

## **Evaluación del efecto tóxico del acetato plomo y el cloruro de cromo sobre el metabolismo bacteriano anaerobio**

*Beatriz Wills\** y *Fernando Naranjo\*\**

(Recibido el 26 de septiembre de 2003. Aceptado el 30 de septiembre de 2004)

### **Resumen**

Se presentan los resultados del estudio de toxicidad del cloruro de cromo ( $\text{CrCl}_3$ ) y el acetato de plomo  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb}$  del lodo de un reactor anaerobio de flujo ascendente y manto de lodos (UASB), aclimatado y estabilizado en el laboratorio con una solución de suero en polvo sintético; los ensayos de toxicidad se realizaron en botellas serológicas de 60 mL, se utilizaron como sustratos soluciones de ácido fórmico y suero en polvo sintético y se ensayaron concentraciones de cloruro de cromo en el rango de 1.000 a 5.000 mg/L, y de 1.000 a 10.000 mg/L para el acetato de plomo. Durante 72 horas se valoró la producción de metano en mL y el comportamiento del potencial redox en mV.

Se presentaron reducciones del 50% en la producción de metano a concentraciones de 3.322 mg/L para cloruro de cromo y 1.415 mg/L para el acetato de plomo cuando el sustrato fue ácido fórmico, y a 2.291 mg/L para el cloruro de cromo y 1.982 mg/L para el acetato de plomo cuando el sustrato fue suero en polvo sintético.

En síntesis, el artículo demuestra que las bacterias metanogénicas tienen un grado de resistencia cuantificable con respecto a las diferentes concentraciones de metales aplicados.

----- *Palabras clave:* toxicidad; reactor UASB; inhibición, metanogénesis, metales pesados y digestión anaerobia.

## **Toxic effect evaluation of the lead acetate and chromium chloride on anaerobic bacterial metabolism**

### **Abstract**

The toxicity of trivalent chromium and lead to anaerobic sludge system was studied. Performed assay was tested in 60 mL serum vials, the toxicity test to succeed in two steps, first with formic acid and then whey powder as a substrate.

---

\* Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Grupo de Ingeniería y Gestión Ambiental, GIGA. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. [bwills@udea.edu.co](mailto:bwills@udea.edu.co)

\*\* Estudiante de la Maestría en Ingeniería Ambiental. Facultad de Ingeniería. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

Anaerobic toxicity assays were performed taking into account, methane gas production and oxidation-reduction potential (ORP) rate, these tests were considered a useful indicator for monitoring a anaerobic sludge suffering from toxicants, over 72 hours with metals dosage against the control. First of all, exploratory assays in order to know different chromium and lead concentrations were carried out.

The assays degradation activity reduced methane by 50% that came into contact with 3.322 mg Cr<sup>3+</sup>/L and 1.415 mg Pb/L and 2.291 mg Cr<sup>3+</sup>/L and 1.982 mg Pb/L with formic acid and whey powder as a substrate respectively.

Heavy metal concentrations that caused 50% inhibition of methanogenesis during whey and formic acid methanation indicated that toxicity decreased in order Pb>>Cr.

----- *Key words:* toxicity, inhibition, anaerobic digestion, UASB, heavy metal, methanogenesis.

## Introducción

La digestión anaerobia se conoce hace más de cien años, pero es a partir de los años 70 que su aplicación tecnológica se constituye en una alternativa para el tratamiento de aguas residuales. Ventajas como la baja producción de lodos y en consecuencia disminución de sus costos de manejo, lodo excedente concentrado y de fácil deshidratación, aceptable eficiencia de tratamiento, bajo requerimiento de área, bajo requerimiento de nutrientes, bajos costos de operación, buena capacidad de rearranque, a pesar de inconvenientes como la posibilidad de olores desagradables, dificultad de arranque, sensibilidad a cargas tóxicas e inhibidoras, necesidad de postratamiento, han propiciado la ampliación de sus aplicaciones a diversidad de residuos industriales.

En el proceso de la digestión anaerobia, en una primera etapa, los compuestos orgánicos complejos son hidrolizados, fermentados y biológicamente convertidos a formas más simples, principalmente a ácidos volátiles, por bacterias facultativas y anaerobias acidogénicas o *fermentativas*. La producción de ácidos, en especial acético y propiónico, genera hidrógeno que, si no es consumido en una segunda etapa por las bacterias metanogénicas para producir metano, puede bajar el pH del medio acuoso hasta valores objetables. La razón de tal comportamiento está en relación directa con la cinética de los procesos de transformación biológica de la materia orgánica, que es función de la concentración de sustrato y del número microorganismos, cuya cinética es gobernada por esta última etapa que es la más lenta, y por esta razón, esta etapa condiciona el proceso de digestión en el aspecto evolutivo.

Sumado a las condiciones inherentes al proceso de digestión anaerobia el desarrollo de la población microbiana anaerobia, se puede también afectar por características fisicoquímicas del medio, como la temperatura, el pH, el potencial redox y la presencia de compuestos tóxicos o inhibidores como metales pesados provenientes de aguas residuales industriales de minería, producción de fertilizantes, refinación de aceites,

manufactura de baterías, pigmentos, pinturas y colorantes, industria fotográfica, industria de la galvanoplastia, productos orgánicos e inorgánicos, curtiduría de pieles y otros.

El efecto tóxico de los metales depende fundamentalmente de la combinación y concentración presente en el medio; bajas concentraciones de algunos de ellos pueden estimular el metabolismo bacterial (metales esenciales) y a altas concentraciones pueden ser tóxicos; así mismo, su combinación puede tener efectos antagónicos o sincrónicos. Estos fenómenos junto con la compleja estructura del lodo hacen difícil valorar la naturaleza y mecanismos de interacción de los metales pesados en el reactor [1].

Los metales en forma soluble producen alto grado de inhibición en el metabolismo bacterial con respecto a la forma insoluble; la inhibición bacteriana ocurrirá cuando la concentración de metales libres se incremente por encima de un umbral propio de cada elemento metálico [2]. La toxicidad relativa de los metales a la degradación total de los ácidos grasos volátiles, acético, butírico y propiónico, en un proceso de degradación anaerobia, fue en orden decreciente, así:  $Cu > Cr > Cd = Zn > Ni > Pb$  [3].

En este estudio se evaluó el efecto metabólico del acetato de plomo y del cloruro de cromo sobre la etapa de metanogénesis de los ácidos grasos volátiles.

## Materiales y métodos

### *Materiales*

Se utilizó inóculo proveniente de un reactor UASB de una industria de sacrificio de aves (demanda química de oxígeno, DQO: 4.200 mg/L; carga orgánica volumétrica, COV: 12,6 kgDQO/m<sup>3</sup>d; tiempo de retención hidráulica, TRH: 8 h; sedimentabilidad: 0,58 m/h) que fue sometido a un proceso de aclimatación estático y posterior estabilización en continuo durante cinco meses en reactores UASB de 7,6 L, con un sustrato con 1.200 mg/L de DQO de suero de leche en

polvo con cantidad suficiente de macro y micro nutrientes (tabla 1). Los reactores se operaron a una temperatura de 25 °C, con tiempo de retención hidráulica de 16 h, un caudal de 11,4 L/d y una velocidad ascensional de 0,11 m/h. La capacidad buffer se ajustó con solución de NaHCO<sub>3</sub> de concentración máxima de 1.000 mg/L. Los parámetros para el seguimiento de la operación de los reactores se realizaron de acuerdo con los procedimientos del texto *Standard methods for examination of water and wastewater* [4].

Los ensayos de toxicidad se realizaron en botellas serológicas de 60 mL de volumen (figura 1) a las que se les adiciono ácido fórmico o suero sintético fresco como sustratos, inóculo, vitaminas y sales metálicas de cloruro de cromo (CrCl<sub>3</sub>) y acetato de plomo (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Pb en concentraciones de 1.000-5.000 mg/L y de 1.000-10.000 mg/L respectivamente.



**Figura 1** Botella serológica utilizada para el ensayo de toxicidad

**Tabla 1** Composición de nutrientes aplicada a los reactores UASB

<i>Solución</i>	<i>Compuesto</i>	<i>mg/L</i>
Macronutrientes	NH <sub>4</sub> Cl	1.400
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.250
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	500
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	250
	NaHCO <sub>3</sub>	2.000
Micronutrientes	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	50
	FeCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	2.963
	ZnCl <sub>2</sub>	50
	MgCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	50
	CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	30
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	50
	AlCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	200
	NaSeO <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	100
	EDTA	1.000
	Resarzurina	200
	HCl 36%	4 mL
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	50	

Fuente: Saldarriaga, 2000.

### **Métodos experimentales**

En los ensayos de toxicidad para cada tóxico y cada concentración, tres en total, se hicieron cinco repeticiones (r = 5) y adicionalmente se montó un control (sin tóxico) para cada uno de los tratamientos. El tiempo total de los ensayos fue de 72 horas.

La composición de la solución en cada botella serológica se presenta en la tabla 2. Adicionalmente, antes de sellar las botellas con los tapones de caucho y aluminio, se gasearon, durante un minuto, en una estación de nitrógeno 100% puro para garantizar ambiente anaerobio. Los ensayos se realizaron a temperatura ambiente, 25 °C en promedio, y sin agitación. La inhibición fue estimada al comparar la producción de metano y el potencial redox en los tratamientos con respecto al control, la cantidad de metano se midió en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 6890, equipado con un detector de ionización de llama (FID).

**Tabla 2** Composición de la solución en cada botella serológica para el ácido fórmico y el suero sintético de leche

<b>Sustrato y medio de cultivo (mL)</b>		<b>Lodo (mL)</b>	<b>Concentración de los tóxicos (mg/L)</b>					
Ácido fórmico de 42 g/L de DQO	Suero sintético de 12 g/L de DQO		Cromo			Plomo		
10,5 11-16	10,5 12,2-15,5	2	1.000	3.000	5.000	1.000	5.000	10.000

El medio de cultivo utilizado es el descrito por Balch *et al.* (1979) [12], al cual no se le adicionó sulfuro de sodio (Na<sub>2</sub>S) con el fin de evitar un efecto antagónico en el sistema, y la solución de vitaminas diluidas de Balch se reemplazó por solución de macronutrientes preparadas en el laboratorio y utilizadas para la corrida de los reactores UASB.

El ensayo de toxicidad con suero sintético fresco como sustrato, se realizó aplicando la técnica de Zayed y Winter [1], que trata de simular el comportamiento del tóxico en un reactor tipo UASB.

### **Diseño experimental**

De acuerdo con los datos del estudio se tiene que el diseño es balanceado y bifactorial, por lo que se aplica el modelo de análisis de varianza (ANOVA) compuesto o de doble vía. El objeto central del ANOVA es la comparación de dos o más tratamientos, cada uno de los cuales representa una población.

### **Resultados y discusión**

La toxicidad de metales pesados en procesos metanogénicos se debe principalmente a la solubilidad del metal en dicho medio. El pH, la generación de grupos intermedios como los AGV, el potencial redox, y la producción de gas metano son parámetros que indican el grado de inhibición de las bacterias metanogénicas en presencia de dichos metales; sin embargo, algunos metales a bajas concentraciones generan estimulación a las bacterias metanogénicas [3, 6].

Se considera como estrategia potencial de monitoreo de medios anaerobios la medición del potencial redox a los sistemas que no estén en equilibrio [7], debido al desconocimiento de reacciones que se llevan a cabo en el sistema, considerándolo un parámetro útil y complementario en el seguimiento de reactores anaerobios, junto con el pH, porcentaje de remoción, AGV, producción de biogás y otros.

El potencial redox suministra información referente a la potencialidad de un ambiente para que sus compuestos donen o acepten electrones. Un ambiente anaerobio requiere de bajo potencial (-330 mV) lo que indica alta actividad electrónica y un ambiente fuertemente reductor [8].

Para todos los ensayos el pH osciló entre 6,7 y 7,2, atendiendo la recomendación hecha por Bitton (1994) de mantener esta variable entre 6,7 y 7,4 para no afectar adversamente a la actividad biogranular de las bacterias metanogénicas. En la presente investigación, la producción de metano y la variación del potencial redox fueron las variables respuesta utilizadas para monitorear el efecto tóxico del cromo y el plomo sobre el metabolismo anaerobio.

La actividad de producción de metano ( $A_m$ ), definida como la fracción de metano producida en 72 horas después de aplicada una dosis de metal al lodo estabilizado frente a un control, se calculó utilizando la expresión propuesta por Field [9] y utilizada posteriormente por Lin *et al.* [3]:

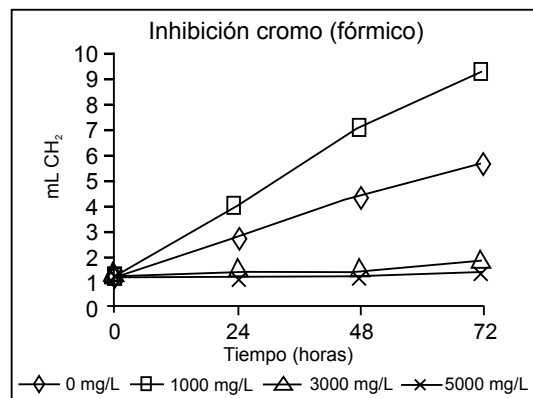
$$A_m (\%) = [(M_{72} - M_0) / (M_{C72} - M_{C0})] \times 100$$

Donde  $M_{72}$ ,  $M_{C72}$  y  $M_0$ ,  $M_{C0}$  corresponden a la producción de metano en mL a 72 y 0 h, del tratamiento y el control respectivamente.

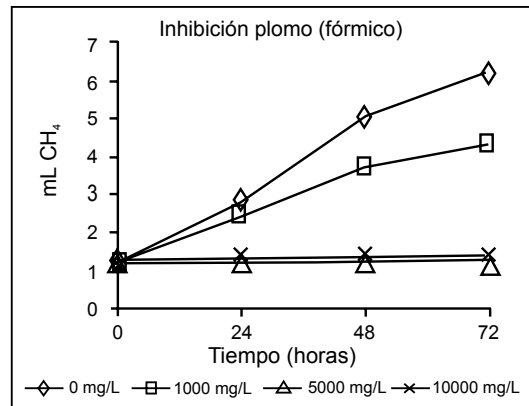
El comportamiento de la producción de metano cuando el lodo se somete a distintas concentraciones de cromo con ácido fórmico como sustrato se muestra en la figura 2. Para la concentración de 1.000 mg/L se presentó un incremento en la producción de metano con respecto al control, lo cual pone de manifiesto el efecto estimulante de dicha concentración en la población metanogénica; mientras que la producción de metano a las concentraciones de 3.000 y 5.000 mg/L con respecto al control es significativamente menor y no muestra signos de recuperación durante las 72 horas permitiendo inferir su efecto inhibitorio.

Para el plomo con ácido fórmico como sustrato, la figura 3 muestra el efecto inhibitorio de dicho metal a la población metanogénica a concentraciones de 1.000, 5.000 y 10.000 mg/L.

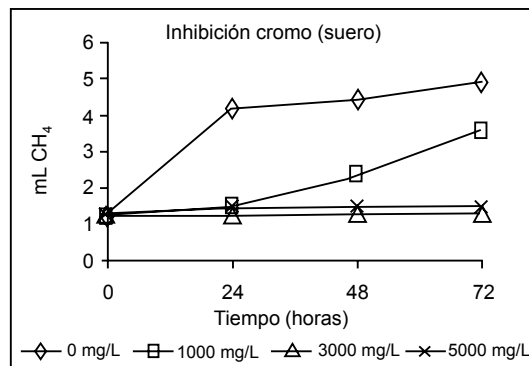
Las figuras 4 y 5 muestran el comportamiento del cromo y del plomo utilizando suero sintético como sustrato. Para la concentración de 1.000 mg/L de cromo, se presenta un leve comportamiento estimulante a partir de las 24 horas, y con 3.000 y 5.000 mg/L hay inhibición total, para el plomo el comportamiento es semejante al ensayo en el que se utilizó como sustrato el ácido fórmico.



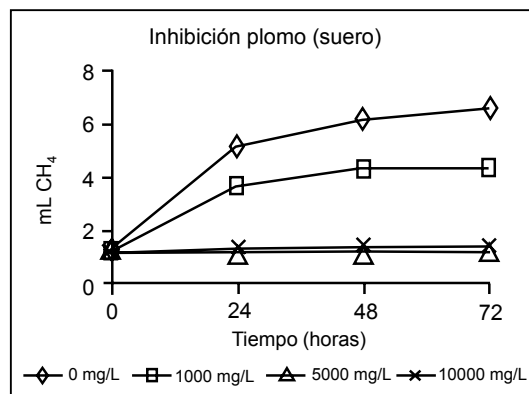
**Figura 2** Producción de metano a diferentes concentraciones de cromo utilizando como sustrato el ácido fórmico



**Figura 3** Producción de metano a diferentes concentraciones de plomo utilizando como sustrato ácido fórmico



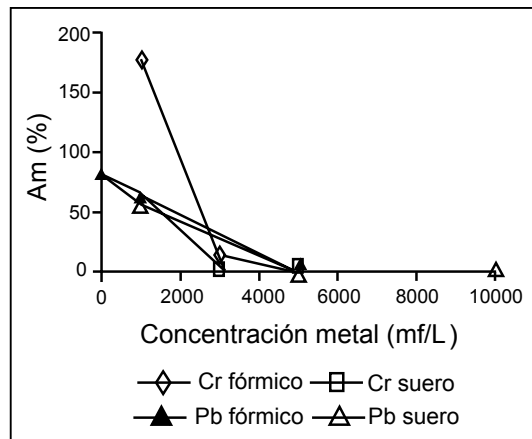
**Figura 4** Producción de metano a diferentes concentraciones de cromo utilizando como sustrato suero sintético



**Figura 5** Producción de metano a diferentes concentraciones de plomo utilizando como sustrato suero sintético

Las concentraciones de los metales que causan un 50% de inhibición en la producción de metano ( $C_{50}$ ) para los sustratos: ácido fórmico y suero sintético, fueron encontradas a partir de la figura 6. A los datos se les aplicó un modelo de regresión lineal y se obtuvieron coeficientes de correlación ( $R^2$ ) de 0,7979 y 0,7961 para el cromo-fórmico y el plomo-fórmico, y de 0,8476 y 0,7834 para el cromo-suero y plomo-suero. En la tabla 3 se reportan los resultados de las  $C_{50}$  obtenidas para esta investigación. La diferencia de valores para los dos tipos de sustratos se puede explicar porque en la degradación de suero tienen lugar todas las etapas del proceso de digestión anaerobia mientras que cuando el sustrato es ácido fórmico la degradación es más directa.

Se reporta  $C_{50}$  de inhibición para un lodo anaerobio de 90 mg/L para cromo y 8.800 mg/L para



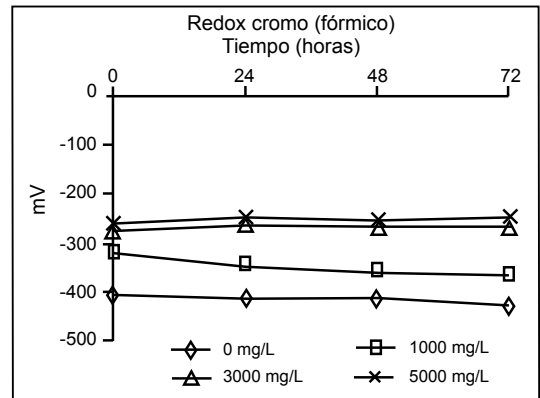
**Figura 6** Porcentaje de metano producido a diferentes concentraciones de cromo y plomo para ácido fórmico y suero sintético como sustratos

**Tabla 3**  $C_{50}$  para cromo y plomo aplicados con diferentes sustratos

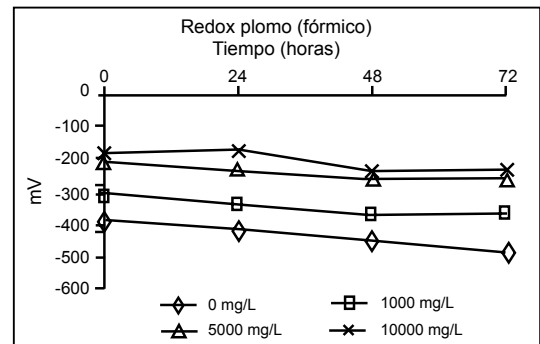
Metal	Sustrato	$C_{50}$
Cromo	Ácido fórmico	3.322 mg/L
Cromo	Suero sintético	1.415 mg/L
Plomo	Ácido fórmico	2.291 mg/L
Plomo	Suero sintético	1.982 mg/L

plomo [3]. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en la presente investigación en el sentido de que el plomo es más tóxico que el cromo.

El potencial redox para los ensayos de toxicidad con cromo y plomo en los que se utilizó ácido fórmico como sustrato, se incrementó a medida que se incrementaron las concentraciones de los dos metales, lo que indica un efecto inhibitorio en la población metanogénica debido a la tendencia oxidante del sistema por la adición de dichos metales (véanse figuras 7 y 8). Los resultados obtenidos en este ensayo coinciden con los reportados por El Bayoumy *et al.* [10], trabajando bajo condiciones similares.



**Figura 7** Comportamiento del potencial redox a diferentes concentraciones de cromo utilizando como sustrato ácido fórmico



**Figura 8** Comportamiento del potencial redox a diferentes concentraciones de plomo utilizando como sustrato ácido fórmico

Cuando se utilizó suero sintético como sustrato, con la máxima concentración de cromo (5.000 mg/L), el potencial redox alcanzó valores de -37,2 mV mientras que para el control el valor mínimo fue de -116 mV (véase figura 9). Los resultados anteriores coinciden con los descritos por El Bayoumy [10] durante el seguimiento a la remoción de metales pesados y DQO por medio de bacterias sulforreductoras en un reactor anaerobio de flujo ascendente de lecho fijo (UAFF); ellos encontraron que el potencial redox osciló entre -220 mV y -150 mV, y a medida que se adicionaron las concentraciones de metales a los reactores (200 mg/L de Cu, 150 mg/L de Ni y de Zn, 75 mg/L de Cr, 50 mg/L de Cd y 40 mg/L de Pb) hasta conseguir el fallo de los mismos, el potencial redox se incrementó de -100 mV a -75 mV. Este aumento correspondió al incremento de las concentraciones de metales en el reactor.

Con la máxima concentración de plomo (10.000 mg/L) el potencial redox alcanzó valores de +95,4 mV, como lo muestra la figura 10, lo que es típico de un medio oxidante e inhibitorio de la actividad metanogénica como lo corroboran Li y Bishop (2002) en su estudio de regulación y remoción de nutrientes en una planta de tratamiento de lodos activados, en el que obtuvieron lecturas de potencial redox entre +150 mV y +200 mV durante todo el proceso de la experimentación.

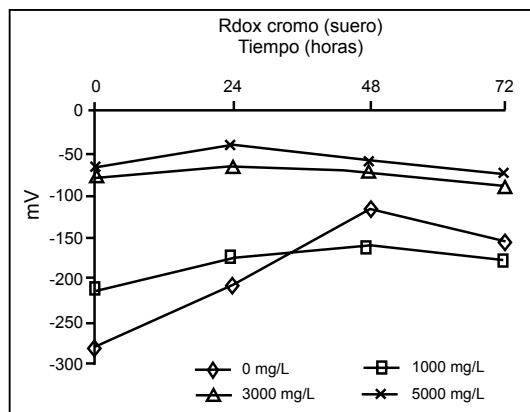


Figura 9 Comportamiento del potencial redox a diferentes concentraciones de cromo utilizando como sustrato suero sintético

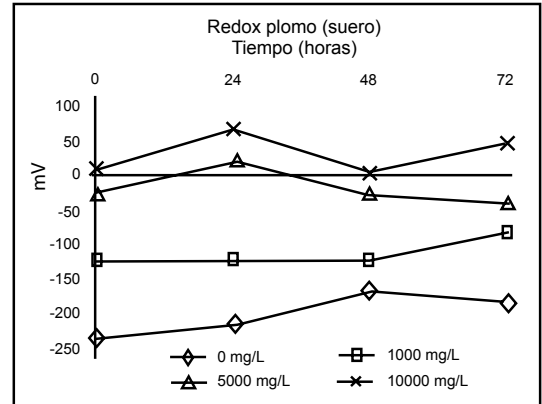


Figura 10 Comportamiento del potencial redox a diferentes concentraciones de plomo utilizando como sustrato suero sintético

### Conclusiones

- Con base en los resultados de los análisis estadísticos realizados a los datos obtenidos en los ensayos de toxicidad, se concluye que existen diferencias significativas entre los tratamientos, a diferentes concentraciones de cloruro de cromo y acetato de plomo, y de los tratamientos con sus respectivos controles, es decir, a mayor concentración del metal mayor grado de inhibición del metabolismo bacteriano.
- El efecto de la presencia cromo o plomo en el sustrato de un lodo anaerobio sobre el metabolismo de las bacterias metanogénicas se ve reflejado en el hecho de una disminución significativa de metano y aumento en el valor del potencial redox.
- Las concentraciones que causaron el 50% de inhibición a las bacterias metanogénicas indica que la toxicidad del plomo es mayor que la del cromo.
- La producción de gas metano y el comportamiento del potencial redox son variables muy confiables para la realización de ensayos de toxicidad en botellas serológicas sometidas a diferentes concentraciones de metales pesados o a diferentes tóxicos.



- Continuar este estudio con la serie de los metales pesados que eventualmente podrían producir efectos metabólicos no deseables en la digestión anaerobia de aguas residuales industriales.

### Bibliografía

1. Zayed, G. y Winter, J. "Inhibition of methane production from whey by heavy metals. Protective effect of sulfide". En: *Applied Microbiology Biotechnology*. N.º 53. 2000. pp. 726-731.
2. Lester, J. *Heavy metals in wastewater and sludge treatment processes*. Editorial CRC Press. Boca Raton, 1987.
3. Lin, Chiu-Yue y Chen, Chin-Chao. "Effect of heavy metals on the methanogenic UASB granule". En: *Water Research*. Vol. 33. N.º 2. 1999. pp. 409-416.
4. American Public Health Association. *APHA Standard methods for examination of water and waste water*. 18<sup>th</sup> Ed. New York, 1992.
5. Saldarriaga, Julio. *Evaluación de la presión selectiva y de la adición de bacterias liofilizadas como alternativas de mejoramiento de una semilla de lodo activado crudo espesado para el arranque de reactores UASB*. Tesis de grado para optar al título de magister en Ingeniería Ambiental. Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia, 2000.
6. Bitton, G. *Wastewater Microbiology*. Ed. Wiley. New York, 1994.
7. Speece, H. *Anaerobic biotechnology for industrial wastewater*. Archae Press. Nashville, 1996.
8. Tinsley, I. *Chemical concepts in pollutant behavior*. Ed. Wiley-Interscience. Canadá, 1979.
9. Field, J. "Medición de Parámetros". En: *Curso: arranque y operación de reactores anaerobios con flujo ascendente y manto de lodos (UASB)*. Universidad del Valle. Cali, 1987.
10. El Bayuomy, Mahmoud *et al.* "Removal of heavy metals and COD by SRB in UAFF reactor". En: *Journal of Environmental Engineering*. Vol. 25. N.º 6. Junio, 1999.
11. Li, B. y Bishop, P. *Oxidation-reduction potential (ORP) in regulation of nutrient removal in activated sludge wastewater treatment plants*.
12. Balch, W. *et al.* "Methanogens: reevaluation of a unique biological group". En: *Microbiology Reviews*. N.º 43. 1979. pp. 260-296.