para disminuir el ORP y reducir Ag^+ a Ag^0 . Se obtuvieron eficiencias de remoción de Ag^+ por encima del 98% en el caso del lodo granular y entre 85-98% en la biopelícula. La máxima eficiencia de remoción de la DQO fue de 92% en el caso del lodo granular y de 97% en la biopelícula. El análisis elemental del residuo recuperado por MEB-EDAX confirmó la presencia de Ag^0 en ambos casos. En este estudio se reporta la factibilidad de utilizar el proceso de digestión anaerobia para la recuperación de Ag^0 de aguas residuales.

Palabras clave: plata, lodo granular, biopelícula, potencial óxido-reducción, actividad metanogénica específica.

3.1 Introducción

Diversos ambientes acuáticos naturales se encuentran contaminados por metales pesados, sin embargo los métodos de depuración en uso no siempre son adecuados, por ello la inmovilización de metales a través de la reducción y precipitación microbiana constituye una alternativa adecuada. Los microbios facilitan la remoción de metales del agua por su habilidad para complejar y precipitar metales, las interacciones que ocurren en el proceso son la unión del metal a la superficie de las células microbianas y capas exopoliméricas, captación intracelular y la precipitación del metal mediante reacciones redox (Pepper et al., 2009). Entre estos metales se encuentra la plata, la cual ha incrementado en el agua debido a actividades como la joyería, electrónica, medicina y fotografía, siendo la última la principal fuente de Ag^+ residual (Wang et al., 2003). La exposición a altos niveles de Ag^+ puede ocasionar problemas respiratorios, anomalías cardíacas y daños al sistema nervioso en el hombre, así como efectos tóxicos en plantas y animales acuáticos (EPA, 1992), por ello es fundamental removerla de las aguas residuales.

Una opción es el proceso de digestión anaerobia, el cual se basa en la degradación de la DQO a partir de diferentes grupos tróficos bacterianos que trabajan en sintrofia para mineralizar el sustrato orgánico de forma secuencial. Entre éstos grupos se encuentran las bacterias acetogénicas que producen acetato a partir de sustratos como el etanol y las BM que transforman un número limitado de sustratos simples como acetato e hidrógeno en CO_2 y CH_4 . Este tipo de bacterias son capaces de reducir el ORP del medio acuoso a valores por debajo de -100 mV, bajo estas condiciones de ORP diversos metales pueden ser reducidos de su estado iónico a estado metálico (Deublein y Steinhauser, 2011). Una implementación exitosa de esta tecnología requiere la retención de altos niveles de biomasa activa en el sistema, ya sea por autoinmovilización de los microbios en forma de gránulos o por su inmovilización en soportes inertes.

El lodo granular se forma por la autoinmovilización de bacterias anaerobias en ausencia de un material de soporte. Entre las desventajas del lodo granular se encuentran largos periodos de arranque debido al tiempo requerido para la granulación anaerobia, y el mantener una buena estructura del lodo granular durante el tratamiento de sustancias más complejas. Las presiones ejercidas en los gránulos pueden llevar a su desintegración, lo que ocasiona problemas de lavado del lodo. Los cambios en el pH, en el balance de nutrientes o la presencia de compuestos

tóxicos en el influente también puede dañar la estructura del gránulo y por lo tanto reducir la eficiencia del proceso. Por lo general se busca que el lodo tenga una buena capacidad de sedimentación para que permanezca dentro de los reactores UASB, sin embargo esto dificulta recuperar productos valiosos del fondo del reactor, como es el caso de la plata. Fude et al. (1994) utilizaron un consorcio de BSR obtenido de aguas residuales provenientes de acabados metálicos para reducir Cr^{6+} a Cr^{3+} mediante pruebas en lote, obtuvieron eficiencias de remoción de Cr^{6+} de 80-95% a partir de concentraciones iniciales entre 50 y 2000 mg/L, lo cual resultó en la disminución del ORP del medio que atribuyen a la actividad y crecimiento activo de las BSR. Pat-Espadas et al. (2016) realizaron pruebas en lote con lodo granular metanogénico para reducir Pd^{2+} a Pd^0 , sus resultados indican que la remoción de Pd^{2+} puede deberse no solo a su reducción sino también a su adsorción en la biomasa microbiana.

Las biopelículas que se forman sobre soportes inertes permiten mejorar la retención de sólidos y eliminar lodos residuales de la biomasa, por lo general las que se desarrollan sobre materiales porosos suelen ser más estables y resistentes, además entre más pequeñas sean las partículas del soporte mayor será su área superficial. Un factor fundamental para la formación de este tipo de biopelículas es el tipo de soporte, debido a que afecta la concentración de biomasa y la carga orgánica que puede soportar un sistema. El soporte elegido debe favorecer la adhesión de los microorganismos, tener alta resistencia mecánica y ser económico (Kaksonen y Puhakka, 2007). La modificación de ciertos parámetros durante la formación de la biopelícula, como el tipo de soporte o la velocidad de agitación, puede favorecer la proliferación de los microorganismos de interés. Adicionalmente, la formación de biopelículas sobre soportes inertes de baja densidad permite que ésta flote en la parte superior del sistema, lo que permite recuperar metales que sedimenten al fondo, separados de la biomasa. Además de ser resistentes, las biopelículas pueden secuestrar minerales, nutrientes y metales de la fase líquida con la que se encuentran en contacto. Se cree que su tolerancia a altas concentraciones de metales pesados se debe a que protegen a las células al retener los metales pesados y retardar su difusión dentro de la biopelícula, y al inmovilizar ciertos metales pesados por medio de una reducción enzimática (Van Hullebusch et al., 2003). Por estas razones han sido utilizadas en estudios como el de Tucker et al. (1998), quienes utilizaron BSR inmovilizadas en gel de poliácridamida para reducir y remover Cr^{6+} , Mo^{6+} , Se^{6+} y U^{6+} de una solución por medio de reacciones enzimáticas en pruebas en lote, como resultado obtuvieron eficiencias de remoción

de los metales de entre el 86 y 96% debido a que precipitaron como sulfuros metálicos. Borja-Maldonado (2014) reportó la reducción de Ag^+ a Ag^0 por la disminución del ORP a valores por debajo de -200 mV, esto en pruebas en lote a partir de una biopelícula sulfidogénica expuesta a diferentes concentraciones de Ag^+ . Sin embargo son pocos los trabajos en los cuales se ha estudiado el efecto del ORP para la recuperación de metales a partir de BM, particularmente de la Ag^+ debido a que se pensaba que su remoción a partir de microorganismos anaerobios no sería factible por sus propiedades antibacterianas, no obstante algunos ensayos han demostrado la resistencia bacteriana a dicho metal. Liang et al. (2010) evaluaron el efecto de AgNPs en un lodo activado de una planta de tratamiento de aguas residuales y mediante experimentos en lote encontraron que a 1 mg/L de Ag total las AgNPs inhibieron la nitrificación un 41.4%, mientras que la Ag^+ la inhibió solo un 13.5%.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto tóxico de diferentes concentraciones de Ag^+ sobre la cinética de producción de CH_4 de dos sistemas biológicos metanogénicos (lodo granular y biopelícula) y comparar el comportamiento de ambos. También se pretende asegurar la reducción de Ag^+ a Ag^0 por medio de la disminución del ORP, con la finalidad de proponer una alternativa para la recuperación de metales pesados de aguas residuales.

3.2 Métodos y metodología

3.2.1 Lodo granular metanogénico

El lodo granular provino de la planta de tratamiento de aguas residuales de la empresa Ricolino S.A. de C.V., en San Luis Potosí, México. El lodo se acondicionó previamente a metanogénesis en un reactor UASB en el Laboratorio de Tratamiento de Aguas Residuales de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

3.2.2 Formación de la biopelícula

Para desarrollar la biopelícula se utilizó un reactor LFI a escala laboratorio como el de la Figura 2.1, al cual se añadieron 100 mL de partículas de polietileno de baja densidad como material de soporte. El reactor se inoculó con 60 mL del lodo granular previamente descrito y se alimentó con agua residual sintética conformada por medio mineral basal (Sección 2.3.1), con

una mezcla etanol-acetato 80:20 como sustrato, a una carga orgánica de 1 g DQO/L-d. El reactor se operó a temperatura y presión ambiente, y a un TRH de un día.

3.2.3 Determinación de la actividad metanogénica de los sistemas biológicos expuestos a plata

Para las pruebas en lote se utilizaron botellas serológicas de 60 mL con 40 mL de medio mineral basal. A cada botella se le añadieron 1 g SSV/L de lodo granular o 5 mL de biopelícula proveniente del reactor LFI después de 94 días de operación, 1 g de DQO/L con etanol como sustrato y diferentes concentraciones de Ag^+ (50, 100, 500, 1000 y 2000 mg/L) como AgNO_3 . Al finalizar la actividad se intercambié el medio con uno fresco para evaluar el grado de recuperación de los microorganismos y el efecto tóxico de la Ag^+ sobre las BM. Los resultados de la actividad se utilizaron para realizar un ajuste utilizando el modelo de crecimiento sigmoideal de Gompertz (Escot, 2014) con la finalidad de obtener la r_{\max} y la máxima producción de CH_4 .

3.2.4 Medios de Cultivo

El medio de cultivo utilizado en los ensayos en lote para determinar la AME se describe en la Sección 2.3.3.

3.2.5 Análisis

Los análisis para determinar la DQO, alcalinidad, pH, ORP, NO_3^- y SVI de las muestras líquidas de las pruebas y el análisis elemental del precipitado recuperado por MEB-EDAX, se describen en la Sección 2.6 y 2.8.

3.3 Resultados y discusión

3.3.1 Cinética de producción de CH_4 en presencia de Ag^+

Al inicio de la actividad el ORP del medio era oxidativo (entre 290 y 400 mV), a mayores concentraciones de Ag^+ inicial se tenía un valor de ORP mayor, esto debido a la cantidad de especies oxidadas introducidas al sistema al añadir Ag^+ como AgNO_3 (Tabla 2.1). El pH del medio en la alimentación se ajustó a 6.5, con la finalidad de mantener el metal en estado soluble, y debido a que las BM presentan una actividad óptima a pH cercano al neutro.

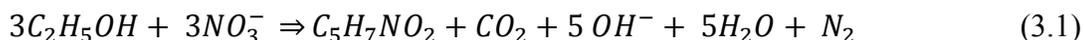
Los resultados de la AME del lodo granular y la biopelícula expuestos a diferentes a concentraciones de Ag^+ y NO_3^- se muestran en las Figuras 3.1 y 3.2 respectivamente. En dichas figuras se muestra un acercamiento de la producción de CH_4 durante las primeras horas de la actividad, donde se observa que las pruebas con mayor concentración de Ag^+ y NO_3^- fueron las primeras en producir CH_4 , mientras que las pruebas sin metal fueron las últimas en producirlo. Este comportamiento podría ser atribuido a que la plata estimula la actividad de los microorganismos o bien a la presencia de NO_3^- como aceptor de electrones en el medio para microorganismos facultativos. Algunos autores sugieren que la presencia de ciertos metales a bajas concentraciones puede estimular la actividad de las bacterias anaerobias que los asimilan como nutrientes y los incorporan en diversas enzimas, con un efecto favorable en la producción de biogás (Lopes et al., 2005; Jain et al., 1992). Yang et al. (2013) estudiaron la respuesta celular y transcripcional de distintas bacterias involucradas en el ciclo del nitrógeno (como la desnitrificante *Pseudomonas stutzeri*) expuestas a Ag^+ añadida como AgNO_3 , mediante ensayos en microplacas de titulación y análisis transcriptómicos encontraron que dosis pequeñas ($20 \mu\text{g/L Ag}^+$) aumentan la viabilidad microbiana, esta estimulación puede ser una respuesta para incrementar las tasas de respiración y obtener más energía, con la finalidad de reparar el daño o superar el estrés, sin embargo a mayores concentraciones ($120 \mu\text{g/L Ag}^+$) el efecto estimulador desapareció. De igual manera Xiu et al. (2012) observaron mediante ensayos de viabilidad que una concentración relativamente baja de Ag^+ ($3\text{-}8 \mu\text{g/L}$), añadida como AgNO_3 , estimuló la supervivencia de *E. coli*.

La producción de CH_4 indica que los consorcios microbianos del lodo granular se encontraban activos y que fueron capaces de disminuir el ORP a condiciones reductoras. Después de 48 h de actividad se midió el ORP en pruebas con 1000 mg/L Ag^+ - 575 mg/L NO_3^- y 2000 mg/L Ag^+ - 1150 mg/L NO_3^- , obteniéndose valores de -90 mV y -110 mV respectivamente, esto podría estar asociado al establecimiento del equilibrio entre el oxígeno presente en la cabeza de aire de la botella y el sustrato incorporado al sistema (etanol). Debido a que la solubilidad del oxígeno en el agua es baja (8.2 mg/L a 25°C), basta con pequeñas cantidades de materia orgánica para eliminar o consumir el oxígeno presente ($\text{CH}_2\text{O} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{bacterias}} \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$). En ausencia de oxígeno los microorganismos anaerobios utilizan los aceptores de electrones con mayor poder oxidante: $\text{NO}_3^- - > \text{SO}_4^{2-} > \text{H}_2\text{O}$ (Wang et al., 2010). Si más de un aceptor de electrones está presente en el sistema, se utiliza primero el que proporcione más energía a

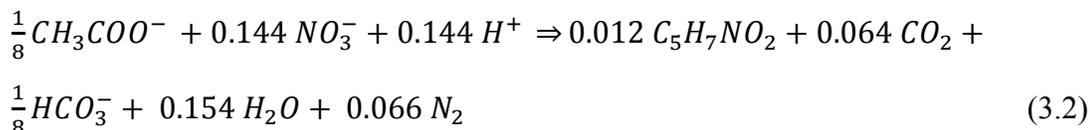
las bacterias, conforme se agota este aceptor de electrones el ORP del medio comienza a disminuir y se utiliza el siguiente aceptor de electrones disponible; por lo que después del agotamiento del oxígeno disuelto y los oxianiones de nitrógeno, la sulfato reducción y metanogénesis tienden a ocurrir en secuencia (Strevett et al., 2002). En la desnitrificación biológica, el oxígeno combinado en el NO_3^- , puede ser utilizado como una fuente de oxígeno para las bacterias, y el nitrógeno reducido escapa como nitrógeno molecular (N_2) del licor mezclado. En este proceso se oxidan los sustratos orgánicos y como resultado el ORP disminuye, sin embargo el ORP exacto que desencadena la desnitrificación varía según la química del agua, particularmente del pH, por lo tanto los valores de ORP para la desnitrificación pueden variar entre 100 mV y -100 mV dependiendo de la situación (Yoon, 2015). Este rango de potencial concuerda con el valor de ORP medido durante las primeras 48 h de la actividad en este estudio, lo que indicó la posibilidad de que la reducción de Ag^+ a Ag^0 también hubiera ocurrido durante las primeras horas, esto se constató al encontrar eficiencias remoción de Ag^+ de 98% para ambos sistemas biológicos. Diversos estudios hablan sobre la reducción de compuestos en periodos cortos de tiempo. Khijniak et al. (2003) utilizaron bacterias halófilas anaerobias para reducir pertecnetato de sodio en condiciones alcalinas y descubrieron que después de 1-3 días de incubación, aproximadamente el 60% del TcO_4^- presente había sido reducido a Tc^{5+} y Tc^{4+} . Por su parte, Espinoza (2013) realizó pruebas en lote con BSR para remover cromo de aguas residuales, en la pruebas de 20 a 125 mg/L observó que la reducción y eliminación del metal se llevó a cabo durante las primeras 10 h de actividad sulfato reductora.

Una vez que la DQO es oxidada biológicamente, el flujo de electrones contribuye a la reducción química del metal, en este caso Ag^+ a Ag^0 . Algunas de las reacciones involucradas en estos sistemas complejos de consorcios microbianos que podrían generar la reducción de Ag^+ en el medio son:

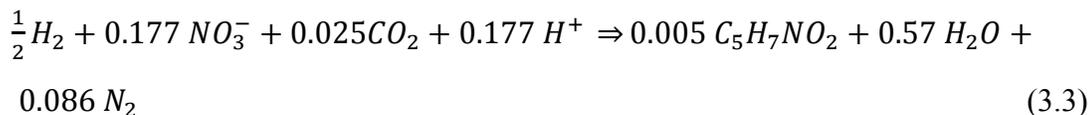
- Reducción de NO_3^- a partir de etanol por desnitrificación (Matějů et al., 1992):



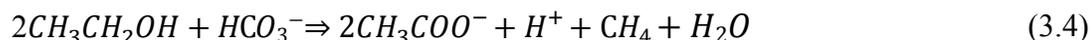
- Reducción de NO_3^- a partir de acetato por desnitrificación (Rittman y McCarty, 2001):



- Reducción de NO_3^- a partir de hidrógeno por desnitrificación (Rittman y McCarty, 2001):



- Oxidación del etanol por metanogénesis (Burlage et al., 1998):



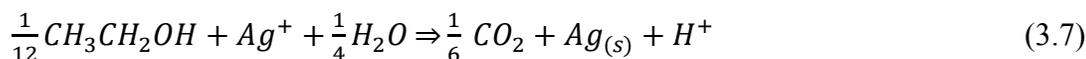
- Oxidación del acetato por metanogénesis (Thauer et al., 1977):



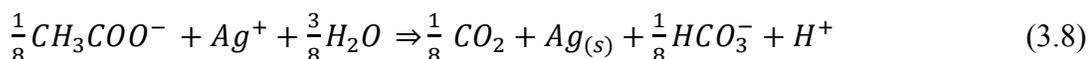
- Oxidación del hidrógeno por metanogénesis (Stumm y Morgan, 1981):



- Reducción de Ag^+ a partir de etanol (Rittman y McCarty, 2001):

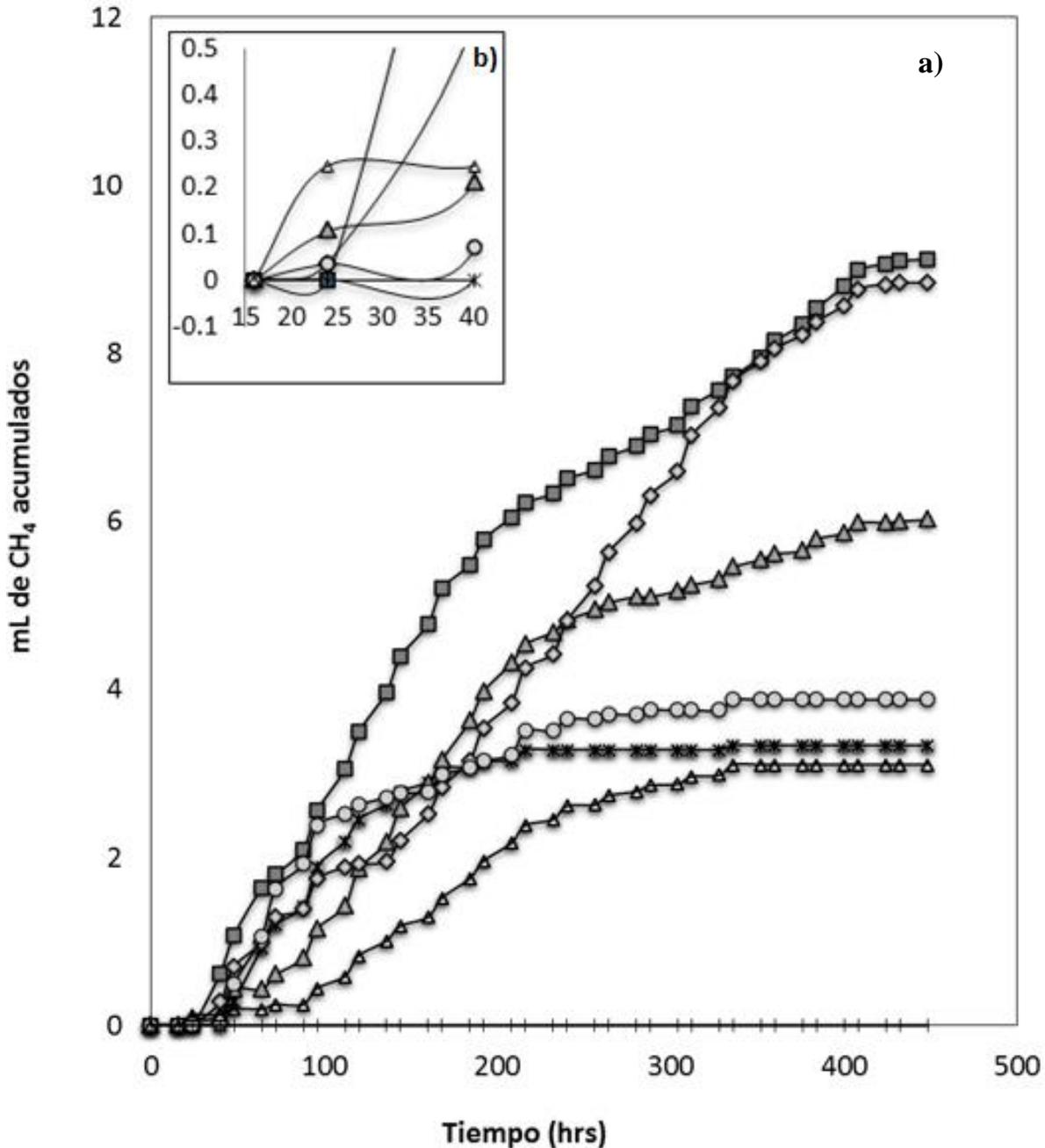


- Reducción de Ag^+ a partir de acetato (Rittman y McCarty, 2001):



De acuerdo con las reacciones anteriores, lo primero que ocurriría en el sistema sería la degradación del etanol por medio de la desnitrificación, debido a que los NO_3^- son el aceptor de electrones con el carácter más oxidante, posteriormente podría ocurrir la oxidación del etanol por medio de la metanogénesis con el CO_2 producido durante la desnitrificación, en este proceso se producen iones acetato los cuales pueden ser oxidados tanto por las bacterias desnitrificantes como por las metanogénicas para producir mayor cantidad de CO_2 o CH_4 respectivamente. El CO_2 restante puede reaccionar con el hidrógeno producido en algunas de las reacciones anteriores para así producir CH_4 y agua. En este proceso la transferencia de electrones durante la oxidación tanto del etanol como del acetato proporciona los electrones necesarios para reducir la Ag^+ a su estado metálico. Esto aporta un panorama general, sin embargo los procesos biológicos son más complejos e involucran otros factores como son los

compuestos del medio mineral basal y mayor variedad de microorganismos como las bacterias acetogénicas, acidogénicas e hidrolíticas que pueden dar lugar a un sinfín de reacciones químicas, entre las que se encuentran las de síntesis celular.



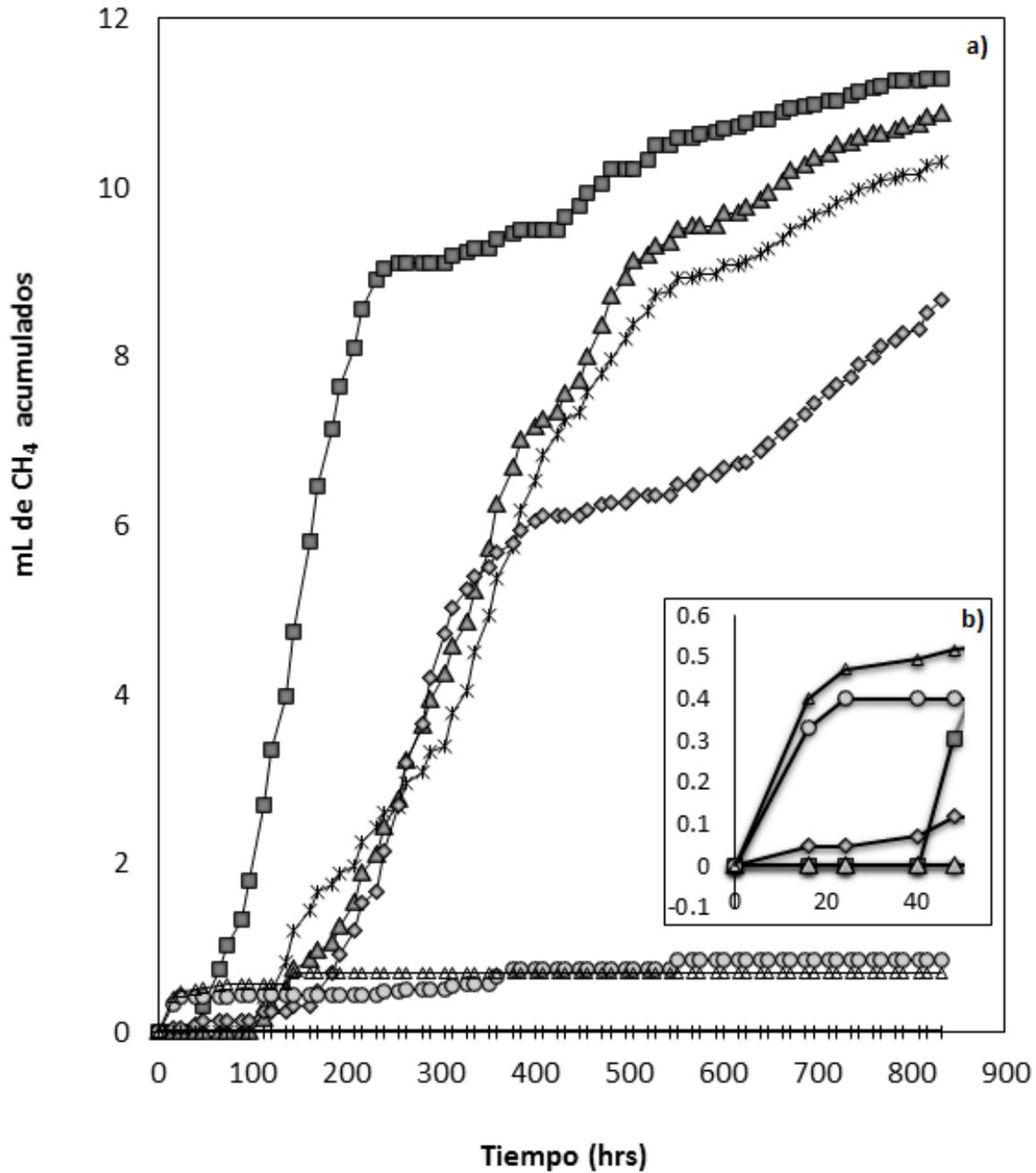


Figura 3.2 a) Producción de CH₄ en experimentos en lote con biopelícula expuesta a Ag⁺. b) acercamiento de las primeras 40 h de la producción de CH₄. Donde control (○), 0 mg/L (■), 50 mg/L (*), 100 mg/L (▲), 500 mg/L (◆), 1000 mg/L (●) y 2000 mg/L (△).

Después de las primeras horas, la producción de CH₄ de las pruebas sin metal fue mayor a la de las pruebas con Ag⁺ y NO₃⁻ en ambos sistemas biológicos hasta finalizar la actividad, esto

indica un efecto adverso en los microorganismos metanogénicos causado por la presencia de estas sustancias, conforme aumentó la concentración de Ag^+ y NO_3^- en el sistema disminuyó la producción total de CH_4 . Esto puede estar asociado a que:

1) Las pruebas expuestas a mayor concentración de Ag^+ están también expuestas a una mayor concentración de NO_3^- , lo que ocasiona un aumento en el ORP en el medio y un posible efecto adverso en las BM que trabajan a un ORP por debajo de -250 mV (Zupančič y Grilc, 2012), además puede haber mayor competencia entre bacterias desnitrificantes y metanogénicas por los sustratos disponibles, al redirigirse los donadores hacia la desnitrificación pueden retrasar y disminuir los rendimientos asociados a la metanogénesis. Banihani et al. (2009) realizaron pruebas en lote para evaluar el impacto de los NO_3^- en la metanogénesis de un lodo granular anaerobio con acetato e hidrógeno como sustratos, en ambos casos la fase lag de la desnitrificación duró aproximadamente 1 día, tiempo durante el cual no hubo impactos significativos en la metanogénesis, sin embargo una vez que comenzó la desnitrificación la inhibición de la metanogénesis fue evidente, siendo más severa a mayores concentraciones de NO_3^- inicial; la fase lag reportada concuerda con el comportamiento de los sistemas biológicos en este estudio, en el cual la producción de CH_4 en las botellas con mayor concentración de NO_3^- se redujo significativamente después de las primeras 24 h de actividad. Del mismo modo, en las pruebas en lote de Percheron et al. (1999) la producción de CH_4 se detuvo cuando comenzó la desnitrificación, concurrentemente se observó un incremento en el ORP. Incluso Yong et al. (2002), que utilizaron BSR para reducir Pd^{2+} a Pd^0 , encontraron que el exceso de NO_3^- fue inhibitorio para la reducción de Pd^{2+} al utilizar formato como sustrato. Se requiere mayor investigación para saber si éste es un fenómeno inhibitorio o competitivo causado por la competición por el sustrato, los cambios del ORP o por envenenamiento de las enzimas (Westermann y Ahring, 1987).

2) Solo algunos microorganismos de la biopelícula son resistentes a Ag^+ , por lo que a concentraciones tan altas del metal el resto de los microorganismos son inhibidos. La toxicidad de los metales pesados durante la digestión anaerobia depende en gran medida de su concentración, considerándose especialmente tóxicos los iones solubles, ya que dentro de las bacterias los cationes metálicos pueden interactuar con componentes como las membranas celulares, proteínas y ácidos nucleicos, dañando a las bacterias (Singh y Tripathi, 2007). Algunos metales pesados pueden favorecer la actividad metabólica de los microorganismos a

bajas concentraciones y durante algún tiempo, sin embargo una vez que dejan de asimilar el metal su metabolismo comienza a verse afectado, de este modo mayores concentraciones del metal pueden resultar tóxicas/inhedorias para los microorganismos (Utgikar et al., 2002). Lopes et al. (2005) evaluaron el efecto del níquel (0.1-85.2 $\mu\text{M Ni}$) en el crecimiento de las BSR en microplacas de titulación, en su estudio el metal afectó positivamente la tasa de crecimiento de las bacterias e incluso aceleró su consumo de sustratos y producción de acetato, la tasa de crecimiento de los microorganismos alcanzó su máximo a una concentración de 8.52 μM , sin embargo a 85.2 μM se inhibió su crecimiento. Además de la concentración del metal, la especie metálica y la especie bacteriana también influyen en la toxicidad de los metales (Lin, 1992).

La producción de CH_4 de los sistemas biológicos expuestos a la concentración máxima 2000 mg/L de Ag^+ -1150 mg/L NO_3^- se mantuvo por debajo del resto, posiblemente debido a un efecto adverso en la actividad metabólica de las BM. Es posible que a mayores concentraciones de NO_3^- exista un predominio de bacterias desnitrificantes, esto interferiría con el siguiente proceso de la secuencia debido a que la cantidad de materia orgánica disponible para la metanogénesis disminuiría significativamente en contraste con los sistemas sin Ag^+ ni NO_3^- . Otra posibilidad es que a estas concentraciones las bacterias estén utilizando los sustratos disponibles para la síntesis y mantenimiento celular con la finalidad de superar el estrés, y no para la producción de biogás.

En las Figuras 3.1 y 3.2 se observa que las pruebas expuestas a 2000 mg/L de Ag^+ -1150 mg/L NO_3^- produjeron CH_4 durante las primeras horas de actividad, tras este tiempo la producción se detuvo, sin embargo en el lodo granular volvieron a producir CH_4 a partir de las 100 h, con lo que se generó una nueva pendiente. Es posible que parte de las BM en el lodo granular sean afines a la Ag^+ , por lo que durante las primeras 25 h de la actividad, el lodo expuesto a una alta concentración de Ag^+ produce mayor cantidad CH_4 que el lodo granular que no fue expuesto al metal, una vez agotada la Ag^+ soluble, por su reducción a Ag^0 debido a la disminución del ORP, las BM que inicialmente fueron inhibidas por la presencia de Ag^+ comenzaron a producir CH_4 . En la biopelícula no se observó esta nueva pendiente, solo hubo un ligero incremento en la producción de CH_4 después de las 100 h, lo que indica menor resistencia de las BM en la biopelícula a la presencia de Ag^+ y NO_3^- . El efecto inhibitorio se vio reflejado en la disminución de la eficiencia de remoción de la DQO, variaciones en el pH y aumento en el ORP del medio.

Numerosos estudios muestran un patrón en la toxicidad metálica, en la cual bajas concentraciones del metal estimulan la actividad hasta que se alcanza un máximo nivel de estimulación, después la toxicidad del metal incrementa conforme aumenta la concentración metálica. En este tipo de estudios se utilizan consorcios y no poblaciones aisladas. Por lo que es posible que este patrón sea resultado de efectos tóxicos diferenciales, donde una segunda población más sensible al estrés causado por el metal compite de alguna manera con la población que expresa la actividad de interés, la inhibición de la segunda población reduce la competencia por los recursos necesitados por la primera población que incrementa su actividad (Mudhoo y Kumar, 2013).

3.3.2 Estimación de las velocidades de producción de CH₄

Los resultados de producción de CH₄ para el lodo granular y la biopelícula expuestos a cada concentración de AgNO₃ fueron ajustados con el modelo sigmoideal de Gompertz. El ajuste permitió estimar la velocidad máxima de producción de CH₄ (r_{max}) en cada condición de concentración de Ag⁺. La r_{max} está expresada en mL CH₄/h y puede ser calculada con los parámetros del modelo con la siguiente expresión:

$$r_{max} = 0.386 Ak$$

Donde (A) es la concentración máxima de CH₄ y (k) es la constante cinética de primer orden (Labastida et al., 2013).

En la Figura 3.3 se muestran los resultados del ajuste con el modelo de crecimiento de Gompertz para el lodo granular en presencia de Ag⁺ y en la Figura 3.4 los resultados del ajuste de la biopelícula. En la Tabla 3.1 se resumen los parámetros de ajuste del modelo, así como las velocidades máximas de producción de CH₄ para cada concentración de Ag⁺.

La fase de retardo es el tiempo en el que los microorganismos se adaptan a las nuevas condiciones del medio y ponen en marcha su actividad metabólica. Corresponde con un periodo de inducción enzimática durante el cual la célula produce las concentraciones de enzimas necesarias para abordar las transformaciones que requiere la asimilación de los nuevos sustratos. La duración de esta fase es variable y en general es mayor cuanto más grande sea el cambio en las condiciones en las que se encuentra el microorganismo (Fernández 2008). Es importante señalar que los cultivos expuestos a mayor concentración de Ag⁺ y NO₃⁻

presentaron mayor tiempo de adaptación (fase de retardo) tanto en el lodo granular como en la biopelícula, esto puede estar relacionado a su efecto inhibitorio sobre los microorganismos y al aumento en el valor oxidativo del ORP que provocan en el medio, lo cual requiere mayor cantidad de energía por parte de las bacterias anaerobias para adaptarse a las condiciones del medio y poder utilizar la energía del sustrato para disminuir el ORP y producir CH₄. Al comparar la fase de retardo entre el lodo granular y la biopelícula se observa que la biopelícula requirió mayor tiempo de adaptación para la producción de CH₄, esto puede ocurrir por las condiciones en las que se encontraban estos sistemas biológicos antes de realizar las pruebas aquí descritas. El lodo granular era operado en lote con adición de nutrientes dos o tres veces por semana, mientras la biopelícula era operada en un sistema continuo y alimentada diariamente de manera gradual, la falta de fluidificación del soporte y de nutrientes constantes que se le proporcionaban dentro del reactor podrían haber retardado su adaptación. Algunos estudios han demostrado que la fase de retardo es afectada no solo por el ambiente de crecimiento, sino también por la historia de las células, las condiciones de crecimiento previo, estrés y el estado fisiológico de las células (Muñoz-Cuevas et al., 2002).

La r_{max} de producción de CH₄ en las pruebas sin Ag⁺ (controles) fue mayor en la biopelícula (0.057 mL CH₄/h) que en el lodo granular (0.032 mL CH₄/h), esto puede deberse a que las biopelículas son más selectivas que los cultivos en suspensión, la diversidad en su consorcio microbiano es influenciada por diversos factores como la composición del afluente y la velocidad superficial del líquido (Castilla et al., 2000), de tal modo que un mejor conocimiento de los microorganismos anaerobios y la formación de biopelículas permite introducir modificaciones para alcanzar comportamientos deseados de microorganismos específicos y su metabolismo. En este caso se promovió la adhesión y proliferación de BM en el soporte fluidificado, las cuales son responsables por la producción de biogás, al utilizar etanol y acetato como sustratos orgánicos y al privar al sistema de la presencia de SO₄²⁻. Sin embargo también pudieron haber proliferado bacterias desnitrificantes por la cantidad de NO₃⁻ añadidos al sistema y por la facilidad que tienen para utilizar tanto el etanol como el acetato como donadores de electrones.

La r_{max} calculada para el lodo granular presenta un decaimiento logarítmico con respecto a las concentraciones de Ag⁺ empleadas, este decaimiento se adapta a un ajuste exponencial (Anexo 5). Esto indica que la exposición a estos iones ejerció un efecto adverso sobre la tasa de

producción de CH₄. En el caso de la biopelícula el efecto adverso fue más evidente, debido a que la r_{max} de las pruebas sin metal fue dos veces mayor que la r_{max} de las pruebas expuestas a diferentes concentraciones de Ag⁺ y NO₃⁻ y fue prácticamente nula a concentraciones de 1000 y 2000 mg/L Ag⁺, lo que sugiere procesos de adaptación más lentos. Estos efectos pueden estar relacionados con la resistencia a la transferencia de masa de la biopelícula y con las variaciones en los metabolismos que se presentan en las fases de retardo calculadas y reportadas por el modelo de Gompertz. En los procesos de biopelícula los sustratos deben atravesar la capa líquida estanca junto a la superficie de la biopelícula y después transportarse a través de ella, fundamentalmente por difusión, hasta la zona en que son consumidos; mientras en el lodo en teoría los sustratos disueltos están disponibles para todas las células. En este caso el soporte sólido de polietileno podría dotar a la biopelícula de cierto espesor, el cual haría decrecer la difusión.

Los valores de la r_{max} en presencia de Ag⁺ fueron similares para ambos sistemas biológicos, sin embargo el lodo granular presentó mayor resistencia a la presencia de Ag⁺ y NO₃⁻ (1000 mg/L Ag⁺-575 mg/L NO₃⁻) que la biopelícula (500 mg/L Ag⁺-287 mg/L NO₃⁻), para concentraciones superiores se observó una etapa de retardo prolongada, con decaimiento en la producción de CH₄ tras las primeras horas. Esto podría estar asociado a un efecto inhibitorio sobre algunas enzimas de las bacterias del consorcio que impidió degradaran la DQO a formas más simples que las BM pudieran metabolizar, ocasionando menores eficiencias de remoción de la DQO. O a la competencia entre la metanogénesis y la desnitrificación que mantuvo un ORP positivo al final de la cinética, afectando así la producción de CH₄.

En una biopelícula los microorganismos consumen sustratos orgánicos y otros nutrientes que se difunden a través de la misma, consecuentemente algunas porciones de la biopelícula pueden sufrir deficiencias de unos u otros componentes, dependiendo de la tasa de difusión relativa, la tasa de reacción y de la estequiometría entre los componentes que reaccionan. Si existen restricciones difusionales puede haber pérdida de actividad microbiana provocada por el desprendimiento de biomasa (Vergara-Fernández et al., 2012). A concentraciones de Ag⁺ y NO₃⁻ mayores puede ocurrir un déficit de sustratos en capas más profundas de la biopelícula (donde generalmente se encuentran las bacterias metanogénicas), lo cual conduciría al desprendimiento y/o inhibición de ciertos microorganismos.

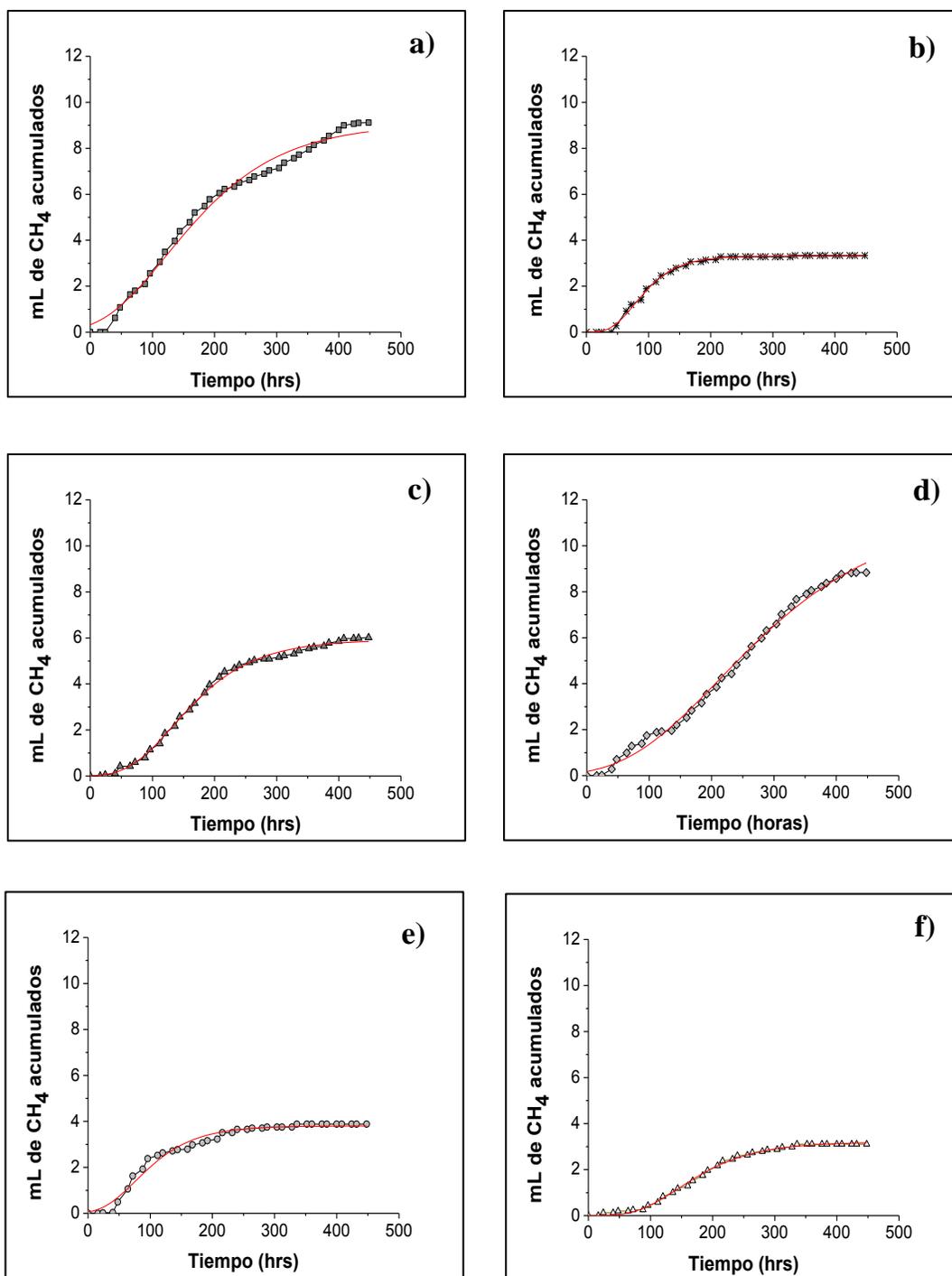


Figura 3.3 Ajustes con el modelo de crecimiento sigmoideal de Gompertz del lodo granular en presencia de Ag⁺. Donde 0 mg/L (■), 50 mg/L (*), 100 mg/L (▲), 500 mg/L (◆), 1000 mg/L (●) y 2000 mg/L (△).

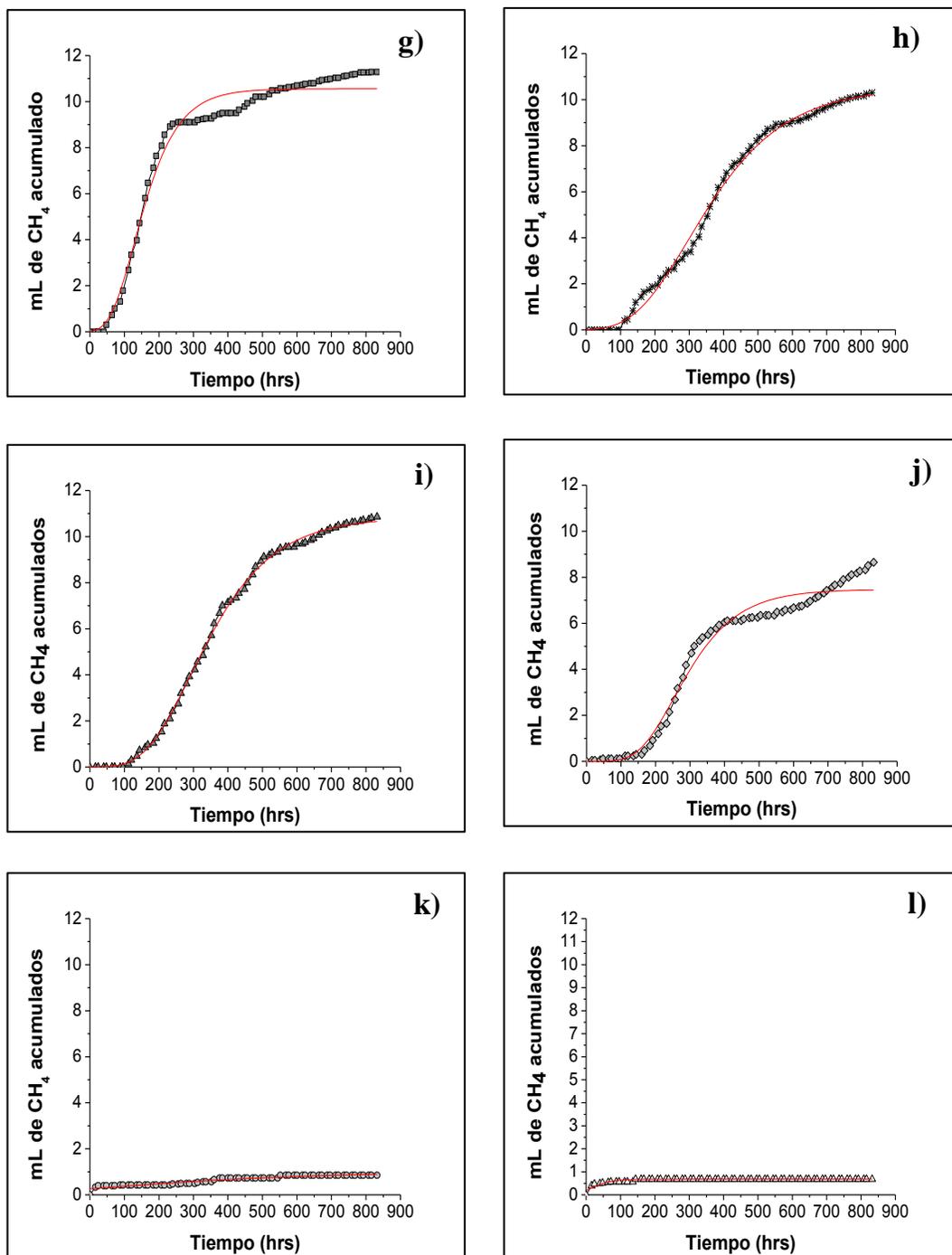


Figura 3.4 Ajustes con el modelo de crecimiento sigmoideal de Gompertz de la biopelícula metanogénica en presencia de Ag⁺. Donde 0 mg/L (■), 50 mg/L (*), 100 mg/L (▲), 500 mg/L (◆), 1000 mg/L (●) y 2000 mg/L (△).

Tabla 3.1 Parámetros cinéticos obtenidos del modelo de crecimiento sigmoidal de Gompertz en presencia de Ag^+ para el lodo granular y la biopelícula metanogénica.

		Ag^+ (mg/L)	A (mL CH_4)	k (h^{-1})	r_{max} (mL CH_4/h)	t_c (h)	R	Fase Lag (h)
Lodo Granular	A	0	9.08	0.009	0.032	122.7	0.987	24
	B	50	3.31	0.027	0.034	77.5	0.997	40
	C	100	5.92	0.014	0.032	133.1	0.997	40
	D	500	11.4	0.007	0.031	213.0	0.995	24
	E	1000	3.80	0.019	0.028	76.1	0.978	40
	F	2000	3.20	0.015	0.019	144.8	0.997	88
Biopelícula	G	0	10.56	0.014	0.057	128.9	0.980	40
	H	50	10.56	0.006	0.024	296.3	0.995	96
	I	100	10.84	0.008	0.033	292.0	0.999	96
	J	500	7.47	0.01	0.029	253.0	0.975	160
	K	1000	1.01	0.003	0.001	99.0	0.910	-
	L	2000	0.68	0.029	0.008	8.6	0.860	-

Cabe señalar que en la biopelícula expuesta a mayores concentraciones de Ag^+ y NO_3^- se observó el desprendimiento de los microorganismos adheridos al soporte, esto se evidenció mediante la determinación de los SVI. Al iniciar la cinética se tenían 1.08 g SVI/Ls en la biopelícula y al finalizar la actividad este valor disminuyó a 0.78 y 0.6 g SVI/Ls en las pruebas de 1000 mg/L Ag^+ -575 mg/L NO_3^- y 2000 mg/L de Ag^+ -1150 mg/L NO_3^- respectivamente; esto señala efectos adversos en la síntesis celular que conducen al decremento en la degradación de la DQO y en la producción de CH_4 .

El desprendimiento bacteriano puede ser influenciado por diversos factores, especialmente por alteraciones en su hábitat y en la calidad del ambiente por la temperatura, pH o la disponibilidad de nutrientes (McDougald et al., 2012). Ocurre debido a que las bacterias no son capaces de adaptarse lo suficientemente rápido a las condiciones cambiantes a su alrededor (Thormann et al., 2005). Aún cuando las biopelículas suelen ser más resistentes a agentes externos tóxicos

por las sustancias exopoliméricas que las recubren, el lodo granular tiene mayor diversidad de microorganismos, que pueden contribuir a la resistencia de las BM. La presencia de diferentes filos permite que se lleven a cabo diversos procesos metabólicos que permiten tolerar los cambios en las condiciones fisicoquímicas que se generan dentro del sistema durante el proceso de bioestabilización del metal (Labastida et al., 2013). Kato et al. (1993) evaluaron el efecto del oxígeno en la metanogénesis de un lodo granular, y observaron que el consumo de oxígeno por parte de bacterias facultativas presentes en el lodo permitió la creación de microambientes anaerobios donde las BM se encontraban protegidas, debido a esto las BM presentaron alta tolerancia a la presencia de oxígeno en el medio. Otro factor a considerar es la estructura de la biopelícula, la distribución de las BM en la biopelícula tiene un papel importante en la producción de biogás. Asumiendo que todas las poblaciones microbianas de un consorcio tienen la misma capacidad de adhesión, su distribución final en la biopelícula es controlada por la competición del espacio disponible y los nutrientes presentes. En este sentido se intuye que las bacterias de la superficie crecen más rápidamente que las del interior, sin embargo las bacterias internas con su crecimiento originan que las bacterias de la superficie se alejen del soporte. Si las BM se encontraban en la parte interior de la biopelícula pudieron tener menor contacto con el sustrato, además estas bacterias son consideradas como las más sensibles a materiales tóxicos en las aguas tratadas (Kugelman y McCarty, 1965).

Al enfocarnos en el análisis de la concentración máxima de CH_4 en cada una de las pruebas (A) en la Tabla 3.1, se observa que en el lodo granular fue mayor para una concentración de 500 mg/L Ag^+ - 287 mg/L NO_3^- , esto puede sugerir la presencia de un mecanismo de tolerancia a Ag^+ que se activa a dicha concentración, aumentando la producción de CH_4 para contrarrestar el efecto tóxico de estas sustancias, un comportamiento similar ha sido reportado en estudios como el de Labastida et al. (2013) y Escot (2014). En el caso de la biopelícula no se observa este comportamiento, sino valores similares a concentraciones entre 0 y 100 mg/L de Ag^+ y posteriormente una disminución en la concentración máxima de CH_4 conforme aumenta la cantidad de Ag^+ y NO_3^- . Un comportamiento similar fue reportado por Rosenkranz (2013) quien utilizó un reactor anaerobio para la degradación de fenoles, en su estudio obtuvo la velocidad promedio de degradación de fenol a diferentes concentraciones iniciales del mismo, a medida que aumentaba la concentración de fenol la velocidad promedio de degradación disminuía por un efecto de inhibición producto de la alta concentración aplicada.

En general la tasa de producción de CH₄ fue mayor al inicio de la actividad y disminuyó conforme transcurrió el tiempo en el presente estudio. La producción de CH₄ depende de parámetros como el volumen de gas en la botella, el tipo de sustrato y su concentración, la relación sustrato/biomasa, la temperatura, agitación, el medio mineral basal y la presencia de sustancias adicionales como Ag⁺ y NO₃⁻. En cada curva de producción de CH₄ de las Figuras 3.1 y 3.2 se observan al menos dos pendientes. La primera puede ser generada por el incremento de la actividad metabólica de las bacterias anaerobias afines a Ag⁺ ante la presencia del metal, una vez que se reduce la Ag⁺ a Ag⁰, se activan aquellas bacterias que no eran afines a Ag⁺ y generan la segunda pendiente. Otra posibilidad es que las pendientes se encuentren asociadas a la utilización de diferentes aceptores de electrones, debido a que pueden estar presentes bacterias anaerobias como las desnitrificantes o metanogénicas que utilizan etanol, acetato o hidrógeno para su metabolismo, podrían también estar asociadas a fenómenos difusionales del sustrato o a la reducción del NO₃⁻.

3.3.3 Desempeño de los sistemas biológicos al finalizar la cinética

Los resultados del desempeño del lodo granular y de la biopelícula al finalizar la cinética de producción de CH₄ se muestran en la Tabla 3.2. Las BM requieren degradar sustratos orgánicos simples para producir biogás, por ello la eficiencia de remoción de DQO está relacionada con la producción de CH₄. La biopelícula presentó mayores eficiencias de remoción de la DQO y una producción de CH₄ máxima mayor a la del lodo granular. En ambos sistemas biológicos la eficiencia de remoción de la DQO y la producción de CH₄ disminuyó conforme aumentó la concentración de Ag⁺ y NO₃⁻. En las pruebas sin metal se alcanzó una eficiencia de remoción de DQO del 97-92%, mientras que en las pruebas con 2000 mg/L Ag⁺-1150 mg/L NO₃⁻ la eficiencia de remoción de la DQO fue del 50%. De igual manera Chu y Hua (1996), al evaluar el efecto del zinc en la remoción de la DQO con un lodo activado en un reactor batch, reportaron que en las pruebas sin metal se obtuvieron eficiencias de remoción de la DQO de hasta 92.5%, mientras que la eficiencia de remoción en presencia de zinc disminuyó a 72.4%, esto debido a que el metal pesado actúa como un competidor por los sitios activos del lodo, con lo que obstaculiza la adsorción orgánica y afecta la reducción de la DQO. Ting et al. (1994) reportaron que en sus pruebas en lote, en los primeros 30 minutos de contacto entre el lodo anaerobio-aerobio y el metal, la eficiencia de remoción de DQO disminuyó del 93 al 80%, del

89 a 86% y del 80 al 60% en presencia de zinc, cadmio y cobre, respectivamente. Estos resultados enfatizan la sensibilidad de la eficiencia de remoción de DQO ante cargas de impacto de los metales pesados.

En los datos de la Tabla 3.2 se observa que las pruebas con mayor concentración de Ag^+ y NO_3^- , a pesar de tener una baja producción de CH_4 , tuvieron eficiencias de remoción de DQO de aproximadamente el 50%. Esto indica que no toda la remoción de la DQO ocurrió por la acción de las BM. Al obtener la equivalencia en g DQO/L del CH_4 producido en cada una de las botellas (1 g DQO/L= 350 mL CH_4) se puede calcular la cantidad de DQO consumida por la vía metanogénica, con esto se confirmó la intervención de otro tipo de bacterias con metabolismo distinto al metanogénico que contribuyeron con la remoción de la DQO.

La presencia de bacterias desnitrificantes se comprobó al determinar el porcentaje de remoción de NO_3^- en las pruebas con biopelícula, para ello se calculó la concentración inicial introducida al sistema como AgNO_3 y se midieron los NO_3^- una vez finalizada la actividad. Estos experimentos demuestran la reducción de NO_3^- por acción de las bacterias anaerobias que lo utilizan como aceptor de electrones para oxidar el etanol. La presencia de NO_3^- en el medio tiene un impacto importante en el desempeño de las BM, pues la metanogénesis puede ser inhibida por la presencia de óxidos de nitrógeno. Esto concuerda con los resultados de la cinética, la biopelícula presentó resistencia a concentraciones entre 0-500 mg/L Ag^+ , en las cuales la remoción de NO_3^- se mantuvo por encima del 90%, mientras que la metanogénesis se inhibió a concentraciones de 1000 y 2000 mg/L de Ag^+ , en las cuales la remoción de NO_3^- fue de 62% y 25% respectivamente. Los NO_3^- restantes en el medio, sumados a la alta concentración de Ag^+ , podrían estar inhibiendo la metanogénesis.

La remoción de NO_3^- puede verse limitada por la cantidad de sustratos orgánicos en el sistema, sin embargo este problema puede ser superado al cuidar el radio C/N (Santibáñez et al., 2011). En este estudio se agregó 1 g de DQO/L de etanol a todas las botellas, cantidad suficiente para degradar los NO_3^- presentes en las pruebas de 0-1000 mg/L Ag^+ , para remover todos los NO_3^- de las pruebas de 2000 mg/L Ag^+ se requerirían 1.15 g DQO/L. Debido a que la biopelícula expuesta a 1000 mg/L de Ag^+ tuvo una remoción de NO_3^- del 67.7%, a pesar de tener sustrato suficiente para alcanzar la máxima eficiencia de remoción, se puede asumir que a partir de esta concentración las bacterias anaerobias desnitrificantes sufrieron cierto grado de inhibición. Throbäck et al. (2007) utilizaron a la comunidad desnitrificante como modelo para evaluar los

efectos de los iones Ag^+ en microorganismos del suelo, y observaron que la Ag^+ causó una reducción sigmoidea dependiente de la dosis en la actividad desnitrificante. Existe una compleja relación entre las BM y las no metanogénicas, las BM mantienen la concentración del H_2 en el sistema a una concentración baja por medio de su oxidación, lo cual permite que crezcan y se desarrollen bacterias no metanogénicas que en otras condiciones no podrían coexistir, además actúan como sumidero de electrones para las especies sensibles a este compuesto (Del Real Olvera, 2007). Por lo que la inhibición de las BM y la acumulación de H_2 podrían afectar la actividad de otros tipos de bacterias anaerobias presentes en el sistema. El pH tiene diversos efectos en la actividad enzimática de los microorganismos, es un indicio de que la digestión se está realizando en condiciones adecuadas, ya que si los productores de CH_4 son inhibidos o destruidos no se degradan los ácidos producidos por las bacterias acetogénicas y el pH dentro del digestor disminuiría progresivamente (Rodríguez, 2010). El valor óptimo de pH para la actividad de las BM es de entre 6.5 y 7.6 (Rittman y McCarty, 2001), el alejarse de este valor disminuye la eficiencia del proceso. Al finalizar la actividad, el pH del medio para ambos sistemas biológicos se mantuvo alrededor de 6.7 y 6.8 en la mayoría de las pruebas, lo cual es indicio de un equilibrio adecuado entre las BM y las acetogénicas que permiten mantener la capacidad buffer del sistema. Sin embargo en el lodo expuesto a 1000 y 2000 mg/L Ag^+ el pH fue de 7.64 y 8.04 respectivamente, lo cual puede deberse a un aumento en la alcalinidad por la metanogénesis o por la generación de iones OH^- durante la desnitrificación (Ec. 3.1). En la biopelícula se observa el efecto contrario, en las pruebas con 2000 mg/L de Ag^+ el pH disminuyó a 6.0, posiblemente debido a un aumento en la población de bacterias acetogénicas, lo cual puede ocasionar la acumulación de acetato que aumenta la acidez del medio y puede llegar a ser inhibitorio para los microorganismos metanogénicos de la biopelícula (Reis et al., 1990), esto coincide con la baja producción de CH_4 observada a esta concentración. Conviene recordar que las bacterias responsables de la fase acidogénica y acetogénica son menos sensibles a los cambios del pH del medio que las metanogénicas, y que presentan elevados valores de velocidad máxima de crecimiento específico, por lo que las perturbaciones en el sistema pueden ocasionar la inhibición de la metanogénesis y la proliferación de ácidos, CO_2 y otros compuestos que acidifican el sistema (Fernández, 2008). El deterioro de los procesos anaerobios a valores de pH menores a 6.5 y mayores a 8.2 han sido demostrados experimentalmente, las variaciones en el pH pueden considerarse más como

el reflejo de un desequilibrio que como la causa del mismo (Del Real Olivera, 2007), éstas afectan significativamente el crecimiento y población de las bacterias anaerobias, y pueden afectar el desempeño de la biopelícula en términos de la remoción de DQO, sin embargo es posible que después de un tiempo las bacterias se adapten a estas condiciones y continúen su actividad. Las bacterias tienen la capacidad de adaptarse al sistema y generar la alcalinidad suficiente para mantener su actividad (Kousi et al., 2011).

Diversos autores han observado una relación entre el ORP y el rendimiento de la digestión microbiana (López Cabanes, 1989). Al finalizar la actividad del lodo granular y la biopelícula, las bacterias anaerobias disminuyeron el ORP a condiciones reductoras (-100 mV a -330 mV), lo cual es un indicio del funcionamiento adecuado del metabolismo de las bacterias, bajo estas condiciones la Ag^+ pudo ser reducida a Ag^0 . Esto se corroboró con las eficiencias de remoción de Ag^+ , cuyo promedio fue de 99.5%. Incluso las pruebas con 1000 mg/L Ag^+ -575 mg/L NO_3^- y 2000 mg/L Ag^+ -1150 mg/L NO_3^- , que mostraron un ORP positivo al final de la actividad, tuvieron eficiencias de remoción de Ag^+ de 99.4% y 99.8% respectivamente. El ORP oxidativo en las pruebas con 1000 y 2000 mg/L de Ag^+ corrobora el efecto adverso en las BM expuestas a mayores concentraciones de Ag^+ y NO_3^- , pues la inhibición de la biopelícula se ve reflejada en el incremento del ORP al finalizar las pruebas que a su vez afecta la producción de CH_4 .

El porcentaje de remoción de Ag^+ fue de entre 85%-100% en cada una de las pruebas para ambos sistemas biológicos. Esto coincide con los resultados de Borja-Maldonado (2014), quien realizó ensayos en botellas con BSR y obtuvo eficiencias de remoción de Ag^+ del 100%, sin embargo en su estudio la Ag^+ fue reducida y recuperada como Ag_2S . Pavlostathis y Maeng (2000) realizaron simulaciones computacionales de sus experimentos en lote para explicar el efecto del $AgNO_3$ y sulfuro en cultivos metanogénicos, y observaron que cuando las concentraciones de Ag^+ y sulfuro son constantes (100 mg/L y 10 mg/L respectivamente) concentraciones casi equimolares de Ag_2S y Ag^0 se forman hasta que el ORP disminuye a -198 mV, debajo de este valor casi toda la plata existe como Ag^0 .

En esta investigación no se introdujeron SO_4^{2-} al sistema, por lo que la Ag^+ fue reducida a Ag^0 , sin embargo esto puede ocurrir tanto por la disminución del ORP como por la presencia de enzimas reductoras. Diversas bacterias han sido utilizadas para reducir los iones Ag^+ a Ag^0 (Kumar et al., 2014; Shivaji et al., 2011; Kalishwaralal et al., 2008). En estos procesos los agentes reductores son sustituidos por compuestos biológicos, incluso se habla de una enzima

llamada nitrato reductasa como la responsable de reducir los iones Ag^+ provenientes del AgNO_3 para sintetizar AgNPs (Vaidyanathan et al., 2010; Kumar et al., 2007). Esta enzima podría haber estado presente en los sistemas biológicos de lodo granular y biopelícula utilizados en esta investigación, por la presencia de bacterias desnitrificantes.

La resistencia de los sistemas biológicos al metal puede atribuirse a la reducción de Ag^+ , ya que la forma iónica de este metal es más tóxica para los microorganismos. El grado de inhibición de las bacterias anaerobias depende de factores como la concentración y forma química del metal, condiciones del entorno como pH y temperatura, así como de la cantidad y distribución de la biomasa (Mudhoo y Kumar, 2013). Al comparar los porcentajes de remoción de Ag^+ de la biopelícula con los del lodo granular se observa que hubo mayor remoción de Ag^+ en el lodo granular, esto se debe a que un alto porcentaje de los metales es absorbido por las partículas del lodo. Green et al. (1998) realizaron experimentos en lote con lodo granular anaerobio y observaron que al menos 90% del cromo y níquel desapareció del medio líquido en las botellas serológicas, 76% de los metales fueron absorbidos por los gránulos y el resto precipitó debido al pH. En el lodo granular se tiene mayor cantidad de microorganismos y el metal se encuentra en contacto directo con los microorganismos, por lo que los metales se acumulan a través de su unión con la membrana celular. Sin embargo en ambos casos, biopelícula y lodo granular, el porcentaje de remoción de Ag^+ fue mayor al 90%. Cabe señalar que el soporte de la biopelícula, que inicialmente era blanco y una vez inoculado presentó un color ligeramente café, tenía una tonalidad plateada al finalizar la actividad debido a la reducción del metal a Ag^0 (Figura 3.5).



Figura 3.5 Evolución de la biopelícula. a) soporte de polietileno de baja densidad. b) formación de la biopelícula tras la inoculación. c) biopelícula después de la adición de Ag^+ .



Tabla 3.2 Resultados de las pruebas en lote con lodo granular y biopelícula expuestos a diferentes concentraciones de plata.

Parámetros	Concentración de Ag ⁺ en mg/L											
	0		50		100		500		1000		2000	
	LG	BP	LG	BP	LG	BP	LG	BP	LG	BP	LG	BP
pH final	6.6 ± 0.1	6.6 ± 0.04	6.5 ± 0.1	6.5 ± 0.04	6.5 ± 0.3	6.4 ± 0.1	6.5 ± 0.02	6.2 ± 0.1	7.6 ± 0.1	6.7 ± 0.1	7.9 ± 0.04	6.0 ± 0.1
ORP final (mV)	- 315 ± 6	- 329 ± 3	- 209 ± 1	- 282 ± 6	- 197 ± 47	- 156 ± 13	- 187 ± 13	- 96 ± 5	230 ± 23	461 ± 6	364 ± 17	582 ± 28
Remoción de DQO (%)	92 ± 2	97 ± 1	71 ± 5	94 ± 1	74 ± 24	95 ± 3	84 ± 7	83 ± 8	63 ± 4	63 ± 3	50 ± 0.04	51 ± 3
Remoción de Ag⁺ (%)	-	-	99 ± 0.05	95 ± 0.1	100 ± 0.2	97 ± 0.04	100 ± 0.02	98 ± 0.1	99 ± 0.1	98 ± 0.1	100 ± 0.04	85 ± 0.1
Remoción de NO₃⁻ (%)	-	-	-	98 ± 1	-	96 ± 0.8	-	91 ± 2	-	62 ± 4	-	25 ± 0.2

*LG= Lodo granular BP= Biopelícula

3.3.4 Caracterización del residuo recuperado

Al finalizar la AME, se recolectó el medio líquido y el residuo de las botellas, para su análisis por MEB-EDAX. En la Figura 3.6 se muestra una micrografía del precipitado del lodo granular expuesto a 1000 mg/L Ag^+ , en la cual se confirmó la presencia de Ag^0 , así como el microanálisis de dicho precipitado. La Figura 3.7 muestra una micrografía que confirma la capacidad de la biopelícula anaerobia para reducir el ORP del medio y llevar a cabo la reducción de Ag^+ a Ag^0 .

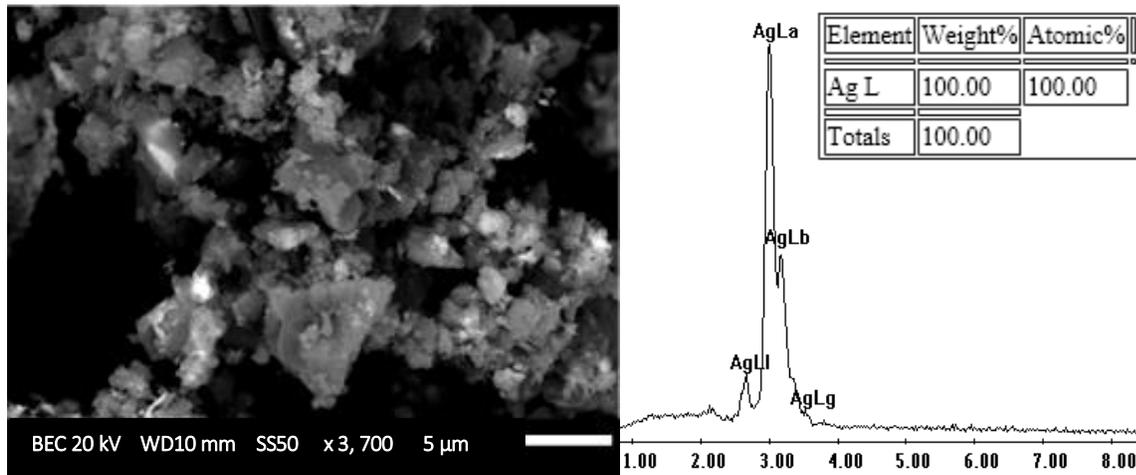


Figura 3.6 Micrografía y microanálisis del residuo recuperado de las pruebas en lote con lodo granular mediante MEB-EDAX.

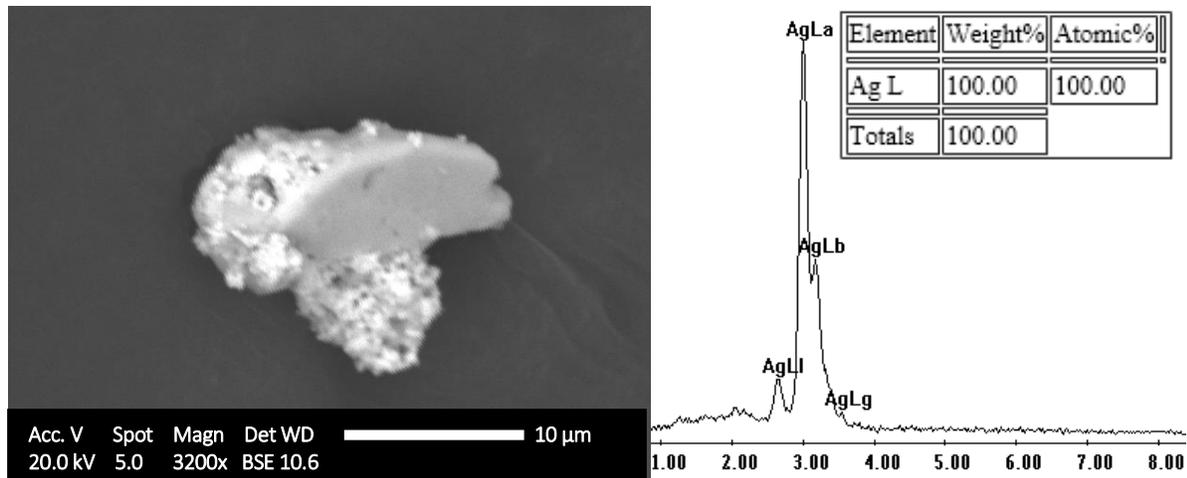


Figura 3.7 Micrografía y microanálisis del residuo recuperado de las pruebas en lote con biopelícula mediante MEB-EDAX.

En estudios previos realizados con BSR se encontraron sulfuros metálicos como las especies predominantes en el análisis del residuo sólido (Borja Maldonado et al., 2014; Gallegos-García et al., 2008). Sin embargo en el presente estudio, al evitar la adición de SO_4^{2-} en la alimentación, se buscó reducir el metal por medio de la disminución del ORP para que sedimentara al fondo del reactor en su estado metálico (Ag^0).

3.3.5 Recuperación de los sistemas biológicos

Al finalizar la AME de los sistemas biológicos de lodo granular y biopelícula expuestos a diferentes concentraciones de Ag^+ y NO_3^- , se retiró el medio líquido de las botellas serológica y se sustituyó por uno fresco sin metal para evaluar la recuperación de las BM. Las condiciones al inicio de la recuperación fueron pH de 6.5 y ORP oxidativo con un valor promedio de 327 mV. La Figura 3.8 presenta la recuperación del lodo granular, en ella se observa que el lodo previamente expuesto de 50 a 1000 mg/L Ag^+ , con sus respectivos NO_3^- , logró recuperarse y alcanzó una producción de CH_4 similar. Incluso el lodo previamente expuesto a Ag^+ , alcanzó una producción de CH_4 similar al lodo que no estuvo en contacto con el metal. Esto se ve reflejado en los valores de la máxima concentración de CH_4 de la Tabla 3.3, los cuales oscilan en valores entre 5.5-6.2 mL de CH_4 , en la r_{max} cuyo valor promedio fue de 0.059 mL CH_4/h y en la eficiencia de remoción de la DQO que se mantuvo alrededor del 89%. Sin embargo el lodo granular expuesto a 2000 mg/L Ag^+ -1150 mg/L NO_3^- no logró recuperarse, esto se vio reflejado en una baja producción de CH_4 y una eficiencia de remoción de DQO del 38%. Cabe señalar que los resultados de producción de CH_4 durante la recuperación de ambos sistemas biológicos expuestos a 2000 mg/L Ag^+ no presentaron un ajuste adecuado con el modelo de crecimiento sigmoideal de Gompertz debido al efecto inhibitorio observado. El pH al finalizar la actividad fue de 6.9 en todas las pruebas con lodo previamente a Ag^+ .

La exposición constante a bajas concentraciones de metales pesados no afecta seriamente la eficiencia biológica de un proceso de tratamiento, de hecho los lodos aclimatados pueden mantener altas eficiencias de remoción de la DQO incluso cuando son expuestos a altas concentraciones de metales como cadmio y zinc. En contraste, las cargas de metales aplicadas a lodos no aclimatados resultan en efectos perjudiciales para el proceso biológico

(Ting et al., 1994). Por lo que si se quisiera aumentar la resistencia del lodo granular se podría aclimatar a la presencia de Ag^+ incrementando la concentración del metal de forma gradual. La Figura 3.9 presenta la recuperación de la biopelícula, que logró recuperarse tras su exposición a Ag^+ y NO_3^- debido a que continuó con la producción de CH_4 y alcanzó una producción máxima de CH_4 de entre 8.0-9.7, así como una r_{max} promedio de 0.50 mL CH_4/h . Al igual que en la cinética de los sistemas biológicos expuestos a Ag^+ , la biopelícula tuvo una producción máxima de CH_4 mayor que la del lodo granular, esto debido a lo que se mencionaba sobre la selectividad de la biopelícula. Sin embargo los valores de la r_{max} son similares para ambos sistemas biológicos. La biopelícula expuesta a 100 mg/L Ag^+ -58 mg/L NO_3^- y 500 mg/L Ag^+ -288 mg/L NO_3^- mostró un ligero efecto adverso sobre la producción de biogás (menor al 30%), posiblemente debido a: 1) el desprendimiento de algunos microorganismos del soporte ante el contacto con el metal por la deficiencia de sustrato en las capas más profundas de la biopelícula y 2) al ser retirada la Ag^+ del medio, las bacterias que son afines este metal ya no participan en la degradación del sustrato orgánico, esto repercute en una menor producción de CH_4 .

Las pruebas con biopelícula previamente expuesta a 1000 mg/L Ag^+ -575 mg/L NO_3^- y 2000 mg/L de Ag^+ -1150 mg/L NO_3^- no fueron capaces de producir CH_4 una vez retirado el metal, esto demuestra que dichas concentraciones tuvieron un efecto inhibitorio en la actividad metabólica de las BM, que se vio reflejado en sus valores oxidativos de ORP al final de la cinética (265 y 319 mV). Las pruebas expuestas de 50-500 mg/L Ag^+ presentaron un ORP reductor al finalizar la actividad (-406 mV a -290 mV), esto indica la recuperación de las bacterias anaerobias en la biopelícula. El pH al final de la recuperación fue de entre 6.5-6.7 en todas las pruebas, a excepción de la de 2000 mg/L Ag^+ -1150 mg/L NO_3^- que tuvo un pH final de 6.0, posiblemente debido a la acumulación de acetato en el sistema por la inhibición de la metanogénesis y el aumento en la acetogénesis. Las eficiencias de remoción de DQO para las pruebas de 50-100 mg/L de Ag^+ fueron de 94%, para la de 500 mg/L de Ag^+ 87% y en las pruebas de 1000 y 2000 mg/L de Ag^+ se alcanzaron valores de hasta 53% y 46% respectivamente, posiblemente por la contribución de otro tipo de microorganismos presentes en la biopelícula, como se mencionó anteriormente. Cabe recordar que la resistencia de la biopelícula depende del grado de madurez de la misma, en este caso se utilizó una biopelícula desarrollada durante 94 días por lo que al realizar las pruebas con una

biopelícula más vieja se podrían obtener mejores resultados. Con estos resultados se reitera la mayor resistencia del lodo granular, el cual ha sido utilizado en estudios previos para la remoción de metales, ante la presencia de Ag^+ y NO_3^- , en comparación con la biopelícula.

La resistencia de los microorganismos al metal varía con la especie bacteriana mediante el desarrollo de una variedad de mecanismos de resistencia específica, tales como la exclusión del metal por barrera de permeabilidad, el transporte activo del metal fuera de la célula, el secuestro intracelular de la proteína de unión al metal, el secuestro extracelular, la desintoxicación enzimática del metal a una forma menos tóxica y la reducción en la sensibilidad de las dianas celulares frente al metal. Además la capacidad de resistencia a los metales pesados depende también de la biodisponibilidad y efecto toxicológico de cada metal pesado (Hoa y Kieu, 2011). Diversas especies bacterianas tienen genes que controlan la resistencia a metales tóxicos específicos. Esta resistencia está por lo general determinada por moléculas de ADN extracromosómico llamadas plásmidos, que con frecuencia son responsables de la resistencia a diversos antibióticos (Silver y Misra, 1984). Además la presencia de iones haluro que actúan como agentes precipitantes, proteínas, y otros ligandos biológicos de Ag^+ , afectan la biodisponibilidad del metal (Silver, 2003); estos procesos permiten que los metales se vuelvan “invisibles” para los microorganismos y no se inhiba la digestión anaerobia (Bhattacharya et al., 1995).

La cinética de la recuperación finalizó en menor tiempo que la cinética de los sistemas biológicos expuestos a AgNO_3 , además la fase lag también se redujo durante la recuperación, siendo menor para los sistemas previamente expuestos a mayores concentraciones de los iones Ag^+ y NO_3^- . Esto ocurre debido a que las bacterias que permanecen en los sistemas biológicos son aquellas que tienen mayor resistencia o tolerancia a Ag^+ y NO_3^- , por lo que son consorcios que se encuentran condicionados. Ante la ausencia de NO_3^- las BM no encontrarían competencia en la desnitrificación y esto podría permitir que incrementen su actividad y por ende la producción de biogás. La velocidad de producción de CH_4 fue mayor durante la recuperación pues alcanzó máximos de 0.080-0.071 mL CH_4 /h, mientras que durante la actividad con metal la r_{max} fue de 0.032-0.057 mL CH_4 /h para el lodo granular y la biopelícula respectivamente. Esto indica que el metal y la presencia de especies oxidantes (NO_3^-) pueden llegar a retardar el metabolismo de las BM, las cuales pueden recuperarse al retirar el metal del medio.

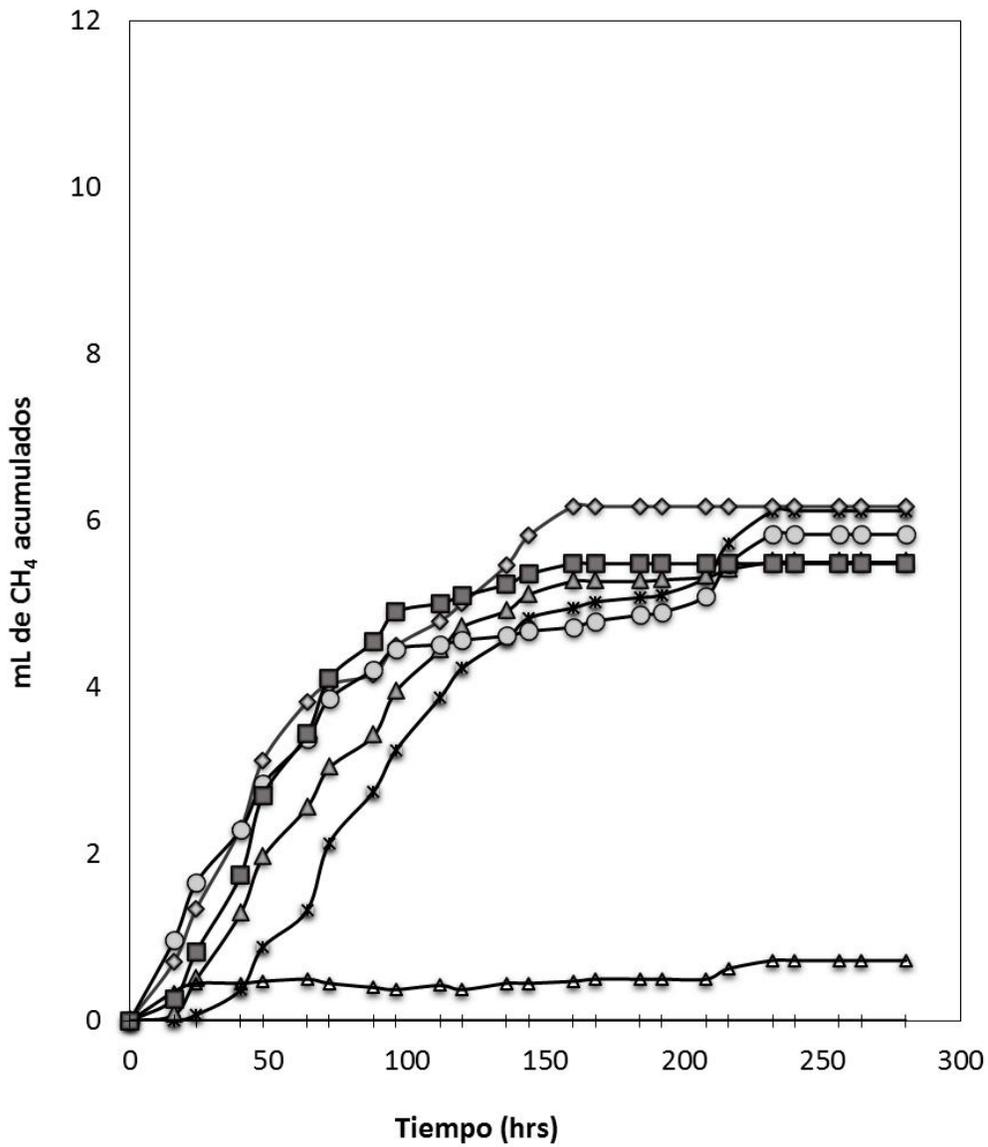


Figura 3.8 Producción de CH₄ en experimentos en lote con lodo granular metanogénico sin metal para evaluar su recuperación. Donde control (○), 0 mg/L (■), 50 mg/L (*), 100 mg/L (▲), 500 mg/L (◆), 1000 mg/L (●) y 2000 mg/L (△).

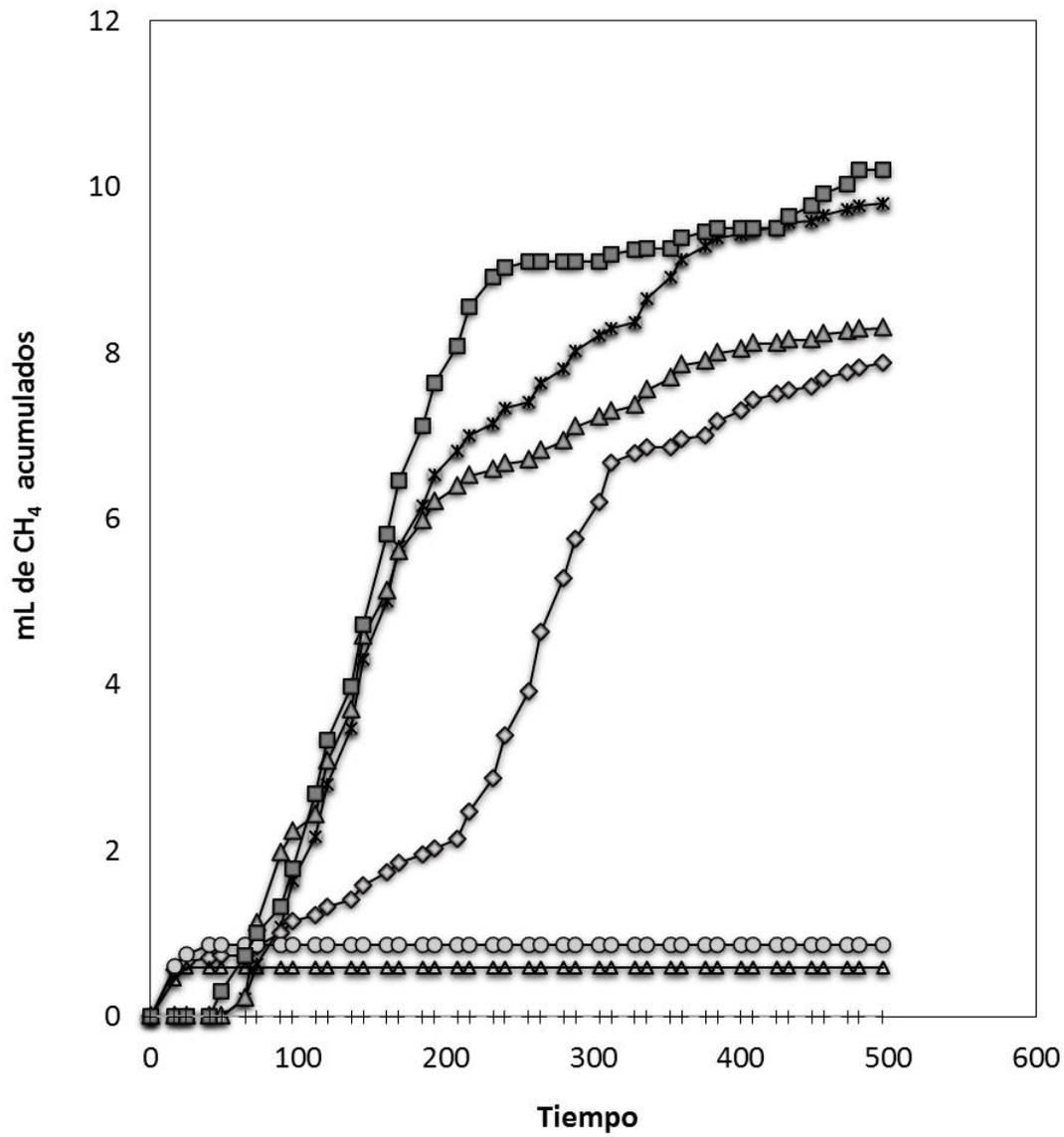


Figura 3.9 Producción de CH₄ en experimentos en lote con la biopelícula sin metal para evaluar su recuperación. Donde control (○), 0 mg/L (■), 50 mg/L (*), 100 mg/L (▲), 500 mg/L (◆), 1000 mg/L (○) y 2000 mg/L (△).

Tabla 3.3 Parámetros cinéticos obtenidos del modelo de crecimiento sigmoideal de Gompertz en presencia de Ag^+ para el lodo granular y la biopelícula metanogénica.

	Ag^+ (mg/L)	A (mL CH_4)	k (h^{-1})	r_{max} (mL CH_4/h)	t_c (h)	R	Fase Lag
Lodo	0	5.48	0.038	0.080	41.8	0.998	0
Granular	50	6.04	0.022	0.051	78.2	0.990	24
	100	5.5	0.027	0.057	54.2	0.996	16
	500	6.24	0.024	0.058	41.5	0.983	0
	1000	5.47	0.023	0.049	35.1	0.953	0
	2000	-	-	-	-	-	0
	Biopelícula	0	9.7	0.019	0.071	123.5	0.995
	50	9.52	0.014	0.051	135.1	0.992	48
	100	7.99	0.016	0.049	116.1	0.990	48
	500	9.08	0.008	0.028	218.1	0.971	0
	1000	0.87	0.149	0.050	9.4	0.999	0
	2000	-	-	-	-	-	0

3.4 Conclusiones

Estos sistemas biológicos constituyen una alternativa adecuada no solo para remover Ag^+ de aguas residuales que contienen metales pesados, sino también para su recuperación como Ag^0 . Los resultados demuestran que las BM en el lodo granular son resistentes a concentraciones de hasta 1000 mg/L de Ag^+ -575 mg/L NO_3^- y en la biopelícula son resistentes hasta 500 mg/L Ag^+ -287 de NO_3^- . La resistencia de la biopelícula fue menor que la del lodo granular, posiblemente debido a que los gránulos del lodo absorben el metal y a que en el lodo se tiene mayor diversidad microbiana, la cual permite que distintos tipos de bacterias trabajen en simbiosis para superar las condiciones adversas. La presencia de bacterias desnitrificantes, la cual fue comprobada con la eficiencia de remoción de nitratos y posterior caracterización de la biopelícula, contribuyó a la degradación de la DQO y a la disminución del ORP del medio, además estas bacterias contienen enzimas como la nitrato

reductasa que podría haber contribuido a la reducción de Ag^+ a Ag^0 . La competencia de las BM con las desnitrificantes contribuiría a explicar la disminución en la producción de CH_4 en los sistemas expuestos a mayores concentraciones de Ag^+ y NO_3^- , es posible que el predominio de microorganismos desnitrificantes no permitiera que se llevara a cabo el siguiente proceso dentro de la secuencia de la digestión anaerobia, ya que las proporciones de materia orgánica en estos casos deben haber disminuido considerablemente en comparación con los sistemas que no fueron expuestos a AgNO_3 . Adicionalmente la presencia de NO_3^- ocasiona un incremento en el ORP, esto afecta la producción de CH_4 debido a que las BM son anaerobios estrictos que requieren condiciones reductoras de ORP. Esto se vio reflejado en la disminución de la tasa de producción de metano en los sistemas expuestos a Ag^+ y NO_3^- , en comparación de los sistemas que solamente tuvieron medio mineral y sustrato orgánico. Durante la cinética de producción de CH_4 se observaron distintas pendientes a cada concentración de Ag^+ y NO_3^- , éstas podrían estar asociadas a la utilización de distintos tipos de sustratos como el etanol, acetato e hidrógeno debido a que existen bacterias anaerobias con distintas vías metabólicas. La fase de retardo calculada y reportada por Gompertz muestra que la adaptación a la presencia de Ag^+ y NO_3^- fue más lenta en los microorganismos de la biopelícula, en comparación con los del lodo granular. Esto puede estar correlacionado con la resistencia a la transferencia de masa de la biopelícula, influenciada por su grosor, sustancias exopoliméricas y distribución de los microorganismos. Las eficiencias de remoción de Ag^+ fueron de entre 85 y 98%, aún en las pruebas que presentaron un ORP oxidativo al finalizar la actividad.

La producción máxima de CH_4 durante la recuperación fue menor a la de los sistemas biológicos expuestos a Ag^+ , sin embargo se llevó a cabo en menor cantidad de tiempo, lo que indica que la Ag^+ y los NO_3^- pueden retardar la actividad metabólica de los microorganismos. La disminución en la fase de retardo durante la recuperación y el incremento en la velocidad de producción de CH_4 demuestran que tras la exposición a AgNO_3 , quedaron microorganismos condicionados en los sistemas biológicos. El análisis elemental del precipitado demostró la presencia de Ag^0 , cumpliendo con el propósito de esta investigación. Este es el primer estudio para la recuperación de Ag^0 de un agua residual sintética a partir de la disminución del ORP con bacterias anaerobias, presentando ventajas no solo ambientales, sino también económicas.

CAPITULO 4. RECUPERACIÓN DE PLATA A PARTIR DE UNA BIOPELÍCULA ANAEROBIA EN UN REACTOR DE LECHO FLUIDIFICADO INVERSO

Resumen

Este estudio evaluó la capacidad de un reactor LFI para reducir Ag^+ y recuperar Ag^0 a partir de un agua residual sintética, mediante la formación de una biopelícula anaerobia. El reactor se alimentó con una mezcla de etanol-ácido acético con una carga orgánica de 1 g DQO/L-d, a un TRH de un día. La velocidad de carga del metal se incrementó gradualmente de 20 hasta 300 mg/L Ag^+ . La composición bacteriana de la biopelícula fue examinada por análisis de la secuencia 16S rRNA. La eficiencia de remoción de DQO incrementó con la presencia de Ag^+ hasta alcanzar valores entre 94-98%, al igual que la alcalinidad que alcanzó valores de hasta 1000 mg CaCO_3/L . El ORP se mantuvo por debajo de -300 mV durante toda la operación del reactor, lo que permitió la reducción de Ag^+ a Ag^0 , y eficiencias de remoción del metal de hasta un 98.7% en promedio. La caracterización del precipitado recuperado del fondo del reactor analizado por MEB y MET confirmó la presencia de Ag^0 . El análisis de las secuencias de genes clonados por 16S rRNA de la biopelícula sugirieron una alta identidad del género *Proteobacterias* y en segundo lugar *Euryarchaeota*, posibles responsables de la degradación de la DQO, reducción del ORP y la reducción del metal. Este estudio es el primero en repostar la viabilidad de recuperar Ag^0 de un agua residual a partir de una biopelícula anaerobia en reactor LFI.

Palabras clave: biopelícula, reactor de lecho fluidificado inverso, plata, potencial oxidoreducción, bacterias anaerobias.

4. 1 Introducción

La digestión anaerobia aplicada a la precipitación de metales ha sido estudiada en diferentes configuraciones de reactores, los cuales incluyen procesos en una sola etapa o múltiples etapas; en los procesos de una sola etapa los metales pesados son precipitados y retenidos en el reactor combinados con la biomasa, mientras que en los de múltiples etapas la oxidación de la DQO y la precipitación de los metales se llevan a cabo en unidades separadas, esto permite la recuperación de minerales valiosos aunque conlleva mayores costos (Gallegos-García et al., 2009). Una amplia variedad de reactores han sido utilizados para los procesos anaerobios, como los reactores de lecho fluidificado, en los cuales los microorganismos se adhieren a un material inerte denso para formar una biopelícula, el soporte puede ser granos de arena, carbón activado granular, tierras diatomeas y otros sólidos pequeños resistentes a la abrasión; el soporte es fluidificado por una alta tasa de flujo ascendente del fluido a tratar que incluye la recirculación del efluente (Rittmann y McCarty, 2001). Estos reactores son ampliamente utilizados para la remoción combinada de DQO, metales y SO_4^{2-} de las aguas residuales debido a que la recirculación diluye las concentraciones de sustancias tóxicas en el influente (Kaksonen et al., 2007). A diferencia de los reactores UASB, la fluidificación del lecho y el mezclado proveen una distribución uniforme del fluido a través del reactor y una buena transferencia de masa del líquido a la superficie de la biopelícula. Kaksonen et al. (2003) utilizaron un reactor de lecho fluidificado sulfato reductor alimentado con lactato para precipitar hierro y zinc de un agua residual que contenía SO_4^{2-} , durante sus experimentos encontraron una remoción del 99.8% de los metales y un incremento en el pH del efluente por la alcalinidad producida. A pesar de sus múltiples ventajas, tanto el reactor UASB como el de lecho fluidificado poseen la desventaja de que los metales precipitan al fondo del reactor, donde se retienen combinados con la biomasa, dificultando su separación.

El reactor LFI ofrece una alternativa para la precipitación y recuperación de los metales pesados en una sola etapa. En éste reactor se utiliza un soporte de baja densidad que flota en la parte superior de la columna de líquido, el cual se expande a través de la recirculación del efluente que entra por la parte superior del reactor; tras inocular el reactor, la biopelícula se desarrolla sobre el soporte que permanece suspendido y mantiene los metales precipitados o sedimentados, en el fondo del reactor separados de la biomasa. El primer estudio en recuperación de metales por medio de un reactor LFI fue realizado por Gallegos-García et

al. (2009), quienes trataron un agua residual sintética con hierro, zinc, cadmio y SO_4^{2-} mediante sulfato reducción, durante su investigación alcanzaron una remoción de SO_4^{2-} del 41% y eficiencias de precipitación del metal por encima del 99% como FeS_2 , ZnS y CdS . Sahinkaya y Gungor (2010) utilizaron un reactor LFI para tratar agua residual sintética con SO_4^{2-} y distintas concentraciones de cobre y zinc, con lactato como sustrato, la reducción de SO_4^{2-} fue de entre 44-88% y 99% de los metales precipitaron al fondo del reactor como sulfuros metálicos.

Estos datos demuestran la factibilidad de utilizar reactores LFI para la remoción y recuperación de diversos metales de aguas residuales, sin embargo pocos estudios han evaluado la remoción de Ag^+ mediante digestión anaerobia debido a sus propiedades antisépticas que se pensaba impedirían la actividad de las bacterias anaerobias. En un estudio reciente realizado por la EPA se detectó la presencia de plata a concentraciones entre 1.94-856 mg/kg de nanoplata, en muestras de lodos y efluentes de plantas de tratamiento de aguas residuales que operan con digestión anaerobia (Chen et al., 2012). Esto condujo a que se realizaran pruebas en lote para evaluar el efecto de Ag^+ y AgNPs sobre los consorcios bacterianos presentes en plantas de tratamiento (Kaegi et al., 2013), y a que se utilizara un reactor LFI para evaluar la remoción de Ag^+ de un agua residual sintética, a partir del proceso de sulfato reducción, con una recuperación promedio de 94% de Ag_2S (Borja Maldonado, 2014). Estos resultados demuestran la posibilidad de remover Ag^+ de aguas residuales a partir del proceso de digestión anaerobia. La mayoría de los estudios en la literatura se basan en la sulfato reducción, proceso mediante el cual se produce H_2S , que provoca la precipitación de los metales como sulfuros metálicos al fondo del reactor; sin embargo en esta investigación se privó de SO_4^{2-} al sistema para promover la actividad de poblaciones anaerobias distintas de las BSR, como las BM, con la finalidad de recuperar Ag^0 en lugar de Ag_2S .

En su mayoría, los reactores anaerobios de lecho fluidificado son inoculados con consorcios indefinidos de microorganismos anaerobios, diversos autores han señalado que la composición de la comunidad microbiana influye la estabilidad y desempeño de los reactores anaerobios, por ello es importante entender éstas comunidades así como sus interacciones para la operación y optimización del desempeño del reactor. Estas interacciones microbianas son importantes particularmente en los reactores con biopelícula y están influenciadas por la capacidad de los microorganismos para añadirse al soporte a las

condiciones de operación del reactor (Celis et al., 2009). En las biopelículas, los diferentes gradientes de químicos, nutrientes y oxidantes crean micro-ambientes que le confieren una estructura en capas, de tal modo que los anaerobios estrictos se encuentran en las capas más profundas (Đapa et al., 2013). La caracterización microbiana de la biopelícula puede ayudar a lograr un arranque del reactor efectivo, una operación confiable y eventualmente a utilizar un reactor de mayor escala. Los métodos previos para la identificación de microorganismos estaban limitados al cultivo, sin embargo durante la última década, los avances en biología molecular basados en el análisis de secuencias 16S rDNA han permitido identificar grupos filogenéticos específicos en un ambiente particular (Celis et al., 2009).

Las pruebas en lote con lodo granular y biopelícula descritas en los capítulos 3 y 4 demuestran la factibilidad de reducir Ag^+ a Ag^0 por medio de la actividad de las bacterias anaerobias que reducen el ORP a condiciones reductoras. El objetivo de esta investigación es evaluar la factibilidad de utilizar un reactor LFI para formar una biopelícula anaerobia que permita la reducción de Ag^+ y su recuperación como Ag^0 del fondo del reactor, separada de la biomasa, en una sola etapa, además de identificar los microorganismos presentes en la comunidad microbiana de la biopelícula.

4.2 Métodos y metodología

4.2.1 Condiciones de operación del reactor

Para los experimentos se utilizó un reactor LFI a escala laboratorio, el cual se describe en la Sección 2.1. El reactor se inoculó con 100 mL de partículas de polietileno de baja densidad como material de soporte y 60 mL de lodo granular anaerobio metanogénico, como se describe en la Sección 2.2. El reactor se alimentó con agua residual sintética, con medio mineral basal y una mezcla de etanol-acetato como sustrato. Bajo estas condiciones el reactor operó en lote por 24 h para formar la biopelícula, transcurrido este tiempo comenzó a operarse en continuo. El reactor se operó a temperatura ambiente, presión ambiental, con una carga orgánica de 1 g DQO/L, TRH de un día y con un flujo de recirculación de 164 mL/min, el cual permitió fluidificar el soporte (40% con respecto al volumen del reactor) y asegurar condiciones de mezcla completa.

La Tabla 4.1 muestra los diferentes periodos de operación del reactor LFI durante los 293 días que se operó en modo continuo. El reactor se operó sin la adición de Ag^+ durante los primeros 231 días (periodos I al III), de los 232 a los 293 días (periodos IV y V) se le alimentó Ag^+ como AgNO_3 . Las concentraciones de Ag^+ que se añadieron al reactor LFI se basaron en los resultados de las pruebas en lote con biopelícula, la concentración inicial fue de 20 mg/L de Ag^+ -11.5 mg/L NO_3^- y se incrementó gradualmente para permitir la adaptación de las bacterias, hasta alcanzar una concentración de 300 mg/L de Ag^+ -172 mg/L NO_3^- .

Tabla 4.1 Condiciones de operación en continuo del reactor LFI a temperatura ambiente (20-27°C)

Parámetro	Periodo Experimental				
	I	II	III	IV	V
Días de operación	0-53	54-94	95-231	232-244	245-293
Etanol: Ácido Acético	80:20	80:20	80:20	80:20	80:20
Carga orgánica (g DQO/L-d)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
TRH (días)	1	1	1	1	1
pH alimentación	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5
Carga de Ag^+ (mg/L-d)	-	-	-	20-50	150-300
Carga de NO_3^- (mg/L-d)				11.5-28.7	86.2-172.4
AME (g DQO/L-d)	0.15	0.19	0.18	-	0.11

4.2.2 Medios de cultivo

El agua residual sintética con la que se alimentó el reactor y el medio mineral basal para evaluar la AME se describen en la Sección 2.3.

4.2.3 Ensayos de actividad metanogénica específica

Durante la operación del reactor LFI se realizaron ensayos en lote, en diferentes periodos de operación, para evaluar la AME de la biopelícula. Para ello se utilizó etanol como sustrato a una carga orgánica de 1 g DQO/L. La AME se calculó mediante la pendiente de la curva de producción de CH_4 obtenida por el método de Gompertz y los SVI contenidos en cada botella. El método de la AME y la determinación de los SVI se describen en la Sección 2.4 y 2.6.4.

4.2.4 Análisis

Para evaluar el desempeño del reactor se determinó la eficiencia de remoción de DQO, eficiencia de remoción de Ag^+ , pH, alcalinidad y ORP, y realizar el análisis elemental del precipitado recuperado por MEB-EDAX se siguió la metodología de la Sección 2.6 y 2.8.

4.2.5 Extracción de ADN

La biopelícula se sometió a un proceso para extraer el ADN y poder realizar la identificación de microorganismos. Una vez obtenido el ADN se realizó la PCR para comprobar si el ADN no se había degradado y verificar si podía amplificarse para su posterior utilización en la pirosecuenciación, esto mediante electroforesis en gel de agarosa. Los procedimientos se describen en la Sección 2.9.

4.2.6 Pirosecuenciación

El ADN aislado se utilizó para realizar la pirosecuenciación por medio de SILVAngs analysis pipeline, con la finalidad de identificar los microorganismos presentes en la biopelícula (Quast et al. 2013). Este procedimiento se describe en la Sección 2.9.3.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Desempeño del reactor LFI

La Figura 4.1 muestra los resultados del desempeño del reactor con respecto al tiempo y las eficiencias de remoción promedio se presentan en la Tabla 4.2. Durante los primeros 17 días de operación de reactor se alcanzó una eficiencia de remoción de DQO de hasta 78%, sin embargo los días 20 y 31 se limpiaron las mangueras y el fondo del reactor, con la finalidad de eliminar los microorganismos que se encontraran en cualquier lugar del reactor que no fuera el soporte fluidificado, para así evitar interferencias en el desempeño de la biopelícula suspendida; esto provocó una disminución en la remoción de la DQO que cayó a un valor de 54%, señal de que los microorganismos eliminados estaban utilizando sustrato que podía ser utilizado por las bacterias en la biopelícula para la síntesis celular y para la producción de CH_4 .

En este periodo se alcanzó una eficiencia de remoción de DQO promedio de 59.6% y pH en el efluente de 7.51. La alcalinidad incrementó con el tiempo y su valor promedio fue de 445.52 mg CaCO₃/L. Estos resultados son indicio de la formación de la biopelícula anaerobia, debido a que la oxidación del sustrato orgánico por la actividad de las bacterias anaerobias ocasiona un incremento en el pH y alcalinidad del sistema. El arranque del reactor es la etapa más crítica en un proceso de digestión anaerobia, debido a que diversos aspectos microbiológicos deben ser estudiados para elucidar las reacciones bioquímicas (Ike et al., 2010) e imponer condiciones selectivas que permitan la proliferación del grupo trófico deseado. En este caso se evitó introducir SO₄²⁻ al sistema para prevenir la proliferación de BSR y fomentar el desarrollo de otro tipo de bacterias anaerobias como las BM, las cuales tienen la ventaja de producir biogás y poseen propiedades que permiten que el estudio de su ecología y actividad sea relativamente simple (Burlage et al., 1998).

En el periodo II aumentó la eficiencia de remoción de DQO promedio en el reactor a 67.5%, el pH promedio a 7.59 y la alcalinidad promedio a 544.5 mg CaCO₃/L. A los 62 días se observó una disminución en la eficiencia de remoción de la DQO a 46.6% por la limpieza del fondo del reactor, la biopelícula se recuperó de manera gradual hasta alcanzar una eficiencia de remoción de DQO de 67%. Durante todo este periodo se monitoreó el ORP el cual es un indicio de la actividad de las bacterias anaerobias, la oxidación de los sustratos orgánicos con el uso de aceptores de electrones oxidantes (NO₃⁻, CO₂) permitió disminuir el ORP del medio a condiciones reductoras. Al inicio del periodo el ORP fue de -284 mV, y disminuyó gradualmente a -340 mV, valor adecuado para asegurar el desarrollo de poblaciones metanogénicas que requieren un ORP inferior a -250 mV (Campos et al., 2012). En el periodo III la eficiencia de remoción promedio de DQO incrementó a 68.88%, la alcalinidad tuvo un valor promedio de 510.58 mg CaCO₃/L, el pH promedio en el efluente aumentó a 7.64 y el ORP promedio fue de -338 mV. Esto indica un incremento en la población de las bacterias anaerobias con respecto a los periodos anteriores, y su adaptación a las condiciones del sistema. A los 108 días disminuyeron la eficiencia de remoción de DQO, la alcalinidad y el pH a valores de 17.8%, 405 mg CaCO₃/L y 6.8, respectivamente, esto debido a una fuga en la manguera de recirculación del reactor LFI.

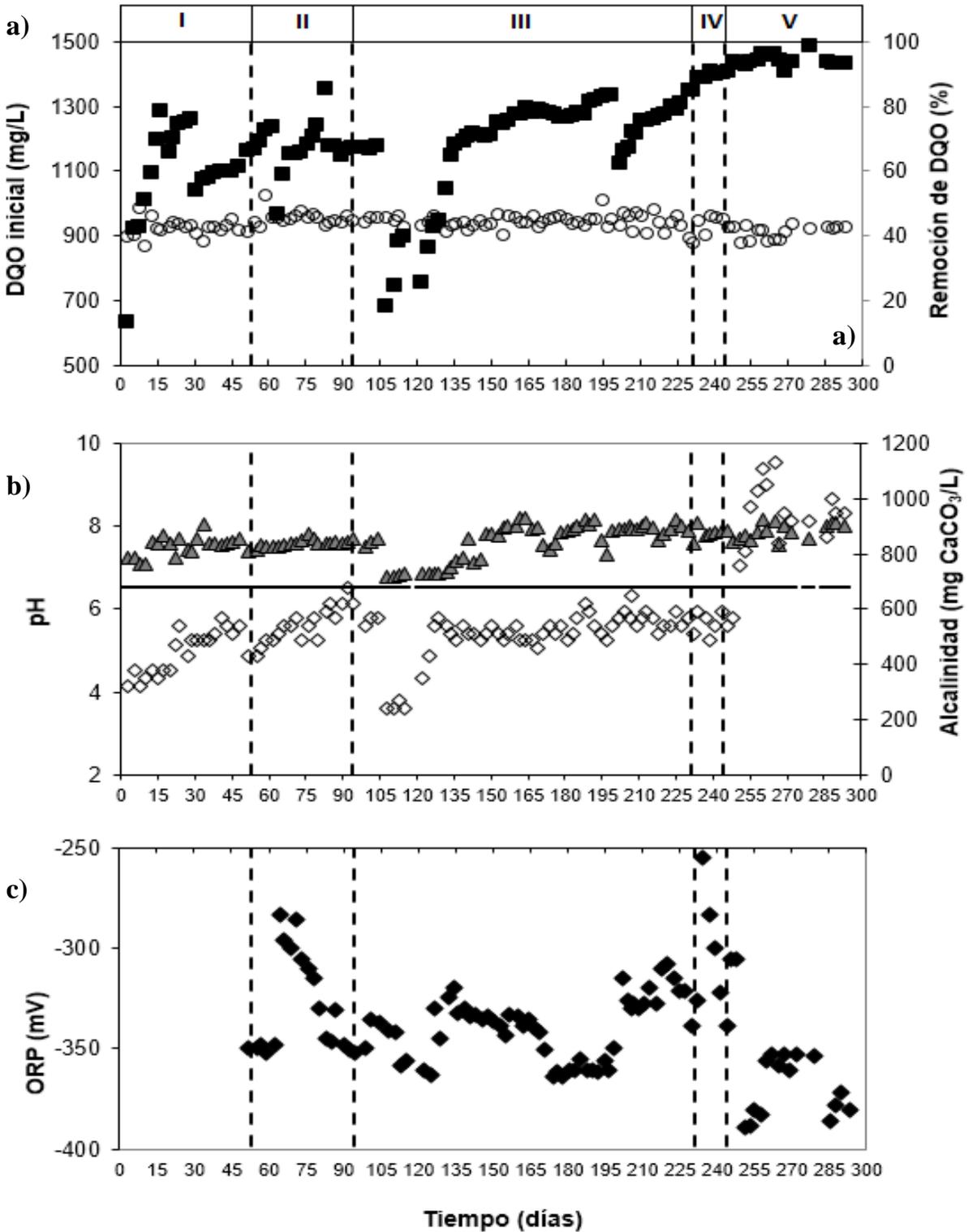


Figura 4.1 Desempeño del reactor LFI. a) (○) DQO en el afluente, (■) % de remoción de DQO. b) (—) pH en la alimentación, (▲) pH en el efluente, (◇) Alcalinidad por bicarbonatos. c) (◆) ORP.



Tabla 4.2 Desempeño del reactor LFI durante su operación en continuo para la reducción de Ag^+ a Ag^0 .

Parámetro	Periodo Experimental				
	I n= 21	II n= 24	III n= 49	IV n= 6	V n= 17
Días de operación	0-53	54-94	95-231	232-244	245-293
Eficiencias de remoción de DQO (%)	60 ± 15	68 ± 8	69 ± 16	89 ± 0.9	94 ± 2
Alcalinidad por bicarbonato (mg CaCO_3/L)	446 ± 79	544 ± 65.6	511 ± 87	556 ± 45	902 ± 164
ORP efluente (mV)	(-) 349 ± 2	(-) 326 ± 24	(-) 339 ± 16	(-) 300 ± 32	(-) 351 ± 35
pH efluente	7.5 ± 0.2	7.6 ± 0.1	7.6 ± 0.4	7.9 ± 0.1	7.9 ± 0.2

Promedios +/- desviación estándar

n= número de muestras

Es importante determinar cuándo se ha producido una perturbación en el proceso que pueda afectar su eficiencia para así poder reconducir el sistema hacia una operación estable (Marsili-Libelli y Beni, 1996), como se hizo en este estudio. A los 161 días de operación del reactor se retiró una cantidad considerable de biopelícula del reactor para realizar pruebas en lote, sin que se observara un efecto adverso sobre la eficiencia del reactor. Sin embargo a los 198 días se añadió la biopelícula previamente utilizada para las pruebas en lote al reactor LFI, esto ocasionó una reducción en la remoción de la DQO a un valor de 62% y un aumento en el ORP a -315 mV. El reactor se recuperó gradualmente y alcanzó una remoción de la DQO de 80.7%, alcalinidad de 565 mg de CaCO₃/L, pH en el efluente de 8.2 y ORP de -323 mV. Debido al desempeño del reactor durante este periodo se decidió iniciar con la adición de Ag⁺ al sistema.

En el periodo IV se alimentó el metal al reactor, con una carga inicial que fue de 20 mg/L-d de Ag⁺ y posteriormente se incrementó a 50 mg/L-d de Ag⁺. Conforme se aumentó la carga del metal el desempeño del reactor LFI se vio favorecido, con un constante incremento en la eficiencia de remoción de DQO, alcalinidad y pH, que alcanzaron valores promedio de 89.4%, 556 mg CaCO₃/L y 7.9, respectivamente. En cuanto se adicionó el metal se observó un aumento en el ORP del reactor a un valor de -255 mV, lo cual puede deberse a la introducción de NO₃⁻ al sistema, sin embargo al finalizar el periodo el ORP disminuyó nuevamente hasta alcanzar -338 mV, esto demuestra la resistencia de las bacterias anaerobias a la presencia de Ag⁺ en el reactor. Los microorganismos que crecen como biopelícula tienen un fenotipo único comparado con su contraparte planctónica, particularmente en el aumento a la resistencia a sustancias tóxicas. La resistencia de la biopelícula es altamente dependiente de la forma del metal y de su concentración, ésta comienza durante la fijación de las bacterias al soporte, y aumenta conforme la biopelícula madura (Patel, 2005). Durante este periodo se alcanzó una eficiencia de remoción promedio de Ag⁺ de 97.8%.

En el periodo V la carga del metal se incrementó a 150 mg/L-d Ag⁺ y posteriormente a 300 mg/L-d Ag⁺. Duldhardt et al. (2010) estudiaron los mecanismos de adaptación de bacterias desnitrificantes, reductoras de hierro y sulfato reductoras a la presencia de disolventes orgánicos y otros contaminantes, y encontraron que sus modificaciones adaptativas están relacionadas con el crecimiento celular, debido a que sus tasas de crecimiento son bajas su respuesta adaptativa requiere más tiempo que la de las bacterias aerobias. Por estas razones

el tiempo entre la adición de una concentración y otra, fue mayor que el aplicado en el periodo IV, con la finalidad de permitir la adaptación de las bacterias anaerobias a la presencia del metal e incrementar su resistencia. Durante este periodo el incremento de la concentración del metal favoreció al sistema y estimuló la actividad de las bacterias anaerobias pues a una concentración de 300 mg/L-d de Ag^+ la eficiencia de remoción de DQO alcanzó valores de hasta 97%. La concentración del metal determina si los metales pesados serán estimulatorios o inhibitorios para los microorganismos anaerobios (Mosey et al., 1971). El incremento en la actividad metabólica de los microorganismos puede deberse a los aceptores de electrones (NO_3^-) añadidos al sistema como AgNO_3 , los cuales promueven la degradación de la DQO. La alcalinidad aumentó conforme incrementó la concentración del metal, a valores por encima de 1000 mg CaCO_3/L , el pH en el efluente tuvo un valor promedio de 7.9. En este periodo se tuvo el ORP más reductor, con valores entre -353 y -389 mV. Estos resultados indican que los microorganismos adheridos en la biopelícula son resistentes al metal, debido a que fueron capaces de degradar la DQO y disminuir el ORP a condiciones reductoras aún ante la presencia de Ag^+ . La exposición de microorganismos a metales pesados activa una amplia variedad de estrategias de detoxificación intracelular, estos sistemas de defensa incluyen la precipitación mediada biológicamente, la quelación de iones metálicos a la superficie celular, exocitosis y la resistencia mediada por plásmidos. Debido a la complejidad del sistema anaerobio, los metales pesados pueden estar involucrados en procesos como precipitación, sorción, formación de complejos y reducción. La configuración del reactor tuvo un papel importante en la reducción del metal a Ag^0 , debido a que la concentración de Ag^+ alimentada al reactor fue diluida por la recirculación, y el afluente entró en contacto directo con el medio reductor al ingresar al reactor, por lo que el metal podría haberse reducido incluso antes de entrar en contacto con la biopelícula. La eficiencia de remoción promedio de Ag^+ durante este periodo fue de 99.0%.

4.3.2 Remoción y recuperación de Ag^+

En la Figura 4.2 se presentan las cargas de Ag^+ alimentadas al reactor LFI y las eficiencias de remoción del metal en función del tiempo de operación. En el periodo IV (232 días), la carga inicial de Ag^+ al reactor fue de 20 mg/L-d y se incrementó gradualmente a 50, 150 y 300 mg/L-d Ag^+ en los días 239, 246 y 258 respectivamente. La eficiencia de remoción de

Ag^+ se mantuvo por encima de un 96% durante casi toda la operación del reactor, y alcanzó un máximo de 99.4% a una carga de 150 mg/L-d de Ag^+ .

Existen diversos parámetros que tienen un papel importante en la remoción del metal. El pH tiene un efecto considerable en la disponibilidad y toxicidad de los metales pesados en un ambiente determinado, en general a pH ácido los metales existen como en forma acuacatiónica, pero a un pH alcalino precipitan como óxidos o hidróxidos insolubles. El pH al cual ocurre la precipitación o la reducción varía entre los diferentes metales y entre distintos estados de oxidación de un mismo elemento. Rafida y Sallis (2005) utilizaron un reactor con una biopelícula sulfato reductora expuesta a zinc, plomo y cadmio, el incremento en el pH de 4.5 a 7.1 permitió duplicar las eficiencias de remoción de los metales. El pH es también un parámetro importante en la digestión anaerobia, bacterias como las metanogénicas y desnitrificantes trabajan a pH cercano al neutro, y se deben mantener en este rango para su proliferación.

El ORP es otro parámetro que se debe considerar y que tiene estrecha relación con el pH, por ello es posible construir diagramas potencial-pH que muestran los valores en las que son estables las posibles especies metálicas que forman el sistema $\text{M}^+-\text{H}_2\text{O}$. Jain y Tyagi (1993) utilizaron microorganismos oxidantes de azufre para remover metales de un lodo de depuradora digerido anaerobicamente, en su investigación la caída del pH y el incremento en el ORP fueron los responsables de la solubilización del metal. De acuerdo con Gadd y Griffiths (1978) 1 ppm de cobre desaparece por completo de una solución a cualquier ORP cuando el pH es mayor que 6 y cuando el pH es menor a 6 requiere un ORP por debajo de 200 mV. En la presente investigación el incremento en el pH del efluente a valores entre 6.8-8.2 y la disminución del ORP a condiciones reductoras por debajo de -300 mV debido a la acción de las bacterias anaerobias, permitió la reducción de Ag^+ a Ag^0 de acuerdo con el diagrama de Pourbaix Ag- H_2O (Capítulo 1 Figura 1.1).

La reducción de la Ag^+ , pudo haber ocurrido también debido a la acción de ciertas enzimas presentes en las bacterias anaerobias. Kalimuthu et al. (2008) mencionan en su investigación que la enzima nitrato reductasa, involucrada en la síntesis de AgNPs, es inducida por los iones NO_3^- y reduce la Ag^+ a Ag^0 . Vaidyanathan et al. (2010) lograron mejorar la síntesis de AgNPs, mediante la estimulación de la producción de la enzima nitrato reductasa por

Bacillus Licheniformis. Esta enzima podría estar en el sistema por la presencia de bacterias desnitrificantes en la biopelícula (Sección 5.4.4.3).

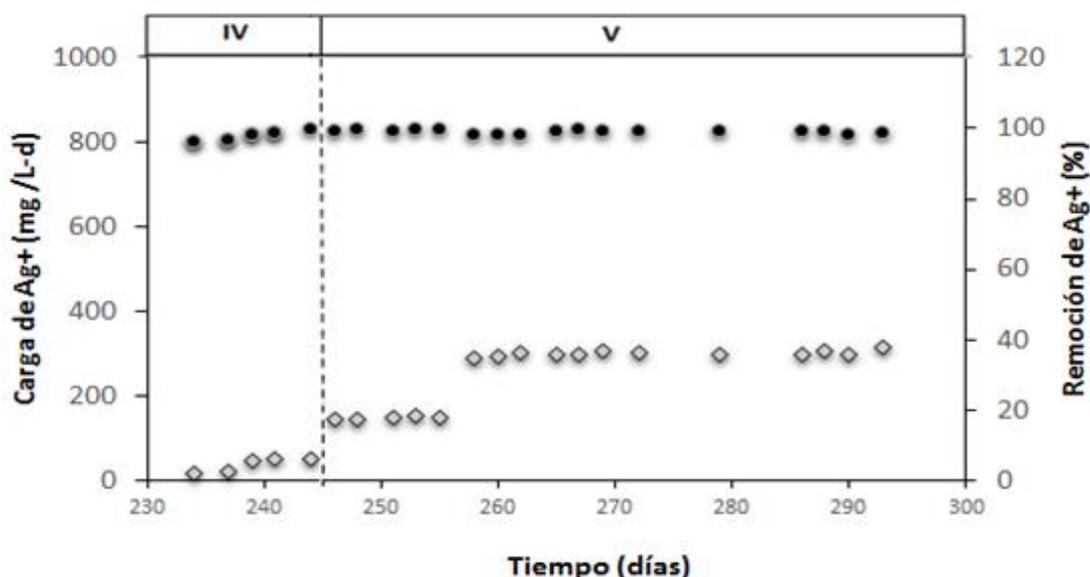


Figura 4.2 (♦) Velocidad de carga de Ag⁺ y (●) eficiencia de remoción de Ag⁺ (%)

El reactor LFI cuenta con un fondo cónico profundo que permite la sedimentación de Ag⁰, la cual se recuperó del sistema al finalizar la operación del reactor; otra parte se recuperó del efluente mediante su deposición en filtros tras su recolección y filtración durante los periodos IV y V. Es posible que una pequeña cantidad se haya perdido debido a la formación de AgNPs, como se observó al analizar el efluente por MET (Figura 4.4). Factores como la fuerza de corte en el reactor LFI y la presencia de compuestos orgánicos pueden interferir con la sedimentación de los metales. Otros parámetros que influyen en la recuperación del metal son el tamaño de partícula, carga superficial y la formación de complejos (Janyasuthiwong et al., 2015). El tamaño de partícula a su vez se ve influenciado por el tiempo de retención de los cristales, que debe ser suficiente para promover su aglomeración, y por la hidrodinámica del reactor que influye en la forma y tamaño de los aglomerados obtenidos. La caracterización por MEB-EDAX permitió realizar el análisis elemental de los precipitados recuperados del sistema (Figura 4.3).

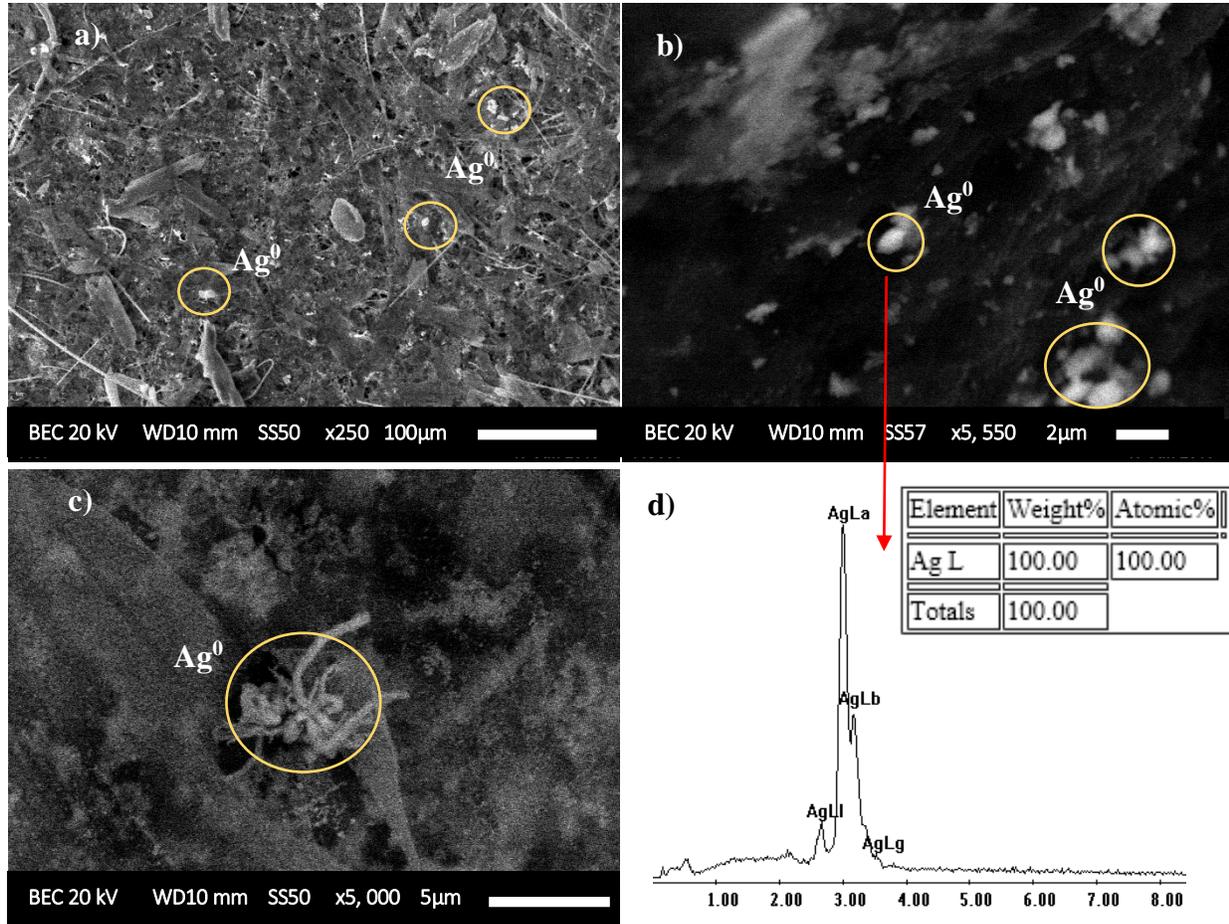


Figura 4.3 Imágenes por MEB del residuo recuperado del reactor LFI y microanálisis por EDAX de la imagen b), el cual es similar al de las imágenes a) y c).

De acuerdo con el análisis, el contenido de Ag (% en peso) fue de 100%. En un estudio previo Borja Maldonado (2014) encontró la presencia de nanopartículas de Ag_2S y AgNPs en el efluente del reactor LFI, por lo que en esta investigación tras encontrar partículas pequeñas de Ag^0 mediante MEB se decidió caracterizar el efluente del reactor por medio de MET. En las imágenes por MET se encontró la presencia de AgNPs de morfología irregular, las cuales se muestran en la Figura 4.4. El microanálisis confirmó que las nanopartículas formadas son de Ag^0 .

Las AgNPs tienen propiedades únicas que las hacen indispensables en múltiples aplicaciones como la medicina, electrónica y tecnología, siendo un producto valioso del reactor LFI.

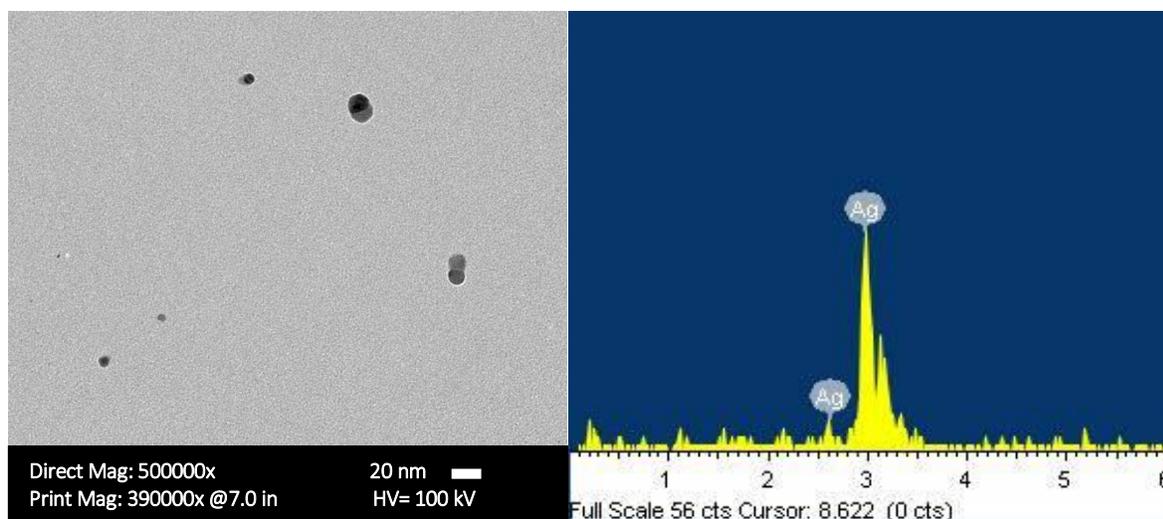


Figura 4.4 Imágenes por MET de AgNPs recuperadas del reactor LFI y su respectivo microanálisis por EDAX.

4.3.3 Actividad metanogénica específica de la biopelícula

El desempeño de la biopelícula fue evaluado a diferentes tiempos de operación del reactor mediante pruebas de AME. Para las pruebas se utilizó etanol como sustrato y los resultados se muestran en la Figura 4.5. El primer análisis de la AME en el reactor LFI se realizó a los 53 días de operación, con la finalidad de evaluar el desempeño de la biopelícula y confirmar la adhesión de microorganismos al soporte, los resultados muestran una AME de 0.15 g DQO-CH₄/g SVI-d y biomasa de 1.02 g SVI/Ls. Antes de la adición del metal (230 días) la AME fue de 0.18 g DQO-CH₄/g SVI-d y la cantidad biomasa incrementó a 1.15 g SVI/Ls, esto se puede atribuir a la maduración de la biopelícula, y a su adaptación a las condiciones del sistema. La edad de la biopelícula puede influir en propiedades de la pared celular que son cruciales para la adsorción de los metales (Zabochnicka-Świątek y Krzywonos, 2014), por esta razón debe transcurrir un tiempo considerable entre el arranque del reactor y la adición del metal.

Después de un mes de adicionar Ag⁺ al sistema (261 días), la AME disminuyó a 0.11 g DQO-CH₄/g SVI-d, esto indicó una disminución en la población metanogénica de la biopelícula. Las BM son microorganismos con baja velocidad de crecimiento y estrictos requerimientos de ORP (<-250 mV), son altamente sensibles a perturbaciones en el sistema y a la presencia de sustancias tóxicas o inhibitorias como detergentes, altas concentraciones de ácidos grasos,

iones de metales pesados y sulfuros (Leitao et al., 2006). Debido a su sensibilidad, la adición de Ag^+ y la formación de AgNPs en el sistema pudieron haber inhibido a las BM que no son resistentes al metal, sin afectar significativamente la actividad de otras bacterias anaerobias. García et al. (2012) estudiaron el efecto inhibitorio de AgNPs sobre la actividad de las principales comunidades microbianas presentes en las plantas tratamiento de agua residual, para ello utilizaron reactores de 1 L equipados con un transductor de presión para monitorear la producción de gas, 0.13 mg/L de AgNPs inhibieron la producción de biogás en un 33%, lo cual atribuyen a la liberación de iones Ag^+ . El efecto tóxico de las AgNPs depende de factores como la forma, tamaño, estabilidad, agregación, solubilidad, carga superficial y de la especie bacteriana (Abbaszadegan et al., 2015).

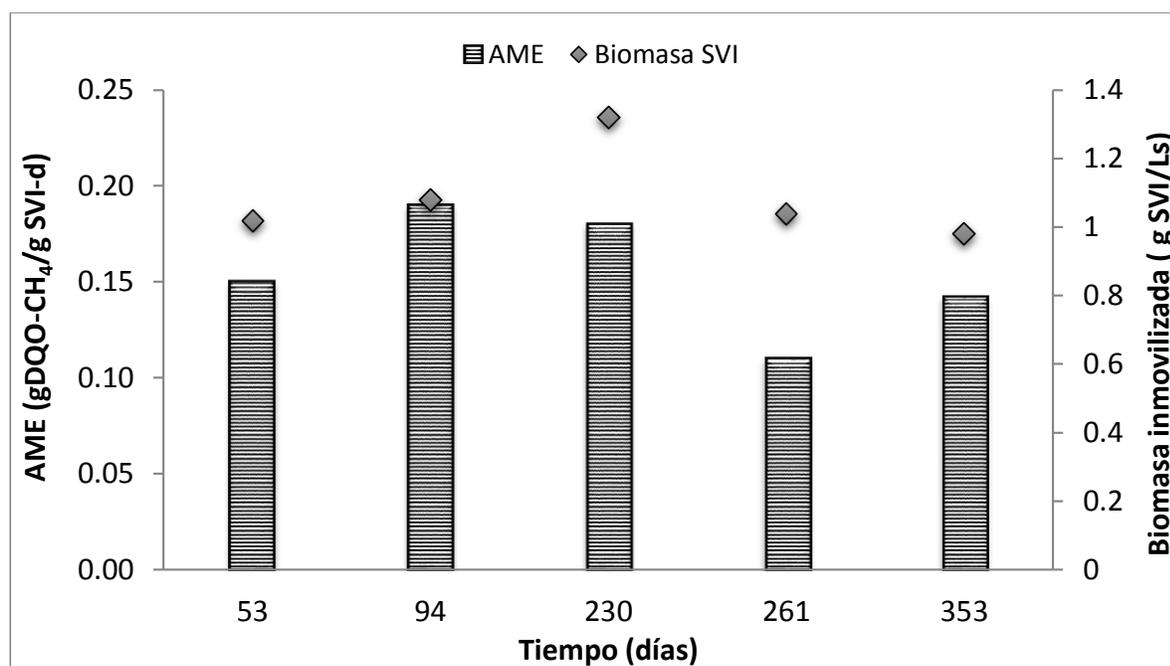


Figura 4.5 AME y biomasa adherida al soporte a diferentes tiempos de operación del reactor LFI.

Las BM también pudieron ser afectadas por los NO_3^- en el sistema, introducidos al añadir la Ag^+ como AgNO_3 . Akunna y Moletta (1998) realizaron pruebas en lote para evaluar la inhibición de la metanogénesis por la presencia de NO_3^- (156 mg/L) a un ORP de aproximadamente -300 mV, y encontraron que la producción de CH_4 comenzó una vez que

ocurrió la reducción de los NO_3^- . Banihani et al. (2009) afirman que la inhibición de la metanogénesis se debe más a la formación de intermediarios reducidos durante la desnitrificación, que a la presencia de NO_3^- , en sus pruebas en lote con lodo granular la inhibición de la metanogénesis fue evidente en cuanto comenzó la desnitrificación. El efecto inhibitorio de los óxidos de nitrógeno varía y depende de las especies metanogénicas y de sus sustratos metabólicos. En los experimentos en lote de Klüber y Conrad (1998) la adición de 30 mM de NO_3^- aún permitió una tasa de producción de CH_4 del 25-40% con respecto a la que se tenía antes de la adición del compuesto de nitrógeno.

Aún cuando la AME disminuyó, la biomasa incrementó a 1.32 g SVI/Ls, esto puede ser atribuido a la producción de sustancias exopoliméricas como respuesta a la presencia de Ag^+ . Además la adición del metal ocasionó un incremento en la actividad metabólica de bacterias anaerobias distintas de las BM, resistentes a Ag^+ , lo que aumentó la eficiencia de remoción de DQO y la eficiencia de remoción de Ag^+ (> 90%). Esto se puede atribuir a que algunos metales favorecen la actividad de los microorganismos anaerobios (Oleszkiewicz y Sharma, 1990). Los metales pesados pueden ser estimulatorios, inhibitorios o incluso tóxicos dependiendo de su concentración, forma química y de factores del proceso como pH, ORP y la concentración de la biomasa (Mosey et al. 1971). La biopelícula presentó resistencia al metal a concentraciones de hasta 300 mg/L Ag^+ . Los dos mecanismos principales de resistencia de las biopelículas involucran el transporte de especies iónicas ya sea hacia adentro o fuera de las células y la reducción a especies químicas menos tóxicas o alguna forma química que pueda ser extruida de las células (Rosen, 1996), esto debido a la adquisición de plásmidos o a la mutación de genes. Es probable que la formación de sustancias exopoliméricas contribuyera a su resistencia (Kaksonen & Puhakka, 2007). También la depleción de nutrientes en la biopelícula puede ocasionar que algunas bacterias entren en un estado estacionario de no crecimiento (Patel, 2005).

Con la finalidad de evaluar si el metal ocasionó un efecto tóxico sobre las BM adheridas al soporte, a los 293 días se retiró la biopelícula del reactor y se le colocó medio fresco sin metal durante 2 meses y se determinó su AME. En los resultados obtenidos se observó que la biopelícula alcanzó una AME de 0.14 g DQO- CH_4 /g SVI-d, similar a la que tuvo inicialmente (53 días), por lo que es posible decir que la Ag^+ no ejerció un efecto tóxico sobre la actividad de las BM del reactor LFI, el cual se vio favorecido por su diversidad bacteriana.

Esto concuerda con los resultados de las pruebas en lote con biopelícula expuesta a Ag^+ (Capítulo 4), en las cuales la biopelícula resistió concentraciones de hasta 500 mg/L Ag^+ . El valor de los SVI durante la recuperación fue de 0.98 g SVI/Ls, valor similar al que se obtuvo durante la estabilización del reactor.

4.3.4 Caracterización de la biopelícula

4.3.4.1 Tinción de Gram

Mediante una prueba de Tinción de Gram y el uso de un microscopio óptico se determinó que las bacterias presentes en la biopelícula son gram-negativas, como se muestra en la Figura 4.6, las cuales se tiñen de rojo debido a que su pared de peptidoglicano es muy fina y no retiene el colorante durante la tinción. Esta imagen muestra la presencia predominante de bacilos y algunos diplococos. Diversos estudios han demostrado que las bacterias gram-negativas tienden a ser más tolerantes a los metales pesados que las bacterias gram positivas (Hughes y Poole, 1989; Duxbury y Bicknell, 1983). Lima et al. (2012) analizaron la tolerancia bacteriana a distintos metales, y encontraron que las bacterias resistentes a la presencia de Ag^+ fueron principalmente Gram-negativas, como *Bacillus sp* con mono-resistencia.

Las paredes celulares de las bacterias no son idénticas. De hecho la composición de la pared bacteriana es el principal determinante para clasificar las bacterias en gram-positivas y gram-negativas. Las diferencias en su estructura y composición resultan en diversas propiedades para ambos tipos de bacterias, las bacterias gram-negativas presentan dos membranas lipídicas entre las que se localiza una fina pared celular de peptidoglicano, mientras que las bacterias gram-positivas presentan sólo una membrana lipídica y la pared de peptidoglicano es mucho más gruesa. Las paredes celulares tienen un papel importante en la unión de los iones metálicos, los grupos funcionales amino presentes en peptidoglicanos, fosfolípidos y polisacáridos de las bacterias gram-negativas son los principales constituyentes responsables por el carácter aniónico y las propiedades de unión de su pared celular.

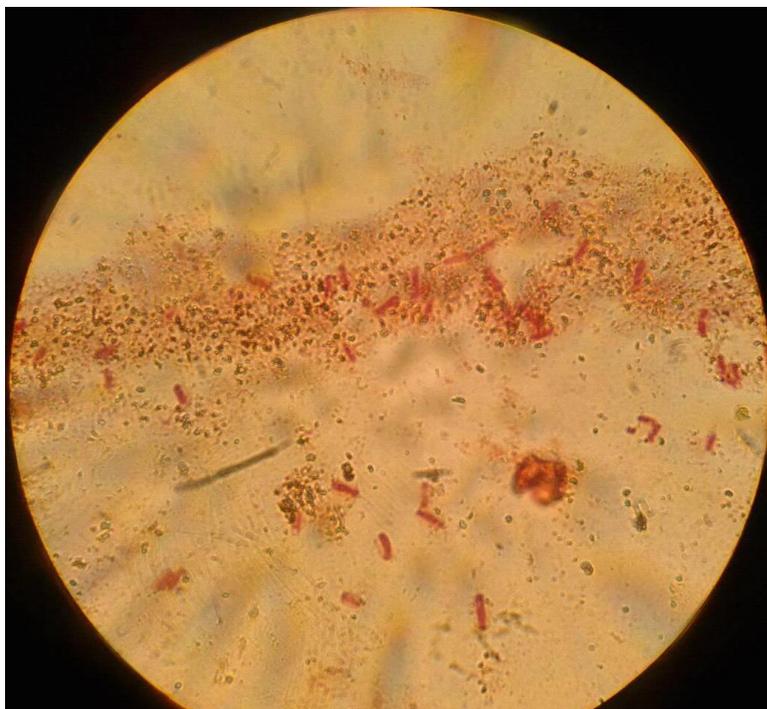


Figura 4.6 Imagen de las bacterias anaerobias en la biopelícula tras el método de tinción de Gram.

4.3.4.2 Microscopía electrónica de barrido

La biopelícula adherida al soporte se observó por medio de MEB. La Figura 4.7 a) muestra la adhesión de microorganismos a las partes rugosas de un pellet, las partes claras corresponden a los lugares en donde se produjo la colonización. En la b) se observa la deposición de Ag^0 en la superficie del soporte de la biopelícula. En la c) y la d) se puede apreciar la colonización microbiana sobre el soporte junto con sustancias que pueden ser sales del medio o sustancias exopoliméricas. Al igual que en la prueba de Tinción de Gram se observó la presencia de microorganismos en forma de cocos y bacilos, y estructuras que asemejan sustancias exopoliméricas.

Con esto se comprobó la adhesión de las bacterias anaerobias al soporte de polietileno de baja densidad, sin embargo estos análisis no proporcionan información sobre los filos de bacterias adheridas, por lo que se requirió realizar análisis con biología molecular con la finalidad de obtener dicha información.

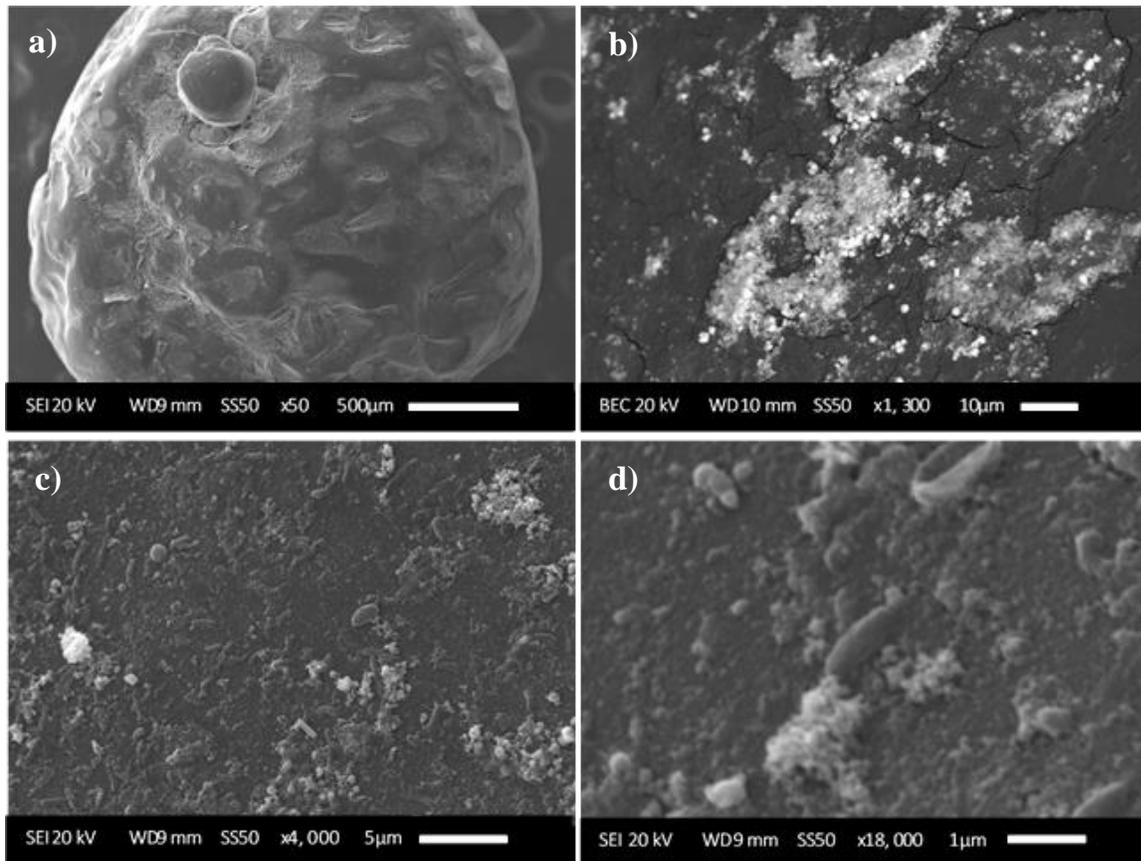


Figura 4.7 Inmovilización de las bacterias anaerobias en el soporte. a) micrografía de un pellet. b) superficie del soporte de la biopelícula. c) y d) colonización microbiana sobre el soporte.

4.3.4.3 Pirosecuenciación

El principal objetivo del aislamiento del ADN, y de su posterior secuenciación y análisis mediante SILVAngs fue el de identificar las especies dominantes en la biopelícula anaerobia, con la finalidad de conocer las bacterias responsables por la reducción de Ag^+ a Ag^0 . Los resultados se muestran en la Figura 4.8.

La biopelícula está compuesta principalmente por *Proteobacterias*, las cuales son gram-negativas, generalmente anaerobias e incluyen muchas de las bacterias responsables por la fijación del nitrógeno, las cuales pueden disminuir el ORP del medio al reducir aceptores de electrones como el NO_3^- .

Dentro de este filo destaca el género *Dechloromonas*, que incluye las *Dechloromonas denitrificans* las cuales son productoras de N₂O y contienen la enzima nitrato reductasa, señalada por diversos autores como la responsable por la reducción de Ag⁺ a Ag⁰ durante la síntesis AgNPs biogénicas (Kumar et al., 2014; Shivaji et al., 2011; Horn et al., 2006).

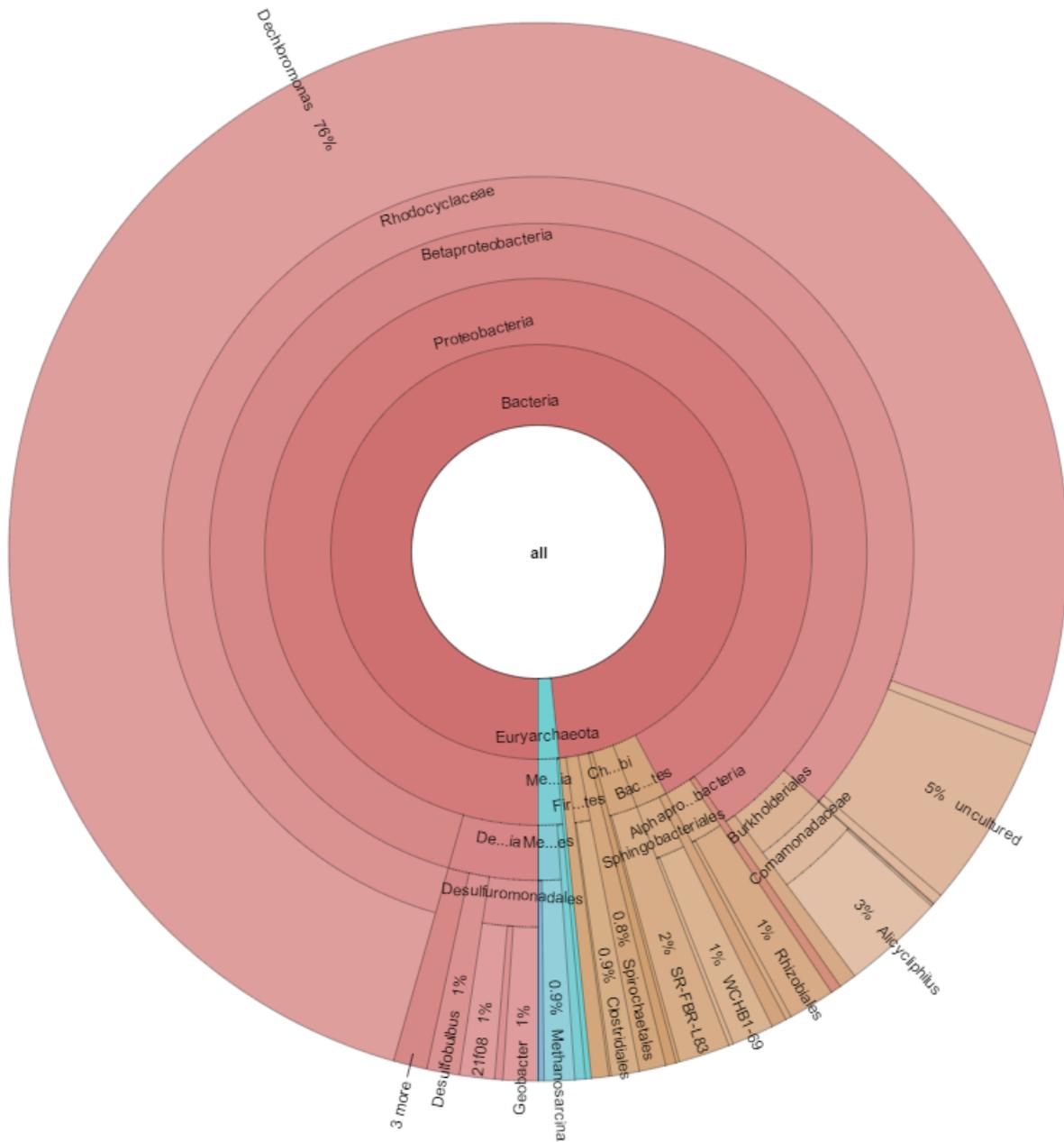


Figura 4.8 Resultados de la pirosecuenciación visualizados por Krona, composición total de la biopelícula.

Se encuentra también el género *Alicyclophilus* que incluye a las *Alicyclophilus denitrificans* bacterias capaces de degradar compuestos aromáticos, que utilizan el NO_3^- como aceptor de electrones. Otras bacterias desnitrificantes presentes son las *Rhizobium* y las *Pseudomonas*, encargadas de la fijación del nitrógeno (Babu et al., 2015), así como las *Thiobacillus* que acoplan la oxidación de compuestos de sulfuro inorgánico con la reducción de compuestos oxidados de nitrógeno como NO_3^- y NO_2^- a N_2 . Otros géneros presentes son *Geobacter*, microorganismos anaerobios que tienen la capacidad de oxidar compuestos orgánicos y metales, como el hierro, y *Desulfobulbus* BSR elipsoidales que descomponen ácidos grasos. Las *Euryarchaeota* destacan como otro filo importante en la biopelícula, el cual incluye a los metanógenos que oxidan distintos sustratos orgánicos para la producción de CH_4 , las especies metanogénicas dentro de la biopelícula se muestran en la Figura 4.9. El 58% de las BM son del género *Methanosarcina*, los únicos metanógenos anaerobios capaces de producir CH_4 por tres rutas metabólicas distintas, por la vía acetoclástica, hidrogenotrófica, o por el metabolismo de compuestos metilados de un carbono como el metanol (Reichlen et al., 2012). El 20% son *Methanosprillum*, las cuales crecen mejor con una mezcla de 80% H_2 y 20% CO_2 , pero que también pueden utilizar formiato y acetato como fuente de carbono, incluso presentan una respuesta quimiotáctica a la presencia de acetato, sin embargo no pueden utilizar el piruvato, metanol, etanol o benzoato como sustratos (Ferry et al., 1974). El 11% son *Methanobrevibacter*, bacterias que se encuentran en la flora intestinal humana y que reciclan el H_2 en CH_4 . El 11% restante pertenece a las *Methanosaeta*, las cuales son bacterias acetoclásticas con un mecanismo similar al de las *Methanosarcina* pero con enzimas distintas (Smith y Ingram-Smith, 2007). Es posible que algunas poblaciones que se encuentran en la biopelícula estén inactivas, como en el caso de Silva et al. (2006), quienes estudiaron la adhesión bacteriana a un soporte de polietileno de baja densidad en un reactor anaerobio diferencial con un agua residual sintética rica en SO_4^{2-} y encontraron 32.7% de BSR y 22.6% de BM, sin embargo aún con la presencia de BSR en la biopelícula no tuvieron reducción de SO_4^{2-} .

Al reactor LFI de este experimento se le suministró diariamente cierta cantidad de NO_3^- como parte del medio mineral basal y se utilizó AgNO_3 como fuente de Ag^+ , esto pudo haber permitido la proliferación de grupos tróficos que utilizan las formas oxidadas de nitrógeno como aceptores de electrones. El uso de etanol y acetato como sustratos podría haber

permitido también la proliferación de BM, las cuales se sabía estaban presentes por las pruebas de AME.

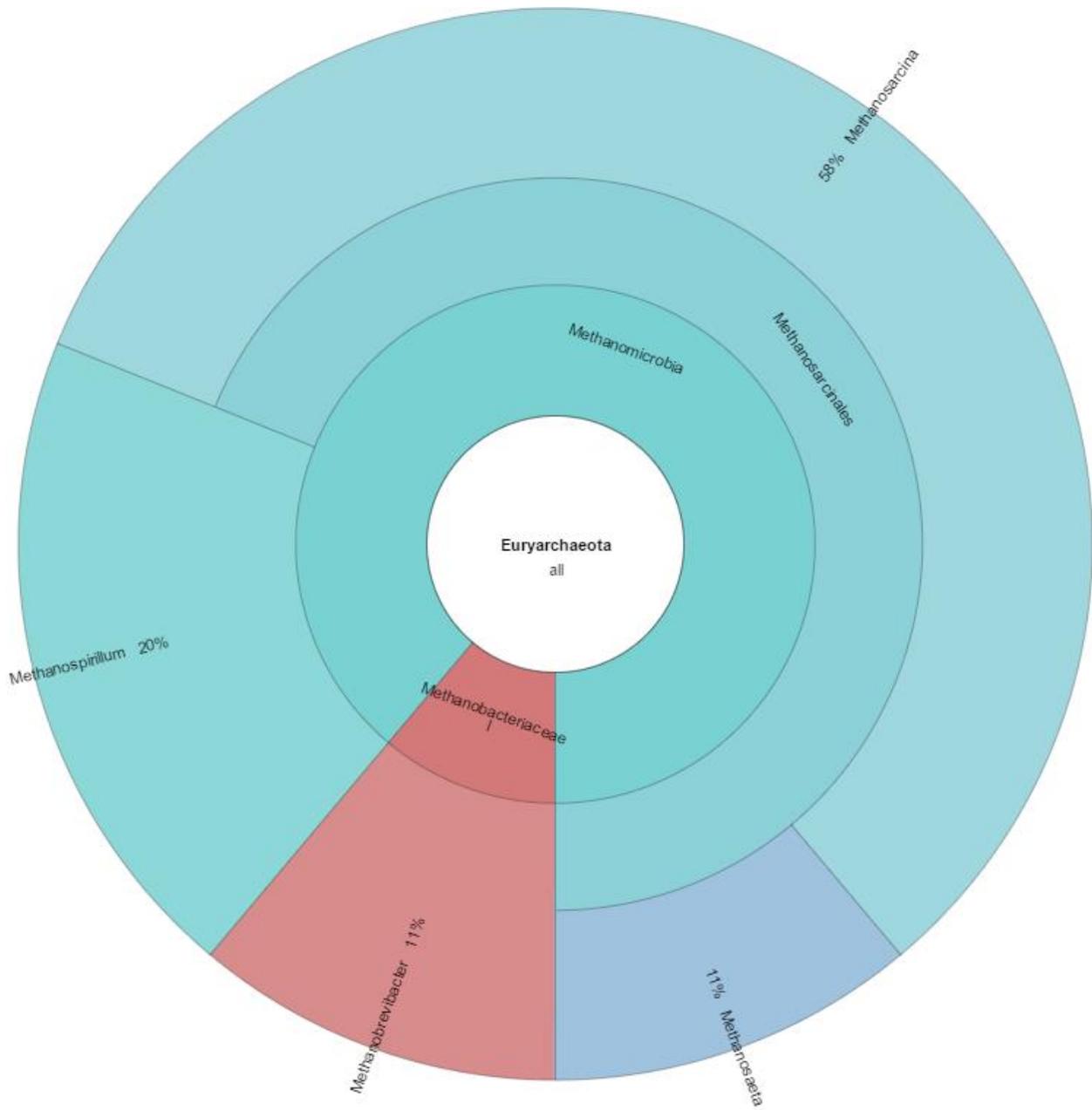


Figura 4.9 Resultados de la pirosecuenciación visualizados por Krona, especies Archaea presentes en la biopelícula.

La composición de las comunidades bacterianas en la biopelícula puede verse afectada por la presencia de compuestos como los metales pesados que pueden influir en la cantidad de

biomasa, la actividad metabólica y la diversidad de las comunidades bacterianas (Kozdrój, 2000; Frostegård et al., 1996). Es posible que el incremento en la tolerancia de una comunidad bacteriana en un ambiente contaminado se deba a la transferencia de genes por medio de los plásmidos. Los cambios en las poblaciones bacterianas tras la exposición a metales pesados puede explicarse por un aumento en las especies tolerantes al metal, que existían en menores cantidades antes de entrar a un medio contaminado (Bååth, 1989). Esta técnica no proporciona información sobre la distribución espacial de los microorganismos en la biopelícula, la cual está íntimamente relacionada con la eficacia y el rendimiento del proceso (Steyer et al., 2006). Sin embargo se sabe que en un sistema de crecimiento adjunto las bacterias desnitrificantes, con menor densidad de biopelícula y mayores tasas de crecimiento tienden a crecer a lo largo de la superficie del soporte, mientras que las BM densas, con menores tasas de crecimiento, se acumulan en el interior del soporte.

4.4 Conclusiones

Este estudio reporta la factibilidad de recuperar Ag^0 de un agua residual sintética a partir de un proceso biológico con una biopelícula anaerobia en un reactor LFI. La reducción de Ag^+ a Ag^0 pudo ocurrir debido a la disminución del ORP a condiciones reductoras por la actividad de las bacterias anaerobias que oxidan la DQO, o por la acción de enzimas presentes en las bacterias como la nitrato reductasa. La biopelícula resistió concentraciones de hasta 300 mg/L de Ag^+ . La presencia de Ag^+ y NO_3^- estimularon la actividad del consorcio bacteriano en la biopelícula, esto se vio reflejado en el incremento de la eficiencia de remoción de DQO y en la disminución del ORP. La caracterización del metal recuperado confirmó la presencia de Ag^0 y AgNPs en el efluente, las condiciones hidrodinámicas y la configuración del reactor con fondo cónico facilitó la recuperación del metal. El uso de bacterias anaerobias puede ser una alternativa viable para la recuperación de metales pesados de aguas residuales, debido a que este proceso utiliza propiedades naturales de los microorganismos para adsorber y reducir metales.

**CAPITULO 5. EFECTO ANTIBACTERIANO DE AgNPs
BIOGÉNICAS FORMADAS A PARTIR DE UNA BIOPELÍCULA
ANAEROBIA SOBRE *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.**

Resumen

En la presente investigación se reporta por primera vez un método efectivo para la síntesis extracelular de AgNPs a partir de una biopelícula anaerobia y la evaluación de su efecto antibacteriano sobre *E. coli* y *S. aureus*. Los resultados obtenidos por absorción UV-vis y MET confirmaron la presencia de AgNPs en un rango entre 2 y 45 nm. Los efectos antibacterianos fueron evaluados sobre células platónicas y biopelículas de las cepas microbianas, *E. coli* fue inhibida a bajas concentraciones de AgNPs, mientras que los efectos inhibitorios del crecimiento en *S. aureus* fueron moderados. Al combinar las AgNPs con otros compuestos (H_2O_2), se puede incrementar su efectividad, posiblemente debido a la liberación de iones Ag^+ . Este método es una alternativa económica para la síntesis de AgNPs y otro tipo de metales, pudiendo ser utilizado para su producción a gran escala.

Palabras clave: nanopartículas de plata, biosíntesis, biopelícula anaerobia, antibacteriano.

5.1 Introducción

El desarrollo reciente en diversas áreas de la ciencia ha demostrado la posibilidad de manipular la materia a escalas extremadamente pequeñas, del nivel de átomos o moléculas. La nanotecnología es un área en crecimiento comúnmente definida como el estudio, control y reestructuración de la materia en el orden de nanómetros (menos de 100nm) para crear materiales con nuevas funciones y propiedades, inmensamente diferentes a las que exhiben estos mismos materiales en una macroescala. Debido a estas propiedades las nanopartículas han sido explotadas en un amplio rango de aplicaciones como son cosméticos, electrónicos, medicamentos, energías renovables, remediación ambiental y dispositivos biomédicos (Tran et al., 2013). Existe un interés creciente por sintetizar nanopartículas metálicas por métodos biológicos, debido a que estos procesos ocurren a pH cercano al neutro y a condiciones ambientales de presión y temperatura (Pat et al., 2013), son técnicas de bajo costo donde el agente reductor y el agente estabilizante son sustituidos por compuestos biológicos (Tran et al., 2013). Se ha encontrado que algunos organismos, tanto unicelulares como multicelulares, son capaces de sintetizar nanopartículas metálicas de manera intra o extracelular. Entre éstos se encuentran hongos como el *Fusarium solani* utilizado para sintetizar nanopartículas de oro (Gopinath y Arumugam, 2014); algunos géneros de algas como *Anabaena*, *Calothrix* y *Leptolyngbya cyanobacteria* con los cuales se producen nanopartículas de oro, plata, paladio y platino (Brayner et al., 2007) y bacterias como *Bacillus CS 11* utilizada para sintetizar AgNPs (Das et al., 2014). Además los procesos biológicos poseen la ventaja de llevarse a cabo a condiciones ambientales de presión y temperatura.

La producción y aplicación de nanopartículas a las ciencias biológicas tiene especial importancia dentro de la nanotecnología pues se ha demostrado que nanopartículas de cobre, zinc, titanio, magnesio, oro y plata exhiben propiedades antimicrobianas ante un amplio rango de microorganismos patógenos (Gholami-Shabani et al., 2014). Por su pequeño tamaño las nanopartículas son capaces de entrar a las células y llegar a sitios donde los compuestos convencionales no logran llegar (McNeil, 2005). Destacan las AgNPs debido a que cuentan con propiedades antisépticas, antibacterianas, antifúngicas, antivirales, anticancerígenas y antiinflamatorias (Kalishwaralal et al., 2009) que resultan fundamentales ante la evolución de microorganismos cada vez más resistentes a los antibióticos. Sin

embargo, debido a estas mismas propiedades la síntesis microbiana de AgNPs está restringida a un pequeño grupo de organismos que son resistentes a dicho metal (Díaz, 2004). Entre las bacterias que han sido utilizadas para sintetizar AgNPs se encuentran *Pseudomonas stutzeri* AG259 (Klaus et al., 1999), *Bacillus subtilis* EWP-46 (Velmurugan et al., 2014), *Bacillus licheniformis* (Kalishwaralal et al., 2008), cepas de *Lactobacillus* (Nair y Pradeep, 2002), entre otras.

En la presente investigación se decidió realizar la síntesis biológica de AgNPs a partir de una biopelícula anaerobia, con base en los resultados obtenidos para el reactor LFI, en cuyo efluente se encontró la presencia de AgNPs (Capítulo 5 Sección 5.3.2.) al tratar un agua residual sintética con Ag^+ . Se utilizó el líquido del reactor LFI, el cual tiene valores negativos de ORP, para sintetizar AgNPs y evaluar sus propiedades antibacterianas ante células planctónicas y biopelículas de *E. coli* y *S. aureus*, debido a que son bacterias patógenas que desempeñan un papel importante en brotes de enfermedades causadas por el consumo de alimentos (Castro del Campo et al., 2004). *E. coli* es una bacteria gram-negativa responsable de desórdenes gastrointestinales y afecciones diarreicas. *S. aureus* es una bacteria gram-positiva que ocasiona gastroenteritis, vómito, diarrea e inflamación de la mucosa gástrica e intestinal. Ambas pueden causar implicaciones clínicamente severas y su clasificación en gram-negativas o positivas se debe a las diferencias en la composición de su pared celular. Las bacterias gram-positivas tienen una capa gruesa de peptidoglicano (30 nm) que se encuentra unida a ácidos teicoicos, estas bacterias no tienen una membrana externa; mientras tanto las bacterias gram-negativas son más complejas tanto química como estructuralmente ya que tienen una capa delgada de peptidoglicano (2-3 nm) que se encuentra entre una membrana citoplásmica y una membrana externa, la cual está compuesta por lipopolisacáridos y suele conferirle resistencia a compuestos hidrofóbicos (Hajipour et al., 2004). Es importante evaluar la actividad antibacteriana de las AgNPs frente a células planctónicas y biopelículas debido a que uno de los principales fallos de los programas de desinfección es su ineficacia ante microorganismos patógenos que tienen la habilidad para adherirse a superficies, formando biopelículas que son hasta entre 10 y 1000 veces más resistentes que las células planctónicas (Gilbert et al., 2002; Mah y O'Toole, 2001). Estudios previos ya han reportado las propiedades antibacterianas de AgNPs sobre *E. coli* y *S. aureus* (Sintubin et al., 2011; Kim et al., 2007), sin embargo los resultados varían de acuerdo con

parámetros físicos y químicos de las nanopartículas como son tamaño, forma, estabilidad, aglomeración, solubilidad y carga superficial (Abbaszadegan et al., 2015). Algunos estudios mencionan que las nanopartículas de menor tamaño tienen mejor actividad antimicrobiana debido a que incrementa su área superficial (Jeong et al., 2014; Morones et al., 2005). Con respecto a la forma, Pal et al. (2007) observaron que las nanopartículas en forma triangular son más tóxicas que las formas esféricas y alargadas, probablemente debido al porcentaje de facetas activas. Badawy et al. (2011) encontraron que las nanopartículas con carga positiva en su superficie son más efectivas que aquellas con carga neutra o negativa. Por estas razones se deben optimizar las condiciones de síntesis para obtener nanopartículas con aquellas características que mejor convengan a cada propósito.

La biopelícula anaerobia, utilizada para la síntesis de las AgNPs, se formó a partir de un lodo granular anaerobio proveniente de una planta de tratamiento de aguas residuales; donde tiene la finalidad de eliminar la DQO y otros compuestos nocivos de las aguas residuales. Esto se realiza mediante la digestión anaerobia, proceso en el cual interaccionan distintas poblaciones bacterianas para degradar la DQO y generar productos como CO_2 y CH_4 , para ello utilizan iones como NO_3^- o SO_4^{2-} que funcionan como aceptores de electrones para la oxidación de los compuestos orgánicos; entre las poblaciones bacterianas pueden encontrarse bacterias hidrolíticas, acidogénicas, acetogénicas, sulfato reductoras, metanogénicas, desnitrificantes, etc. Este proceso ha sido previamente utilizado en bioremediación de suelos y en el tratamiento de aguas residuales que contienen metales pesados (Gallegos-García et al., 2009). Sin embargo existen pocos estudios sobre su aplicación para la síntesis de nanopartículas metálicas, recientemente Kumara et al. (2014) utilizaron por primera vez un cultivo mixto de bacterias en condiciones anaerobias provenientes de manura de cerdo para sintetizar nanopartículas de oro y plata, las bacterias predominantes en el consorcio bacteriano fueron *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus amylophilus* y *Salmonella enterica*. Sin embargo no existen reportes sobre el uso de una biopelícula anaerobia formada a partir de un lodo granular que permita sintetizar AgNPs de manera extracelular.

5.2 Métodos y metodología

5.2.1 Biosíntesis y caracterización de las nanopartículas de plata

La síntesis de AgNPs se realizó en botellas serológicas según lo descrito en la metodología (Sección 2.10.1), con 100 mL de líquido proveniente del reactor que tenía condiciones reductoras de ORP y una solución acuosa de AgNO₃. Una vez finalizada la síntesis, las AgNPs se centrifugaron y resuspendieron en agua desionizada; y fueron caracterizadas por espectroscopia UV-Visible, MEB y MET. La concentración de AgNPs se determinó por espectroscopia de absorción atómica (AAS)

5.2.2 Cepas bacterianas

Para las pruebas antibacterianas se utilizaron las cepas *E. coli* CECT 434 (gram-negativa) y *S. aureus* CECT 976 (gram-positiva), como se detalla en la Sección 2.10.2.1.

5.2.3 Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida

La CMI se determinó por el método de microdilución en caldo y la CMB se determinó colocando 10 µL de cada pocillo donde se inhibió el crecimiento en platos de Agar, como se especifica en la Sección 2.10.2.2. Para los experimentos se utilizaron concentraciones de AgNPs biogénicas (entre 1.5 y 25 µg/L). Esta metodología se utilizó también para evaluar el efecto de combinar AgNPs y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) sobre *S. aureus*.

5.2.4 Formación de biopelículas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

Las biopelículas de *E. coli* y *S. aureus* fueron desarrolladas de acuerdo con el método para placas de microtitulación modificado por Stepanovic et al. (2000) de la Sección 2.10.2.3.

5.2.5 Actividad de control de la biopelícula

La capacidad de las AgNPs para remover e inactivar biopelículas de *E. coli* y *S. aureus* se evaluó de acuerdo con lo descrito en la Sección 2.10.2.4. Se realizó el mismo experimento sobre biopelículas de *E. coli* y *S. aureus* de 72 horas., así como la evaluación del control que

tienen las AgNPs sobre biopelículas mixtas (50% *E. coli* y 50% *S. aureus*) para observar la interacción entre ambas cepas.

5.3 Resultados y discusión

5.3.1 Síntesis y caracterización de nanopartículas de plata

La síntesis de AgNPs a partir de una biopelícula anaerobia, cuya población bacteriana incluye bacterias fijadoras de nitrógeno como *Dechloromonas*, *Alicyclophilus*, *Rhizobium* y *Pseudomonas*, además de BM como *Methanosarcina* y *Methanosprillum* (Capítulo 5 Sección 5.3.4.3), quedó demostrada. En la Figura 5.1 se observa el cambio en la coloración del líquido durante la síntesis de las AgNPs, antes de la reacción el líquido proveniente del reactor LFI era incoloro (1), al agregar la sal de plata (AgNO_3) se observó la presencia de partículas plateadas en la parte superior del líquido (2), una vez terminada la reacción tras 24 horas se observó un cambio de coloración a amarillo-café (3), dicho cambio ha sido reportado por diversos autores como una indicación de la formación de las AgNPs como consecuencia de la resonancia del plasmón superficial de las mismas (Gholami-Shabani et al., 2014).

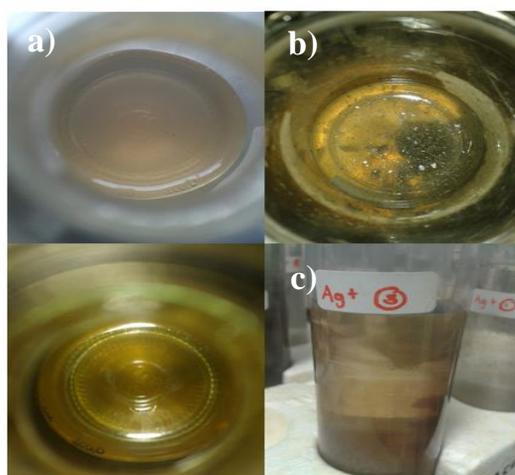


Figura 5.1. Fotografía del cambio en la coloración del líquido proveniente del reactor durante la síntesis de AgNPs. a) Antes de la adición de Ag^+ . b) al instante de añadir Ag^+ . c) después de 24 h de reacción.

La espectroscopia UV-visible es una técnica ampliamente utilizada en el área de los nanomateriales, pues la aparición de picos determinados indican si el proceso de síntesis ha

concluido con la formación de nanopartículas. Un pico de absorción alrededor de los 400 nm es indicativo de la presencia de AgNPs (Kapoor, 1998). Además algunas propiedades como el tamaño, forma y estado de la agregación de las nanopartículas pueden influir en la forma y posición del pico de absorción (Shenar et al., 2005). En este caso se utilizó un espectrofotómetro UV-Visible (HACH modelo DR/400, USA) para confirmar la aparición de AgNPs. La Figura 5.2 muestra el espectro de absorción obtenido al realizar un barrido entre los 200 y 1000 nm, se observó un pico de absorción único a los 423 nm de longitud de onda, el cual es característico de las AgNPs (Vodnik et al., 2008). Otro pico de absorción aparece a los 270 nm, el cual se atribuye a los aminoácidos aromáticos de las proteínas (Eftink y Ghiron, 1981), en este caso probablemente liberadas por las bacterias de la biopelícula. Phanjom y Ahmed (2015), al caracterizar sus AgNPs biogénicas, encontraron un pico a 220 nm correspondiente al AgNO_3 y un pico a 260 nm correspondiente al filtrado celular fúngico utilizado para la síntesis, este pico lo atribuyen a aminoácidos aromáticos (fenilalanina y tirosina junto con residuos de triptófano). Cabe recordar que una biopelícula se mantiene unida debido a la secreción de sustancias exopoliméricas, las cuales están formadas principalmente por polisacáridos y proteínas que proveen la matriz en la cual los microorganismos estarán inmersos y contribuyen a su resistencia (Masse et al., 1992).

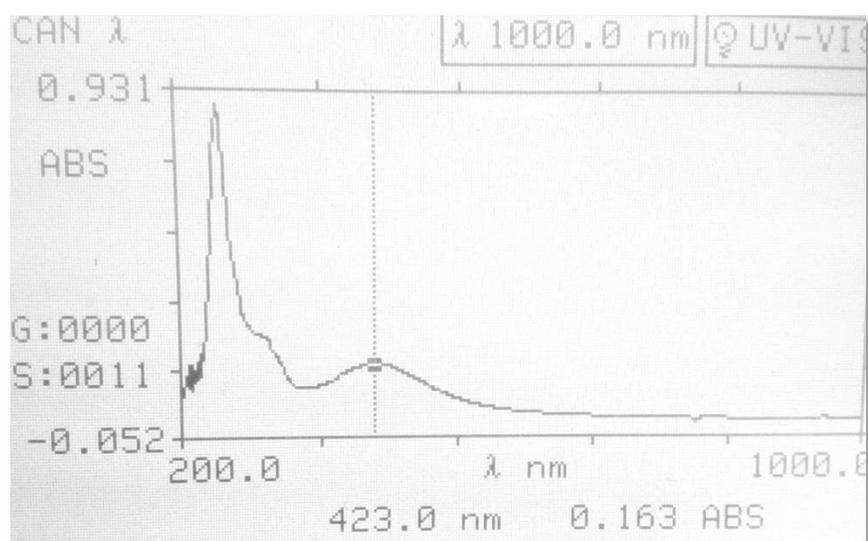


Figura 5.2. Espectro UV-visible de AgNPs sintetizadas biológicamente.

Para constatar la información proporcionada por el espectro de absorción, se analizaron muestras de la suspensión coloidal por MET. En la Figura 5.3 se observan AgNPs individuales y aglomeradas, las cuales se encuentran en un rango de tamaño entre los 2 y 45 nm. La variación en el tamaño de las nanopartículas se observa también en la amplitud del pico en el espectro UV-visible. La poca aglomeración entre las AgNPs puede deberse a un encapsulamiento por las proteínas liberadas, lo cual le confiere estabilidad a la suspensión coloidal (Ahmad et al., 2003).

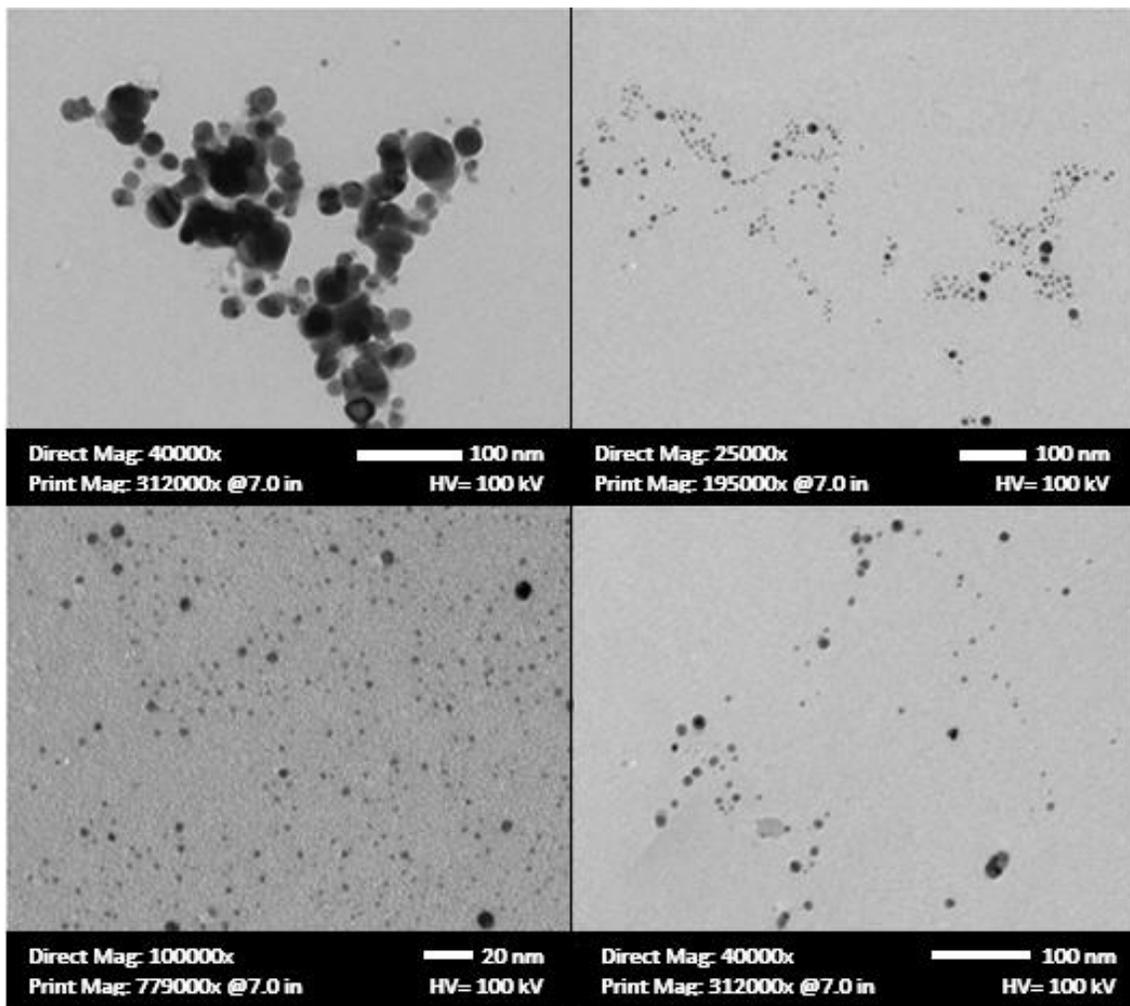


Figura 5.3. Imágenes por MET de las AgNPs.

En este caso la síntesis se llevó a cabo de manera extracelular, la reducción de los iones Ag^+ a AgNPs puede deberse no solo a las condiciones reductoras del sistema, alrededor de -300 mV de ORP, en las cuales determinados metales pueden pasar de su forma iónica a su forma

metálica; sino también a la presencia de enzimas como la nitrato reductasa liberada por los microorganismos, la cual ha sido reportada como la responsable por la reducción de Ag^+ a AgNPs en algunos estudios (Das et al., 2014; Kalimuthu et al., 2008). La caracterización de la biopelícula (Capítulo 5 Sección 5.3.4.3) confirmó la presencia de bacterias desnitrificantes como *Dechloromonas*, *Alicyclophilus*, *Rhizobium*, *Pseudomonas* y *Thiobacillum*, que podrían ser responsables por la liberación de la enzima nitrato reductasa durante la digestión anaerobia. Estos resultados demuestran que agentes biológicos como las bacterias anaerobias son eficientes para la síntesis de nanopartículas metálicas.

5.3.2 Actividad antibacteriana de las nanopartículas de plata biogénicas

La plata es un agente antibacteriano ampliamente utilizado para combatir infecciones y controlar la contaminación microbiana, si bien los efectos antibacterianos de los iones o sales de plata son bien conocidos, los efectos de las AgNPs siguen explorándose; sin embargo se ha reportado que las AgNPs tienen mayor actividad antibacteriana que los iones Ag^+ (Sondi y Salopek-Sondi, 2004). En el presente estudio se evaluó el efecto de las AgNPs biogénicas en células planctónicas de bacterias gram-negativas y gram-positivas mediante la determinación de la CMI y CMB. La CMI es la mínima cantidad de antimicrobiano que puede inhibir el crecimiento microbiano (Abreu et al., 2014), se encontró que la CMI de las AgNPs sobre *E. coli* fue de 9.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y sobre *S. aureus* de 11.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Mientras tanto la mínima concentración bactericida es aquella cantidad mínima de antimicrobiano capaz de matar al 99.9% de los microorganismos inoculados tras 18 y 24 horas de cultivo, la CMB en este caso fue de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *E. coli* y > 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *S. aureus*. En los controles sin AgNPs no se observó inhibición del crecimiento bacteriano. Las AgNPs fueron más efectivas contra las bacterias gram-negativas (*E. coli*), esto puede deberse a la diferencia en la composición química de la superficie de ambas bacterias, a pesar de que diversos autores señalan que las bacterias gram-negativas suelen ser más resistentes a la presencia de metales pesados (Hughes y Poole, 1989). Otros autores han encontrado resultados similares, Sintubin et al. (2013) utilizaron *L. fermentum* para sintetizar AgNPs y obtuvieron una CMI de 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *E. coli* y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *S. aureus*, así como una CMB de 25 y 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente. Kim et al. (2007) reportaron que sus AgNPs inhibieron efectivamente el crecimiento bacteriano en *E. coli*, sin embargo el efecto inhibitorio ante *S. aureus* fue

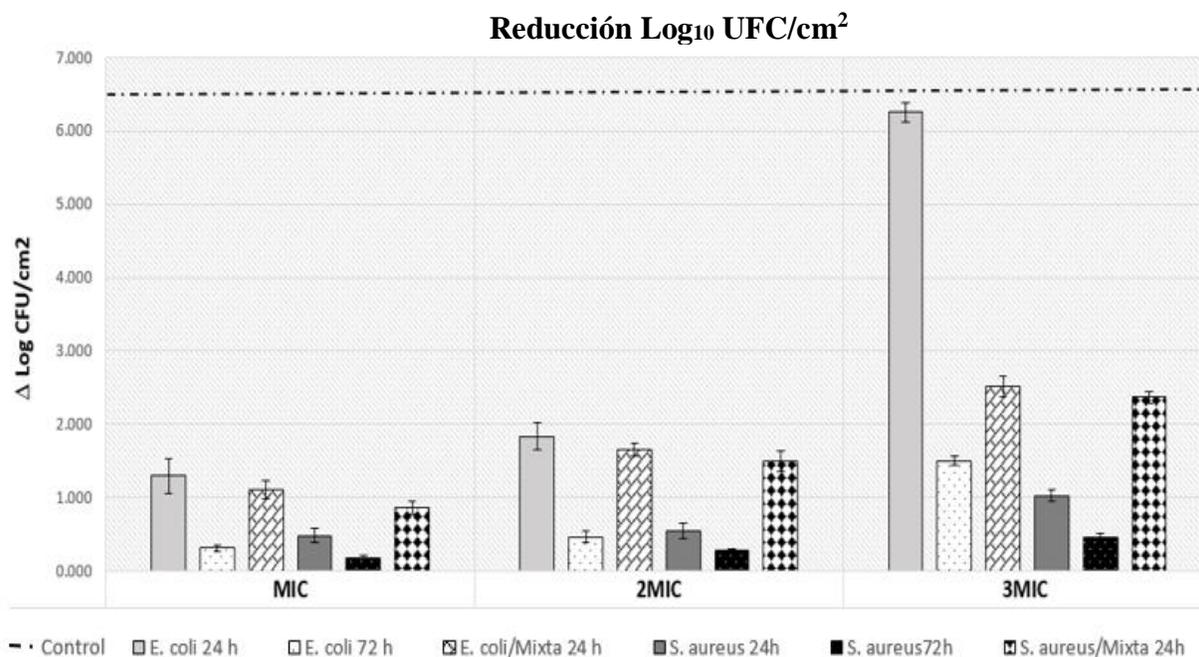
moderado, por lo que los efectos de las AgNPs pueden estar asociados a características de ciertas especies bacterianas y a diferencias en su estructura. Las bacterias gram-negativas están compuestas por lípidos y polisacáridos ligados de manera covalente por lo que carecen de fuerza y rigidez, su capa de peptidoglicano es delgada, y la interacción entre las AgNPs y la pared celular puede verse favorecida por la abundancia de cargas negativas provenientes de los lipopolisacáridos de la membrana externa que interactúan con la carga positiva de las AgNPs; las bacterias gram-positivas tiene una capa gruesa de peptidoglicano que consiste en cadenas de polisacáridos lineales entrecruzados con péptidos cortos lo cual le profiere rigidez y dota la pared celular con menor cantidad de sitios para que anclen las nanopartículas, dificultando su penetración (Shrivastava , 2007).

A pesar de que se han propuesto diversos mecanismos, la actividad antibacteriana de las AgNPs aún no se comprende por completo. Se considera que parte de su actividad se debe a la liberación de iones Ag^+ que reaccionan con los grupos tioles de las enzimas, inactivándolas, y a que el ADN puede perder su capacidad de réplica por la afinidad de la Ag^+ con sus grupos fosforilados y azufrados (Morones et al., 2005). La generación de radicales libres y estrés oxidativo parecen ser dos de sus principales mecanismos de toxicidad, la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) puede causar una serie de eventos fisiológicos y celulares que incluyen estrés, perturbación y destrucción de la mitocondria, apoptosis, inflamación y muerte celular (Gurunathan et al., 2013; Reidy et al., 2013).

Las biopelículas son comunidades microbianas complejas que se forman por adhesión a una superficie sólida debido a la secreción de sustancias exopoliméricas que las protegen. Las biopelículas de cepas patógenas constituyen un problema para los antimicrobianos debido a que protegen a las bacterias, permitiendo el desarrollo de infecciones crónicas (Hajipour et al., 2004). Las bacterias que comúnmente están asociadas a enfermedades humanas y que forman biopelículas son *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus viridans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y *Pseudomonas aeruginosa* (Donlan, 2001). En este estudio se evaluó la actividad antibacteriana de las AgNPs sobre biopelículas de *E. coli* y *S. aureus* de 24 horas, en la Figura 5.4 se muestra la reducción \log_{10} de UFC, unidad utilizada para estimar el número viable de bacterias en una muestra, tras su exposición a la CMI, 2 veces la CMI y 3 veces la CMI de

las AgNPs. La reducción logarítmica se basa en la diferencia entre el número de UFC en el control (solución salina) y en los tratamientos con AgNPs en cada experimento. De acuerdo con Geldreich (1996) un antimicrobiano es efectivo cuando logra reducir 6 \log_{10} de una concentración inicial bacteriana, por su parte la Agencia de Alimentos y Medicamentos (FDA, 2001), establece que las alternativas para el procesamiento de productos alimenticios con el objetivo de garantizar su inocuidad deben lograr al menos una reducción de 5 \log_{10} UFC/g de las bacterias patógenas más significativas en el alimento en cuestión.

En presencia de las AgNPs a la CMI, la reducción \log_{10} fue de 1.3 para *E. coli* y de 0.5 para *S. aureus*, la máxima inhibición se alcanzó a 3CMI con una reducción \log_{10} de 6.3 y 1.0 para *E. coli* y *S. aureus* respectivamente. Si bien se observó una inhibición importante en el crecimiento de *E. coli*, las AgNPs apenas tuvieron efecto en el crecimiento de *S. aureus*. Esto muestra que la capacidad para remover e inactivar biopelículas depende de la concentración de las AgNPs, pues el incremento en la concentración de las AgNPs inhibió progresivamente el crecimiento bacteriano. Al igual que en las pruebas con células planctónicas, las AgNPs tuvieron mayor efecto antibacteriano sobre las biopelículas gram-negativas que sobre las gram-positivas. Otros autores han encontrado resultados similares, Shrivastava et al. (2007) encontraron 90% de inhibición del crecimiento bacteriano para biopelículas de *E. coli* con 10 $\mu\text{g/mL}$ de AgNPs, sin embargo apenas se elucidó una ligera inhibición en el crecimiento microbiano de *S. aureus* a concentraciones de 100 $\mu\text{g/mL}$ de AgNPs. Algunos autores (Abbaszadegan et al. 2015; Singh et al. 2008) también demostraron que las AgNPs fueron más activas contra las bacterias gram-negativas sin importar su nivel de resistencia. De acuerdo con Shrivastava et al. (2007) el efecto pronunciado de las AgNPs sobre las bacterias gram-negativas puede estar relacionado al contenido de fosfotirosina de las proteínas que intervienen en la transducción de la señal bacteriana, la cual está relacionada con el crecimiento bacteriano; en su investigación después del tratamiento con AgNPs no observaron ningún cambio en el perfil de tirosina de las proteínas fosforiladas en *S. aureus*, mientras que en *E. coli* fue notable la desfosforilación de dos péptidos. Adicionalmente *E. coli* y *S. aureus* poseen diferencias en su composición y estructura. Stewart y Franklin (2008) mencionan que algunas características de las biopelículas como su concentración de oxígeno, el sustrato, pH y composición pueden influir en la agregación de las AgNPs y consecuentemente en su difusión y efecto sobre las células de la biopelícula.



Reducción Log ₁₀ UFC/cm ²			
<i>E. coli</i>	AgNPs (CMI)	AgNPs (2 CMI)	AgNPs (3 CMI)
Biopelícula de 24 h	1.3 ± 0.2	1.8 ± 0.2	6.3 ± 0.1
Biopelícula de 72 h	0.3 ± 0.04	0.5 ± 0.07	1.5 ± 0.06
Biopelícula Mixta de 24 h	1.1 ± 0.1	1.7 ± 0.08	2.6 ± 0.1
<i>S. aureus</i>			
Biopelícula de 24 h	0.5 ± 0.09	0.6 ± 0.1	1.0 ± 0.08
Biopelícula de 72 h	0.2 ± 0.03	0.3 ± 0.02	0.5 ± 0.05
Biopelícula Mixta de 24 h	0.9 ± 0.09	1.5 ± 0.1	2.4 ± 0.08

Figura 5.4. Reducción log₁₀ de UFC/cm², obtenida como la diferencia entre el control y las biopelículas tratadas con AgNPs. Resultados obtenidos para biopelículas de *E. coli* y *S. aureus* de 24 y 72 horas, así como para *E. coli* y *S. aureus* en biopelículas mixtas de 24 horas, a CMI, 2 CMI y 3CMI de las AgNPs.

En la presente investigación se evaluaron también biopelículas de 72 horas de *E. coli* y *S. aureus* para determinar si las biopelículas jóvenes (24 horas) son más susceptibles a las AgNPs que las biopelículas maduras (72 horas). Los resultados se muestran en la Figura 5.4,

la máxima actividad antibacteriana se encontró a una concentración de 3CMI de AgNPs, con una reducción log₁₀ de 1.5 para *E. coli* y de 0.5 para *S. aureus*, lo cual es un cambio significativo con respecto a los resultados obtenidos a la misma concentración en biopelículas de 24 horas. Diversos autores sugieren que las biopelículas formadas sobre un extenso periodo de tiempo tienen mayor resistencia a las sustancias antimicrobianas (Shen et al., 2011; Xu et al., 2011), debido a que el incremento en las sustancias poliméricas y el grosor de la biopelícula con el tiempo aumentan su resistencia a agentes desinfectantes.

Wolcott et al. (2010) probaron la susceptibilidad de biopelículas de *P. aeruginosa* y *S. aureus* ante el tratamiento con gentamicida, las biopelículas más jóvenes (6-12 horas) fueron las más susceptibles al tratamiento con antibiótico mientras las biopelículas maduras (24-48 horas) se volvieron cada vez más tolerantes a la gentamicida. Las biopelículas de 24 horas suelen tener una estructura menos organizada, un metabolismo más activo y una respuesta al estrés menos pronunciada en comparación con biopelículas más maduras.

Posteriormente se evaluaron biopelículas mixtas de *E. coli* y *S. aureus* en proporción 1:1 para observar si la interacción entre ambas cepas bacterianas tiene algún efecto en la actividad antibacteriana de las AgNPs, esto debido a que pueden ocurrir diferencias importantes en la composición química y la estructura de la matriz en biopelículas mixtas (Silva et al., 2012). Además en el ambiente, diversos microorganismos coexisten en comunidades, comúnmente asociados en biopelículas, compitiendo por los recursos. Para estas biopelículas mixtas de 24 horas se obtuvo una reducción log₁₀ de 2.6 para *E. coli* y 2.4 para *S. aureus*. Se observó un aumento en la reducción log₁₀ para *S. aureus* pero una disminución en la misma para *E. coli*, en comparación con las biopelículas de una sola especie. En estudios sobre las interacciones presentes en biopelículas de múltiples especies se han observado relaciones antagonistas, mutualistas, competitivas y comensales; por lo cual la diversidad de biopelícula puede afectar la eficacia de la desinfección (Simões et al., 2007). En este caso se visualizó una interacción competitiva entre ambas especies, donde *E. coli* se vio beneficiada al desarrollar mayor resistencia al antibacteriano.

Finalmente se estudió la interacción entre las AgNPs y el H₂O₂ al evaluar su actividad antibacteriana en *S. aureus*. Al determinar la CMI para *S. aureus* de forma individual se obtuvo que se requieren 11.7 µg/mL de AgNPs para inhibir su crecimiento y 400 mM de H₂O₂. Cuando estas sustancias se combinaron su CMI disminuyó a 2.34 mg/mL para las

AgNPs y 80 mM para el H_2O_2 . Por lo que el uso de pequeñas cantidades de H_2O_2 combinadas con las AgNPs producen una actividad antibacteriana significativamente mayor que cada sustancia por separado. Esto podría ser atribuido a la liberación de iones Ag^+ de las AgNPs causada por la acción oxidante del H_2O_2 , se ha reportado que el H_2O_2 es altamente reactivo con plata, lo cual resulta en la producción de radicales oxidrilo y provoca la disolución de Ag^+ como subproducto de la reacción (Navarro et al., 2008). Adicionalmente la plata cataliza la descomposición del H_2O_2 mediante una reacción de primer orden con respecto al H_2O_2 (Goszner et al., 1972):



De este modo su descomposición ocurre más rápido y se libera mayor cantidad de energía, las fuerzas de interacción entre el activador de plata y las moléculas de H_2O_2 forman radicales y aniones con una alta energía cinética que les permiten penetrar con mayor facilidad en la pared celular para que la oxidación interna de las células microbianas ocurra de manera eficiente.

Para comprobar la oxidación de la Ag^0 ante la presencia de H_2O_2 se realizaron pruebas adicionales por medio de UV-visible, las cuales se muestran en la Figura 5.5.

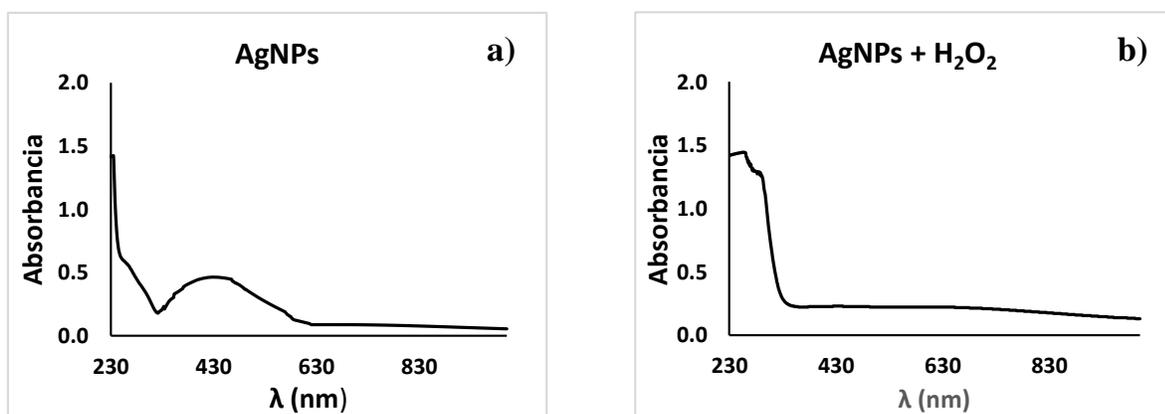


Figura 5.5 a) espectro UV-visible de las AgNPs en agua desionizada. b) espectro UV-visible de las AgNPs con H_2O_2 .

En la primera gráfica se muestra el espectro de las AgNPs en agua desionizada con su pico de absorción característico cercano a los 420 nm. La segunda gráfica muestra lo que ocurrió al añadirles H₂O₂, ante el contacto con el H₂O₂ el pico correspondiente a las AgNPs desapareció, esto podría indicar la oxidación de la Ag⁰ a Ag⁺. Se observa también un cambio en el pico cercano a los 230 nm que en algunos casos se atribuye a la Ag⁺, esto podría indicar un aumento en la concentración de la misma en la segunda gráfica.

Esto nos demuestra que las AgNPs pueden mejorar las propiedades de antisépticos y antibióticos convencionales. Existen reportes que muestran la actividad sinérgica entre las AgNPs y antibióticos como ampicilina, kanamicina, estreptomina o vancomicina contra *E. coli* y *P. aeruginosa* (Wolska et al., 2012).

5.4 Conclusiones

Este es el primer trabajo realizado para la síntesis extracelular de AgNPs a partir de una biopelícula anaerobia formada en un reactor LFI. *Dechloromonas*, *Alicyclophillus*, *Rhizobiales* y *Methanosarcina* fueron identificadas como especies dominantes en la biopelícula, responsables por la bio-reducción efectiva de iones Ag⁺ en AgNPs. La reducción de los iones Ag⁺ puede deberse a las condiciones reductoras de ORP del efluente del reactor utilizado para la síntesis, pues a dichas condiciones y pH cercano al neutro la Ag⁺ puede ser reducida a su estado metálico; la reducción puede ser también resultado de un proceso enzimático, ya que algunos compuestos biológicos como la enzima reductasa han sido detectados como responsables de la síntesis de AgNPs biogénicas en estudios previos (Ahmad, y otros, 2003). Las AgNPs fueron caracterizadas por Espectroscopia UV-Visible y MET. Los resultados muestran que las AgNPs tienen una actividad antibacteriana moderada en células planctónicas y biopelículas de *S. aureus*, y mejor actividad antibacteriana ante *E. coli*; podrían optimizarse diversos parámetros durante la síntesis como el pH, temperatura, velocidad de agitación, etc. con la finalidad de obtener AgNPs más efectivas, pues ciertas características de las nanopartículas como su tamaño, forma y estado de agregación influyen en su actividad antibacteriana. Las AgNPs fueron más efectivas en las bacterias Gram-negativas que en la Gram-positivas, posiblemente debido a las diferencias estructurales entre ambas bacterias, se requiere realizar estudios comparativos y profundizar en los posibles mecanismos de acción de las AgNPs para confirmar esta suposición. La madurez de las

biopelículas influye en su resistencia al antibacteriano pues las biopelículas formadas durante más tiempo presentaron mayor resistencia a las AgNPs. Las AgNPs pueden combinarse con otros compuestos como antisépticos o antibióticos para mejorar su actividad antibacteriana, esto es importante debido a que la resistencia de diversas especies bacterianas patógenas ha incrementado a una velocidad alarmante, de igual manera las interacciones microbianas en biopelículas con múltiples especies comúnmente encontradas en ambientes naturales continúan como un reto para la biología. Además aún se requieren analizar el efecto que pueden tener las AgNPs en la salud humana. La discrepancia entre estos resultados y estudios previos puede ser atribuida a diferencias en las cepas bacterianas, a las diferentes propiedades químicas y físicas de las AgNPs empleadas y a las metodologías antimicrobianas empleadas. Sin embargo este método ofrece una alternativa de bajo costo para la síntesis de AgNPs mediante microorganismos de fácil acceso que se pueden encontrar en plantas de tratamiento de aguas residuales.

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados de las pruebas en lote con lodo granular y biopelícula expuestos a diferentes concentraciones de Ag^+ demostraron la capacidad de las bacterias anaerobias de reducir la Ag^+ a Ag^0 por medio de la reducción del ORP del medio a valores negativos, así como por la posible presencia de enzimas reductoras. La exposición a Ag^+ y NO_3^- retardó la actividad metabólica de los microorganismos, los cuales requirieron mayor tiempo para degradar el sustrato y adaptarse a las condiciones del sistema, sin embargo en todas las pruebas se lograron eficiencias de remoción de Ag^+ superiores al 85% y una degradación de la DQO mayor al 50%, esto debido a la actividad de las BM y a la intervención de otro tipos de bacterias anaerobias. La actividad de la biopelícula puede ser inhibida a una concentración de Ag^+ y NO_3^- menor que la del lodo granular, esto debido a que en el lodo se tiene mayor diversidad bacteriana. Sin embargo la biopelícula resulta más adecuada cuando se desea recuperar la Ag^0 separada de la biomasa, adicionalmente su resistencia puede incrementar si tiene mayor madurez o si se va adaptando gradualmente a la presencia de Ag^+ y NO_3^- . La r_{max} de producción de CH_4 fue similar para ambos sistemas, sin embargo en el lodo granular los valores de la máxima producción de CH_4 fueron menores a los de la biopelícula, indicio de la selectividad de los microorganismos adheridos al soporte. El análisis elemental por MEB realizado al residuo recuperado demostró la presencia de Ag^0 , esto confirmó la efectividad de utilizar el proceso de digestión anaerobia para la remoción de Ag^+ de un agua residual sintética como Ag^0 .

El estudio realizado en el reactor LFI demostró que la biopelícula fue capaz de adaptarse a la adición gradual de Ag^+ y NO_3^- a concentraciones que fueron de 20 mg/L Ag^+ -11.5 mg/L NO_3^- hasta 300 mg/L Ag^+ -172 mg/L NO_3^- . Los microorganismos en el reactor adquirieron tolerancia a la presencia de Ag^+ y NO_3^- e incluso incrementaron su actividad, esto debido a que algunos metales pueden ser estimulatorios para las bacterias hasta ciertas concentraciones y/o por la cantidad de NO_3^- añadidos al sistema, que estimulan la actividad de algunas bacterias anaerobias. Esto se observó en el aumento en la eficiencia de remoción de DQO y en la eficiencia de remoción de Ag^+ a valores por encima del 90% conforme

aumentó la concentración de Ag^+ y NO_3^- añadido al sistema. La biopelícula mantuvo la alcalinidad del sistema con pH cercano a 7.5 y condiciones reductoras de ORP con valores inferiores a -250 mV. La caracterización por MEB y MET confirmaron la presencia de Ag^0 . La caracterización de la biopelícula por técnicas moleculares basadas en el 16S rRNA demostró la presencia no solo de BM, sino también de desnitrificantes y otras bacterias gram-negativas, las cuales podrían estar contribuyendo a la eficiencia del sistema. La presencia de AgNPs detectadas en el efluente del reactor impulsó a sintetizar AgNPs biogénicas utilizando el efluente fresco del reactor, el cual tenía condiciones reductoras de ORP y sustancias producidas por las bacterias que contribuyeron a la remoción del metal y a la formación de las nanopartículas. Las AgNPs presentaron mayor actividad antibacteriana sobre *E. coli* que sobre *S. aureus*, posiblemente debido a diferencias en su estructura, sin embargo su actividad antibacteriana disminuyó ante biopelículas maduras de estas cepas, esto debido a con el tiempo incrementa la cantidad de sustancias exopoliméricas que las protegen. Una alternativa podría ser combinar las AgNPs con sustancias adicionales como antibióticos o sustancias antisépticas que contribuyan a aumentar su efectividad.

Se puede concluir que los sistemas biológicos basados en la digestión anaerobia constituyen una alternativa prometedora en el tratamiento de aguas residuales que contienen Ag^+ , además pueden ser utilizados para la síntesis extracelular de nanopartículas metálicas, las cuales tienen múltiples aplicaciones tecnológicas. Esto representa ventajas ambientales y económicas por el valor que tienen los productos obtenidos. Sin embargo es necesario realizar más estudios para confirmar estos acercamientos.

Se recomienda realizar la caracterización microbiana de la biopelícula tras la adición de AgNO_3 para evaluar cómo varían las comunidades microbianas e identificar aquellos microorganismos que presentan resistencia a Ag^+ y NO_3^- . Esto permitiría fomentar el desarrollo específico de microorganismos para recuperación de Ag^0 . Así mismo se propone realizar experimentos únicamente con Ag^+ y otros con NO_3^- para así determinar cuál de estos iones es responsable por el efecto adverso en la metanogénesis, o si ambos contribuyen. Es necesario conocer los límites del reactor, sobre todo en lo que se refiere a cargas orgánicas volumétricas y en la carga del metal, en especial si se quiere aplicar a aguas residuales provenientes de distintas industrias. De igual manera se podrían variar diversas condiciones hidrodinámicas del sistema para asegurar la síntesis de AgNPs dentro del reactor.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbaszadegan, A., Ghahramani, Y., Gholami, A., Hemmateenejad, B., Dorostkar, S., Nabavizadeh, M., & Sharghi, H. (2015). The effect of charge at the surface of silver nanoparticles on antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria: a preliminary study. *Journal of Nanomaterials*, 2015.
- Abreu, A. C., Borges, A., Mergulhão, F., & Simões, M. (2014). Use of phenyl isothiocyanate for biofilm prevention and control. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 86, 34-41.
- Ahmad, A., Mukherjee, P., Senapati, S., Mandal, D., Khan, M. I., Kumar, R., & Sastry, M. (2003). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus *Fusarium oxysporum*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 28(4), 313-318.
- Ahmadian, A., Ehn, M., & Hober, S. (2006). Pyrosequencing: history, biochemistry and future. *Clinica chimica acta*, 363(1), 83-94.
- Akunna, J. C., Bernet, N., & Moletta, R. (1998). Effect of nitrate on methanogenesis at low redox potential. *Environmental technology*, 19(12), 1249-1254.
- Anderson, R. T., & Lovley, D. R. (2002). Microbial redox interactions with uranium: an environmental perspective. *Interactions of microorganisms with radionuclides*, 2, 205-223.
- Ansari, M. I., Schiwon, K., Malik, A., & Grohmann, E. (2012). Biofilm Formation by Environmental Bacteria. *Environmental Protection Strategies for Sustainable Development*, 341-377.
- APHA, American Public Health Association (1998). *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 2a edición. New York.
- Applegate, D. H., & Bryers, J. D. (1991). Effects of carbon and oxygen limitations and calcium concentrations on biofilm removal processes. *Biotechnology and bioengineering*, 37(1), 17-25.
- Aquino, S. F., & Stuckey, D. C. (2007). Bioavailability and toxicity of metal nutrients during anaerobic digestion. *Journal of environmental engineering*, 133(1), 28-35.
- Araujo, J. C., Campos, J. R., & Vazoller, R. F. Methanogenic biofilm: structure and microbial population activity in an anaerobic fluidized bed reactor treating synthetic wastewater. *Biofilm Journal*, 3(1).
- Auffan, M., Rose, J., Bottero, J. Y., Lowry, G. V., Jolivet, J. P., & Wiesner, M. R. (2009). Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nature nanotechnology*, 4(10), 634-641.

- Bååth, E. (1989). Effects of heavy metals in soil on microbial processes and populations (a review). *Water, Air, and Soil Pollution*, 47(3-4), 335-379.
- Babu, S., Prasanna, R., Bidiarani, N., Nain, L., & Shivay, Y. S. (2015). Synergistic action of PGP agents and Rhizobium spp. for improved plant growth, nutrient mobilization and yields in different leguminous crops. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4(4), 456-464.
- Bae, J. W., Rhee, S. K., Hyun, S. H., Kim, I. S., & Lee, S. T. (2000). Layered structure of granules in upflow anaerobic sludge blanket reactor gives microbial populations resistance to metal ions. *Biotechnology letters*, 22(24), 1935-1940.
- Banihani, Q., Sierra-Alvarez, R., & Field, J. A. (2009). Nitrate and nitrite inhibition of methanogenesis during denitrification in granular biofilms and digested domestic sludges. *Biodegradation*, 20(6), 801-812.
- Barker, H. A. (1941). Studies on the methane fermentation V. Biochemical activities of Methanobacterium omelianskii. *Journal of Biological Chemistry*, 137(1), 153-167.
- Bhattacharya, S. K., Madura, R. L., Uberoi, V., & Haghghi-Podeh, M. R. (1995). Toxic effects of cadmium on methanogenic systems. *Water Research*, 29(10), 2339-2345.
- Borges, A., Abreu, A. C., Ferreira, C., Saavedra, M. J., Simões, L. C., & Simões, M. (2014). Antibacterial activity and mode of action of selected glucosinolate hydrolysis products against bacterial pathogens. *Journal of Food Science and Technology*, 1-12.
- Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M. J., & Simões, M. (2013). Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 19(4), 256-265.
- Borja Maldonado, F. J. (2014). Evaluación de la capacidad de una biopelícula sulfidogénica para precipitar y recuperar plata de agua residual sintética en un reactor anaerobio. (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México.
- Brayner, R., Barberousse, H., Hemadi, M., Djedjat, C., Yéprémian, C., Coradin, T., Livage, J., Fiévet, F. & Couté, A. (2007). Cyanobacteria as bioreactors for the synthesis of Au, Ag, Pd, and Pt nanoparticles via an enzyme-mediated route. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 7(8), 2696-2708.
- Brioukhanov, A. L., Netrusov, A. I., & Eggen, R. I. (2006). The catalase and superoxide dismutase genes are transcriptionally up-regulated upon oxidative stress in the strictly anaerobic archaeon Methanosarcina barkeri. *Microbiology*, 152(6), 1671-1677.
- Bruins, M. R., Kapil, S., & Oehme, F. W. (2000). Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicology and environmental safety*, 45(3), 198-207.
- Burlage, R. S., Atlas, R., Stahl, D., Geesey, Gill, Sayler, G. (Eds.) (1998). *Techniques in microbial ecology*. Oxford University Press on Demand.
- Butterman, W. C., & Hilliard, H. E. (2005). Mineral Commodity Profiles. *US Department of the Interior*.

- Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., & Madden, T. L. (2009). BLAST+: architecture and applications. *BMC bioinformatics*, *10*(1), 421.
- Campos, E., Elias, X., & Flotats, X. (2012). *Procesos biológicos: la digestión anaerobia y el compostaje*. Ediciones Díaz de Santos.
- Canto, C. S. A., Ratusznei, S. M., Rodrigues, J. A. D., Zaiat, M., & Foresti, E. (2008). Effect of ammonia load on efficiency of nitrogen removal in an SBBR with liquid-phase circulation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, *25*(2), 275-289.
- Castilla, P., Meraz, M., Monroy, O., & Noyola, A. (2000). Anaerobic treatment of low concentration wastewater in an inverse fluidized bed reactor. *Water science and technology*, *41*(4-5), 245-251.
- Castro Jiménez, C. C. (2004). Efecto de los metales pesados cadmio y níquel sobre la producción de metano de un lodo anaerobio a escala de laboratorio. (Tesis de Licenciatura). Universidad de Antioquía, Colombia.
- Castro del Campo, N., Chaidez Quiroz, C., Rubio Carrasco, W., & Benigno Valdez Torres, J. (2004). Sobrevivencia de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* en frutos mínimamente procesados. *Revista Cubana de Salud Pública*, *30*(1).
- Celis, L. B., Villa-Gómez, D., Alpuche-Solís, A. G., Ortega-Morales, B. O., & Razo-Flores, E. (2009). Characterization of sulfate-reducing bacteria dominated surface communities during start-up of a down-flow fluidized bed reactor. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, *36*(1), 111-121.
- Chang, R., Ibarra, P., & de la Rosa Gómez, I. (2011). *Fundamentos de química*. McGraw-Hill.
- Chen, Y., Chen, H., Zheng, X., & Mu, H. (2012). The impacts of silver nanoparticles and silver ions on wastewater biological phosphorous removal and the mechanisms. *Journal of hazardous materials*, *239*, 88-94.
- Cheng, K. C., Demirci, A., & Catchmark, J. M. (2010). Advances in biofilm reactors for production of value-added products. *Applied microbiology and biotechnology*, *87*(2), 445-456.
- Chmielewski, R. A. N., & Frank, J. F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, *2*(1), 22-32.
- Chu, H., & Hua, F. L. (1996). Effects of a heavy metal (zinc) on organic adsorption capacity and organic removal in activated sludge. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *57*(1), 845-849.
- Chuichulcherm, S., Nagpal, S., Peeva, L., & Livingston, A. (2001). Treatment of metal-containing wastewaters with a novel extractive membrane reactor using sulfate-reducing bacteria. *Journal of chemical technology and biotechnology*, *76*(1), 61-68.

- Clarens, M., Bernet, N., Delgenès, J. P., & Moletta, R. (1998). Effects of nitrogen oxides and denitrification by *Pseudomonas stutzeri* on acetotrophic methanogenesis by *Methanosarcina mazei*. *FEMS Microbiology Ecology*, 25(3), 271-276.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322.
- Couillard, D., Chartier, M., & Mercier, G. (1994). Major factors influencing bacterial leaching of heavy metals (Cu and Zn) from anaerobic sludge. *Environmental Pollution*, 85(2), 175-184.
- Cresson, R., Carrere, H., Delgenes, J. P., & Bernet, N. (2006). Biofilm formation during the start-up period of an anaerobic biofilm reactor—Impact of nutrient complementation. *Biochemical Engineering Journal*, 30(1), 55-62.
- Đapa, T., Leuzzi, R., Ng, Y. K., Baban, S. T., Adamo, R., Kuehne, S. A., Scarselli, M., Minton, N.P., Serruto, D. & Unnikrishnan, M. (2013). Multiple factors modulate biofilm formation by the anaerobic pathogen *Clostridium difficile*. *Journal of bacteriology*, 195(3), 545-555.
- Das, V. L., Thomas, R., Varghese, R. T., Soniya, E. V., Mathew, J., & Radhakrishnan, E. K. (2014). Extracellular synthesis of silver nanoparticles by the *Bacillus* strain CS 11 isolated from industrialized area. *3 Biotech*, 4(2), 121-126.
- Del Real Olvera, J. (2007). Evaluación y modelado de la cinética de depuración anaerobia de vinazas de la industria alcoholera. (Tesis de Doctorado). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- Doublein, D., & Steinhauser, A. (2011). *Biogas from waste and renewable resources: an introduction*. John Wiley & Sons.
- Díaz, E. (2004). Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *International Microbiology*, 7(3), 173-180.
- Donlan, R. M. (2001). Biofilms and device-associated infections. *Emerging infectious diseases*, 7(2), 277.
- Duldhardt, I., Gaebel, J., Chrzanowski, L., Nijenhuis, I., Härtig, C., Schauer, F., & Heipieper, H. J. (2010). Adaptation of anaerobically grown *Thauera aromatica*, *Geobacter sulfurreducens* and *Desulfococcus multivorans* to organic solvents on the level of membrane fatty acid composition. *Microbial biotechnology*, 3(2), 201-209.
- Duxbury, T., & Bicknell, B. (1983). Metal-tolerant bacterial populations from natural and metal-polluted soils. *Soil Biology and Biochemistry*, 15(3), 243-250.
- Eftink, M. R., & Ghiron, C. A. (1981). Fluorescence quenching studies with proteins. *Analytical biochemistry*, 114(2), 199-227.
- EPA, Environmental Protection Agency (2012). *R.E.D. Facts Silver*. Obtenido de Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (H-7508W). Una versión de este trabajo fue vista por última vez enero, 2016 en la URL:

http://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/reregistration/red_G-75_1-Jul-93.pdf

- EPA, Environmental Protection Agency (2009). *Targeted national sewage sludge survey sampling and analysis technical report*. Obtenido de Office of Water (4301T). Una versión de este trabajo fue vista por última vez enero, 2016 en la URL: http://www.epa.gov/sites/production/files/2015-04/documents/targeted_national_sewage_sludge_survey_sampling_and_analysis_technical_report_0.pdf
- Escot, V.M. (2014). Dinámica de la diversidad microbiana con actividad sulfato reductora durante la bioestabilización de As en sistemas batch. (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México.
- Espinoza, G. Y. (2013). Reducción y precipitación de Cr (VI) de aguas residuales a partir de un sistema sulfato reductor. (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México.
- El Badawy, A. M., Silva, R. G., Morris, B., Scheckel, K. G., Suidan, M. T., & Tolaymat, T. M. (2010). Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles. *Environmental science & technology*, 45(1), 283-287.
- Fernández, N., Díaz, E. E., Amils, R., & Sanz, J. L. (2008). Analysis of microbial community during biofilm development in an anaerobic wastewater treatment reactor. *Microbial ecology*, 56(1), 121-132.
- Fernández Güelfo, L. A. (2008). Caracterización cinética de la degradación anaerobia termofílica seca de la FORSU. Efecto de diferentes pre-tratamientos sobre la biodegradabilidad del residuo. (Tesis de Doctorado). Universidad de Cádiz, España.
- Ferry, J. G., Smith, P. H., & Wolfe, R. S. (1974). Methanospirillum, a New Genus of Methanogenic Bacteria, and Characterization of Methanospirillum hungatii sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 24(4), 465-469.
- Fetzer, S., & Conrad, R. (1993). Effect of redox potential on methanogenesis by Methanosarcina barkeri. *Archives of Microbiology*, 160(2), 108-113.
- FDA., Food and Drug Administration (2001). Final rule, HACCP procedures for the sage and sanity processing of juice. *Federal register*, 66(13).
- Förstner, U., & Wittmann, G. T. (2012). *Metal pollution in the aquatic environment*. Springer Science & Business Media.
- Frostegård, Å., Tunlid, A., & Bååth, E. (1996). Changes in microbial community structure during long-term incubation in two soils experimentally contaminated with metals. *Soil Biology and Biochemistry*, 28(1), 55-63.
- Fu, F., & Wang, Q. (2011). Removal of heavy metal ions from wastewaters: a review. *Journal of Environmental Management*, 92(3), 407-418.

- Fude, L., Harris, B., Urrutia, M. M., & Beveridge, T. J. (1994). Reduction of Cr (VI) by a consortium of sulfate-reducing bacteria (SRB III). *Applied and Environmental Microbiology*, 60(5), 1525-1531.
- Fuentes, F., & Massol-Deyá, A. (2002). Manual de laboratorios: Ecología de microorganismos. *Universidad de Puerto Rico*.
- Gadd, G. M., & Griffiths, A. J. (1977). Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microbial Ecology*, 4(4), 303-317.
- Gallegos-Garcia, M., Celis, L. B., Rangel-Méndez, R., & Razo-Flores, E. (2009). Precipitation and recovery of metal sulfides from metal containing acidic wastewater in a sulfidogenic down-flow fluidized bed reactor. *Biotechnology and bioengineering*, 102(1), 91-99.
- García, A., Delgado, L., Torà, J. A., Casals, E., González, E., Puentes, V., Font, X. Carrera, J. & Sánchez, A. (2012). Effect of cerium dioxide, titanium dioxide, silver, and gold nanoparticles on the activity of microbial communities intended in wastewater treatment. *Journal of hazardous materials*, 199, 64-72.
- Geldreich, E. E. (1996). *Microbial quality of water supply in distribution systems*. CRC Press.
- Gholami-Shabani, M., Akbarzadeh, A., Norouzian, D., Amini, A., Gholami-Shabani, Z., Imani, A., Chiani, M., Riazi, G., Shams-Ghahfarokhi, M., & Razzaghi-Abyaneh, M. (2014). Antimicrobial Activity and Physical Characterization of Silver Nanoparticles Green Synthesized Using Nitrate Reductase from *Fusarium oxysporum*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(8), 4084-4098.
- Gilbert, P., Maira-Litran, T., McBain, A. J., Rickard, A. H., & Whyte, F. W. (2002). The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. *Advances in microbial physiology*, 46, 203-256.
- Gopinath, K., & Arumugam, A. (2014). Extracellular mycosynthesis of gold nanoparticles using *Fusarium solani*. *Applied Nanoscience*, 4(6), 657-662.
- Goszner, K., Körner, D., & Hite, R. (1972). On the catalytic activity of silver: I. activity, poisoning, and regeneration during the decomposition of hydrogen peroxide. *Journal of Catalysis*, 25(2), 245-253.
- Green, S. C., Howgrave-Graham, A. R., & Mlondobozi, S. (1998). Heavy metal uptake during anaerobic digestion of combined electroplating and brewery wastewaters. *Biotechnology letters*, 20(11), 1081-1084.
- Guevara Vera, A. (1996). Fundamentos básicos para el diseño de biodigestores anaeróbicos rurales. (Tesis de Maestría). Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente, Perú.
- Gurunathan, S., Han, J. W., Kwon, D. N., & Kim, J. H. (2014). Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Nanoscale research letters*, 9(1), 1-17.

- Gurunathan, S., Han, J. W., Eppakayala, V., Jeyaraj, M., & Kim, J. H. (2013). Cytotoxicity of biologically synthesized silver nanoparticles in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *BioMed research international*, 2013.
- Hadidi, A., & Candresse, T. (2003). Polymerase chain reaction. *Viroids*, 115-122.
- Hartl, M. G. (2013). Homeostasis and toxicology of non-essential metals. Edited by CM Wood, AP Farrell & CJ Brauner. *Journal of Fish Biology*, 83(5), 1476-1477.
- Hajipour, M. J., Fromm, K. M., Ashkarran, A. A., de Aberasturi, D. J., de Larramendi, I. R., Rojo, T., Serpooshan, V., Parak, W.J. & Mahmoudi, M. (2012). Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends in biotechnology*, 30(10), 499-511.
- Hammack, R. W., & Edenborn, H. M. (1992). The removal of nickel from mine waters using bacterial sulfate reduction. *Applied microbiology and biotechnology*, 37(5), 674-678.
- Haroon, M. F., Hu, S., Shi, Y., Imelfort, M., Keller, J., Hugenholtz, P., Yuan, Z. & Tyson, G. W. (2013). Anaerobic oxidation of methane coupled to nitrate reduction in a novel archaeal lineage. *Nature*, 500, 567-570.
- Hoa, T. T. H., Liamleam, W., & Annachhatre, A. P. (2007). Lead removal through biological sulfate reduction process. *Bioresource technology*, 98(13), 2538-2548.
- Hogstrand, C., & Wood, C. M. (1998). Toward a better understanding of the bioavailability, physiology, and toxicity of silver in fish: implications for water quality criteria. *Environmental toxicology and chemistry*, 17(4), 547-561.
- Horn, M. A., Drake, H. L., & Schramm, A. (2006). Nitrous oxide reductase genes (nosZ) of denitrifying microbial populations in soil and the earthworm gut are phylogenetically similar. *Applied and environmental microbiology*, 72(2), 1019-1026.
- Hughes, M. N., & Poole, R. K. (1989). *Metals and Microorganisms* (Vol. 412). London: Chapman and Hall.
- Ike, M., Inoue, D., Miyano, T., Liu, T. T., Sei, K., Soda, S., & Kadoshin, S. (2010). Microbial population dynamics during startup of a full-scale anaerobic digester treating industrial food waste in Kyoto eco-energy project. *Bioresource technology*, 101(11), 3952-3957.
- Jain, D. K., & Tyagi, R. D. (1993). Factors affecting toxic metals removal from digested sewage sludge by enriched sulphur-oxidizing microorganisms. *Bioresource technology*, 45(1), 33-41.
- Jain, S. K., Gujral, G. S., Jha, N. K., & Vasudevan, P. (1992). Production of biogas from *Azolla pinnata* R. Br and *Lemna minor* L.: Effect of heavy metal contamination. *Bioresource technology*, 41(3), 273-277.
- Janyasuthiwong, S., Rene, E. R., Esposito, G., & Lens, P. N. (2015). Effect of pH on Cu, Ni and Zn removal by biogenic sulfide precipitation in an inversed fluidized bed bioreactor. *Hydrometallurgy*, 158, 94-100.

- Jeong, Y., Lim, D. W., & Choi, J. (2014). Assessment of size-dependent antimicrobial and cytotoxic properties of silver nanoparticles. *Advances in Materials Science and Engineering*, 2014.
- Jong, T., & Parry, D. L. (2003). Removal of sulfate and heavy metals by sulfate reducing bacteria in short-term bench scale upflow anaerobic packed bed reactor runs. *Water Research*, 37(14), 3379-3389.
- Kaegi, R., Voegelin, A., Ort, C., Sinnet, B., Thalmann, B., Krismer, J., Hagedorfer, H., Elumelu, M., & Mueller, E. (2013). Fate and transformation of silver nanoparticles in urban wastewater systems. *Water research*, 47(12), 3866-3877.
- Kaksonen, A. H., Franzmann, P. D., & Puhakka, J. A. (2003a). Performance and ethanol oxidation kinetics of a sulfate-reducing fluidized-bed reactor treating acidic metal-containing wastewater. *Biodegradation*, 14(3), 207-217.
- Kaksonen, A. H., Riekkola-Vanhanen, M. L., & Puhakka, J. A. (2003b). Optimization of metal sulphide precipitation in fluidized-bed treatment of acidic wastewater. *Water Research*, 37(2), 255-266.
- Kaksonen, A. H., Plumb, J. J., Franzmann, P. D., & Puhakka, J. A. (2004). Simple organic electron donors support diverse sulfate-reducing communities in fluidized-bed reactors treating acidic metal-and sulfate-containing wastewater. *FEMS Microbiology Ecology*, 47(3), 279-289.
- Kaksonen, A. H., Plumb, J. J., Robertson, W. J., Riekkola-Vanhanen, M., Franzmann, P. D., & Puhakka, J. A. (2006). The performance, kinetics and microbiology of sulfidogenic fluidized-bed treatment of acidic metal-and sulfate-containing wastewater. *Hydrometallurgy*, 83(1), 204-213.
- Kaksonen, A. H., & Puhakka, J. A. (2007). Sulfate reduction based bioprocesses for the treatment of acid mine drainage and the recovery of metals. *Engineering in Life Sciences*, 7(6), 541-564.
- Kalimuthu, K., Babu, R. S., Venkataraman, D., Bilal, M., & Gurunathan, S. (2008). Biosynthesis of silver nanocrystals by *Bacillus licheniformis*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 65(1), 150-153.
- Kalishwaralal, K., Deepak, V., Ramkumarandian, S., Nellaiah, H., & Sangiliyandi, G. (2008). Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by the culture supernatant of *Bacillus licheniformis*. *Materials Letters*, 62(29), 4411-4413.
- Kalishwaralal, K., Banumathi, E., Pandian, S. R. K., Deepak, V., Muniyandi, J., Eom, S. H., & Gurunathan, S. (2009). Silver nanoparticles inhibit VEGF induced cell proliferation and migration in bovine retinal endothelial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 73(1), 51-57.
- Kapoor, S. (1998). Preparation, characterization, and surface modification of silver particles. *Langmuir*, 14(5), 1021-1025.
- Kato, M. T., Field, J. A., & Lettinga, G. (1993). High tolerance of methanogens in granular sludge to oxygen. *Biotechnology and bioengineering*, 42(11), 1360-1366.

- Keyser, M., Britz, T. J., & Witthuhn, R. C. (2007). Fingerprinting and identification of bacteria present in UASB granules used to treat winery, brewery, distillery or peach-lye canning wastewater. *South African journal for enology and viticulture*, 28(1), 69.
- Khijniak, T., Simonoff, M., Sergeant, C., & Simonoff, G. (2003). Microbial reduction of ^{99}Tc (as TcO_4^-) in anaerobic alkaline conditions. *Czechoslovak Journal of Physics*, 53, 113-117.
- Kieu, H. T., Müller, E., & Horn, H. (2011). Heavy metal removal in anaerobic semi-continuous stirred tank reactors by a consortium of sulfate-reducing bacteria. *Water research*, 45(13), 3863-3870.
- Kim, J. S., Kuk, E., Yu, K. N., Kim, J. H., Park, S. J., Lee, H. J., Kim, S.H., Park, Y.K., Park, Y.H., Hwang, C.Y. & Kim, Y. K. (2007). Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 3(1), 95-101.
- Klaus, T., Joerger, R., Olsson, E., & Granqvist, C. G. (1999). Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(24), 13611-13614.
- Klüber, H. D., & Conrad, R. (1998). Effects of nitrate, nitrite, NO and N₂O on methanogenesis and other redox processes in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 25(3), 301-318.
- Kousi, P., Remoundaki, E., Hatzikioseyan, A., Battaglia-Brunet, F., Joulain, C., Kousteni, V., & Tsezos, M. (2011). Metal precipitation in an ethanol-fed, fixed-bed sulphate-reducing bioreactor. *Journal of hazardous materials*, 189(3), 677-684.
- Kozdrój, J., & van Elsas, J. D. (2000). Response of the bacterial community to root exudates in soil polluted with heavy metals assessed by molecular and cultural approaches. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(10), 1405-1417.
- Krongthamchat, K., Riffat, R., & Dararat, S. (2006). Effect of trace metals on halophilic and mixed cultures in anaerobic treatment. *International Journal of Environmental Science & Technology*, 3(2), 103-112.
- Kugelman, I. J., & McCarty, P. L. (1965). Cation toxicity and stimulation in anaerobic waste treatment. *Journal Water Pollution Control Federation*, 37(1), 97-116.
- Kumar, S. A., Abyaneh, M. K., Gosavi, S. W., Kulkarni, S. K., Pasricha, R., Ahmad, A., & Khan, M. I. (2007). Nitrate reductase-mediated synthesis of silver nanoparticles from AgNO_3 . *Biotechnology Letters*, 29(3), 439-445.
- Kumar, K. S., Kumar, G., Prokhorov, E., Luna-Bárceñas, G., Buitron, G., Khanna, V. G., & Sanchez, I. C. (2014). Exploitation of anaerobic enriched mixed bacteria (AEMB) for the silver and gold nanoparticles synthesis. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 462, 264-270.
- Labastida, I. (2007). Evaluación a escala laboratorio de bacterias sulfato reductoras en la estabilización de la fracción bioaccesible de plomo, en un suelo impactado por la minería. (Tesis de Maestría). Universidad Autónoma de San Luis Potosí, México.

- Leitão, R. C., Van Haandel, A. C., Zeeman, G., & Lettinga, G. (2006). The effects of operational and environmental variations on anaerobic wastewater treatment systems: a review. *Bioresource Technology*, 97(9), 1105-1118.
- Lens, P., Vallerol, M., Esposito, G., & Zandvoort, M. (2002). Perspectives of sulfate reducing bioreactors in environmental biotechnology. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 1(4), 311-325.
- Lenz, M., Van Hullebusch, E. D., Hommes, G., Corvini, P. F., & Lens, P. N. (2008). Selenate removal in methanogenic and sulfate-reducing upflow anaerobic sludge bed reactors. *Water research*, 42(8), 2184-2194.
- Li, W., & Godzik, A. (2006). Cd-hit: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics*, 22(13), 1658-1659.
- Liang, Z., Das, A., & Hu, Z. (2010). Bacterial response to a shock load of nanosilver in an activated sludge treatment system. *Water Research*, 44(18), 5432-5438.
- Lima e Silva, A. A. D., Carvalho, M. A., de Souza, S. A., Dias, P. M. T., Silva Filho, R. G.D., Saramago, C. S., Bento, C. A., & Hofer, E. (2012). Heavy metal tolerance (Cr, Ag and Hg) in bacteria isolated from sewage. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(4), 1620-1631.
- Lin, C. Y. (1992). Effect of heavy metals on volatile fatty acid degradation in anaerobic digestion. *Water Research*, 26(2), 177-183.
- Lin, Y. F., & Chen, K. C. (1995). Denitrification and methanogenesis in a co-immobilized mixed culture system. *Water Research*, 29(1), 35-43.
- Lopes, F. A., Morin, P., Oliveira, R., & Melo, L. F. (2005). The influence of nickel on the adhesion ability of *Desulfovibrio desulfuricans*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 46(2), 127-133.
- López Cabanes, J. M. (1989). Digestión anaerobia de lodos de depuradora, etapas controlantes y cinética del proceso. (Tesis de Doctorado). Universidad de Alicante, España.
- Magaly, C., Donaldo, M., Marielba, M. R., Alejandro, E., Elsa, C., & Nola, F. (2003). Evaluación de la biomasa en el lodo granular anaerobio en reactores por carga. *Multiciencias*, 3(2).
- Mah, T. F. C., & O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology*, 9(1), 34-39.
- Marsili-Libelli, S., & Beni, S. (1996). Shock load modelling in the anaerobic digestion process. *Ecological modelling*, 84(1), 215-232.
- Martínez Martínez, B. E., & Mosquera Calle, J. M. (2012). Evaluación de la digestión anaerobia como alternativa de estabilización de biosólidos producidos en la planta de tratamiento de aguas residuales de la Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia.

- Masse, D. I., Masse, L., Verville, A., & Bilodeau, S. (2001). The start-up of anaerobic sequencing batch reactors at 20° C and 25° C for the treatment of slaughterhouse wastewater. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 76(4), 393-400.
- Matějů, V., Čížinská, S., Krejčí, J., & Janoch, T. (1992). Biological water denitrification—a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 14(3), 170-183.
- McBride, B. C., & Wolfe, R. S. (1971). Biosynthesis of dimethylarsine by *Methanobacterium*. *Biochemistry*, 10(23), 4312-4317.
- McDougald, D., Rice, S. A., Barraud, N., Steinberg, P. D., & Kjelleberg, S. (2012). Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nature Reviews Microbiology*, 10(1), 39-50.
- McHugh, S., O'reilly, C., Mahony, T., Collieran, E., & O'flaherty, V. (2003). Anaerobic granular sludge bioreactor technology. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2(2-4), 225-245.
- McNeil, S. E. (2005). Nanotechnology for the biologist. *Journal of Leukocyte Biology*, 78(3), 585-594.
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T., & Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(10), 2346.
- Mosey, F. E., Swanwick, J. D., & Hughes, D. A. (1971). Factors affecting the availability of heavy metals to inhibit anaerobic digestion. *Water Pollution Control*, 70(6), 668-678
- Mudhoo, A., & Kumar, S. (2013). Effects of heavy metals as stress factors on anaerobic digestion processes and biogas production from biomass. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 10(6), 1383-1398.
- Muñoz-Cuevas, M., Fernández, P. S., George, S., & Pin, C. (2010). Modeling the lag period and exponential growth of *Listeria monocytogenes* under conditions of fluctuating temperature and water activity values. *Applied and environmental microbiology*, 76(9), 2908-2915.
- Nagpal, S., Chuichulcherm, S., Peeva, L., & Livingston, A. (2000). Microbial sulfate reduction in a liquid–solid fluidized bed reactor. *Biotechnology and bioengineering*, 70(4), 370-380.
- Nair, B., & Pradeep, T. (2002). Coalescence of nanoclusters and formation of submicron crystallites assisted by *Lactobacillus* strains. *Crystal Growth & Design*, 2(4), 293-298.
- Navarro, E., Piccapietra, F., Wagner, B., Marconi, F., Kaegi, R., Odzak, N., Sigg, L. & Behra, R. (2008). Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science & Technology*, 42(23), 8959-8964.
- Nicolella, C., Van Loosdrecht, M. C. M., & Heijnen, J. J. (2000). Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. *Journal of biotechnology*, 80(1), 1-33.

- O'Connell, R., Tankard, W., Alexander, C., Leyland, A., Strachan, R., Piggott, M., Litosh, D., Wiebe, J., Wong, L., Rannestad, E., Li, S., Nambiath, S., Tourney, J., Cochrane, R., Zhao, S., Scott-Gray, N., Aranda, D., Rodwell, G. *World Silver Survey 2015*. (Thomson Reuters, Ed.). The Silver Institute. London, UK.
- Oleszkiewicz, J. A., & Sharma, V. K. (1990). Stimulation and inhibition of anaerobic processes by heavy metals—a review. *Biological Wastes*, *31*(1), 45-67.
- Omil, F., Visser, A., Hulshoff Pol, L., & Lettinga, G. (1997). Desarrollo de biomasa sulfurogénica durante el tratamiento anaerobio de aguas con alto contenido de sulfato en reactores anaerobios de lodos granulares. *Revista Afinidad*, *54*, 353-471.
- Ondov, B. D., Bergman, N. H., & Phillippy, A. M. (2011). Interactive metagenomic visualization in a Web browser. *BMC bioinformatics*, *12*(1), 385.
- Pal, S., Tak, Y. K., & Song, J. M. (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, *73*(6), 1712-1720.
- Park, J. Y., & Yoo, Y. J. (2009). Biological nitrate removal in industrial wastewater treatment: which electron donor we can choose. *Applied microbiology and biotechnology*, *82*(3), 415-429.
- Pat-Espadas, A. M., Field, J. A., Otero-Gonzalez, L., Razo-Flores, E., Cervantes, F. J., & Sierra-Alvarez, R. (2016). Recovery of palladium (II) by methanogenic granular sludge. *Chemosphere*, *144*, 745-753.
- Pat-Espadas, A. M., Razo-Flores, E., Rangel-Mendez, J. R., & Cervantes, F. J. (2013). Reduction of palladium and production of nanocatalyst by *Geobacter sulfurreducens*. *Applied microbiology and biotechnology*, *97*(21), 9553-9560.
- Patel, R. (2005). Biofilms and antimicrobial resistance. *Clinical orthopaedics and related research*, *437*, 41-47.
- Pavlostathis, S. G., & Maeng, S. K. (2000). Fate and effect of silver on the anaerobic digestion process. *Water Research*, *34*(16), 3957-3966.
- Percheron, G., Bernet, N., & Moletta, R. (1999). Interactions between methanogenic and nitrate reducing bacteria during the anaerobic digestion of an industrial sulfate rich wastewater. *FEMS microbiology ecology*, *29*(4), 341-350.
- Pepper, I. L., Gerba, C. P., Gentry, T. J., & Maier, R. M. (Eds.). (2011). *Environmental microbiology*. Academic Press.
- Phanjom, P., & Ahmed, G. (2015). Biosynthesis of silver nanoparticles by *Aspergillus oryzae* (MTCC No. 1846) and its characterizations. *Nanoscience and Nanotechnology*, *5*(1), 14-21.
- Pruesse, E., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2012). SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics*, *28*(14), 1823-1829.

- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., & Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic acids research*, *41*, 590-596.
- Rafida, A. I., & Sallis, P. J. (2005). Removal of heavy metals from rainwater in vertical flow biofilters conditioned with sulphate reducing bacteria (SRB). University of Newcastle.
- Ram, M. S., Singh, L., Suryanarayana, M. V. S., & Alam, S. I. (2000). Effect of iron, nickel and cobalt on bacterial activity and dynamics during anaerobic oxidation of organic matter. *Water, Air, and Soil Pollution*, *117*(1-4), 305-312.
- Reichlen, M. J., Vepachedu, V. R., Murakami, K. S., & Ferry, J. G. (2012). MreA functions in the global regulation of methanogenic pathways in *Methanosarcina acetivorans*. *MBio*, *3*(4).
- Reidy, B., Haase, A., Luch, A., Dawson, K. A., & Lynch, I. (2013). Mechanisms of silver nanoparticle release, transformation and toxicity: a critical review of current knowledge and recommendations for future studies and applications. *Materials*, *6*(6), 2295-2350.
- Reis, M. A. M., Lemos, P. C., Almeida, J. S., & Carrondo, M. J. T. (1990). Influence of produced acetic acid on growth of sulfate reducing bacteria. *Biotechnology letters*, *12*(2), 145-148.
- Renninger, N., McMahon, K. D., Knopp, R., Nitsche, H., Clark, D. S., & Keasling, J. D. (2001). Uranyl precipitation by biomass from an enhanced biological phosphorus removal reactor. *Biodegradation*, *12*(6), 401-410.
- Reyes Cruz, V., Ramírez Ortega P. (2004). Recuperación de plata proveniente de los desechos sólidos de la industria fotográfica y radiográfica. *Memorias del XIX Congreso Nacional de la SMEQ*. ED.0 (1-10)
- Rittmann, B. E., & McCarty, P. L. (2012). *Environmental biotechnology: principles and applications*. McGraw-Hill Education.
- Rodríguez, J. (2003). Tratamiento anaerobio de aguas residuales. *Sistemas Integrados Sostenibles para el Tratamiento de Aguas Residuales y Opción de Reúso*, 5. AEISA.
- Rodríguez Morales, J. A. (2010). Estudio comparativo de diferentes tecnologías de higienización de lodos de depuradora con fines para su reutilización. (Tesis de Doctorado). Universidad Politécnica de Madrid, España.
- Rosen, B. P. (1996). Bacterial resistance to heavy metals and metalloids. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, *1*(4), 273-277.
- Rosenkranz F. (2013). Estudio del comportamiento de reactores anaerobios de tipo ASBR frente a compuestos de difícil degradación y/o efectores negativos. (Tesis de Doctorado). Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Colombia. Universidad de Santiago de Compostela, España.

- Ruiz, I., Álvarez, J. A., & Soto, M. (2001). El potencial de la digestión anaerobia en el tratamiento de aguas residuales urbanas y efluentes de baja carga orgánica. *Universidade da Coruña*.
- Sahinkaya, E., Altun, M., Bektas, S., & Komnitsas, K. (2012). Bioreduction of Cr (VI) from acidic wastewaters in a sulfidogenic ABR. *Minerals Engineering*, 32, 38-44.
- Sahinkaya, E., & Gungor, M. (2010). Comparison of sulfidogenic up-flow and down-flow fluidized-bed reactors for the biotreatment of acidic metal-containing wastewater. *Bioresource technology*, 101(24), 9508-9514.
- Santibáñez, C., Varnero, M. T., & Bustamante, M. (2011). Residual glycerol from biodiesel manufacturing, waste or potential source of bioenergy: a review. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 71(3), 469-475.
- Santini, T. C., Degens, B. P., & Rate, A. W. (2010). Organic substrates in bioremediation of acidic saline drainage waters by sulfate-reducing bacteria. *Water, Air, & Soil Pollution*, 209(1-4), 251-268.
- Shafer, M. M., Overdier, J. T., & Armstong, D. E. (1998). Removal, partitioning, and fate of silver and other metals in wastewater treatment plants and effluent-receiving streams. *Environmental toxicology and chemistry*, 17(4), 630-641.
- Shen, Y., Stojicic, S., & Haapasalo, M. (2011). Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. *Journal of endodontics*, 37(5), 657-661.
- Shenhar, R., Norsten, T. B., & Rotello, V. M. (2005). Polymer-mediated nanoparticle assembly: structural control and applications. *Advanced Materials*, 17(6), 657-669.
- Sheng, Z., & Liu, Y. (2011). Effects of silver nanoparticles on wastewater biofilms. *Water research*, 45(18), 6039-6050.
- Shivaji, S., Madhu, S., & Singh, S. (2011). Extracellular synthesis of antibacterial silver nanoparticles using psychrophilic bacteria. *Process Biochemistry*, 46(9), 1800-1807.
- Shrivastava, S., Bera, T., Roy, A., Singh, G., Ramachandrarao, P., & Dash, D. (2007). Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 18(22), 225103.
- Schultz, G., Phillips, P., Yang, Q., & Stewart, P. S. (2010). Biofilm maturity studies indicate sharp debridement opens a time-dependent therapeutic window. *Journal of wound care*, 19(8), 320.
- Sierra-Alvarez, R., Karri, S., Freeman, S., & Field, J. (2006). Biological treatment of heavy metals in acid mine drainage using sulfate reducing bioreactors. *Water Science & Technology*, 54(2), 179-185.
- Silva, A. J., Hirasawa, J. S., Varesche, M. B., Foresti, E., & Zaiat, M. (2006). Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. *Anaerobe*, 12(2), 93-98.

- Silva, S., Pires, P., Monteiro, D. R., Negri, M., Gorup, L. F., Camargo, E. R., Barbosa, D.B., Oliveira, R., Williams, D.W., Henriques, M. & Azeredo, J. (2013). The effect of silver nanoparticles and nystatin on mixed biofilms of *Candida glabrata* and *Candida albicans* on acrylic. *Medical mycology*, 51(2), 178-184.
- Silver, S., & Misra, T. K. (1984). Bacterial transformations of and resistances to heavy metals. *Basic life sciences*, 28, 23-46.
- Silver, S. (2003). Bacterial silver resistance: molecular biology and uses and misuses of silver compounds. *FEMS microbiology reviews*, 27(2-3), 341-353.
- Simões, L. C., Simões, M., & Vieira, M. J. (2007). Biofilm interactions between distinct bacterial genera isolated from drinking water. *Applied and environmental microbiology*, 73(19), 6192-6200.
- Simões, L. C., Simões, M., & Vieira, M. J. (2010). Influence of the diversity of bacterial isolates from drinking water on resistance of biofilms to disinfection. *Applied and environmental microbiology*, 76(19), 6673-6679.
- Singh, M., Singh, S., Prasad, S., & Gambhir, I. S. (2008). Nanotechnology in medicine and antibacterial effect of silver nanoparticles. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 3(3), 115-122.
- Singh, S. N., & Tripathi, R. D. (Eds.). (2007). *Environmental bioremediation technologies*. Springer Science & Business Media.
- Sintubin, L., De Windt, W., Dick, J., Mast, J., van der Ha, D., Verstraete, W., & Boon, N. (2009). Lactic acid bacteria as reducing and capping agent for the fast and efficient production of silver nanoparticles. *Applied microbiology and biotechnology*, 84(4), 741-749.
- Sintubin, L., De Gussemé, B., Van der Meeren, P., Pycke, B. F., Verstraete, W., & Boon, N. (2011). The antibacterial activity of biogenic silver and its mode of action. *Applied microbiology and biotechnology*, 91(1), 153-162.
- Smith, K. S., & Ingram-Smith, C. (2007). Methanosaeta, the forgotten methanogen? *Trends in microbiology*, 15(4), 150-155.
- Smith, W. L., & Gadd, G. M. (2000). Reduction and precipitation of chromate by mixed culture sulphate-reducing bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 88(6), 983-991.
- Soda, S., Kashiwa, M., Kagami, T., Kuroda, M., Yamashita, M., & Ike, M. (2011). Laboratory-scale bioreactors for soluble selenium removal from selenium refinery wastewater using anaerobic sludge. *Desalination*, 279(1), 433-438.
- Sondi, I., & Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of colloid and interface science*, 275(1), 177-182.
- Souto, T. F., Aquino, S. F., Silva, S. Q., & Chernicharo, C. A. (2010). Influence of incubation conditions on the specific methanogenic activity test. *Biodegradation*, 21(3), 411-424.

- Srey, S., Jahid, I. K., & Ha, S. D. (2013). Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food Control*, *31*(2), 572-585.
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., & Švabić-Vlahović, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of microbiological methods*, *40*(2), 175-179.
- Stewart, P. S., & Franklin, M. J. (2008). Physiological heterogeneity in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, *6*(3), 199-210.
- Steyer, J. P., Bernard, O., Batstone, D. J., & Angelidaki, I. (2006). Lessons learnt from 15 years of ICA in anaerobic digestion processes. *Water Science and Technology*, *53*(4-5), 25-33.
- Strevett, K., Davidova, I., & Suflita, J. M. (2002). A comprehensive review of the screening methodology for anaerobic biodegradability of surfactants. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, *1*(2), 143-167.
- Stumm, W., & Morgan, J. J. (1981). *Aquatic chemistry: an introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters*. John Wiley.
- Suzuki, K. N., Machado, E. C., Machado, W., Bellido, A. V. B., Bellido, L. F., Osso, J. A., & Lopes, R. T. (2014). Kinetics of trace metal removal from tidal water by mangrove sediments under different redox conditions. *Radiation Physics and Chemistry*, *95*, 336-338.
- Thakkar, K. N., Mhatre, S. S., & Parikh, R. Y. (2010). Biological synthesis of metallic nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, *6*(2), 257-262.
- Thauer, R. K., Jungermann, K., & Decker, K. (1977). Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriological reviews*, *41*(1), 100.
- Thompson, W. T., Kaye, M. H., Bale, C. W., & Pelton, A. D. (2000). Pourbaix diagrams for multielement systems. *Uhlig's Corrosion Handbook*, 125-136.
- Thormann, K. M., Saville, R. M., Shukla, S., & Spormann, A. M. (2005). Induction of rapid detachment in *Shewanella oneidensis* MR-1 biofilms. *Journal of bacteriology*, *187*(3), 1014-1021.
- Throbäck, I. N., Johansson, M., Rosenquist, M., Pell, M., Hansson, M., & Hallin, S. (2007). Silver (Ag⁺) reduces denitrification and induces enrichment of novel nirK genotypes in soil. *FEMS Microbiology Letters*, *270*(2), 189-194.
- Ting, Y. P., Imai, H., & Kinoshita, S. (1994). Effect of shock-loading of heavy metals on total organic carbon and phosphate removal in an anaerobic-aerobic activated sludge process. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *10*(3), 308-312.
- Tiwari, M. K., Guha, S., Harendranath, C. S., & Tripathi, S. (2006). Influence of extrinsic factors on granulation in UASB reactor. *Applied microbiology and biotechnology*, *71*(2), 145-154.

- Tran, Q. H., & Le, A. T. (2013). Silver nanoparticles: synthesis, properties, toxicology, applications and perspectives. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 4(3).
- Trautner, B. W., & Darouiche, R. O. (2004). Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. *American journal of infection control*, 32(3), 177-183.
- Tucker, M. D., Barton, L. L., & Thomson, B. M. (1998). Reduction of Cr, Mo, Se and U by *Desulfovibrio desulfuricans* immobilized in polyacrylamide gels. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 20(1), 13-19.
- Tuo, Y., Cai, J., Zhu, D., Zhu, Y., Liu, G., Hua, Y., & He, J. (2014). Effect of Zn²⁺ on the performances and methanogenic community shifts of UASB reactor during the treatment of swine wastewater. *Water, Air, & Soil Pollution*, 225(6), 1-11.
- Tuppurainen, K. O., Väisänen, A. O., & Rintala, J. A. (2002). Sulphate-reducing laboratory-scale high-rate anaerobic reactors for treatment of metal and sulphate containing mine wastewater. *Environmental technology*, 23(6), 599-608.
- Utgikar, V. P., Harmon, S. M., Chaudhary, N., Tabak, H. H., Govind, R., & Haines, J. R. (2002). Inhibition of sulfate-reducing bacteria by metal sulfide formation in bioremediation of acid mine drainage. *Environmental toxicology*, 17(1), 40-48.
- Vaidyanathan, R., Gopalram, S., Kalishwaralal, K., Deepak, V., Pandian, S. R. K., & Gurunathan, S. (2010). Enhanced silver nanoparticle synthesis by optimization of nitrate reductase activity. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces*, 75(1), 335-341.
- Van Hullebusch, E. D., Zandvoort, M. H., & Lens, P. N. (2003). Metal immobilization by biofilms: mechanisms and analytical tools. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2(1), 9-33.
- Velmurugan, P., Iydroose, M., Mohideen, M. H. A. K., Mohan, T. S., Cho, M., & Oh, B. T. (2014). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Bacillus subtilis* EWP-46 cell-free extract and evaluation of its antibacterial activity. *Bioprocess and Biosystems engineering*, 37(8), 1527-1534.
- Vergara-Fernández, A., Alarcon, N. A., & Aroca, G. E. (2012). Modelado y simulación de un biofiltro de película para el tratamiento de aire contaminado con hidrocarburos aromáticos. *Información Tecnológica*, 14(2-2003), 19.
- Vodnik, V. V., Božanić, D. K., Bibić, N., Šaponjić, Z. V., & Nedeljković, J. M. (2008). Optical properties of shaped silver nanoparticles. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, 8(7), 3511-3515.
- Wang, J., Huang, C. P., & Pirestani, D. (2003). Interactions of silver with wastewater constituents. *Water research*, 37(18), 4444-4452.
- Wang, L. K., Ivanov, V., Tay, J.-H., & Hung, Y.-T. (Eds.). (2010). *Environmental Biotechnology (Vol.10)*. Humana Press

- Westermann, P., & Ahring, B. K. (1987). Dynamics of methane production, sulfate reduction, and denitrification in a permanently waterlogged alder swamp. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(10), 2554-2559.
- White, C., & Gadd, G. M. (2000). Copper accumulation by sulfate-reducing bacterial biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, 183(2), 313-318.
- Whitman, W. B., Bowen, T. L., & Boone, D. R. (2006). The methanogenic bacteria. *Prokaryotes*, 3, 165-207.
- Wolska, K. I., Grzes, K., & Kurek, A. (2012). Synergy between novel antimicrobials and conventional antibiotics or bacteriocins. *Polish Journal of Microbiology*, 61(2).
- Woodrow Wilson Center (2011). A nanotechnology consumer products inventory. Obtenido de The Project on emerging nanotechnologies. Una versión de este trabajo fue vista por última vez enero, 2016 en la URL: <http://www.nanotechproject.org/cpi/>.
- Xiu, Z. M., Zhang, Q. B., Puppala, H. L., Colvin, V. L., & Alvarez, P. J. (2012). Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. *Nano letters*, 12(8), 4271-4275.
- Xu, H., Teo, K., Neo, H., & Liu, Y. (2012). Chemically inhibited ATP synthesis promoted detachment of different-age biofilms from membrane surface. *Applied microbiology and biotechnology*, 95(4), 1073-1082.
- Yang, Y., Gajaraj, S., Wall, J. D., & Hu, Z. (2013). A comparison of nanosilver and silver ion effects on bioreactor landfill operations and methanogenic population dynamics. *Water research*, 47(10), 3422-3430.
- Yang, Y., Wang, J., Xiu, Z., & Alvarez, P. J. (2013). Impacts of silver nanoparticles on cellular and transcriptional activity of nitrogen-cycling bacteria. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(7), 1488-1494.
- Yang, Y., Chen, Q., Wall, J. D., & Hu, Z. (2012). Potential nanosilver impact on anaerobic digestion at moderate silver concentrations. *Water research*, 46(4), 1176-1184.
- Yong, P., Rowson, N. A., Farr, J. P. G., Harris, I. R., & Macaskie, L. E. (2002). Bioreduction and biocrystallization of palladium by *Desulfovibrio desulfuricans* NCIMB 8307. *Biotechnology and bioengineering*, 80(4), 369-379.
- Yoon, S. H. (2015). *Membrane bioreactor processes: Principles and applications*. CRC Press.
- Zabochnicka-Świątek, M., & Krzywonos, M. (2014). Potentials of biosorption and bioaccumulation processes for heavy metal removal. *Mercury*, 6(5,245), 1-145.
- Zeikus, J. G. (1977). The biology of methanogenic bacteria. *Bacteriological Reviews*, 41(2), 514.
- Zellner, G., Feuerhake, E., Jördening, H. J., Macario, A. J., & Conway de Macario, E. (1995). Denitrifying and methanogenic bacteria in the biofilm of a fixed-film reactor operated

with methanol/nitrate demonstrated by immunofluorescence and microscopy. *Applied microbiology and biotechnology*, 43(3), 566-571.

Zouboulis, A. I. (1995). Silver recovery from aqueous streams using ion flotation. *Minerals Engineering*, 8(12), 1477-1488.

Zupančič, G. D., & Grilc, V. (2012). Anaerobic treatment and biogas production from organic waste. *Management of Organic Waste*, 1-28.

ANEXOS

ANEXO 1



Figura A.1. Aspecto visual del reactor LFI a) antes de la adición de metales. b) durante la inoculación.

ANEXO 2



Figura A.2. Aspecto visual de las pruebas en lote para evaluar el efecto tóxico de la Ag^+ sobre la AME del lodo granular y la biopelícula.

ANEXO 3



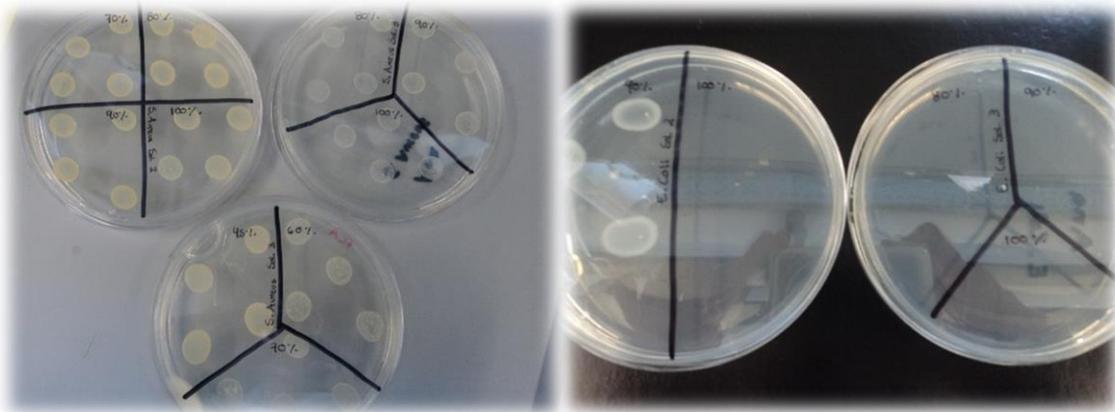
Figura A.3. Fotografía del aspecto visual del ensayo de AME.

ANEXO 4



S. aureus

E. coli



S. aureus

E. coli

Figura A.4. Fotografías de los ensayos de actividad antibacteriana de las AgNPs.

ANEXO 5

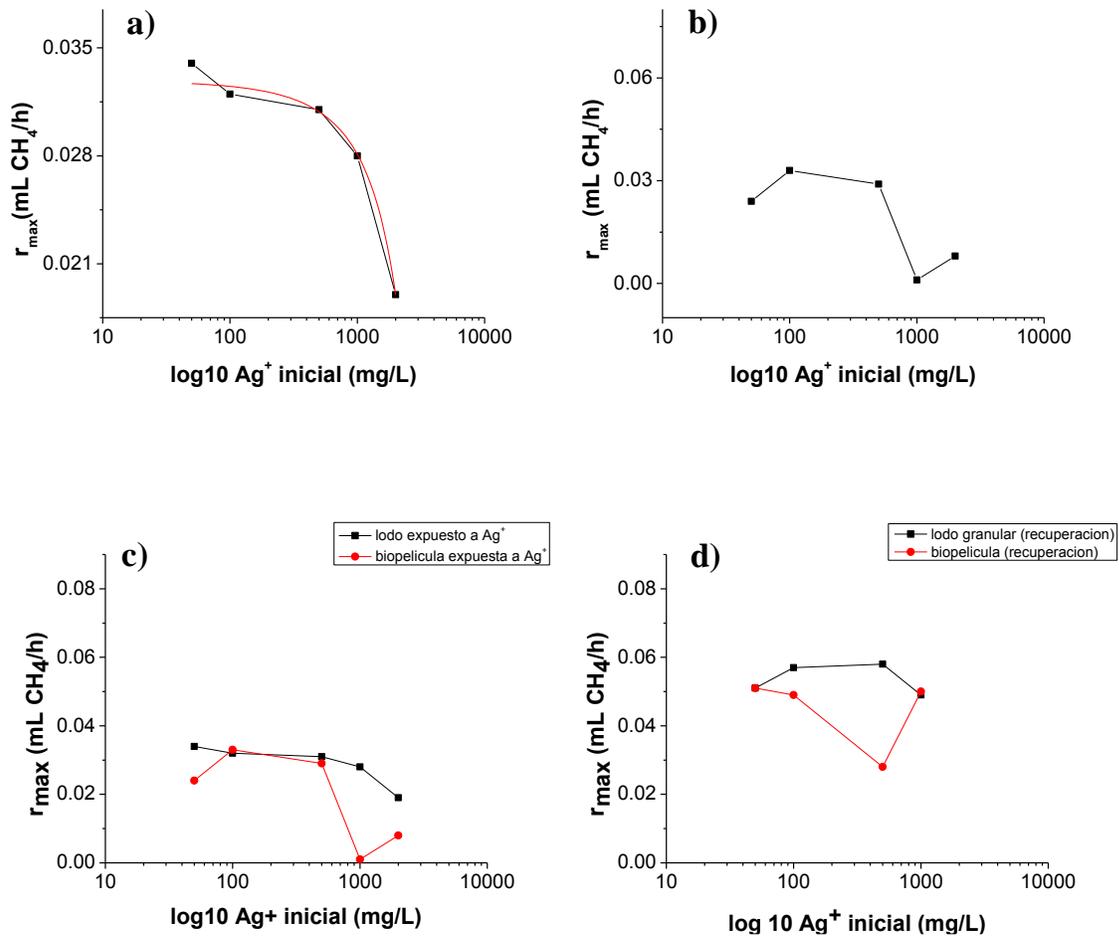


Figura A.5. Gráficas de r_{\max} vs. Concentración inicial de Ag⁺ en mg/L en escala logarítmica. a) lodo granular expuesto a Ag⁺. b) biopelícula expuesta a Ag⁺. c) comparación entre ambos sistemas expuestos a Ag⁺. d) comparación entre ambos sistemas biológicos durante la recuperación.