



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

Centro de Ciencias Básicas

“ESTUDIO SOBRE LOS MECANISMOS DE REMOCIÓN Y  
PRINCIPALES GÉNEROS MICROBIANOS IMPLICADOS EN LA  
DEPURACIÓN DE METALES PESADOS, EMPLEANDO LAGUNAS  
DE ESTABILIZACIÓN ENRIQUECIDAS CON BIOFLÓCULOS”

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**PRESENTA**

**M en C LUIS FERNANDO PRIETO CONTRERAS**

**Tutores: Dra. Alma Lilian Guerrero Barrera**

**Dr. Francisco Javier Avelar González**

**Asesor: Dr. Fernando Esparza García**

**Aguascalientes, Ags., Marzo de 2015**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

**LUIS FERNANDO PRIETO CONTRERAS  
ALUMNO DEL DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
P R E S E N T E.**

Estimado alumno Prieto:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **“ESTUDIOS SOBRE LOS MECANISMOS DE REMOCIÓN Y PRINCIPALES GÉNEROS MICROBIANOS IMPLICADOS EN LA DEPURACIÓN DE METALES PESADOS, EMPLEANDO LAGUNAS DE ESTABILIZACIÓN ENRIQUECIDAS CON BIOFLÓCULOS”**, hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

**ATENTAMENTE**

Aguascalientes, Ags., 19 de febrero de 2015

“SE LUMEN PROFERRE”

EL DECANO

**M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES  
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

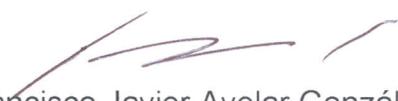
M. EN C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
P R E S E N T E

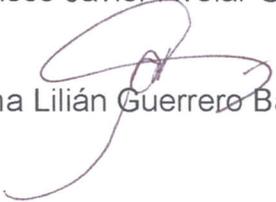
Por medio del presente como Tutores designados del estudiante **LUIS FERNANDO PRIETO CONTRERAS** con ID 11067 quien realizó la tesis titulada: **“ESTUDIO SOBRE LOS MECANISMOS DE REMOCIÓN Y PRINCIPALES GÉNEROS MIROBIANOS IMPLICADOS EN LA DEPURACIÓN DE METALES PESADOS, EMPLEANDO LAGUNAS DE ESTABILIZACIÓN ENRIQUECIDAS CON BIOFLÓCULOS”**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que el pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATE NTAMENTE  
“Se Lumen Proferre”

Aguascalientes, Ags., a 5 de enero de 2015.

  
Dr. Francisco Javier Avelar González, Tutor

  
Dra. Alma Lilián Guerrero Barrera, Tutora

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado  
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Morfología y Depto. De Fisiología y Farmacología  
c.c.p.- Secretario Técnico



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES  
FORMATO DE CARTA DE VOTO APROBATORIO

M. EN C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
P R E S E N T E

Por medio del presente como Tutor designado del estudiante **LUIS FERNANDO PRIETO CONTRERAS** con ID 11067 quien realizó la tesis titulada: **“ESTUDIO SOBRE LOS MECANISMOS DE REMOCIÓN Y PRINCIPALES GÉNEROS MIROBIANOS IMPLICADOS EN LA DEPURACIÓN DE METALES PESADOS, EMPLEANDO LAGUNAS DE ESTABILIZACIÓN ENRIQUECIDAS CON BIOFLÓCULOS”**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que el pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

“Se Lumen Proferre”

Aguascalientes, Ags., a 06 de Febrero de 2015.

Dr. Fernando José Esparza García, Tutor

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado  
c.c.p.- Jefatura del Depto. de Morfología y Depto. De Fisiología y Farmacología  
c.c.p.- Secretario Técnico

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

# International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences (IJCMAS)

ISSN: 2319-7692 (Print) ISSN 2319-7706 (Online)

An International, Monthly, Online, Free Access, Peer Reviewed,  
Indexed, fast track Scientific Research Journal

[www.ijcmas.com](http://www.ijcmas.com)

PART A: *Editorial Office Only*

Accepted

## Section – I

Manuscript Number:	<b>IJCMAS – 201501082</b>
Title:	<b>Bioflocks structure from enriched lab-scale stabilization ponds used to remove high chromium concentrations</b>
Authors:	<b>L.F.Prieto-Contreras<sup>1,2</sup>, F.J.Avelar-González<sup>1</sup>, V.M.Loera-Muro<sup>1</sup>, C.Quiñones-Valles<sup>1</sup>, A.Loera-Muro<sup>1</sup>, E.M.Ramírez- López<sup>1</sup>, F. Esparza-García<sup>3</sup>, A. L. Guerrero-Barrera<sup>1*</sup></b>

**GENERAL RECOMMENDATION**

RECOMMENDATION	Excellent	Good	Fair	Poor	N/A
Originality	✓				
Design and Methodology	✓				
Writing Style	✓				
Data Analysis		✓			
Conclusions		✓			
Contribution to field		✓			
Novelty of Results	✓				
Discussion	✓				

✓ **Make tick for as applicable for this research paper**

**SECTION III - Recommendation: (Kindly Mark With An X)**

Accept As Is:	<b>X</b>
Requirements	--
Requires Minor Corrections:	--
Requires Moderate Revision:	--
Requires Major Revision:	--
Submit To Another Publication Such As:	--
Reject On Grounds Of (Please Be Specific):	--

## DEDICATORIAS

A Dios:

Por permitirme culminar esta etapa tan importante en mi vida y por ayudarme a no darme por vencido en los momentos difíciles.

A mi Padre †

Que lamentablemente se adelantó en el camino, más sin embargo con su apoyo, amor y palabras de aliento mientras su enfermedad lo permitió, logró darme ánimo y perseverancia. Gracias Papá en donde quiera que te encuentres.

A mi Madre:

Todo mi amor y respeto para quien nunca he dejado de apoyarme incondicionalmente en todos los sentidos de mi vida, y que lo seguirá haciendo mientras pueda. Gracias Mamá.

Papá y Mamá, gracias a ustedes he llegado hasta aquí. Nunca los defraudaré. LOS AMO.

A mi Esposa:

Faby gracias por tu comprensión y apoyo durante la realización de este proyecto, pero sobre todo en la etapa final. Te Amo.

A Camila:

Hija espero que algún día esto te sirva de ejemplo para no rendirte ante circunstancias adversas. Te amo y esto es por y para ti.

A mis hermanos

Rocío, Arturo, Lore , Gris y Clau por todo su apoyo y cariño que me brindaron todo el tiempo.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Avelar, Dra. Alma Lilian y Dr. Esparza

Gracias por la confianza depositada en un servidor y por la acertada dirección de este trabajo. Gracias por todo su apoyo y paciencia. Pero sobre todo gracias por su amistad.

A Laurita Y, Sam, Romy, Guilda, Mony, David, Tannya, Israel, Rosalinda, Víctor, Cesar, Cristi, Keila, Luis y Rogelio

Gracias por todo el apoyo brindado y por la amistad brindados para la realización de este proyecto. Sin ustedes esto no hubiera sido posible

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes por el subsidio a los estudios del doctorado y a CONACyT por la beca numero 170018 otorgada para la realización de los estudios

Gracias a todos mis maestros y sobre todo a mi comité tutorial (Dra. Elsa Marcela Ramírez López y Dr. Francisco Flores Tena) por su apoyo y aportes durante el desarrollo de este proyecto.

Sra. Eva

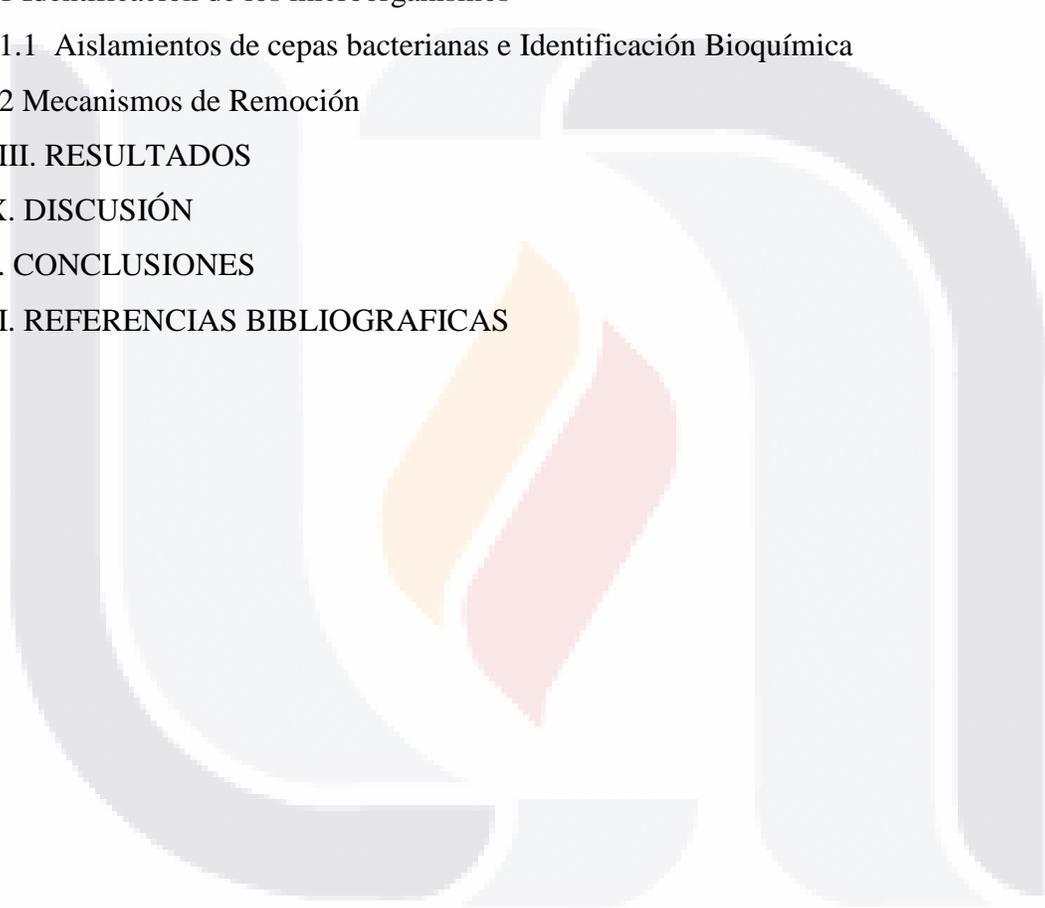
Gracias por su amistad y cariño, por sus palabras de aliento en mis momentos difíciles y por el cariño que siempre ha depositado en mí, Con mucho cariño y respeto.

Gracias a todas las personas que de alguna u otra manera tuvieron algo que ver con este proyecto, y que igualmente me brindaron su amistad

## ÍNDICE GENERAL

Índice General	1
Índice de Tablas	3
Índice de Figuras	4
Resumen	5
Abstract	8
I. INTRODUCCIÓN	11
1.1 El agua	11
1.1.1 Importancia	11
1.1.2 Contaminación del agua	12
1.2. Tratamiento biológico de aguas Residuales	13
1.2.1 Sistemas de lodos activados	13
1.2.2 Sistemas de Lagunas de Estabilización	14
1.2.3 Microbiología de las lagunas de estabilización	16
❖ Bacterias	17
❖ Algas	17
❖ Hongos	17
❖ Protozoarios	18
1.2.4 Ventajas y Desventajas de las Lagunas de Estabilización	18
1.2.5 Enfoques Propuestos Para Subsanan las Principales Deficiencias de las Lagunas de Estabilización	20
II. ANTECEDENTES	22
2.1 Microorganismos Resistentes a Metales Pesados	26
2.2 Mecanismos de Remoción de Metales Pesados	27
Bioadsorción	28
Bioacumulación	28
Biotransformación	29
Bioprecipitación o biomineralización	29
Bioquimioadsorción	29

Biodegradación de agentes quelantes sintéticos	29
III. JUSTIFICACIÓN	31
IV. HIPÓTESIS	32
V. OBJETIVO GENERAL	33
VI. OBJETIVOS ESPECIFICOS	33
VII. METODOLOGÍA	34
7.1 Identificación de los microorganismos	34
7.1.1 Aislamientos de cepas bacterianas e Identificación Bioquímica	34
7.2 Mecanismos de Remoción	35
VIII. RESULTADOS	37
IX. DISCUSIÓN	48
X. CONCLUSIONES	54
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	55



## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1 Principales cepas aisladas en lagunas de estabilización enriquecidas con bioflóculos	38
Cuadro 2 Distribución porcentual entre las fracciones inorgánica y orgánica de la concentración total de metales pesados en los sedimentos de las lagunas	42



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Microfotografías de Bioflóculos Tratados con Metales Pesados en Microscopio de Campo Claro y Epifluorescencia	37
Figura 2 Microfotografías de Bioflóculos en Microscopio Electrónico de Barrido	39
Figura 3 Microfotografías de Bioflóculos en Microscopio Electrónico de Barrido	40
Figura 4 Imágenes en Microscopía de Campo Claro	41
Figura 5 Remoción de Cadmio en Experimentos por Lote	43
Figura 6 Remoción de Cromo en Experimentos por Lote	43
Figura 7 Remoción de Mercurio en Experimentos por Lote	44
Figura 8 Remoción de DQO en Experimentos por Lote	45
Figura 9 Microfotografías de cristales de Cd, Cr y Hg y Bioflóculos Tratados con Metales Pesados en Microscopía de Campo Claro y de Epifluorescencia	46
Figura 10 Microfotografías de Bioflóculos Antes y Después del Tratamiento con Metales Pesados en Microscopía Confocal.	47

## RESUMEN

El objetivo general del trabajo fue determinar los principales mecanismos de remoción y los principales géneros microbianos involucrados en la depuración de cadmio, cromo y mercurio en lagunas de estabilización enriquecidas con bioflóculos. Para determinar la viabilidad de los bioflóculos, se realizaron ensayos de viabilidad sobre la biomasa tratada con metales pesados, empleando el Kit vida muerte de Molecular Probes, una vez realizadas las pruebas de viabilidad se procedió al aislamiento de las bacterias, el cual se llevó a cabo empleando agar BHI enriquecido con 100 mg/L de cada metal (Cd, Cr y Hg) y BHI libre de metales para microorganismos provenientes de bioflóculos provenientes de lagunas control. Una vez verificada la viabilidad de la biomasa, se procedió a la identificación, la cual se llevó a cabo primero empleando pruebas bioquímicas (galerías Api NE y Api E, Biomérieux), y posteriormente se corroboró la identificación empleando técnicas de secuenciación de rRNA por PCR, utilizando los Primers universales 16s (27f) y 16s (1492R). Por otro lado, se prepararon frotis de los bioflóculos para observar su estructura al microscopio electrónico de barrido, esto consistió en fijar los bioflóculos al aire en portaobjetos, deshidratarlos con soluciones crecientes de alcohol para finalmente cubrirlos con oro y realizar la observación y toma de micrografías de los bioflóculos.

Se tomaron muestras de sedimentos de las lagunas enriquecidas y alimentadas con cada uno de los metales, y de la laguna control no enriquecida y tratada con metales pesados para determinar la concentración de metales pesados en el sedimento completo y se procuró separar la fracción inorgánica (cristales) de la orgánica (biomasa) por medio de sedimentación, a fin de determinar la concentración de metales en cada una de estas dos fracciones por separado.

Se realizaron experimentos por lote (500 mL) utilizando biomasa tinalizada y sin tinalizar de las lagunas enriquecidas, con la finalidad de estudiar la importancia de los mecanismos abióticos de remoción de los metales en estos sistemas.

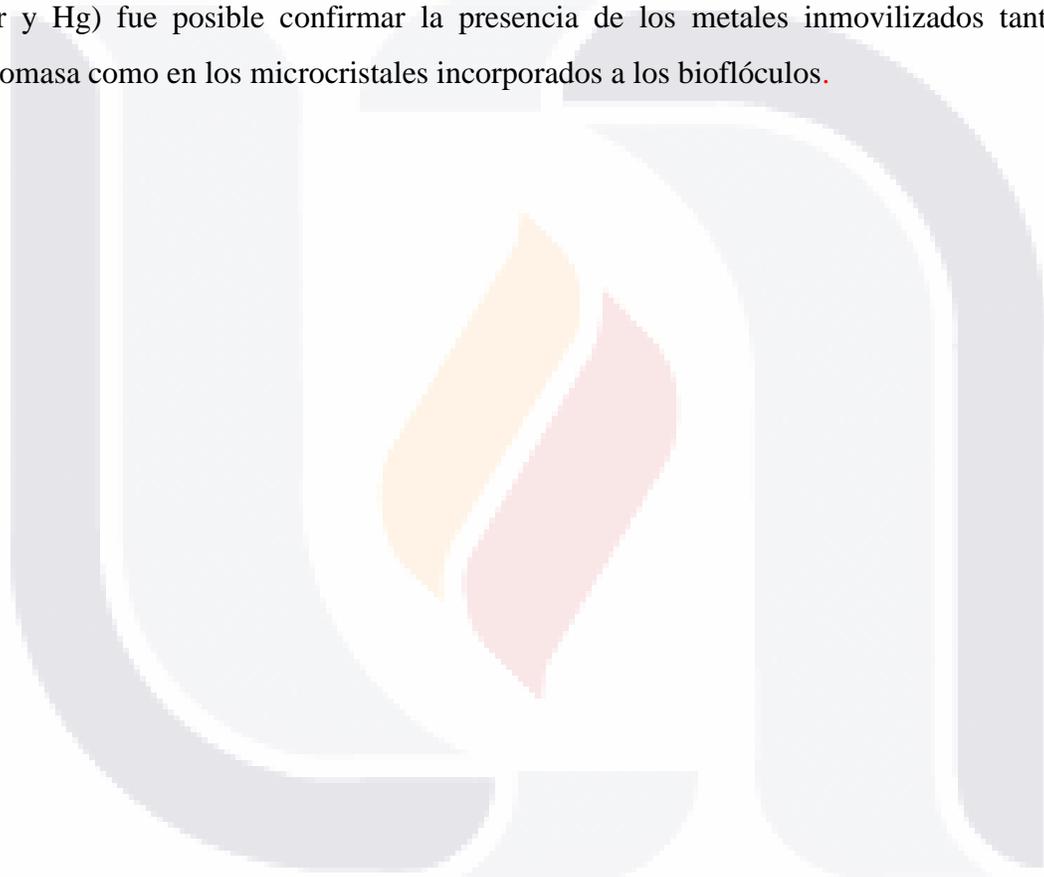
De acuerdo con los resultados obtenidos observando se observó que la alimentación de elevadas concentraciones de metales no provocó efectos tóxicos significativos en la biomasa de las lagunas enriquecidas con bioflóculos. En todos los casos, la viabilidad fue

del orden del 90%, similar a la observada en la biomasa antes de la alimentación de los metales. Se aislaron y caracterizaron diez cepas bacterianas en las lagunas enriquecidas con bioflóculos antes de la alimentación con metales en contraste, posterior a la alimentación con metales pesados, se identificaron sólo dos cepas en el caso del Cd, cuatro para el Cr y tres para el Hg, siendo en la mayoría de los casos diferentes a las previamente identificadas. La observación de la estructura de los bioflóculos empleando un microscopio electrónico de barrido mostró notables similitudes con la conformación presentada por las biopelículas, incluyendo canales para el paso de agua y nutrientes, con la excepción de que los bioflóculos no están adheridos a superficie alguna.

Los resultados obtenidos en los estudios sobre la biomasa sedimentada muestran que en todos los casos se observó una concentración significativa de metales pesados (entre el 24 y el 76%) tanto en la fracción orgánica (biomasa) como en la inorgánica (cristales); lo cual implica que para todos los metales estudiados, en ambos tipos de laguna, los mecanismos de remoción asociados a la inmovilización de los metales en la biomasa (bioadsorción, bioquimioadsorción y bioacumulación), y los mecanismos asociados a la precipitación del metal (bioprecipitación, biotransformación y biomineralización), fueron ambos relevantes, inmovilizando en los sedimentos al menos cerca de la cuarta parte del metal removido del agua residual. La información obtenida de los experimentos por lote, para los tres metales ensayados (Cd, Cr, y Hg); muestran que la biomasa tinalizada presenta una importantes remoción del metal sin embargo, conforme se siguió alimentando el metal, dejó de remover significativamente los metales. Estos resultados muestran un patrón de saturación en la biomasa tinalizada, que está ausente en la biomasa experimental activa; lo cual hace evidente que los procesos fundamentales que mantienen una elevada eficiencia en la remoción de los metales en las lagunas de estabilización enriquecidas son de naturaleza biológica.

La remoción de los metales se debió casi en su totalidad a la actividad de la biomasa sedimentada (bioflóculos). Experimentos por lote demostraron que la biomasa suspendida (sobrenadante de las lagunas) no contribuye de manera significativa a la remoción de los metales. En todos los casos, la remoción por los sobrenadantes fue similar al experimento control. Esto descarta la contribución significativa de la precipitación química debido a los componentes del agua residual sintética, y también la bioprecipitación debida a metabolitos

presentes en la masa líquida; no así la bioprecipitación a nivel de los microambientes en el interior de los bioflóculos. Empleando la autofluorescencia de los metales ensayados, los cuales generan una señal muy clara en el microscopio de epifluorescencia, fue posible localizar los metales inmovilizados en la biomasa de las lagunas enriquecidas con bioflóculos. Los experimentos control, empleando biomasa libre de metales, no mostraron señal alguna de fluorescencia; lo cual descarta la interferencia de los componentes del agua residual sintética y de la biomasa misma. En contraste, para los tres metales estudiados (Cd, Cr y Hg) fue posible confirmar la presencia de los metales inmovilizados tanto en la biomasa como en los microcristales incorporados a los bioflóculos.



## ABSTRACT

The overall objective was to determine the main removal mechanisms and major microbial genres involved in the purification of cadmium, chromium, and mercury in stabilized ponds enriched with bioflocks. In order to determine the viability of bioflocks, viability tests were performed over the biomass treated with heavy metals. The Molecular Probes life death kit was used. Once the viability tests were done, the bacteria were isolated. This was done by using BHI agar enriched with 100 mg/L of each metal (Cd, Cr, and Hg) and metal-free BHI for microorganisms of bioflocks originating from control ponds. Identification proceeded once the biomass viability was verified. This was done, first, by using biochemical tests (Api NE and Api E galleries, bioMériux) and, later, identification was confirmed through rRNA PCR sequencing techniques, using 16s (27f) and 16s (1492R) universal primers. Furthermore, smear bioflocks were prepared for observation of their structure through scanning electron microscopy. This consisted of placing the bioflocks on slides for proper ventilation, then dehydrating them with increasing alcohol solutions, to finally cover them with gold and perform the observation and the taking of micrographs from the bioflocks.

Sediment samples were taken from enriched and fed ponds with each of the metals and from the non-enriched control pond, treated with heavy metals, to determine the concentration of heavy metals in the entire sediment; seeking to separate the inorganic fraction (crystals) from the organic (biomass) through sedimentation in order to determine the metals concentration in each of these two fractions separately.

Batch experiments (500mL) were performed using sterilized and non-sterilized biomass from enriched ponds to be able to study the importance of abiotic mechanisms for the removal of metals in these systems.

According to the obtained results, it was observed that the feeding of high metal concentrations caused no significant toxic effects on the biomass of ponds enriched with bioflocks. In all cases, viability was approximately 90%, which is similar to that observed in the biomass prior to the feeding of metals. Ten bacterial strains were isolated and characterized in the ponds enriched with bioflocks before the feeding of metals in contrast. After the feeding of heavy metals, only two strains were identified for Cd, four for Cr, and

three for Hg; in most cases these were different from the previously identified. The bioflocks structure observation done using the scanning electron microscope showed remarkable similarities to the structure presented by the biofilms, including canals for the passage of water and nutrients, with the exception that bioflocks are not stuck to any surface.

The results obtained from the sediment biomass studies showed that in all cases there is a significant concentration of heavy metals (between 24% and 26%) in the organic fraction (biomass), as well as in the inorganic (crystals); implying that for all metals studied, in both types of ponds, the removal mechanisms associated with the immobilization of metals in biomass (biosorption, biochemical sorption, and bioaccumulation) and the mechanisms associated with the precipitation of metal (bioprecipitation, biotransformation, and biomineralization) were both relevant, immobilizing within the sediments, at least, about a quarter of the removed metal from wastewater. The information obtained from the batch experiments from the three tested metals (Cd, Cr, and Hg) show that the sterilized biomass presents a major metal removal; however, as the metal continued to be fed, the removal of metals significantly ceased. These results show a saturation pattern in the sterilized biomass, which is absent in the active experimental biomass; this clearly represents that the fundamental processes that maintain a high efficiency in the removal of metals in the ponds with enriched stabilization are biological in nature.

The removal of metals was due, almost entirely, to the sediment biomass (bioflocks) activity. Batch experiments showed that the suspended biomass (supernatant ponds) does not contribute significantly with the removal of metals. In all cases, the removal through supernatants was similar to that of the control experiment. This eliminates the significant contribution of chemical precipitation due to the components of synthetic wastewater and the bioprecipitation due to the metabolites present in liquid mass; nevertheless, the bioprecipitation at a level of the microenvironments in the interior of the bioflocks. By using the autofluorescence microscope, it was possible to locate the immobilized metals in the biomass of the ponds enriched with bioflocks. The control experiments, using free-biomass metals, showed no fluorescence signal; this rule out the interference of synthetic wastewater components and the biomass itself. In contrast, it was possible to confirm the

presence of immobilized metals in the biomass, as well as in the microcrystals incorporated in the bioflocks, for the three metals studied (Cd, Cr, and Hg.)



## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 EL AGUA

#### 1.1.1 IMPORTANCIA

El agua presenta propiedades físicas y químicas fundamentales para sostener la vida y el equilibrio ambiental de la Tierra (CNA, 2010; SEMARNAT, 2010). Se encuentra distribuida en todo el planeta, en la superficie, en lagos, mares y ríos; en los desiertos, como agua subterránea que se manifiesta exteriormente en los oasis; atrapada entre los granos de arena como pequeñas gotas o presente en el vapor de la atmósfera (Grant *et al.*, 2004). El agua constituye hasta el 97% de la materia de los seres vivos, en ella se originó y se mantiene la vida. Lo que distingue a la Tierra de los demás cuerpos del sistema solar es que posee agua en abundancia en sus tres fases: sólida, líquida y gaseosa (Needham *et al.*, 2000; SEMARNAT, 2010).

En nuestro planeta el 70% de la superficie es agua; sin embargo, su distribución es desigual. El agua dulce es escasa, sólo comprende un 2.5%; en tanto que el resto es salada. De esta pequeña fracción de agua dulce, el 70% se encuentra congelada en los casquetes polares y el resto se distribuye en la atmósfera, cuerpos de agua superficiales y acuíferos. Se estima que menos del 0.01% del agua del planeta es disponible para consumo humano (Guerrero, 1999; SEMARNAT, 2010), esto sin tomar en cuenta los diferentes factores que limitan su calidad (Arellano, 2002, SEMARNAT, 2010).

El descuido en el manejo del recurso, la ineficiencia en su aprovechamiento y su escasez, provoca que las aguas superficiales y subterráneas de varias regiones del país sean insuficientes, o carezcan de calidad para satisfacer las demandas actuales. Numerosos cuerpos de agua reciben descargas residuales sin tratar, lo que ocasiona distintos grados de contaminación y limita su uso posterior (por ejemplo las cuencas del Lerma, Alto Pánuco, Alto Balsas, San Juan y el Valle de México). En 1994 el 68% de las muestras de agua superficiales recolectadas a nivel nacional presentaban considerables niveles de contaminación: sólidos, microorganismos patógenos, materia orgánica, metales pesados,

nutrientes (fósforo y nitrógeno) y sustancias tóxicas (SEMARNAT, 2010; Treviño y Cázares, 1999).

### 1.1.2 CONTAMINACIÓN DEL AGUA

El uso indiscriminado del agua genera gran cantidad de aguas residuales aunado al insuficiente control y tratamiento de las mismas ocasiona el deterioro gradual de los recursos hídricos. Las aguas residuales no tratadas, al final desembocan en los cuerpos receptores tanto superficiales como subterráneos, afectando su calidad e impidiendo su empleo (CNA, 2010; SEMARNAT, 2010; Treviño y Cázares, 1999).

La sobre-explotación de los mantos acuíferos provoca el arrastre de contaminantes naturales que yacen en el subsuelo, como el arsénico. En las zonas costeras, la sobreexplotación de agua subterránea produce la infiltración de agua de mar, con la consecuente salinización del agua dulce. En estados como Aguascalientes, San Luis Potosí, Hidalgo, Guanajuato y Yucatán, la contaminación por descarga de aguas residuales ha afectado de manera importante el acuífero (CNA, 2010; SEMARNAT, 2010; Treviño y Cázares 1999).

Los principales contaminantes del agua tanto superficial como subterránea son: sólidos, materia orgánica, materia inorgánica, microorganismos patógenos, nutrientes como fósforo y nitrógeno, detergentes, entre estos contaminantes se encuentran sustancias tóxicas tales como: *metales pesados (arsénico, bario, cadmio, cromo, mercurio, plomo, plata, selenio, entre otros)*, agroquímicos (endrín, malatión, DDT) y sustancias orgánicas volátiles (benceno, tolueno y fenol) (CNA, 2010; SEMARNAT, 2010; Treviño y Cázares, 1999).

Con base a lo anterior la remediación de la contaminación del agua se vuelve cada vez un requisito prioritario para el bienestar y la supervivencia del ser humano, tanto en el caso del agua superficial, como la subterránea. Los tratamientos fisicoquímicos y biológicos son la opción adecuada, siendo estos últimos los más accesibles y económicos.

## 1.2 TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE AGUAS RESIDUALES

El tratamiento de agua es una de las formas más antiguas de protección para la salud pública. Desde hace muchos años, el hombre ha tratado el agua para eliminar residuos, reducir los riesgos a la salud y mejorar su calidad, en cuanto a su apariencia, olor, color y sabor. Desde la época antigua el agua se trataba hirviéndola, exponiéndola al sol, depositándola en recipientes para su sedimentación o filtrándola a través de arena o grava para purificarla. En la actualidad muchas de estas técnicas son utilizadas para el tratamiento de las aguas ya sean de abastecimiento o residuales, complementándose con las técnicas físicas y químicas modernas. (Arellano, 2002; SEMARNAT, 2010; Treviño y Cázares, 1999).

Existe una gran cantidad de procesos para el tratamiento de agua, los cuales se clasifican en tres categorías: tratamientos físicos, químicos y biológicos; estos últimos utilizan organismos vivos para provocar cambios químicos, así el tratamiento biológico puede considerarse una modalidad de tratamiento químico (SEMARNAT, 2010).

Los tipos de tratamiento biológico incluyen, entre otros, la *digestión aerobia* y *anaerobia*, que son ampliamente utilizadas (Arellano, 2002; CNA, 2010; SEMARNAT, 2010).

Dentro de los principales tratamientos biológicos para aguas residuales se encuentran los lodos activados, lagunas estabilización, pantanos artificiales o humedales, filtros biológicos, zanjas de oxidación, entre otros, siendo los más utilizados los dos primeros (CNA, 2010; SEMARNAT, 2010).

### 1.2.1 SISTEMAS DE LODOS ACTIVADOS

En términos generales, la depuración biológica por lodos activados consiste en un tratamiento aerobio del agua residual mediante un cultivo en suspensión de microorganismos, donde tras el aporte mecánico de oxígeno, se llevan a cabo una serie de procesos de biodegradación (oxidación de la materia orgánica disuelta en el agua) y biosíntesis (producción de una nueva biomasa celular) y cuya finalidad es la producción de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

un clarificado bajo en DBO (Demanda Bioquímica de Oxígeno), SS (sólidos suspendidos) y turbiedad (efluente secundario), correctamente separado del lodo activado decantado y compactado.

La mayor porción de los sólidos biológicos son removidos por la sedimentación y posteriormente reciclados. El inconveniente de estos sistemas es que tienen altos costos de construcción, operación y mantenimiento; lo cual los hace en muchas ocasiones inaccesibles para ciertas poblaciones (Arellano, 2002; CNA, 2010; SEMARNAT, 2010).

### 1.2.2 SISTEMAS DE LAGUNAS DE ESTABILIZACIÓN

Como se expuso anteriormente, el tratamiento de aguas residuales, es importante para prevenir problemas de salud inherentes a la actividad humana diaria. Los procesos de tratamiento suponen inversiones de capital elevadas y costos de operación altos, que la mayoría de las comunidades no pueden soportar (Romero Rojas, 1999). Por lo tanto, en los países de bajos recursos económicos, sin capacidad para depurar las aguas residuales ni siquiera de materia orgánica común, el desarrollo de tecnologías de bajo costo para remover xenobióticos altamente tóxicos adquiere una importancia capital. En México, toda la infraestructura disponible apenas alcanza para depurar menos del 20% de la DBO generada, y los trenes de tratamiento no están diseñados para remover sustancias tóxicas y/o recalcitrantes (CNA, 2010; SEMARNAT, 2010).

Las lagunas de estabilización constituyen el sistema de tratamiento de aguas residuales más antiguo, las primeras referencias se remontan 3000 años atrás (Grau, 1996). Esta tecnología es también la más cercana a los procesos de autopurificación de los cuerpos de agua (Belhatche, 1995). Consiste básicamente en estanques de tierra para embalsar el agua residual, la cual es depurada debido a la acción de diversos mecanismos naturales. Entre los más importantes están la sedimentación, digestión anaerobia, degradación aerobia, volatilización, adsorción, aireación y mezclado por acción del viento, suministro de oxígeno por procesos fotosintéticos, eliminación de patógenos por competencia microbiana y acción de la luz ultravioleta solar. Este sistema busca que los contaminantes de las aguas residuales se transformen en especies químicas más sencillas y que puedan

incorporarse a los ciclos biogeoquímicos. Los efluentes de las lagunas de estabilización pueden descargarse en los cuerpos naturales de agua (ríos, mares, lagos, etc.) sin que causen daño significativo al ecosistema (Almasi y Pescod, 1996; Álvarez, 1991; Avelar *et al.*, 1994; Houghton y Mara, 1992; Izurieta, 1984; Masseret, 2000; Metcalf y Eddy, 1991; Pearson *et al.* 1987, Pescod, 1996; Polprasert y Charnpratheep, 1989; Saqqar y Pescod, 1995; Vuillot, 1987).

Dependiendo de la carga orgánica y del diseño, particularmente de la profundidad del estanque, las lagunas de estabilización pueden ser clasificadas en: anaerobias (2.5 a 4.5 m), aerobias (0.5 a 1.0 m) o facultativas (1.0 a 2.5 m) (León 1995). La poca profundidad de las lagunas aerobias y facultativas se debe a la necesidad de que la luz y el oxígeno penetren y garanticen condiciones aerobias en la mayor parte de la columna de agua. Las lagunas facultativas, que combinan la digestión anaerobia en el fondo del estanque y la degradación aerobia en las capas superiores de la columna de agua, son las más usadas (Belhateche, 1995; Metcalf y Eddy, 1991), y constituyen el sistema que se proyecta construir en mayor número en los próximos 10 años en nuestro país (Escalante *et al.*, 2000). Recientemente se ha propuesto el empleo de lagunas anóxicas (Almasi y Pescod, 1996), las cuales tiene profundidades similares a las anaerobias, pero la carga orgánica presenta valores intermedios entre las lagunas facultativas y completamente anaerobias (de 15 a 100 g DBO/m<sup>3</sup>/d) (Belhateche, 1995; Metcalf y Eddy, 1991).

Para diseñar, construir y operar lagunas de estabilización, no se requiere tecnología sofisticada. En muchos casos, la única fuente de energía es la luz solar, y generalmente pueden prescindir de bombas, motores y otras partes móviles. Los costos de construcción, operación y mantenimiento son inferiores a cualquier otra alternativa de tratamiento secundario. Diseñadas y operadas adecuadamente, las lagunas representan eficiencias de remoción de materia orgánica y patógenos muy altas (superiores al 90%); permitiendo la reutilización segura del efluente en el riego de parcelas. Estas características hacen de las lagunas de estabilización la tecnología de tratamiento biológico de aguas residuales más económica y difundida en el mundo. Su aplicación exitosa es factible incluso en regiones donde la electricidad y la mecanización no han llegado aún (Grau, 1996; Mara, 1987).

En naciones desarrolladas, las ventajas inherentes de esta tecnología frecuentemente la ubican como la elección natural en pequeñas comunidades y pueblos. De acuerdo con

Green (1995), en Estados Unidos las lagunas de estabilización ocupan el primer lugar entre los sistemas de tratamiento de aguas residuales municipales; existen 7000 lagunas en este país (Zhao y Wang, 1996). A finales de los años ochenta del siglo pasado, se inventariaron más de 3500 lagunas en Europa, distribuidas en 16 países (Vuillot y Boutin, 1987). A mediados de los noventa, en Francia había más de 2000 lagunas de estabilización (Racault *et al.*, 1995).

Para países subdesarrollados, y especialmente en las regiones más pobres, las lagunas de estabilización representan la única opción tecnológica y financiera posible (Charlton, 1997; Lansdell, 1987; Mayo, 1995; Oakley *et al.*, 2000; Oufdou *et al.*, 2000). En China operan más de diez mil, tanto en regiones rurales como urbanas (Zhao y Wang, 1996). En Centroamérica prácticamente la totalidad de la infraestructura de saneamiento de aguas residuales se basa en esta tecnología. Está proyectada la construcción de un sistema de lagunas facultativas de 162 hectáreas para la ciudad de Managua, Nicaragua (un millón de habitantes) y otra de 168 hectáreas para San Pedro Sula, Honduras, con 640 mil habitantes (Oakley *et al.*, 2000). En México operan 1077 plantas de tratamiento de aguas residuales municipales, y cerca del 50% (530) de las plantas corresponden a lagunas de estabilización (CNA, 2010; Escalante *et al.*, 2000; SEMARNAT, 2010).

### 1.2.3 MICROBIOLOGÍA DE LAS LAGUNAS DE ESTABILIZACIÓN

Las lagunas de estabilización son ecosistemas, dentro de los cuales se llevan a cabo un sin fin de interacciones microbianas complejas. Este sistema se fundamenta en el desarrollo de comunidades microbianas de naturaleza heterogénea, sujetas a condiciones ambientales cambiantes como el pH, temperatura, viento, etcétera (Avelar *et al.*, 2001; Masseret, 2000; Metcalf y Eddy, 1991; Oufdou y Mezriouri *et al.*, 2000). Los organismos encontrados en las lagunas de estabilización son tanto microscópicos como macroscópicos, cuya supervivencia y proliferación se establece debido a las interacciones interespecíficas y con el ambiente circundante, el cual influye directamente en la eficiencia del sistema (Avelar *et al.*, 1994; Masseret, 2000; Oufdou y Mezriouri *et al.*, 2000). Los principales grupos de organismos presentes en estos cuerpos de agua son bacterias, algas, hongos protozoarios, rotíferos, crustáceos y larvas de insectos. Las bacterias y las algas (procariotes

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

y eucariotes) de estos sistemas están directamente relacionadas con la remoción de los desechos contenidos en el agua (Alba, 2000; Álvarez, 1991; Azov, 1982; Martínez y Avendamo, 1987; Oufdou *et al.*, 2000).

#### ❖ BACTERIAS

Las bacterias son las principales responsables de la remoción de la materia orgánica debido a su gran versatilidad metabólica y de adaptación, lo cual les permite degradar una gran variedad de compuestos. Son los organismos más simples encargados de la degradación de materia orgánica, logrando su incorporación a la dinámica de los ciclos biogeoquímicos; predominando ampliamente sobre los protozoarios, hongos y otras formas de vida (Alba, 2000; Álvarez, 1991; Avelar *et al.*, 1994; Oufdou *et al.*, 2000).

#### ❖ ALGAS

Las algas microscópicas son organismos unicelulares, autótrofos y fotosintéticos. Pueden ser procariotes (cianobacterias principalmente) o eucariotes tales como *Nitzschia linearis*, *N. dissipata*, o *Navicula rynocephala* (Alba 2000). Juegan un papel muy importante para el proceso biológico de las lagunas de estabilización, pues son responsables de la producción de oxígeno molecular, elemento básico y fundamental para que las bacterias aerobias lleven a cabo la oxidación bioquímica de la materia orgánica. La presencia de algas en niveles adecuados, asegura el funcionamiento del proceso aerobio en las lagunas. Si la población de estos microorganismos disminuyera significativamente, se rompería el equilibrio entre los procesos aerobio y anaerobio; llegando a predominar este último. En tal situación la eficiencia del sistema se reduciría significativamente (León, 1995; Oufdou *et al.*, 2000).

## ❖ HONGOS

Microorganismos eucariotes, heterótrofos, no fotosintéticos; hay unicelulares (levaduras) y multicelulares (hongos filamentosos). La mayoría de los hongos son aerobios estrictos, metabolizan el mismo material que las bacterias; pero se desarrollan en condiciones ambientales diferentes. Algunos pueden crecer con poca humedad y en general toleran un pH más bajo. El pH óptimo en el que se desarrollan la mayoría de las especies es de 5.6 y el intervalo en el que pueden crecer se extiende desde 2 a 9 (Avelar *et al.*, 1994; Oufdou *et al.*, 2000). Los hongos tienen una demanda baja de nitrógeno, necesitan aproximadamente la mitad de lo que requieren las bacterias y sobreviven a pH bajo, lo cual los hace útiles en el tratamiento de algunos efluentes industriales (Metcalf y Eddy, 1991).

## ❖ PROTOZOOARIOS

Los protozoarios son organismos móviles microscópicos, la mayoría son heterótrofos aerobios, aunque algunos son anaerobios. Muchos tipos de protozoarios consumen bacterias como fuente de energía. Actúan como purificadores de los afluentes de procesos biológicos de tratamiento de aguas residuales, al consumir bacterias y partículas orgánicas (Avelar *et al.*, 1994; Oufdou *et al.*, 2000). Únicamente se desarrollan en sistemas estables en los que el suplemento de oxígeno excede la demanda. Por esta razón, se consideran indicadores de alto grado de eficiencia del tratamiento biológico aerobio (Espino, 1984; Metcalf y Eddy, 1991).

### 1.2.4 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LAS LAGUNAS DE ESTABILIZACIÓN

Como se mencionó anteriormente, las lagunas de estabilización son un sistema económico y eficiente para el tratamiento de aguas residuales, el cual presenta varias ventajas sobre otros sistemas de tratamiento, los cuales se desglosan a continuación:

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

➤ VENTAJAS

- a) La inversión necesaria para construir una laguna de estabilización es considerablemente menor que la requerida para cualquier otro sistema de tratamiento secundario de las aguas residuales (Álvarez, 1991; Charlton 1997; Espino, 1984; León, 1995; Mayo, 1996).
- b) La construcción de las lagunas de estabilización es muy simple; no requiere de tecnología avanzada, no se necesitan partes o componentes de importación, la maquinaria y equipo empleado en la construcción de estos sistemas es de tipo convencional (Álvarez, 1991; Charlton 1997; Espino, 1984; León, 1995; Mayo, 1996).
- c) Los costos de operación y mantenimiento de las lagunas de estabilización se calculan entre el 10 y el 50% respecto a los sistemas de tratamiento convencionales (Álvarez, 1991; Charlton 1997; Espino, 1984; León, 1995; Mayo, 1996).
- d) La operación de las lagunas es muy simple y no se requiere personal altamente calificado (Álvarez, 1991; Charlton 1997; Espino, 1984; León, 1995; Mayo, 1996).
- e) En cuanto al mantenimiento requerido, es esporádico (incluso de varios meses) y se lleva a cabo en forma sencilla, básicamente consiste en remover los lodos sedimentados en el fondo de la laguna (Álvarez, 1991; Charlton 1997; Espino, 1984; León, 1995; Mayo, 1996).
- f) Existe una excelente reducción de microorganismos patógenos (coliformes y no enterobacterias) (Álvarez, 1991; Charlton 1997; Espino, 1984; León, 1995; Mayo, 1996).
- g) Son capaces de tolerar aumentos bruscos de cargas orgánicas o hidráulicas (Álvarez, 1991; Charlton 1997; Espino, 1984; León, 1995; Mayo, 1996).
- h) Pueden operar sin un tanque de sedimentación primario, pero esto trae como consecuencia que el mantenimiento sea más frecuente (Álvarez, 1991; Charlton 1997; Espino, 1984; León, 1995; Mayo, 1996).
- i) Diseñadas y operadas adecuadamente, las lagunas de estabilización generan eficiencias muy altas, equivalentes a las de los procesos de lodos activados

convencionales, en la remoción de SS y DBO (Álvarez, 1991; Charlton 1997; Espino, 1984; León, 1995; Mayo, 1996).

No obstante sus notables ventajas, las lagunas de estabilización adolecen de severas desventajas. Las más importantes se enumeran a continuación:

➤ DESVENTAJAS

- a) Tiempos de retención altos debido a la baja concentración de biomasa activa; por lo que necesitan grandes superficies de terreno (Álvarez, 1991; Belhateche, 1995; León, 1995; Mayo, 1996; Metcalf y Eddy, 1991; Oakley *et al.*, 2000; Shin y Polprasert, 1987; Soler *et al.*, 2000).
- b) No existen criterios de diseño confiables (Álvarez, 1991; Belhateche, 1995; León, 1995; Mayo, 1996; Metcalf y Eddy, 1991; Oakley *et al.*, 2000; Shin y Polprasert, 1987; Soler *et al.*, 2000).
- c) Su eficiencia es altamente sensible a factores climáticos (particularmente a la temperatura y a la intensidad de la luz solar) (Álvarez, 1991; Belhateche, 1995; León, 1995; Mayo, 1996; Metcalf y Eddy, 1991; Oakley *et al.*, 2000; Shin y Polprasert, 1987; Soler *et al.*, 2000).
- d) Sus efluentes suelen tener elevadas concentraciones de algas (Álvarez, 1991; Belhateche, 1995; León, 1995; Mayo, 1996; Metcalf y Eddy, 1991; Oakley *et al.*, 2000; Shin y Polprasert, 1987; Soler *et al.*, 2000).
- e) Pueden producir malos olores y contribuir a la propagación de moscas y mosquitos (Álvarez, 1991; Belhateche, 1995; León, 1995; Mayo, 1996; Metcalf y Eddy, 1991; Oakley *et al.*, 2000; Shin y Polprasert, 1987; Soler *et al.*, 2000).
- f) Las lagunas son también muy susceptibles al arrastre de la biomasa (“lavado”) durante las tormentas (Álvarez, 1991; Belhateche, 1995; León, 1995; Mayo, 1996; Metcalf y Eddy, 1991; Oakley *et al.*, 2000; Shin y Polprasert, 1987; Soler *et al.*, 2000).

### 1.2.5 ENFOQUES PROPUESTOS PARA SUBSANAR LAS PRINCIPALES DEFICIENCIAS DE LAS LAGUNAS DE ESTABILIZACIÓN

- Optimización del volumen útil del reactor por medio de un diseño hidráulico adecuado, de manera que el influente se distribuya lo más uniformemente posible y el patrón de flujo minimice los espacios muertos (Mara, 1987; Muttamara y Puetpaiboon, 1997; Pearson y Mara, 1989; Zanotelli *et al.*, 2002).
- Implementación de verdaderos trenes de tratamiento con base en lagunas de estabilización. Este enfoque propone diseñar una serie de lagunas pequeñas, cada una especializada en la remoción de una clase de contaminantes específicos; en lugar de construir grandes lagunas con la esperanza de que lo remuevan todo (Pearson y Mara, 1987).
- Desarrollo de lagunas anóxicas. Esta propuesta cuestiona la concepción tradicional de lagunas facultativas y sugiere la posibilidad de incrementar significativamente la carga orgánica recomendada, manteniendo tasas de remoción aceptables y sin grandes problemas de generación de olores. De esta manera se pretende reducir el tamaño de la laguna y sus necesidades de terreno (Almasi y Pescod, 1996; Houghthon y Mara, 1992; Pescod, 1996).
- Lagunas anaerobias profundas, de hasta 13 metros, operando en lote. Este enfoque busca reducir las necesidades de terreno y las pérdidas de agua por evaporación (Soler *et al.*, 2000).
- Producción de proteínas de origen unicelular (microalgas), para alimentación de ganado, en lagunas de maduración de alta tasa. Esta propuesta busca transformar una desventaja operacional en una ventaja económica (Oswald, 1995).
- Incremento en la concentración de biomasa en las lagunas, promoviendo el desarrollo de biopelículas. La concentración de biomasa en las lagunas es muy pequeña, aproximadamente 50 veces inferior que en otros reactores biológicos, esta característica implica una tasa de remoción muy baja, tiempos de residencia prolongados, y la necesidad de un reactor muy grande. Varias de las principales desventajas de esta tecnología, tales como el requerimiento de grandes extensiones de terreno, difícil control, poca confiabilidad, versatilidad deficiente, y alta

sensibilidad a factores climáticos, tienen su origen en la baja concentración de biomasa en el reactor. El desarrollo de biopelículas ha logrado incrementar la tasa de remoción de DQO hasta en un 20% (Baskaran *et al.*, 1992; Muttamara y Puetpaiboon, 1997; Polprasert y Agarwalla, 1994; Polprasert y Charnpratheep, 1989; Polprasert y Sookhanich, 1995; Rakkoed *et al.*, 1999; Reynolds, 1975; Shin y Polprasert, 1987; Zhao y Wang, 1996;). Sin embargo, el engrosamiento excesivo de las biopelículas y la acumulación de escorias en las superficies activas, con las consecuentes limitaciones en la transferencia de masa, han obstaculizado el desarrollo e implementación de éste método de enriquecimiento (Baskaran *et al.*, 1992; Muttamara y Puetpaiboon, 1997; Polprasert y Agarwalla, 1994; Polprasert y Charnpratheep, 1989; Polprasert y Sookhanich, 1995; Rakkoed *et al.*, 1999; Reynolds, 1975; Shin y Polprasert, 1987; Zhao y Wang, 1996;).

- Recientemente se ha propuesto como una alternativa para aumentar la cantidad de biomasa activa en las lagunas de estabilización facultativas, el enriquecimiento con bioflóculos. Adicionando biomasa desarrollada en un sistema de lodos activados y aclimatándolos a las condiciones de las lagunas de estabilización. Estos sistemas han mostrado que el enriquecimiento con bioflóculos aumenta la eficiencia de las lagunas para remover altas cargas de materia orgánica, fenol y anilina (Avelar *et al.*, 2001; 2003; Ramos *et al.*, 2005).

## II. ANTECEDENTES

La determinación de la especiación química de metales en aguas residuales contaminadas es esencial para el desarrollo de acciones para la remoción de los metales y su posible reutilización. La movilización de metales pesados en el medio ambiente debido a las actividades industriales es un serio problema debido a la toxicidad de estos metales para los humanos y demás formas de vida. Los metales se dividen en cuatro grandes categorías, en base a sus propiedades químicas, efectos fisiológicos y sus aplicaciones, como son: metales pesados tóxicos, metales estratégicos, metales preciosos y radionúcleos. La remoción de metales pesados tóxicos y radionúcleos de aguas industriales es esencial para

el mantenimiento del control de la contaminación industrial. Los metales pesados el mercurio, el plomo y el cadmio, son llamados el gran trío debido a su mayor impacto en el ambiente. Muchas industrias, especialmente las de manufactura de baterías y pigmentos liberan metales pesados como plomo, cadmio y zinc en aguas residuales. El plomo y el cadmio, junto con el cromo son potentes nefrotóxicos. El cromo en su forma hexavalente (cromato) es altamente tóxico y es un conocido carcinogénico y mutagénico para organismos vivos, además también es teratogénico en mamíferos, incluyendo a los humanos. Se han encontrado cantidades elevadas de cromato en aguas superficiales que reciben efluentes industriales. Estudios recientes muestran que ciertas especies de bacterias son capaces de transformar el cromo hexavalente a una especie menos tóxica y menos soluble como es el cromo trivalente. Existen bacterias que pueden protegerse de sustancias tóxicas en el medio ambiente por transformación de compuestos tóxicos por medio de la oxidación, reducción o metilación en más volátiles, menos tóxicas o formas precipitables. Se cree que la reducción enzimática de Cr (VI) a Cr (III) es uno de los mecanismos de defensa utilizados por los microorganismos que viven en suelos contaminados con Cr (VI); la reducción de a Cr (III) puede precipitar al cromo como hidróxido en un rango de pH neutral (Essa, *et.al.*,2002, Evans, *et.al.*, 1997, Drogui P., *et al*, 2005, Leppard G., *et al*, 2003, Nancharaiah *et al*, 2010; Puranik y Paknikar, 1999).

El mercurio es uno de los metales pesados más tóxicos por su gran uso industrial, actividades mineras y su uso en agricultura. El mercurio se puede unir a grupos sulfhidrilos de enzimas y proteínas inactivando su función vital. Estos usos han incrementado la contaminación con este metal. Y una vez que son descargados al medio ambiente los sedimentos persisten por muchas décadas. Su forma altamente tóxica (metilmercurio) es absorbida por organismos acuáticos, biomagnificándose a través de la cadena alimenticia. El envenenamiento por mercurio produce enfermedades crónicas o incluso la muerte. Es por eso que las descargas industriales de mercurio al ambiente deben de ser tratadas eficientemente. Bacterias resistentes a mercurio encontradas en ambientes con altos contenidos de este metal pueden reducir el  $Hg^{2+}$  a  $Hg^0$  vía enzimas mercurio reductasas. El acomplejamiento del  $Hg^{2+}$  también juega un rol importante en el transporte y mutilación del mercurio en ambientes acuáticos, investigaciones previas sugieren que la movilización del  $Hg^{2+}$  en los cuerpos de agua es potenciada por el acomplejamiento con materia orgánica

disuelta y por la asociación con material coloidal. Por lo tanto, la absorción de mercurio por microorganismos depende de la concentración de las especies biodisponibles de mercurio (Essa, *et.al.*,2002, Drogui P., *et al*, 2005, Hsu y Sedlar, 2003 Leppard G., *et al*, 2003, Puranik y Paknikar, 1999, Wagner *et.al.*,2000).

Por otro lado las tecnologías convencionales para la remoción de metales de aguas contaminadas como la oxidación química, la reducción, precipitación con agentes químicos flocculantes, adsorción mineral, solidificación por electrolisis y el intercambio iónico son algunos de los procesos fisicoquímicos utilizados para la remoción de metales pesados de las aguas residuales. La aplicación de estos procesos en algunos casos es restringido porque se tienen dificultades técnicas y económicas. La exposición a metales tóxicos altera la composición de las comunidades microbianas seleccionándose colonias resistentes a metales, esto sugiere que la exposición a metales indirectamente selecciona bacterias resistentes a estos tóxicos. La biomasa de una gran cantidad de microorganismos incluyendo bacterias, hongos, levaduras y algas, incluyendo biomasa viva o muerta, son capaces de adsorber o acumular iones metálicos debido a la atracción de los metales por la pared celular o por el mecanismo de absorción intracelular. Debido al gran potencial que tiene la biomasa como bioadsorbente, se ha puesto gran atención por parte de muchos investigadores en las recientes décadas realizando investigaciones sobre bioadsorción de metales pesados, esta tecnología puede llegar a reemplazar los procesos convencionales para la remediación de la contaminación metálica en aguas residuales.(Chang y Huang, 1998, Michel Z.C. *et.al.*,1997, Schneegurt *et.al*, 2001, Stepanauskas *et.al.*, 2005).

Investigadores del instituto nacional de investigaciones científicas de Québec, Canadá han desarrollado e innovado procesos bioquelantes para remediar lodos de aguas residuales, encontrando que el principal microorganismos involucrado en este proceso de bioquelación es el *Acetobacillus ferrooxidans*, una bacteria quimioautótrofa. Por otro lado, una bacteria marina identificada como *Bacillus thuringiensis* cepa DM55 mostró una resistencia múltiple a metales. Estudios de microscopía revelan que esta cepa puede segregar en la pared celular polímeros aniónicos que pueden inmovilizar cationes, como el  $Cd^{2+}$ . Aparentemente la resistencia y bioadsorción a  $Cd^{2+}$  puede ser inducida o coincidente. La remoción biológica de metales (bioadsorción) ha mostrado ventajas sobre los métodos convencionales, por ejemplo este proceso no produce lodos químicos y puede ser altamente

selectivo, más eficiente, fácil de operar y presentar ventajas económicas para grandes volúmenes de aguas residuales con concentraciones bajas de metales (Drogui P., *et al*, 2005, Helow *et.al.*, 2000, Leppard G., *et, al*, 2003, Puranik y Paknikar, 1999).

El proceso de remoción de metales basado en propiedades bioadsorbentes de biomasa microbiana puede ser utilizado para la remoción de metales de aguas residuales. Mecanismos como el acomplejamiento, el intercambio iónico, adsorción, Quelación y microprecipitación pueden ser sinérgicamente o independientemente involucrados en la bioadsorción de metales. Varios tipos de biomasa, incluyendo la biomasa microbiana han sido bien estudiados y documentados para remover agentes metálicos (Drogui P., *et al*, 2005, Leppard G., *et, al*, 2003, Puranik y Paknikar, 1999).

Como una de las alternativas más eficientes para aumentar la biomasa activa en las lagunas de estabilización y así disminuir las desventajas que presentan estos sistemas, recientemente se ha propuesto el uso de bioflóculos, comunidades de microorganismos adaptadas para la remoción de altas cargas de materia orgánica, así como para la remoción de xenobióticos diversos (Alba 2000; Avelar *et al.*, 2001; 2003; Ramos *et al.*, 2005).

Este enriquecimiento con bioflóculos consiste en la adición de lodos activados provenientes del sedimentador secundario de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales a las lagunas, seguido de una aclimatación apropiada de esta biomasa adicional. Los lodos activados están formados por comunidades microbianas derivadas de aguas residuales altamente concentradas en biomasa.

El resultado del enriquecimiento de las lagunas de estabilización con bioflóculos, es la formación de un lecho de bioflóculos sedimentados (comunidades microbianas sedimentadas) con una actividad incrementada grandemente si es comparada con la desarrollada por la biomasa suspendida. Este enriquecimiento produce aumento considerable en la tasa de remoción de estos sistemas, con respecto a las lagunas tradicionales: Incrementos mayores al 100% para la remoción de la materia orgánica común (Avelar *et al.*, 2001); de 200 a 500% en la depuración de fenol (Avelar *et al.*, 2002; Ramos *et al.*, 2005) y de alrededor del 700% para la remoción de anilina (Ramos, 2003).

Otros tóxicos probados en las lagunas enriquecidas con bioflóculos son los metales pesados (Prieto, 2005). Los resultados obtenidos muestran que la resistencia de estos sistemas a metales como el cromo se incrementa significativamente. Las eficiencias en la

reducción de cromo VI a cromo III fueron constantes entre el 99 y 100%; así como un incremento en la remoción de cromo total del 100% con respecto a los sistemas tradicionales (Prieto, 2005).

Además de las lagunas de estabilización enriquecidas con bioflóculos, se han probado otros sistemas biológicos de baja tecnología, como lagunas de estabilización normales y pantanos artificiales o humedales (“wetlands”) para la depuración de metales pesados a bajas concentraciones, del orden de microgramos por litro (Crites *et al.*, 1997; Gadd y White, 1993; Michalakos *et al.*, 1997; Polprasert y Charnpratheep, 1989; Toumi *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 1996). En contraste, las lagunas de estabilización enriquecidas con bioflóculos fueron empleadas para la remoción de cromo y cadmio en el orden de los miligramos por litro, superiores 1000 veces a lo antes reportado en la literatura (Prieto, 2005).

## 2.1 MICROORGANISMOS RESISTENTES A METALES PESADOS

La gran capacidad de los microorganismos para adaptarse a condiciones adversas los hace aptos para usarse en biorremediación tanto de sólidos como líquidos. En la actualidad se han descubierto y aislado una gran cantidad de microorganismos resistentes a metales pesados en zonas donde estos elementos se encuentran en niveles elevados de contaminación. Algunos de ellos son: *Pseudomonas pseudoalcaligenes*, *Micrococcus luteus*, *Rhodotorula rubra*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. cepacia*, *Sphaeromonas paucimobillis*, *Bacillus pumilus*, *P. aeruginosa*, *P. putida*, *Candida albicans*, *Achromobacter eurydice*, *Aeromonas dechromatica*, *Agrobacterium radiobacter*, *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Enterobacter cloacae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Micrococcus roseus*, *Ralstonia metallidurans*, *P. dechromaticans*, *P. fluorescens*, *P. chromatophila*, *Xanthomonas axonopodis*, entre otros (Andreas E. *et al.*, 2004; Jun Ye *et al.*, 2004; Leung *et al.*, 2000; Mergeay *et al.*, 2003; Rodrigue A. *et al.*, 2005; Rossbach S. *et al.*, 2000; Wang 2000).

## 2.2 MECANISMOS DE REMOCIÓN DE METALES PESADOS QUE IMPLICAN LA PARTICIPACIÓN DE MICROORGANISMOS.

La contaminación del ambiente con metales tóxicos y radionúcleos se debe principalmente a la industria y la agricultura. Los metales se descargan en la atmósfera, a ambientes acuáticos y terrestres, principalmente como solutos o partículas, que pueden alcanzar concentraciones elevadas, especialmente cerca del sitio de descarga. Los efectos de los metales pesados sobre los ecosistemas varían de forma considerable y repercuten en la economía y la salud pública. Entre los mecanismos moleculares que determinan su toxicidad se encuentran. el desplazamiento en el metabolismo, de iones metálicos esenciales de biomoléculas y el bloqueo de sus grupos funcionales; la modificación de la conformación activa de biomoléculas, especialmente enzimas y polinucleótidos; ruptura de la integridad de biomoléculas y la modificación de otros agentes biológicamente activos (Cañizares, 2000). Los metales pesados constituyen un grupo cercano a 40 elementos de la tabla periódica que tienen una densidad mayor o igual  $5 \text{ g/cm}^3$  (Cañizares, 2000). Debido a su movilidad en los ecosistemas acuáticos naturales y a su toxicidad para las formas superiores de vida, los iones de metales pesados presentes en las fuentes de agua superficiales y subterráneas, son considerados los contaminantes inorgánicos más importantes en el ambiente según la PNUMA y USEPA. Aún en concentraciones bajas e indetectables, su recalcitrancia y persistencia en cuerpos de agua implica su biomagnificación. Los metales pesados pueden ser detectados en su estado elemental o enlazados con varios complejos con sales. De cualquier manera, los iones metálicos no son precipitados (Cañizares, 2000; Crites, 1997).

La dinámica de los metales pesados en el medio ambiente incluye procesos microbianos como la bioprecipitación reductiva y bioadsorción. La formación de microfósiles y acumulaciones minerales, la deposición de hierro y manganeso, además de la mineralización de uranio y plata, representan algunos de los procesos microbianos de mayor importancia geoquímica (Cañizares 2000; Gadd y White 1993; Hobman *et al.*, 2000; Lovley 2000; Oremland y Stolz 2000; Southam 2000; Wang 2000).

La necesidad de remediar los sitios contaminados, ha influido en el avance del conocimiento básico sobre las interacciones ambientales entre los microorganismos y los

metales, principalmente suelo y ecosistemas acuáticos. La capacidad para inmovilizar estos tóxicos les confiere múltiples potencialidades para la depuración de sitios contaminados con ellos (Lloyd y Macaskie 2000).

Los procesos por los cuales los organismos interactúan con los metales tóxicos son diversos e incluyen reacciones redox, intercambio iónico, bioadsorción, difusión y transporte dentro de las células, unión covalente, atrapamiento de partículas, metalotioneínas, péptidos de metal gamma–glutamil cisteína, quelación, precipitación por productos excretados (e.g. oxalato, sulfuro) y formación de complejos; entre otros (Cañizares R, 2000; Gadd y White 1993; Lloyd y Macaskie 2000). A continuación se detallan algunos de los procesos realizados por los microorganismos para la biorremediación de sitios contaminados con metales:

**Bioadsorción.** El termino bioadsorción, se utiliza para referirse a la captación de metales que lleva a cabo una biomasa completa (viva o muerta). Es una interacción química de cationes metálicos, dando por resultado la formación de complejos con ligandos celulares, generalmente ubicados en las capas externas de las células microbianas (cápsula, membrana externa, espacio periplásmico, pared celular y membrana celular). Los ligandos implicados en la unión con metales incluyen grupos carboxilo, amino, imino, amida, imidazol, hidroxilo, carbonilo, fosfato, fosfonato, fosfodiéster, tioeter, sulfonato y sulfhidrilo. La biomasa de algas, bacterias y hongos tienen un gran potencial como medio adsorbente de metales. La bioadsorción normalmente incluye a cuatro procesos distintos, adsorción, quimioadsorción, intercambio catiónico y micro-precipitación (Cañizares R, 2000; Gadd y White 1993; Gadd y Sayer 2000; Lloyd y Macaskie 2000; Schiewer y Volesky 2000).

**Bioacumulación.** Asimilación celular de metales. Se ha demostrado la existencia de transporte activo hacia el interior de las células para la mayoría de los metales con importancia fisiológica. Algunos metales pesados pueden emplear estos mismos mecanismos para penetrar a las células. Una vez dentro de la célula, los metales tóxicos son secuestrados por metalotioneínas (polipéptidos de bajo peso molecular ricos en cisteína) o ser segregados en vacuolas (Gadd y White 1993; Lloyd y Macaskie 2000).

**Biotransformación.** En este tipo de procesos, los microorganismos catalizan, por vía enzimática, la transformación de metales tóxicos en formas menos solubles o volátiles. Por ejemplo, la reducción microbiana de Cr (VI) a Cr (III), Se (VI) a Se (0), V (V) a V (III) y Au (III) a Au (0) da como resultado la precipitación del metal bajo condiciones fisiológicas. En muchos casos, el metal de alta valencia puede ser usado como aceptor final de electrones bajo condiciones anóxicas. La biometilación puede incrementar la volatilidad de los metales; esto se ha documentado en el caso de Hg, Cd, Pb, Sn, Se y Te. La reducción microbiana del Hg (II) a Hg (0) también incrementa la volatilidad del metal (Lloyd y Macaskie 2000, Hobman *et al.*, 2000).

**Bioprecipitación o biomineralización.** Formación de precipitados metálicos insolubles, vía generación microbiana de ligandos, los sulfuros, carbonatos, hidróxidos y fosfatos metálicos son muy insolubles en agua, razón por la cual forman precipitados rápidamente. La producción de estos ligandos implica un método de destoxificación desarrollado por los microorganismos (principalmente bacterias) y tienen un gran potencial en la depuración de ecosistemas acuáticos. La precipitación de metales en forma de sulfuros, a partir de la generación de ácido sulfhídrico por bacterias sulfato reductoras, se ha utilizado ampliamente en los últimos años (Lloyd y Macaskie 2000, Southam 2000).

**Bioquimioadsorción.** Inclusión, por intercambio catiónico, de un catión metálico dentro de la estructura cristalina de un material previamente depositado. El depósito primario actúa como foco de nucleación o cristal hospedero para la subsiguiente deposición del metal de interés. De esta forma, el depósito primario actúa acelerando las reacciones de precipitación del metal de interés. El depósito primario se forma inicialmente por las rutas de biomineralización (generalmente sulfuro o fosfato) descritas en el apartado anterior (Lloyd y Macaskie 2000).

**Biodegradación de agentes quelantes sintéticos.** La degradación microbiana de la porción orgánica de quelantes metálicos, formados a partir de quelantes sintéticos como el EDTA y el nitrilotriacetato (NTA), disminuye la movilidad del metal y lo transforma en un ión

metálico o en un compuesto inorgánico, facilitando su posterior eliminación por mecanismos previamente descritos (Bolton *et al.*, 2000)

Los microorganismos y sus productos pueden ser bioacumuladores muy eficientes de metales solubles y en su forma coloidal, por esto las tecnologías basadas en microorganismos ofrecen una alternativa o ayudan a las técnicas convencionales para la eliminación de metales pesados. Muchos metales pesados son esenciales para el crecimiento y el metabolismo microbiano en bajas concentraciones e.g. Cu, Zn, Mn, mientras que a otros no se les conoce función biológica como el Au, Ag, Pb y Cd. Una característica de estos metales y de los elementos relacionados es que pueden ser altamente tóxicos para las células vivas (Cañizares R., 2000). Por lo tanto, si se considera el uso de células vivas para la eliminación de metales pesados, se pensaría en una toxicidad para ellas, inactivándolas o envenenándolas. Sin embargo, las células vivas pueden presentar una amplia variedad de mecanismos para la acumulación de metales como, el transporte, la formación de complejos extracelulares, la precipitación y la quelación empleando quelantes naturales como los sideróforos (Diles *et al.*, 1999; Gupta *et al.*, 2002; Hill *et al.*, 2002). Por otro lado, la tolerancia y la resistencia a los metales pesados son propiedades que están muy distribuidas en los microorganismos de todos los grupos (Andreas E. *et al.*, 2004; Cañizares R., 2000; Jun Ye *et al.*, 2004; Leung *et al.*, 2000; Mergeay *et al.*, 2003; Rodrigue A. *et al.*, 2005; Wang, 2000).

La bioadsorción ha sido el mecanismo más utilizado en los procesos biotecnológicos para la remoción de metales pesados. Los sistemas de mayor aceptación en la actualidad incorporan las tecnologías tradicionales de adsorción e intercambio iónico, tanto en reactores de lecho empacado, como de lecho fluidizado, usando biomasa muerta de bacterias, algas y hongos como medio adsorbente (Çeçen y Gürsoy 2001; Gadd y White 2000; Schiewer y Volesky 2000; Zulfadhly *et al.*, 2001). La bioadsorción se ha extendido recientemente a la depuración de sustancias orgánicas altamente recalcitrantes (Jianlong *et al.*, 2000); e incluso se ha llegado a establecer que constituye un mecanismo importante en la depuración de materia orgánica común (Guellil *et al.*, 2001). Los sistemas basados en biomasa muerta han demostrado una elevada eficiencia y confiabilidad. Sin embargo, pese a utilizar un medio adsorbente económico y muy eficiente, lo cual representa una ventaja

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

importante en relación a los sistemas fisicoquímicos tradicionales (Aziz y Mohd 1998; Charentanyarak 1999; Ouki y Kavannagh 1999; Ricordel *et al.*, 2001), la necesidad de regenerar a la biomasa con frecuencia ubica a estas alternativas biotecnológicas en un nivel de costos elevado (Schiewer y Volesky 2000).

Recientemente ha tomado impulso la investigación sobre el uso de biomasa viva en la remoción de metales pesados. En estas condiciones, la intervención de mecanismos adicionales a la bioadsorción, especialmente biomineralización y biotransformación juegan un papel importante.

Debido a que las lagunas de estabilización facultativa enriquecidas con bioflóculos a escala laboratorio han probado ser un adecuado medio de depuración de metales pesados a altas concentraciones. Y a que los bioflóculos son comunidades microbianas adaptadas para resistir y depurar estos xenobióticos, en las cuales los organismos más importantes para la remoción de los metales pesados son las bacterias. El propósito del presente proyecto es la identificación de las principales especies bacterianas presentes en las lagunas de estabilización enriquecidas con bioflóculos, tratadas con metales pesados a altas concentraciones (Cr, Cd, Hg). Así como dilucidar los mecanismos mediante los cuales se lleva a cabo la depuración de estos contaminantes.

### III. JUSTIFICACIÓN

Los metales pesados son contaminantes importantes derivados de actividades industriales como son: minería, industria metal mecánica, galvanoplastia, industria del cemento, actividades agrícolas, entre otras. Los sistemas comunes de depuración de agua, presentan poca eficiencia en la remoción de estos contaminantes. A pesar de lo anterior, se ha demostrado que el empleo de sistemas de tratamiento de aguas residuales de baja tecnología, como son las lagunas de estabilización enriquecidas con bioflóculos para este tipo de depuración parece funcionar a escala laboratorio (Avelar *et al.*, 2001, 2002; Prieto, 2005; Ramos *et al.*, 2005).

Así, la remoción de metales pesados como el cromo, mostró incrementos significativos con respecto a los sistemas tradicionales (no enriquecidos). La remoción de

cadmio fue parecida en ambos sistemas (cerca del 90%). Sin embargo, para el mercurio la eficiencia de remoción en ambos sistemas, enriquecido y no enriquecido con bioflóculos fue baja (cerca del 40%). Este comportamiento refleja que en la remoción de estos metales están implicados diversos mecanismos desarrollados por las poblaciones microbianas que forman los bioflóculos. También refleja una sensibilidad hacia el tóxico diferente para cada metal. Una de las preguntas fundamentales que esto provoca, es saber cuáles son las causas de este comportamiento diferencial en respuesta a cada uno de los metales pesados empleados. La composición biológica de los bioflóculos podría conducir a una respuesta adecuada, también es importante explorar cuales son los mecanismos involucrados en la depuración de estos metales con la intervención de los bioflóculos.

El propósito del presente proyecto es como dilucidar los mecanismos mediante los cuales se lleva a cabo la depuración de estos contaminantes. Así como la identificación de los principales géneros bacterianos presentes en las lagunas de estabilización enriquecidas con bioflóculos, tratadas con metales pesados a altas concentraciones (Cr, Cd, Hg). Y así sustentar estas tecnologías para la biorremediación aguas residuales que contienen metales pesados.

#### **IV. HIPÓTESIS**

1. La bioadsorción y bioprecipitación constituyen los principales mecanismos de remoción de cadmio, cromo y mercurio, en las lagunas de estabilización enriquecidas con bioflóculos.
2. La Reducción de Cr (VI) a Cr (III) realizada por microorganismos presentes en las lagunas de estabilización enriquecida con bioflóculos es un mecanismo empleado por los bioflóculos para remover el cromo de solución

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
3. Existen varios géneros microbianos involucrados en la remoción de cadmio, cromo y mercurio en lagunas de estabilización enriquecidas con bioflóculos dentro de los cuales se pueden encontrar *Pseudomonas* y *Micrococcus*.

## **V. OBJETIVO GENERAL**

Determinar los principales mecanismos de remoción y los principales géneros microbianos involucrados en la depuración de cadmio, cromo y mercurio en lagunas de estabilización enriquecidas con bioflóculos.

## **VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar los principales mecanismos de remoción involucrados en la depuración de cadmio, cromo y mercurio en lagunas de estabilización enriquecidas con bioflóculos.
2. Determinar las especies microbianas reductoras de Cr presentes en las lagunas de estabilización enriquecidas con bioflóculos.
3. Identificar los principales géneros microbianos involucrados en la remoción de cadmio, cromo y mercurio en lagunas de estabilización enriquecidas con bioflóculos.

## VII. METODOLOGÍA

### 7.1 IDENTIFICACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

#### 7.1.1 Aislamiento de cepas bacterianas y caracterización bioquímica.

Se obtuvieron bioflóculos provenientes de lagunas de estabilización enriquecidas y tratadas con cadmio (107 mg/L), cromo (153 mg/L) y mercurio (100 mg/L), conjuntamente con agua residual sintética como fuente de carbono y nutrientes minerales. Preservados a  $-20^{\circ}\text{C}$  con glicerol al 60%. A partir de estos bioflóculos se realizó una prueba de viabilidad con el kit vida muerte LiveBacLight Molecular Probes (Prieto 2005) el cual muestra con fluorescencia verde las bacterias que viven y con fluorescencia roja las bacterias muertas. Para comprobar la viabilidad se realizó un una cuenta en placa de bacterias anaerobias y aerobios tanto en medio sin metal como en medios enriquecidos con cadmio, cromo y mercurio. Después se procedió al cultivo selectivo de las bacterias que forman el bioflóculo, en agar (BHI), adicionado con sales metálicas (100 mg/L). Según el procedimiento propuesto por Leung y colaboradores (2000). Dichos cultivos se incubaron a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas. Las sales que se emplearon para adicionar los medios fueron  $\text{CdCl}_2$  100 mg/L,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  100 mg/L,  $\text{HgCl}_2$  100 mg/L. Para evitar la precipitación de las sales las soluciones madre se prepararon a pH 5.

Para el aislamiento de las bacterias presentes en los bioflóculos, estos se lavaron tres veces con amortiguador salino de fosfatos, para eliminar el glicerol presente. Debido a la concentración de los bioflóculos se realizó una dilución 1:20 para proceder a la siembra. Para la selección de cepas resistentes a cada uno de los metales (Cd, Cr, y Hg), se realizaron siembras en cajas con agar infusión Cerebro Corazón (BHI) enriquecido con cada una de las sales metálicas, a una concentración de 100 mg/L; por otro lado, se realizaron al mismo tiempo siembras en cajas con agar BHI para el aislamiento de las bacterias provenientes de bioflóculos control (libres de metales). Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de la dilución y se sembró por plaqueo en caja de agar con cada metal y en caja de agar sin metal. Las cajas fueron incubadas a  $30^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. Después se seleccionaron las

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

diferentes colonias aisladas tomando en cuenta la morfología colonial, posteriormente cada colonia fue resembrada individualmente en una caja e incubadas a 30°C durante 24 h, una vez transcurrido el tiempo se les realizó tinción de Gram para evaluar su grado de pureza. Para aislar completamente las cepas bacterianas, cada colonia fue resembrada por dilución en estría hasta obtener cepas puras. Una vez aisladas las cepas y corroborado su grado de pureza, se realizó la caracterización bioquímica empleando galerías Api NE (no enterobacterias) y Api E (enterobacterias) (Biomérieux) que basa su principio en 20 pruebas bioquímicas a microescala. Los resultados fueron analizados e interpretados con el sistema Api Lab Plus (Biomérieux).

Posteriormente se confirmó o corrigió la identificación empleando técnicas de secuenciación de rRNA por PCR, utilizando los primers universales 16s (27f) y 16s (1492R). Para realizar esta técnica se realizó una extracción de ADN de cada bacteria para posteriormente amplificar un segmento con los primers antes mencionados. Una vez realizada la amplificación se mandaron secuenciar para comparar las secuencias de cada una de las bacterias con el Genbank.

## 7.2 MECANISMOS DE REMOCIÓN

Con el propósito de estudiar la contribución de los mecanismos de bioprecipitación y bioadsorción en la remoción de los metales estudiados, se tomaron muestras de sedimentos de las lagunas enriquecidas y de la laguna control no enriquecida. Se determinó la concentración de metales pesados en el sedimento completo y se procuró separar la fracción inorgánica (cristales) de la orgánica (biomasa), a fin de determinar la concentración de metales en cada una de estas dos fracciones por separado. Con el propósito de reducir la interferencia debida a la microprecipitación, la cual implica la formación de cristales microscópicos estrechamente ligados a la biomasa (dificultando la separación eficiente de las fracciones orgánica e inorgánica), las muestras fueron sometidas a sonicación (1 minuto), seguido de un tratamiento con un detergente no iónico, tritón X-100 al 0.01%, previo a la separación de cristales y biomasa por precipitación diferencial.

Se llevaron a cabo experimentos por lote (500 mL) utilizando biomasa tindalizada y sin tindalizar de las lagunas enriquecidas, con la finalidad de estudiar la importancia de los

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

mecanismos abióticos de remoción de los metales en estos sistemas. Estos experimentos se realizaron simulando las condiciones en las que fueron tratadas las lagunas de estabilización enriquecidas con bioflóculos (450 mg/L DQO y las concentraciones de metales Cd 107 mg/L, Cr 153 mg/L y Hg 100 mg/L). En estos experimentos se realizó un muestreo diario para determinar la concentración de DQO y la concentración de metales pesados durante diez días. Al término de este tiempo se alimentó nuevamente el metal en cuestión y el agua residual sintética a las concentraciones iniciales y se continuó con el muestreo durante los siguientes diez días; para finalmente realizar el mismo procedimiento por tercera vez y muestrear durante diez días más. El análisis de DQO se realizó por el método de reflujos cerrados empleando un kit de la marca Hach; este método basa su principio en la colorimetría. El análisis de los metales pesados se realizó utilizando un espectrómetro de absorción atómica en su modalidad de flama para cromo y cadmio y la modalidad de generador de hidruros para la medición del mercurio (Standard Methods, 2000). Estos experimentos se realizaron con la finalidad de determinar el factor principal de la remoción de metales pesados en estos sistemas biológicos

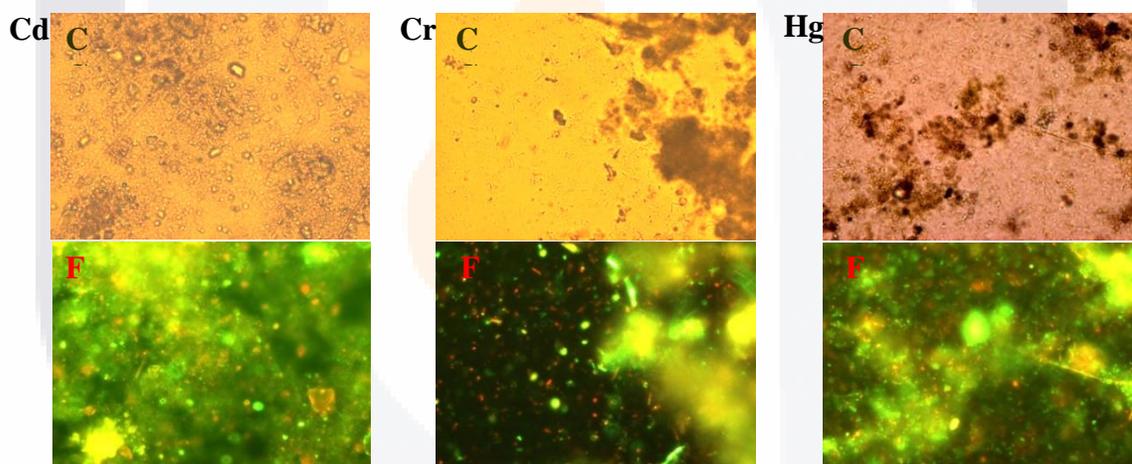
Empleando la autofluorescencia de los metales ensayados, los cuales generan una señal muy clara en el microscopio de epifluorescencia, fue posible localizar los metales inmovilizados en la biomasa de las lagunas enriquecidas con bioflóculos. Se utilizó material biológico proveniente de lagunas de estabilización enriquecidas con bioflóculos y tratadas con cadmio a 107 mg/L, cromo a 153 mg/L y mercurio a 100 mg/L; como control negativo se utilizó material biológico proveniente de laguna de estabilización enriquecida con bioflóculos y ausente de tratamiento con metales pesados. Las imágenes fueron capturadas empleando un microscopio Zeiss AxioScope 40; el análisis de las imágenes se llevó a cabo con el sistema Image Pro Plus.

Se observó la estructura de los bioflóculos empleando un microscopio electrónico de barrido. La biomasa se homogeneizó y se diluyó como ya se mencionó en el aislamiento de los microorganismos. Se tomaron 3 µl de la dilución 1:20, se colocaron en un portaobjetos se secaron al aire. Después las muestras fueron deshidratadas en alcohol con concentraciones crecientes (60 al 100%). La humedad residual se removió con CO<sub>2</sub> líquido

empleando una cámara de punto crítico (Tousimis). Las muestras deshidratadas se cubrieron con oro. Las muestras fueron observadas con el microscopio electrónico de barrido y capturadas con el software del microscopio.

### VIII. RESULTADOS

Los ensayos de viabilidad (Figura 1) mostraron que la alimentación de elevadas concentraciones de metales no provocó efectos tóxicos significativos en la biomasa de las lagunas enriquecidas con bioflóculos. En todos los casos, la viabilidad fue del orden del 90%, similar a la observada en la biomasa antes de la alimentación de los metales.



**Figura 1.** Microfotografías de bioflóculos de las lagunas enriquecidas con bioflóculos, después del tratamiento con 80.8 mg/L de Cd, 128.1 mg/L de Cr y 60 mg/L de Hg. (C): Estructura observada en microscopio de luz (400X). (F): Pruebas de viabilidad con el kit Dead/Live BactLight (Molecular Probes), observadas con epifluorescencia, filtro FITC (400X). Los microorganismos en color verde implican viabilidad, en tanto que el color rojo indica microorganismos muertos.

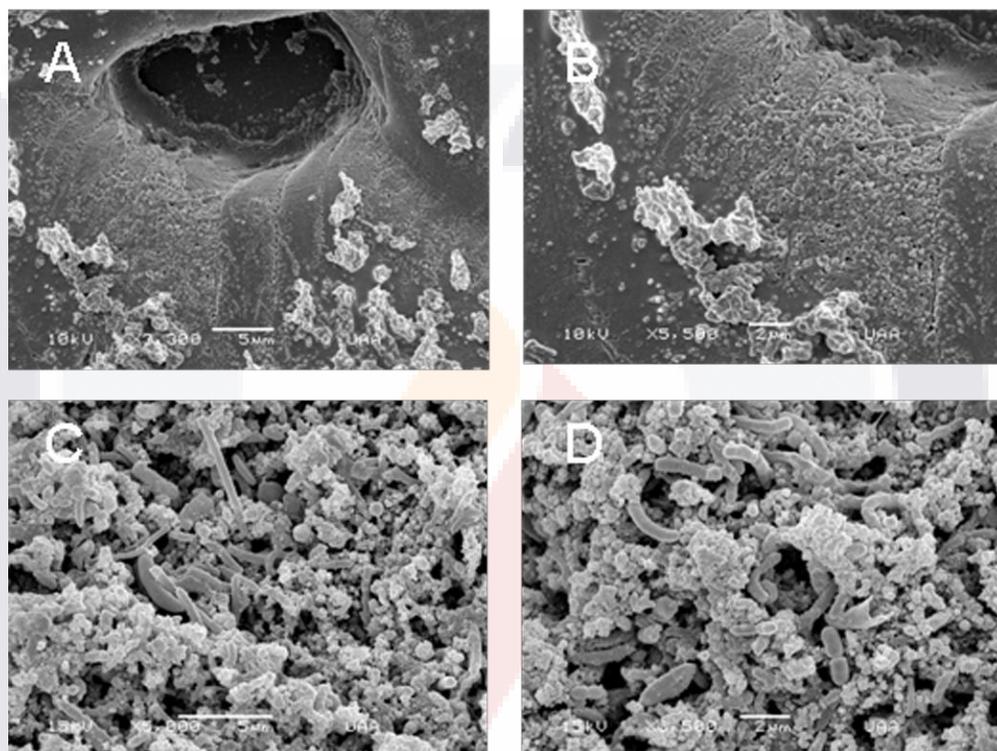
El Cuadro 1 muestra las principales cepas bacterianas aislada y caracterizadas en las lagunas enriquecidas con bioflóculos, antes y después del tratamiento con los metales pesados. Previo a la alimentación de los metales, se identificaron diez cepas bacterianas. En contraste, posterior a la alimentación con metales pesados, se identificaron sólo dos cepas

en el caso del Cd, cuatro para el Cr y tres para el Hg, siendo en la mayoría de los casos diferentes a las previamente identificadas

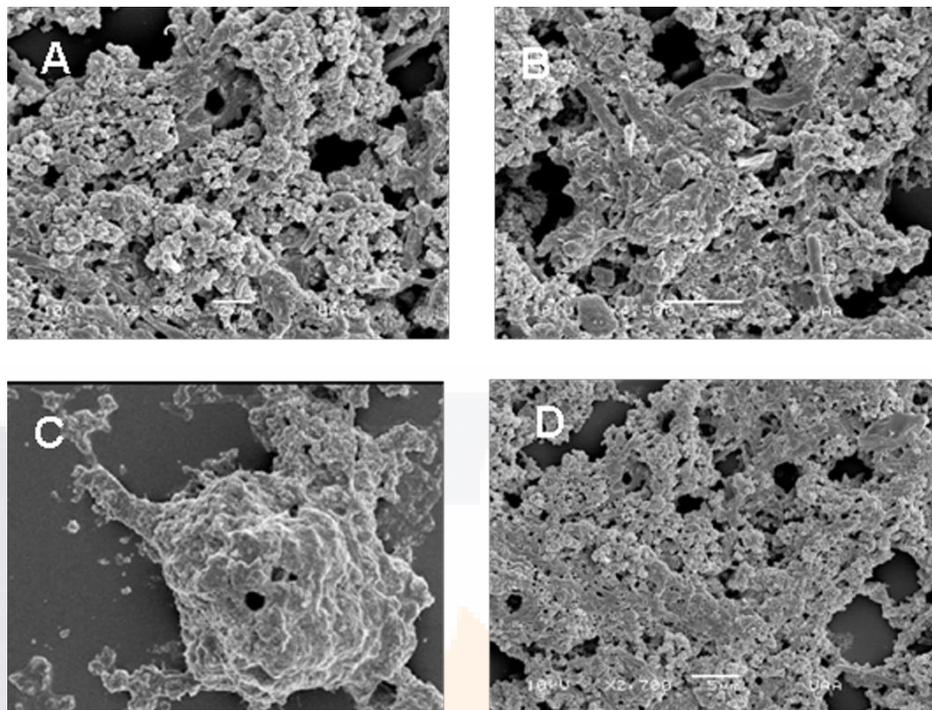
**Cuadro 1.** Principales cepas aisladas en las lagunas enriquecidas con bioflóculos. Para la identificación se emplearon ensayos bioquímicos (galerías Api NE y Api E, Biomériéux) y secuenciación de rRNA por PCR, empleando los primers universales 16s (27f) y 16s (1492R).

Tratamiento	Pruebas bioquímicas	PCR
Sin metales	<i>Staphylococcus sp</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> OTUC3
Sin metales	<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> AKR1
Sin metales	<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Aeromonas salmonicida</i> subsp. Salmonicida
Sin metales	<i>Actinobacillus noeslundii</i>	<i>Escherichia coli</i> UMN026
Sin metales	<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Enterobacter sp.</i> YRL01
Sin metales	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Sin metales	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. pneumoniae MGH 78578
Sin metales	<i>Shewanella putrefaciens</i>	<i>Bacillus sp</i> By130(A) Ydz-ds
Sin metales	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	<i>Citrobacter sp</i> I101-10
Sin metales	<i>Ewingella americana</i>	<i>Escherichia coli</i> UMN026
Cd	<i>Morganella morganii</i>	<i>Morganella morganii</i> BH-16
Cd	<i>Morganella morganii</i>	<i>Morganella morganii</i> NCTC 00235
Cr	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Acinetobacter sp</i> TPR15
Cr	<i>Ewingella americana</i>	<i>Morganella morganii</i> BH-16
Cr	<i>Morganella morganii</i>	<i>Morganella morganii</i> BH-16
Cr	<i>Actinobacillus naeslundii</i>	<i>Escherichia coli</i> UMN026
Cr	<i>Aeromonas hydrophilla</i>	<i>Escherichia coli</i> UMN026
Hg	<i>Morganella morganii</i>	<i>Escherichia coli</i> BE42
Hg	<i>Morganella morganii</i>	<i>Morganella morganii</i> BH-16
Hg	<i>Morganella morganii</i>	<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. urealyticus

Las figuras 2 y 3 muestra los estudios con microscopia electrónica de barrido en donde se puede observar que la organización de los bioflóculos es compleja y similar a la organización que presentan los microorganismos que crecen en forma de biopelículas, incluso presentan canales similares a los de las biopelículas para el paso de agua y nutrientes.



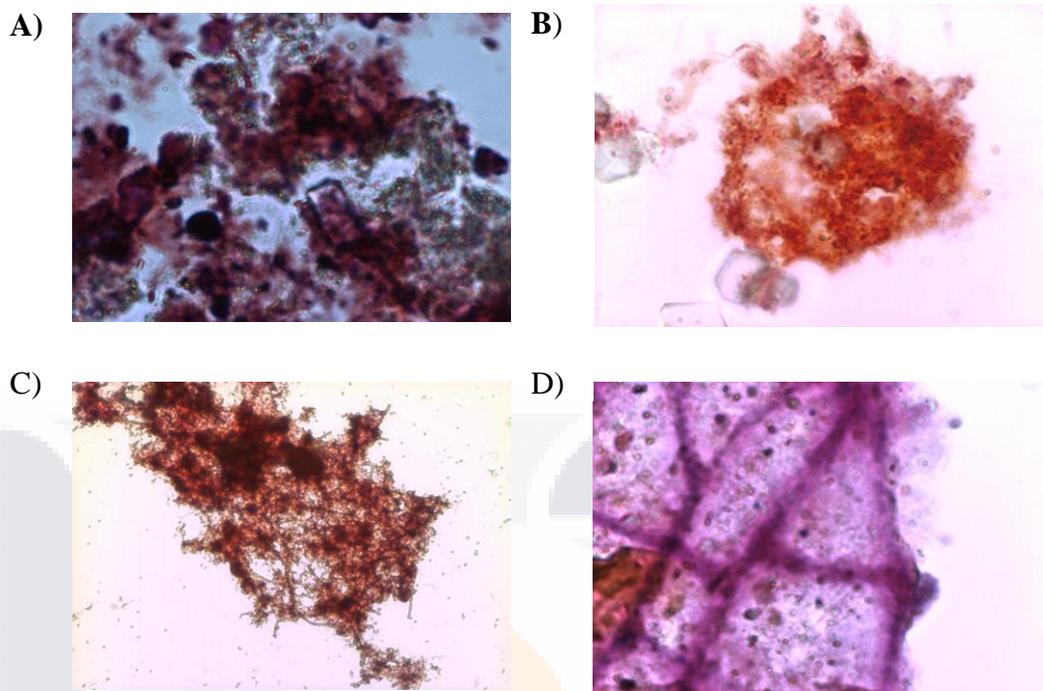
**Figura 2.** Microfotografías de bioflóculos tomadas con microscopio electrónico de barrido (A) canal de agua en la estructura de los bioflóculos, (B) se observa el crecimiento de los microorganismos presentes en los sistemas, (C y D) Estructura de biofilm, se muestran diferentes tipos de bacterias y algunos canales de agua entre ellos.



**Figura 3.** Microfotografías de bioflóculos tomadas con microscopio electrónico de barrido (A y B) muestran el crecimiento de los microorganismos, (C) muestra en primer plano la estructura de un canal de agua y (D) estructura de biofilm, se muestran diferentes tipos de bacterias y algunos canales de agua

Con el propósito de estudiar la contribución de los mecanismos de bioprecipitación y bioadsorción en la remoción de los metales estudiados, se tomaron muestras de sedimentos de las lagunas enriquecidas y de la laguna control no enriquecida. Se determinó la concentración de metales pesados en el sedimento completo y se procuró separar la fracción inorgánica (cristales) de la orgánica (biomasa), las muestras fueron sometidas a sonicación (1 minuto), seguido de un tratamiento con un detergente no iónico, tritón X-100 al 0.01%, previo a la separación de cristales y biomasa por precipitación diferencial. Se observó una mejor separación de las fracciones orgánica e inorgánica (Figura 4).

. El Cuadro 2 muestra los resultados obtenidos de esta estimación, realizada por triplicado, de los mecanismos de bioprecipitación y bioadsorción.



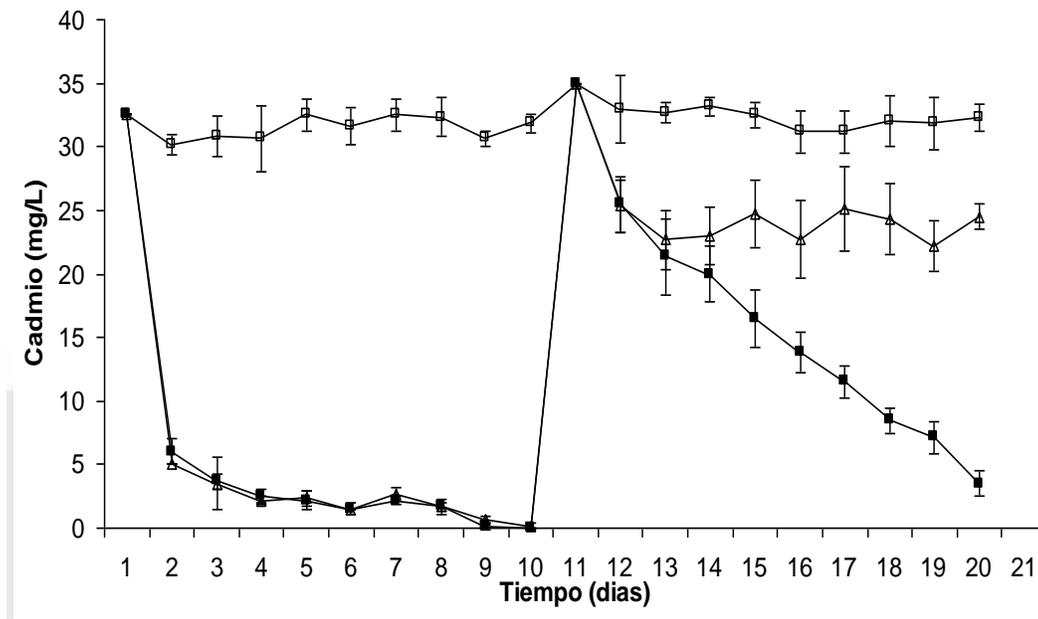
**Figura 4.** Imágenes 40X capturadas con un sistema Image Pro Plus, usando un microscopio Zeiss Axioscope 40. A) Bioflóculo con estrecha asociación entre biomasa y cristales. B) Fracción orgánica separada sin tratamiento con sonicación ni detergente. C) y D) fracciones orgánica e inorgánica, respectivamente, separadas después del tratamiento con sonicación y detergente.

**Cuadro 2.** Distribución porcentual entre las fracciones inorgánica (cristales) y orgánica (biomasa) de la concentración total de los metales pesados en los sedimentos de las lagunas.

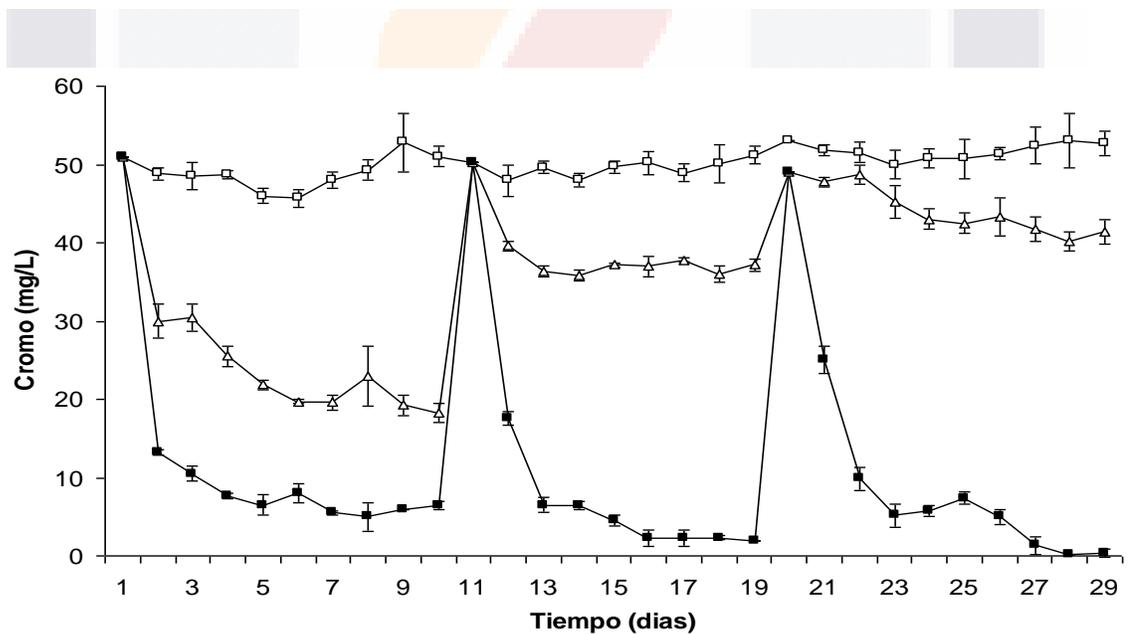
Metal	Concentración Alimentada (mg/L)	Porcentaje de la concentración total en sedimentos (%)			
		Lagunas enriquecidas con bioflóculos		Laguna control no enriquecida	
		Cristales	Biomasa	Cristales	Biomasa
Cd	14.4	67.5 ± 8.2	32.5 ± 7.7	53.6 ± 9.4	46.4 ± 8.5
	80.8	71.5 ± 4.8	28.5 ± 5.5	48.4 ± 5.3	51.6 ± 4.4
Cr	38.4	59.9 ± 3.6	40.1 ± 4.1	31.7 ± 3.5	68.3 ± 3.7
	128.1	61.5 ± 2.1	38.5 ± 2.3	45.2 ± 3.2	54.8 ± 2.7
Hg	10.4	49.3 ± 6.7	50.7 ± 7.2	38.9 ± 8.7	61.1 ± 8.9
	60.0	59.1 ± 9.4	40.9 ± 8.9	61.2 ± 8.9	38.8 ± 8.5

Debido a las dificultades técnicas para determinar con exactitud la proporción del metal inmovilizado en la biomasa y los cristales, los datos mostrados en el Cuadro 2 deben considerarse como una estimación aproximada de la importancia de ambos tipos de mecanismos de remoción mencionados.

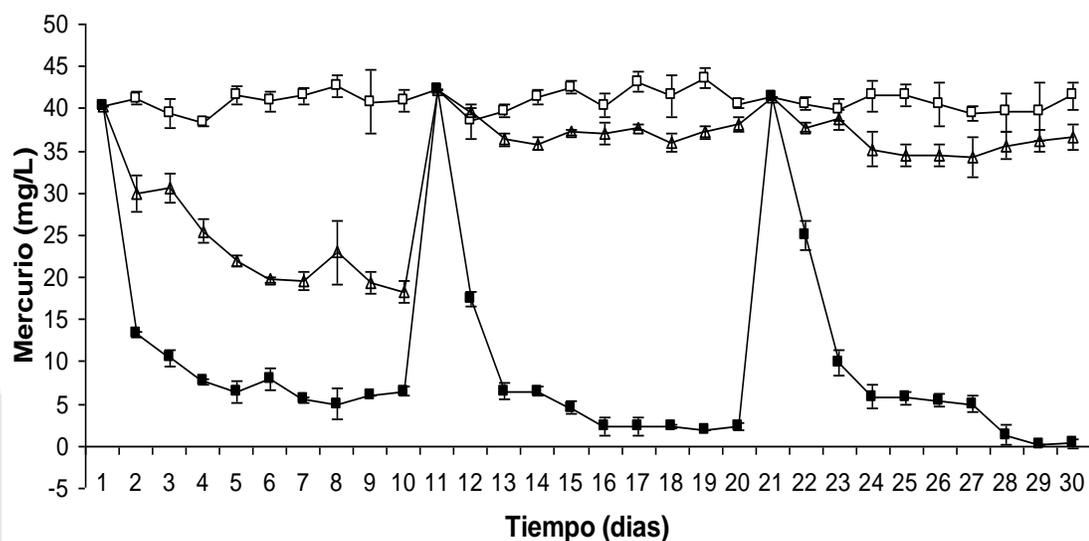
Los experimentos por lote (500 mL) utilizando biomasa tindalizada y sin tindalizar de las lagunas enriquecidas, muestran la importancia de los mecanismos abióticos de remoción de los metales en estos sistemas (Figuras 5, 6 y 7). Para los tres metales ensayados (Cd, Cr, y Hg), la biomasa tindalizada presenta una importantes remoción del metal durante el primer ensayo (entre el 50 al 98% de la remoción observada en la biomasa experimental); no obstante, al restituirse la concentración del metal y los nutrientes para realizar un segundo y tercer ensayo consecutivos con la misma biomasa, la remoción del metal por la biomasa tindalizada se redujo de manera muy importante (entre el 10 al 20% de la remoción mostrada por la biomasa experimental, sin tindalizar).



**Figura 5.** Remoción de cadmio en experimentos por lote (500 mL), empleando biomasa tomada de las lagunas enriquecidas con bioflóculos. Se restituyó varias veces la concentración del metal y de los nutrientes del agua residual. Todos los experimentos fueron por triplicado. Se muestra un experimento control sin biomasa, únicamente con agua residual sintética (□), biomasa tinalizada (△), y biomasa experimental activa (■).



**Figura 6.** Remoción de cromo en experimentos por lote (500 mL), empleando biomasa tomada de las lagunas enriquecidas con bioflóculos. Se restituyó varias veces la concentración del metal y de los nutrientes del agua residual. Todos los experimentos fueron por triplicado. Se muestra un experimento control sin biomasa, únicamente con agua residual sintética (□), biomasa tinalizada (△), y biomasa experimental activa (■).

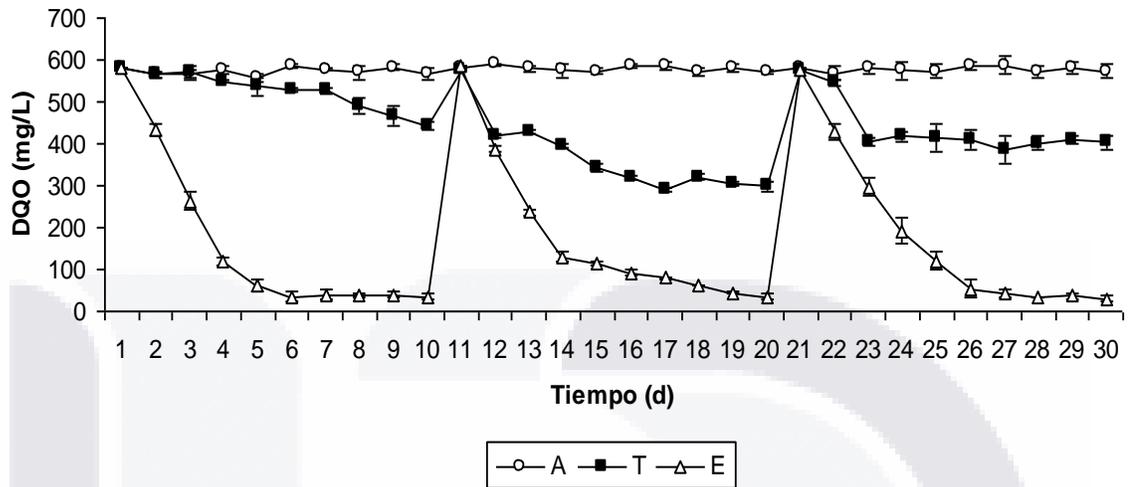


**Figura 7.** Remoción de mercurio en experimentos por lote (500 mL), empleando biomasa tomada de las lagunas enriquecidas con bioflóculos. Se restituyó varias veces la concentración del metal y de los nutrientes del agua residual. Todos los experimentos fueron por triplicado. Se muestra un experimento control sin biomasa, únicamente con agua residual sintética (□), biomasa tinalizada (△), y biomasa experimental activa (■).

La remoción de los metales se debió casi en su totalidad a la actividad de la biomasa sedimentada (bioflóculos). Experimentos por lote demostraron que la biomasa suspendida (sobrenadante de las lagunas) no contribuye de manera significativa a la remoción de los metales. En todos los casos, la remoción por los sobrenadantes fue similar al experimento control de la Figuras 5, 6 y 7.

La remoción de DQO en los experimentos por lote de la Figura 8 mostró un comportamiento muy similar al de los metales. La biomasa activa removió rápidamente la materia orgánica y mantuvo su capacidad intacta en todos los ciclos. En contraste, la biomasa tinalizada removió con rapidez cantidades significativas de materia orgánica sólo en el primer ciclo; perdiendo esta capacidad en los ciclos subsiguientes.

### Remoción de DQO

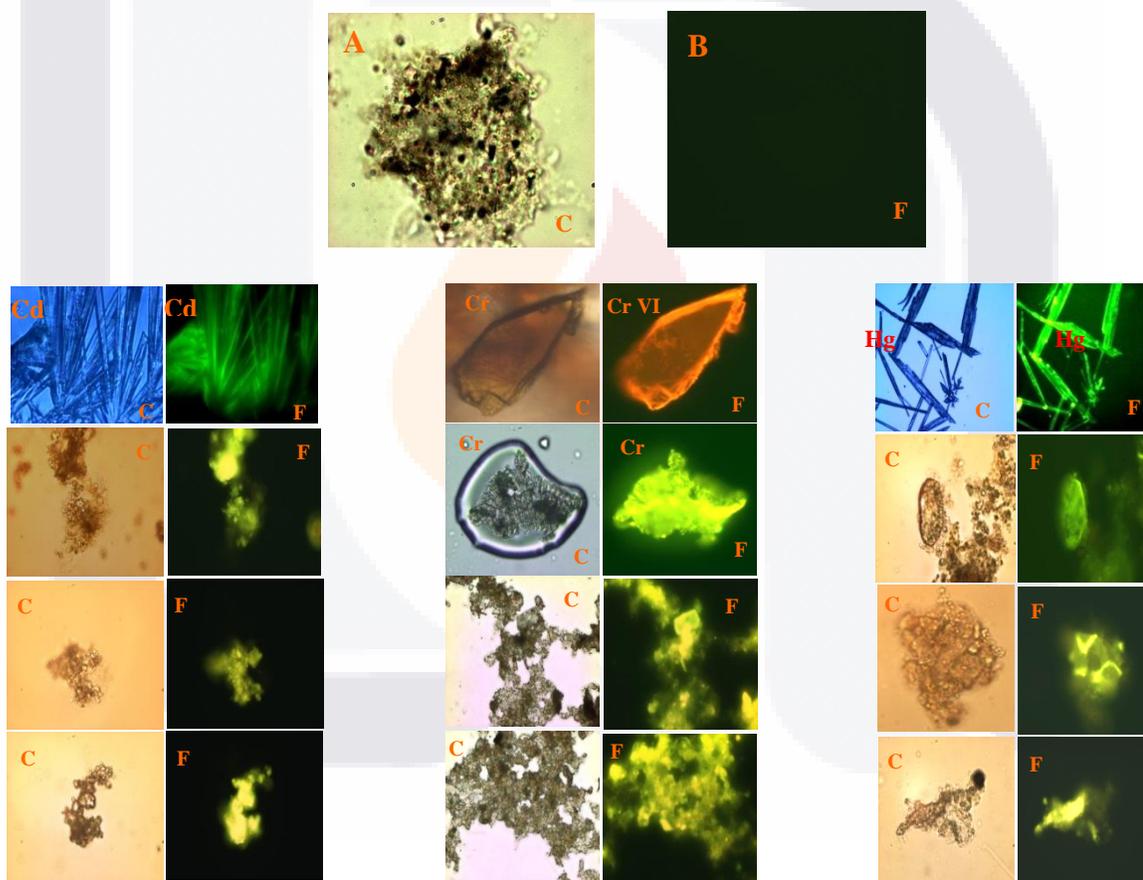


**Figura 8.** Remoción de DQO en experimentos por lote (500 mL), empleando biomasa tomada de las lagunas enriquecidas con bioflóculos. Se restituyó varias veces la concentración del metal y de los nutrientes del agua residual. Todos los experimentos fueron por triplicado. Se muestra un experimento control sin biomasa, únicamente con agua residual sintética (o), biomasa tindalizada (■), y biomasa experimental activa (△).

Empleando la autofluorescencia de los metales ensayados, los cuales generan una señal muy clara en el microscopio de epifluorescencia (Figura 9), fue posible localizar los metales inmovilizados en la biomasa de las lagunas enriquecidas con bioflóculos. Experimentos control, empleando biomasa libre de metales, no mostraron señal alguna de fluorescencia; lo cual descarta la interferencia de los componentes del agua residual sintética y de la biomasa misma. En contraste, para los tres metales estudiados (Cd, Cr y Hg) fue posible confirmar la presencia de los metales inmovilizados tanto en la biomasa como en los microcristales incorporados a los bioflóculos (Figura 9). Esta evidencia experimental confirma la inmovilización de los metales, de manera significativa, tanto por la vía de su incorporación a la biomasa (bioadsorción, bioquimioadsorción y bioacumulación), como por la vía de su incorporación a precipitados inorgánicos (mecanismos asociados con la bioprecipitación, biotransformación y biomineralización).

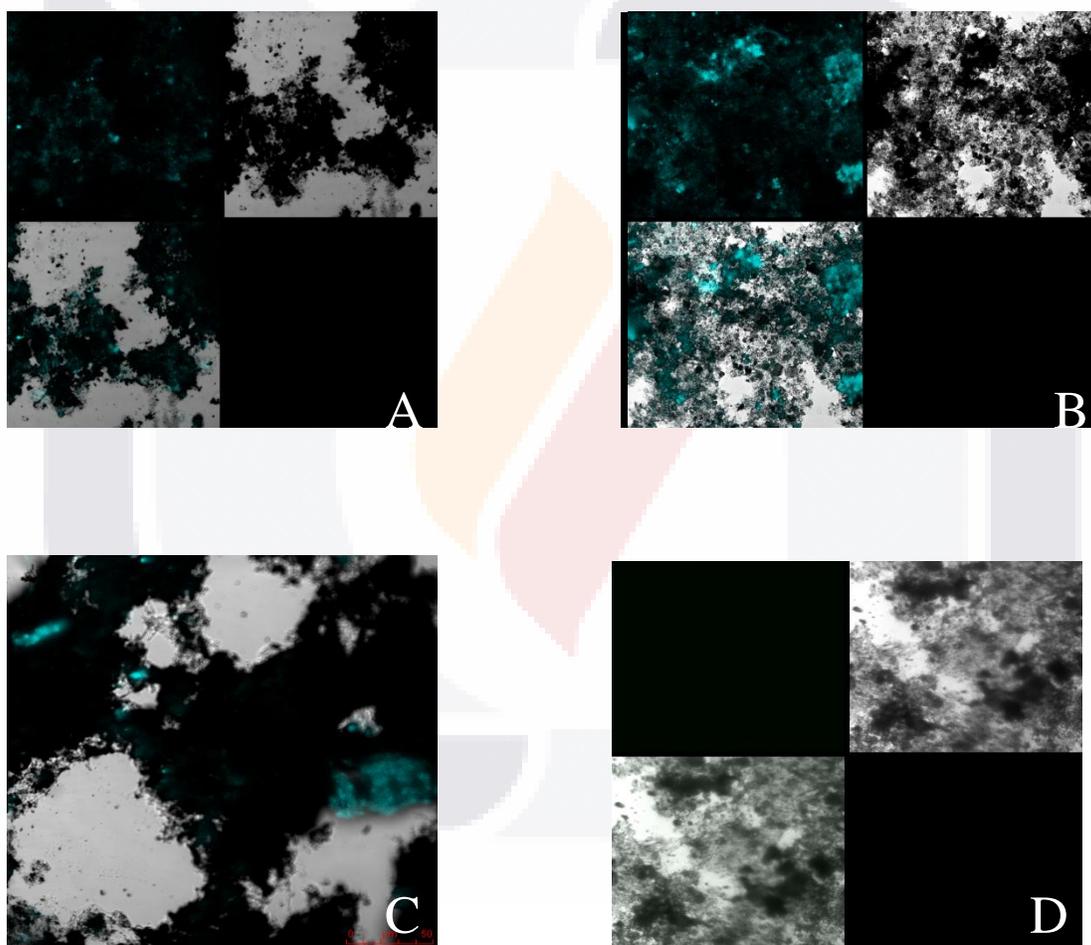
Las imágenes obtenidas en el microscopio de epifluorescencia para cadmio cromo y mercurio se analizaron empleando el programa KODAK Digital Science (20 imágenes para cada metal), con el propósito de estimar la proporción de cada metal incorporado a la

biomasa, y la incorporada a los cristales. En general, estos resultados mostraron que únicamente entre el 18 y el 31% de la fluorescencia se debía a los cristales; el resto de la fluorescencia fue generado por la biomasa. No obstante, es necesario considerar que estos datos subestiman la proporción del metal inmovilizado en los cristales, debido a la dificultad de distinguir los microcristales inmersos en el bioflóculo. En el caso del Cr, gracias a que las formas oxidada (Cr VI) y reducida (Cr III) presentan epifluorescencia a distintas longitudes de onda (en la Figura 9 pueden observarse los colores anaranjado y verde, respectivamente), fue posible observar que más del 99% del cromo inmovilizado en los sedimentos está en forma reducida (Cr III).



**Figura 9.** Microfotografías (40X) de cristales de Cd, Cr y Hg en campo claro (C) y en microscopio de epifluorescencia (F). Se observa que los metales presentan una autofluorescencia basal que permite su localización en los bioflóculos. Se muestra un control negativo de biomasa de las lagunas enriquecidas con bioflóculos antes de la alimentación de los metales, en campo claro (A) y epifluorescencia (B). Por último se presentan microfotografías (40X) de la biomasa después del tratamiento con 80.8 mg/L de Cd, 128.1 mg/L de Cr y 60 mg/L de Hg, en campo claro (C) y epifluorescencia (F), las cuales revelan la localización de los metales en la biomasa y cristales.

La figura 10 se muestran fotografías tomadas con el microscopio confocal en las cuales se observa fluorescencia en muestras de bioflóculos tratadas con mercurio (A), cadmio (B) y cromo (C). En contraste, la figura D que muestra una fotografía tomada de un bioflóculos no tratados con metales, no presenta fluorescencia. Estos resultados son similares a lo observado en el microscopio de epifluorescencia, en donde se observa el mismo patrón fluorescente en bioflóculos tratados con mercurio (Fig. 9).



**Figura 10.** Fotografías tomadas con microscopio confocal de bioflóculos tratados con mercurio (A), bioflóculos tratados con cadmio (B), bioflóculos tratados con cromo (C) y bioflóculo libre de metales (D).

## IX. DISCUSIÓN

Los ensayos de viabilidad (Figura 1) mostraron que la alimentación de elevadas concentraciones de metales no provocó efectos tóxicos significativos en la biomasa de las lagunas enriquecidas con bioflóculos. En todos los casos, la viabilidad fue del orden del 90%, similar a la observada en la biomasa antes de la alimentación de los metales. Esto sugiere que los microorganismos presentan una gran tolerancia a los metales pesados debido a que fueron desarrollando resistencia a cada uno de los metales conforme se iban incrementando la concentración de metal alimentada. Esta resistencia puede ser el resultado de que los bioflóculos presentan una estructura similar a las biopelículas, crecimiento desarrollado por los microorganismos como protección para condiciones ambientales adversas para ellos, que evita que los agentes tóxicos lleguen a los microorganismos de forma directa. Además se debe de tomar en cuenta que los microorganismos presentan una extraordinaria capacidad de adaptación a ambientes adversos como lo menciona Baker Austin (2010), que encontró biopelículas de bacterias resistentes a fierro en una mina de California, EU.

Previo a la alimentación de los metales, se identificaron diez cepas bacterianas. En contraste, posterior a la alimentación con metales pesados, se identificaron sólo dos cepas en el caso del Cd, cuatro para el Cr y tres para el Hg, siendo en la mayoría de los casos diferentes a las previamente identificadas. Esto refleja una clara selección de especies resistentes y eficientes en la remoción de altas concentraciones de los metales ensayados. En diversos estudios se ha observado que las especies seleccionadas durante la remoción de altas concentraciones de metales presentan un metabolismo sinérgico que favorece dicha remoción. Algunas de las especies seleccionadas en el presente estudio, como *E. coli*, *Acinetobacter* sp y *Morganella morganii* (Leung *et al.*, 2000) han sido reportados previamente como organismos eficientes en la remoción de metales. Al igual que ha sido reportado para biopelículas, la organización de los microorganismos en estructuras complejas, como los bioflóculos, son uno de los principales mecanismos de defensa contra efectos tóxicos. La observación de la estructura de los bioflóculos empleando un microscopio electrónico de barrido mostró notables similitudes con la conformación

presentada por las biopelículas, incluyendo canales para el paso de agua y nutrientes, con la excepción de que los bioflóculos no están adheridos a superficie alguna. Además de la selección de microorganismos eficientes y tolerantes, la estructura misma de los bioflóculos explica la resistencia a altas concentraciones de metales, mostrada por la biomasa de las lagunas enriquecidas.

Con el propósito de estudiar la contribución de los mecanismos de bioprecipitación y bioadsorción en la remoción de los metales estudiados, se tomaron muestras de sedimentos de las lagunas enriquecidas y de la laguna control no enriquecida. Se determinó la concentración de metales pesados en el sedimento completo y se procuró separar la fracción inorgánica (cristales) de la orgánica (biomasa), a fin de determinar la concentración de metales en cada una de estas dos fracciones por separado. Con el propósito de reducir la interferencia debida a la microprecipitación, la cual implica la formación de cristales microscópicos estrechamente ligados a la biomasa (dificultando la separación eficiente de las fracciones orgánica e inorgánica).

La concentración de metales en la fracción inorgánica (cristales) de los sedimentos se considera un indicador del mecanismo de bioprecipitación; en tanto que la concentración de metales en la fracción orgánica (biomasa) de los sedimentos se asume como un indicador de los mecanismos de bioadsorción y bioacumulación. Sin embargo, debido a las dificultades técnicas para determinar con exactitud la proporción del metal inmovilizado en la biomasa y los cristales, los datos mostrados en el Cuadro 2 deben considerarse como una estimación aproximada de la importancia de ambos tipos de mecanismos de remoción mencionados. Estas limitaciones no permiten explicar de forma concluyente las distintas capacidades observadas en ambos tipos de laguna para remover los metales estudiados. No obstante, pueden señalarse algunas conclusiones generales. En todos los casos se observó una concentración significativa de metales pesados (entre el 24 y el 76%) tanto en la fracción orgánica (biomasa) como en la inorgánica (cristales); lo cual implica que para todos los metales estudiados, en ambos tipos de laguna, los mecanismos de remoción asociados a la inmovilización de los metales en la biomasa (bioadsorción, bioquimioadsorción y bioacumulación), y los mecanismos asociados a la precipitación del metal (bioprecipitación, biotransformación y biomineralización), fueron ambos relevantes,

inmovilizando en los sedimentos al menos cerca de la cuarta parte del metal removido del agua residual.

En el caso del cadmio, en las lagunas enriquecidas los mecanismos de remoción asociados a la inmovilización del metal en los cristales predominaron sobre los mecanismos de inmovilización en la biomasa. En contraste, en la laguna control no enriquecida ambos tipos de mecanismos tuvieron aproximadamente la misma contribución. En relación con el cromo, la inmovilización en forma de cristales superó ligeramente a la inmovilización en la biomasa en las lagunas enriquecidas. El caso contrario se observó en la laguna control no enriquecida, en la cual dominó la inmovilización en la biomasa. Esta discrepancia entre la importancia relativa de los dos tipos de mecanismos de remoción del cromo observada en las lagunas enriquecidas y el control no enriquecido, es probablemente un factor importante que determina la mayor capacidad de las lagunas enriquecidas con bioflóculos para remover al cromo (Figura 1).

En el caso del mercurio se observó en ambos tipos de laguna un incremento en la contribución de los mecanismos de remoción relacionados con la inmovilización del metal en los cristales, en respuesta a un incremento en la concentración del mercurio en el influente. Este efecto fue más notorio en la laguna control no enriquecida.

Se llevaron a cabo experimentos por lote (500 mL) utilizando biomasa tindalizada y sin tindalizar de las lagunas enriquecidas, con la finalidad de estudiar la importancia de los mecanismos abióticos de remoción de los metales en estos sistemas (Fig. 5, 6 y 7). Para los tres metales ensayados (Cd, Cr, y Hg), la biomasa tindalizada presenta una importantes remoción del metal durante el primer ensayo (entre el 50 al 98% de la remoción observada en la biomasa experimental); no obstante, al restituirse la concentración del metal y los nutrientes para realizar un segundo y tercer ensayo consecutivos con la misma biomasa, la remoción del metal por la biomasa tindalizada se redujo de manera muy importante (entre el 10 al 20% de la remoción mostrada por la biomasa experimental, sin tindalizar). Estos resultados muestran un patrón de saturación en la biomasa tindalizada, que está ausente en la biomasa experimental activa; lo cual hace evidente que los procesos fundamentales que mantienen una elevada eficiencia en la remoción de los metales en las lagunas de estabilización enriquecidas son de naturaleza biológica.

La remoción de los metales se debió casi en su totalidad a la actividad de la biomasa sedimentada (bioflóculos). Experimentos por lote demostraron que la biomasa suspendida (sobrenadante de las lagunas) no contribuye de manera significativa a la remoción de los metales. En todos los casos, la remoción por los sobrenadantes fue similar al experimento control de las figuras 5,6 y 7. Esto descarta la contribución significativa de la precipitación química debido a los componentes del agua residual sintética, y también la bioprecipitación debida a metabolitos presentes en la masa líquida; no así la bioprecipitación a nivel de los microambientes en el interior de los bioflóculos. De acuerdo con estos resultados, en un primer momento se presenta una contribución significativa de mecanismos abióticos (probablemente adsorción) los cuales no son sostenibles en ausencia de procesos biológicos, y la capacidad de la biomasa sedimentada (bioflóculos) para remover metales se agota (biomasa tinalizada, figuras 5,6 y 7). En contraste, cuando la biomasa está activa, la intervención de factores biológicos impide la saturación, restaurando continuamente su capacidad para remover metales (biomasa experimental, figuras 5,6 y 7).

Empleando la autofluorescencia de los metales ensayados, los cuales generan una señal muy clara en el microscopio de epifluorescencia (Figura 9), fue posible localizar los metales inmovilizados en la biomasa de las lagunas enriquecidas con bioflóculos. Experimentos control, empleando biomasa libre de metales, no mostraron señal alguna de fluorescencia; lo cual descarta la interferencia de los componentes del agua residual sintética y de la biomasa misma. En contraste, para los tres metales estudiados (Cd, Cr y Hg) fue posible confirmar la presencia de los metales inmovilizados tanto en la biomasa como en los microcristales incorporados a los bioflóculos (Figura 9). Esta evidencia experimental confirma la inmovilización de los metales, de manera significativa, tanto por la vía de su incorporación a la biomasa (bioadsorción, bioquimioadsorción y bioacumulación), como por la vía de su incorporación a precipitados inorgánicos (mecanismos asociados con la bioprecipitación, biotransformación y biomineralización).

Por otra parte, la información cinética obtenida de los experimentos por lote (Figuras 5, 6 y 7), implica la intervención de mecanismos de remoción de metales que actúan muy rápidamente (la mayor parte de la remoción ocurre en el primer día) y que se saturan en ausencia de procesos biológicos (la biomasa inactiva por tinalización pierde su capacidad de remover metales después de uno o dos ciclos). Una hipótesis razonable es la

intervención dominante en primera instancia de la adsorción, conjuntamente con la liberación sistemática de los sitios activos, mediada por procesos biológicos, derivando en la disposición final del metal en precipitados inorgánicos y matrices orgánicas de alto peso molecular (lo cual explicaría el elevado nivel de inmovilización de los metales en los sedimentos de las lagunas). En la biomasa muerta (tindalizada), los sitios activos para la adsorción no son liberados, lo cual deriva en su saturación, y por tanto la pérdida de su capacidad para remover los metales. Otra hipótesis, que aunque menos probable no puede descartarse, es la intervención de la bioprecipitación, pero únicamente a nivel de los microambientes en el interior de los bioflóculos. Dado que el sobrenadante de las lagunas no mostró remoción significativa de metales, la presencia en la masa líquida de metabolitos capaces de precipitar metales se descarta. No obstante, dichos metabolitos podrían estar en los microambientes de los bioflóculos, y ser continuamente renovados por la biomasa activa. Por su parte, la biomasa muerta perdería su capacidad de remoción de metales al agotarse la reserva de dichos metabolitos.

Las imágenes obtenidas en el microscopio de epifluorescencia para cadmio cromo y mercurio se analizaron empleando el programa KODAK Digital Science (20 imágenes para cada metal), con el propósito de estimar la proporción de cada metal incorporado a la biomasa, y la incorporada a los cristales. En general, estos resultados mostraron que únicamente entre el 18 y el 31% de la fluorescencia se debía a los cristales; el resto de la fluorescencia fue generado por la biomasa. No obstante, es necesario considerar que estos datos subestiman la proporción del metal inmovilizado en los cristales, debido a la dificultad de distinguir los microcristales inmersos en el bioflóculo. Al igual que en el caso de la estimación a partir del análisis por absorción atómica de las fracciones orgánica e inorgánica (Cuadro 2), las proporciones derivadas del análisis de epifluorescencia no son lo bastante precisas para explicar las diferentes capacidades de las lagunas enriquecidas para remover los metales ensayados. En el caso del Cr, gracias a que las formas oxidada (Cr VI) y reducida (Cr III) presentan epifluorescencia a distintas longitudes de onda (en la Figura 9 pueden observarse los colores anaranjado y verde, respectivamente), fue posible observar que más del 99% del cromo inmovilizado en los sedimentos está en forma reducida (Cr III), lo cual reduce los riesgos por tener una toxicidad menor que el Cr VI. Casi todo el Cr VI alimentado a las lagunas fue inmovilizado en forma de Cr III; implicando en consecuencia

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

procesos de biotransformación del Cr. Estos resultados concuerdan con la medición de cromo VI y cromo III realizada en estudios previos con la técnica de la difenilcarbazida (Prieto 2005), que arroja resultados de que cerca del 99% del cromo alimentado como cromo VI se encuentra como cromo III.

Los resultados obtenidos con epifluorescencia se corroboraron con microscopia confocal (figura 10),

La remoción de DQO en los experimentos por lote de la Figura 8 mostró un comportamiento muy similar al de los metales. La biomasa activa removió rápidamente la materia orgánica y mantuvo su capacidad intacta en todos los ciclos. En contraste, la biomasa tinalizada removió con rapidez cantidades significativas de materia orgánica sólo en el primer ciclo; perdiendo esta capacidad en los ciclos subsiguientes. Para el caso de la remoción de materia orgánica, se descarta la hipótesis de la bioprecipitación. Por otra parte, en sistemas de lodos activados, que se basan también en la actividad de bioflóculos, varios autores han destacado la importancia de la adsorción en la biomasa, como mecanismo de remoción de primera instancia, tanto de contaminantes orgánicos como inorgánicos. Los contaminantes adsorbidos son posteriormente degradados o inmovilizados por medio de procesos biológicos. En consecuencia, a partir de la evidencia experimental y la información publicada para sistemas similares, la hipótesis más sustentada que explica la remoción de los metales pesados en las lagunas enriquecidas con bioflóculos es la adsorción de los metales en la biomasa sedimentada, como mecanismo dominante en primera instancia, seguido de procesos biológicos que liberan continuamente los sitios activos, e inmovilizan los metales adsorbidos en matrices inorgánicas y orgánicas.

## X. CONCLUSIONES

- El método de enriquecimiento con bioflóculos de las lagunas de estabilización permite incrementar la capacidad de remoción de los metales pesados y su grado de inmovilización en los sedimentos de las lagunas, derivando en sistemas más eficientes y seguros para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con estos xenobióticos.
- La hipótesis con mayor sustento que explica la remoción de los metales pesados en las lagunas enriquecidas con bioflóculos es la adsorción de los metales en la biomasa sedimentada, como mecanismo dominante en primera instancia, seguido de procesos biológicos que liberan continuamente los sitios activos, e inmovilizan los metales adsorbidos en matrices inorgánicas y orgánicas.
- Prácticamente todo el Cr VI alimentado a las lagunas fue inmovilizado en los sedimentos en forma de Cr III; implicando en consecuencia procesos de biotransformación del Cr. Dada la menor toxicidad del Cr III, la reducción del Cr VI implica también un mecanismo de detoxificación.
- La viabilidad de la biomasa no fue afectada por la alimentación de elevadas concentraciones de los metales ensayados. Sin embargo, se observó una clara selección de especies bacterianas resistentes y eficientes para la remoción de concentraciones elevadas de estos xenobióticos.
- Además de la selección de microorganismos eficientes y tolerantes, la estructura misma de los bioflóculos, similar a la conformación de las biopelículas, explica la resistencia a altas concentraciones de metales, mostrada por la biomasa de las lagunas enriquecidas.

## XI. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Alba, F. J. 2000. Estudio Microbiológico en sistemas de lagunas de tipo facultativo adaptadas para la remoción de fenol. Tesis para obtener el grado de Maestría en Microbiología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN.
2. Almasi A., Pescod M.B. (1996). Wastewater Treatment Mechanism in Anoxic Stabilization Ponds. *Water Sci. Technol* **33**(7), 125 – 132.
3. Álvarez (1991) Manual de Operación y de Mantenimiento de plantas de tratamiento de aguas residuales, Vol. III, “Lagunas de Estabilización”. CNA.
4. Andreas E. *et al.*, (2005) Regulation of Resistance to Copper in *Xanthomonas axonopodis* pv. Vesicatoria. *Applied and Environmental Microbiology*. Feb p. 782 – 789.
5. Avelar G. F. J. (1994). “Estudio sobre la remoción Fenol en Modelos Lagunas de Estabilización de tipo Facultativo”. Tesis de maestría. Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. CINVESTAV-IPN. México D.F.
6. Avelar F.J., Martínez Pereda P., Thalasso F., Rodríguez-Vázquez R., Esparza-García F.J. (2001). Upgrading of facultative waste stabilization ponds Under high organic load. *Biotechnol. Lett.* **23**(14), 1115-1118
7. Avelar, F. J., Martínez-Pereda, P., Thalasso, F., Rodríguez-Vázquez, R., Alba, J., Esparza-García, F. J. (2003). Phenol removal in upgraded facultative waste stabilization ponds. *Environ Technol.* 24(4): 465-470.
8. Arellano D. J. (2002) Introducción a la ingeniería ambiental. 1ª edición, Alfaomega, México, D.F. 27 – 49.
9. Aziz H.A., Mohd M. (1998) Potencial use of low cost filtration technique for removing selected Heavy metals from wastewater at pH less than 5. *Indian J. Engin. Mat Sci* **5**(4), 194-201.
10. Azov, Y. (1982) Carbon Limitation of Biomass Production in High Rate Oxidation ponds. *Biotechnol. Lett* **23** (14). 1115 – 1118.

11. Baker-Austin C, Potrykus J, Wexler M, Bond PL, Dopson M. (2010) Biofilm development in the extremely acidophilic archaeon 'Ferroplasma acidarmanus' Fer1. *Extremophile*. 14(6):485-91.
12. Baskaran K., Scott P. H., Connor M.A. (1992) Biofilms as an aid to nitrogen removal in sewage treatment lagoons. *Water Sci. Technol* **26** (7 – 8) 1707 – 1716. m
13. Belhateche D.H. (1995). Choose appropriate wastewater treatment technologies. *Chem. Eng.Prog.* **91**(8), 32-51.
14. Bolton H., Xun L., Girvin D. C. (2000) Biodegradation of Synthetic Chelating Agents. En. Lovley D.R. (Eds.) *Environmental microbe-metal interactions*. ASM Press, Washington D.C. USA. 363 – 383.
15. Borrok D.M., Fein J.B., Kulpa C.F. (2004) Cd and proton adsorption onto bacterial consortia grown from industrial wastes and contaminated geologic settings. *Environ Sci Technol*. 1;38(21) 5656-5664.
16. Cañizares V. (2000) Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología* (42), 131-143.
17. Çeçen F. y Gürsoy G. (2001) Biosorption of heavy metals from landfill leachate onto activated sludge. *J. Environ. Sci. Health* **A36** (6). 987-998.
18. Chang J.S., Huang J.C. (1998) Selective Adsorption/Recovery of Pb, Cu, and Cd with multiple Fixed Beds Containing Immobilized Bacterial Biomass. *American Chemical Society. Biotechnol* 14. 735-741.
19. Charlton, J. (1997). Application of waste stabilization ponds in Bhutan lessons within a sustainable development context. *Water Sci Technol* **35** (9). 199 – 208.
20. Charentanyarak L. (1999) Heavy metal removal by chemical coagulation and precipitation. *Water Sci Technol.* **39** (10-11)135-138.
21. CNA (2010) Sistema Nacional de Información del Agua (SINA)- Estadísticas del agua en México
22. Crites R.W., Dombeck G.D., Watson R.C., Williams C.R. (1997). Removal of metals and ammonia in constructed wetlands. *Water Environ. Res.* **69**, 132-135.
23. Daughney C.J., Siciliano S.D., Rencz A.N., Lean D., Fortin D. (2002) Hg(II) adsorption by bacteria: a surface complexation model and its application to

- shallow acidic lakes and wetlands in Kejimikujik National Park, Nova Scotia, Canada. *Environ Sci. Technol.* 1;36(7) 1546- 1553.
24. Deng L., Wang H., Deng N. (2006) Photoreduction of Chromium (VI) in the presence of algae, *Chlorella vulgaris*. *J. Hazard Mater.* 138 (2): 288-92
  25. Diels, L. De Smet, M., Hooyberghs, L., Corbisier, P. 1999. Heavy metals bioremediation of soil. *Mol Biotechnol.* 12(2): 149-158.
  26. Drogui P., Mercier G., Blais J.F. (2005) Bioproduction of Ferric Sulfate Used During Heavy Metals Removal From Sewage Sludge. *J. Environ Qual* 34:816-824.
  27. Elangovan R., Abhipsa S., Rohit B., Ligy P., Chandraraj K. (2006) Reduction of Cr(VI) by a *Bacillus sp.* *Biotechnology Letters* (2006) 28: 247–252.
  28. El-Helow E.R., Sabry S.A. Amer R.M. (2000) Cadmium Biosorption by a cadmium resistant strain of *Bacillus thuringiensis*: regulation and optimization of cell surface affinity for metal cations. *Biometals* 13(4) 273-280.
  29. Escalante V., Moeller G., Rivas A. (2000). Pond evaluation and upgrading in Mexico. *Water Sci. Technol* **42** (10-11), 43-50.
  30. Espino V.S. (1984) Consideraciones en el Diseño de las Lagunas de Estabilización y su Probable Aplicación en la Remoción de detergentes. Tesis de Maestría. CINVESTAV – IPN.
  31. Essa A.M., Macaskie L.E., Brown N.L. (2002) Mechanisms of mercury bioremediation. *Biochem Soc Trans.* 30(4) 672 -674.
  32. Evans M.N., Chirwa., Wang Y.T. (1997) Hexavalent Chromium Reduction by *Bacillus sp.* In a Packed Bed Bioreactor. *Environ. Sci. Technol.* 31. 1446-1451.
  33. Faisal M., Hameed A., Hasnain S. (2005) Chromium-resistant bacteria and cyanobacteria: impact on Cr (VI) reduction potential and plant growth. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 32: 615–621.
  34. Fredrickson J. F., Kostandarithes H. M., Li S.W., Plymale A. E. AND Daly J. M. (2000) Reduction of Fe(III), Cr(VI), U(VI), and Tc(VII) by *Deinococcus radiodurans* R1. pp. 2006-2011.
  35. Gadd G.M., White C. (1993) Microbial treatment of metal pollution – a working biotechnology? *TIBTECH* **11**, 353-359.

36. Gokhale S.V., Jyoty K.K., Lele S.S. (2008) *Bioresource Technol* (99)9:3600 – 3608.
37. Grant, S. Sorokin, D. Y., Grant, W. D., Jones B. E., Heaphy, S. 2004. A phylogenetic analysis of Wadi el Natrun soda lake cellulase enrichment cultures and identification of cellulase genes from these cultures. *Extremophiles* 8(5):421-9.
38. Grau P. (1996). Low cost wastewater treatment. *Water Sci. Technol* **33**(8), 39-46.
39. Green F.B. (1995). Introducción, Selección de artículos presentados en la Second IAWQ Internacional Specialist Conference on Waste Stabilization Ponds and the Reuse of Ponds Effluents, November 30-December 3, 1993, Oakland California *Water Sci. Technol* **31**(12), ix.
40. Guellil A., Thomas F., Block J.C., Bersillon J.L., Ginestet P. (2001) transfer of organic matter between wastewater and activated sludge flocs. *Water res.* **35** (1), 142-150.
41. Guerrero M. (1999) *Uso sustentable del agua en México, reto de nuestro tiempo.* Ed México Desconocido. México. 262 pp.
42. Gupta, A., Meyer, J. M., Goel, R. 2002. Development of heavy metal-resistant mutants of phosphate solubilizing *Pseudomonas* sp. NBRI 4014 and their characterization. *Curr Microbiol.* 45(5): 323-327.
43. Han X., Wong Y.S., Tam N.F. (2006) Surface complexation mechanism and modeling in Cr(III) biosorption by a microalgal isolate, *Chlorella minata*
44. Han X., Wong Y.S., Tam N.F. (2007) Biosorption and bioreduction of Cr (VI) by a microalgal isolate *Chlorella minata*.
45. Helow E.R., Sabry S.A., Amer R.M. (2000) Cadmium biosorption by a cadmium resistant strain of *Bacillus thuringiensis*: regulation and optimization of cell surface affinity for metal cations. *Biometals* 3(4) 273-280.
46. Hill, K. A., Lion, L. W., Ahner, B. A. 2002. Reduced Cd accumulation in *Zea mays*: a protective role for phytochelatins? *Environ Sci Technol* 36(24): 5363-5368.

47. Hobman J.L., Wilson J.R., Brown N.L. (2000). Microbial mercury reduction. En: Lovley D.R. (Eds.) Environmental Microbe-Metal interactions ASM Press, Washington, D.C., USA. Pp 177-197.
48. Horton R., Apel W.A. Thompson V., Sheridan P. (2006) Low temperature reduction of hexavalent chromium by a microbial enrichment consortium and a novel strain of *Arthrobacter aurescens* *BMC Microbiology* 2006, **6**:5
49. Houghton S.R., Mara D.D. (1992). The effects of sulphide generation in waste stabilization ponds on photosynthetic populations and effluent quality. *Water Sci. Technol* **26**(7-8), 1759-1768.
50. Hsu H., Sedlak D.L. (2003) Strong Hg(II) Complexation in Municipal Wastewater Effluent and Surface Waters. *Environ. Sci. Technol.* **37**. 2743 – 2749.
51. la Farre M, Garcia MJ, Castillo M, Riu J, Barcelo D (2001) Identification of surfactant degradation products as toxic organic compounds present in sewage sludge. *J Environ Monit*; **3**(2):232-7
52. Izurieta, R. E. (1984) *Lagunas de Estabilización, Clasificación y Descripción, Lagunas Aeróbicas – Anaeróbicas, diseño.* División de educación continua, facultad de ingeniería, UNAM.
53. Jianlong W., Yi Q., Horan N., Stentiford E. (2000) Bioadsorption of pentachlorophenol (PCP) from aqueous solution by activated sludge biomass. *Biosource Technol.* **75**.157-161.
54. Jun Ye *et al.*, (2005) crystal structure of the *Staphylococcus aureus* pI258 cadC Cd(II)/Pb(II)/Zn(II)-Responsive Represor. *Journal of Bacteriology*. June p. 4214 – 4221.
55. Lansdell M. (1987). The development of lagoons in Venezuela. *Water Sci. Technol.* **19**(12), 55-60.
56. Lee S.E., Lee J.U., Chon H.T., Lee J. S. (2008) Microbiological reduction of hexavalent chromium by indigenous chromium-resistant bacteria in sand column experiments. *Environ Geochem Health.* **30**(2): 141-5

57. León, G. (1995) Aspectos Generales y Principios Básicos de los sistemas de lagunas de Estabilización, Seminario Internacional, Lagunas de estabilización. CEPIS.
58. Leppard G.G., Droppo I.G., West M.M., Liss S.N. (2003) Compartmentalization of metals within the Diverse Colloidal Matrices comprising Activated Sludge Microbial flocs. *J. Environ, Qual* 32:2100-2108.
59. Leung *et al.*, (2000) Removal and Recovery of heavy metals by bacteria isolated from activated sludge treating industrial effluents and municipal wastewater. *Water Sci Technol* **41**(12), 233-240.
60. Lovley D.R. (2000) Fe(III) and Mn(IV) Reduction En; Lovley D.R. (Eds) *Environmental microbe-Metal Interactions* ASM Press, Washington D.C: USA. 3 – 29.
61. Lloyd J.R., Macaskie L.E. (2000) Bioremediation of Radionuclide-Containing wastewaters. En; Lovley D.R. (Eds.) *Environmental Microbe-Metal interactions*. ASM Press, Washington. D.C. USA. 277 – 327.
62. Mara D. (1987). *Waste stabilization ponds: Problems and controversies*. *Water Qual. Int* **1**, 20-22.
63. Martinez, F., Avendamo, M. (1987) Algae Population and Auxotrophic Adaptation in a Sugar Refinery Wastewater Environment. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 33:331.
64. Masseret *et al*; (2000). Effect of the Waste Stabilization Lagoon Discharge on Bacterial and Phytoplanktonic Communities of a Stream. *Water Environment Research.*, column 72, number 3, 285 -294.
65. Mayo A. W. (1996) DBO<sub>5</sub> Removal in Facultative Ponds: Experience in Tanzania. *Water Sci. Technol* **34** (11), 107 – 117.
66. Metcalf & Eddy Inc. (1991) *Wastewater engineering – Treatment, Disposal and Reuse*. 3<sup>rd</sup> edition, McGraw-Hill, New York.
67. Mergeay *et al.*, (2003) *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals. Towards a catalogue of metal-responsive genes. *FEMS microbial Rev.* 27(2-3), 385-410.

68. Michale Z.C., Hu, Reeves M. (1997) Biosorption of Uranium by *Pseudomonas aeruginosa* Strain CSU Immobilized in a Novel Matrix American Chemical Society. *Biotechnol* 13. 60 - 70
69. Nicaraos G.D., Nieva J.M., Vayenas D.V., Libertaos G. (1997). Removal of iron from potable water using trickling filter. *Wat. Res.* **31**(5), 1991-1996.
70. McLean J & Beveridge T. (2001) Chromate Reduction by *Pseudomonad* Isolated from a Site Contaminated with Chromated Copper Arsenate. *Applied and Environmental Microbiology* 67.3.1076–1084
71. Muttamara S. Peutpaiboon U. (1997) Roles of Baffles in Waste Stabilization Ponds. *Water Sci. Technol* 35, 275 – 284.
72. Nancharaiah Y.V., Dodge C., Venugopalan V.P., Narasimhan S.V., Francis A.J. 2010. Immobilization of Cr (VI) and Its Reduction to Cr (III) Phosphate by Granular Biofilms Comprising a Mixture of microbes. *Applied and Environmental Microbiology* Vol 76 No 8. p. 2433–2438
73. Naz, N., Young, H. K., Ahmed, N., Gadd1, M.E. 2005. Cadmium Accumulation and DNA Homology with Metal Resistance Genes in Sulfate-Reducing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, Aug. 71, 4610–4618
74. Needham, C., Hoagland, M., McPherson, K., Dodson, B. 2000. Intimate strangers unseen life on the Earth. ASM Press, Washington D. C., USA.
75. Oakley S.M., Pocasangre A., Flores C., Monge J., Estrada M. (2000). Waste stabilization ponds use in Central America: The experience of El Salvador, Guatemala, Honduras and Nicaragua. *Water Sci. Technol* **42**(10-11), 51-58.
76. Okeke B.C., Laymon J., Crenshaw S. Oji C. (2008) Environmental and Kinetic Parameters for Cr(VI) Bioreduction by a Bacterial Monoculture Purified from Cr(VI)-Resistant Consortium. *Biological Trace Element Research* 123 (1-3) 229-41.
77. Oremland R.S. Stolz J. (2000) Dissimilatory reduction of Selenate and Arsenate in Nature. En; Lovley D.R. (Eds) *Environmental microbe-Metal Interactions* ASM Press, Washington D.C: USA. 199 – 223.
78. Oswald W.J. (1995) Ponds in the Twenty-First Century. *Water Sci. Technol* **31**(12) 1 – 8.

79. Oufdou K., Mezrioui N., Oudra B., Barakate M., Loudiki M., Ait-Alla A. (2000). Relationships between bacteria and cyanobacteria in the Marrakech waste stabilization ponds. *Water Sci. Technol* **42**(10-11), 171-178
80. Pal A., Dutta S., Paul A.K. (2005) Reduction of Hexavalent Chromium by Cell-Free Extract of *Bacillus sphaericus* and 303 Isolated from Serpentine Soil. *Current Microbiology* Vol. 51, pp. 327–330.
81. Pearson H.W., Mara D.D., Mills S.W., Smallman D.J. (1987). Factors determining algal populations in waste stabilization ponds and the influence of algae on pond performance. *Water Sci. Technol* **19**(12), 131-140.
82. Pescod M.B. (1996). The role and limitations of anaerobic pond systems. *Water Sci. Technol* **33**(7), 11-21.
83. Polprasert C. Agarwalla B.K. (1994) A facultative pond model incorporating biofilm activity. *Water Env. Res* **66**(5) 625 – 631.
84. Polprasert C., Charnpratheep K. (1989). Heavy metal removal in attached growth waste stabilization ponds. *Water Env. Res.* **66**(5), 625-631.
85. Polprasert C. Sookhanich S. (1995) Upgrading of facultative ponds to treat a toxic organic wastewater. *Water Sci. Technol* **31**(12) 91 – 101.
86. Poopal A.C. & Laxman R.S. (2008) Hexavalent chromate reduction by immobilized *Streptomyces griseus*. *Biotechnology letters.* 30(6): 1005-10.
87. Prieto C., (2005) Remoción de cadmio y cromo empleando lagunas de estabilización enriquecidas con bioflóculos. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Toxicología Maestría. Universidad Autónoma de Aguascalientes.
88. Puranik P.R. y Paknikar K.M. (1999) Biosorption of Lead, Cadmium, and Zinc by *Citrobacter* Strain MCMB-181: Characterization Studies. American Chemical Society.
89. Racault Y., Boutin C., Seguin A. (1995). Waste stabilization ponds in France: A report of fifteen years experience. *Water Sci. Technol* **31**(12), 91-101.
90. Rakkoed A., Dantenavaranich S., Puetpaiboon U. (1999) Nitrogen Removal in Attached growth Waste Stabilization ponds of wastewater from a Rubber Factory *Water Sci. Technol* **40**(1), 45-42.

91. Ramos, S.M., Dávila, J. L., Esparza, F., Thalasso, F., Alba, J., Guerrero, A. L., Avelar, F. J. 2005. Treatment of wastewater containing high phenol concentrations using stabilization ponds enriched with activated sludge. *Water Sci. Technol.* 51(12): 257-260.
92. Reynolds J.H. (1975) Biomass Distribution and Kinetics of Baffled Lagoons. *J. Environment. Eng Div. ASCE* 101, 1005.
93. Richards J.W., Krumholz G.D., Chval M.S., Tisa L.S. (2002) Heavy metal resistance patterns of *Frankia* Strains. *Applied and Environ microbial.* 68,2, 923-927.
94. Ricordel S., Taha S., Cisse I., Dorange G., (2001) Heavy metal removal by adsorption onto peanuts husos carbon characterization, kinetic study and modelling. *Separat. Purific. Technol.* **24**(3), 389-401.
95. Rodrigue *et al.*, (2005) Identification of rcnA (yohM), a Nickel and Cobalt resistance Gene in *E. coli*. *Journal of Bacteriology.* Apr. p 2912-2916.
96. Romero Rojas J. A. (1999) Tratamiento de aguas residuales por lagunas de estabilización. 3ª edición. Alfaomega. México. 1-10.
97. Saqqar M.M., Pescod M.B. (1995) Modeling the performance of anaerobic wastewater stabilization ponds. *Water Sci. Technol* **31**(12) 171- 183.
98. Schiever S., Volesky B. (2000). Biosorption processes for heavy metal removal. En Lovely D. R. (Eds.) *Environmental microbe-metal interactions.* AMS Press, Washington, D.C., USA, pp 329-361.
99. Schneegurt M.A., Jain J.C., Menicucci J.A. Brown S.A. Kemner K.M., Garofalo D.F., Quallick M.R., Neal C.R., Kulpa C.F. (2001) *Environ. Sci. Technol* 35. 3786 – 3791.
100. Sears KJ, Alleman JE, Gong WL (2005) Feasibility of using ultrasonic irradiation to recover active biomass from waste activated sludge. *J Biotechnol*;119(4):389-99.
101. SEMARNAT (2010) Sistema Nacional de Información Ambiental y de Recursos Naturales – SNIARN. México, D.F.
102. Shin H.K., Polprasert C. (1987) Attached-Growth Waste Stabilization ponds Treatment Evaluation *Water Sci. Technol* **19**(12) 229 – 235.

103. Soler A., Moreno M.D., Saez J., Moreno J. (2000) Kinetic Model for Deep Waste Stabilization Ponds Operating in Bath Mode Water Sci. Technol **42**(10 – 11) 315 –325.
104. Srivastava S. Shekar Thakur I. (2007) Evaluation of biosorption potency of *Acinetobacter sp.* For removal of hexavalent chromium from tannery effluent. Biodegradation. Biodegradation . 18(5) 637-46.
105. Southam G. (2000) Bacterial Surface-mediated formation En: Enviromental microbe-Metal Interactions ASM Press, Washington D.C: USA. 257– 275.
106. Srinath T., Gark S.K., Ramteke P.W. (2003) Biosorption and elution of chromium from immobilized *Bacillus coagulans* biomass. Indian J. Exp Biol. 41(9): 986-990.
107. Stewart P.S. & Franklin M.J. (2008) Physiological Heterogeneity in biofilms, Nature Reviews Microbiology. Vol 6. 199 – 210.
108. Toumi A., Nejmeddine A., Hamouri B. (2000) Heavy metal removal in waste stabilization ponds and high rate ponds. Water Sci. Technol **42**(10-11), 17-21.
109. Treviño A.B. & Cázares R.E. (1999) Uso sustentable del agua en México, reto de nuestro tiempo. Ed México Desconocido. México. 262 pp.
110. Stepanauskas r., Glenn T.C., Jagoe C.H., Tuckfield R.C., Lindell A.H., McArthur J.V. (2005) Elevated Microbial Tolerance to Metals and and Antibiotics in Metal-Contaminated Industrial Environments. Environ. Sci. Technol 39. 3671 – 3678.
111. Vilchez R., Pozo C., Gómez M.A., Rodelas B., González López J. (2007) Dominance of sphingomonads in a copper exposed biofilm community for groundwater treatment. Microbiology **153**: 325-337.
112. Vuillot M., Boutin C (1987). Waste stabilization ponds in Europe: A state of the art review. Water Sci. Technol **19**(12), 1-6.
113. Wagner D.I., Canstein H.V., Li Y., Timmis K.N. Deckweyr W.D. (2000) Removal of Mercury from Chemical Wastewater by Microorganisms in Technical Scale. Environ. Sci. Technol 34. 4628-4634.

114. Wang Y.T. (2000) Microbial Reduction of Chromate En: Environmental microbe-Metal Interactions ASM Press, Washington D.C: USA. 225 – 235.
115. Wu J.S., Holman R.E., Dorney J.R. (1996) Systematic evaluation of pullulant removal by urban wet detention ponds. J. Environ. Eng. **122**(11), 983-988.
116. Zanutelli C.T., Medri W., Belli P., Perdomo C.C., Mulinari M.R., Costa R.H.R. (2002) Performance of a Baffled Facultative pond Treating Piggery Wastes. Water Sci. Technol **45**(1) 49 – 53.
117. Zhao Q., Wang B. (1996). Evaluation on a pilot-scale attached-growth pond system treating domestic wastewater. Water Res. **30**(1), 242-245.
118. Zulfadhly Z., Mashitah M.D., Bathia S. (2001) Heavy metal removal in fixed-bed column by the macrofungus *Pycnoporus sanguineus*. Environm. Pollution **112**(3). 463-470

