



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DE UN MÉTODO INDIRECTO PARA
LA CUANTIFICACIÓN RÁPIDA DE BIOMASA
BACTERIANA EN AGUAS RESIDUALES**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A

KARLA VICTORIA JIMÉNEZ GUEVARA



MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Durán Domínguez de Bazúa María del Carmen

VOCAL: Profesor: Ramírez Burgos Landy Irene

SECRETARIO: Profesor: García Gómez Rolando Salvador

1er. SUPLENTE: Profesor: Rivero Cruz José Fausto

2° SUPLENTE: Profesor: Bernal González Marisela

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIOS 301, 302 Y 303, INGENIERÍA QUÍMICA AMBIENTAL Y QUÍMICA AMBIENTAL, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA.

ASESOR DEL TEMA:

Durán Domínguez María del Carmen

SUPERVISOR TÉCNICO:

Amábilis Sosa Leonel Ernesto

SUSTENTANTE:

Jiménez Guevara Karla Victoria

Índice

	Pág.
Lista de figuras y tablas	-1-
Nomenclatura y acrónimos	-4-
Resumen	-5-
Abstract	-6-
1. PROBLEMÁTICA	-7-
1.1. Introducción	-7-
1.2. Objetivos	-8-
1.2.1. Objetivo general	-8-
1.2.2. Objetivos particulares	-8-
1.3. Hipótesis	-9-
1.4. Alcances	-9-
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	-10-
2.1. Contaminación del agua en México	-10-
2.2. Problemática de los metales pesados	-14-
2.2.1. Uso de bacterias tolerantes en el tratamiento de aguas residuales con contenido de metales pesados	-16-
2.2.2. Humedales artificiales inoculados con cepas tolerantes para el tratamiento de metales pesados	-18-
2.3. Metabolismo bacteriano en la remoción de contaminantes de las aguas	-20-
2.3.1. Remoción de materia orgánica	-20-
2.3.2. Remoción de nitrógeno	-24-
2.3.3. Requerimientos de oxígeno de los microorganismos y su importancia en el tratamiento de aguas residuales	-27-
2.3.4. Interacción entre microorganismos y metales pesados	-29-
2.3.4.1. Biosorción	-30-
2.3.4.2. Bioacumulación	-31-
2.3.4.3. Biomineralización	-32-
2.3.4.4. Biotransformación	-32-
2.3.4.5. Quimiosorción mediada por microorganismos	-33-
2.4. Cuantificación bacteriana	-34-

2.4.1. Métodos directos para el recuento de células totales	-35-
2.4.1.1. Recuento microscópico	-35-
2.4.1.2. Turbidimetría	-36-
2.4.1.3. Obtención de una curva estándar	-37-
2.4.1.4. Contadores electrónicos	-38-
2.4.2. Métodos indirectos de recuento de células viables	-39-
2.4.2.1. Método de dilución y vertido en placa	-39-
2.4.2.2. Método de la gota o de Miles y Misra	-40-
2.4.2.3. Recuento por filtro de membrana	-41-
2.4.2.4. Número más probable	-41-
2.4.3. Consideraciones sobre el recuento bacteriano	-42-
3. METODOLOGÍA	-43-
3.1. Caracterización bacteriana	-43-
3.1.1. Aislados bacterianos	-43-
3.1.2. Caracterización morfológica y de requerimientos de oxígeno	-43-
3.2. Caracterización bioquímica bacteriana	-46-
3.2.1. Degradación de la caseína	-46-
3.2.2. Biodegradación de carbohidratos	-46-
3.2.3. Hidrólisis de lípidos	-47-
3.2.4. Reducción de nitratos	-47-
3.3. Utilización de un método indirecto para cuantificar las bacterias en aguas residuales	-48-
3.3.1. Curva de calibración y cuantificación bacteriana	-48-
3.3.2. Determinaciones analíticas y análisis estadísticos	-50-
3.4. Identificación de la influencia de la densidad bacteriana en humedales artificiales sobre la remoción de metales pesados	-51-
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	-52-
4.1. Caracterización bacteriana	-52-
4.1.1. Características morfológicas las cepas tolerantes	-52-
4.1.2. Requerimientos de oxígeno	-55-
4.2. Pruebas bioquímicas en función de los contaminantes de las aguas residuales	-56-
4.2.1. Remoción de proteínas	-56-
4.2.2. Remoción de carbohidratos	-58-
4.2.3. Remoción de lípidos	-59-

4.2.4. Reducción de nitrógeno	-60-
4.3. Medida indirecta del crecimiento microbiano para cuantificar bacterias en aguas residuales	-61-
4.3.1. Curva de calibración	-61-
4.3.2. Caracterización de las muestras de agua residual para la aplicación de la curva de calibración	-63-
4.3.3 Validación del método indirecto e influencia de parámetros fisicoquímicos	-64-
4.4. Influencia de la densidad bacteriana en humedales artificiales sobre la remoción de metales pesados	-66-
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	-71-
5.1 Conclusiones	-71-
5.2 Recomendaciones	-72-
Anexo 1. Disposición de los residuos generados en esta investigación	-73-
BIBLIOGRAFÍA	-74-

Lista de figuras y tablas

No. de Figura o Tabla	Descripción	Página
Figura 1	Generación de aguas residuales municipales por entidad federativa, 2013. Fuente: CONAGUA (2014)	-11-
Figura 2	Tratamiento de agua residual industrial, 2004 (L/s) Fuente: CONAGUA (2004)	-12-
Figura 3	Materia orgánica descargada en aguas residuales por giro industrial. Modificado de CONAGUA (2004)	-21-
Figura 4	Ruta de eliminación biológica del nitrógeno de las aguas residuales (construcción de la autora)	-26-
Figura 5	Mecanismos de interacción entre metales pesados y microorganismos (Vullo, 2003)	-30-
Figura 6	Medidas turbidimétricas del desarrollo microbiano realizadas en un espectrofotómetro o un fotómetro (Madigan y col., 2009)	-37-
Figura 7	Método de diluciones seriadas para recuento en placa de colonias (Tortora y col., 2007)	-40-
Figura 8	Medio con tioglicolato donde se pueden apreciar las dos zonas principales, óxica y anóxica	-45-
Figura 9	Resultados de la Tinción de Gram. De izquierda a derecha, TAN117, TAN119, TAN217, TAN1113 y TAN1115	-53-
Figura 10	Ejemplo de los resultados para la Tinción de endosporas. Posición terminal de la endospora correspondiente a TAN.1115 (izquierda) y posición subterminal de la espora correspondiente a TAN117 (derecha)	-54-

Figura 11	Resultados de la prueba de requerimientos de oxígeno para las cepas TAN117 (izquierda superior), TAN119 (derecha superior), TAN1113 (izquierda inferior) y TAN1115 (derecha inferior), las cuales tienen mayor crecimiento en la zona óxica del medio tioglicolato	-55-
Figura 12	Resultado de la prueba de requerimientos de oxígeno para la cepa TAN217, la cual tiene mayor crecimiento en la zona anóxica del medio tioglicolato	-56-
Figura 13	Resultados de la prueba de degradación de la caseína	-57-
Figura 14	Resultado de la prueba con lecitinasa	-59-
Figura 15	Muestras que conformaron los puntos de la curva de calibración bacteriana. De izquierda a derecha la densidad del consorcio es descendente	-61-
Figura 16	Curva de calibración para la correspondencia entre UFC mL ⁻¹ del consorcio bacteriano utilizado y sus respectivas absorbancias	-62-
Figura 17.	Remoción de plomo y cromo en un humedal inoculado con cepas tolerantes a metales, en función de la concentración bacteriana disuelta	-68-
Figura 18	Remoción de plomo y cromo en un humedal convencional, en función de la concentración bacteriana disuelta	-69-
Tabla 1	Tabla 1. Contaminantes, procesos y fuentes que afectan la calidad del agua (modificada de Kraemer y col., 2001; Pérez y Ganado, 2013)	-13-
Tabla 2	Compuestos orgánicos presentes en aguas residuales domésticas, expresados como porcentaje	-20-
Tabla 3	Concentración bacteriana en función de la concentración de metales pesados (\pm desviación estándar)	-49-

Tabla 4	Caracterización morfológica, fisiológica y bioquímica de las cepas metatolerantes utilizadas en las fases experimentales	-52-
Tabla 5	Resultados de la caracterización de las muestras de agua residual utilizadas para evaluar el método indirecto a proponer	-64-
Tabla 6	Valores de UFC correspondientes al método directo y método indirecto. \pm Desviación estándar en porcentaje	-65-
Tabla 7	Valores de remoción de plomo y cromo y de concentración bacteriana, en humedales artificiales con cepas tolerantes y convencionales. (Tomado de Amábilis y col. 2015)	-67-

Nomenclatura y acrónimos

As	Arsénico
Cd	Cadmio
CONAGUA	Comisión Nacional del Agua
Cr	Cromo
CV	Coeficiente de Variación
DBO	Demanda bioquímica de oxígeno
DOF	Diario Oficial de la Federación
DQO	Demanda química de oxígeno
Hg	Mercurio
NMP	Número más probable
Pb	Plomo
pH	Potencial de hidrógeno
SSV	Sólidos suspendidos volátiles
PTAR	Planta de tratamiento de aguas residuales
Redox	Reacciones de oxidación-reducción o de óxido-reducción
RIV	Reactor Inoculado con vegetación
RV	Reactor con vegetación
r&R	Análisis de reproducibilidad y repetibilidad
UFC	Unidades formadoras de colonias
UGA	Unidad de Gestión Ambiental
Zn	Zinc

Nota:

Esta tesis usa el punto decimal (DOF, 2009)

Resumen

La contaminación por metales pesados (Cu, Zn, Pb, Cd, Cr, Ni, Hg, Co, Ag, Au) ha venido incrementándose por el gran número de industrias que los descargan al medio ambiente. En el caso particular de los acuíferos y aguas superficiales, los metales pueden comprometer seriamente su uso debido a la biodisponibilidad que presentan para los organismos acuáticos y posteriormente para el consumo humano. Algunos sistemas microbianos con tolerancia a metales tienen el potencial de ser utilizados en procesos biotecnológicos para la biorremediación de suelos y aguas contaminadas con metales pesados de importancia ambiental. Así, se ofrece una alternativa potencial a los métodos ya existentes para la descontaminación y recuperación de metales tóxicos. En este trabajo se evaluó la factibilidad de un método indirecto para la cuantificación rápida de biomasa bacteriana en aguas residuales que contengan metales pesados u otros contaminantes xenobióticos. En este sentido, las cepas usadas en el presente estudio fueron caracterizadas morfológicamente, por tinción de Gram y presencia de esporas y se estudiaron los requerimientos de oxígeno idóneos para cada una de las cepas. Posteriormente, se evaluaron con pruebas bioquímicas relacionadas con los contaminantes típicos de un agua residual municipal, entre los que destacaron la asimilación de proteínas (para el nitrógeno), así como asimilación de grasas. Los metales sujetos a estudio que podrían estar presentes en aguas residuales son mercurio (Hg^{2+}), plomo (Pb^{2+}) y cromo (Cr^{6+}), debido a que son generados en grandes cantidades por varias industrias en el país, además de que presentan un alto nivel de toxicidad. En relación a esto, en recientes estudios se evaluó la resistencia de los aislados bacterianos a utilizar hacia los tres metales pesados mencionados. Con base en el nivel de tolerancia hacia los metales pesados, se propuso un método indirecto de cuantificación bacteriana en diferentes aguas residuales, en el cual se evaluó la certidumbre estadística mediante la elaboración de curvas de calibración utilizando un consorcio bacteriano conformado por cepas resistentes a metales pesados y cuantificando el número de microorganismos por UFC mL^{-1} registrando sus respectivas absorbancias (los grados de inhibición se realizaron con diferentes concentraciones de metales pesados). Con base en los resultados obtenidos, con lo arriba descrito, se analizó la factibilidad técnica de utilizar esta metodología para el personal de los sistemas de tratamiento de aguas residuales municipales con y sin presencia de metales u otros compuestos xenobióticos.

Palabras clave: Cepas tolerantes a metales pesados, tratamiento de aguas residuales

Abstract

The pollution caused by heavy metals (Cu, Zn, Pb, Cd, Cr, Ni, Hg, Co, Ag, Au) has been increasing by the metal waste that is being thrown into the environment by a large number of industries. In the case of groundwater and surface water, metals can seriously compromise their use because of the bioavailability having to aquatic organisms and later for human consumption. Some heavy-metal-resistance microbial systems have the potential to being used in biotechnological processes such as soil bioremediation and heavy metal contaminated water. Thus, they offer a potential alternative to the existing methods for decontamination and recovery of toxic metals. On this research, the feasibility of an indirect method for rapid quantification of bacterial biomass in wastewaters containing heavy metals or other contaminants is assessed xenobiotics was evaluated. In this regard, the strains used on the actual study were morphologically characterized using the Gram stain and presence of spores and s requirements for each was studied strains oxygen . The metals under study were mercury (Hg^{2+}), lead (Pb^{2+}), and chrome (Cr^{6+}), due to the fact that they present a high toxicity and are generated in large quantities by several industries in Mexico. In addition, on recent studies, the resistance of bacterial isolates to the metals above mentioned has been evaluated. Afterwards, they were evaluated using biochemical tests related with typical contaminants of a municipal wastewater, such as uptake of proteins (for nitrogen) and cholesterol and other fats (for fats and oils). The importance of bacterial density in artificial wetlands for the removal of heavy metals was studied, as well as the effect of the presence of heavy metal on the kinetics of microbial growth and assimilation of organic matter. An it was proposed an indirect method of bacterial quantification on different wastewaters, in which statistical certainty was evaluated through the construction of calibration curves using a bacterial consortium formed with heavy metal resistant strains. It included quantification of the number of microorganisms as CFU mL^{-1} , recording their respective absorbance. Based on the results obtained, under the conditions described above, technical feasibility of using heavy metals tolerant strains for treating municipal wastewater with and without the presence of metals was observed.

Key Words: Heavy metals tolerant strains, wastewaters treatment

1. PROBLEMÁTICA

1.1. Introducción

En los últimos años, los problemas derivados de la contaminación han adquirido gran relevancia por la magnitud y diversidad que presentan. Esto ha provocado que la sociedad, en general, vaya tomando cada vez mayor conciencia de los riesgos actuales y, más aún, de los potenciales que pueden suscitarse si no se toman medidas correctivas y preventivas.

Dentro de este ámbito, las aguas residuales se caracterizan por generar grandes impactos negativos a los ecosistemas y al sector de salud pública. Todo esto derivado de su amplia gama de componentes físicos, químicos y biológicos, entre los que se encuentran los sólidos suspendidos, compuestos orgánicos biodegradables, sólidos inorgánicos como los metales pesados, nutrientes, plaguicidas, patógenos, etc., que alteran las condiciones naturales de un ecosistema (Crites y Tchobanoglous, 2000).

De los contaminantes arriba mencionados, los metales pesados tales como Cd, Cr, Pb, Hg, As y Zn, se consideran de las sustancias más peligrosas presentes en aguas residuales, ya que propician graves efectos sobre la salud humana, incluyendo del tipo tóxico, teratogénico, carcinógeno y mutagénico (Dickson, 2006), aunado a su negativo impacto sobre los ecosistemas al ser tóxicos para la biota y potencialmente bioacumulables (Brown y col., 2000; Manahan, 2007). Además de esto, su naturaleza inorgánica da lugar a su persistencia en los diversos compartimientos ambientales de los ecosistemas ya que, a diferencia de los compuestos orgánicos, no pueden ser degradados. En efecto, los sistemas de tratamiento de aguas residuales convencionales no pueden tratarlos por la toxicidad hacia el sistema biológico. Actualmente existen métodos fisicoquímicos para su remoción como la adsorción con carbón activado, intercambio iónico con resinas, filtración con membranas y precipitación química que son sumamente

costosos o de compleja operación e implementación, por lo que está lejos de ser asequible a un gran número de comunidades (Barakat, 2011).

En paralelo a lo anterior, recientemente se han realizado estudios sobre aislamientos bacterianos expuestos a soluciones con metales pesados con el fin de proponer alternativas biotecnológicas que sean eficientes y accesibles a todo tipo de poblaciones (Carballo-Valdés y col., 2009; Rathnayake y col., 2010; Rodríguez y Rodríguez, 2002; Salgado-Bernal y col., 2012; Xie y col., 2010). Entre las investigaciones, destaca la de Salgado y col. (2012) quienes encontraron tanto tolerancia como remoción de metales pesados de la fase acuosa por parte de varias cepas aisladas provenientes de un humedal natural. Esto ha llevado a utilizar los mencionados organismos tolerantes en sistemas de tratamiento de aguas residuales a escala de laboratorio, como los humedales artificiales, para la remoción de mercurio, plomo y cromo (Amábilis y col., 2015). En este orden de ideas, resulta importante evaluar la viabilidad de utilizar un consorcio microbiano tolerante a metales pesados, en el tratamiento de aguas residuales que los contienen y que además, existen con diversos contaminantes orgánicos. Así, los resultados del presente estudio microbiano contribuirán a conocer la factibilidad técnica de llevar el mencionado tratamiento a una mayor escala.

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo general

Evaluar la viabilidad de un consorcio microbiano tolerante, a metales pesados, durante el tratamiento de aguas residuales.

1.2.2. Objetivos particulares

- Evaluar las características bioquímicas del consorcio microbiano tolerante en función de los contaminantes característicos de un agua residual.
- Evaluar un método indirecto para la cuantificación rápida de bacterias en aguas residuales.

- Identificar la influencia de la densidad bacteriana en humedales artificiales sobre la remoción de metales pesados.

1.3. Hipótesis

El consorcio bacteriano tolerante a metales pesados es capaz de degradar las proteínas, ácidos grasos y carbohidratos que, presentes en las aguas residuales, provocan contaminación por materia orgánica. Esto en conjunto con sus requerimientos de oxígeno y características fisiológicas, hace factible el empleo de los organismos metalolerantes en sistemas de tratamiento, como los humedales artificiales, para tratar aguas residuales con contenido de metales pesados.

Por otra parte, el consorcio bacteriano tolerante a metales pesados, al ser expuesto a diferentes concentraciones de estos contaminantes, permitirá construir una curva de calibración de la densidad bacteriana, con la que se podrá cuantificar, de manera rápida, la concentración de bacterias en diferentes tipos de aguas residuales a través de la absorbancia. Esto, a su vez se deriva de la relación entre la densidad poblacional bacteriana y la remoción de metales pesados.

1.4. Alcances

El presente trabajo se circunscribe a la caracterización fisiológica y de requerimientos metabólicos enfocados al tratamiento de aguas residuales de un consorcio bacteriano tolerante a metales pesados. Así mismo, se relacionarán los datos de concentración bacteriana con los de remoción de metales pesados en humedales artificiales a escala de laboratorio previamente inoculados con los microorganismos tolerantes.

Se desarrolló y evaluó un método de cuantificación rápida bacteriana en aguas residuales, fundamentado en la disminución de la absorbancia en función de la población bacteriana presente en una muestra.

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1. Contaminación del agua en México

Los recursos hídricos en México, al igual que en el resto del mundo, se encuentran bajo una creciente presión. El crecimiento demográfico, la urbanización y el incremento en el consumo de agua en los hogares, la agricultura y la industria, han aumentado significativamente el uso global del agua.

La contaminación de las aguas superficiales es un problema que puede ocasionar alteración y destrucción de hábitats, efectos nocivos para la salud, eutrofización, disminución de poblaciones de peces y en general afectaciones en el ciclo hidrológico (Escobar, 2002).

La principal fuente de contaminación son las descargas de aguas residuales, que se definen como aguas de composición variada provenientes de los usos municipales, industriales, comerciales, de servicios, agrícolas, pecuarios, domésticos, incluyendo fraccionamientos y en general, de cualquier otro uso, así como la mezcla de ellas (Rodríguez-Monroy y Durán-de-Bazúa, 2006).

En el último reporte de CONAGUA (2014), las entidades del país que en el 2013 generaron las mayores descargas de aguas residuales municipales fueron el estado de México ($26.17 \text{ m}^3/\text{s}$), el Distrito Federal ($22.46 \text{ m}^3/\text{s}$) y Veracruz ($16.41 \text{ m}^3/\text{s}$) que, en conjunto, contabilizaron 27.5% del volumen nacional generado, tal y como se muestra en la Figura 1.

En cuanto a las aguas residuales, en 2003, las industrias en todo el país descargaron alrededor de 8 km^3 ($258 \text{ m}^3/\text{s}$). Esto equivale a más de 9.5 millones de toneladas de DBO (aproximadamente 6.5 millones de toneladas de DQO), de las cuales sólo el 18% se removieron mediante los sistemas de tratamiento. (CONAGUA, 2014).

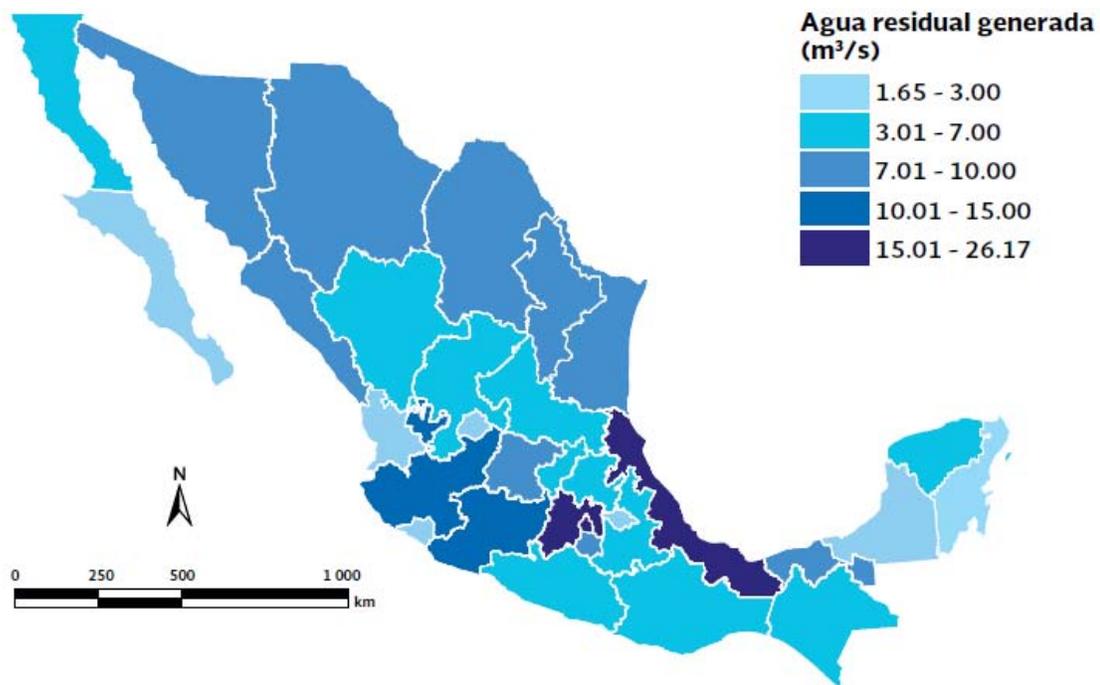


Figura1. Generación de aguas residuales municipales por entidad federativa, 2013. Fuente: CONAGUA (2014)

Como se puede observar en la Figura 2, a diciembre de 2004 el país contaba con 1,875 plantas de tratamiento de aguas residuales industriales, las cuales procesaban cerca de 27.4 m³/s (10.6% del volumen generado). (CONAGUA, 2014).

En función de la fuente del agua residual, esta puede contener contaminantes como nutrimentos (nitrógeno y fósforo), organismos patógenos (bacterias y virus), además de otros microorganismos no patógenos, metales pesados, plaguicidas, detergentes, compuestos farmacéuticos y materia orgánica, además de la mezcla de cualquiera de ellos (Kraemer y col., 2001).

En la Tabla 1 se expone una descripción más detallada de los contaminantes que afectan los cuerpos de agua.

Los metales pesados deberían encontrarse sólo en ciertos tipos particulares de efluentes industriales; sin embargo, han sido cuantificados en numerosas descargas de aguas de tipo municipal, dado su amplio uso en el mercado, aunado a los inapropiados sistemas de drenaje, hecho que se ha venido incrementando en los últimos años.

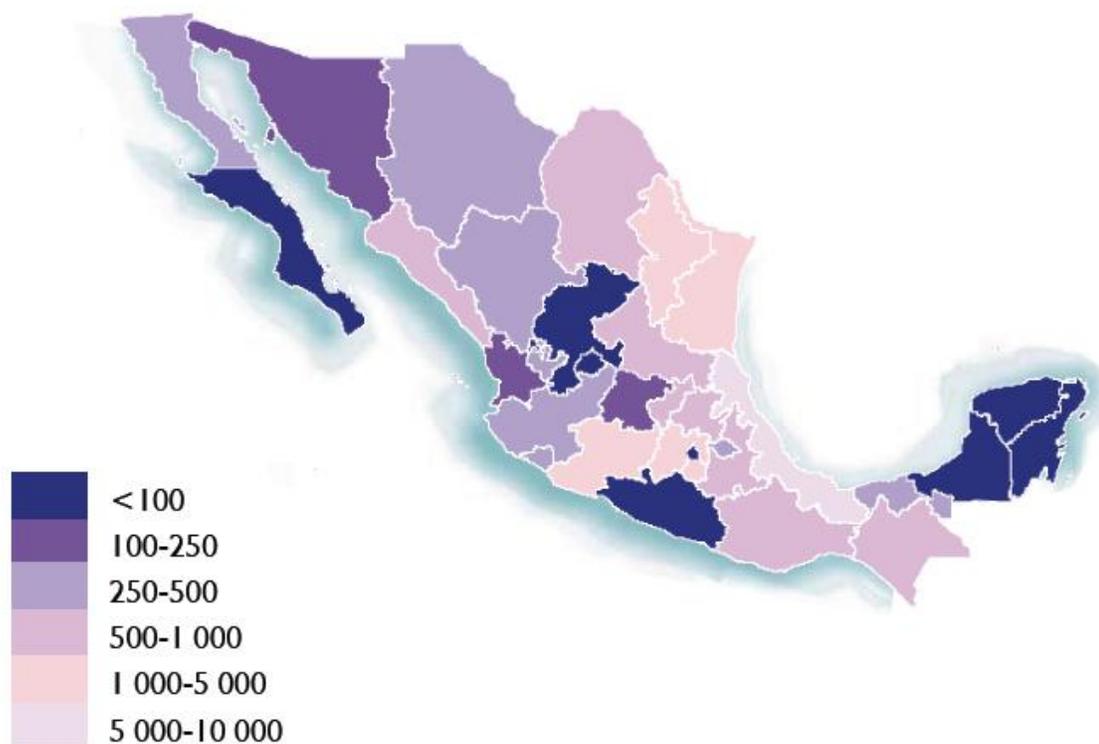


Figura 2. Tratamiento de agua residual industrial, 2004 (L/s). Fuente: CONAGUA (2004)

La contaminación por metales pesados puede derivar en diversos efectos a la salud y al ambiente, dependiendo del metal de que se trate. Todos estos compuestos son peligrosos porque tienden a bioacumularse en diferentes compartimientos ambientales. La bioacumulación significa un aumento en la concentración de un producto químico en un organismo vivo en un cierto plazo de tiempo, comparada con la concentración de dicho producto químico en el ambiente (Angelova y col., 2004).

Tabla 1. Contaminantes, procesos y fuentes que afectan la calidad del agua
(modificada de Kraemer y col., 2001; Pérez y Ganado, 2013)

Contaminantes	Descripción	Fuentes
Contaminantes orgánicos no persistentes	Se descomponen en el agua y disminuyen el oxígeno disuelto, contribuyendo con la eutrofización	Efluentes industriales, domésticos y asentamientos humanos
Nutrientes	Incluyen principalmente formas químicas del nitrógeno y fósforo, que se relacionan intermitentemente con el fenómeno de eutrofización. Se originan de desechos humanos y animales, detergentes y escorrentías	Efluentes domésticos, industriales y escorrentía agrícola
Microorganismos	Se debe a microorganismos patógenos como coliformes fecales, amebas y huevos de helmintos <i>Pseudomonas</i> , <i>Thiobacillus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Serratia</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>A. Níger</i> , <i>A. terreus</i> , y <i>Rhizopus microsporus var microsporis</i> , <i>Euglena gracilis</i>	Efluentes municipales desechos domésticos no tratados y criaderos de animales
Compuestos tóxicos orgánicos	Compuestos químicos industriales dioxinas, plásticos, plaguicidas agrícolas, hidrocarburos de petróleo, hidrocarburos aromáticos policíclicos, compuestos orgánicos persistentes, disruptores endocrinos, cianotoxinas y compuestos orgáno-estánicos de pinturas anti-incrustantes	Fuentes industriales provenientes de la fabricación de explosivos, plaguicidas, pinturas y plásticos, entre otras. Otras fuentes de estos contaminantes son los asentamientos humanos y la escorrentía agrícola
Compuestos químicos traza y compuestos farmacéuticos	Son sustancias peligrosas no removidas necesariamente por los tratamientos convencionales	Industria química y farmacia. Desechos hospitalarios
Metales pesados	Son contaminantes inorgánicos de suma importancia por ser recalcitrantes a los tratamientos tradicionales precisamente por su alta toxicidad. Se originan del rápido desarrollo industrial, principalmente alrededor de centros industriales y mineros. También pueden provenir de actividades militares, escorrentías agrícolas y fuentes no puntuales	Efluentes industriales, centros mineros, cromadoras, asentamientos humanos, actividades militares, industria del papel, curtiduría, galvanoplastia, fertilizantes y plaguicidas

Los metales pesados pueden incorporarse a un sistema de abastecimiento de agua por medio de residuos industriales que son vertidos sin previos tratamientos, y posteriormente son depositados en lagos, ríos y distintos sistemas acuíferos (García, 2005).

Se consideran entre los metales pesados elementos como el plomo, el cadmio, el cromo, el mercurio, el zinc, el cobre y la plata, entre otros, los cuales constituyen un grupo de gran importancia, ya que algunos de ellos son esenciales para las células, pero en altas concentraciones pueden resultar tóxicos para los seres vivos, organismos del suelo, plantas y animales, incluido el ser humano.

En el siguiente apartado se detallan las características fisicoquímicas que describen a los metales pesados, así como las implicaciones ambientales y de salud pública que genera su presencia en efluentes industriales sin un adecuado tratamiento.

2.2 Problemática de los metales pesados

El uso del recurso hídrico provoca una disminución en su calidad y, en muchos casos, un deterioro ambiental al ser reincorporado al medio receptor sin un tratamiento posterior a su utilización; de ahí la importancia de realizar un correcto tratamiento al agua residual de acuerdo con sus características químicas y biológicas antes de ser vertida.

Los metales pesados constituyen un grupo cercano a los 40 elementos de la Tabla Periódica, que poseen una densidad mayor a 5 g cm^{-3} . Sin embargo, desde el punto de vista ecotoxicológico, el rango distintivo es que a pesar de que muchos de ellos son esenciales para el metabolismo, también tienen efectos tóxicos sobre las células, principalmente como resultado de su capacidad para alterar o desnaturalizar las proteínas. (Barakat, 2011).

Algunos efectos sobre la salud son característicos de cada compuesto, como el arsénico que es un metaloide ampliamente encontrado en la metalurgia del cobre, sus compuestos trivalentes tienen tendencia acumulativa en el organismo: en queratina de uñas, pelo y piel. (Huato, 1998).

Por otro lado, el cadmio ingresa al organismo vía respiratoria y gastrointestinal. En sangre, el 70% está en los hematíes. Se acumula en riñones e hígado y ya se ha determinado su carcinogenicidad. (Ochial, 1195). En lo que respecta al cromo (Cr), su absorción, distribución y excreción es muy variable y depende principalmente de sus características fisicoquímicas y de la solubilidad del metal. Algunos compuestos trivalentes se absorben rápidamente y su concentración urinaria es elevada, pero es su forma hexavalente, que es sumamente tóxica, desafortunadamente es la especie química requerida y utilizada en los procesos industriales. (Corey, 1989).

En lo que respecta a la exposición ocupacional del plomo, su principal vía de ingreso es el pulmón y el 50% del Pb proveniente de esta vía se absorbe y distribuye a todo el organismo, mientras que un 75% es excretado por los riñones. (Corey, 1989).

Por último, la peligrosidad del mercurio metálico (Hg) radica en que se evapora a temperatura ambiental y es absorbido fácilmente por la vía respiratoria. En pulmones, los vapores de Hg son oxidados a Hg II, ligándose inmediatamente a las proteínas, consiguiendo así su forma organometálica para ser acumulada en riñones, hígado, bazo, huesos y células relacionadas con el sistema nervioso central (SNC). (Ramírez, 2006).

La toxicidad de los metales pesados descritos es muy alta. Su acción directa sobre los seres vivos ocurre a través del bloqueo de las actividades biológicas, es decir, la inactivación enzimática por la formación de enlaces entre el metal y los grupos -SH (sulfhidrilos) de las proteínas, causando daños irreversibles en los diferentes organismos (Vullo, 2003).

Existe vasta información sobre los efectos a la salud que pueden causar los metales pesados, incluyendo un incorrecto desarrollo del cuerpo humano, cáncer, daño a los órganos internos y trastornos al sistema nervioso. En altas dosis, los metales pesados pueden causar daños a diferentes partes del cerebro y en casos extremos la muerte (Barakat, 2011).

A pesar de todo lo anterior, las descargas de aguas residuales con metales pesados han ido en aumento, en los últimos años, debido a la rápida industrialización, pero sin el tratamiento apropiado.

2.2.1 Uso de bacterias tolerantes en el tratamiento de aguas residuales con contenido de metales pesados

El objetivo de los tratamientos de un agua residual es el de separar, concentrar y/o transformar los diferentes tipos de contaminantes presentes en el agua, para garantizar la calidad que exige la legislación y así poder verter el agua al cuerpo receptor final.

Existen muchas tecnologías para el tratamiento de aguas residuales municipales e industriales. Para estas últimas, el propósito particular es modificar las propiedades físicas y/o químicas de sus compuestos, además de disminuir o eliminar la toxicidad de estos elementos y lograr un vertimiento que cumpla con los requerimientos legales ambientales.

La remediación es usada para solucionar problemas generados por la dispersión de contaminantes en el ambiente. Se define como el uso intencional de procesos de degradación químicos o biológicos para eliminar sustancias contaminantes que han sido vertidos con conocimiento o accidentalmente en el ambiente. Los procesos de remediación pueden efectuarse *in situ*, o sea en el mismo lugar donde ha ocurrido la contaminación, o bien *ex situ*, separando la porción contaminada y trasladándola a un reactor (Vullo, 2003).

En específico, los microorganismos son considerados como contaminantes porque algunas especies son patógenas para el humano. No obstante, no sólo son perjudiciales para la salud, sino que realizan procesos que sustentan la vida y son utilizados en beneficio de la humanidad a través de desarrollos biotecnológicos. En efecto, los métodos más usados para el tratamiento de aguas residuales son los llamados sistemas biológicos, en los cuales los microorganismos son la parte fundamental del funcionamiento de los biorreactores, ya que de ellos depende la eficiencia en la remoción de los contaminantes al degradar la materia orgánica y transformar compuestos de nitrógeno y fósforo presentes en las aguas residuales (Knobelsdorf, 2005).

Así, la eficiencia de remoción de los contaminantes se encuentra en función, en gran medida, de la presencia de los organismos procarióticos. En este sentido, su tratamiento y certera cuantificación son procedimientos obligados y de suma importancia en el tratamiento de cualquier agua residual.

A los procesos de descontaminación de aguas y suelos donde intervienen elementos vivos (plantas, microorganismos, etc.) se les denomina procesos de biorremediación y surgen como una rama de la biotecnología que busca resolver los problemas de contaminación mediante el uso de seres vivos capaces de degradar compuestos que provocan desequilibrio en el ambiente.

En 1988 los científicos comenzaron a utilizar microorganismos para eliminar contaminantes y desechos tóxicos producidos por diversos procesos industriales. Por ejemplo, algunas bacterias pueden usar realmente contaminantes como fuentes de energía; otras producen enzimas que degradan toxinas en sustancias menos dañinas (Tortora y col., 2007).

Los mecanismos de acción bacteriana para la remoción de contaminantes son tan eficientes que incluso se utilizan enzimas bacterianas para la limpieza de sistemas hidráulicos que presentan obstrucciones, lo cual evita el uso de sustancias

químicas perjudiciales para el ambiente. Según la problemática a resolver, en algunos casos se utilizan microorganismos autóctonos del ambiente; en otros se emplean organismos procarióticos genéticamente modificados. Por diversas circunstancias, en la mayoría de los casos es mejor usar las bacterias nativas del sitio, principalmente por su adaptación natural a las condiciones climatológicas (Adams y col., 1999).

Entre las bacterias más empleadas para la biorremediación destacan ciertas especies de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* por la versatilidad y tolerancia que presentan (Tortora y col, 2007).

2.2.2 Humedales artificiales inoculados con cepas tolerantes para el tratamiento de metales pesados

Existen diversos sistemas de tratamiento de aguas residuales, entre los cuales destacan los de tipo biológico como los de lodos activados, los filtros percoladores, los reactores secuenciales por lotes, los digestores o reactores anaerobios y los humedales artificiales, siendo en efecto los más utilizados para el tratamiento de los efluentes municipales. Dentro del tren de tratamiento de aguas residuales, el sistema biológico (tratamiento secundario) se caracteriza por transformar la mayor cantidad de materia orgánica en CO₂ y agua, así como la asimilación y conversión de nutrientes a formas asimilables o liberadas del medio acuoso (hacia la atmósfera). Todo esto se realiza por mecanismos de acción bacteriana propios de su metabolismo. Se presentan algunos ejemplos en el siguiente apartado. (Durán-de-Bazúa, 1995).

En específico, los sistemas de humedales artificiales presentan altas eficiencias de remoción de compuestos tanto orgánicos como de metales pesados, debido a los procesos que resultan de las interacciones entre la vegetación, el medio de empaque y las bacterias (DeLaune y Pezeshki, 2001; Vymazal y Kröpfelová, 2009). De los dos primeros, se han realizado numerosos estudios con el fin de entender y optimizar los procesos que permiten la remoción de los metales pesados presentes en el agua residual. Sin embargo, para un completo

entendimiento y optimización, resulta conveniente investigar, también, sobre la intervención de las bacterias en el proceso, ya que desempeñan el papel más importante en la remoción de los mencionados contaminantes inorgánicos, lo cual se ha indagado de pruebas de aislamientos bacterianos expuesto a soluciones con metales pesados (Carballo-Valdés y col., 2009; Rodríguez y Rodríguez, 2002; Ruíz-López y col. 2010; Xie y col., 2010).

Así mismo, existen trabajos con bacterias tolerantes a metales pesados presentes en aguas residuales. Al respecto, se han realizado estudios recientes como el de Rathnayake y col. (2010) y el de Salgado-Bernal y col. (2012), en los cuales se han encontrado bacterias rizosféricas con tolerancia a altas concentraciones de metales pesados. Dichas bacterias se han estudiado ampliamente con el objetivo de evaluar el efecto de organismos tolerantes sobre la eficiencia de remoción de cromo y otros metales pesados en humedales artificiales a escala de laboratorio (Amábilis-Sosa y col., 2015; Pérez y Ganado, 2013).

Estos estudios sugieren la posibilidad de la remoción de metales pesados en sistemas de tratamiento secundario, en especial en los humedales artificiales de flujo subsuperficial por las características funcionales y constructivas que poseen. La remoción está sustentada en tres principios básicos: la actividad bioquímica de microorganismos, el aporte de oxígeno a través de la vegetación durante el día y el apoyo físico de un lecho inerte que sirve como soporte (medio de empaque) para el enraizamiento de las hidrófitas, y para el desarrollo de los microorganismos en forma de biopelícula (Kadlec y Wallace, 2009).

A pesar de los resultados positivos que se han reportado a lo expuesto acerca de los metales pesados, los organismos bacterianos requieren remover los contaminantes convencionales de un agua residual municipal como materia orgánica proveniente de moléculas de carbohidratos, lípidos y proteínas. Así como nutrientes inorgánicos disueltos y subsistir a las condiciones de oxígeno propias de los humedales artificiales. Todo esto se debe cumplir para considerarlas en el

tratamiento de aguas residuales municipales, independientemente de la tolerancia a los metales pesados.

En este sentido, en el siguiente apartado se elucida acerca del metabolismo bacteriano en función del tipo de contaminante presente en las aguas residuales.

2.3 Metabolismo bacteriano en la remoción de contaminantes de las aguas

2.3.1 Remoción de materia orgánica

Las bacterias pueden asimilar varios compuestos orgánicos carbonosos y usarlos para sus funciones metabólicas y síntesis de nuevo material celular. Los aminoácidos, los ácidos grasos, los ácidos orgánicos, los glúcidos, las bases nitrogenadas e incluso compuestos aromáticos pueden ser usados por unas u otras especies bacterianas. (Durán-de-Bazúa, 1995).

Las aguas residuales a tratar puede contener constituyentes físicos, químicos y biológicos, así como una mezcla de sustancias orgánicas e inorgánicas, suspendidas o disueltas. Las sustancias orgánicas constituyen la principal fracción de contaminantes en la mayoría de las plantas de tratamiento. El carbono orgánico predomina como una numerosa mezcla de sustancias disueltas y suspendidas que están formadas como base, por combinaciones de carbono, de hidrógeno y de hierro. En la mayor parte de las aguas residuales la fracción orgánica corresponde al 70% de la cantidad de materia sólida existente (Metcalf & Eddy, 2003; Tebutt, 1977) y el 30% restante es inorgánico. La Tabla 2 muestra la composición de esta materia orgánica presente, ya sea disuelta o suspendida.

Tabla 2. Compuestos orgánicos presentes en aguas residuales domésticas, expresados como porcentaje

COMPUESTO ORGÁNICO	SCOTTI (1968)	TEBUTT (1977)	METCALF & EDDY (2003)
Proteínas	40	65	40 - 60
Carbohidratos	50	25	25 - 50
Lípidos	10	10	10

A pesar de que la materia orgánica biodegradable no es perjudicial requiere de oxígeno disuelto para ser degradada, por lo que si se encuentra en exceso generará condiciones anóxicas o anaerobias, lo cual es perjudicial para las especies acuáticas que habitan en los cuerpos de agua ya que, además, crea condiciones favorables para el desarrollo de microorganismos patógenos. (Durán-de-Bazúa, 1995).

En la Figura 3 se muestra que, en el 2003, las industrias que contribuyeron con mayor carga de contaminantes en México a las aguas residuales fueron la azucarera, la petrolera y la agropecuaria (64% en conjunto) siendo el estado de Veracruz el que generó mayores descargas aguas residuales industriales (cerca del 40% del total nacional). (CONAGUA, 2014).

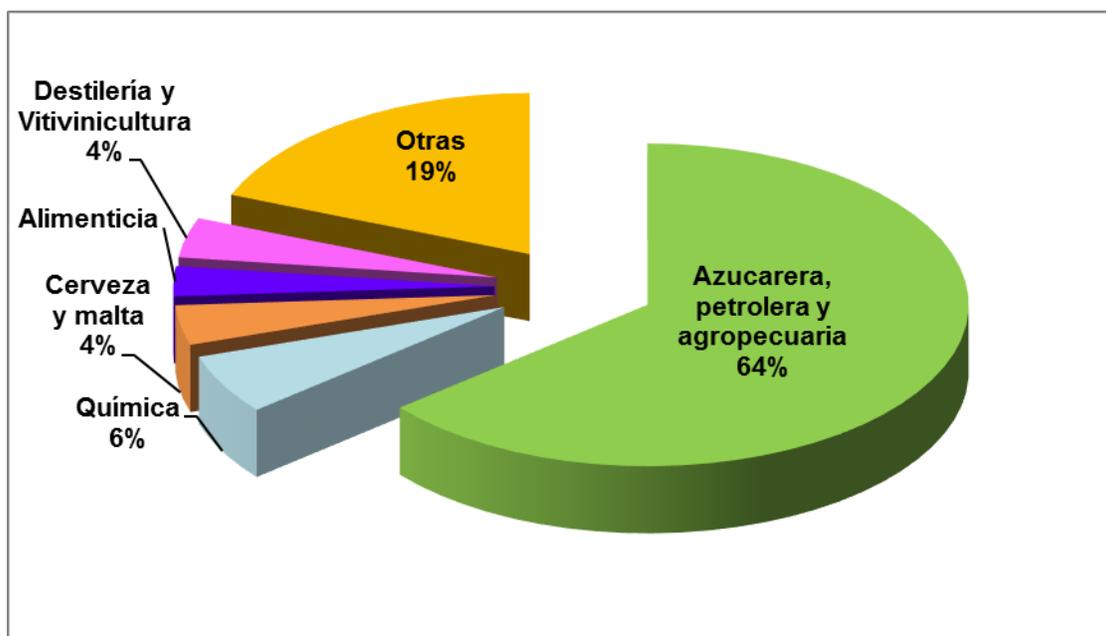


Figura 3. Materia orgánica descargada en aguas residuales por giro industrial.

Modificado de CONAGUA (2004)

Las proteínas presentes en las aguas residuales son generalmente las albúminas y globulinas. Todas las proteínas contienen carbono, común a todas las sustancias

orgánicas, oxígeno e hidrógeno. Además, como característica distintiva, contienen una elevada cantidad de nitrógeno. Así, la urea y las proteínas son los principales responsables de la presencia de nitrógeno en las aguas residuales y en grandes cantidades se relacionan con los procesos de eutrofización, ya que el nitrógeno es uno de los nutrientes esenciales para el desarrollo de los organismos fotosintéticos. Además, el exceso de proteínas es fuente de olores fuertes y desagradables (alteración de características organolépticas) (Metcalf & Eddy, 2003).

Por su parte, los carbohidratos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y, en particular, en las aguas residuales se encuentra presente en sus formas más comunes, tales como glucosa, sacarosa, almidón y celulosa. Contienen carbono, oxígeno e hidrógeno. Los más comunes contienen seis átomos de carbono por molécula (o un múltiplo de seis), y oxígeno e hidrógeno en las mismas proporciones en las que ambos elementos se hallan presentes en el agua residual; algunos, como la glucosa y la sacarosa, son solubles en agua y más fácilmente degradados por los microorganismos.

Los hidratos de carbono tienen tendencia a descomponerse por procesos enzimáticos. Los almidones, por otro lado, son más estables, pero se convierten en glúcidos de baja masa molecular por la actividad bacteriana así como por la acción de ácidos minerales diluidos. Desde el punto de vista del volumen y la resistencia a la descomposición, la celulosa es el hidrato de carbono cuya presencia en el agua residual es más importante por su más lenta o difícil biodegradación (Blundi, 1988).

Los lípidos son el tercer componente orgánico presente en las aguas residuales, provenientes de los alimentos como carnes, mantequilla, manteca de cerdo, margarina, gérmenes de cereales y semillas en general, nueces, del uso de aceites vegetales y ciertas frutas (Metcalf & Eddy y, 2003). Las membranas citoplasmáticas de todas las células contienen lípidos y muchos organismos producen materiales de reserva lipídicos y los contienen en su pared celular. Estas

sustancias son biodegradables y son sustratos excelentes para el metabolismo microbiano productor de energía, ya que se obtiene una alta eficiencia energética de ellas. De la misma forma, cuando las células mueren, su contenido de lípidos es catabolizado para generar CO₂ y agua como producto final del catabolismo (Madigan y col., 2009).

El término grasa, de uso extendido, engloba las grasas animales, aceites, ceras y otros constituyentes presentes en las aguas residuales. Las grasas animales y los aceites son compuestos de alcohol (ésteres) o glicerol (glicerina) y ácidos grasos. Químicamente son muy parecidos y están compuestos por carbono, oxígeno e hidrógeno en diferentes proporciones. (Baduí-Dergal, 1993).

Los compuestos lipídicos se hallan entre los compuestos orgánicos de mayor estabilidad, y su descomposición por acción bacteriana es más complicada que la de los carbohidratos y proteínas. La mayor parte de estos aceites flotan en el agua residual, aunque una fracción de ellos se incorpora al lodo residual como sólidos flotantes. Las partículas de estos compuestos interfieren en el normal desarrollo de la actividad biológica y son causa de problemas de mantenimiento y operación en las plantas de tratamiento. (Metcalf & Eddy, 2003).

Como ha sido descrito, la presencia de grasas y aceites en el agua residual puede provocar problemas, tanto en la red de alcantarillado como en las plantas de tratamiento. Además, si no se elimina el contenido de grasas antes del vertido del agua residual, puede interferir con la vida acuática de las aguas superficiales y crear películas y acumulaciones de materia flotante perjudiciales. (Durán-de-Bazúa, 1995).

Se pueden utilizar una variedad de parámetros para determinar el contenido de materia orgánica de las aguas residuales en una muestra dada. Los métodos más usados son las medidas indirectas que miden el déficit de oxígeno. Estas son la demanda bioquímica de oxígeno (DBO) y la demanda química de oxígeno (DQO). La DBO se encuentra relacionada con la cantidad de oxígeno disuelto que

consumen los microorganismos aerobios para degradar la materia orgánica presente en el agua residual. Por su parte, La DQO se refiere a la cantidad estequiométrica de oxígeno contenido en el ion Cr_2O_7^- necesario para oxidar la materia orgánica presente en el agua residual, por lo que brinda una medida más real de la cantidad de carbono orgánico disuelto, ya que el dicromato tiene un potencial oxidante más alto que el metabolismo bacteriano aerobio. (Durán-de-Bazúa, 1995).

2.3.2 Remoción de nitrógeno

Después del carbono, el nitrógeno es el elemento más abundante en las células, al ser constituyente primordial de las proteínas, de los ácidos nucleicos y de otros organelos celulares. Así mismo, es uno de los contaminantes más importantes del agua, ya que las actividades agrícolas e industriales han propiciado el incremento casi en un 100%, de la concentración de nitrógeno fijado anualmente en la biosfera (Berks y col., 1995; Bock y col., 1995).

Por una parte, el amoníaco (NH_3) presente en aguas residuales municipales se deriva principalmente de la orina y se forma en el sistema de alcantarillado mediante acción enzimática sobre la urea por la ureasa. Parte importante de este nitrógeno llega a los diferentes cuerpos de agua en la forma de amonio (NH_4), nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-) o dinitrógeno (N_2), creando problemas de toxicidad para los organismos acuáticos, principalmente, sobre aquellos relacionados con la eutrofización de lagos (Laws, 1993), de la cual ya se había mencionado. La mayor parte de las bacterias son capaces de usar amonio como única fuente de nitrógeno y otras muchas pueden usar las formas oxidadas nitratos y nitritos.

Existen métodos fisicoquímicos y biológicos para la eliminación de compuestos de nitrógeno del agua. Los primeros, en la mayoría de los casos, no resuelven el problema ya que trasladan el contaminante de un ambiente a otro. Los métodos biológicos sí eliminan al contaminante y, en condiciones idóneas, sus productos finales son CO_2 y N_2 . (Soto-Esquivel y col., 2013).

Los compuestos nitrogenados constituyen nutrientes clave para el crecimiento de los seres vivos, así que el nitrógeno puede ser eliminado del agua si es asimilado por microorganismos, pero el manejo de la biomasa producida de este modo resulta en sí un problema. Por ello, los procesos biológicos no asimilativos, como la nitrificación y la desnitrificación, han constituido la forma más efectiva, sostenible y económicamente factible de eliminación de nitrógeno de las aguas residuales (Halling-Sørensen y Jörgensen, 1993).

Para la eliminación del nitrógeno en los sistemas de tratamiento de aguas residuales se requiere la nitrificación y posterior desnitrificación. La transformación se da tanto en los suelos como en las aguas a través de la acción de las bacterias y no se conoce ninguna bacteria que sea capaz de transformar directamente el amonio a nitrato. En esta oxidación participan más bien dos grupos de bacterias para que haya primero una oxidación de amonio a nitritos y posteriormente de nitritos a nitratos. En cada una de ellas participan microorganismos de géneros diferentes, como *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosolobus*, *Nitrosospira* y *Nitrosovibri*. Las bacterias nitrificantes quimioautótrofas son las responsables de la conversión del amoniaco en nitritos y posteriormente en nitratos (Parés y Juárez, 1997).

Para eliminar completamente los compuestos de nitrógeno del agua, es necesario el proceso de desnitrificación, que es la reducción de las formas oxidadas (nitratos y nitritos), previamente formadas a partir del nitrógeno amoniacal. Sin embargo, la capacidad de realizar este proceso metabólico, está limitada a algunas bacterias. En efecto, las especies activas se encuentran restringidas a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Paracoccus*, aunque *Thiobacillus desnitrificans* y ocasionalmente especies como *Chromobacterium*, *Corynebacterium*, *Hyphomicrobium* o *Serratia* pueden realizar también este proceso (Parés y Juárez, 1997).

El primer paso de la desnitrificación es la reducción de NO_3^- a NO_2^- , seguido de la reducción de NO_2^- a NO y de la reducción de NO a N_2O , siendo la última etapa la reducción del N_2O a N_2 , (forma gaseosa del nitrógeno que es transferida a la atmósfera) en donde cada reducción tiene una velocidad específica de reacción que depende de las características cinéticas de cada enzima participante.

En la Figura 4 se puede observar la ruta de eliminación del nitrógeno de las aguas residuales, basada en los procesos antes descritos de nitrificación-desnitrificación

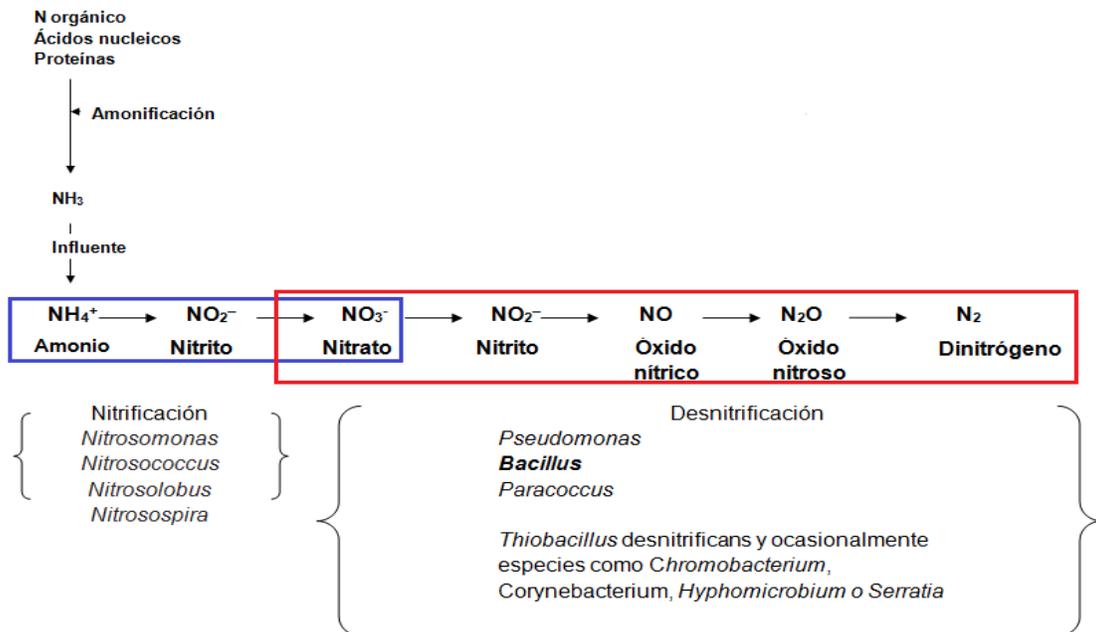


Figura 4. Ruta de eliminación biológica del nitrógeno de las aguas residuales (construcción de la autora)

Los altos niveles de compuestos de nitrógeno en las descargas de aguas residuales ocasionan impactos negativos en la calidad del agua al relacionarse con el fenómeno de eutrofización. Por esta razón deben ser eliminados junto con el carbono orgánico durante el tratamiento de aguas residuales, aunado a que sus niveles máximos de concentración se encuentran indicados en la normativa mexicana e internacionales.

Acorde con esto es importante conocer la viabilidad del uso de las cepas tolerantes estudiadas en función de su contribución a la remoción de nitrógeno ya que, a diferencia de los compuestos hasta ahora descritos, el nitrógeno no es asimilado de manera directa (sólo una pequeña cantidad de amonio para la síntesis de proteínas). En efecto, la remoción del nitrógeno implica dos procesos acoplados entre sí que, como ya se mencionó arriba en términos generales, se denominan nitrificación y desnitrificación.

Por otra parte, el fósforo en aguas residuales se encuentra principalmente como fosfatos y en formas orgánicas (ya asimilado por los organismos). La contaminación de agua por este elemento tiene su fuente principal en el uso de productos de limpieza con compuestos fosfatados (efecto surfactante). Es esencial para el desarrollo de los organismos y puede ser un nutrimento limitante de la productividad primaria. La incorporación de aguas residuales o tratadas en los cuerpos de agua provoca un incremento en sus concentraciones, lo cual a la vez estimula el crecimiento acelerado de macro y microorganismos, provocando eutrofización (por el decaimiento de oxígeno disuelto) con la desventaja, a diferencia del nitrógeno, que no está presente como una especie química gaseosa que pueda ser transferida a la atmósfera (Chapra, 1997). Sin embargo al ser asimilado de forma orgánica e inorgánica para la síntesis celular, de material genético y de ATP por parte de los microorganismos procarióticos, es susceptible de ser removido de las aguas residuales con un adecuado tren de tratamiento y control operacional (Masters y Ela, 2008).

2.3.3 Requerimientos de oxígeno de los microorganismos y su importancia en el tratamiento de aguas residuales

La limpieza y depuración de las aguas residuales, implica operaciones unitarias como son la sedimentación y la filtración para los materiales en suspensión, pero los procesos biológicos que se llevan a cabo en el proceso de tratamiento son los de mayor importancia ya que transforman el material disuelto en suspendido siendo los microorganismos el reactivo, el reactor y el producto. Por eso es

primordial entender los mecanismos de los microorganismos que son precisamente los que realizan la parte clave del proceso. (Durán-de-Bazúa, 1995).

Los microorganismos, para desarrollar sus funciones metabólicas, requieren nutrientes que provean energía y condiciones físicas entre las que destaca el suministro de oxígeno. Esto es tan importante, que en el ámbito del tratamiento de aguas residuales los sistemas son clasificados según el nivel de oxígeno con el que trabajen (aerobios, facultativos y anaerobios). (Durán-de-Bazúa, 1995).

La degradación aerobia implica, en presencia de oxígeno, la oxidación de las proteínas, las grasas y carbohidratos en una secuencia sumamente compleja (incluyendo por hidrólisis, glucólisis y ciclo de Krebs) que, finalmente, producen agua y dióxido de carbono (CO_2). Además, si persisten las condiciones oxidantes, el nitrógeno amoniacal producido por la hidrólisis de los compuestos nitrogenados y que no escapa a la atmósfera en forma de gas, se oxida a nitritos y posteriormente a nitratos. (Durán-de-Bazúa, 1995).

Por su parte la degradación anaerobia de la materia orgánica también tiene como productos finales el CO_2 y agua, pero también metano y sulfuro de hidrógeno dada la presencia de bacterias acidogénicas y arqueas metanogénicas aunque en este caso los compuestos que promueven las reacciones de oxidación-reducción son los sulfatos, entre otros. (Durán-de-Bazúa, 1995).

Con lo anterior, se denota la importancia de la presencia de oxígeno en los procesos de tratamiento de aguas residuales, ya que determinan el tipo de microorganismos que degradan la materia orgánica. Desde otra perspectiva, un consorcio bacteriano determina el tipo de sistema de tratamiento a utilizar dependiendo de sus requerimientos de oxígeno o sustancias oxidantes.

2.3.4 Interacción entre microorganismos y metales pesados

Todas las interacciones entre los microorganismos y los metales u otros elementos como carbono, nitrógeno, azufre y fósforo son componentes fundamentales de los ciclos biogeoquímicos. (Manahan, 2007).

La toxicidad de los metales pesados se encuentra en función de mecanismos moleculares como el desplazamiento de iones metálicos esenciales de biomoléculas y bloqueo de sus grupos funcionales, la modificación de la conformación activa de biomoléculas, especialmente enzimas y polinucleótidos, la ruptura de la integridad de biomoléculas y modificación de otros agentes biológicamente activos. (Cervantes, 2001).

Dependiendo del estado de oxidación que presente un metal y la especie que esté conformando, un microorganismo puede realizar dos transformaciones posibles. Una correspondería a la movilización del metal, es decir el paso de un estado insoluble inicial correspondiente a una fase sólida, a un estado soluble final, en fase acuosa. Este proceso se conoce como el nombre de lixiviación microbiana. En contraste, el otro corresponde a la inmovilización del metal, es decir, el paso de un estado soluble inicial en fase acuosa a uno insoluble final en fase sólida. (Cervantes, 2001).

Dentro de la amplia diversidad microbiana, existen organismos resistentes y organismos tolerantes a metales. Los resistentes se caracterizan por poseer mecanismos de desintoxicación codificados genéticamente, inducidos por la presencia del metal (Silver y Phung, 2005).

En cambio, los tolerantes son indiferentes a la presencia o ausencia del metal. Tanto los microorganismos resistentes como tolerantes son de particular interés como captadores de metales en sitios contaminados, debido a que ambos pueden extraer los contaminantes. La resistencia o tolerancia experimentada por microorganismos es posible gracias a la acción de diferentes mecanismos como la

biosorción, bioacumulación, biomineralización, biotransformación y quimiosorción, los cuales son descritos a través de la Figura 5 y que se detallarán más adelante (Vullo, 2003).

2.3.4.1 Biosorción

La biosorción es un fenómeno ampliamente estudiado en la biorremediación de diversos metales pesados como el cromo y plomo. Se trata de utilizar biomasa “muerta” en la que los microorganismos son utilizados como biosorbentes, por lo general aislados a partir de ecosistemas contaminados. (Vullo, 2003).

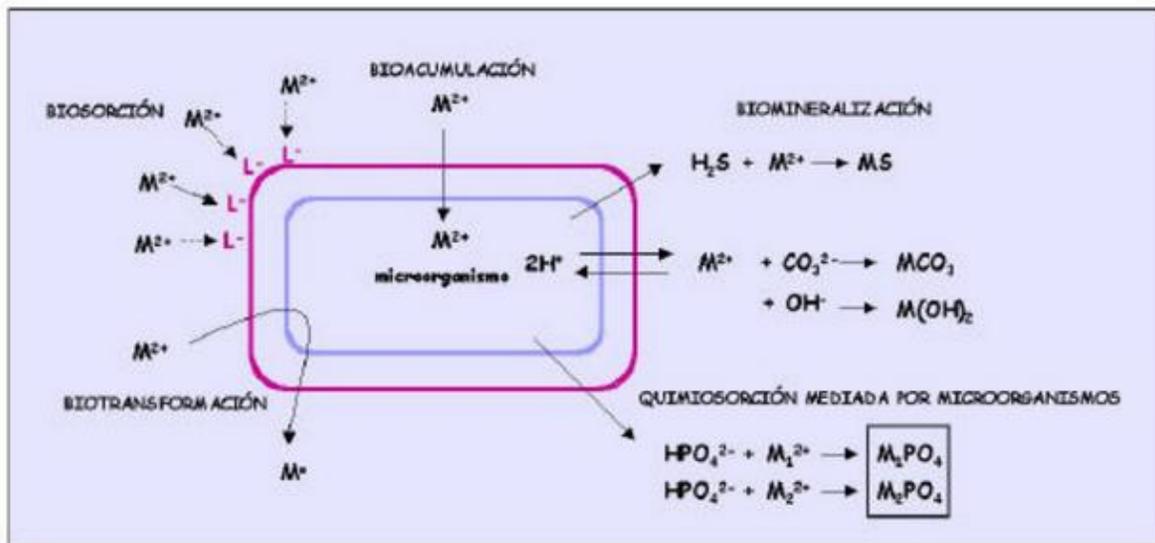


Figura 5. Mecanismos de interacción entre metales pesados y microorganismos (Vullo, 2003)

Se caracteriza por retener los metales pesados en intervalos de tiempo relativamente cortos al entrar en contacto con el medio acuoso. Esto minimiza los costos en un proceso de remediación, ya que no requiere la adición de nutrientes al sistema, al no requerir un metabolismo microbiano activo. La biomasa capaz de participar en estos procesos es fácilmente extraíble de los sistemas acuosos como cursos de aguas o efluentes de diversos orígenes, por lo que el proceso global de biorremediación resulta rentable. Es por ello que la búsqueda de este tipo de

microorganismos se encuentra en crecimiento constante, junto con el estudio de sistemas biosorbentes, basados en el uso de consorcios microbianos o sistemas mixtos, formados por microorganismos y macromoléculas (polímeros) sorbentes, que incrementarían los rendimientos en la captación de mezclas de metales pesados (Vullo, 2003).

Los fenómenos de biosorción se caracterizan por la retención del metal mediante una interacción fisicoquímica del metal con ligandos pertenecientes a la superficie celular. Esta interacción se produce con grupos funcionales expuestos hacia el exterior de la célula perteneciente a partes de moléculas componentes de las paredes celulares, como por ejemplo carboxilo, amino, hidroxilo, fosfato y sulfhidrilo. En efecto, las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia para tolerar los efectos nocivos de los metales tóxicos (Silver y Phung, 2005).

Entre ellos se encuentran principalmente los que involucran: componentes celulares que capturan a los iones y neutralizan su toxicidad, enzimas que modifican el estado redox de los metales o metaloides convirtiéndolos en formas menos tóxicas y transportadores de la membrana que expulsan las especies nocivas del citoplasma celular (Vullo, 2003).

2.3.4.2 Bioacumulación

Este mecanismo celular involucra un sistema de transporte de membrana que se encarga de introducir el metal pesado que se encuentra en el entorno celular (alrededores) hacia la célula, a cambio de un considerable gasto de energía. Este consumo energético se genera a través del sistema H^+ -ATPasa. Una vez incorporado el metal pesado al citoplasma, es secuestrado por la presencia de proteínas ricas en grupos sulfhidrilos llamadas metalotioneínas o también puede ser dirigido a una vacuola, como ocurre en los hongos y plantas. Algunos ejemplos de este proceso son muy interesantes, como el caso de acumulación de uranio por

la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, el cual fue detectado íntegramente en el citoplasma, al igual que en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Lovley, 2000).

2.3.4.3 Biomineralización

Los microorganismos son capaces de precipitar metales y radionúclidos en formas químicas como carbonatos e/o hidróxidos, mediante un mecanismo de resistencia basado en la codificación de plásmidos. En términos generales, este mecanismo se basa en expulsar el metal tóxico presente en el citoplasma hacia el exterior celular en contracorriente a un flujo de H^+ (que ingresan hacia el interior celular). Prácticamente funciona como un sistema de bombeo a contracorriente. La expulsión de los metales va acompañada con sustancias extracelulares (restos de ADN) que da lugar a una alcalinización localizada sobre la superficie celular externa y por lo tanto la precipitación del metal pesado (Vullo, 2003).

Otra forma de precipitar los metales es a través de la formación de sulfuros o fosfatos, como resultado de alguna actividad enzimática celular. Un ejemplo de ello es la precipitación de sulfuros metálicos en reactores con cultivos mixtos de bacterias reductoras de sulfato (Lovley, 2000) o la acumulación de CdS en la pared celular de las bacterias *Klebsiella planticola* y *Pseudomonas aeruginosa* (Sharma y col., 2000; Wang y col., 1997).

2.3.4.4 Biotransformación

Este es un proceso que involucra un cambio químico del metal pesado, provocando por la acción metabólica de la bacteria. Los más evidenciados son el cambio del estado de oxidación o metilación. Esta transformación biológica de los metales pesados que resultan tóxicos mediada por enzimas microbianas puede dar como resultado compuestos poco solubles en agua o bien compuestos volátiles. El ejemplo más claro es el ciclo del Hg en la naturaleza, donde la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* puede reducir el catión Hg^{2+} a Hg^0 y otros

organismos pueden luego metilarlo dando como producto el CH_3Hg^+ y $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$, que son volátiles y aún más tóxicos que el propio Hg elemental. (Cervantes, 2001).

Las reducciones de V(V) a V(III), Au(III) a Au(0) y Cr(VI) a Cr(III) conducen a la precipitación del metal bajo condiciones fisiológicas. Entre estos últimos, el Cr es el metal más ampliamente utilizado en la industria de aceros, automóviles, equipamiento de hospitales y curtiembres, entre otras. El Cr(VI) es un contaminante de prioridad 1 catalogado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos, ya que es estable en solución acuosa y por lo tanto de alta movilidad en diferentes ambientes, con un alto potencial mutagénico y carcinogénico. El paso a Cr(III) produce la inmovilización por precipitación de hidróxidos y la disminución en el grado de mutación. La utilización de microorganismos resistentes a Cr con capacidad de bioconversión del Cr (VI) en Cr(III) es de fundamental importancia en el tratamiento biológico de efluentes industriales (Lovley, 2000; Srinath y col., 2002).

2.3.4.5 Quimiosorción mediada por microorganismos

Dentro de este término se pueden describir aquella clase de reacciones en donde los microorganismos biomineralizan un metal, formando un depósito primario. Este depósito funciona como núcleo de cristalización, con la subsecuente deposición del metal de interés, promoviendo y acelerando así el mecanismo de mineralización.

Un ejemplo de este proceso es la adición de Fe a un efluente a tratar en presencia de bacterias reductoras del sulfato. Estos microorganismos producen sulfuros que precipitan en forma de FeS, sobre la superficie celular. Los otros metales contaminantes utilizan el FeS formado como soporte y cristalizan sobre sus cristales. Luego, aprovechando las propiedades magnéticas del Fe, pueden separarse fácilmente de la fase soluble, descontaminando así el material (Lovley, 2000).

Cualquiera de los mecanismos microbianos arriba mencionados, posibilita la remoción de los metales pesados presentes en efluentes contaminados. En paralelo, los microorganismos autóctonos que sobreviven en sitios contaminados han desarrollado mecanismos de resistencia y/o tolerancia que son útiles a la hora de la implementación de procesos de biorremediación. Los microorganismos y sus productos pueden ser bioacumuladores muy eficientes de metales solubles y particulados, En efecto, las tecnologías basadas en los microorganismos ofrecen una alternativa para el tratamiento y/o recuperación de diversos metales (Lovley, 2000).

Una de las ventajas del uso de las bacterias en el tratamiento de las aguas residuales, es que al final del proceso se generan biosólidos (lodos residuales) que precisamente son los microorganismos pero como biomasa muerta, la cual puede ser empleada como un bioadsorbente, eliminando el problema de la toxicidad, provocada no sólo por metales disueltos, sino también por las condiciones adversas de postoperación. Sin embargo, el uso de células no vivas solamente remueve metales por biosorción, a diferencia de la utilización de microorganismos vivos, los cuales presentan más de un mecanismo de los mencionados en este apartado. En cualquier caso, ambos aspectos son ventajas del uso de bacterias tolerantes a metales pesados en el tratamiento de aguas residuales (Lovley, 2000).

2.4 Cuantificación bacteriana

Es importante contar con un método de cuantificación bacteriana, para conocer el funcionamiento de cualquier tecnología de biorremediación, es por eso que el siguiente apartado se detalla las características de metodologías conocidas para el conteo de microorganismos.

En general, los ensayos de cuantificación microbiana se agrupan en métodos directos y métodos indirectos. Con los primeros se determina la cantidad total de

microorganismos (vivos y muertos), en tanto que con los segundos se cuantifica únicamente a los microorganismos vivos (viables) (Ramírez-Gama y col., 2011).

El “crecimiento” microbiano hace referencia al aumento del número de microorganismos a lo largo del tiempo y no al aumento de tamaño de un microorganismo y el aumento del número de microorganismos permite la formación de colonias o de poblaciones. Es por eso que en microbiología, la palabra growth en inglés se tradujo como “crecimiento” para estudiar por poblaciones y no en microorganismos individuales, ya que las bacterias se reproducen generalmente por fisión binaria. El resultado de la fisión binaria son dos células hijas por cada célula madre, así, una célula se divide en dos, dos en cuatro y cuatro en ocho y así sucesivamente, dando una cinética de reproducción de “crecimiento” de tipo exponencial.

2.4.1 Métodos directos para el recuento de células totales

Mediante los métodos directos se establece la población total de microorganismos existentes en una muestra. Tienen la ventaja de ser rápidos; sin embargo, a través de ellos es imposible diferenciar a las células vivas de las muertas. La estimación del número total de microorganismos se realiza por turbidimetría, microscópicamente o con contadores electrónicos (Ramírez-Gama y col., 2011).

2.4.1.1 Recuento microscópico

En el método de recuento directo se puede determinar el número de células de una población, mediante el uso de un microscopio, en muestras fijadas sobre un portaobjeto y para muestras líquidas se emplean cámaras de recuento especiales.

El recuento directo por microscopía es un método rápido para conocer el número de células. Sin embargo, presenta ciertas limitaciones; en primer lugar no distingue las células vivas de las muertas, las células pequeñas son difíciles de ver en el microscopio y algunas posiblemente se pierden en el recuento. Además, en

ocasiones la precisión es difícil, se requiere de un microscopio de contraste de fases cuando la muestras no se tiñen. El método no suele ser adecuado para suspensiones con baja densidad celular y las células móviles se deben inmovilizar antes del recuento (Madigan y col., 2009).

2.4.1.2 Turbidimetría

En una suspensión microbiana, la cantidad de microorganismos está directamente relacionada con su turbiedad o densidad óptica e inversamente relacionada con la cantidad de luz que pasa por la misma. De este modo, se puede precisar con bastante exactitud el número de microorganismos presentes en una suspensión mediante la determinación de la turbiedad. Para ello se emplean nefelómetros o espectrofotómetros (Figura 6).

La suspensión microbiana se deposita en un tubo claro, se dirige una fuente de luz constante hacia la suspensión (luz incidente) y mediante una celda fotoeléctrica se registra la intensidad de luz transmitida que sale de la celda de cuarzo u otro material transparente (cubeta, por traducción literal del inglés o el francés). La metodología es útil con suspensiones de densidad microbiana baja y con cultivos, en donde los microorganismos son unicelulares y con un tamaño de unos cuantos micrómetros, características que les permiten mantenerse suspendidos y homogéneamente distribuidos; en tanto que con microorganismos de mayor tamaño, así como aquellos productores de polisacáridos, este tipo de metodología no es adecuada (Ramírez-Gama y col., 2011).

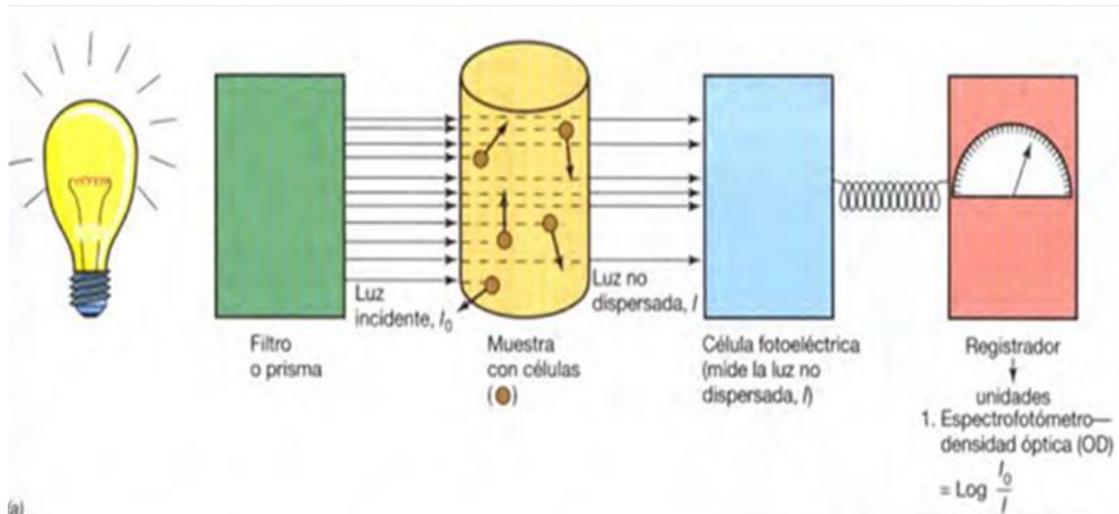


Figura 6. Medidas turbidimétricas del desarrollo microbiano realizadas en un espectrofotómetro o un fotómetro (Madigan y col., 2009).

La longitudes de onda más utilizadas para medir la turbidez bacteriana son 540 nm (verde), 600 nm (naranja) y 660 nm (rojo). Los espectrofotómetros miden solamente luz no dispersada y las unidades se expresan en unidades fotométricas como unidades de densidad óptica (DO) (Madigan y col., 2009).

2.4.1.3 Obtención de una curva estándar

En el caso de organismos unicelulares, la densidad óptica es proporcional (dentro de ciertos límites) al número de células. Por consiguiente, las lecturas de turbidez pueden usarse como un sustituto de los métodos de recuento directo. Sin embargo, antes de utilizar la turbidez como sistema para estimar el número de células, se debe preparar primero para cada microorganismo a estudiar una curva estándar relacionando alguna medida directa del número de células (microscópica o recuento de viables) o de la masa (masa seca) con la medida indirecta obtenida con la turbidez. Tal curva de calibración puede contener datos, tanto del número de células como de la masa celular, permitiendo una estimación de ambos parámetros a partir de una simple lectura de la turbidez (Madigan y col., 2009).

Las medidas de turbidez pueden ser razonablemente precisas y tienen la virtud de ser rápidas y fáciles de realizar. Además, estas determinaciones se pueden hacer normalmente sin destruir o modificar significativamente la muestra. Por estos motivos, las medidas de turbidez se usan con frecuencia para seguir la velocidad de crecimiento en los cultivos microbianos. La misma muestra puede medirse repetidamente y los resultados se puede representar semilogarítmicamente con respecto al tiempo y usarse para calcular el tiempo de generación de un cultivo en crecimiento (Madigan y col., 2009).

2.4.1.4 Contadores electrónicos

Existen varios modelos para efectuar el recuento de microorganismos. En éstos se hace pasar un volumen conocido de la muestra a través de un pequeño orificio de 5 a 10 μm de diámetro, mediante manipulación con una micropipeta de mercurio. La resistencia a través del orificio está normalizada y se altera cada vez que un microorganismo pasa a través de él, la modificación de la resistencia se amplifica y ese registra electrónicamente. Con estos métodos se valora la población total, que incluye células vivas y muertas. Este dato es útil pero en ocasiones es necesario conocer la población de microorganismos vivos y activos. Con tal fin se aplican otros métodos conocidos como recuento de organismos viables que no son muy exactos, pero proporcionan la forma de estimar la cantidad de ciertos grupos fisiológicos en una muestra dada. El método usual para realizar una determinación de células viables se basa en contar el número de células de la muestra que es capaz de formar colonias sobre un medio sólido adecuado. Por esta razón, el recuento de células viables también se llama recuento en placa o recuento de colonias. En este procedimiento se supone que cada célula viable puede formar una colonia (Ramírez-Gama y col., 2011).

2.4.2 Métodos indirectos de recuento de células viables

2.4.2. 1 Método de dilución y vertido en placa

El método de dilución y vertido en placa involucra la dispersión de la muestra que se estudia en un medio con agar. Se basa en el supuesto de que cada célula bacteriana, incluida en el medio con agar o en su superficie, al multiplicarse dará origen a un cúmulo de células que producen una colonia. Se realiza en recuento en aquéllas que se presenten entre 30 y 300 colonias, las que se reportan como Unidades Formadoras de Colonias (UFC). El principal inconveniente de este método es que no existe ningún medio de cultivo o grupo de condiciones de incubación que permitan el desarrollo de todos los grupos microbianos. Esto indica que el estudio de muestras con poblaciones heterogéneas involucra el recuento de cada grupo microbiano o fisiológico por separado, en donde el microbiólogo empleará tantos medios de cultivo y condiciones de incubación como grupos microbianos le interese cuantificar (Madigan y col., 2009).

Los cuidados que se deben tener siempre presentes al desarrollar esta metodología, corresponde a efectuar la medición exacta y precisa del volumen del diluyente y de la muestra y en agitar y mezclar bien todas las suspensiones microbianas. En la inoculación y vertido en placa se debe medir el volumen exacto de la muestra, mantener el medio de cultivo a la temperatura recomendada y efectuar la homogeneización de la muestra y el medio de cultivo con rapidez (Ramírez-Gama y col., 2011).

En la Figura 7 puede observarse un esquema del procedimiento de diluciones de 1:10 a 1:100.000 a partir de tubos de ensaye, en donde cada tubo de ensaye contiene 1 mL del inóculo (Tortora y col., 2007).

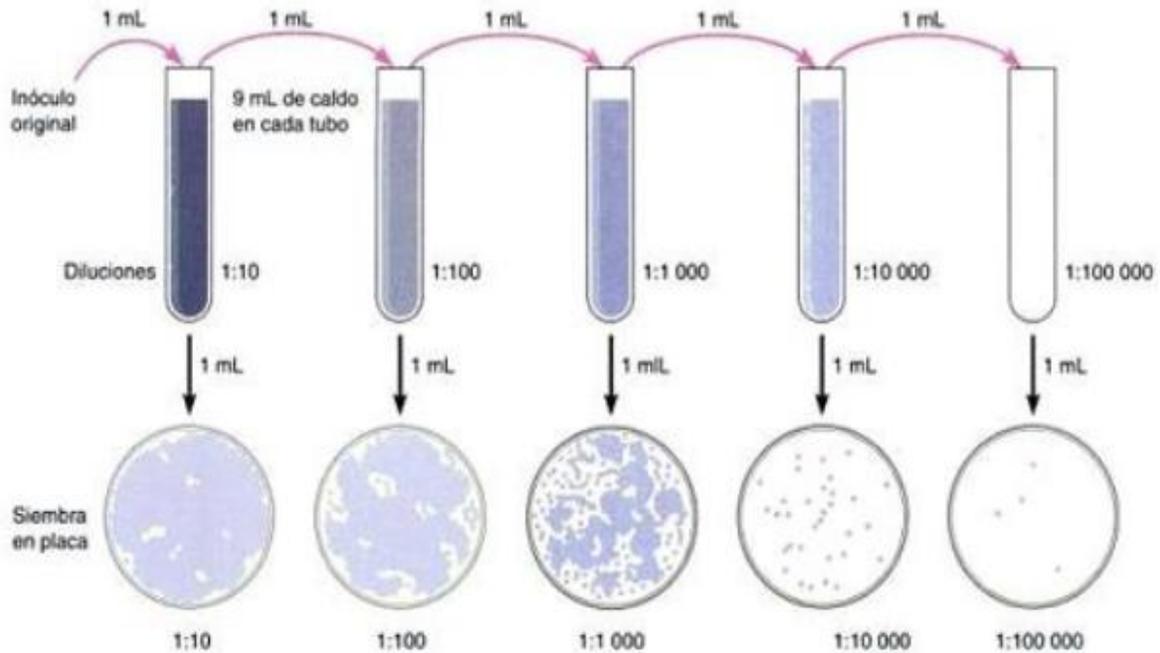


Figura 7. Método de diluciones seriadas para recuento en placa de colonias (Tortora y col., 2007)

2.4.2.2 Método de la gota o de Miles y Misra

Se emplean pipetas Pasteur previamente calibradas o agujas hipodérmicas del número 19 (1.06 mm), de las que se eliminan los biseles y las puntas, se desengrasan con cloroformo y se procede a comprobar su exactitud. En este tipo de conteo se liberan de 48 a 52 gotas por mililitro. El método consiste en colocar un número determinado de gotas de la muestra diluida sobre las placas de agar con superficie seca. Después de que las gotas son totalmente absorbidas por el agar, se invierten las placas y se incuban. Después de la incubación se seleccionan las placas que tengan colonias aisladas en el área en que se colocaron las gotas, de preferencia, aquéllas que contengan menos de 40 colonias por gota.

2.4.2.3 Recuento por filtro de membrana

Este procedimiento es muy útil para establecer el número de microorganismos en muestras que contienen una población muy reducida de microorganismos. En este caso, volúmenes grandes de aire o líquido se filtran a través de una membrana porosa, en donde se concentran los microorganismos. La membrana con los microorganismos retenidos se coloca en una placa sobre una almohadilla saturada con el medio de cultivo adecuado y se procede a la incubación. Los portafiltros están hechos de metal o de vidrio y se componen de un embudo inferior acoplado a uno superior. Ambos, se sujetan mediante pinzas o anillo empalmador. Por su parte, los filtros son discos delgados de éster de celulosa poroso, de unos 120 μm de grueso y, principalmente, con una porosidad de 0.45 μm . Los poros de las capas superiores son más pequeños que los de la cara inferior. De esta forma, los microorganismos quedan retenidos en la parte superior y el medio de cultivo asciende fácilmente hasta ellos por capilaridad (Madigan y col., 2009).

A ciertos medios de cultivo se les adicionan colorantes, los que al ser absorbidos por los microorganismos, facilitan el recuento de las UFC desarrolladas sobre la cuadrícula de la membrana.

2.4.2.4 Número más probable

El método conocido como del Número Más Probable (NMP) es específico para organismos coliformes y se clasifica como un técnica de recuento de células viables, fundamentado en la teoría de la probabilidad, donde la enumeración de organismos coliformes puede realizarse mediante el empleo de medios de cultivo líquidos y sólidos con características selectivas y diferenciales. El principal inconveniente en la utilización de la técnica NMP es su especificidad para microorganismos patógenos por lo que el resto de los organismos procarióticos no son cuantificados. En el caso que ocupa esta investigación, que es el de las aguas residuales, existen ambos tipos y el método solamente cuantifica a los primeros, limitando su utilidad.

2.4.3 Consideraciones sobre el recuento bacteriano

El conteo directo empleando el método conocido como de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) es aceptado y avalado internacionalmente, con la ventaja es que genera certidumbre en los resultados al contar células viables. Su desventaja es que se requiere de un mayor número de materiales ya que por la misma certidumbre requiere el uso de un mínimo de siete diluciones de la muestra a analizar, además del tiempo que implica.

Para concluir esta parte de los fundamentos, puede decirse que la estimación del número total de microorganismos realizada por turbidimetría podría precisar con exactitud el número de microorganismos totales, viables y no viables, presentes en una suspensión mediante la determinación de la turbiedad, empleando nefelómetros o espectrofotómetros (Madigan y col., 2009).

Además, como se había mencionado, la densidad óptica es proporcional al número de células bacterianas, por lo que, las lecturas de turbidez pueden usarse como un sustituto de los métodos de recuento directo. Sin embargo, antes de utilizar la turbidez con este fin, primero se debe preparar una curva de calibración, que permita relacionar la medida indirecta obtenida con la turbidez con una medida directa del número de células (microscópica o mediante recuento de organismos viables) que se encuentre normada o estandarizada internacionalmente. Aunado a esto, las medidas de turbidez pueden ser precisas y tienen la virtud de ser rápidas y fáciles de realizar.

Con base en lo anterior, resulta conveniente, establecer un método de cuantificación rápida calibrado estadísticamente en cuanto a precisión y exactitud para la determinación del número de células microbianas presentes en algún(os) tipo(s) de agua residual.

A continuación se presenta la metodología seguida en esta investigación.

3. METODOLOGÍA

3.1 Caracterización bacteriana

3.1.1 Aislados bacterianos

Las cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo provienen de la investigación conducida por Salgado y col. (2012), quienes las aislaron de la rizosfera de plantas hidrófitas de la especie *Typha dominguensis*, seleccionadas de tres humedales naturales pertenecientes a la cuenca hidrográfica Almendares-Vento, en la Ciudad de La Habana, Cuba, para posteriormente evaluar su tolerancia hacia diversos metales pesados. Los autores aislaron 58 cepas, de las cuales se seleccionaron cinco denominadas como TAN117, TAN119, TAN217, TAN 1113 y TAN 1115, que actualmente se encuentran bajo registro del GenBank (simultáneamente disponibles en EMBL, Europa y DNA Data Bank, Japón), bajo la referencia de Salgado y col. (2012). La selección se realizó con base en su mayor capacidad para tolerar metales pesados, además de que fueron las únicas que exhibieron la habilidad de disminuir su concentración de la fase acuosa.

Las cepas con las que se trabajó se encontraban en medio con agar nutritivo a 4°C en posición inclinada. Éstas se resembraron en nuevo medio previamente preparado y esterilizado. De cada cepa inoculada en medio sólido con agar nutritivo, se preparó un frotis con ayuda de un asa bacteriológica sobre un portaobjetos con una gota de agua destilada. Se dejó secar a condiciones ambientales y, finalmente, las preparaciones fueron fijadas con calor del mechero (Ramírez-Gama y col., 2011).

3.1.2 Caracterización morfológica y de requerimientos de oxígeno

La tinción de Gram es un procedimiento de gran utilidad empleado en los laboratorios de microbiología. Se define como una tinción diferencial, ya que utiliza

dos colorantes y clasifica a las bacterias en dos grandes grupos: bacterias Gram negativas y bacterias Gram positivas (Madigan y col., 2009).

Acorde con lo anterior, se hizo una tinción diferencial para cada cepa aislada utilizando Cristal Violeta como primer colorante, seguida de una solución de yodo para, posteriormente, decolorar la muestra con una mezcla de alcohol etílico-acetona y, finalmente, se aplicó Safranina como colorante de contraste. Así, con ayuda del microscopio óptico (Olympus Official Modelo CH30), se realizaron las observaciones morfológicas con objetivo de 100x, adicionando a la preparación una gota de aceite de inmersión (Ramírez-Gama y col., 2011).

Una de las características de las especies de *Bacillus*, que es exclusiva entre todos los microorganismos aerobios de importancia ambiental, es la capacidad de producir esporas. Dichos componentes celulares no se tiñen con los métodos comunes, como la tinción simple y la tinción de Gram, porque estos colorantes no atraviesan sus paredes (Madigan y col., 2009).

Dado que la presencia de endosporas es importante para indagar sobre los mecanismos de remoción de metales pesados en aguas residuales, se procedió a utilizar la tinción Schaeffer y Fulton descrita en el Manual de Microbiología (Ramírez-Gama y col., 2011). En este orden de ideas, se aplicó el colorante primario Verde de Malaquita a una película seca fijada con calor y se calentó nuevamente hasta la emisión de vapores durante aproximadamente 5 minutos. El calor ayudó a que el colorante atravesara la pared de la endospora. Luego se lavó el preparado con agua durante aproximadamente 30 segundos para eliminar el exceso de Verde de Malaquita de todas las partes de las células salvo de las endosporas. A continuación se aplicó safranina sobre la película seca presente en el portaobjetos, conocida coloquialmente como “extendido”. La safranina es un colorante de contraste para teñir las porciones de la célula distintas de las endosporas. En un extendido preparado de modo adecuado, las endosporas aparecen verdes dentro de células rojas o rosadas (Tortora y col., 2007);

posteriormente, se hicieron las observaciones con el microscopio óptico antes mencionado.

Por otro lado, se determinó el efecto del oxígeno sobre el desarrollo de las cepas microbianas mediante el medio tioglicolato (Figura 8) para conocer, por una parte, si las cepas seleccionadas cuentan con la característica necesaria para subsistir bajo las condiciones de oxígeno de las aguas residuales, en las que por lo general se presentan condiciones anóxicas-anaerobias (Madigan y col., 2009) y, por la otra, para conocer si el método indirecto de cuantificación bacteriana, detallado más adelante, es aplicable a dichas aguas residuales. Este método fue elegido por la completa información que proporciona, ya que también indica si la bacteria es facultativa con preferencias aerobias o facultativa con preferencias anaerobias (Ramírez-Gama y col., 2011).



Figura 8. Medio con tioglicolato donde se pueden apreciar las dos zonas principales, óxica y anóxica

3.2 Caracterización bioquímica bacteriana

La caracterización bioquímica de las cepas bacterianas se realizó en función de la remoción de materia orgánica disuelta de las aguas residuales. Esto es, la capacidad de metabolizar a CO₂ y agua, las macromoléculas de carbohidratos, proteínas y lípidos que, en las aguas residuales, son expresadas como materia orgánica y constituyen el contaminante mayoritario (Madigan y col., 2009).

3.2.1 Degradación de la caseína

Para determinar si los microorganismos estudiados son capaces de degradar proteínas, como la caseína, se prepararon tubos con caldo nutritivo y leche descremada en polvo con campana de Durham, en los cuales se inocularon aproximadamente 0.5 mL de las cepas aisladas previamente puestas en desarrollo 24 horas en caldo nutritivo. Se dejaron en incubación por 24 horas a 30°C y posteriormente se les midió el pH y se realizaron las observaciones pertinentes (Ramírez-Gama y col., 2011).

3.2.2 Biodegradación de carbohidratos

La utilización de hidratos de carbono por parte de los microorganismos estudiados se corrobora experimentalmente mediante la prueba de biodegradación de carbohidratos en tubos con medio base Rojo de Fenol y sacarosa como hidrato de carbono biodegradable. Por lo tanto, la degradación del compuesto orgánico se observa por la acidez en el medio de cultivo y la formación de gas capturado en la campana de biodegradación (Ramírez-Gama y col., 2011).

Aunado a lo anterior, mediante la técnica analítica de la demanda química de oxígeno (DQO) descrita en la NMX-AA-030-SCFI-2001 (DOF, 2013), se cuantificó la asimilación de la materia orgánica por parte de los microorganismos. El método se basa en que una gran cantidad de compuestos orgánicos e inorgánicos son oxidados por acción de dicromato de potasio en solución ácida. Acorde con esto,

se prepararon muestras de agua residual sintética con contenido inicial de DQO conocido (a partir de sacarosa) y se introdujeron las cepas en estudio. Una vez transcurrido el tiempo de residencia hidráulico o de contacto sugerido por Amábilis-Sosa y col. (2015), se les determinó la concentración final de DQO, que es equivalente a la cantidad de carbohidratos asimilados por el consorcio bacteriano. Cabe mencionar que en las aguas residuales municipales, la materia orgánica equivale a la cantidad de carbohidratos, lípidos y proteínas presentes en el medio acuoso.

3.2.3 Hidrólisis de lípidos

Esta prueba se realiza para determinar la capacidad de los microorganismos para producir la enzima lecitinasa, evidenciada por la aparición de la opacidad en el medio con yema de huevo, siendo una prueba típica requerida para la identificación de especies de *Bacillus*. En este orden de ideas, se sembraron los microorganismos estudiados mediante una estría recta en una placa de agar yema de huevo y se incubaron durante 48 horas a 30°C para, posteriormente realizar las observaciones. La prueba se hizo según lo descrito por McFaddin (2003).

3.2.4 Reducción de nitratos

La nitrificación solamente la realizan cierto grupo de bacterias que afortunadamente se encuentran en aguas residuales municipales y que no es ninguna de las cepas utilizadas en el presente estudio. En contraparte, la desnitrificación puede ser conducida por un mayor número de bacterias facultativas y/o anaerobias en ausencia de oxígeno molecular. Así, la prueba de desnitrificación fue realizada para determinar la capacidad de los microorganismos de reducir nitratos y nitritos, ya que junto con el carbono, el nitrógeno se encuentra en exceso en las aguas residuales siendo un riesgo para los cuerpos de agua a los que son descargadas (Metcalf & Eddy, 2003).

La parte analítica consiste en preparar tubos con caldo nitrito por cada cepa aislada y después de su incubación se añaden los reactivos A y B de Griess-Ilosvay en cantidades iguales, en donde el nitrito reacciona con dos reactivos añadidos: ácido sulfanílico y dimetil-a-naftilamina (o a-naftilamina), lo cual revela la presencia de nitritos a partir de nitratos reducidos.

La reacción de color se debe a la formación de un compuesto diazonio, psulfobenceno-azo-a-naftilamina. Cuando la prueba resulta negativa se utiliza la prueba del zinc para forzar a reducir químicamente los nitratos presentes a nitritos y formar el compuesto colorido a partir de los reactivos de Griess-Ilosvay (Ramírez-Gama y col., 2011).

3.3 Utilización de un método indirecto para cuantificar las bacterias en aguas residuales

Con la finalidad de proponer un método para la cuantificación rápida bacteriana, a continuación se detallan los pasos seguidos basados, por una parte, en la tolerancia del consorcio bacteriano utilizado, lo que permitió que se cuente con un amplio rango de concentración bacteriana a cuantificar y, por otro lado, el procedimiento se fundamenta en un análisis estadístico utilizado para validar métodos analíticos, en los que es primordial la precisión y exactitud.

3.3.1. Curva de calibración y cuantificación bacteriana

La validez del método de cuantificación indirecto a proponer, se encuentra en función de la semejanza estadística que exhiba con el método de cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC), que es el avalado y estandarizado por diversas instancias internacionales. Así, en primer lugar se realizó una curva de calibración graficando las concentraciones en UFC mL⁻¹ (abscisas) contra la absorbancia medida en cada una de ellas (ordenadas). En primer término, el consorcio microbiano conformado por las cinco cepas seleccionadas fue incubado a 30°C durante 24 horas en cinco matraces que contenían caldo nutriente.

Además, cada matraz contenía una concentración diferente de la mezcla de mercurio, plomo y cromo, con la finalidad de inhibir el crecimiento microbiano en rangos controlados. Acorde con esto, en la Tabla 3 se indican las concentraciones de metales pesados utilizadas para obtener diferentes concentraciones bacterianas del consorcio. Este experimento se fundamenta en la metodología propuesta por Amábilis-Sosa y col. (2015).

Una vez aplicadas las diferentes concentraciones de metales (sustancias inhibidoras del crecimiento) al consorcio bacteriano, se tomaron dos muestras, una para la determinación de UFC por el procedimiento descrito por Beishir (1996) y otra para la lectura de la absorbancia de cada solución. Estas últimas se realizaron a una longitud de onda de 400 nm en un espectrofotómetro UV-Visible marca GBC Cintra 5.

Tabla 3. Concentración bacteriana en función de la concentración de metales pesados (\pm desviación estándar)

Plomo, mg L ⁻¹	Mercurio, mg L ⁻¹	Cromo, mg L ⁻¹	Concentración bacteriana UFC mL ⁻¹ x10 ⁵
0	0	0	300 \pm 29
0.82	0.003	0.53	270 \pm 31
5.5	0.02	3.5	220 \pm 21
16.5	0.06	10.5	100 \pm 14
33	0.12	21	39 \pm 3
66	0.24	42	0.12 \pm 0.01
110	0.4	70	0.02 \pm 0.01

Los resultados de absorbancia y concentración bacteriana en UFC mL⁻¹ fueron relacionados a través de una curva de calibración, en la que a cada valor de absorbancia le corresponde una concentración bacteriana en UFC mL⁻¹ para así obtener la ecuación de la curva resultante.

Por otra parte, se recolectaron seis muestras de agua residual provenientes de diferentes fuentes para medirles sus absorbancias. Estos valores de absorbancias fueron utilizados para calcular sus UFC mL⁻¹ teóricas a través de la ecuación de la curva de calibración previamente obtenida. Así, a las mismas seis muestras se les determinó su concentración bacteriana por el método directo de UFC y los resultados se contrastaron estadísticamente contra las UFC teóricas (obtenidas a partir de la curva de calibración). Todos los análisis fueron conducidos con cinco réplicas. Además las diferentes muestras de agua residual fueron caracterizadas para indagar sobre el efecto de algún parámetro sobre la validez del método de cuantificación bacteriana propuesto.

3.3.2 Determinaciones analíticas y análisis estadísticos

Los parámetros que se les midieron a cada una de las seis muestras de agua residual fueron valor de pH, conductividad eléctrica, potencial redox, sólidos suspendidos totales, sólidos suspendidos volátiles y carbono orgánico de manera indirecta expresado como demanda química de oxígeno (DQO). Las primeras tres determinaciones se realizaron a través de una sonda multiparamétrica marca Hanna modelo HI 9828. Por su parte, los sólidos suspendidos se calcularon por el método de la NMX-AA-034-SCFI-2001 (DOF, 2001) y la DQO por el procedimiento descrito en la NMX-AA-030-SCFI-2001 (DOF, 2013). Como se mencionó anteriormente, cada uno de estos parámetros puede indicar la aplicabilidad del método de cuantificación propuesto, a través de valores inusuales, o bien en conjunto, indicarán el tipo de agua residual y si dicho método es aplicable.

Para evaluar la certidumbre del método indirecto propuesto, todos los resultados teóricos de concentración bacteriana fueron analizados a través del método r&R (*Reproducibilidad y Repetitividad*), el cual permite evaluar tanto la precisión como la exactitud. La primera a través de la variación observada en el proceso y la segunda por medio de un estudio de exactitud, que examina las diferencias existentes entre el promedio de las mediciones observadas (teóricas) y un valor de

referencia o “valor maestro” que en este caso son las UFC mL⁻¹ medidas experimentalmente (Montgomery, 2012). La evaluación de la certidumbre se realizó con base en lo descrito por ASTM (1999) e ISO (1995), donde r&R <10 son valores confiables entre laboratorios o entre métodos (como este caso). Valores de r&R mayores a 10 y menores a 30 no son confiables, pero pueden someterse a algún ajuste analítico o estadístico para ser aceptados. Finalmente, los valores r&R>30 presentan mucha variación y certidumbre para ser tomados en cuenta.

Como una última etapa, se aplicó un análisis de covarianza entre los valores de las determinaciones fisicoquímicas realizadas y los resultados de la prueba r&R, para, identificar a qué tipo de aguas residuales es aplicable el método propuesto. Para este y todos los análisis, se empleó el paquete estadístico Minitab 15 para Windows (MINITAB, 2007).

3.4 Identificación de la influencia de la densidad bacteriana en humedales artificiales sobre la remoción de metales pesados

Si las cepas tolerantes a metales pesados resultan viables en el tratamiento de aguas residuales, es posible que además ofrezcan la ventaja de interactuar para la remoción de metales pesados, ya que al ser tolerantes a dichos compuestos, su densidad bacteriana podría influir en la capacidad de remoción. Para comprobar esto, se tomaron los datos experimentales de Amábilis-Sosa y col. (2015), quienes cuantificaron la remoción de plomo y cromo en dos tipos de humedales artificiales. Unos contenían bacterias metalotolerantes y los otros sólo contenían bacterias convencionales de un agua residual. Los parámetros que se tomaron en cuenta fueron el porcentaje de remoción de cada metal y la cantidad de bacterias presentes en el sistema en UFC mL⁻¹. Acorde con lo anterior, se correlacionó el porcentaje de remoción de plomo y cromo con la concentración bacteriana, tanto de los humedales con bacterias tolerantes, como de los humedales con bacterias convencionales. Esto se hizo para contrastar las diferencias entre los dos tipos de humedales utilizados que, a la vez, se encuentra en función del tipo de organismos presente en ellos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización bacteriana

4.1.1 Características morfológicas las cepas tolerantes

En la Tabla 4 se encuentran plasmadas las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de cada una de las cepas utilizadas en este trabajo, así como la clasificación de Gram y la identificación genética del género de cada cepa, cuya base de datos se encuentran publicados en GenBank (simultáneamente disponibles en EMBL, Europa y DNA Data Bank, Japón) bajo la referencia de Salgado y col. (2012).

Tabla 4. Caracterización morfológica, fisiológica y bioquímica de las cepas metatolerantes utilizadas en las fases experimentales

Características	Cepas bacterianas				
	Morfológicas/fisiológicas/bioquímicas	TAN117	TAN119	TAN217	TAN1113
Morfología	BI	Bc	Bc y BI	BI	Dp
Agrupación	C	s/a	s/a	C	s/a
Tinción de Gram	+	+	+	+	+
Tinción Schaeffer y Fulton	SB	T	T	T	T
<i>Bacillus subtilis</i>	√	N/A	N/A	N/A	N/A
<i>Bacillus mojavenensis</i>	√	N/A	N/A	N/A	N/A
<i>Bacillus vallismortis</i>	√	N/A	N/A	N/A	N/A
<i>Bacillus thuringiensis</i>	N/A	√	N/A	√	√
<i>Bacillus mycooides</i>	N/A	√	N/A	√	√
<i>Bacillus sp.</i>	N/A	N/A	√	N/A	N/A
<i>Bacillus weihenstephanensis</i>	N/A	√	N/A	N/A	N/A
Requerimientos de oxígeno	A	A	AN	A	A
Degradación de la caseína	+	+	+	+	+
Fermentación de carbohidratos	+	+	+	+	+
Hidrólisis de lípidos	+	+	+	+	+
Reducción de nitratos	+	+	+	+	+

+: Positivos; N/A: No Aplica; BI: Bacilos largos; Bc: Bacilos cortos; Dpc: Dipobailos cortos; C: Cadena; s/a: sin agrupación; SB: Subterminal; T: Terminal; A: Aerobio; AN: Anaerobio

Entre los diferentes resultados durante la caracterización destaca, en primer lugar, que las cinco cepas bacterianas sean del género *Bacillus* y Gram positivas tal y como se aprecia en la Figura 9. Este resultado coincide con diversos estudios, en donde dicho género de bacterias, tienen un potencial uso biotecnológico para el tratamiento de aguas residuales. Además, es similar a los reportados por Benavides y col. (2006), quienes utilizaron bacterias del género *Bacillus* para la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo.

Los resultados en la tinción fueron los esperados, al ser todas las cepas Gram positivas. En efecto, estas cepas pertenecen al género *Bacillus*, por lo que la resistencia de estas hacia los metales pesados puede estar relacionada con las características fisicoquímicas de la pared celular, propia de las bacterias Gram positivas, ya que se sabe que uno de los mecanismos más importantes por lo que resultan tóxicos hacia las células es la penetración hacia el citoplasma, inhibiendo procesos enzimáticos básicos y la desnaturalización de las lipoproteínas. Ambos procesos se ven disminuidos al encontrarse la pared celular Gram positiva como barrera bioquímica. La pared celular de las bacterias Gram positivas, también realiza fenómenos de adsorción de superficie (sorción física y fuerzas de Van der Waals) al estar compuestas en su mayoría por peptidoglicanos que funcionan como agentes quelantes (Abou-Shanab y col., 2007; Rathnayake y col., 2010).

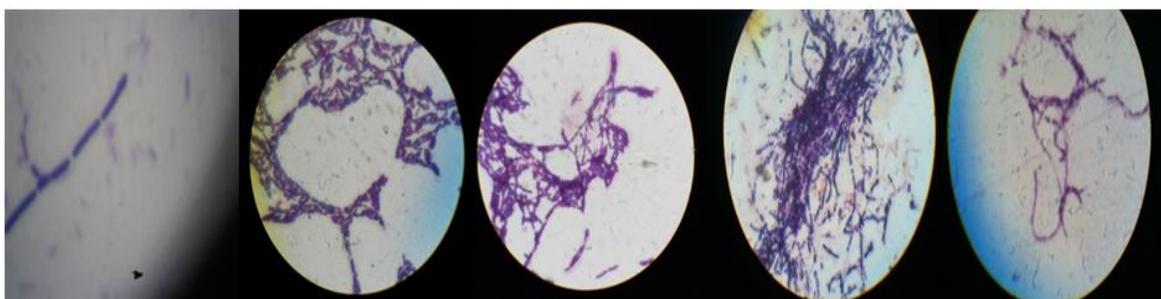


Figura 9. Resultados de la Tinción de Gram. De izquierda a derecha, TAN117, TAN119, TAN217, TAN1113 y TAN1115.

Por otra parte, la prueba de tinción de Schaeffer-Fulton, relativa a la formación de endosporas, reveló que las cinco cepas utilizadas para conformar el consorcio bacteriano dieron positivo, tal y como se indica en la Figura 10, en la cual se muestran dos de estas cepas y se indica la presencia de las endosporas por medio de los matices verdes (algunas encerradas en círculos amarillos en diversas posiciones, ya sean de localización terminal, subterminal o central. Por otra parte, las células vegetativas se tiñen de color rosa.

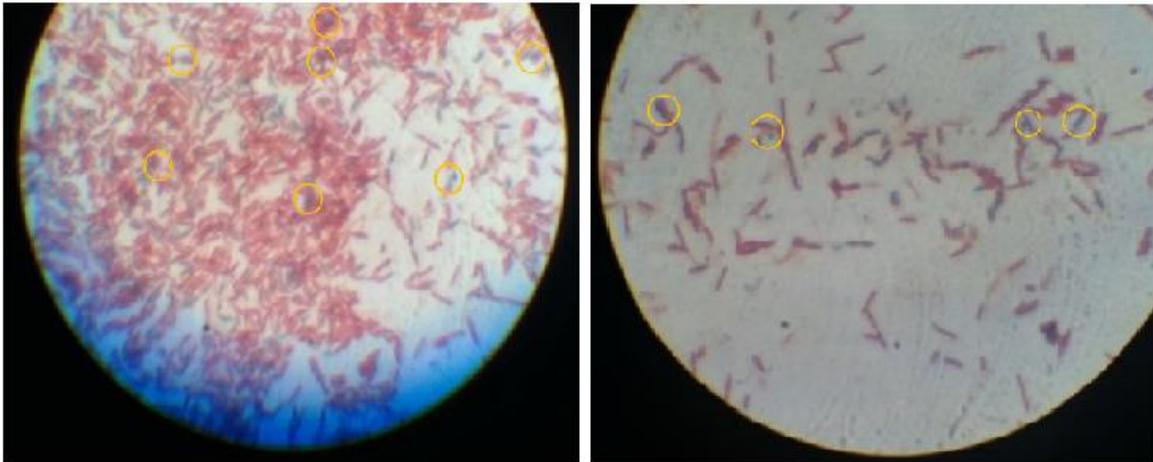


Figura 10. Ejemplo de los resultados para la tinción de endosporas. Posición terminal de la endospora correspondiente a TAN.1115 (izquierda) y posición subterminal de la espora correspondiente a TAN117 (derecha)

Este resultado, aunado al hecho de ser Gram positivas, puede sustentar la tolerancia hacia los metales pesados por parte de las cinco cepas bacterianas, ya que las endosporas son una estructura que es producida por algunos microorganismos procarióticos como *Bacillus*, *Clostridium* y *Sporosarcina*. Las endosporas son resistentes y latentes y, al formarse dentro de la célula, protegen a las bacterias de las condiciones ambientales adversas. Estos estudios contribuyen a elucidar sobre los mecanismos de resistencia bacteriana hacia los compuestos metálicos (Madigan, 2009, Manahan y col., 2007; Srinath y col., 2002).

4.1.2 Requerimientos de oxígeno

Para conocer los requerimientos de oxígeno de las cepas estudiadas se utilizó el medio tioglicolato de sodio, tal y como se describió en la metodología. La interpretación de esta prueba se basa en la observación del crecimiento microbiano por medio de turbidez del tubo. El medio, ya solidificado, se divide en tres secciones a lo largo del tubo (parte superior con condiciones aerobias, parte media con condiciones microaerobias o facultativas y parte inferior con condiciones anaerobias). Como se observa en la Figura 11, las cepas TAN 117, TAN 119, TAN 1113 y TAN 1115, proliferaron en la parte más cercana a la superficie, de manera gradual hacia la parte media del tioglicolato. Esto indica que los microorganismos son facultativos con preferencias aerobias. Así mismo, en la Figura 12 se muestra que la cepa TAN 217 presentó un crecimiento microbiano mayor en la profundidad del medio de cultivo y de menor intensidad en la parte media del tioglicolato, lo cual se interpreta como de que se trata de un microorganismo facultativo pero con preferencias anaerobias.

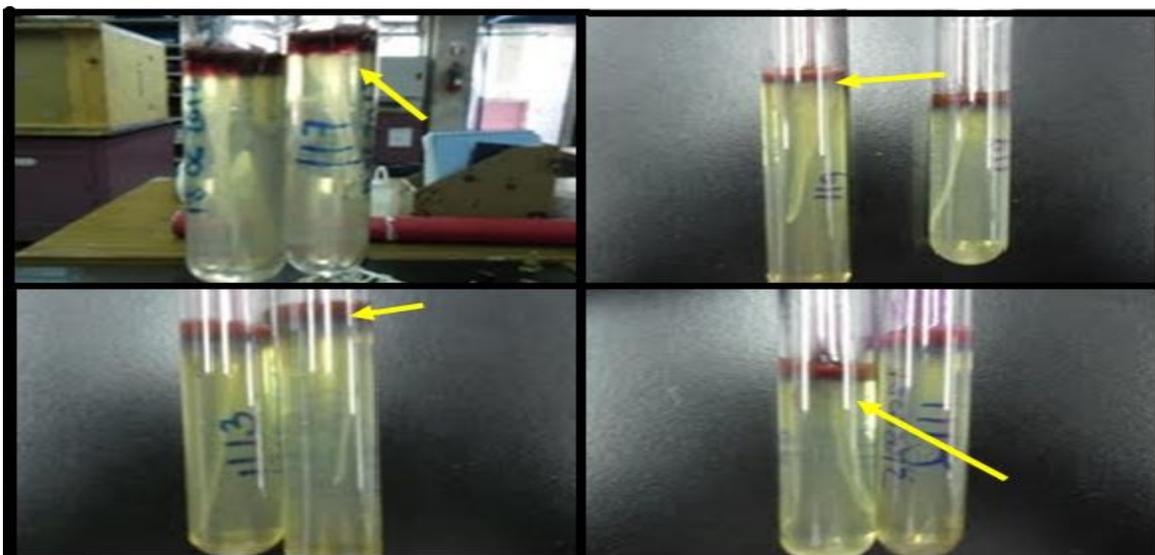


Figura 11. Resultados de la prueba de requerimientos de oxígeno para las cepas TAN117 (izquierda superior), TAN119 (derecha superior), TAN1113 (izquierda inferior) y TAN1115 (derecha inferior), las cuales tienen mayor crecimiento en la zona óxica del medio tioglicolato

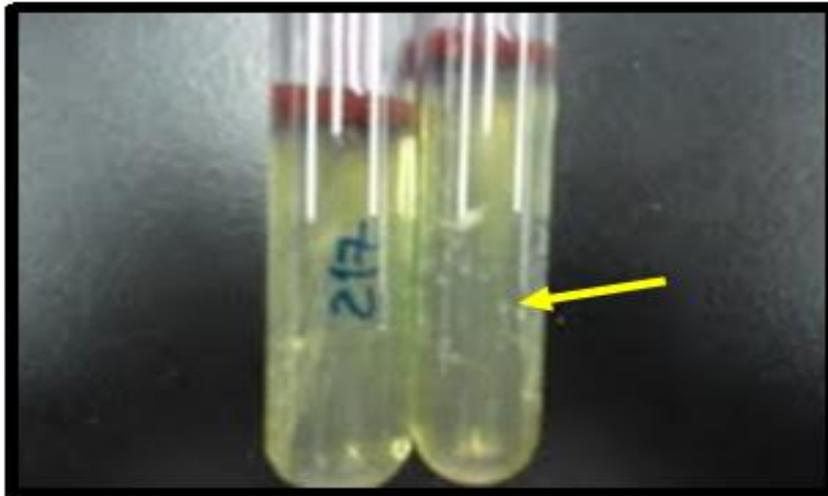


Figura 12. Resultado de la prueba de requerimientos de oxígeno para la cepa TAN217, la cual tiene mayor crecimiento en la zona anóxica del medio tioglicolato

Los resultados anteriores indican que las cinco cepas estudiadas se desarrollan adecuadamente bajo las condiciones de poca disponibilidad de oxígeno, equiparables con las de las aguas residuales, las cuales por lo general son anóxicas-anaerobias (Madigan y col., 2009).

4.2 Pruebas bioquímicas en función de los contaminantes de las aguas residuales

4.2.1. Remoción de proteínas

Las cepas tolerantes estudiadas en esta investigación dieron positivo para la prueba bioquímica de la degradación de caseína. Los principales ingredientes de la leche son en su mayor parte lactosa y caseína, seguidas por lactoalbúmina y lactoglobulina y, en menor proporción, también algo de grasas y vitaminas. Las cepas tolerantes estudiadas al lograr biodegradar la lactosa, produjeron una reacción ácida, lo que conllevó a precipitar las proteínas y así formar un coágulo insoluble-gelatinoso adherido a las paredes del tubo, que es soluble en

condiciones alcalinas, lo cual puede ser observado en la Figura 13 (a). Los microorganismos además produjeron gas, por lo que las burbujas rompieron el coágulo a medida que ascendían por el tubo de ensaye y al juntarse en el extremo superior del medio, formaron espuma.

Otro tipo de coágulo se formó por la conversión de la sal soluble de caseína en un precipitado insoluble de caseinato de calcio, este proceso es catalizado por las enzimas reninas, pepsina y quimiotripsina que se encuentran en la leche y que son activadas por los iones H^+ . Este coágulo o cuajo es suave y presentaba fluidez al inclinarse el tubo. Además, a diferencia del coágulo del párrafo anterior, no es soluble en condiciones alcalinas. Esta falta de solubilidad hace que el coágulo se separe de los costados del tubo de ensayo después de algunas horas, dando lugar a un líquido residual gris claro, el cual también puede ser observado en la Figura 13.



Figura 13. Resultados de la prueba de degradación de la caseína

La degradación de las proteínas tiene como uno de los productos el amoníaco (NH_3^+), lo que provoca un pH alcalino, aunque al registrar su lectura (pH=7.7) se vio que está todavía en el intervalo circumneutro pero mayor que 7. La prueba de la peptonización se basa en que las proteínas pasan de estado coloidal a cristaloides, por lo que el medio opaco se torna pardo sucio. Esta transformación es descendente quedando traslúcido al final, lo cual puede ser observado en la Figura 13 (b).

Los resultados obtenidos de esta prueba bioquímica, señalan que las cepas tolerantes a metales pesados pueden degradar la fracción de la materia orgánica compuesta por proteínas y aminoácidos, que se encuentran en grandes cantidades en ciertos tipos de aguas residuales con influencia de rastros (conocidos también como mataderos) y criaderos (Crites y Tchobanoglous, 2000; Masters y Ela, 2008, Davis y Cornwell, 1998).

4.2.2 Remoción de carbohidratos

La biodegradación de un compuesto orgánico se observó por la acidez en el medio de cultivo y la formación de gas capturado en la campana correspondiente. El uso del medio caldo rojo de fenol con sacarosa fue usado para la identificación bioquímica de microorganismos basándose en su capacidad para degradar la sacarosa. En dicha prueba, la peptona de caseína proporcionó al medio los nutrientes necesarios para el desarrollo de las cepas tolerantes y el indicador de pH fue el rojo de fenol que presentó el viraje de rojo a amarillo, derivado de la degradación de la sacarosa realizada por los microorganismos.

Uno de los objetivos de esta prueba bioquímica fue corroborar la presencia de la enzima invertasa, la cual al estar presente en los microorganismos, es capaz de romper a la sacarosa en fructosa y glucosa fermentándose esta última. Dicho cambio es evidenciado por el viraje de color del indicador Rojo de Fenol que, al ser fermentado este hidrato de carbono, provoca una disminución en el pH del

medio cambiado su color rojo inicial, siendo prueba positiva la presencia de gas en la campana de Durham y el medio color amarillo.

Con los resultados de esta prueba, se puede suponer que los microorganismos son capaces de biodegradar tanto a la sacarosa, después de invertirla a sus monómeros, como otros glúcidos que son vertidos o formados en las aguas residuales como segunda etapa del catabolismo microbiano.

4.2.3 Remoción de lípidos

Los resultados de la prueba de degradación de lípidos, indicaron que existió aparición de lecitinasa positiva, lo cual es demostrado por la aparición de una zona opaca alrededor del “crecimiento” microbiano que, a su vez, es resultado de la hidrólisis de la lecitina de la yema de huevo, propia del medio de cultivo. Esta prueba se utilizó para determinar la capacidad de los microorganismos estudiados para producir la enzima lipasa, que cataliza la hidrólisis de triglicéridos y diglicéridos a ácidos grasos y glicerol para, posteriormente, ingresar a la glucólisis. En la Figura 14 se puede observar una zona opaca de precipitación alrededor del desarrollo microbiano.

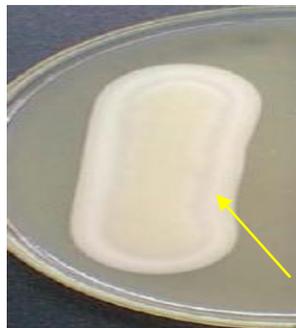


Figura 14. Resultado de la prueba con lecitinasa

Uno de los contaminantes particulares por su hidrofobicidad lo representan las grasas y aceites (Tchobanoglous y col., 2003) que, aunque no son un contaminante obligado a ser removido biológicamente, sería conveniente que las bacterias que remueven la materia orgánica, también lo hagan aunque esta esté

compuesta en parte por grasas y así poder prescindir de la trampa de grasas que involucra más espacio y costos dentro de los trenes de tratamiento de aguas residuales.

4.2.4 Reducción de nitrógeno

Al realizar la prueba de reducción de nitratos a nitritos, todas las cepas dieron resultados positivos con excepción de la denominada TAN 217 (Tabla 4), lo cual indica que, al utilizar el consorcio bacteriano, es muy posible que ocurra desnitrificación durante el tratamiento de aguas residuales. Además, dado que primero existirá una nitrificación por parte de bacterias que se encuentren en el agua residual y una desnitrificación por las cepas tolerantes a metales, se estaría removiendo completamente el nitrógeno presente.

La cepa TAN 217 fue la única que no presentó color rojo al adicionar los reactivos de Griess por lo que, en función de lo mencionado en el Manual de Microbiología (Ramírez-Gama et. al., 2011), se le agregó óxido de zinc para corroborar que los nitratos estuvieran presentes. En efecto, se produjo la coloración rojiza característica.

El hecho de que la cepa 217 haya sido la única que no logró reducir los nitratos, se encuentra relacionado con sus requerimientos de oxígeno ya que, a través de la prueba del medio tioglicolato, se indicó que son facultativos pero con preferencias anaerobias. Esto es, al acabarse el oxígeno molecular su metabolismo empieza a funcionar anaerobiamente, buscando como aceptores de electrones los ácidos orgánicos provenientes del Ciclo de Krebs incompleto (Crites y Tchobanoglous, 2000; Madigan y col., 2009). Esto ocurre en contraste con las otras cuatro cepas que dieron positivo a la prueba de reducción de nitratos. Al ser facultativas con preferencias aerobias, su metabolismo utiliza el oxígeno presente en los iones nitratos al verse en ausencia escasez del oxígeno molecular (Schlegel, 1976).

La presencia de bacterias facultativas en el tratamiento de las aguas residuales, resulta beneficioso en la remoción de nutrientes (nitrógeno y fósforo), ya que los trenes de tratamiento se basan en combinar condiciones aerobias, anóxicas y anaerobias, por lo que las cepas utilizadas en el presente estudio, resultarían viables al respecto, además de que esto ha sido sugerido para “bioaumentar” los sistemas de tratamiento (Mohan y col., 2007; Stephenson y Stephenson, 1992).

4.3 Medida indirecta del desarrollo microbiano para cuantificar bacterias en aguas residuales

4.3.1 Curva de calibración

En la Figura 15 se pueden observar las muestras que conformaron la curva de calibración. Cada una contenía diferente concentración cuantificada, tanto como UFC como con absorbancias, con lo que cabe destacar que al inicio todas fueron inoculadas con la misma concentración bacteriana y procedimiento, al igual que el caldo nutritivo con las mismas características fisicoquímicas. Es decir, las diferentes concentraciones bacterianas fueron producidas por las diferentes concentraciones de metales pesados aplicadas previo a la incubación de los microorganismos.



Figura 15. Muestras que conformaron los puntos de la curva de calibración bacteriana. De izquierda a derecha la densidad del consorcio es descendente

La Figura 16 se refiere a la curva de calibración construida con base en los resultados de las absorbancias y sus respectivas concentraciones (UFC mL⁻¹) de las muestras de la Figura 15.

Según la ecuación generada (Figura 16), se obtiene un factor de correlación del 97.35% (certidumbre de utilizar la ecuación de la curva). También se observa que la correlación es de primer orden, lo cual indica en primera instancia que el método indirecto es más eficiente conforme la concentración bacteriana es menor (Chapra, 1997), aunque el punto asintótico aparece aproximadamente a los 20 x 10⁶ UFC mL⁻¹, valor que supera hasta por cuatro veces los reportados para las aguas residuales municipales (Crites y Tchobanoglous, 2000).

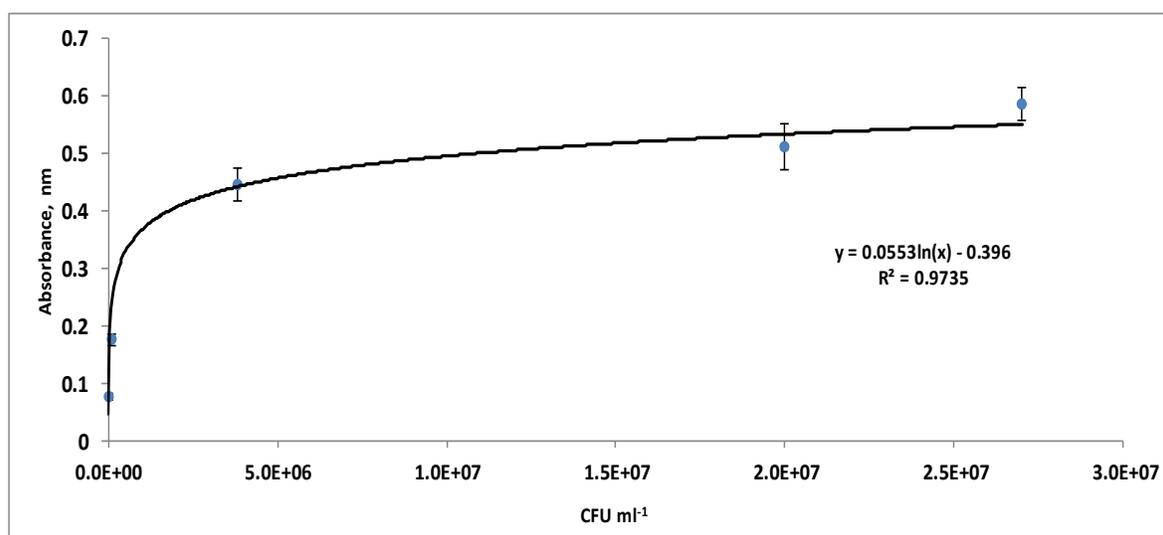


Figura 16. Curva de calibración para la correspondencia entre UFC mL⁻¹ del consorcio bacteriano utilizado y sus respectivas absorbancias

Derivado de la tolerancia hacia los metales pesados por parte del consorcio utilizado, fue posible realizar este estudio con un amplio rango de concentraciones bacterianas. Estos resultados están sustentados en lo que describen Hassen y col. (1998), quienes mencionan que, en presencia de la mezcla de metales pesados, los microorganismos oxidan rápidamente los compuestos orgánicos disueltos en el caldo nutritivo, permitiendo realizar las pruebas de absorbancia con el consorcio

microbiano. Esto presenta ventajas hacia otros agentes inhibidores del crecimiento microbiano, en especial cuando los microorganismos utilizados son tolerantes a los metales pesados (Amor y col., 2001).

4.3.2 Caracterización de las muestras de agua residual para la aplicación de la curva de calibración

En la Tabla 5 se presenta la descripción y caracterización de las muestras de agua residual seleccionadas de diferentes fuentes intencionalmente (aguas residuales domésticas, municipales e industriales) para conocer el grado de aplicación del método indirecto propuesto. Es decir, en qué tipo de muestras la precisión y exactitud del método indirecto es certera en función del método de UFC. En efecto, en la misma Tabla 5 puede observarse que las muestras provenientes del proceso de minería exhiben altos valores de DQO a pesar de ser muestras incoloras y con condiciones oxidantes (valores de potenciales redox positivos), lo cual denota claramente procesos industriales en los que se encuentran presentes sustancias complejas con carga orgánica difícilmente biodegradable (Masters y Ela, 2008). Por su parte, los valores fisicoquímicos de las aguas provenientes de fuentes domésticas y municipales coinciden con los valores característicos reportados ampliamente por la literatura (Crites y Tchobanoglous, 2000; Davis y Cornwell, 1998, Masters y Ela, 2008).

Como caso particular, el agua de la planta de tratamiento de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) tratada por sedimentación secundaria (influyente de cloración), exhibe los mayores valores del potencial redox y menor concentración de SSV (Tabla 5), lo cual es característico de las aguas residuales que han sido tratadas eficientemente por el tratamiento biológico acoplado a sedimentación secundaria (Crites y Tchobanoglous, 2000, Masters and Ela, 2008).

En la Tabla 6 se muestran los resultados en UFC mL⁻¹ de las muestras de agua residual, calculadas a partir del método indirecto y con la técnica de UFC validada analíticamente.

Tabla 5. Resultados de la caracterización de las muestras de agua residual utilizadas para evaluar el método indirecto a proponer

Procedencia del agua residual	Descripción cualitativa	Absorbancia $\lambda=400\text{nm}$	Parámetros de caracterización				
			DQO (mL^{-1})	SSV (mgL^{-1})	Redox (mV)	pH	Conductividad (mS^{-1})
Planta de tratamiento UNAM (influyente)	Color café, con partículas suspendidas, con olor desagradable	0.6055	462.5	141.3	-15	8.4	1.27
Planta de tratamiento UNAM (influyente cloración)	Incoloro e inodoro	0.0159	297	18.5	80	7.5	997
Agua de mina Tizapa, efluente proceso flotación 1	Ligera turbidez y partículas suspendidas, inodoro	0.0734	687	27.3	28.1	7.1	3.2
Agua de mina Tizapa, efluente proceso flotación 2	Ligera turbidez y partículas suspendidas, inodoro	0.0542	687	22.6	50	6.7	3.5
Efluente reactor biomasa suspendida a escala de laboratorio 1	Ligera turbidez y partículas suspendidas, inodoro	0.0065	62.5	7.2	80	2.5	2.12
Efluente reactor biomasa suspendida a escala de laboratorio 2	Ligera turbidez y partículas suspendidas, inodoro	0.0084	27.5	23.1	83	1.9	2.02

4.3.3 Validación del método indirecto e influencia de parámetros fisicoquímicos

Derivado de lo que se mencionó en la metodología, se realizó un Análisis de Reproducibilidad y Repetibilidad (r&R) que, además, aplica un análisis de varianza. Acorde con esto, la última columna de la Tabla 6 es la que indica el resultado final de la prueba de certidumbre.

Tabla 6. Valores de UFC correspondientes al método directo y método indirecto.
±Desviación estándar en porcentaje

Procedencia del agua residual	UFC mL ⁻¹ teórica (curva de calibración)	UFC mL ⁻¹ cuantificada	Precisión (reproducibilidad método indirecto), %r	Exactitud (precisión método indirecto), %R	Relación r&R, %
Planta de tratamiento UNAM (influyente)	1.71x10 ⁶	6.3x10 ⁶ ±8.4%	8.2	3.5	22.31
Planta de tratamiento UNAM (influyente cloración)	7.33x10 ¹	1.2x10 ¹ ±7.6%	9.3	4.3	8.42
Agua de mina Tizapa, efluente proceso flotación 1	4.85x10 ³	1.15x10 ³ ±8.6%	8.7	3.8	8.56
Agua de mina Tizapa, efluente proceso flotación 2	3.43x10 ³	3.0x10 ³ ±7.2%	5.3	3.6	2.3
Efluente reactor biomasa suspendida a escala de laboratorio 1	1.44x10 ³	1.4x10 ¹ ±9.3%	12.8	45.6	40.9
Efluente reactor biomasa suspendida a escala de laboratorio 2	1.49x10 ³	1.6x10 ¹ ±6.3	11.3	39.7	45.3

De las seis muestras probadas, el influente de cloración de la PTAR de C.U. y los dos de la minera Tizapa presentaron una relación r&R menor a 10, lo cual indica que el método indirecto aplicado coincide con precisión y exactitud con el método analítico, cabiendo destacar que las aguas de la minera Tizapa son de tipo industrial, lo cual se denota con las caracterización presentada en la Tabla 5.

La muestra del agua influente a la PTAR de C.U. a pesar de ser de tipo municipal convencional, exhibió una relación r&R arriba de 10, pero menor a 30 (Tabla 6) lo cual indica que sí es posible utilizar el método indirecto, siempre y cuando se ajusten los rangos de medición de manera analítica y estadística (ASTM, 1999).

Por su parte, las muestras de los efluentes de los reactores de biomasa suspendida, presentaron una relación r&R arriba de 30, por lo que el método

indirecto no es aplicable, aunque es importante mencionar que el agua tratada por estos reactores son de refinerías, conteniendo numerosos compuestos y entre ellos el fenol, que al ser objeto de degradación da lugar a intermediarios que modifican las características del agua residual entre ellas el pH, que resultó sumamente ácido (Tabla 5) pudiendo afectar la viabilidad de las células bacterianas (Nava-Urrego y col., 2014).

Finalmente, en lo que respecta al análisis de covarianza múltiple entre los parámetros de la Tabla 5 y las relaciones r&R, se encontró covarianza negativa con los sólidos suspendidos volátiles, SSV ($P < 0.05$), que es una forma de cuantificación ingenieril de los microorganismos presentes en las aguas residuales. El hecho de que la covarianza sea negativa (a mayor número de SSV, menor certidumbre de r&R) radica en el principio de que la cuantificación por turbidimetría es más eficiente a menores concentraciones de microorganismos (Madigan y col., 2009), lo cual ya se había evidenciado a través de la ecuación de la Figura 16, característica de primer orden. Así mismo, el análisis de covarianza también indicó una respuesta de sensibilidad con el pH, lo cual significa que estadísticamente los cambios de valores de r&R cambian en mayor grado cuando lo hacen los de pH, aunque no se presentó covarianza como tal. Aquí vuelve a resaltar el efecto que ocasionó la acidez (pH 1.9-2.5) de las muestras del efluente de reactores de biomasa suspendida.

4.4 Influencia de la densidad bacteriana en humedales artificiales sobre la remoción de metales pesados

En la Tabla 7 se presentan los valores de remoción de cromo y plomo junto con los de la concentración bacteriana cuantificada.

Tabla 7. Valores de remoción de plomo y cromo y de concentración bacteriana, en humedales artificiales con cepas tolerantes y convencionales. (Tomado de Amábilis y col. 2015)

Días de operación	Humedal con bacterias tolerantes a metales				Humedal con bacterias convencionales			
	RIV				RV			
	RIV 4d SSV	UFC mL-1	% remoción Cr	% remoción Pb	RV 2d SSV	UFC mL-1	% remoción Cr	% remoción Pb
15	7.5	197,368.4			11.3	297,368.4		
19	8.2	215,789.5	50.5	51.6	14.0	368,421.1	50.0	40.0
23	9.4	247,368.4	60.0	52.3	12.0	315,789.5	40.2	43.0
27	14.3	376,315.8	57.3	57.3	15.3	402,631.6	41.3	45.0
31	12.3	323,684.2	58.1	54.3	19.0	500,000.0	42.3	47.0
35	15.2	400,000.0	59.6	56.4	17.0	447,368.4	39.6	42.0
39	14.4	378,947.4	60.2	54.2	19.5	513,157.9	46.0	46.0
43	52.5	1,380,526.3	60.1	53.7	28.6	752,631.6	45.3	43.0
47	64.7	1,702,631.6	58.9	61.2	34.6	910,526.3	41.1	48.0
51	36.5	960,526.3	58.3	57.5	42.3	1,113,157.9	43.2	52.0
55	51.2	1,348,421.1	57.9	57.3	45.7	1,202,631.6	44.1	53.0
59	57.0	1,500,000.0	56.9	54.7	49.6	1,305,263.2	42.1	51.0
63	53.5	1,407,894.7	55.6	53.1	76.2	2,005,263.2	40.9	54.0
67	70.4	1,852,631.6	55.2	51.3	77.3	2,034,210.5	41.6	55.0
71	55.6	1,463,157.9	54.1	54.1	79.8	2,100,000.0	43.2	52.0
75	60.3	1,586,842.1	52.5	52.5	82.6	2,173,684.2	42.3	56.0
79	67.3	1,771,052.6	50.5	50.5	75.4	1,984,210.5	40.9	51.0
83	77.2	2,031,578.9	47.0	53.2	71.3	1,876,315.8	43.6	57.0
87	68.2	1,794,736.8	48.8	54.5	66.3	1,744,736.8	45.0	54.0
91	66.2	1,742,105.3	49.1	58.9	61.3	1,613,157.9	42.0	51.0
95	62.2	1,636,842.1	47.9	58.2	62.3	1,639,473.7	41.3	49.0
99	64.2	1,689,473.7	48.5	58.4	69.8	1,836,842.1	40.8	48.0
103	71.7	1,886,842.1	47.2	58.7	72.3	1,902,631.6	44.0	53.0
107	72.3	1,902,631.6	46.5	60.1	74.6	1,963,157.9	46.0	56.0
111	81.3	2,138,421.1	48.1	61.1	70.6	1,857,894.7	47.0	48.0
115	80.4	2,114,736.8	48.2	60.7	75.3	1,981,578.9	45.0	49.0
119	77.9	2,050,526.3	48.6	61.2	72.1	1,897,368.4	43.9	51.0
123	74.3	1,955,000.0	49.2	61.0	66.9	1,760,526.3	40.8	46.0
127	69.7	1,833,421.1	47.3	61.2	70.4	1,852,631.6	42.9	43.0
131	75.6	1,990,000.0	47.6	60.4	65.2	1,715,789.5	38.0	42.0
135	77.5	2,040,263.2	48.6	59.9	77.9	2,050,000.0	36.0	41.0
139	72.5	1,906,842.1	48.7	61.2	76.3	2,007,894.7	34.5	49.0
143	69.7	1,833,421.1	48.1	61.7	77.2	2,031,578.9	36.0	46.5
147	75.2	1,979,210.5	46.3	61.7	78.2	2,057,894.7	37.0	45.5
151	73.1	1,923,684.2	47.1	61.2	71.1	1,871,052.6	35.0	48.0

Estos valores se describen para los humedales con cepas tolerantes a metales pesados (RIV) y para los humedales con bacterias convencionales (RV). Cada parámetro fue cuantificado cada 4 días.

Los datos que fueron tomados en cuenta para el análisis de correlación en cada humedal artificial, fueron a partir del día de operación 79, ya que previo a este

punto, los sistemas de humedales artificiales se encontraban en etapa de estabilización (Amábilis y col., 2015). Acorde con esto, la Figura 17 muestra la relación entre la concentración bacteriana y la remoción de plomo y cromo exhibida durante por el humedal artificial con bacterias tolerantes durante su operación.

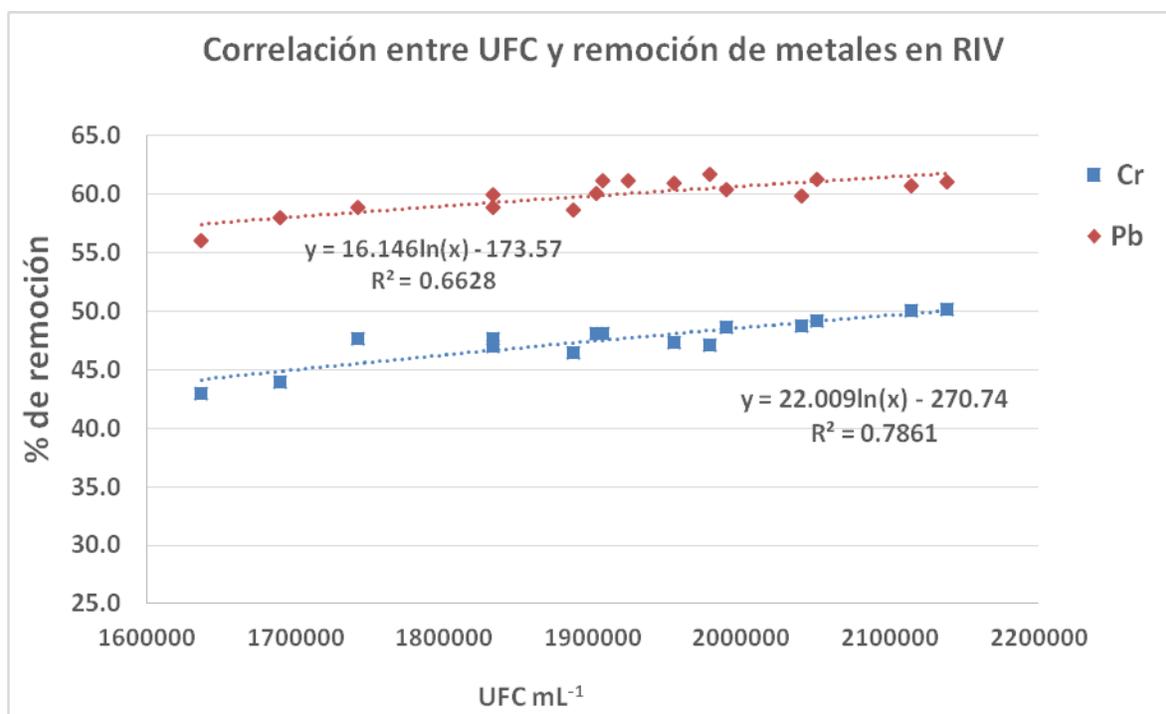


Figura 17. Remoción de plomo y cromo en un humedal inoculado con cepas tolerantes a metales, en función de la concentración bacteriana disuelta

En dicha figura se observa que, tanto para plomo como para cromo, existe una tendencia de remover mayor cantidad del metal conforme la concentración bacteriana aumenta. A pesar de no tener coeficientes correlación (R^2) (0.79 para cromo y 0.66 para plomo), la tendencia ascendente es clara y de primer orden (logarítmica), lo cual se encuentra relacionado con los diferentes modelos que relacionan el desarrollo de microorganismos con remoción de contaminantes (Mazaheri y Shojaosadati, 2013). Esta relación podría estar vinculada con los mecanismos de tolerancia hacia los metales pesados que desarrollan los

organismos procarióticos como lo son los fenómenos de adsorción con su superficie extracelular y reducción de los metales a especies menos tóxicas (en especial el caso del cromo), tal y como lo sugieren Rajkumar y col. (2012). Esto, además, incrementa la remoción de los metales pesados en los sistemas de tratamiento de agua residual (Orandi y col., 2012). En este orden de ideas, la Figura 18 muestra la relación entre la concentración bacteriana presente en humedales artificiales convencionales (RV) y la remoción de cromo y plomo exhibida por dicho sistema. A diferencia de los RIV, no existe tendencia alguna entre la concentración bacteriana y la remoción de los metales.

Como se aprecia en la Figura 18, ambos coeficientes se encuentran por debajo de 0.25 por lo que no se puede hablar de alguna correlación.

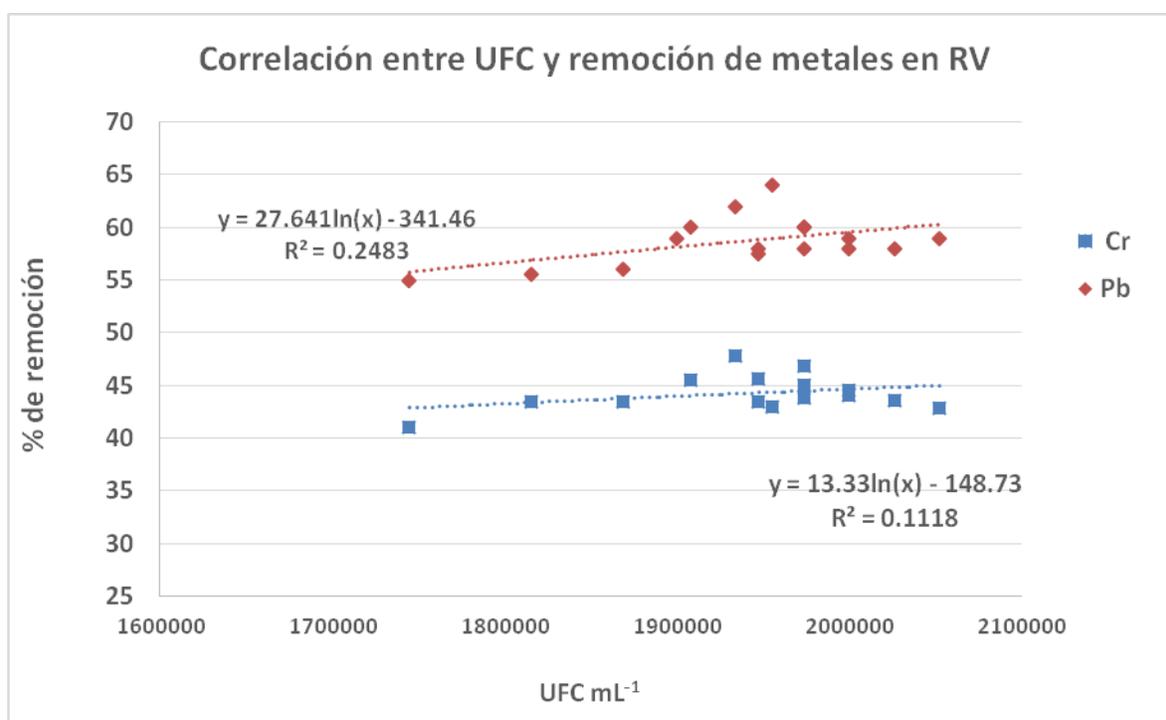


Figura 18. Remoción de plomo y cromo en un humedal convencional, en función de la concentración bacteriana disuelta

Ya se ha mencionado que el uso de cepas tolerantes a metales en el tratamiento de aguas residuales puede coadyuvar con diferentes procesos de depuración. El

hecho de no verse inhibidas en sus funciones metabólicas da lugar al desarrollo de adaptaciones bioquímicas que, finalmente, se reflejan en una mayor remoción de contaminantes en función de la presencia de organismos usados como agentes biorremediantes, tal y como lo describen Abd-Alla y col. (2012) y Safronova y col. (2012).

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

De acuerdo con los objetivos planteados y los resultados obtenidos en esta investigación, a continuación se presentan las conclusiones y recomendaciones de este estudio.

5.1 Conclusiones

- Mediante los resultados obtenidos de la caracterización bioquímica del consorcio bacteriano, es posible concluir que es viable el uso de dicho consorcio en el tratamiento de aguas residuales con contenido tanto de metales pesados como de materia orgánica proveniente de proteínas, lípidos y carbohidratos.

- De la evaluación de los resultados relacionados con el método indirecto para la cuantificación bacteriana, se concluye que es posible realizar una cuantificación bacteriana certera, rápida e indirecta de las aguas residuales, con excepción de aquellas que provengan de procesos industriales que propicien valores de pH menores a 3.5.

- Derivado de los resultados relacionados con el efecto de la densidad bacteriana sobre la remoción de metales pesados, es posible concluir que no existe una relación directa entre la concentración de microorganismos procarióticos con la remoción de plomo y cromo en humedales artificiales. No obstante, la presencia de bacterias metalotolerantes sí parece estar relacionada con las remociones de plomo y cromo, siendo directamente proporcionales. Esto significa que el empleo de dichos microorganismos tolerantes plantea mayores eficiencias de remoción de metales pesados.

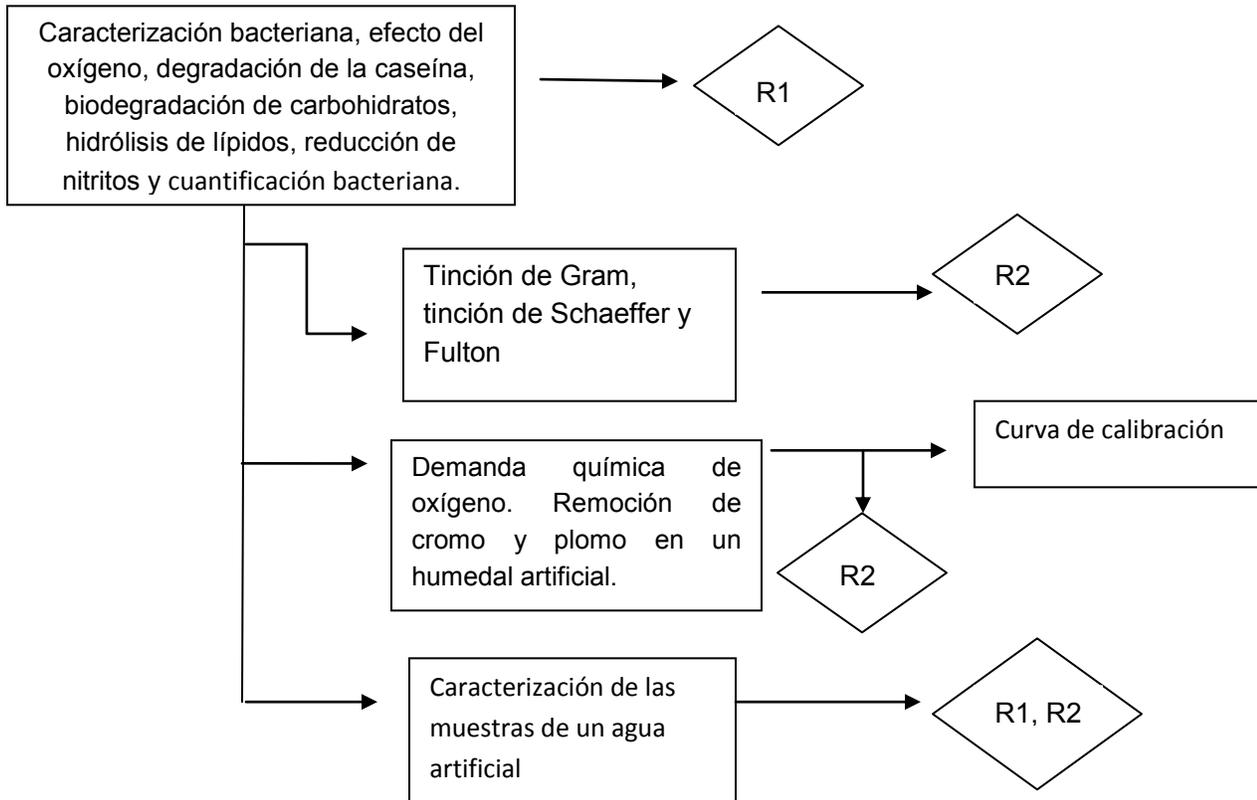
5.2 Recomendaciones

Para continuar esta investigación se recomienda lo siguiente:

- Dado que los resultados confirman la viabilidad del uso de bacterias metalotolerantes en el tratamiento de aguas residuales a nivel *in vitro*, es recomendable realizar los experimentos a escala de banco y/o piloto para seguir, posteriormente, con su escalamiento a nivel prototipo y real.
- Dado que el método indirecto de cuantificación bacteriana rápida resultó apropiado para aguas residuales de tipo municipal e industriales con valores de pH convencionales y no para aquellas con valores de pH menores a 3, se recomienda ampliar este experimento, enfocándose a identificar el efecto del pH sobre la inhibición de la curva de calibración realizada. Esto se haría con la finalidad de expandir la aplicación del método indirecto propuesto.

Anexo 1. Disposición de los residuos generados en esta investigación

La disposición de los residuos generados en esta investigación se hizo como sigue:



R1 = Corresponde a los desechos de las mediciones de muestras de agua residual de la planta de tratamiento y de un reactor de biomasa suspendida (redox, conductividad, pH y SSV) , así como de los medios de cultivo utilizados en la presente investigación, en donde inicialmente se esterilizan en autoclave (121°C, 103.4kPa, 15min), para posteriormente separar los sólidos los cuales se desechaban al contenedor de basura orgánica y los líquidos se vertían a la tarja para que llegaran diluidos a la planta de tratamiento de aguas residuales de C.U.

R2 = Corresponde a los desechos de los colorantes utilizados en las tinciones, así los productos de la digestión con dicromato de potasio y de las mediciones en muestras de agua de mina, por lo que se consideran peligrosos y se envían a la Unidad de Gestión Ambiental, UGA, de la Facultad de Química para su disposición controlada.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abd-Alla, M. H., Morsy, F. M., El-Enany, A. W. E. y Ohyama, T. 2012. Isolation and characterization of a heavy-metal-resistant isolate of *Rhizobium leguminosarum* bv. viciae potentially applicable for biosorption of Cd²⁺ and Co²⁺. ***International Biodeterioration & Biodegradation***. **67**:48-55.
- Abou-Shanab, R. A. I., Van Berkum, P. y Angle, J. S. 2007. Heavy metal resistance and genotypic analysis of metal resistance genes in gram-positive and gram-negative bacteria present in Ni-rich serpentine soil and in the rhizosphere of *Alyssum murale*. ***Chemosphere***. **68**(2):360-367.
- Adams, S. R., Rodríguez, V.I. y García, H. L. 1999. Potencial de la biorremediación de suelo y agua impactados por petróleo en el trópico mexicano. ***Terra Latinoamericana***. **17**(2):159-174.
- Amábilis-Sosa L. E., Siebe C., Moeller-Chávez G. y Durán-Domínguez-de-Bazúa M.C. 2015. "Remoción de mercurio, cromo y plomo por humedales artificiales inoculados con cepas tolerantes". ***Tecnología y Ciencias del Agua***, **6**(2): 21-34.
- Amor L., Kennes C. y Veiga M.C. 2001. Kinetics of inhibition in the biodegradation of monoaromatic hydrocarbons in presence of heavy metals. ***Bioresource Technology*** **78**(2):181-185.
- Angelova V., Ivanova R., Delibaltova V. e Ivanov K. 2004. Bio-accumulation and distribution of heavy metals in fibre crops (flax, cotton and hemp). ***Industrial Crops and Products*** **19**:197-205.

- ASTM E 691. 1999. **Standard practice for conducting an interlaboratory study to determine the precision of a test method.** American Society for Testing and Materials. West Conshohocken, PA, Estados Unidos.
- Baduí-Dergal S. 1993. **Química de los alimentos.** Ed. Pearson ISBN:968-444-152-4. México, D.F. México.
- Barakat M.A., 2011. New trends in removing heavy metals from industrial wastewater. **Arabian Journal of Chemistry** 4(4):361-367.
- Beishir L 1996. Microbiology in practice 6th Edition Addison-Wesley Educational Publishers Inc. California, Estados Unidos. Pp. 125-129.
- Benavides L., J., Quintero G. y Guevara A.L. 2006. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo **NOVA 4**: 82-90.
- Berks B., Richardson D., Robinson C., Reilly A., Willis A. y Ferguson S. 1995. The napEDABC gene cluster encoding the periplasmic nitrate reductase system of *Thiosphaera pantotropha*. **Biochemical Journal** 309:983- 992.
- Blundi C.E. 1988. **Aplicação de métodos alternativos para a determinação de matéria orgânica em águas residuárias.** Dissertação (Doutorado em Hidráulica e Saneamento). São Carlos, Brasil. 329p.
- Bock E., Schmidt I., Stueven R. y Zart D. 1995. Nitrogen loss caused by denitrifying Nitrosomonas cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor. **Archives of Microbiology** 163:16-20.

- Brown P.A., Gill S.A. y Allen S.J. 2000. Metal removal from wastewater using peat. **Water Research** **34(16)**:3907-3916.
- Carballo-Valdés M.E., Martínez A., Salgado I. y Cruz M. 2009. Mejoramiento de la biosorción de Zn^{2+} y Cd^{2+} en microorganismos mediante la caracterización de parámetros asociados al proceso. En **Memorias del Seminario Internacional de Expertos en Tratamiento de Efluentes Industriales y Residuos**. ISBN 978-607-7807-02-5. UNAM Y AMCATH (Academia Mexicana de Ciencias, Artes, Tecnología y Humanidades, A.C.). México D.F. México. Pp. 271-280.
- Cervantes C., J. Campos-García S., Devars F., Gutiérrez-Corona H., Loza-Tavera J.C., Torres-Guzmán and Moreno-Sánchez R., 2001. **Interactions of chromium with microorganisms and plants**. FEMS Microbiol. Rev. 25:335-347.
- Chapra S. 1997. **Surface water quality modeling**. Ed. McGraw-Hill. ISBN: 007115242-3. Singapore. Pp. 295-315.
- CONAGUA. 2014. **Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Compendio de Estadísticas Ambientales. Indicadores Clave y de Desempeño Ambiental**. Edición 2013. México, D.F. México.
- Corey G., Galvao L.A.C. 1989. Plomo. **Serie vigilancia 8**. Centro Panamericano de ecología humana y salud. Organización Panamericana de la Salud, OMS.
- Crites R. y Tchobanoglous G., 2000. **Tratamiento de Aguas Residuales en Pequeñas Poblaciones**. Ed. McGraw-Hill. Bogotá, Colombia. Pp. 7-12.

- Davis M. y Cornwell D. 1998. **Introduction to Environmental Engineering**. Ed. McGrawHill. Estados Unidos. Pp. 352-354.
- DeLaune R.D. y Pezeshki S.R. 2001. Plant functions in wetland and aquatic system: Influence intensity and capacity of soil reduction. **The Scientific World Journal** 2(1): 36-49.
- Dickson T. R. 2006 **Química, un enfoque ecológico**. Limusa Wiley. México, D.F. México. 15pp.
- DOF. 2013. Norma Mexicana **NMX-AA-030-SCFI-2001**. Análisis de agua. Determinación de la demanda química de oxígeno en aguas naturales, residuales y residuales tratadas. Método de prueba –parte 1 de reflujo abierto. (Cancela a la NMX-AA-030-SCFI-2001) Diario Oficial de la Federación. Poder Ejecutivo Federal. México, D.F. México.
- DOF. 2009. Modificación del inciso 0, en el encabezado de la Tabla 13, el último párrafo del Anexo B y el apartado Signo decimal de la Tabla 21 de la Norma Oficial Mexicana **NOM-008-SCFI-2002**, Sistema general de unidades de medida. Jueves 24 de septiembre de 2009 (Primera Sección). Diario Oficial de la Federación. Poder Ejecutivo Federal. México, D.F. México.
- DOF. 2001. Norma Oficial Mexicana. **NMX-AA-034-SCFI-2001**. Análisis de agua-Determinación de sólidos y sales disueltas en aguas naturales, residuales y residuales tratadas-Método de prueba. Diario Oficial de la Federación. Poder Ejecutivo Federal. México, D.F. México.
- Durán-de-Bazúa, C. 1995. **Tratamiento biológico de aguas residuales de la industria de proceso**. 5ª edición. UNAM, Facultad de Química, Programa de Ingeniería Química Ambiental y de Química Ambiental. México, D.F. México.

- Escobar J. 2002. **La Contaminación de los ríos y sus efectos en las áreas costeras y el mar.** Ed. CEPAL-ECLAC de Naciones Unidas. Santiago de Chile, Chile. Pp. 5-6.

- García T. 2005. **Diseño, construcción y evolución preliminar de un humedal de flujo subsuperficial.** Tesis doctoral. Universidad de los Andes. Bogotá, Colombia. Pp. 11-20.

- Halling-Sørensen B. y Jörgensen S. 1993. **The removal of nitrogen compounds from wastewater.** Ed. Elsevier, The Netherlands. Pp. 3.

- Hassen A., Saidi N., Cherif M. y Boudabous A. 1998. Resistance of environmental bacteria to heavy metals. **Bioresource Technology** **64**(1): 7-15.

- Huato S.J., Trejo L.P., Jiménez C., Ogura T. 1988. Arsenic, lead and other heavy metals in lime and tortilla in Mexico. **Revista de la Sociedad Química de México.** **40**(5):210-214.

- ISO 1995. Guide to the expression of uncertainty in measurement. BIPM, IEC, ISO, OIML. Estados Unidos.

- Kadlec R.H. y Wallace S. 2009. **Treatment Wetlands.** Ed. CRC Press. ISBN-13:978-1566705264. Boca Raton, Florida, Estados Unidos. Pp.973-1000.

- Knobelsdorf M.J. 2005. **Eliminación biológica de nutrientes en un ARU de baja carga orgánica mediante el proceso VIP.** Tesis de Doctorado. Universidad Politécnica de Cataluña. Barcelona, España.

- Kraemer A., Choudhury K. y Kampa E. 2001. **Protecting Water Resources: Pollution Prevention.** En International Conference of Freshwater. Bonn, Alemania. Pp. 1-8.
- Laws E.A. 1993. **Aquatic pollution - an introductory text.** Ed. Interscience. Estados Unidos. 55p.
- Lovley D.R. 2000. **Environmental Microbe-Metal Interactions.** American Society for Microbiology, Washington D.C. Estados Unidos.
- McFaddin J. F. 2003. **Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica.** Ed. Médica Paramericana. Buenos Aires, Argentina. Pp. 254-261.
- Madigan T.M., Martinko M.J., Dunlap V.P. y Clarck P.D. 2009. **Brock, Biología de los microorganismos.** Décima Edición. Ed. Pearson Prentice Hall. España. 1259pp.
- Manahan S.E., 2007. **Introducción a la química ambiental.** Coed. UNAM y Reverté S.A. de C.V. México, D.F. y Barcelona, España. Pp. 27-38.
- Masters G. y Ela W. 2008. **Introduction to Environmental Engineering.** Ed. Prentice Hall. Estados Unidos. Pp. 47-49.
- Mazaheri D. y Shojaosadati S.A.. 2013. Mathematical models for microbial kinetics in solid-state fermentation: a review. **Iran. J. Biotechnol.** **11 (3):**156-167.
- Metcalf & Edsy Inc, Tchobanolous G., Burton F., Stensel D. 2003. **Wastewater Engineering Treatment and Reuse.** Ed. McGraw Hill. Estados Unidos.

- MINITAB. 2007. Minitab® Inc. 15.1.20.0. Quality, analysis and results. Pennsylvania, Estados Unidos.
- Mohan S. V., Mohanakrishna G., Raghavulu S. V., y Sarma P. N. 2007. Enhancing biohydrogen production from chemical wastewater treatment in anaerobic sequencing batch biofilm reactor (AnSBBR) by bioaugmenting with selectively enriched kanamycin resistant anaerobic mixed consortia. **International Journal of Hydrogen Energy**. **32(15)**:3284-3292.
- Montgomery D. 2012. **Diseño y análisis de experimentos**. Ed. Limusa. México, D.F. México. Pp 145-155.
- Nava-Urrego L.M., Gasperín-Sánchez R. y Durán A. 2014. Comparación de un reactor de biomasa suspendida y un reactor de biomasa adherida para la biodegradación de compuestos tóxicos presentes en aguas residuales de refinerías de petróleo. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**. **30(1)**:101-112.
- Occhial E. Toxicity of heavy metals and biological defense. **Journal of Chemical Education**, **72(6)**:479-484.
- Orandi S., Lewis D. M. y Moheimani N. R. 2012. Biofilm establishment and heavy metal removal capacity of an indigenous mining algal-microbial consortium in a photo-rotating biological contactor. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. **39(9)**:1321-1331.
- Parés R. y Juárez A. 1997. **Bioquímica de los microorganismos**. Ed. Reverté. Pp 191-210, 271-288.

- Pérez E. y Ganado K. 2013. **Efecto de bacterias tolerantes sobre la eficiencia de remoción de cromo en humedales artificiales.** Tesis de Licenciatura. Universidad La Salle. Facultad de Ciencias Químicas. Pp. 10-11. México, D.F. México.
- Rajkumar M., Sandhya S., Prasad M. N. V., y Freitas H. 2012. Perspectives of plant-associated microbes in heavy metal phytoremediation. **Biotechnology Advances. 30(6):1562-1574.**
- Ramírez A. 2006. Biomarcadores en monitoreo de exposición a metales pesados en metalurgia. **Anales de la Facultad de Medicina. 67(1):49-58.**
- Ramírez-Gama R M., Luna-Millán B., Velázquez-Madrado O., Vierna-García L., Mejía-Chávez A.G., Tsuzuki-Reyes M.G., Hernández-Gómez L., Camacho-Cruz A. y Urzúa-Hernández M.C., 2011. **Manual de Prácticas de Microbiología General.** Facultad de Química, UNAM, México, D.F., México. 210p.
- Rathnayake I. V. N., Megharaj M., Bolan N. y Naidu R. 2010. Tolerance of heavy metals by gram positive soil bacteria. **International Journal of Civil and Environmental Engineering. 2(4):191-195.**
- Rodríguez F.H. y Rodríguez J. 2002. **Métodos de análisis de suelos y plantas. Criterios de interpretación.** Ed. Trillas. México D.F. Pp. 55-79.
- Rodríguez-Monroy J. y Durán de Bazúa M. C. 2006. Remoción de nitrógeno en un sistema de tratamiento de aguas residuales usando humedales artificiales de flujo vertical a escala de banco. **Tecnología Ciencia Educación (IMIQ) 21(1):25-33.**

- Ruíz-López V., González-Sandoval M.R., Barrera-Godínez J.A., Moeller*Chávez G., Ramírez-Camperos E y Durán-Domínguez-de-Bazúa M.C. 2010. Remoción de zinc y cadmio de una corriente acuosa de una empresa minera **usando humedales artificiales. Tecnología Ciencia y Educación (IMIQ) 25(1):27-34.**
- Safronova V. I., Piluzza G., Zinovkina N. Y., Kimeklis A. K., Belimov A. A., y Bullitta S. 2012. Relationships between pasture legumes, rhizobacteria and nodule bacteria in heavy metal polluted mine waste of SW Sardinia. **Symbiosis. 58(1-3): 149-159.**
- Salgado-Bernal I., Carballo-Valdés M.E., Martínez-Sardiñas A., Cruz-Arias M. y Durán-Domínguez-de-Bazúa M.C. 2012. Interacción de aislados bacterianos rizosféricos con metales de importancia ambiental. **Tecnología y Ciencias del Agua. 3(3):83-95.**
- Schelegel, Hans G 1976. Microbiología General. Ed. Omega. Barcelona, España. 669p.
- Scotti R. 1968. **Natureza dinâmica da composição dos esgotos**, Dissertação (Mestrado em SaúdePública), São Paulo, Brasil.
- Sharma P.K., Balkwill D.L., Frenkel A. y Vairavamurthy M.A. 2000. A new Klebsiella planticola Strain (Cd-1) grows anaerobically at high cadmium concentrations and precipitates cadmium sulfide. **Applied and Environmental Microbiology. 66(7):3083-3087.**

- Silver S. y Phung L.T. 2005. A bacterial view of the periodic table: gene and proteins for toxic inorganic ion. **Journal of Industrial Microbiology Technology**. **32**(111-12):587-605.
- Soto-Esquivel M.G, Guido-Zárate A., Guzmán-Aguirre S., Mejía-chávez A.G., García-Gómez R.S., Huanosta T., Pachón-López R.M., Rodríguez-Monroy J., Mijaglova-Nacheva P., Buitrón-Méndez G y Durán-de-Bazúa, C. 2013. Algunos aspectos interesante de sistemas de humedales a escala de laboratorio y de banco en México. **Química Central** **3**(2):56-65.
- Srinath T., Verma T., Ramteke P.W. y Gang S.K. 2002. Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. **Chemosphere**. **48**:427-435.
- Stephenson, D. y Stephenson, T. 1992. Bioaugmentation for enhancing biological wastewater treatment. **Biotechnology Advances**. **10**(4):549-559.
- Tebutt T. 1977. **Principles of water quality control**. 2a Ed., Oxford, Reino Unido.
- Tchobanoglous G., Burton F. y Stensel D. 2003. **Wastewater Engineering Treatment and Reuse**. Ed. MacGraw Hill, Estados Unidos. Pp. 101-127.
- Tortora G.J., Funke B.R. y Case C.L. 2007. **Introducción a la microbiología**. Ed. Médica Panamericana, Buenos Aires, Argentina. Pp. 17-18.
- Vullo D., 2003. Microorganismos y metales pesados: Una interacción en beneficio del medio ambiente. **Revista Química Viva**. **2**(3):93-104.

- Vymazal J. y Kröpfelová L. 2009. Removal of organics in constructed wetlands with horizontal subsurface flow. A review of the field experience. **The Science of the Total Environment**. **407**(13):3911-3922.
- Wang C.L., Michels P.C., Dawson S.C., Kitisakkul S. Baross J.A., Keasling J.D. y Clark D.S. 1997. Cadmium removal by a new strain of *Pseudomonas aeruginosa* in aerobic culture. **Applied and Environmental Microbiology**. **63**(10):4075-4078.
- Xie X., Fu J., Wang H. y Liu J. 2010. Heavy metal resistance by two bacteria strains isolated from a Cooper mine tailing in China. **African Journal of Biotechnology**. **9**(26):4056-4066.