



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN
ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA



Tema: Evaluación la inhibición tóxica de Cd^{2+} y Cr^{6+} en la actividad metanogénica de un inóculo bacteriano proveniente de biosólidos del biodigestor de la planta de tratamiento de aguas residuales de Ambato

Trabajo de Titulación, Modalidad Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingeniera Biotecnóloga, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

AUTOR: Lissbeth Vanessa Montero Vega

TUTOR: Dr. -Ing. Rodny David Peñafiel Ayala

Ambato – Ecuador

Septiembre - 2023

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dr. - Ing. Rodny David Peñafiel Ayala

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este trabajo de titulación bajo la modalidad de proyecto de investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería de Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 21 de julio del 2023

Dr. - Ing. Rodny David Peñafiel Ayala

C.I. 171228352-0

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Lissbeth Vanessa Montero Vega, manifiesto que los resultados obtenidos en el presente trabajo de titulación, modalidad proyecto de investigación, previo a la obtención del título de Ingeniera Biotecnóloga son absolutamente originales, auténticos y personales a excepción de las citas bibliográficas.



Lissbeth Vanessa Montero Vega

C.I. 1803731833

AUTORA

DERECHOS DE AUTOR

Autorizo a la Universidad Técnica de Ambato, para que haga de este trabajo de titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedo los derechos en línea patrimoniales de mi trabajo de titulación, con fines de difusión pública, además apruebo la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando mis derechos de autor.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Lissbeth Vanessa Montero Vega', written over a horizontal line.

Lissbeth Vanessa Montero Vega

C.I. 1803731833

AUTORA

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Docentes Calificadores, aprueban el trabajo de titulación, modalidad Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para la constancia firman:

.....

Presidente del tribunal

.....

Dr. Pablo Vinicio Tuza Alvarado

C.I. 1104063241

.....

Mg. Daniel Alfonso Cabrera Valle

C.I. 1802561595

Ambato, 22 de agosto del 2023

DEDICATORIA

A mis padres Raquel Vega e Isidro Montero por su apoyo incondicional tanto emocional como económicamente. Gracias por motivarme día a día para salir adelante, por confiar en mí y por trabajar arduamente para lograr que su hija culmine con la carrera, que pese a quedarse muchas veces sin dinero para ustedes, me han sabido dar de donde sea para que yo jamás falte a la universidad. Los quiero mucho, son mi ejemplo a seguir como padres.

A mi pareja Diter por ser mi compañero de buenos momentos desde el Bachillerato y motivarme a seguir con la carrera, por ayudarme a comprender temas de mi carrera que él como Bioquímico tenía conocimiento, por aconsejarme cuando algo salía mal, por amarme incondicionalmente y sobre todo por darme a mi hija Rachel que se ha convertido en el motivo de querer ser mejor día a día. Gracias por brindarme de una familia completa y llena de amor.

A mis amigas Thalia y Gabriela por su apoyo en el transcurso de mi carrera, por motivarme a estudiar durante los exámenes y ayudarme en mis tareas, incluso en pandemia cuando todos perdieron contacto, siempre estuvieron presentes. Sobre todo, por ser mis mejores amigas y estar junto a mí en cada momento importante.

AGRADECIMIENTO

A Dios por brindar sabiduría, paciencia y fortaleza a mi vida la cual me fue útil durante la trayectoria estudiantil permitiéndome sobrellevar obstáculos para finalmente cumplir con el objetivo establecido.

A mi tutor, Dr.- Ing Rodney Peñafiel por su orientación durante la realización del trabajo de integración curricular, por el tiempo brindado y los conocimientos impartidos, principalmente por su paciencia a la hora de realizar las revisiones respectivas tanto de la parte experimental como escrita.

A la Facultad de Ciencia e Ingeniería de Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato por dejarme formar parte de sus estudiantes y por brindarme entendimiento de distintas asignaturas que me ayudaron en la formación profesional.

A los integrantes del Proyecto Canje de Deuda Ecuador – España “Fortalecimiento de la unidad operativa de investigación (FITA - UOITA)” y a la Unidad Operativa de Investigación y Desarrollo (UODIDE – ICIA), por brindarme acceso a sus instalaciones y permitirme el uso de sus equipos para la culminación de la parte experimental del trabajo de integración curricular.

A Gabriela, Thalía, Diana y Jenny por acompañarme desde el inicio de la carrera y haberme ayudado a lo largo del camino con su apoyo incondicional, con su compañía cuando más lo necesité, por las experiencias vividas juntas y por siempre ser sinceras conmigo. Además, quiero agradecer a Marlon y Estefanía porque pese a conocernos recién en los últimos semestres, se han convertido en amigos incomparables, gracias por sus consejos y ayuda constante. Agradezco a cada uno de los mencionados por hacerme parte de su vida, por formar lazos con mi persona como si fuésemos familia. Siempre los tendré en mi corazón.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS	
APROBACIÓN DEL TUTOR	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	iii
DERECHOS DE AUTOR	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTO	vii
RESUMEN EJECUTIVO	xiii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO	1
1.1. Antecedentes investigativos	1
1.1.1 Introducción	1
1.1.2. Planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) de Ambato	2
1.1.3. Proceso de tratamiento de aguas residuales en la PTAR de Ambato	4
1.1.4. Caracterización fisicoquímica de biosólidos	6
1.1.5. Digestión anaerobia	8
1.1.6. Producción de metano	9
1.1.7. Índice de toxicidad por metales pesados de bacterias anaerobias en su actividad metanogénica	10
1.2. Objetivos	11
1.2.1. Objetivo General	11
1.2.2. Objetivos Específicos	11
1.3. Hipótesis	11
1.3.1. Hipótesis nula	11

1.3.2 Hipótesis alternativa	11
1.4 Variables	11
1.4.1. Variables independientes	11
1.4.2. Variables dependientes	11
CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA	12
2.1. Materiales	12
2.1.1. Materiales de laboratorio	12
2.1.2. Reactivos de laboratorio	12
2.1.3. Equipos de laboratorio	14
2.2. Métodos	15
2.2.1. Toma de muestra, conservación y transporte	15
2.2.2. Métodos analíticos	15
2.2.3. Ensayos de toxicidad en la actividad metanogénica máxima específica	22
2.2.4. Determinación del índice de toxicidad	24
CAPITULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
3.1. Análisis y discusión de los resultados	25
3.1.1. Caracterización fisicoquímica de biosólidos provenientes de la planta de tratamiento de aguas residuales de Ambato	25
3.1.2. Determinación de la actividad metanogénica máxima específica (AME) del inóculo bacteriano a partir de la producción de biogás.	30

3.1.3. Estimación del índice de inhibición toxica de Cd y Cr (VI) en la actividad metanogénica del inóculo bacteriano de los biosólidos del biodigestor.	34
3.2. Verificación de hipótesis	39
CAPITULO IV .- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	40
4.1. Conclusiones	40
4.2. Recomendaciones	42
MATERIALES DE REFERENCIA	43
Referencias Bibliográficas	43
Anexos	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Materiales de laboratorio.....	12
Tabla 2. Reactivos necesarios para el desarrollo del proyecto de investigación.....	13
Tabla 3. Equipos de laboratorio	14
Tabla 4. Métodos de referencia de parámetros en la caracterización de biosólidos.	16
Tabla 5. Especificaciones para la determinación de cromo VI.	20
Tabla 6. Resultados de la caracterización fisicoquímica de biosólidos proveniente del biodigestor de la PTAR-Ambato en comparación con límites máximos permisibles para biosólidos.	25
Tabla 7. Concentraciones inhibitorias de cadmio y cromo (VI) del 20, 50 y 80 %..	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Componentes del agua residual que ingresa a una PTAR.....	3
Figura 2. Tasa de generación de metano en función a distintas concentraciones de Cd.	30
Figura 3. Tasa de generación de metano en función a distintas concentraciones de Cr (VI).....	32
Figura 4. Porcentajes de inhibición tóxica de cadmio y cromo (VI) sobre bacterias anaerobias presentes en los biosólidos del biodigestor de la PTAR-Ambato.....	36

RESUMEN EJECUTIVO

La generación de lodos (biosólidos) en las plantas de tratamiento de aguas residuales (PTAR) resulta un problema para la salud humana y el ambiente, debido a su elevada contaminación. El tratamiento de biosólidos mediante digestión anaerobia ayuda a reducir contaminantes mientras genera gas metano, sin embargo, la presencia de metales pesados como cromo o cadmio puede generar inhibición tóxica y dificultar el tratamiento. Por esta razón, el objetivo del proyecto fue evaluar la inhibición tóxica del cadmio (II) y cromo (VI) sobre la actividad metanogénica específica (AME) de un inóculo bacteriano proveniente de biosólidos del biodigestor de la PTAR de Ambato.

Se utilizaron métodos analíticos para conocer las características principales del biosólido y se realizaron bioensayos para monitorear la AME. Los resultados revelaron que los biosólidos contienen contaminantes como materia orgánica, nutrientes y metales. Además, la AME del inóculo (sin adición de los metales) fue de 0,6 moles de metano por gramo de biomasa bacteriana al día. El efecto inhibitorio genera una reducción de la AME en un 20, 50 y 80 por ciento con la adición de 15, 28,4 y 50 mg cadmio por litro. Estas reducciones de la AME se dan para el cromo (VI) con la adición de 75, 100 y 200 mg por litro en un 20, 50 y 80 por ciento respectivamente.

Finalmente, se demostró que al aumentar concentraciones de cadmio y cromo (VI) hay disminución significativa de la AME lo que representaría un riesgo potencial para el tratamiento de biosólidos en la PTAR.

Palabras clave: Gestión ambiental, contaminación ambiental, digestión anaerobia, biosólidos, gas metano, cadmio, cromo hexavalente, biodigestor, bioensayos, toxicidad, actividad metanogénica, inhibición.

ABSTRACT

The generation of sludge (biosolids) in wastewater treatment plants (PTAR) poses a problem for human health and the environment due to its high level of contamination. Treating biosolids through anaerobic digestion helps reduce contaminants while generating methane gas. However, the presence of heavy metals such as chromium or cadmium can lead to toxic inhibition and hinder the treatment process. For this reason, the objective of the project was to evaluate the toxic inhibition of cadmium (II) and chromium (VI) on the specific methanogenic activity (AME) of a bacterial inoculum derived from biosolids in Ambato's PTAR biodigester.

Analytical methods were used to determine the main characteristics of the biosolids, and bioassays were conducted to monitor the AME. The results revealed that the biosolids contained contaminants such as organic matter, nutrients, and metals. Additionally, the AME of the inoculum (without the addition of metals) was 0.6 moles of methane per gram of bacterial biomass per day. The inhibitory effect caused a reduction in AME by 20, 50, and 80 percent with the addition of 15, 28.4, and 50 mg of cadmium per liter, respectively. These reductions in AME were observed for chromium (VI) with the addition of 75, 100, and 200 mg per liter, resulting in a reduction of 20, 50, and 80 percent, respectively.

Finally, it was demonstrated that increasing concentrations of cadmium and chromium (VI) significantly decreased the AME, which would represent a potential risk for biosolids treatment in the PTAR.

Key words: environmental management, environmental pollution, anaerobic digestion, biosolids, methane gas, cadmium, hexavalent chromium, biodigester, bioassays, toxicity, methanogenic activity, inhibition

CAPÍTULO I.- MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes investigativos

1.1.1 Introducción

A nivel mundial se ha verificado un aumento en la población y por ende la generación de aguas residuales con lodos activados en mayor cantidad, mismos que resultan en problemas ambientales, económicos y de salud. Es de gran importancia distinguir que los residuos urbanos requieren de una gestión adecuada para su tratamiento final especialmente haciendo mención a países en desarrollo ya que del 20 % al 50 % del presupuesto de los municipios va dirigido al manejo de los residuos y alcantarillados (Ibarra et al., 2020). Al tratar de mejorar la calidad de agua residual que llega a las plantas de tratamiento de aguas residuales se ha intentado inicialmente separar las aguas residuales de los biosólidos. Estudios mencionan que los biosólidos se integran al agua residual representando gran porcentaje de materia orgánica misma que no puede ser degradada con facilidad por métodos convencionales. Por ello en América latina, se han desarrollado investigaciones donde los métodos biológicos son los más adecuados para tratar los lodos activados (biosólidos), en especial la digestión anaerobia, misma que utiliza microorganismos para descomponer la materia orgánica generando como producto un biogás, principalmente metano (CH_4) y dióxido de carbono (CO_2) (EPA, 2022).

La digestión anaerobia es considerada la mejor tecnología para reducir el volumen de biosólidos y generar energía renovable, sin embargo, se han presentado distintos problemas con respecto al rendimiento del metano y la inestabilidad del proceso debido a la micro ecología anaeróbica. Los microorganismos involucrados en la degradación de biosólidos tienen un papel importante en el ciclo del carbono ya que transforma pequeñas moléculas de carbono en metano. Los microorganismos anaerobios requieren demandas nutricionales de crecimiento específicas para estimular la degradación anaerobia. Debido a la contaminación por metales pesados en biosólidos es considerado hoy en día un problema ambiental, debido que los

metanógenos están expuestos a estrés y perturbación de su ecología local (Ibarra et al., 2020).

Al existir presencia de metales a baja concentración, como Fe, Mn, Cu, Ni, Zn, Al, etc., se da un efecto estimulador en la actividad metanogénica de las bacterias, sin embargo, la presencia de otros metales como Pb, Cd, As, Cr VI y Hg en concentraciones excesivas puede provocar un decaimiento en la velocidad de crecimiento (Li et al., 2019). El metal pesado presente en suelos, sedimentos, aire y agua que mayor contaminación genera es el cadmio, mismo que entra fácilmente en la célula provocando daños, dando lugar al estrés oxidativo e inhibiendo el crecimiento celular haciendo que las bacterias anaerobias se vean afectadas (Baca & Martinez, 2017). Por otro lado, al aumentar las industrias de faenamiento, curtiembres, mueblerías, entre otros, se ha considerado al cromo hexavalente (VI) como el principal contaminante ya que es utilizado por las mismas para acabados, cromado de metales, curtido de cueros y conservante de maderas, motivo por el cual se ha detectado al cromo VI como la principal sustancia tóxica en aguas residuales urbanas debido a su alta toxicidad y movilidad en ambientes acuosos (Hu et al., 2018).

En base a lo antes mencionado, es relevante comprender el impacto del Cd^{2+} y Cr^{6+} en la actividad de bacterias anaerobias y en la producción de biogás. En el presente proyecto de investigación se propuso dar tratamiento anaerobio a biosólidos perteneciente a la PTAR de Ambato para estimar el índice de toxicidad de metales pesados (Cd^{2+} y Cr^{6+}) en la actividad metanogénica de bacterias anaerobias. Se realizó con la finalidad de generar información sobre el efecto de la presencia de Cd^{2+} y Cr^{6+} en los residuos sanitarios y el manejo de los mismos a nivel nacional. La información obtenida podrá ser utilizada por distintas instituciones encargadas del manejo de residuos para aprovechar los mismos y producir gas metano ofreciendo a su vez beneficios al medio ambiente.

1.1.2. Planta de tratamiento de aguas residuales (PTAR) de Ambato

La PTAR es una instalación en la que se combina distintos procesos con la finalidad de digerir el agua residual para que este sea devuelto al ambiente de manera segura para evitar su contaminación (Wang et al., 2022). Según la estadística de información

ambiental económica en Gobiernos Autónomos Descentralizados Municipales (GADM), la empresa municipal de agua potable y alcantarillado de Ambato (EMAPA) cuenta con la PTAR ubicada en el sector “Las Viñas” donde ingresan aproximadamente $65664 m^3$ de agua residual al día, misma que es tratada y descargada en el río Ambato por lo cual conocer sus fuentes contaminantes es relevante para evitar daños en el ambiente (Cando, 2021).

Tipos de aguas residuales que ingresan a la PTAR

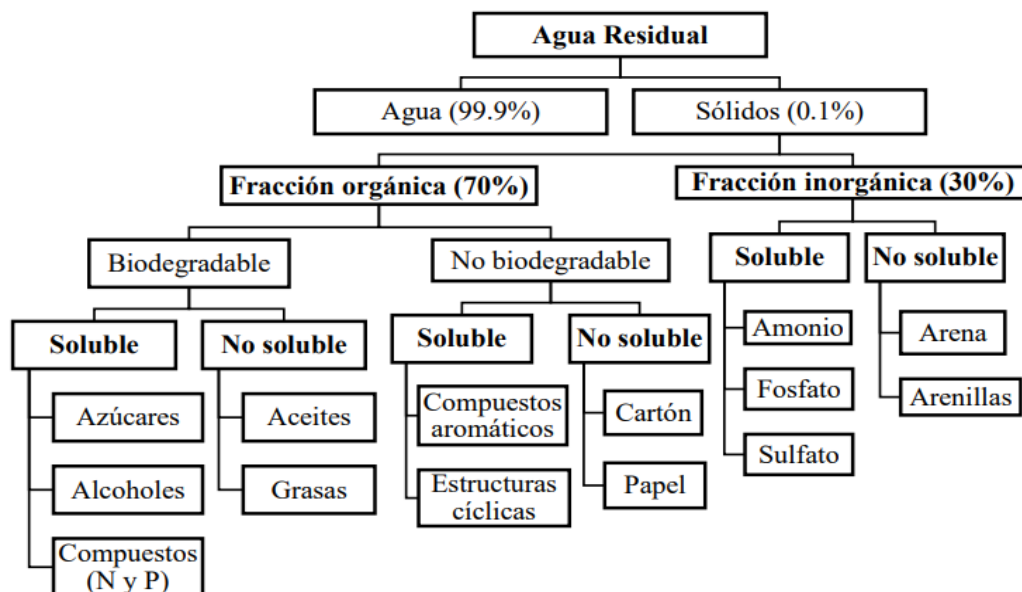
Existen diferentes tipos de aguas residuales dependiendo de su origen, siendo estas las aguas blancas, negras, grises e industriales. Las aguas de lluvia, nieve o hielo son consideradas aguas blancas mismas que son consideradas residuales ya que son arrastradas a través de las vías o por sistemas de alcantarillado, por otro lado, las aguas negras contienen mayor porcentaje de patógenos debido a su contenido de desechos fecales y orina provenientes de inodoros (Ali et al., 2021)

Adicionalmente las aguas grises son aquellas que contienen materia inorgánica como detergentes y jabones mismas que se han generado como resultado del aseo personal o de la limpieza de la casa. Finalmente se tiene a las aguas industriales que son provenientes de empresas farmacéuticas, químicas, alimentarias, automotrices, etc., donde los últimos mencionados son los que mayor porcentaje de tratamiento requieren debido a la cantidad de metales pesados que provienen de dichas industrias (Ahmed et al., 2021).

El agua residual que ingresa a la PTAR se encuentra compuesta por un 99,9 % agua y 0,01 % de sólidos (Figura 1), donde dichos sólidos del agua residual llevan consigo un 70 % de fracción orgánica y 30 % de fracción inorgánica.

Figura 1.

Componentes del agua residual que ingresa a una PTAR



Fuente. (Hughes & Gray, 2012).

1.1.3. Proceso de tratamiento de aguas residuales en la PTAR de Ambato

Las etapas para el tratamiento de dichas aguas son el pretratamiento, tratamiento primario, secundario y terciario. Cabe recalcar que las etapas de tratamiento de agua residual, se tiene un tratamiento adicional de sus subproductos como la digestión aerobia, anaerobia, deshidratación de fangos, generación de energía a partir de biogás, sedimentación, recirculación, bombeo y almacenamiento de lodos (GAD, 2020).

Pretratamiento

Durante la fase de pretratamiento de las aguas residuales se bombean las mismas a una cámara donde se someten a un proceso de desbaste fino. Aquí, el agua es filtrada a través de rejillas y tamices de diferentes grosores para eliminar sólidos y materiales flotantes de mayor tamaño, como palos, ramas, plásticos, trapos y vísceras. Después, la arena, la grasa y las partículas de menor tamaño son eliminadas mediante seis desarenadores y desengrasadores. Con esta etapa comienza el proceso de depuración

del agua residual, eliminando materiales que podrían causar problemas en la operación de la planta (GAD, 2020).

Tratamiento primario

Luego del pretratamiento, el proceso inicial de depuración del agua residual, cuyo objetivo principal es eliminar la mayor parte de los sólidos en suspensión, es el tratamiento primario donde el agua se deja en reposo durante una o dos horas en decantadores para separar las partículas, homogeneizar el flujo y eliminar la materia orgánica. Es importante destacar que se pueden agregar sustancias químicas, como floculantes y coagulantes, para optimizar la sedimentación (GAD, 2020).

Tratamiento secundario

En el proceso de tratamiento secundario o biológico, se logra la eliminación de la materia orgánica y de nutrientes como el fósforo y el nitrógeno, junto con los sólidos suspendidos restantes, a través del uso de microorganismos (lodos activados). Estos microorganismos son generalmente bacterias heterótrofas facultativas, ya que crecen naturalmente en el agua residual y transforman la materia orgánica disuelta o particulada en productos más sencillos como el dióxido de carbono y agua (Buitron et al., 2018).

En esta fase del proceso, el reactor biológico (RB) recibe el agua purificada del sedimentador primario (RP) y lodos de sedimentador secundario, una vez que se ha retirado inicialmente el lodo y las impurezas de la superficie. El objetivo del tratamiento secundario también es crear un entorno aeróbico, anaeróbico o anóxico para degradar la materia orgánica suspendida (lodos activados o biosólidos) por lo que adicionalmente los lodos retirados del tanque de recirculación son llevados a biodigestores con condiciones controladas para degradar la materia orgánica, disminuir contaminantes y generar gas metano como energía renovable (GAD, 2020). Cabe mencionar que la materia orgánica suspendida se tomó como muestra para el presente proyecto misma que se denominó biosólido. Según (Collivignarelli et al., 2019), los biosólidos son lodos activados o desechos orgánicos producidos durante el tratamiento de aguas residuales, los cuales suelen estar en forma líquida o semi-sólida

y contener típicamente entre el 0,25 y el 20% de sólidos por peso, dependiendo del tipo de operación o proceso que se haya llevado a cabo anteriormente.

Tratamiento terciario

Es común que en la mayoría de PTAR se finalice el proceso con el tratamiento secundario (Crini & Lichtfouse, 2019). No obstante, es necesario aplicar un tratamiento terciario para la depuración de aguas residuales, ya que el agua tratada se vierte en el medio ambiente (cuenca baja del río Ambato). El objetivo es mejorar la calidad del agua final y eliminar organismos patógenos. En esta etapa se realiza un proceso de desinfección, donde es común mezclar hipoclorito sódico con el agua que fluye gradualmente desde los tanques de tratamiento secundario.

1.1.4. Caracterización fisicoquímica de biosólidos

Es importante realizar el análisis de biosólidos, ya que estos pueden utilizarse en diversos procesos, por ejemplo, como fertilizantes o en la eliminación de contaminantes de suelos. Conocer los componentes de los biosólidos puede evitar la contaminación del medio ambiente y prevenir posibles daños en la salud humana. (Bermudes, 2022). Las características físicas y químicas ayudan a comprender la composición de los biosólidos y brinda conocimiento de su estado, por lo tanto, entre las principales características están:

pH: El potencial hidrógeno hace referencia a la cantidad de iones hidrógeno que contiene una muestra, dicha medición puede ser ácida (un valor cercano al cero), neutra (valor cercano a 7) y básica (valor cercano a 14), dependiendo del tipo de muestra. A partir de la medición del pH se puede evidenciar la solubilidad de la muestra y la cantidad de nutrientes que se encuentren en sus componentes (Fisherbrand, 2023).

Temperatura: La temperatura es considerada una medida de calor, y puede influir significativamente en los resultados de análisis de la muestra. Además, es importante tener en cuenta la temperatura adecuada para el análisis para obtener resultados precisos y confiables. La importancia de conocer la temperatura en una muestra es informarse del estado en que se encuentra ya que dicha temperatura puede afectar el

crecimiento de microorganismos aerobios o anaerobios, así como la efectividad de la actividad metanogénica y la solubilidad del agua. (Fisherbrand, 2023).

Conductividad: La conductividad eléctrica es la habilidad de una solución acuosa o muestra específica para conducir corriente eléctrica. En el caso particular de los biosólidos, éstos pueden conducir corriente eléctrica debido a la presencia de iones disueltos, que pueden ser ácidos, bases o sales. (Fisherbrand, 2023).

DQO (Demanda química de oxígeno): Es la cantidad de oxígeno que se necesita para degradar u oxidarla la materia orgánica que se encuentra en las muestras de agua, convirtiendo dicha materia en dióxido de carbono y agua. Mientras más contaminada esta cualquiera muestra, mayor es la cantidad de DQO (Baird et al., 2017).

Sólidos: Los sólidos que se encuentran en una muestra son muy nocivos cuando estos se encuentran en gran proporción y es el contaminante que más influye sobre la calidad del agua. Los sólidos que pueden encontrarse en las muestras son totales, volátiles y suspendidos mismos que pueden contener sales orgánicas, metales pesados, y cantidades de materia orgánica disueltas. Los altos niveles afectan la turbidez de la muestra aumentan su temperatura y disminuyen los niveles de oxígeno disuelto lo que puede afectar negativamente a los microorganismos presentes (Baird et al., 2017).

Metales pesados (cadmio y cromo VI): Frecuentemente, los contaminantes más peligrosos en los biosólidos son los metales pesados. El análisis de metales pesados es importante, en especial en este proyecto, debido que se tratará con microorganismos vivos y la presencia iones metálicos. Los metales a estudiar fueron cadmio y cromo (VI) ya que provocan daños en las células bacterianas al entrar en contacto con sus células, reaccionando con enzimas y alterando al ser vivo (EPA, 2020a).

Además, es necesario mencionar que el cromo VI es conocido por ser tóxico y carcinogénico. La exposición a altas concentraciones de cromo VI puede tener efectos perjudiciales en la salud humana, incluyendo problemas respiratorios, daño a los riñones, daño al sistema gastrointestinal y posibles efectos cancerígenos. Por lo tanto, los niveles permisibles de cromo VI en el agua se establecen en niveles bajos, generalmente hasta 0.5 mg/L, para proteger la salud pública. Por otro lado, las

autoridades de medio ambiente del país establecen como límite permitido de cadmio en el agua a 0,002 mg/L, esto debido que el cadmio es un metal muy tóxico para la salud humana e inhibitorio para los microorganismos ya que puede entrar fácilmente en la célula dando lugar al estrés oxidativo e inhibiendo el crecimiento celular (TULSMA, 2003).

Para el análisis de iones que suelen encontrarse en los biosólidos, se hizo uso de equipos analíticos, mismos que tienen su propio fundamento:

Fotómetro HANNA HI 83399

Este equipo calcula parámetros fundamentales sobre la calidad del agua y aguas residuales utilizando 73 métodos rápidos basándose en rangos y variaciones, incluye algunos metales pesados, demanda química de oxígeno y permite la medición de absorbancia, lo que es de utilidad para personas que tienen su propio método químico como por ejemplo quienes utilizan la ley de Beer-Lambert (HANNA, 2021).

Espectrofotómetro de absorción atómica

El equipo emplea lámparas específicas dependiendo del metal a analizar, mismas que son capaces de emitir una línea atómica característica del elemento. Además, cuenta con un cilindro sellado lleno de neón o argón donde también se encuentra el ánodo y cátodo. Cuando se aplica una diferencia de potencial entre el ánodo y el cátodo, los iones positivos generados son acelerados por el campo eléctrico y colisionan con el cátodo cargado negativamente. Las colisiones desalojan átomos metálicos individuales que son excitados elevando sus estados energéticos debido a los impactos con el gas, lo que posteriormente emite una radiación lo que favorece al análisis de su presencia y concentración (Razmilic, 2020)

1.1.5. Digestión anaerobia

Según (Meegoda et al., 2018), hay cuatro pasos de procesamiento definidos en la digestión anaeróbica, cada uno atribuido a diferentes grupos metabólicos.

Hidrólisis: En esta etapa, las bacterias hidrolíticas secretan enzimas extracelulares que descomponen los polímeros orgánicos complejos en moléculas pequeñas también denominados monómeros.

Acidogénesis: En esta etapa, las bacterias acidogénicas (o fermentativas) transforman los productos hidrolíticos generados en la etapa anterior en ácido acético, compuestos orgánicos de cadena corta y productos intermedios como ácido láctico, etanol y propionato, además, estas bacterias generan energía mediante la fermentación de los sustratos orgánicos y es por ello que producen ácidos como subproducto.

Acetogénesis: En esta etapa, las bacterias acetogénicas toman los productos generados en la acidogénesis y los convierte en acetato, hidrógeno y dióxido de carbono. Estas bacterias utilizan distintas vías metabólicas para la producción de acetato y contribuyen a la generación de compuestos que sirven para las bacterias metanogénicas en la etapa final.

Metanogénesis: Esta es la etapa final de la digestión anaerobia, donde las bacterias metanogénicas (arqueas metanógenas) convierten los productos de la acetogénesis en metano mismo que es el principal componente del biogás.

Cada uno de los pasos antes mencionados son esenciales para el proceso global de la digestión anaerobia y la conversión de la materia orgánica en productos finales, como el metano. Dichos procesos son ampliamente utilizados en la producción de biogás a partir de diferentes sustratos orgánicos, como residuos agrícolas, aguas residuales y residuos orgánicos municipales, con el fin de obtener energía renovable y reducir la contaminación ambiental (Meegoda et al., 2018).

1.1.6. Producción de metano

La producción de metano (metanogénesis) en la descomposición de residuos sólidos, es una digestión anaerobia típica mediada por metanógenos y catalizada por enzimas. La metanogénesis utiliza carbono (ácido acético y dióxido de carbono) como aceptor terminal de electrones para producir metano. La reacción involucra una serie de enzimas y coenzimas. Comprender el mecanismo subyacente de la dinámica de la comunidad metanógena y la diversidad metabólica durante la descomposición de desechos sólidos es fundamental para la producción y recuperación de metano (Yang et al., 2021).

1.1.7. Índice de toxicidad por metales pesados de bacterias anaerobias en su actividad metanogénica

Pese a la existencia de varias reacciones químicas que pueden participar en el metabolismo de bacterias anaerobias, se pueden identificar dos procesos para el tratamiento de aguas residuales, como son la ingestión y el crecimiento. Por tal motivo, cuando compuestos o elementos químicos tóxicos entran al metabolismo de las bacterias anaerobias, pueden inhibir o reaccionar con enzimas del sistema celular y provocar que las bacterias metanogénicas dejen de producir cierta cantidad de metano e incluso puede llegar a matarlas (Kapoor & Singh, 2021).

Por lo antes mencionado, es necesario conocer el índice de toxicidad que ciertos metales, como el cadmio (II) y cromo VI, provocan en las bacterias anaerobias metanogénicas lo cual es posible comprobar mediante la cantidad de metano que generen. Para expresar el índice de toxicidad o la concentración inhibitoria (IC) de generación de metano se toma en cuenta concentraciones inhibitoria del 20 %, 50 % y 80 %, donde el IC representa la concentración del metal que reduce la tasa de generación de metano al porcentaje establecido. Cabe mencionar que para ello se realizó varios bioensayos con distintas concentraciones del metal evidenciando la disminución de la actividad metanogénica respecto a un bioensayo control (Ochoa et al., 2009).

1.2. Objetivos

1.2.1. Objetivo General

- Evaluar la inhibición tóxica de Cd^{2+} y Cr^{6+} en la actividad metanogénica de un inóculo bacteriano proveniente de biosólidos del biodigestor de la planta de tratamiento de aguas residuales de Ambato

1.2.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar fisicoquímicamente los biosólidos provenientes de la planta de tratamiento de aguas residuales.
- Determinar la actividad metanogénica máxima específica del inóculo bacteriano a partir de la producción de biogás.
- Estimar el índice de inhibición tóxica del Cd^{2+} y Cr^{6+} en la actividad metanogénica del inóculo bacteriano de los biosólidos del biodigestor.

1.3. Hipótesis

1.3.1. Hipótesis nula

Las mediciones de metano (CH_4) aumentan cuando las concentraciones de metales evaluados son mayores.

1.3.2 Hipótesis alternativa

Las mediciones de metano (CH_4) disminuyen cuando las concentraciones de metales evaluados son mayores.

1.4 Variables

1.4.1. Variables independientes

Concentraciones de Cadmio y Cromo (VI) añadidos en los bioensayos.

1.4.2. Variables dependientes

Tasa de generación de metano e índices de toxicidad al 20%, 50% y 80%.

CAPÍTULO II.- METODOLOGÍA

2.1. Materiales

2.1.1. Materiales de laboratorio

A continuación, se muestra la tabla 1, misma que contiene los materiales de laboratorio a utilizar en la ejecución del trabajo de titulación dentro de los Laboratorios de Investigación de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, carrera de Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato (UODIDE).

Tabla 1.

Materiales de laboratorio necesarios para el desarrollo del trabajo de titulación.

Material	Cantidad
Agujas hipodérmicas	50
Botellas ámbar	52
Balones volumétricos de 1L	5
Bolsas de hielo	2
Cooler	1
Crisoles	5
Gradillas	1
Manguera afluyente	4
Matraces Erlenmeyer	5
Microfibra de vidrio	1
Pipetas graduadas	3
Tapones de corcho	42
Tubos de ensayos	10
Vasos de precipitación	6

2.1.2. Reactivos de laboratorio

A continuación, se muestra la tabla 2, misma que contiene los reactivos de laboratorio a utilizar en la ejecución del trabajo de titulación dentro de los Laboratorios de Investigación de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, carrera de Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato (UODIDE).

Tabla 2.*Reactivos necesarios para el desarrollo del trabajo de titulación.*

Componentes	Nomenclatura	Cantidad (mg)
Cloruro de amonio	NH ₄ Cl	1400,0
Fosfato mono potásico	KH ₂ PO ₄	1250,0
Cloruro de magnesio hexahidratado	MgCl ₂ *6H ₂ O	412,5
Cloruro de calcio	CaCl ₂	50,0
Bicarbonato de sodio	NaHCO ₃	15000,0
Extracto de levadura	-	50,0
Acetato de sodio anhidro	C ₂ H ₃ NaO ₂	10269,0
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	0,3
Cloruro ferroso- Tetrahidratado	FeCl ₂ 4H ₂ O	10,0
Cloruro de zinc	ZnCl ₂	0,3
Dicloruro de manganeso	MnCl ₂	0,2
Molibdato de amonio Tetrahidratado	(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ 4H ₂ O	0,3
Sulfato de aluminio hidratado	Al ₂ (SO ₄) ₃ 18H ₂ O	0,7
Hexahidrato de cloruro cobaltoso	CoCl ₂ 6H ₂ O	10,0
Nitrato de níquel hexahidratado	Ni (NO ₃) ₂ 6H ₂ O	0,3
Sulfato cúprico pentahidratado	CuSO ₄ 5H ₂ O	0,2
Selenito de sodio Pentahidratado	Na ₂ SeO ₃ 5H ₂ O	0,5
Ácido etilendiaminotetraacético	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	5,0
Ácido clorhídrico	HCl	0,0025
Ácido sulfúrico concentrado	H ₂ SO ₄	100 mL
Nitrato de plata	AgNO ₃	100 mL
Hidróxido de sodio	NaOH	100000
Dicromato de potasio	K ₂ Cr ₂ O ₇	5000,0
Cloruro de cadmio dihidratado	CdCl ₂	10000,0
Solución digestora	-	100 mL
Agua destilada	-	8 L

2.1.3. Equipos de laboratorio

A continuación, se muestra la tabla 3, misma que contiene los equipos de laboratorio a utilizar en la ejecución del trabajo de titulación dentro de los Laboratorios de Investigación de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, carrera de Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato (UODIDE).

Tabla 3.

Equipos de laboratorio necesarios para el desarrollo del trabajo de titulación.

Equipo	Cantidad
Balanza analítica	1
Desecador	1
Equipo de filtrado al vacío	1
Equipo de absorción atómica	1
Estufa	1
Horno microondas para digestión	1
Incubadora	1
Fotómetro multiparamétrico Hanna	1
Medidor multiparámetro HI 9829	1
Mufla de cerámica BIOBASE	1
Plato de calentamiento con agitación magnética	1
Refrigerador	1

2.2. Métodos

2.2.1. Toma de muestra, conservación y transporte

Las muestras fueron tomadas de la planta de tratamiento de aguas residuales ubicada en el sector Las Viñas al norte de Ambato, mismas que se recolectaron durante proceso de tratamiento. Para la toma de muestra se contó con botellas ámbar, estériles correctamente etiquetados con la fecha y hora de la toma de muestra, el número o nombre de la misma donde especificó que la muestra es simple. Cabe mencionar que antes de recoger la muestra, el envase se lavó tres veces con la misma muestra que se tomó, el envase se llenó hasta el tope con la finalidad de eliminar interferencias relacionadas a aireación y se cerró herméticamente. Dichas recolecciones fueron realizadas desde un mismo punto y de la misma manera para cada evento (DEP, 2010).

Por otro lado, para conformar la muestra simple fue basada en el procedimiento descrito por las Normas NTE INEN 2169-2013, NTE INEN- ISO 5667-1:2014 y el método estándar Ed. 23-1060 B. Se recolectó 1000 ml de muestra del mismo sitio por triplicado y se transportó en un *cooler* con hielo, desde PTAR hacia el laboratorio de investigación de la Facultad de ciencia e ingeniería en alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato (UODIDE). Es necesario mencionar que el hielo fue necesario para mantener las muestras a una temperatura entre 3 - 4 °C con el objetivo de que la muestra no pierda su propiedad (Baird et al., 2017).

Preparación de las muestras

En caso de ser necesario, el biosólido se diluyó con agua destilada para su correspondiente análisis según la Norma NTE INEN-ISO 5667-1:2014 (Aguilar et al., 2020).

2.2.2. Métodos analíticos

Los parámetros fisicoquímicos de los biosólidos de la PTAR se realizaron haciendo uso del Laboratorio 1.4 “Análisis Medio Ambiente” de la Unidad Operativa de Investigación y Desarrollo UODIDE con la finalidad de realizar las mediciones de parámetros establecidos en la Tabla 1, se basó en los métodos analíticos descritos por *Standard Methods Ed. 23* (Baird et al., 2017).

Tabla 4.

Métodos de referencia de parámetros en la caracterización de biosólidos.

Parámetro	Método de referencia
Potencial hidrógeno	<i>Standard Methods Ed. 23- 4500-H+ B</i>
Temperatura	<i>Standard Methods Ed. 23- 2550- B</i>
Conductividad	<i>Standard Methods Ed. 23-2510 C</i>
Demanda química de oxígeno	<i>Standard Methods Ed. 23- 5220</i>
Sólidos (ST, SV, SST, SSV)	<i>Standard Methods Ed. 23- 2540 B, C, E, G</i>
Metales pesados	<i>Standard Methods Ed. 23- 3110</i>
Cadmio	<i>Standard Methods Ed. 23- 3500- Cd</i>
Cromo	<i>Standard Methods Ed. 23- 3500- Cr</i>
Amoniaco	<i>Standard Methods Ed. 23- 4500- NH₃</i>
Nitrato	<i>Standard Methods Ed. 23- 4500- NO₃⁻</i>
Sulfato	<i>Standard Methods Ed. 23- 4500- SO₄²⁻</i>
Sulfuro	<i>Standard Methods Ed. 23- 4500- S²⁻</i>
Fosfato	<i>Standard Methods Ed. 23- 4500- PO₄³⁻</i>

Fuente. (Baird et al., 2017).

Potencial hidrógeno (pH)

La medición del pH se realizó en el laboratorio 1.4 de la Unidad Operativa de Investigación y Desarrollo UODIDE-ICIA, para el cual se utilizó un equipo pH-metro de mesa *accumet* AB200 previamente calibrado, mismo que cuenta con un electrodo que fue enjuagado con agua destilada y posteriormente con la muestra (Fisherbrand,

2023). Para lo antes mencionado se tomó aproximadamente 50 mL de muestra en un Erlenmeyer y se introdujo el electrodo en la muestra (sin permitir que el electrodo toque las paredes o el fondo) para finalmente registrar el pH de la muestra una vez que los números se encuentren fijos (Baird et al., 2017).

Temperatura

La medición de Temperatura se realizó en el laboratorio 1.4 de la Unidad Operativa de Investigación y Desarrollo UODIDE-ICIA utilizando el equipo pH-metro de mesa *accumet* AB200 previamente calibrado (Fisherbrand, 2023). Se hizo uso de una muestra de 50 mL colocada en un vaso de precipitación y se introdujo el sensor respectivo sin tocar paredes y fondo. El equipo leyó rápidamente y reportó los valores de la muestra en °C (Baird et al., 2017).

Conductividad

Se tomó 50 mL de muestra en un vaso precipitado, se midió en laboratorio 1.4 de la Unidad Operativa de Investigación y Desarrollo UODIDE-ICIA con ayuda del pH-metro de mesa *accumet* AB200 previamente calibrado y el uso de la sonda de conductividad donde su unidad se mostró en $\mu\text{S}/\text{cm}$ (micro siemens por centímetro) (Fisherbrand, 2023).

Demanda química de oxígeno (DQO)

La determinación de DQO se realizó en el 1.4 de la Unidad Operativa de Investigación y Desarrollo UODIDE-ICIA, donde se hizo uso del método HANNA con el vial de reactivo DQO de bajo rango. El método HANNA para DQO fue adoptado de *US: EPA 410.4 approved method for the COD determination on surface waters and wastewaters*, mismo que menciona que para medir la demanda química de oxígeno, toda muestra debe pasar por un proceso de digestión en una solución compuesta por dicromato de potasio y ácido sulfúrico concentrado. Debido a lo antes mencionado el vial comercial de HANNA viene con la solución digestora a la cual se le añadió 2,5 mL de muestra y una vez cerrado herméticamente se colocó en un reactor HANNA durante 2 horas a 150 °C. Una vez finalizada la digestión de la muestra y enfriado el vial a temperatura ambiente, se procedió a realizar la medición en el fotómetro

HANNA (HANNA, 2016). Cabe mencionar que el blanco para la medición de DQO fue agua destilada por lo que se realizó el mismo procedimiento antes mencionado, pero en vez de muestra se colocó agua destilada.

Sólidos totales (ST), volátiles (SV), suspendidos totales (SST) y suspendidos volátiles (SSV)

Para la determinación de sólidos se tomó en cuenta *Standard Methods Ed. 23- 2540 B, C, E, G* mismo que se basa en la diferencia de pesos (Baird et al., 2017). Inicialmente se tomó pesos de una cápsula (usada para ST y SV) y de un filtro (usado para SST y SSV). Se colocó 50 ml de muestra en la capsula a 105 °C en estufa por 24 horas para determinar ST, una vez que la muestra seca salió y se enfrió en un desecador se tomaron pesos del crisol con la muestra seca. Luego se colocó la misma en una mufla a 550 °C por 3 horas para determinar SV. Finalmente, para determinar SST y SSV se realizó el mismo procedimiento anterior, pero en este caso los 50 ml de la muestra se filtraron al vacío con un filtro y dicho filtro con muestra filtrada es el que se secó en la estufa para posteriormente se pasar a la mufla. Cabe mencionar que en la determinación de SSV, el filtro con muestra seca se colocó en una cápsula previamente pesada para poder ser ingresado a la mufla.

El cálculo de sólidos se realizó a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Sólidos (g/L)} = \frac{(A-B) \times 1000}{\text{ml (muestra)}} \quad (1)$$

Donde,

A: Peso de crisol o filtro + muestra seca

B: Peso inicial de crisol o filtro

En caso de los SSV, A sería el peso del crisol con el filtro de muestra seca y B sería el peso inicial del crisol.

Medición de Metales pesados (cadmio y cromo)

Para la digestión del cadmio se hizo uso del laboratorio canje de deuda de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología, donde inicialmente se realizó una digestión de la muestra de acuerdo al protocolo de *Standard Methods Ed. 23 3030 D* (Baird et al., 2017), mismo que menciona que antes de realizar los análisis de metales, es necesario que la muestra pase por un proceso de digestión basándose en el método 3015A de digestión ácida asistida por microondas (EPA, 2020), por lo que se le añadió 5 mL de ácido nítrico a 45 ml de muestra, finalmente la digestión se generó al colocar en el digestor microondas a 150 °C por 2 horas.

Una vez realizado lo antes mencionado, se procedió a la medición de cadmio, donde se hizo uso del espectrofotómetro de absorción atómica con horno de grafito y lámparas PG, para lo cual se configuró la longitud de onda, siendo 228,8 nm para cadmio (PG Instruments, 2022). Además, la curva de calibración de la absorbancia en función de la concentración se realizó mediante estándares de 1 - 10 ppb de cadmio a partir de una solución patrón de 1000 mg/L. Por último, se leyó y registró las absorbancias provistas por el equipo para calcular la concentración de cada ión en microgramos por litro ($\mu\text{g/L}$) de acuerdo con las curvas de calibración. De igual manera se realizó el procedimiento para medir cromo total en el espectrofotómetro de absorción atómica, sin embargo, se utilizó solución patrón para cromo y la curva de calibración se realizó en rangos de 5 - 100 ppb. (Baird et al., 2017).

Por otro lado, la determinación de cromo VI de los biosólidos se realizó en el laboratorio 1.4 de la Unidad Operativa de Investigación y Desarrollo UODIDE-ICIA empleando el método rápido HANNA mediante el uso del fotómetro multiparamétrico HANNA HI83399 (HANNA, 2021), que fue adaptado de *ASTM Manual of Water and Environmental Technology, D1687-92, Diphenylcarbohydrazide method*, mismo que usa una formulación de polvo seco denominado HI 93723-0 que contuvo un tapón ácido combinado con 1,5-difenilcarbohidrazida el cual reacciona con los iones de cromo (VI) generando una coloración púrpura.

La concentración de cromo VI se expresó como $\mu\text{g/L}$ de cromo VI. Las especificaciones para la determinación del metal se detallan en la tabla 5.

Tabla 5.

Especificaciones para la determinación de cromo VI.

Especificaciones	Cantidad
Rango ($\mu\text{g/L}$)	0-100
Resolución ($\mu\text{g/L}$)	1
Precisión (a 25°C)	$\pm 5\mu\text{g/L} \pm 4\%$
Fuente de luz (nm)	525

Fuente: (HANNA, 2021).

Iones no metálicos

Los iones no metálicos como nitratos, sulfatos, sulfuros, fosfatos y amonio se determinaron en el laboratorio 1.4 de la Unidad Operativa de Investigación y Desarrollo OUIDE-ICIA mediante el uso del fotómetro multiparámetro HANNA HI 83399 (HANNA, 2021).

Medición de nitratos

El para la determinación de nitrato ($\text{NO}_3 - \text{N}$) se realizó mediante el uso del fotómetro HANNA mismo que utiliza el método de reducción de cadmio para el análisis respectivo por lo que se añadió a la muestra un reactivo comercial (HI 93728-0) que contenía gránulos de cadmio para provocar que los iones nitrito reaccionen y formen un compuesto altamente colorido (HANNA, 2021)

Medición de sulfatos

La determinación de sulfatos (SO_4^{2-}) fue posible con el uso del fotómetro HANNA mismo que utiliza la precipitación del sulfato para su análisis, motivo por el cual se añadió a la muestra un reactivo comercial (HI 93751-0) que contenía cristales de cloruro de bario. Una vez realizada la reacción de la muestra transcurrido un determinado tiempo, se midió la misma con método establecido por el equipo que a su vez mide con una fuente de luz de 466 nm (HANNA, 2021).

Medición de sulfuros

Inicialmente se realizó curvas de calibración para sulfuro de 0 y 1 mg/L, donde se observó un cambio de color a azul de metileno lo que resulta de la reacción entre el reactivo colorimétrico, Dimetil pimelimidato (DMP) y el sulfuro. Una vez realizado lo antes mencionado, se colocó 5 mL de cloruro de zinc al 2% en un balón de aforo de 25 mL, luego se adicionó 2,5 mL de solución de DMP (2 g/L) con 20% de ácido sulfúrico concentrado, hierro III (100 g/L) y 0,125 mL de sulfato de amonio, además, se añadió 10 mL de muestra con la finalidad de obtener una concentración máxima de sulfuro de 1 mg/L. Finalmente se midió la muestra en el fotómetro HANNA a una absorbancia de 610 nm (HANNA, 2021).

Medición de fosfatos

Se seleccionó el método *Phosphate LR* (PO_4^{3-}) en la pantalla del fotómetro, luego se midió el blanco el cual fue la misma muestra sin reactivos comerciales. El método de medición de fosfatos en el fotómetro HANNA se basó en *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, Amino Acid method*, que hace referencia a la reacción que tiene los fosfatos frente a reactivos formados por molibdato y amonio motivo por el cual se colocaron dos reactivos comerciales (HI 93717A y HI 93717B) y se midió con una fuente de luz de 525 nm (HANNA, 2021).

Medición de amonio

Al igual que los iones anteriores, se hizo uso del fotómetro HANNA para la medición de amonio ($NH_3 - N$) mismo que se basó en *Standard Test Methods for Ammonia Nitrogen* donde se menciona que se debe añadir solución de Nessler (una combinación de hidróxido de sodio y yoduro de potasio) para que la muestra reaccione con los iones amonio y cambie de color motivo por el cual se añadió soluciones comerciales a 10 mL de muestra, específicamente 4 gotas de cada reactivo (HI93715A y HI93715B) y se procedió a medir en el fotómetro con una fuente de luz de 420 nm (HANNA, 2021).

2.2.3. Ensayos de toxicidad en la actividad metanogénica máxima específica

Medio basal mineral con acetato

Se preparó el medio basal mineral (MB) en laboratorio 1.4 de Investigación Ambiental de la Unidad Operativa de Investigación y Desarrollo UODIDE. Dicho MB estuvo compuesto (en mg/L) por; NH_4Cl (280); KH_2PO_4 (250); $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (82,49); $CaCl_2$ (10); $NaHCO_3$ (3000); extracto de levadura (10); $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ (3204,53) y 1 mL/L de solución de elementos traza. La solución de elementos traza se compuso (en mg/L) por; H_3BO_3 (0,05); $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ (2); $ZnCl_2$ (0,05); $MnCl_2$ (0,032); $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ (0,05); $Al_2(SO_4)_3 \cdot 18H_2O$ (0,14); $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (2); $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ (0,06); $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (0,04); $NaSeO_3 \cdot 5H_2O$ (0,1); EDTA (1); HCl (0,001) (Garzón et al., 2015).

Actividad metanogénica máxima específica

Para determinar la actividad metanogénica se hizo uso del laboratorio 1.6 de la Unidad Operativa de Investigación y Desarrollo UODIDE donde se realizó un bioensayo por triplicado y se emplearon botellas ámbar (125 mL) selladas herméticamente con tapones de corcho donde en una botella se colocó 90 % de medio basal mineral con acetato y 10 % de inóculo bacteriano (muestra) ajustando previamente el MB a pH 7.1-7.6. El acetato fue quien tomó el papel de sustrato donador de electrones en el bioensayo por lo que se añadió 3,2 gramos por litro, esto para obtener condiciones anaerobias para el crecimiento del consorcio bacteriano.

En una segunda botella de 225 mL se colocó hidróxido de sodio al 2% con la finalidad de que el CO_2 generado durante el proceso sea disuelto, de modo que el gas metano y el dióxido de carbono sean separados. Finalmente, se armó el bioensayo de manera que, la primera botella se conecte con la segunda a través de una manguera que contó con una aguja hacia el exterior y adicionalmente se colocó una botella colectora para retener la solución de NaOH desplazado por el gas metano generado. Motivo por el cual el método para cuantificar dicho biogás fue el método por desplazamiento líquido. Los bioensayos se llevaron a incubación por 3 días a 30 °C (Garzón et al., 2015).

Producción de biogás con adición de metales

La producción de biogás se realizó en el del laboratorio 1.6 de la Unidad Operativa de Investigación y Desarrollo UODIDE , donde se monitoreó la generación de gas durante 72 h tomando 3 valores diarios que a su vez se expresaron como moles de CH_4 por g de sólidos suspendidos volátiles (SSV) (Garzón et al., 2015). En la botella ámbar con el medio y el inóculo se añadió distintas cantidades de cadmio o cromo de manera separada y se realizaron los bioensayos por triplicado para cada cantidad de metal adicionado, donde el compuesto madre para el cadmio fue el nitrato de cadmio y para la adición de cromo VI fue el dicromato de potasio. Al igual que en la actividad metanogénica específica máxima, se conectó la botella con el medio, el inóculo y el metal a otra que contenía NaOH al 2% mediante una manguera y una aguja, dicha botella ámbar se encontró sellada con tapón de corcho y estuvo de manera invertida. Se separó el biogás según sus componentes (dióxido de carbono y metano) donde el primero entró en contacto con el hidróxido de sodio y se convirtió en bicarbonato por lo que fue absorbido, mientras que el segundo componente desplazó al hidróxido a través de una segunda aguja direccionada hacia una botella o recipiente colector. Finalmente, el hidróxido de sodio desplazado representó la cantidad de metano generado en el bioensayo (Garzón et al., 2015). Cabe mencionar que el gas metano se midió a partir de método volumétrico o de desplazamiento líquido, mismo que se basa en la cuantificación del metano generado a partir del uso de una sustancia desplazante que en este caso será el NaOH debido a su propiedad de reaccionar con demás componentes gaseosos a excepción del metano, permitiendo de tal manera una medición aproximada del volumen de metano producido (Metcalf & Eddy, 2014). Es necesario recalcar que, para cada peso del recipiente con el hidróxido desplazado, se tomó en cuenta la temperatura ambiente exacta en dicho tiempo.

Además, para la determinación de la concentración de metano generada, se hizo uso de la ley de los gases ideales específicamente la Ley de Avogadro y según (Moya, 2019), la ecuación se da de la siguiente manera:

$$PV = nRT \quad (2)$$

Donde,

P: Es la presión del gas que para este caso es la presión atmosférica de Ambato (0,7370 atm).

V: Es el volumen adquirido de hidróxido misma que representó a la cantidad de metano.

n: Es el número de moles del gas que para este caso sería de metano, mismo que fue despejado y determinado posteriormente.

R: Es la constante de los gases ideales ($0,08206 \frac{atm*L}{mol*K}$).

T: Es la temperatura del gas medida en Kelvin.

2.2.4. Determinación del índice de toxicidad

Se determinó el efecto inhibitorio de los metales pesados sobre la actividad metanogénica o la velocidad de crecimiento del inóculo bacteriano proveniente de biosólidos del biodigestor de la planta de tratamiento de aguas residuales de Ambato realizando varios bioensayos añadiendo distintas concentraciones de cadmio y cromo hexavalente, de manera que se evidencie la disminución de la actividad respecto al bioensayo control (sin metales pesados).

El parámetro a su vez se calculó en base a la siguiente ecuación:

$$I (\%) = \left(1 - \frac{r(CH_4)_C}{r(CH_4)_{Control}}\right) * 100 \quad (6)$$

Donde, IC es porcentaje de índice de toxicidad, $r(CH_4)_C$ es la tasa de generación de metano estacionaria de la fase de crecimiento con las concentraciones ensayo de los metales a evaluar y $r(CH_4)_{Control}$ es la tasa de generación de metano control sin la presencia de los metales a evaluar, a su vez la división de estos dos rendimientos y su multiplicación por 100, representó el porcentaje de actividad metanogénica máxima específica (Ochoa et al., 2009).

CAPITULO III.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis y discusión de los resultados

3.1.1. Caracterización fisicoquímica de biosólidos provenientes de la planta de tratamiento de aguas residuales de Ambato

En la tabla 6 se muestra los resultados de la caracterización fisicoquímica de biosólidos provenientes del biodigestor de la planta de tratamiento de aguas residuales de Ambato, donde además se observa los valores típicos de iones metálicos y no metálicos en biosólidos de plantas de tratamiento de aguas residuales, según los libros “*Wastewater Engineering Treatment and Resource Recovery*” de Metcalf & Eddy, (2023); “*Ingeniería de los sistemas de tratamiento y deposición de aguas residuales*” de Valdez & Vásquez, (2003).

Tabla 6.

Resultados de la caracterización fisicoquímica de biosólidos proveniente del biodigestor de la PTAR-Ambato en comparación con límites máximos permisibles para biosólidos.

Parámetros	Expresado como:	Cantidad obtenida		Valor típico (Metcalf & Eddy)	Valor típico (Valdez & Vásquez)
Cadmio	µg/L	60,74	± 0,003	126 µg/L	-
Cromo VI	µg/L	7	-	11,5 µg/L	-
Cromo total	µg/L	813,87	± 0,007	81, 68 µg/L	-
Amonio	mg/L	660	-	41 mg/L	50 mg/L
Fosfatos	mg/L	241,66	± 14,43	-	96,94 mg/L
Nitratos	mg/L	40	-	-	181,77 mg/L
Sulfatos	mg/L	120	-	-	-
Sulfuros	mg/L	9,04	-	-	-
ST	mg/L	12118	-	16120 mg/L	12000 mg/L
SV	mg/L	6252	-	3040 mg/L	3500 mg/L

SST	mg/L	8200	-	4490 mg/L	-
SSV	mg/L	3600	-	3890 mg/L	-
DQO	mg/L	1053,33	± 11,54	1016 mg/L	1000 mg/L
Temperatura	°C	25,80	-	< 40 °C	-
Conductividad	μS/cm	693,80	-	500-1500	-
pH	-	7,73	± 0,005	6-8	6-9

Nota: Los resultados obtenidos representan la media de 3 repeticiones y su respectiva desviación estándar.

Inicialmente se realizó el análisis de los parámetros físicos de la muestra de biosólidos del biodigestor de la PTAR-Ambato como son temperatura, conductividad y pH. La temperatura mostró resultado de 25,8 °C el cual se encontró dentro del valor típico de ser menor a 40 °C propuesto por (Metcalf & Eddy, 2014), tomando en cuenta que este valor fue medido media hora después de la recolección de muestra por lo que su temperatura bajó en comparación a la temperatura del biodigestor misma que según GAD, (2020), fue de 36 °C. La disminución de la temperatura pudo deberse a que la muestra fue transportada a 4°C hasta el laboratorio 1.4 de la Unidad Operativa de Investigación y Desarrollo UODIDE para su correspondiente análisis. Conjuntamente, es oportuno decir que si la temperatura fuese mayor a la establecida afectaría a las sales y a la solubilidad de gases en la muestra, mientras que a una temperatura menor a 40 °C favorece el desarrollo del consorcio bacteriano aumentando su actividad metabólica en una temperatura adecuada (Durai & Rajasimman, 2010).

La conductividad por otra parte, mostró un resultado de 693,8 μS/cm que se encuentra dentro del valor típico por Metcalf & Eddy, (2023), con un valor de 500 μS/cm y 1500 μS/cm de conductividad para lodos activados de un digestor y estos a su vez se basaron en el *Environmental Protection Agency*. El método de conductividad es ampliamente utilizado para estimar la cantidad de sólidos disueltos totales porque tiene una relación directa con la concentración de sustancias ionizadas disueltas en la muestra que se desea analizar lo cual el resultado se ve influenciado por la temperatura, dado que a

medida que la temperatura aumenta, también lo hace la conductividad debido al movimiento de los iones en la solución (Grellier et al., 2006). En el análisis del pH se obtuvo un resultado de $7,73 \pm 0,0057$ encontrándose dentro del valor típico. Pues Metcalf & Eddy, (2023); Valdez & Vásquez, (2008) en sus libros “*Wastewater Engineering Treatment and Resource Recovery*” e “*Ingeniería de los sistemas de tratamiento y deposición de aguas residuales*”, respectivamente, aluden que el pH óptimo debe encontrarse entre 6 y 9 con la finalidad de mantener un proceso de tratamiento de lodos activados eficaz garantizando a su vez las condiciones óptimas para que el proceso funcione bien.

Los iones metálicos evaluados en el biosólido del biodigestor de la PTAR fueron cadmio, cromo VI y cromo total, mismos que presentaron concentraciones de 60,74 , 7 y 813,87 $\mu\text{g/L}$ respectivamente. Cabe mencionar que estos metales son considerados metales pesados tóxicos debido que su densidad es mayor a 5 g/cm^3 y por su capacidad de ingresar a las vías fluviales ocasionando contaminación ambiental e incluso llegan a introducirse en células bacterianas que favorecen la descomposición de la materia orgánica causando toxicidad en su metabolismo celular (Hu et al., 2018). Además, como se visualiza en la Tabla 6, la cantidad de cadmio y cromo (VI) se encuentra dentro del valor típico establecido por Metcalf & Eddy, (2023), mientras que el valor de cromo total no se encontró dentro de los datos de referencia por el mismo autor mencionado, el cual fue de 81,68 $\mu\text{g/L}$, demostrando de tal manera que el cromo total sobrepasa dicho rango 10 veces más a lo establecido, lo cual podría afectar el tratamiento de biosólidos.

Por otro lado, el valor obtenido de cromo (VI) de 7 $\mu\text{g/L}$ pudo verse afectado a causa de la presencia de sulfatos y sulfuros en la muestra, según mencionan Durai & Rajasimman, (2010) es posible disminuir el cromo (VI) a través de la actividad sulfato reductora en ambientes anaerobios con presencia de compuestos orgánicos y cromo (VI) , provocando que el sulfato se reduzca a sulfuro y el sulfuro proceda a reducir el cromo (VI) a cromo (III), lo que incitaría una disminución del valor obtenido de cromo (VI) e incluso se podría obtener un valor por debajo de los límites permisibles.

Los iones no metálicos analizados en la muestra de biosólidos fueron amonio, fosfatos, nitratos, sulfatos y sulfuros, mismos que son considerados a su vez como nutrientes que favorecen el desarrollo de microorganismos donde amonio y nitrato son utilizados como fuente de nitrógeno, fosfato como fuente de fosfato, finalmente el sulfato y sulfuro como fuente de azufre (Meegoda et al., 2018). La concentración de nitrato en los biosólidos fue de 40 mg/L mismo que no pudo ser comparado con valores teóricos establecidos de concentraciones en biosólidos, sin embargo, Naz et al., (2015) determinó que, en lodos de depuradora y condiciones anaerobias, los nitratos pueden llegar a medir hasta 136,9 mg/L, por ende, el resultado obtenido en los biosólidos de la PTAR es bajo por lo que no afectaría en el funcionamiento del tratamiento secundario de la PTAR- Ambato. La concentración de amonio fue de 660 mg/L lo cual sobrepasa el valor típico establecido por Metcalf & Eddy, (2023) y (Valdez & Vásquez, 2008), de 41 mg/L y 50 mg/L respectivamente, lo que pudo ser consecuencia de la presencia de materia orgánica proveniente de lugares de faenamiento o de los servicios sanitarios de cada hogar, teniendo en cuenta que los desechos fecales y materia orgánica en general que entra a la PTAR tiene un alto contenido de nitrógeno en forma de nitrógeno orgánico y amonio, los cuales durante el primer tratamiento realizado por la PTAR deben ser disminuidos en cantidad para que se proceda al tratamiento secundario en el biorreactor (GAD, 2020).

Otro de los parámetros de iones no metálicos fue el fosfato con una concentración obtenida de 241,66 mg/L, observándose también que presentó una alta desviación estándar luego de ser calculada a partir de las tres mediciones realizadas y a su vez el valor de 241,66 mg/L es muy alto en comparación al valor de referencia de 96,94 mg/L establecido por Valdez & Vásquez, (2008), dicho valor pudo deberse a que el origen de la muestra fue el biodigestor de la PTAR mismo que forma parte de su tratamiento secundario el cual no permite eliminar más de 2 mg/L de fosfato porque en el biodigestor no es posible realizar hidrólisis ácida y al encontrarse en ambiente anaerobio provoca el efecto de eutrofización que es el exceso de nutrientes inorgánicos como nitrato y fosfato en un ambiente acuático además de impedir el crecimiento de microorganismos aerobios y generar mal olor (García et al., 2018). En cuanto a los iones sulfato y sulfuro, no se encontraron valores de referencia para su presencia en lodos activados, sin embargo, Naz et al. (2015), menciona en su estudio que la cantidad

máxima de sulfatos fue de 84,2 mg/L lo que significaría que hay gran cantidad de sulfatos que sobrepasa la referencia. Al igual que la cantidad de cromo (VI) se vio afectado al reducirse a cromo (III), la cantidad de sulfuro aumentó al disminuir el sulfato, esto debido a la actividad sulfato reductora (Durai & Rajasimman, 2010).

Dentro de los parámetros que tiene una muestra de biosólidos de un digestor, se mencionan a distintos sólidos como ST, SV, SST y SSV. Los resultados obtenidos de ST fue 12118 mg/L y SST fue 8200 mg/L mismos que se encuentran muy elevados en comparación con Metcalf & Eddy, (2023); Valdez & Vásquez, (2008) que cuentan con valores típicos para ST de 16120 mg/L y 12000 mg/L respectivamente y con valores referenciales para SSV de 3890 mg/L según (Metcalf & Eddy, 2014) , además los valores elevados de ST y SST señalan una alta concentración de biomasa ya sea viva o muerta y una elevada cantidad de sedimentos dentro del biodigestor de la PTAR (Mullins et al., 2018). De la misma forma las concentraciones de 6252 mg/L de SV y 3600 mg/L de SSV se encontraron por encima de los valores de Metcalf & Eddy, (2023) de 3040 mg/L para SV y 3890 mg/L para SSV. Los SV o SSV se mostraron en rango mayores a los referenciados, por consecuencia de la elevada cantidad de materia orgánica que queda en el biosólido donde dichos resultados representan la misma ya que esta se oxida formando gas carbónico y agua que se volatilizan a 550 °C, a su vez estiman la concentración de lodos activados en el biodigestor lo que permite que la PTAR use esos parámetros para controlar sus desechos o recirculación (Mullins et al., 2018).

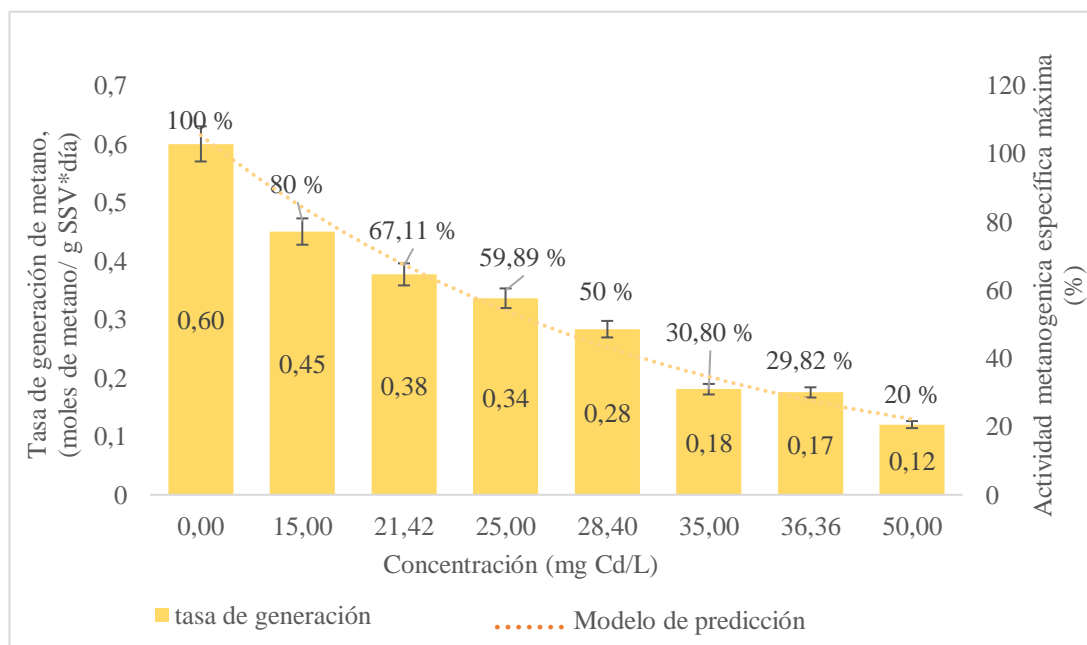
Finalmente, la concentración de DQO en los biosólidos del biodigestor fue de 1053,33 ± 11,547 mg/L lo cual sobrepasó los valores de 1016 mg/L y 1000 mg/L establecidos por Metcalf & Eddy, (2023); Valdez & Vásquez, (2008) respectivamente. Según Metcalf & Eddy, (2023), existen varios factores que afectan el valor de DQO, aumentándolo de manera excesiva en un reactor biológico, los que incluyen una alta carga de materia orgánica en el sistema, un exceso de microorganismos que consumen oxígeno o la falta de disponibilidad de oxígeno para los microorganismos, donde el primer y último factor pueden ser las razones principales ya que el biodigestor de la PTAR-Ambato se encuentra en condiciones anaerobias con un alto contenido de materia orgánica.

3.1.2. Determinación de la actividad metanogénica máxima específica (AME) del inóculo bacteriano a partir de la producción de biogás.

En las Figuras 2 y 3, se observa la tasa de generación de metano por bacterias anaerobias presentes en los biosólidos del biodigestor de la PTAR- Ambato, donde se adicionó distintas concentraciones de cadmio y cromo hexavalente a distintos bioensayos con biosólido como inóculo y medio basal mineral con acetato para favorecer el desarrollo de microorganismos que generan gas metano y se incubó durante 3 días, con la finalidad de determinar la AME del inóculo bacteriano con adición de metales pesados respecto a un control.

Figura 2.

Tasa de generación de metano en función a distintas concentraciones de Cd.



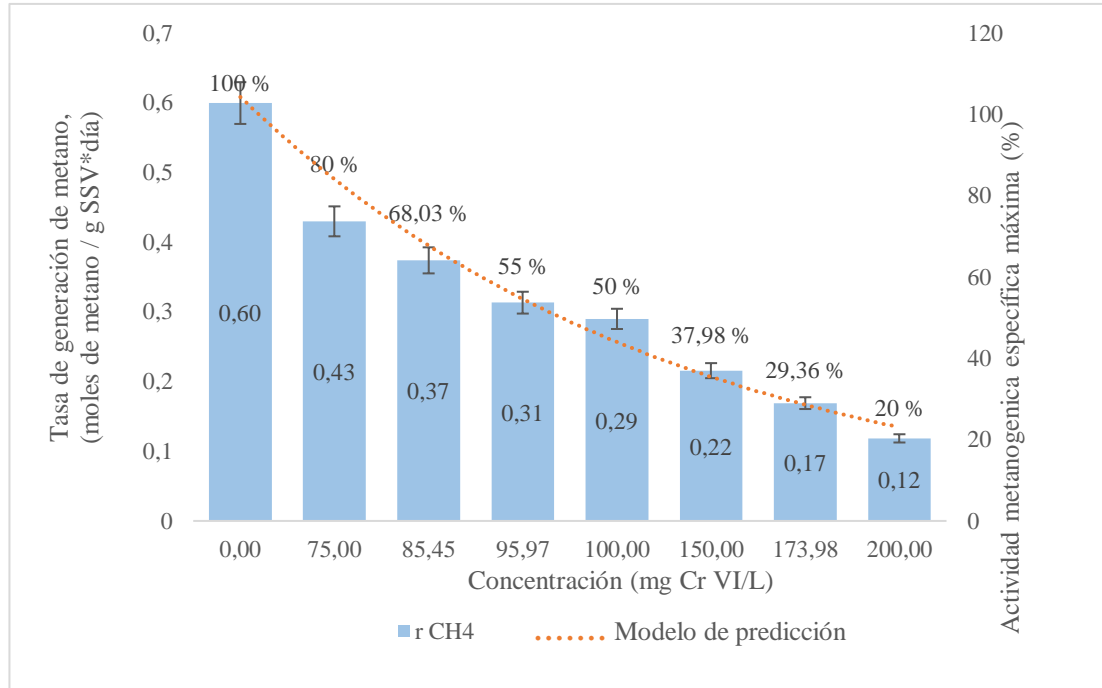
Nota: Mediante el método de desplazamiento volumétrico se obtuvo valores aproximados de moles de metano aplicando la ley de los gases ideales, mismo que favoreció a la obtención de la tasa de generación de metano para ser comparado con su porcentaje de actividad metanogénica máxima específica respecto a las distintas concentraciones de cadmio adicionadas a cada bioensayo realizado.

Según la Figura 2, se hizo evidente que la tasa de generación de metano que se vio reflejado en moles de metano por gramo de SSV al día. Mullins et al., (2018), menciona que los SSV representan la cantidad de materia orgánica que se encuentra en una muestra por lo que teóricamente esos compuestos orgánicos que componen a los SSV son convertidos en metano, debido a ello la tasa de generación de metano estuvo representado en moles de metano por gramo de materia orgánica. Además, se visualizó que el control a diferencia de los bioensayos con adición de cadmio, tuvo un valor máximo de tasa de generación de metano de 0,6 moles de metano por gramo de SSV, mientras que, al adicionar cadmio, la tasa de generación de metano disminuyó significativamente al finalizar los bioensayos de 3 días de duración (Anexo C- Figura 6). De acuerdo a (DEP, 2010), las características químicas y biológicas de los biosólidos que han sido utilizados como inóculo y el medio basal con acetato, son adecuadas para que los microorganismos anaerobios puedan desarrollarse y ser activos, lo que reflejó que la adición de acetato fue eficaz para el desarrollo de microorganismos metanogénicos aumentando su potencial.

Durai & Rajasimman, (2010), mencionan que la degradación de contaminantes en un biodigestor está directamente relacionada con las actividades microbianas presentes, por ello, cuando la concentración de metales es alta, la actividad microbiana se ve afectada. Esto se evidenció al comparar el porcentaje de AME al adicionar un metal como el cadmio de manera que disminuyó conforme la concentración de metal fue aumentando, dándose un porcentaje de AME de 100 %, 80 %, 67,11 %, 59,89 %, 50 %, 30,8 %, 29,82 % y 20 % , a concentraciones de cadmio de 0 mg/L , 15 mg/L, 21,42 mg/L , 25 mg/L, 28,4 mg/L, 35 mg/L, 36,36 mg/L y 50 mg/L respectivamente. Un estudio preliminar realizado por Abdel & Mansour, (2014) en el que se analizó el efecto del mercurio, cadmio y cromo hexavalente, mencionó que la tasa de generación de metano en 300 días fue de 40,96 moles de metano y durante 72 horas dicha tasa de generación fue de 0,53 moles de metano, además el estudio menciona que al añadir 13,6 mg/L de cadmio se generó un 80 % de actividad metanogénica máxima específica , mientras que al añadir 0,34 mg/L de cadmio se redujo la actividad metanogénica en un 76,8 % . Los valores obtenidos en el estudio de referencia pudieron deberse a que durante la experimentación se realizó una alimentación por pulso de cadmio es decir que constantemente se ingresaba distintas cantidades de cadmio al sistema.

Figura 3.

Tasa de generación de metano en función a distintas concentraciones de Cr (VI).



Nota: Mediante el método de desplazamiento volumétrico se obtuvo valores aproximados de moles de metano aplicando la ley de los gases ideales, mismo que favoreció a la obtención de la tasa de generación de metano para ser comparado con su porcentaje de actividad metanogénica máxima específica respecto a las distintas concentraciones de cadmio adicionadas a cada bioensayo realizado.

La productividad de metano o productividad metanoica es uno de los indicadores que se utilizan para determinar la cantidad de biogás que se produce en un biodigestor, este parámetro se refiere a la cantidad de metano que se produce por unidad de tiempo, a partir del sustrato que se ha cargado en el bioensayo (Rivas et al., 2016). En la Figura 3, se observó que la tasa de generación de metano disminuye cuando la concentración de cromo adicionado es mayor. En el control, debido a la ausencia del metal, la AME llegó al 100% con una tasa de generación de 0,6 moles CH_4 / g SSV* día. Mientras que los bioensayos con adición de cromo han afectado la generación de metano debido a la toxicidad que dicho metal tiene hacia los microorganismos presentes en los biosólidos. Los microorganismos se vieron afectados por la toxicidad de los aniones Cr (VI) porque tienen un alto potencial redox, lo que genera condiciones extremas de óxido-reducción dificultando la vida de microorganismos anaerobios, además, los

aniones Cr (VI) reacciona con agentes reductores del organismo ya sea ácido ascórbico o tiol, generando radicales hidroxilos, superóxidos e iones peróxido de hidrógeno lo que puede dañar proteínas y ácidos nucleicos intracelulares (Hu et al., 2018).

Además, para que disminuya la generación de metano se requirió la adición de mayor cantidad de Cr (VI) que cantidad de Cd (II), lo cual pudo deberse a la existencia de microorganismos reductores de Cr (VI) o a que el inóculo inicialmente tuvo un alto contenido de cromo, favoreciendo a que los microorganismos pertenecientes al mismo se adapten a dicha condición o a su vez, debido a la presencia de sulfuros, a la presencia de microorganismos reductores de Cr (VI) o a través de componentes presentes en el protoplasma celular (ácidos orgánicos, proteínas, aminoácidos, carbohidratos, nucleótidos, y flavonoides) que pueden servir como donantes de electrones favoreciendo a que dicho metal sea transformado en Cr (III) haciendo de este metal un metal inerte que se precipita y forma parte de los sólidos en la muestra (Hu et al., 2018). Por ende, la AME mantuvo su alto nivel de generación de metano, sin embargo, al adicionar valores igual o mayor al antes mencionado, como son: 75; 85,45; 95,97; 100; 150; 173,98 y 200 mg Cr (VI)/L, se observó una disminución significativa del AME llegando hasta un porcentaje de 20.

Cabe mencionar que la tasa de generación de metano puede verse afectada por la temperatura, debido que se cuantificó el metano a partir del método por desplazamiento líquido utilizando hidróxido de sodio como sustancia desplazante mismo que la ser desplazado representó la cantidad de metano generado, para el cual se realizó mediciones del volumen desplazado cada cierto tiempo tomando en cuenta la temperatura exacta del ambiente al momento de su medición. Dicha temperatura fue utilizada para determinar los moles de metano a partir de la ley de los gases ideales (ecuación 2). Moya, (2019) menciona que, dentro de la ley de los gases ideales, la temperatura tiene un impacto significativo en el estado de las moléculas del gas ya que puede aumentar o disminuir su velocidad y a su vez aumentando o disminuyendo la cantidad de moles del gas.

3.1.3. Estimación del índice de inhibición toxica de Cd y Cr (VI) en la actividad metanogénica del inóculo bacteriano de los biosólidos del biodigestor.

Los metales pesados son altamente reactivos cuando se encuentran en forma catiónica o unidos a otros compuestos, ya que tienen una alta afinidad bioquímica hacia grupos funcionales (como los grupos sulfhidrilo) que son importantes para las enzimas que catalizan reacciones críticas en un organismo. Se ha observado que los iones metálicos pueden interactuar con componentes celulares, incluyendo ADN y proteínas, provocando alteraciones conformacionales y daños que pueden afectar el ciclo celular (Durán et al., 2018). Actualmente se ha incorporado una idea nueva que se llama Concentración Inhibidora (IC) la cual se usa para describir los efectos negativos y toxicidad de los metales en la inhibición de la actividad metanogénica de los sistemas biológicos anaerobios (Metcalf & Eddy, 2014). En el presente estudio se analizó el efecto tóxico del cadmio y cromo (VI) en la actividad metanogénica máxima específica de un inóculo bacteriano de biosólidos del biodigestor de la PTAR-Ambato en base a la adición de distintas concentraciones de los mismos dentro de varios bioensayos (Anexo D).

En la Tabla 7 se observa las concentraciones de cadmio y cromo hexavalente para producir inhibición del 20, 50 y 80 % de la AME en microorganismos anaerobios presentes en los biosólidos del biodigestor de la PTAR-Ambato, donde dichas concentraciones fueron establecidas en base a las pendientes del control con respecto a la tasa de generación de metano de cada metal expresadas en $n \text{ CH}_4/\text{g SSV}^* \text{ día}$ (Anexo C), y se comparó respecto al control según la ecuación de inhibición (3) (véase en el apartado 2.2.4). Cabe mencionar que se realizó bioensayos con cuatro concentraciones diferentes para cada metal y para determinar las concentraciones inhibitorias requeridas, en caso de ser necesario, se realizó interpolación a partir de la recta obtenida con las concentraciones establecidas de 15, 25, 35 y 50 mg/L de cadmio y de 75, 100, 150 y 200 mg/L de cromo (VI).

Tabla 7.

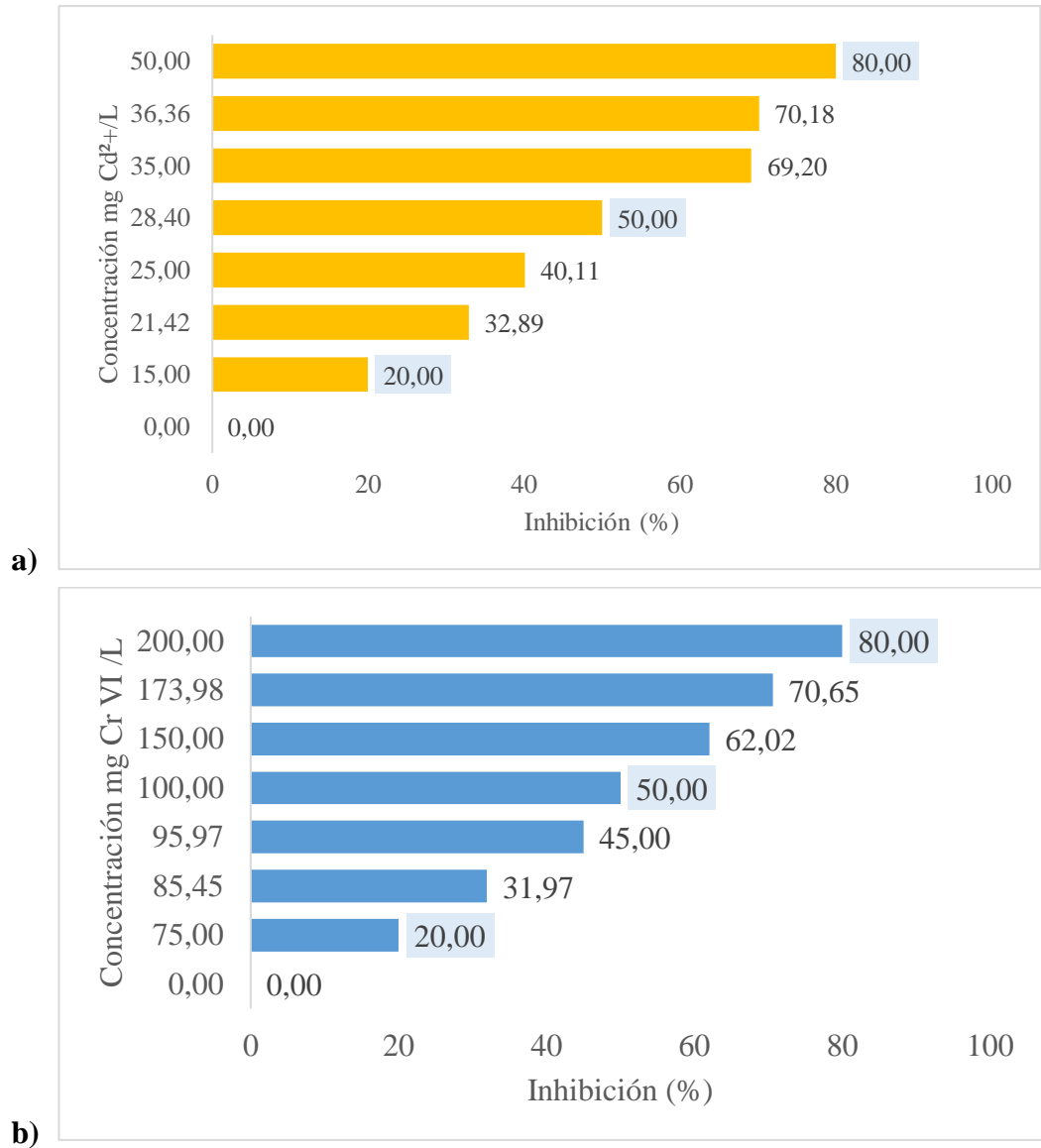
Concentraciones inhibitorias de cadmio y cromo (VI) del 20, 50 y 80 %.

	Cd (mg/L)	Cr (mg/L)
<i>IC₂₀</i>	15	75
<i>IC₅₀</i>	28,40	100
<i>IC₈₀</i>	50	200

En base a los porcentajes de inhibición presentados en la tabla # respecto a la toxicidad de ambos metales en la AME del inóculo bacteriano, se puede evidenciar que el cadmio es más tóxico que el cromo hexavalente ya que se requirió de menor concentración para inhibir la generación de metano. Los iones de metales pesados tienen un efecto incrementador en la actividad de bacterias siempre y cuando se encuentren en bajas concentraciones, sin embargo, a partir de una concentración considerable de los metales, pueden proporcionar toxicidad provocando disminución de la velocidad de crecimiento y de la generación de metano, dicha toxicidad aumenta con el peso molecular por lo que el orden de toxicidad de los metales pesados es Ni>Cu>Cd>Cr(VI) – Cr (III)>Pb>Zn (FAO, 2011).

Figura 4.

Porcentajes de inhibición tóxica de cadmio y cromo (VI) sobre bacterias anaerobias presentes en los biosólidos del biodigestor de la PTAR-Ambato.



Nota: A partir de la realización de bioensayos para generación de metano, se obtuvo inhibición de la AME al adicionar cadmio y cromo (VI). a) Se visualiza que las inhibiciones se incrementaron conforme se aumentó la cantidad de cadmio, partiendo de 15; 25; 35; 50 mg C/L y provocando inhibiciones de 20; 40,11; 69,20 y 80 % respectivamente. b) Las inhibiciones se incrementaron conforme se aumentó la cantidad de cromo, partiendo de 75; 100; 150; 200 mg Cr/L y provocando inhibiciones de 20; 50; 62,02 y 80 % respectivamente.

Como se observa en la Figura 4a el efecto inhibitorio se ha hecho evidente al reducir la actividad metanogénica máxima específica conforme la concentración adicionada de metal va en aumento. Se realizaron bioensayos adicionando concentraciones de cadmio de 15, 25, 35 y 50 mg/L mismos que presentaron inhibiciones de 20; 40,11; 69, 2 y 80 % respectivamente, lo cual se encuentra dentro de los parámetros para inhibir a AME en comparación a estudios realizados con dicho metal para la producción de biogás establecidos por Abdel & Mansour, (2014), mencionando en su estudio que la inhibición por cadmio en la generación de metano parte de 0,1 a 75 mg Cd /L , donde el valor mayor puede inhibir de un 90 a un 100 % la generación de metano. Los valores inhibitorios para las concentraciones de 21,42 ; 28,4; 36,36 mg/L fueron establecidos a partir de la recta obtenida de la curva de concentración respecto al porcentaje de inhibición a partir de una interpolación (Anexo C – Figura 8). La toxicidad del cadmio en microorganismos anaerobios radica en que inhibe las actividades enzimáticas de los microorganismos presentes en las plantas de tratamiento de aguas residuales, además de que a inhibir estas enzimas hace que se interrumpa los metabolismos microbianos y ocasiona daños en su membrana celular (Grazioso et al., 2020).

Los efectos tóxicos del cadmio se dieron en concentraciones muy bajas en comparación a la toxicidad del cromo (VI) se pudo deber a que los microorganismos utilizan mecanismos de transporte de nutrientes a través de la membrana celular, además tiene la capacidad de interactuar con los transportadores de membrana que se encargan de absorber los nutrientes, limitando los sitios de unión de proteínas mediante el proceso denominado mimetismo catiónico que es la capacidad de imitar ser un nutriente para que las proteínas transportadoras introduzcan el cadmio en las células evitando que los nutrientes que de verdad son esenciales para el funcionamiento de la célula entren en la misma, por ende provoca daños celulares e incluso provocaría la muerte celular (Genchi et al., 2020).

Por otro lado, en el estudio de Abdel & Mansour, (2014), se realizó una evaluación de la toxicidad del mercurio, cromo y cadmio en la digestión anaeróbica de lodos de una PTAR, donde se evidenció que el nivel de toxicidad de cada metal fue en el orden de: Hg>Cd>Cr al inhibir en un 80 % la generación de metano en concentraciones de 55

mg/L con cadmio y 225 mg/L de cromo (VI) , valores muy cercanos a los adicionados en el presente estudio según la Figura 4 donde la cantidad de cadmio (Figura 4a) fue menor a la de cromo (VI) (Figura 4b) para que se genere toxicidad. Estudios previamente reportados hacen referencia a interacciones metal-microorganismo sosteniendo que dicha combinación da lugar a la inhibición de la actividad del organismo e incluso ocasionar la muerte del consorcio bacteriano (EPA, 2020a). Por esta razón, el cadmio ejerció toxicidad en la AME del inóculo bacteriano ya que este metal según Grazioso et al., (2020), tiene la capacidad de reemplazar el zinc y manganeso de ciertos sitios de unión de una proteína específica relacionada con el ADN, lo que puede afectar su estructura debido que dichos iones tienen cargas y tamaños similares, por lo tanto, la presencia del cadmio puede tener un efecto tóxico en el organismo.

Según (FAO, 2011), la inhibición experimentada por los microorganismos varía ampliamente según diversos factores, por ejemplo, si la incorporación del metal se da de manera gradual, los microorganismos pueden adaptarse y reducir el efecto tóxico, si los metales que se adicionan son solubles debido que pueden presentar mayores dificultades para el proceso en comparación con las formas insolubles o si existe la presencia de sulfuros porque estos disminuyen la toxicidad de los metales al formar sulfuros de metal insolubles (excepto para el cromo), los cuales se precipitan y permiten tolerar altas concentraciones de metales pesados en estos casos.

El último caso mencionado fue el que se presentó en la realización de los bioensayos, pues al existir cierta cantidad de sulfuros en los inóculos, la inhibición por parte del cromo se vio afectada pues se requirió de gran cantidad del mismo para que inicie un efecto inhibitorio en la generación de metano como se pudo observar en la Figura 4b donde la inhibición del 20% se dio con la adición de 75 mg Cr (VI)/L, mientras que la inhibición del 80% se dio con la adición de 200 mg/L. Adicionalmente, puede existir otro motivo por el cual se requirió mayor concentración de cromo para inhibir el inóculo el cual puede ser que existió remoción biológica del metal por parte de microorganismos denominados *Pseudonomas sp.*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium* y *Candida maltosa* que tienen un efecto microbiostático al remover el

cromo hexavalente, removiendo el metal y deteniendo el crecimiento microbiano sin matar al organismo (Ake et al., 2023).

3.2. Verificación de hipótesis

A partir de los datos obtenidos de los bioensayos y del análisis ANOVA (Anexo E), se hace factible aceptar la hipótesis alternativa dado que la adición de metales pesados como el Cd^{2+} y Cr^{6+} a concentraciones de 50 y 200 mg/L respectivamente, tuvo un efecto inhibitorio sobre la actividad metanogénica máxima específica de microorganismos anaerobios de los biosólidos del biodigestor de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de la ciudad de Ambato sector Las Viñas, lo cual se evidenció al disminuir la tasa de generación de metano en el transcurso de 3 días.

CAPITULO IV .- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- A partir de la estimación de generación de metano mediante un método de desplazamiento volumétrico y el enriquecimiento con medio basal mineral con acetato, se evaluó la inhibición tóxica del cadmio (II) y cromo (VI) en la actividad metanogénica de un inóculo bacteriano proveniente de biosólidos del biodigestor de la PTAR-Ambato, donde se demostró que al aumentar concentraciones de cadmio y cromo (VI) existe una disminución significativa de la actividad metanogénica máxima lo que ocasionaría inconvenientes en el proceso de digestión anaerobio de la PTAR representando un riesgo potencial tanto para el medio ambiente como para la salud humana.
- Se realizó la caracterización fisicoquímica de los biosólidos del biodigestor de la PTAR-Ambato, en la tabla 6 se evidenció que parámetros como nitratos, temperatura, conductividad y pH estuvieron dentro de los valores típicos de lodos activados de una PTAR. Mientras que Cr (VI) y sulfuros presentaron valores menor y mayor al referencial respectivamente, lo que pudo deberse a la actividad sulfato reductora donde el sulfato se reduce a sulfuro y el sulfuro reduce el cromo (VI) a cromo (III).
- Mediante la adición de metales pesados como el cadmio y cromo (VI) (Figuras 2 y 3) en la mezcla de medio basal mineral con acetato y el inóculo se demostró que existe toxicidad directa por parte de estos metales en la actividad metanogénica específica máxima. La actividad metanogénica máxima específica del inóculo sin adición de metales presentó una tasa de generación de metano de 0,6 moles CH_4 / g SSV por día, mismo que fue disminuyendo con la adición de 15, 25, 35 y 50 mg Cd/L provocando tasas de generación de metano de 0,45; 0,34; 0,18 y 0,12 moles CH_4 / g SSV por día respectivamente. También disminuyó con la adición de cromo (VI) en concentraciones de 75, 100, 150 y 200 mg Cr (VI)/L generando tasas de 0,43; 0,29; 0,22 y 0,12 moles CH_4 / g SSV por día donde las generaciones de metano mencionadas pudieron verse sujetas a cambios ya que para la transformación de volumen de NaOH a moles de metano se tomó en cuenta la temperatura exacta al momento de

monitorear la generación de metano, en caso de la temperatura ser mayor o menor, las moles de metano obtenidas cambiarían.

- La estimación del índice de toxicidad del cadmio y cromo hexavalente sobre la actividad metanogénica de bacterias anaerobias se realizó mediante un análisis de concentración inhibitoria (Figura 4), donde se comparó las concentraciones del metal añadido respecto a la disminución de su actividad metanogénica. Los resultados de inhibición tóxica para IC_{20} , IC_{50} e IC_{80} con la adición de cadmio se dieron al adicionar 15; 28,4 y 50 mg/L respectivamente, de los cuales el valor de IC_{50} se determinó a partir de la recta de comparación entre las cuatro concentraciones añadidas y el porcentaje de inhibición calculado a partir de dichas concentraciones (Anexo B - figura 8). De igual manera, la inhibición tóxica para IC_{20} , IC_{50} e IC_{80} con la adición de cromo (VI) se dieron al añadir concentraciones de 75, 100, y 200 mg/L. Las inhibiciones al comparar ambos metales se evidenciaron que se requiere de mayor cantidad de cromo que de cadmio para que se inhiba al mismo porcentaje.

4.2. Recomendaciones

- Ejecutar un proyecto enfocado a la toxicidad de distintos metales en la actividad metanogénica máxima específica combinando varios metales en un mismo ensayo.
- Diseñar un sistema que permita capturar gas metano puro y que al mismo tiempo dicho sistema permita degradar la materia orgánica disminuyendo la contaminación por metales pesados en biosólidos.
- Implementar técnicas de identificación de microorganismos presentes en los biosólidos, con la finalidad de conocer si cuentan con metabolismos que permitan reducir la contaminación por metales pesados o su importancia en la degradación de materia orgánica.

MATERIALES DE REFERENCIA

Referencias Bibliográficas

- Abdel, H. I., & Mansour, M. S. (2014). Biogas production as affected by heavy metals in the anaerobic digestion of sludge. *Egyptian Journal of Petroleum*, 23(4), 409-417. <https://doi.org/10.1016/j.ejpe.2014.09.009>
- Aguilar, M. I., Lloréns, M., Fernández, J. M., Pérez, A. B., Ortuño, J. F., & Meseguer, V. F. (2020). Heavy metals effect on the heterotrophic activity of activated sludge. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 17(5), 3111-3118. <https://doi.org/10.1007/S13762-020-02704-1>
- Ahmed, S. F., Mofijur, M., Nuzhat, S., Chowdhury, A. T., Rafa, N., Uddin, M. A., Inayat, A., Mahlia, T. M. I., Ong, H. C., Chia, W. Y., & Show, P. L. (2021). Recent developments in physical, biological, chemical, and hybrid treatment techniques for removing emerging contaminants from wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, 4(16), 125-912. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2021.125912>
- Ake, H., Hafidi, M., Ouhdouch, Y., Jemo, M., Aziz, S., & El Fels, L. (2023). Microorganisms from tannery wastewater: Isolation and screening for potential chromium removal. *Environmental Technology & Innovation*, 3(1), 103-167. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2023.103167>
- Ali, I., Naz, I., Peng, C., Elsalam, K., Khan, Z., Islam, T., Pervez, R., & Amjed, M. (2021). *Sources, classifications, constituents, and available treatment technologies for various types of wastewater: An overview*. 2(1), 11-46. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821141-0.00019-7>
- Baca, I., & Martinez, A. (2017). Evaluación de la toxicidad microbiana en un reactor anaerobio para el tratamiento de lixiviados ricos en cromo (VI). *Jóvenes en la Ciencia: Verano de la Investigación Científica*, 3(2), 2-4. <http://repositorio.ugto.mx/handle/20.500.12059/3945>

- Baird, R., Eaton, A., & Rice, E. (2017). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. En *American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation* (23rd ed.). American Public Health Association.
- Bermudes, J. (2022). *Análisis de biosólidos - AGQ labs*. <https://agqlabs.co/2022/02/25/analisis-de-biosolidos/>
- Buitron, G., Reino, C., & Carrera, J. (2018). *Manual técnico sobre tecnologías biológicas aerobias aplicadas al tratamiento de aguas residuales industriales*. http://www.cyted.org/sites/default/files/manual_sobre_oxidaciones_avanzadas_
- Cando, C. (2021). *Estadística de información ambiental económica en gobiernos autónomos descentralizados municipales*. GAD Municipales, INEC. [https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Encuestas_Ambientales/Municipios_2021/Agua_potable_alcantarrillado_2021/PRESENTACION%20APA%202021_V7%20\(Rev.%20Dicos\).pdf](https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Encuestas_Ambientales/Municipios_2021/Agua_potable_alcantarrillado_2021/PRESENTACION%20APA%202021_V7%20(Rev.%20Dicos).pdf)
- Collivignarelli, M. C., Canato, M., Abbà, A., & Carnevale Miino, M. (2019). Biosolids: What are the different types of reuse? *Journal of Cleaner Production*, 23(8), 117-844. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2019.117844>
- Crini, G., & Lichtfouse, E. (2019). Advantages and disadvantages of techniques used for wastewater treatment. *Environmental Chemistry Letters*, 17(1), 145-155. <https://doi.org/10.1007/S10311-018-0785-9/TABLES/1>
- DEP. (2010). *Biosolids Sampling Manual Commonwealth of Pennsylvania*. Department of Environmental Protection. <https://files.dep.state.pa.us/water/bpnpsm/wastewatermanagement/Biosolids/3800-MN-DEP4081combined.pdf>
- Durai, G., & Rajasimman, M. (2010). Biological Treatment of Tannery Wastewater - A Review. *Journal of Environmental Science and Technology*, 4(1), 1-17. <https://doi.org/10.3923/jest.2011.1.17>

- Durán, U., Coronado, K., Meza, E., Ulloa, G., & Serrano, D. (2018). Two combined mechanisms responsible to hexavalent chromium removal on active anaerobic granular consortium. *Chemosphere*, 19(8), 191-197. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.024>
- EPA. (2020a, marzo 20). *Metals* / US EPA. <https://www.epa.gov/caddis-vol2/metals>
- EPA. (2020b, mayo 24). *Method 3015A: Microwave assisted acid digestion of aqueous samples and extracts*. <https://www.epa.gov/esam/epa-method-3015a-microwave-assisted-acid-digestion-aqueous-samples-and-extracts>
- EPA. (2022, agosto 31). *Información básica sobre digestión anaeróbica (DA) | EPA de EE. UU.* <https://www.epa.gov/anaerobic-digestion/basic-information-about-anaerobic-digestion-ad>
- FAO. (2011, marzo 19). *Manual de biogás* (M. Varnero, Ed.). Ministerio de Energía de Chile.
- Fisherbrand. (2023). *pHmetro de mesa AB200 Fisher Scientific. Medidor de pH*. Thermo Fisher Scientific. <https://www.fishersci.es/shop/products/accumet-ab200-ph-conductivity-benchtoper-meters/12800643>
- GAD. (2020). *Descontaminación ambiental. Se adjudica Planta de Tratamiento de Aguas Residuales*. [https://gadmatic.ambato.gob.ec/lotaip/2015/lotaip-julio/anexo literal m/Planta de aguas residuales 9-7-15.pdf](https://gadmatic.ambato.gob.ec/lotaip/2015/lotaip-julio/anexo%20literal%20m/Planta%20de%20aguas%20residuales%209-7-15.pdf)
- García, M., Goretti, F., & Miranda, V. (2018, febrero). *Eutrofización, Una amenaza para el recurso hídrico*. Universidad Nacional Autónoma de México. <https://ru.iiec.unam.mx/4269/>
- Garzón, P., Ochoa, V., & Peñafiel, R. (2015). Estudio de la generación de gas metano a partir del agua residual del proceso de extracción de aceite crudo de palma en biodigestores experimentales. *ACI Avances en Ciencias e Ingenierías*, 7(2), 130-137. <https://doi.org/10.18272/ACI.V7I2.274>

- Genchi, G., Sinicropi, M. S., Lauria, G., Carocci, A., & Catalano, A. (2020). The Effects of Cadmium Toxicity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(11), 37-82. <https://doi.org/10.3390/ijerph17113782>
- Grazioso, R., García, S., Russo, L., D'Abrosca, G., Esposito, S., Zaccaro, L., Iacovino, R., Milardi, D., Fattorusso, R., Malgieri, G., & Isernia, C. (2020). Substitution of the native Zn(II) with Cd(II), Co(II) and Ni(II) changes the downhill unfolding mechanism of Ros87 to a completely different scenario. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(21), 82-85. <https://doi.org/10.3390/ijms21218285>
- Grellier, S., Robain, H., Bellier, G., & Skhiri, N. (2006). Influence of temperature on the electrical conductivity of leachate from municipal solid waste. *Journal of Hazardous Materials*, 137(1), 612-617. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.02.049>
- HANNA. (2016). *Fotometro multiparamétrico con COD HI83399*. www.hannacolombia.com.
- HANNA. (2021). Fotómetro multiparamétrico HI 83399. Manual de instrucciones. *HANNA Instruments*. https://cdn.hannacolombia.com/hannacdn/support/manual/2020/08/Manual_HI_83399.pdf
- Hu, Q., Sun, J., Sun, D., Tian, L., Ji, Y., & Qiu, B. (2018a). Simultaneous Cr(VI) bio-reduction and methane production by anaerobic granular sludge. *Bioresource Technology*, 262, 15-21. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.060>
- Hughes, T. A., & Gray, N. F. (2012). Akute und chronische Toxizität von saurem Grubenwasser auf das Belebtschlammverfahren. *Mine Water and the Environment*, 31(1), 40-52. <https://doi.org/10.1007/S10230-011-0168-Y/TABLES/6>
- Ibarra, B., Narváez, M., & de la Rosa, A. (2020). Análisis de la disposición de los desechos sólidos y generación de biogás en el relleno sanitario de Ambato, Ecuador. *Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales. Investigación*,

desarrollo y práctica, 13(3), 988-1006.
<https://doi.org/10.22201/IINGEN.0718378XE.2020.13.3.68441>

- Kapoor, D., & Singh, M. P. (2021). Heavy metal contamination in water and its possible sources. *Heavy Metals in the Environment: Impact, Assessment, and Remediation*, 179-189. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821656-9.00010-9>
- Li, J., Zhang, M., Ye, Z., & Yang, C. (2019). Effect of manganese oxide-modified biochar addition on methane production and heavy metal speciation during the anaerobic digestion of sewage sludge. *Journal of environmental sciences (China)*, 7(6), 267-277. <https://doi.org/10.1016/J.JES.2018.05.009>
- Meegoda, J., Li, B., Patel, K., & Wang, L. (2018). A Review of the Processes, Parameters, and Optimization of Anaerobic Digestion. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(10), 22-24. <https://doi.org/10.3390/ijerph15102224>
- Metcalf, & Eddy, I. (2014). Treatment, reuse, and disposal of solids and biosolids. En G. Tchobanoglous, D. Stensel, & R. Tsuchihashi (Eds.), *Wastewater Engineering. Treatment and Reuse* (4th Edition, Vol. 1, pp. 1454-1456). McGraw-Hill Education. https://www.ect2.com/applications-wastewater/?utm_source=google&utm_medium=cpc&utm_campaign=Service&utm_term=waste%20water%20treatment&gclid=CjwKCAjwx_eiBhBGEiwA15gLN-AssU9kEbfXZVcMht57sGj5SuJJ1p2P2ANhDQMECrTVB6k2f2nMexoCtgIQA vD_BwE
- Moya, A. (2019). Studying Avogadro's Law with Arduino. *The Physics Teacher*, 57(9), 621-623. <https://doi.org/10.1119/1.5135793>
- Mullins, D., Coburn, D., Hannon, L., Jones, E., Clifford, E., & Glavin, M. (2018). A novel image processing-based system for turbidity measurement in domestic and industrial wastewater. *Water Science and Technology*, 77(5), 1469-1482. <https://doi.org/10.2166/wst.2018.030>

- Naz, I., Seher, S., Perveen, I., Saroj, D. P., & Ahmed, S. (2015). Physiological activities associated with biofilm growth in attached and suspended growth bioreactors under aerobic and anaerobic conditions. *Environmental Technology*, 36(13), 1657-1671. <https://doi.org/10.1080/09593330.2014.1003614>
- Ochoa, V., Banihani, Q., León, G., Khatri, C., Field, J. A., & Sierra-Alvarez, R. (2009). Toxicity of fluoride to microorganisms in biological wastewater treatment systems. *Water Research*, 43(13), 3177-3186. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.04.032>
- PG Instruments. (2022). *The AA500 atomic now glp compliant instruments*. Analytical Instruments for Science. <https://www.pginstruments.com/wp-content/uploads/2016/02/AA500-AAS.pdf>
- Razmilic, B. (2020). *Control de calidad y dietas acuicolas*. Merck Química Chilena. <https://www.fao.org/3/ab482s/AB482S04.htm>
- Rivas, O., Faith, M., & Guillén, R. (2016). Biodigesters: chemical, physical and biological factors related to their productivity. *Revista Tecnología en Marcha*, 29(5), 47-50. <https://doi.org/10.18845/tm.v29i5.2516>
- TULSMA. (2003, marzo 31). *Reforma de Texto Unificado de Legislación Secundaria, Medio ambiente, Libro VI*. Ministerio del Ambiente de Ecuador.
- Valdez, C., & Vásquez, G. (2008). *Ingeniería de los sistemas de tratamiento y disposición de aguas residuales*. Fundación Ica. https://www.academia.edu/31205529/Ingenier%C3%ADa_de_los_sistemas_de_tratamiento_y_disposici%C3%B3n_de_aguas_residuales
- Wang, D., Thunéll, S., Lindberg, U., Jiang, L., Trygg, J., & Tysklind, M. (2022). Towards better process management in wastewater treatment plants: Process analytics based on SHAP values for tree-based machine learning methods. *Journal of Environmental Management*, 30(1), 113-941. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113941>

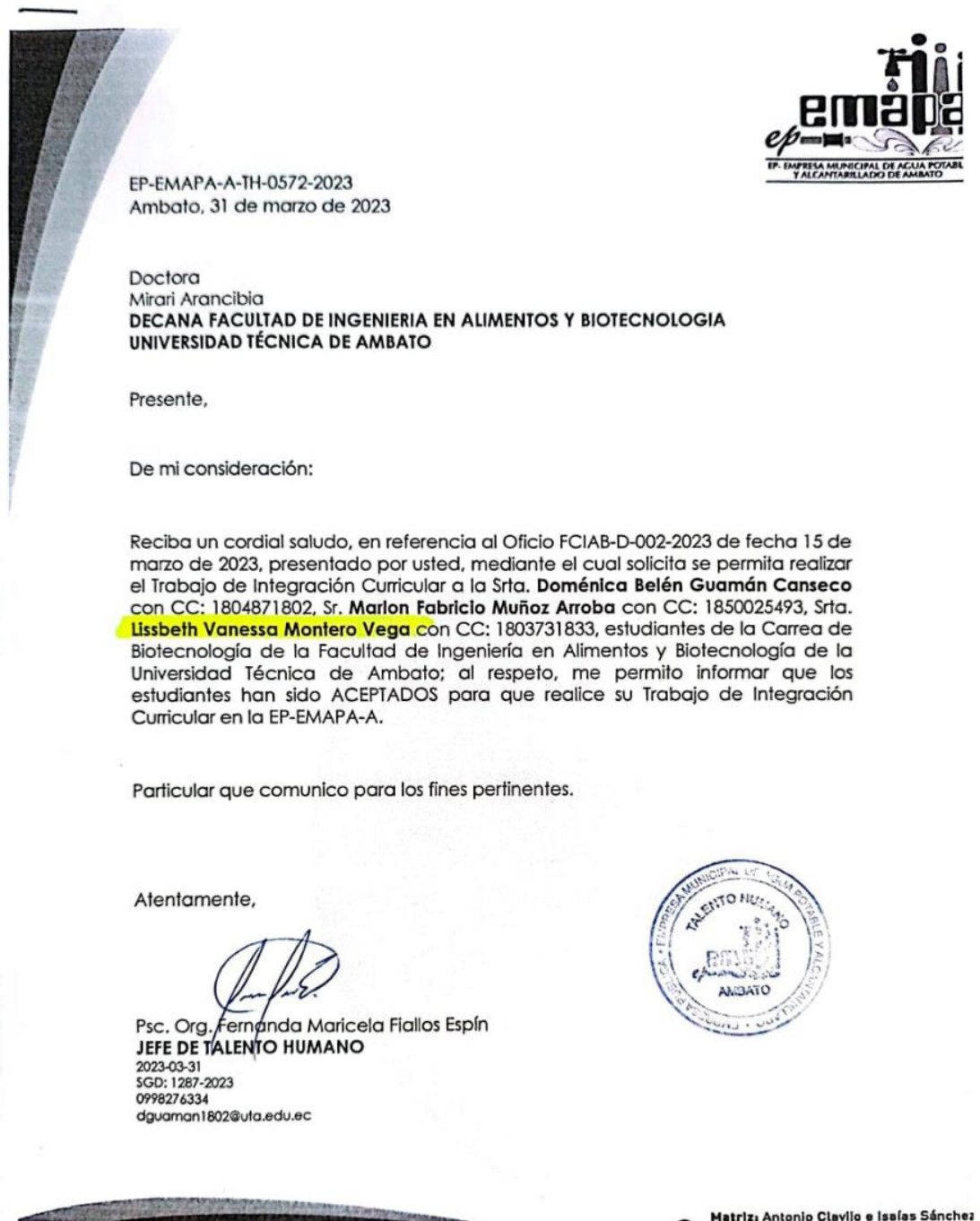
Yang, S., Li, L., Peng, X., Zhang, R., & Song, L. (2021). Methanogen Community Dynamics and Methanogenic Function Response to Solid Waste Decomposition. *Frontiers in Microbiology*, *12*(5), 18-21. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.743827>

Anexos

Anexo A. Carta de compromiso con EMAPA

Figura 5.

Carta de compromiso realizada con la Planta de tratamiento de aguas residuales ubicada en Ambato sector Las Viñas.



ANEXO B. Tablas de monitoreo de generación de metano y curvas de Actividad metanogénica máxima específica respecto al tiempo.

Tabla 8.

Valores adquiridos de temperatura, tiempo y Litros de hidróxido desplazado además de las moles de metano calculados y tasa de generación de metano sin la adición de metales pesados (Control).

Temp. (°K)	Tiempo (h)	V adq (L)	n CH4	SD (V adq)	n CH4 /g SSV
288,15	15	0,00936833	0,00029204	0,00149011	0,00648972
288,15	18	0,1289563	0,00398687	0,00553701	0,08859716
291,15	24	0,2564761	0,00787564	0,00868694	0,1750143
284,15	38	0,36267247	0,01131853	0,00880412	0,25152284
284,15	40	0,41569897	0,01297869	0,00690918	0,28841534
286,15	42	0,47506583	0,01476089	0,00119996	0,32801986
288,15	67	0,58677023	0,01814781	0,00395911	0,40328457
289,15	69	0,66118833	0,02040195	0,0117608	0,45337678
290,15	72	0,87681403	0,02699054	0,00318071	0,59978977

Nota: Los valores determinados son un promedio de las réplicas realizadas para cada bioensayo a excepción de la desviación estándar (SD) del volumen desplazado (V adq) el cual fue calculado a partir de cada medición en las distintas réplicas.

Tabla 9.

Valores adquiridos de temperatura, tiempo y Litros de hidróxido desplazado además de las moles de metano calculados y tasa de generación de metano con la adición de 15 mg/L de Cadmio.

Temp. (°K)	Tiempo (h)	V adq (L)	n CH4	SD (V adq)	n CH4 /g SSV
293,15	2	0,0067696	0,00020743	0,00032495	0,00460952
294,15	4	0,01966653	0,00060056	0,00087134	0,0133457
294,15	6	0,0323097	0,00098664	0,00057946	0,02192535
289,15	26	0,21465633	0,0066683	0,01196266	0,14818454
294,15	28	0,24632137	0,00752191	0,00642425	0,16715356
294,15	30	0,26519827	0,00809835	0,0240379	0,17996341
289,15	52	0,47507787	0,01475831	0,00236928	0,32796235
292,15	54	0,57551583	0,01769483	0,01085364	0,39321834
293,15	56	0,65536303	0,02008107	0,01506652	0,44624609

Nota: Los valores determinados son un promedio de las réplicas realizadas para cada bioensayo a excepción de la desviación estándar (SD) del volumen desplazado (V adq) el cual fue calculado a partir de cada medición en las distintas réplicas.

Tabla 10.

Valores adquiridos de temperatura, tiempo y Litros de hidróxido desplazado además de las moles de metano calculados y tasa de generación de metano con la adición de 25 mg/L de Cadmio.

Temp. (°K)	Tiempo (h)	V adq (L)	n CH4	SD (V adq)	n CH4 /g SSV
293,15	2	0,00661683	0,00020275	0,00049892	0,0045055
294,15	4	0,01738767	0,00053097	0,00054011	0,01179926
294,15	6	0,0307407	0,00093873	0,00037712	0,02086062
289,15	26	0,15773227	0,00489996	0,00429263	0,10888793
294,15	28	0,20513067	0,00626407	0,00509274	0,13920157
294,15	30	0,2704674	0,00825926	0,01429597	0,18353904

289,15	52	0,38253313	0,0118834	0,01332065	0,26407558
292,15	54	0,4406872	0,01354938	0,01339762	0,30109735
293,15	56	0,49365757	0,01512623	0,00588966	0,33613852

Nota: Los valores determinados son un promedio de las réplicas realizadas para cada bioensayo a excepción de la desviación estándar (SD) del volumen desplazado (V adq) el cual fue calculado a partir de cada medición en las distintas réplicas.

Tabla 11.

Valores adquiridos de temperatura, tiempo y Litros de hidróxido desplazado además de las moles de metano calculados y tasa de generación de metano con la adición de 35 mg/L de Cadmio.

Temp. (°K)	Tiempo (h)	V adq (L)	n CH4	SD (V adq)	n CH4 /g SSV
289,15	17	0,0849458	0,00263884	0,00294654	0,05864096
293,15	19	0,10343607	0,0031694	0,00107536	0,0704311
293,15	21	0,1098586	0,00336619	0,00082084	0,0748043
291,15	44	0,19629493	0,00605602	0,00098654	0,13457819
293,15	46	0,20772263	0,00636486	0,00244874	0,14144132
293,15	48	0,22308187	0,00683548	0,00118745	0,15189964
292,15	68	0,30472843	0,00936919	0,01211838	0,20820419
292,15	70	0,34418957	0,01058246	0,00983554	0,23516582
293,15	72	0,39634757	0,01214454	0,00590151	0,26987875

Nota: Los valores determinados son un promedio de las réplicas realizadas para cada bioensayo a excepción de la desviación estándar (SD) del volumen desplazado (V adq) el cual fue calculado a partir de cada medición en las distintas réplicas.

Tabla 12.

Valores adquiridos de temperatura, tiempo y Litros de hidróxido desplazado además de las moles de metano calculados y tasa de generación de metano con la adición de 50 mg/L de Cadmio.

Temp. (°K)	Tiempo (h)	V adq (L)	n CH4	SD (V adq)	n CH4 /g SSV
289,15	17	0,00793977	0,00024665	0,00122801	0,00548109
293,15	19	0,01493283	0,00045756	0,00191882	0,01016798
293,15	21	0,0268063	0,00082138	0,00593774	0,01825279
291,15	44	0,04120531	0,00127125	0,00542523	0,02825002
293,15	46	0,05389297	0,00165134	0,00082568	0,03669649
293,15	48	0,0698935	0,00214162	0,0077539	0,04759149
292,15	68	0,10121963	0,0031121	0,00564616	0,06915781
292,15	70	0,1317018	0,00404931	0,00720627	0,0899846
293,15	72	0,17599277	0,00539262	0,0004423	0,119836

Nota: Los valores determinados son un promedio de las réplicas realizadas para cada bioensayo a excepción de la desviación estándar (SD) del volumen desplazado (V adq) el cual fue calculado a partir de cada medición en las distintas réplicas.

Figura 6.

Ajuste lineal de generación de metano durante 3 días en comparación de un control y la adición de distintas concentraciones de Cd.

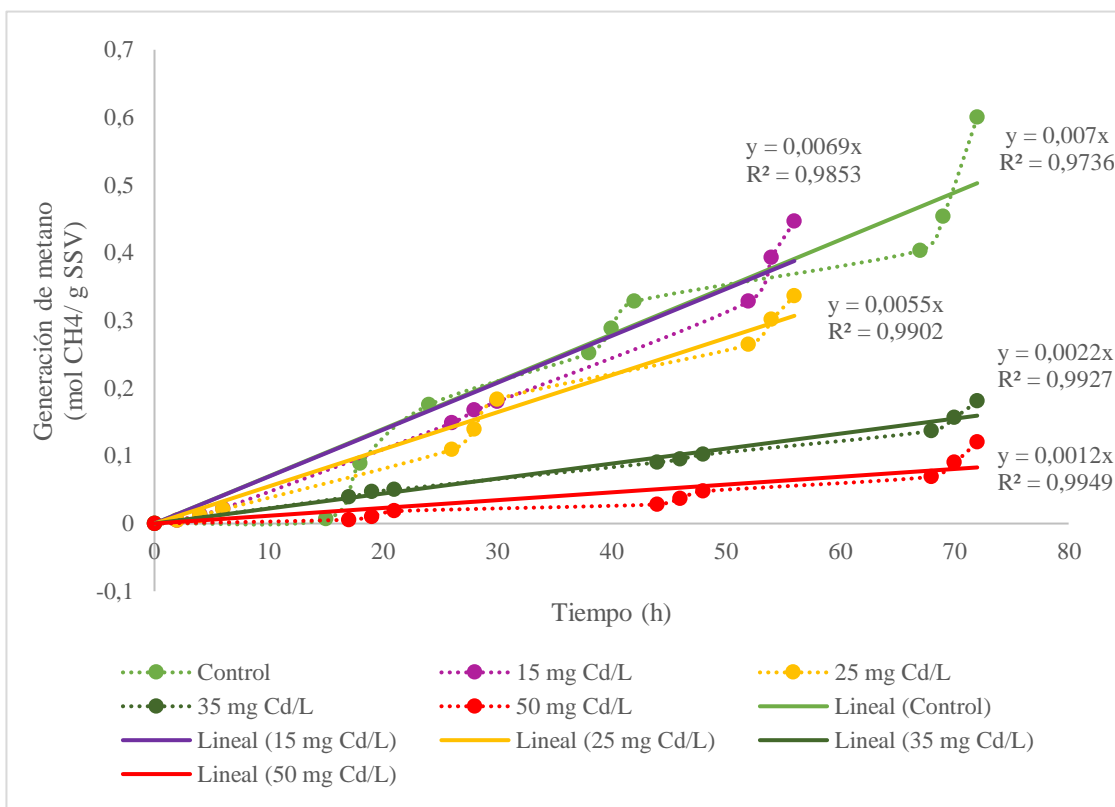


Tabla 13. *Valores adquiridos de temperatura, tiempo y Litros de hidróxido desplazado además de las moles de metano calculados y tasa de generación de metano con la adición de 75 mg/L de Cromo (VI).*

Temp. (°K)	Tiempo (h)	V adq (L)	n CH ₄	SD (V adq)	n CH ₄ /g SSV
290,15	18	0,20293367	0,00628241	0,00591722	0,13960916
292,15	20	0,2188257	0,00672802	0,00325745	0,14951158
293,15	22	0,23933483	0,00733349	0,01280783	0,16296652
291,15	37	0,402274	0,01241081	0,00345338	0,27579574
293,15	39	0,42654993	0,01306998	0,00999256	0,29044397
293,15	41	0,4512284	0,01382616	0,00894976	0,30724789

292,15	68	0,58707127	0,01805011	0,00615354	0,40111354
294,15	70	0,6071958	0,01854192	0,00593056	0,41204276
294,15	72	0,630259	0,0192462	0,00307098	0,42769344

Nota: Los valores determinados son un promedio de las réplicas realizadas para cada bioensayo a excepción de la desviación estándar (SD) del volumen desplazado (V adq) el cual fue calculado a partir de cada medición en las distintas réplicas.

Tabla 14.

Valores adquiridos de temperatura, tiempo y Litros de hidróxido desplazado además de las moles de metano calculados y tasa de generación de metano con la adición de 100 mg/L de Cromo (VI).

Temp. (°K)	Tiempo (h)	V adq (L)	n CH4	SD (V adq)	n CH4 /g SSV
288,15	16	0,0741679	0,00231202	0,01866919	0,0513783
292,15	18	0,08683153	0,00266972	0,01706682	0,05932722
293,15	20	0,11342337	0,00347542	0,01768628	0,0772316
293,15	42	0,16195157	0,00496238	0,03144625	0,11027515
293,15	44	0,2167737	0,00664219	0,02427844	0,14760432
293,15	46	0,25581763	0,00783855	0,02226122	0,1741899
292,15	67	0,33136497	0,01018816	0,01701374	0,22640347
295,15	69	0,3727737	0,01134481	0,00484525	0,25210698
295,15	71	0,42559737	0,01295242	0,0066067	0,28783164

Nota: Los valores determinados son un promedio de las réplicas realizadas para cada bioensayo a excepción de la desviación estándar (SD) del volumen desplazado (V adq) el cual fue calculado a partir de cada medición en las distintas réplicas.

Tabla 15.

Valores adquiridos de temperatura, tiempo y Litros de hidróxido desplazado además de las moles de metano calculados y tasa de generación de metano con la adición de 150 mg/L de Cromo (VI).

Temp. (°K)	Tiempo (h)	V adq (L)	n CH4	SD (V adq)	n CH4 /g SSV
288,15	16	0,0583101	0,00181769	0,0030899	0,04039313
292,15	18	0,06929247	0,00213047	0,00766596	0,04734373
293,15	20	0,07893983	0,00241881	0,01276605	0,05375127
293,15	42	0,18374107	0,00563004	0,03712048	0,12511193
293,15	44	0,1989682	0,00609661	0,03599779	0,1354803
293,15	46	0,2157114	0,00660964	0,03450073	0,14688099
292,15	67	0,28455253	0,00874886	0,0161712	0,19441911
295,15	69	0,3015623	0,0091776	0,01162683	0,20394668
295,15	71	0,3189284	0,00970611	0,02127831	0,21569138

Nota: Los valores determinados son un promedio de las réplicas realizadas para cada bioensayo a excepción de la desviación estándar (SD) del volumen desplazado (V adq) el cual fue calculado a partir de cada medición en las distintas réplicas.

Tabla 16.

Valores adquiridos de temperatura, tiempo y Litros de hidróxido desplazado además de las moles de metano calculados y tasa de generación de metano con la adición de 200 mg/L de Cromo (VI).

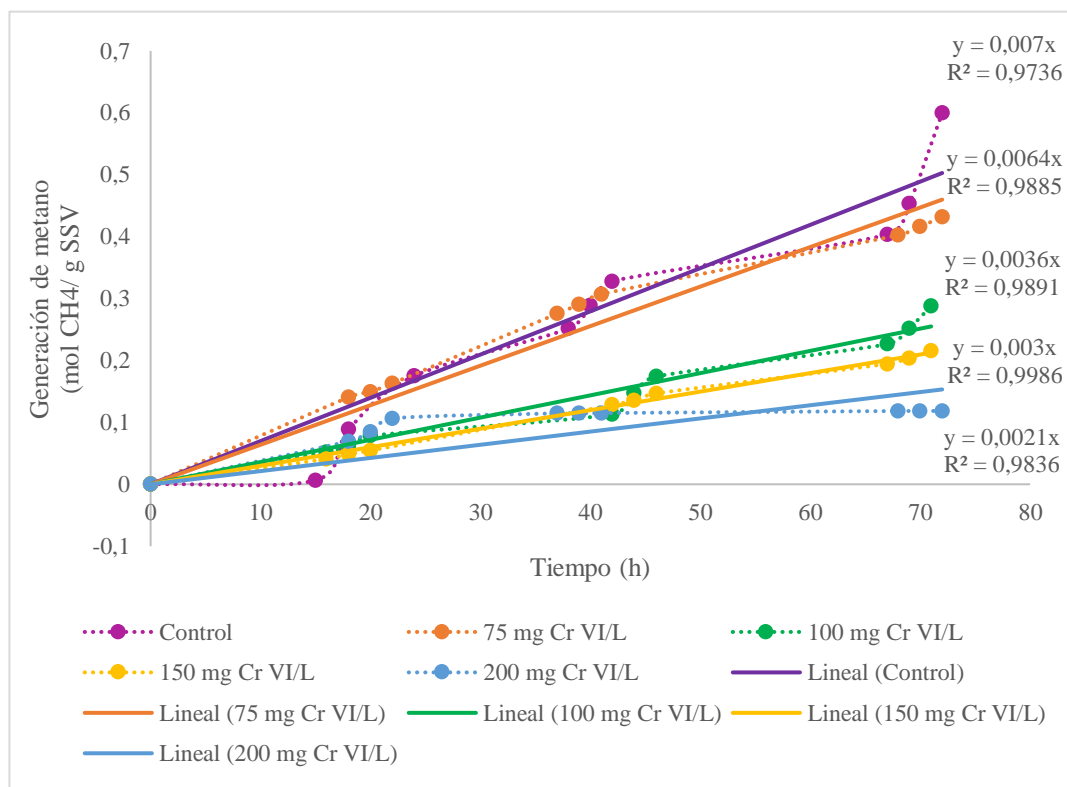
Temp. (°K)	Tiempo (h)	V adq (L)	n CH4	SD (V adq)	n CH4 /g SSV
290,15	0	0	0	0	0
290,15	18	0,10029877	0,00310505	0,00149696	0,069001
292,15	20	0,12434183	0,00382302	0,00226877	0,08495594
293,15	22	0,15648133	0,00479477	0,00310572	0,10655039
291,15	37	0,1670299	0,00515314	0,00460639	0,11451432
293,15	39	0,16828433	0,00515642	0,00420787	0,11458722

293,15	41	0,16903587	0,00517945	0,00362721	0,11509895
292,15	68	0,17266363	0,00530872	0,00097491	0,11797157
294,15	70	0,1727572	0,00527548	0,00100306	0,11723295
294,15	72	0,17281397	0,00527722	0,00104168	0,11727147

Nota: Los valores determinados son un promedio de las réplicas realizadas para cada bioensayo a excepción de la desviación estándar (SD) del volumen desplazado (V_{adq}) el cual fue calculado a partir de cada medición en las distintas réplicas.

Figura 7.

Ajuste lineal de generación de metano durante 3 días en comparación de un control y la adición de distintas concentraciones de Cr (VI).



ANEXO C. Tablas de datos con porcentaje de inhibición de la actividad metanogénica máxima específica y gráficas de comparación.

Tabla 17.

Datos obtenidos de tasa de generación de metano de un control y bioensayos adicionando distintas concentraciones de cadmio para la obtención del porcentaje de inhibición.

Ensayo	Concentración	r CH4		AME (%)	Inhibición (%)
	(mg/L)	r CH4	(control)		
Control	0	0,59978977	0,599789768	100	0
IC20	15	0,45	0,562	80,0711744	19,92882562
1	21,42	0,37677348	0,561357662	67,11	32,89
2	25	0,336	0,561	59,8930481	40,10695187
IC50	28,40	0,28311873	0,569501812	50	50
3	35	0,1805	0,586	30,8020478	69,19795222
4	36,36	0,17499976	0,587272784	29,82	70,18
IC80	50	0,12	0,6	20	80

Nota. La tasa de generación de metano tanto para el control como para los bioensayos en el que se añadió cadmio son representados en n CH₄/ g SSV*día.

Figura 8.

Ajuste lineal de datos comparados entre la concentración de cadmio adicionado en los bioensayos y el porcentaje de inhibición de la actividad metanogénica máxima específica.

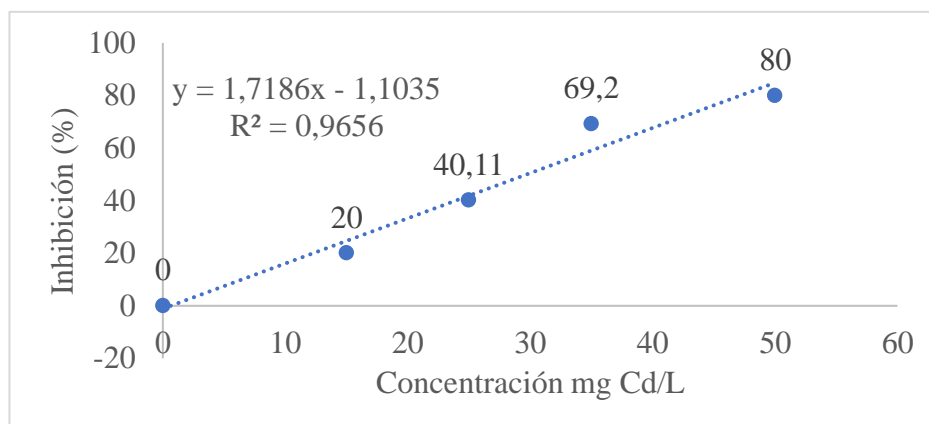


Tabla 18.

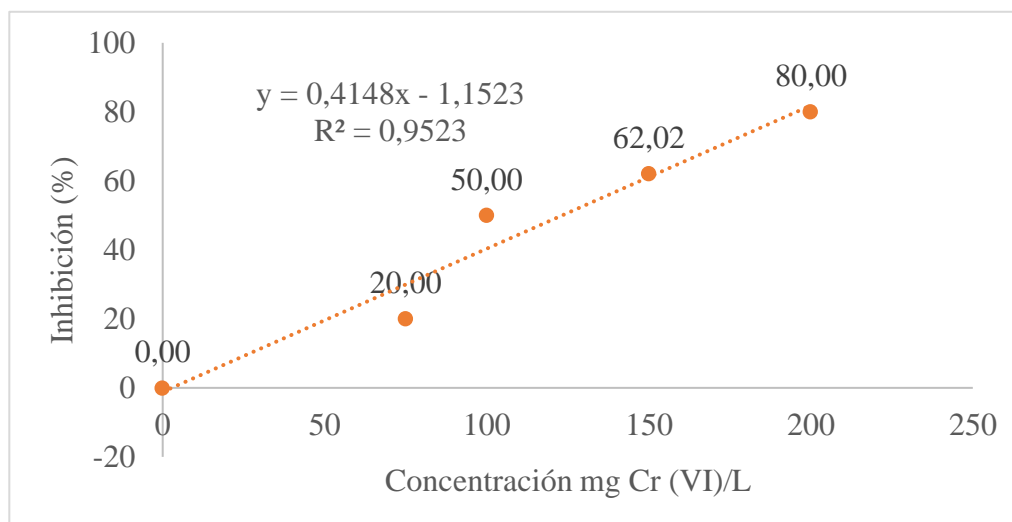
Datos obtenidos de tasa de generación de metano de un control y bioensayos adicionando distintas concentraciones de cromo (VI) para la obtención del porcentaje de inhibición.

Ensayo	Concentración (mg/L)	r CH4		AME (%)	Inhibición (%)
		r CH4	(control)		
Control	0	0,59978977	0,599789768	100	0
IC20	75	0,43	0,538	80	20
1	85,45	0,374	0,5543	68,03	31,968
2	95,96550577	0,31329193	0,572151065	55	45
IC50	100	0,29	0,579	50	50
3	150	0,21569138	0,567975072	37,9755014	62,0244
4	173,9822315	0,16906438	0,579543774	29,3585864	70,6463
IC80	200	0,11847983	0,592094391	20,0102946	80

Nota. La tasa de generación de metano tanto para el control como para los bioensayos en el que se añadió cadmio son representados en n CH₄/ g SSV*día.

Figura 9.

Ajuste lineal de datos comparados entre la concentración de cromo (VI) adicionado en los bioensayos y el porcentaje de inhibición de la actividad metanogénica máxima específica.



ANEXO D. ANOVA establecido a partir de un diseño completamente al azar.

Tabla 19.

ANOVA para tasa de generación de metano por concentración de metal añadido

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
Entre grupos	0,329822	7	0,0471174	1019,96	0,0032
Intra grupos	0,000739126	16	0,0000461954		
Total (Corr.)	0,330561	23			

Nota. Se realizó un diseño completamente al azar en el sistema estadístico Statgraphics 19- X64 donde la variable independiente fue la tasa de generación de metano y el factor es la concentración de metal. La tabla ANOVA descompuso la varianza de la tasa de generación de metano en dos componentes (entre-grupos y dentro-de-grupos) de los cuales se obtuvo un valor-P de la prueba-F menor a 0,05 demostrando que existe una

diferencia significativa entre la media de la tasa de generación de metano y el nivel de concentración, por lo tanto se acepta la hipótesis alternativa.

ANEXO E. Anexo Fotográfico.

Figura 10.

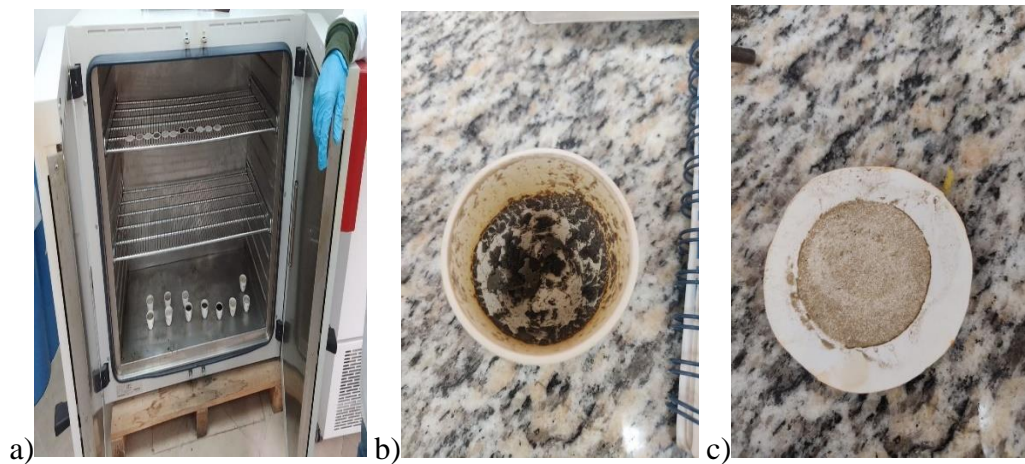
Toma de muestras



Nota. Se representa la toma de muestra desde una zona de desfogue del biodigestor de la PTAR-Ambato sector Las Viñas.

Figura 11.

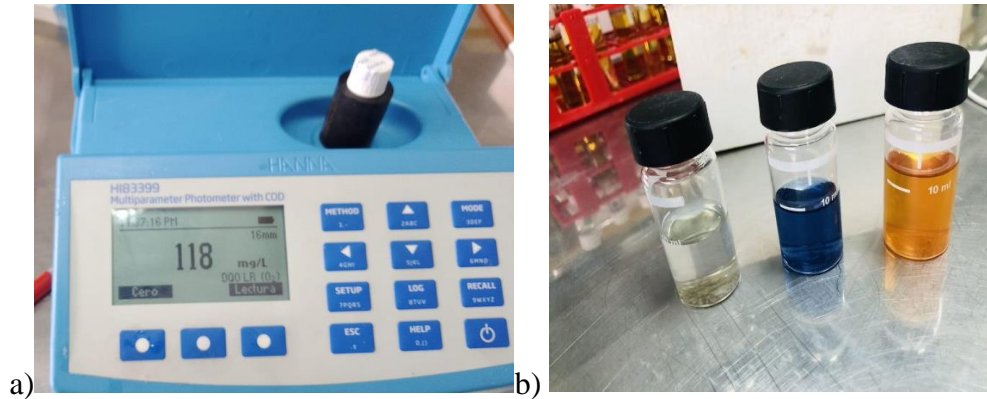
Análisis de sólidos presentes en la muestra de biosólidos.



Nota. a) Estufa donde se añaden las muestras a 105 °C por 24 h. b) Crisol con muestra seca luego de 24 h. c) Filtro con muestra seca para determinación de sólidos mediante cálculo de diferencia de pesos.

Figura 12.

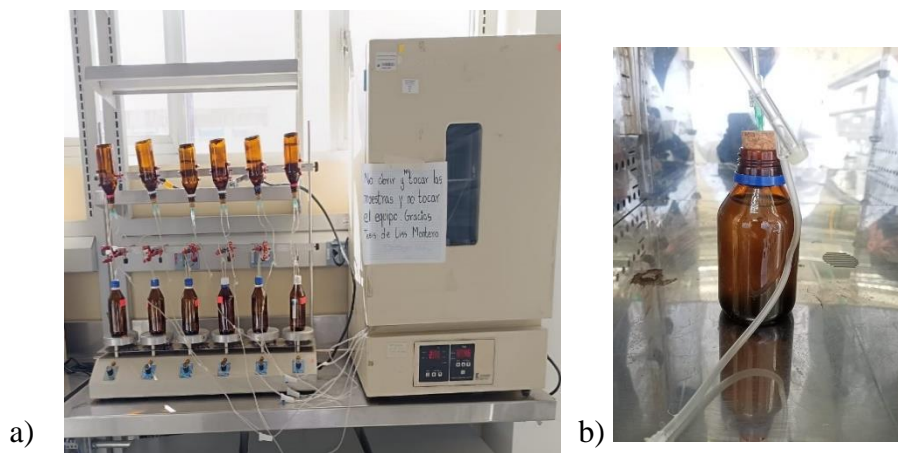
Análisis de muestra en Fotómetro HANNA



Nota: Análisis de DQO y distintos metales pesados. a) Equipo Fotómetro HANNA HI83399 analizando DQO. b) Presencia de Nitratos y Fosfatos en la muestra de biosólidos visualizados por cambio de color al añadir reactivos comerciales.

Figura 13.

Bioensayos para generación de metano



Nota. a) Se visualizan las botellas que contienen hidróxido de sodio de manera invertida conectada a una botella recicladora y a una manguera que se conecta a la botella con medio e inóculo. b) Botella con medio e inóculo que se encontró dentro de la incubadora a 30 °C.