



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD ZACATENCO**

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**Caracterización microrrespirométrica de la inhibición de procesos de lodos
activados por nanopartículas y metales pesados**

Tesis que presenta

Gabriel Rafael Hernández Martínez

Para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Director de la Tesis: Dr. Frédéric Thalasso

Ciudad de México.

Junio, 2018

COMITÉ TUTORIAL.

Director de tesis:

Dr. Frédéric Thalasso (CINVESTAV-IPN)

Asesores:

Dr. Luc Dendooven (CINVESTAV-IPN)

Dr. Ricardo Aguilar Lopez (CINVESTAV-IPN)

Dr. Alberto Ordaz Cortés (UMB)

Dr. Juan Lema (USC)

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) bajo la dirección del Dr. Frédéric Thalasso (CINVESTAV) y la asesoría del Dr. Ricardo Aguilar López (CINVESTAV), Dr. Luc Dendooven (CINVESTAV), Dr. Alberto Ordaz Cortés (UMB) y el Dr. Juan Lema (USC). La realización de este proyecto fue gracias al apoyo brindado por el “Concejo Nacional de Ciencia y Tecnología” (CONACYT, proyecto #133338 y beca otorgada # 261685).

Quiero agradecer infinitamente a mi director de tesis el Dr. Frédéric Thalasso por toda la confianza, el tiempo, dedicación y amistad brindados. Y también quiero agradecer a todos los miembros de mi comité tutorial por la orientación y ayuda en la realización de este trabajo.

A todos los miembros del laboratorio de Bioprosesos-Ambientales del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería por brindarme su apoyo y amistad. En especial a Victoria T. Velázquez-Martínez, Juan Corona-Hernández y Francisco Silva-Olmedo por su asistencia técnica.

Contenido

COMITÉ TUTORIAL	i
AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE DE FIGURAS.	v
INDICE DE TABLAS.	vii
NOMECLATURA.....	viii
RESUMEN.	xi
ABSTRACT.....	xiv
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1.1 Proceso de lodos activados.	1
1.2 Importancia de los metales pesados en los procesos de lodos activados.	3
1.3 Importancia de las nanopartículas en los procesos de lodos activados.....	7
1.4 Caracterización de procesos de lodos activados.	11
1.5 Respirimetría.	14
1.6 Microrrespirimetría.	19
JUSTIFICACIÓN.	22
HIPÓTESIS.	23
OBJETIVOS.	24
Estrategia experimental general.	25
CAPÍTULO 2.....	26
2.1 Introducción.	27
2.2 Materiales y Métodos.....	30
2.3 Resultados y discusión.....	39
2.4 Conclusiones.....	51
CAPÍTULO 3.....	53

3.1 Introducción.....	54
3.2 Materiales y Métodos.....	58
3.3 Resultados y discusión.....	65
3.4 Conclusiones.....	80
Capítulo 4.....	82
4.1 Introducción.....	83
4.2 Materiales y métodos.....	85
4.3 Resultados y discusión.....	91
4.4 Conclusiones.....	102
CONCLUSIONES GENERALES.....	103
BIBLIOGRAFÍA.....	106
ANEXO 1. ARTICULOS PUBLICADOS.....	130

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1.1 Configuración de un proceso convencional de lodos activados.-----	2
Figura 1.2 Efecto de la concentración de metales pesados en el crecimiento microbiano. 6	6
Figura 1.3 Valores de IC ₅₀ reportados en la literatura para diferentes metales pesados.-	7
Figura 1.4 Ejemplo de respirógrama obtenido por el método dinámico.-----	17
Figura 2.1 Imagen de SEM y composición por EDX de las nanopartículas de plata.----	40
Figura 2.2 Distribución del tamaño de las nanopartículas.-----	41
Figura 2.3 Ejemplos de respirogramas en los ensayos preliminares.-----	44
Figura 2.4 Ejemplos de perfiles de OUR_{ex} después de la inyección de una concentración de sustrato (50 mg COD L ⁻¹) en presencia de concentraciones crecientes de AgNPs.-----	46
Figura 2.5 Efecto de la concentración de AgNPs en $I\%$ (●) e $I\%_{obH}$ (■).-----	47
Figura 2.6 Efecto de la relación S_0/X_0 en $I\%$ e $I\%_{obH}$.-----	50
Figura 2.7 Influencia del tiempo de exposición en la inhibición del lodo activado causado por AgNPs-----	51
Figura 3.1 Eficiencia de remoción de DQO (□), velocidad de carga orgánica (VC, ●) y concentración de biomasa (▲) observado en el proceso modelo de lodos activados.--	66
Figura 3.2 Ejemplos de respuestas respirometricas después de la inyección de un pulso de 32 mg DQO L ⁻¹ de agua residual sintética, 32 mg NOD L ⁻¹ de amonio y 32 mg NOD L ⁻¹ de urea.-----	67
Figura 3.3 Efecto de la concentración de sustrato sobre la concentración de Ni (■), Cd (●) y Co (▲) libre.-----	69
Figura 3.4. Respirogramas observados después de la inyección de un pulso de 64 mg DQO L ⁻¹ a varias concentraciones totales de metales pesados.-----	70
Figura 3.5 $I\%$ vs la concentración total de los metales pesados.-----	71
Figura 3.6. $I\%$ vs la concentración libre de los metales pesados.-----	72
Figura 3.7. Ejemplo de linealización de Lineweaver-Burk observado sin Cd (experimento control, ●), 5 mg Cd (●), 20 mg Cd (●) and 40 mg Cd (●).-----	73

Figura 3.8. Valores de OUR'_{max} y K'_s para diferentes concentraciones totales de metales pesados.-----	74
Figura 3.9 Efecto de la concentración de biomasa sobre $I\%$.-----	77
Figura 3.10 Efecto de la concentración de sustrato sobre $I\%$.-----	78
Figura 3.11 Efecto del tiempo de exposición sobre $I\%$.-----	80
Figura 4.1 Reactor de control (A) y reactor alimentado con metal pesado (B) durante todo el tiempo de operación.-----	93
Figura 4.2 Concentración de biomasa para el sistema (●) RC y RM (▲) durante todo el tiempo de operación del reactor.-----	95
Figura 4.3 Ejemplo de perfiles de $SOUR_{ex}$ en cada etapa observada después de la inyección de 64 mg DQO L^{-1} -----	96
Figura 4.4 $I\%$ estimado en el sistema CR (●) durante todo el tiempo de operación.-----	97
Figura 4.5 $I\%$ (▲) e $I_E\%$ (▲) en el sistema MR durante todo el tiempo de operación. -	98
Figura 4.6 K_S (A) y OUR_{max} (B) en el sistema RC (●) sin concentración de metales pesados y (●) con metales pesados durante todo el tiempo de operación.-----	99
Figura 4.7 K_S (A) y OUR_{max} (B) en el sistema RM, (●) sin concentración de metales pesados y (●) con metales pesados durante todo el tiempo de operación.-----	101

INDICE DE TABLAS.

Tabla 1.1 Concentraciones de metales pesados en diferentes efluentes de aguas residuales.-----	4
Tabla 1.2 Concentraciones de AgNPs medidas y estimadas en las aguas residuales. -----	9
Tabla 1.3 Efecto de las nanopartículas de plata en procesos de lodos activados.-----	10
Tabla 1.4 Parámetros cinéticos y estequiométricos en diferentes cultivos. -----	13
Tabla 2.1. Valores reportados de IC_{50} ($mg L^{-1}$) para AgNPs en diferentes cultivos y determinado por diferentes métodos.-----	29
Tabla 2.2 Condiciones experimentales para cada conjunto de ensayos respirométricos.	35
Tabla 2.3. Diámetros de las nanopartículas promedio ($nm \pm DE$) y la intensidad de las dos clases dominantes de partículas ($\% \pm DE$), por el análisis de DLS.-----	42
Tabla 2.4. Ag libre y acomplejado, expresado como un porcentaje de la concentración total de plata.-----	43
Tabla 2.5 Parámetros cinéticos estimados por el modelo propuesto para AgNPs.-----	48
Tabla 3.1 Reportes previos de valores de IC_{50} ($mg L^{-1}$) para Ni, Cd y Co en procesos de lodos activados con diferentes sustratos, y determinados por varios métodos.-----	55
Tabla 3.2. Condiciones experimentales para cada conjunto de ensayos respirométricos.-	62
Tabla 3.3. Porcentaje de los complejos formados de los metales pesados y metales pesados libres, en función de la concentración total de los metales pesados.-----	68
Tabla 3.4 Parámetros cinéticos estimados por modelo propuesto para Ni, Cd y Co.-----	76
Tabla 4.1. Configuración experimental del RM.-----	87

NOMECLATURA.

b_H	Velocidad de consumo de oxígeno endógeno	(mg O ₂ L ⁻¹ h ⁻¹)
b'_H	Velocidad de consumo de oxígeno endógeno aparente	(mg O ₂ L ⁻¹ h ⁻¹)
C	Concentración de oxígeno disuelto en el tiempo	(mg O ₂ L ⁻¹)
C_b	Concentración de oxígeno disuelto de la línea base	(mg O ₂ L ⁻¹)
C_0	Concentración de oxígeno disuelto al comienzo del pulso	(mg O ₂ L ⁻¹)
C_f	Concentración de oxígeno disuelto al final del pulso	(mg O ₂ L ⁻¹)
C^*	Concentración de saturación de oxígeno disuelto	(mg O ₂ L ⁻¹)
D	Tasa de dilución	(h ⁻¹)
DLS	Dispersión dinámica de la luz	(-)
DO	Densidad óptica	(nm)
DQO	Demanda química de oxígeno	(mg O ₂ L ⁻¹)
DQO_s	Fracción de DQO soluble	(mg O ₂ L ⁻¹)
DQO_x	Fracción insoluble	(mg O ₂ L ⁻¹)
OD	Oxígeno disuelto	(mg OL ⁻¹)
HRT	Tiempo de retención hidráulico	(h)
I	Concentración del inhibidor	(mg L ⁻¹)
$I\%$	Porcentaje de inhibición	(-)
$I\%_{bH}$	Porcentaje de inhibición de la respiración endógena	(-)
IC_{50}	Concentración del inhibidor que causa el 50% de inhibición	(mg L ⁻¹)
I_{max}	Concentración del inhibidor que causa la máxima inhibición	(mg L ⁻¹)
$IOUR_{max}$	OUR'_{max} en presencia del inhibidor	(mg O ₂ L ⁻¹ h ⁻¹)

K_I	Constante de inhibición	(mg L ⁻¹)
K_{La}	Coefficiente volumétrico de transferencia de masa	(h)
K_s	Constante de afinidad por el sustrato	(mg CODs L ⁻¹)
K_{O_2}	Constante de afinidad por el oxígeno	(mg O ₂ L ⁻¹)
K_m	Constante de mantenimiento	(mg L ⁻¹)
OUR	Velocidad de consumo de oxígeno	(mg O ₂ L ⁻¹ h ⁻¹)
OUR _{end}	OUR endógeno	(mg O ₂ L ⁻¹ h ⁻¹)
OUR _{ex}	OUR exógeno	(mg O ₂ L ⁻¹ h ⁻¹)
OUR' _{max}	OUR máximo observado	(mg O ₂ L ⁻¹ h ⁻¹)
OUR _{total}	Sumatoria de OUR _{end} + OUR _{ex}	(mg O ₂ L ⁻¹ h ⁻¹)
R _{max}	Velocidad máxima de degradación del sustrato	(mg S L ⁻¹ h ⁻¹)
r ²	Coefficiente de correlación de Person	(-)
S	Concentración de sustrato	(mg DQOs L ⁻¹)
SS	Sólidos suspendidos	(mg)
SSV	Sólidos suspendidos volatiles	(mg)
SOUR _{ex}	OUR _{ex} específico	(mg O ₂ mg DQO _X ⁻¹ h ⁻¹)
SOUR' _{max}	OUR _{ex} específico máximo	(mg O ₂ mg DQO _X ⁻¹ h ⁻¹)
S _P	Concentración de pulso de sustrato	(mg DQOs L ⁻¹)
S ₀ /X ₀	Relación sustrato-biomasa inicial	(mg DQOs mg DQO _X ⁻¹)
t	tiempo	(h)
		(d)
t ₀	Tiempo en el cual el pulso es inyectado	(h)
t _{end}	Tiempo en el cual el pulso termina	(h)

X	Concentración de biomasa	$(\text{mg DQO}_x \text{ L}^{-1})$
$Y_{O_2/S}$	Rendimiento de oxidación	$(\text{mg O}_2 \text{ mg DQOs}^{-1})$
$Y_{X/S}$	Rendimiento celular	$(\text{mg DQO}_x \text{ mg DQOs}^{-1})$
σ	Desviación estándar	$(-)$
μ	Tasa específica de crecimiento	(h^{-1})
μ_{max}	Tasa específica máxima de crecimiento	(h^{-1})

RESUMEN.

El proceso de lodos activados es el proceso más utilizado en el tratamiento de aguas residuales, debido a su fácil implementación, los bajos costos de operación y los elevados porcentajes de degradación de carga orgánica, comparado con otros sistemas de tratamiento. Sin embargo este proceso se puede ver afectado significativamente por múltiples factores entre los más importantes se encuentra la presencia de compuestos tóxicos en las aguas residuales. Tal es el caso de los metales pesados y las nanopartículas de plata (AgNPs). El efecto inhibitorio de estos compuestos tóxicos fue previamente reportado principalmente a través de la concentración que causa un 50% inhibición (IC_{50}). Existen diferentes metodologías para medir el grado de inhibición en los procesos de lodos activados, sin embargo todos conllevan un esfuerzo experimental importante y generalmente son métodos específicos, es decir que requieren el desarrollo de una metodología particular para cada caso. Por lo que en esta tesis, se evaluó el potencial de una nueva metodología desarrollada en el grupo de trabajo, denominada microrrespirometría, para valorar la inhibición de los metales pesados y de las AgNPs. El método de microrrespirometría se basa en la medición del oxígeno disuelto en condiciones controladas en un conjunto de 24 microrreactores.

El potencial de ese método para el estudio de efectos inhibitorios permite la realización de un gran número de réplicas, en un tiempo corto, y adicionalmente, permite determinar no solamente el IC_{50} , pero también los principales parámetros cinéticos y estequiométricos del proceso.

En la primera etapa de este trabajo valoramos el efecto inhibitorio de las AgNPs en un sistema de lodos activados. Se probaron diferentes condiciones incluyendo la concentración de

nanopartículas de plata, la relación sustrato/biomasa (S_0/X_0) inicial y el tiempo de exposición. El efecto inhibitorio fue cuantificado a través de la determinación del porcentaje de inhibición en la respiración endógena y exógena, así como también en la determinación de la constante de afinidad (K_S), la constante de inhibición (K_I) y la velocidad de consumo de oxígeno máxima (OUR_{max}). Los resultados mostraron que las AgNPs presentan una inhibición acompetitiva y el valor de la IC_{50} para la respiración exógena fue de $3.23 \pm 0.16 \text{ mg L}^{-1}$. El efecto inhibitorio de las AgNPs en la respiración endógena fue relativamente alto, con un valor de la IC_{50} de $7.12 \pm 0.11 \text{ mg L}^{-1}$. En general se observó que un aumento en la relación S_0/X_0 resulta en un aumento de la inhibición y un aumento del tiempo de exposición disminuye el efecto inhibitorio.

En la segunda etapa valoramos el efecto de Ni, Cd y Co en un sistema de lodos activados. Se probaron diferentes condiciones incluidas la concentración de metales pesados, biomasa y sustrato, así como el tiempo de exposición. Al igual que las AgNPs, el efecto inhibitorio de los metales fue cuantificado por la determinación del porcentaje de inhibición y a través de la determinación de los principales parámetros como K_S , K_I y OUR_{max} . Los resultados indicaron que, en un rango de 0-40 mg L^{-1} , los metales pesados presentaron una inhibición del tipo acompetitiva y una incompleta inhibición en el sistema de lodos activados, con una máxima inhibición de 67, 57 y 53 para Ni, Cd y Co, respectivamente. Un incremento de la biomasa de 620% resultó en un decremento de la inhibición de 47 y 69% para Co y Cd, respectivamente mientras que no fueron observados cambios en la inhibición del Ni. Un incremento de la concentración de sustrato de 87% resultó en un incremento de la inhibición de 24, 70 y 47% para Ni, Co y Cd, respectivamente. En el caso del Ni y Cd, un incremento del tiempo de exposición incrementó la inhibición.

En la tercera etapa fue valorada la inhibición a largo plazo de una mezcla de Cu, Ni y Zn en un sistema de lodos activados. El efecto inhibitorio de la mezcla de metales pesados fue cuantificado a través de la determinación de la eficiencia de remoción de DQO, así como también mediante la determinación del porcentaje de inhibición y de los principales parámetros del sistema de lodos activados. Los resultados mostraron que el proceso de lodos activados control (sin aclimatar a la mezcla de metales pesados) presentó un incremento de la inhibición proporcional a las concentraciones de metales pesados (inhibición a corto plazo) y en la última etapa evaluada observamos un efecto antagónico. En el sistema que fue aclimatado a la mezcla de metales pesado se observaron picos de inhibición solo cuando la concentración de metales pesados fue incrementada en cada etapa, después, se observó un periodo de recuperación del sistema. Se observaron cambios importantes en la eficiencia de remoción de DQO y en la concentración de biomasa durante todo el tiempo de operación.

ABSTRACT.

The activated sludge process is the most widely used process in wastewater treatment due to easy implementation, low operating costs and high percentages of organic removal efficiencies. However, this process can be significantly affected by multiple factors, and among them, the most important is the impact of toxic compounds like heavy metals and silver nanoparticles (AgNPs). The effects of toxic compounds have been previously characterized, but mostly through the determination of the concentration that causes a 50% inhibition (IC_{50}). There are different methods to measure the degree of inhibition in activated sludge processes, however, all of them involve an important experimental effort, and are generally specific methods. In this thesis, the potential of a new methodology developed in our working group, and called microrespirometry, was evaluated and used to assess the inhibition of heavy metals and AgNPs on activated sludge. The microrespirometry method, is based on the measurement of dissolved oxygen under controlled conditions in a set of 24 microreactors.

The potential of this method for the study of inhibitory effects that it allows the realization of a large number of replicates, in a short time, and additionally, it allows to determine not only the IC_{50} , but also the main kinetic and stoichiometric parameters of the process.

In the first stage of this work, we assess the potential inhibitory effect of AgNPs in a model activated sludge system. Several conditions were tested, including AgNP concentration, substrate to biomass ratio (S_0/X_0) and exposure time. The inhibitory effects were quantified through the percentage of inhibition of the exogenous and endogenous respiration rates as well as through determination of the half saturation constant (K_S), the inhibition constant (K_I) and the maximum oxygen uptake rate (OUR_{max}). The results indicated that AgNPs exert an

uncompetitive inhibition and that the concentration that caused a 50% of inhibition (IC_{50}) of the exogenous respiration rate was $3.32 \pm 0.16 \text{ mg L}^{-1}$. The inhibitory effect of AgNPs on the endogenous respiration was relatively lower, with an IC_{50} of $7.12 \pm 0.11 \text{ mg L}^{-1}$. Overall, it was observed that an increase in the S_0/X_0 ratio resulted in higher inhibition and that the inhibitory effects of AgNPs decreased with exposure time.

In the second stage, we evaluated the inhibitory effect of Ni, Cd and Co on an activated sludge process. The inhibitory effect was tested under different conditions including the heavy metals, substrate and biomass concentrations, and exposure time. The inhibitory effect was quantified by the percentage of inhibition, K_S , K_I , and OUR_{max} . The results indicated that, in a range of concentration from 0 to 40 mg L^{-1} , the three heavy metals exerted an uncompetitive and incomplete inhibitory effect, with a maximum inhibition of 67, 57, and 53% for Ni, Co, and Cd, respectively. An increase of the biomass concentration by 620% resulted in a decrease of the inhibition by 47 and 69% for Co and Cd, respectively, while no effect was observed on Ni inhibition. An increase of the substrate concentration by 87% resulted in an increase of the inhibition by 24, 70, and 47% for Ni, Co and Cd, respectively. In the case of nickel and cadmium, an increase in the exposure time to the heavy metals also increased the inhibition.

In the third stage, the long-term inhibition of a mixture of Cu, Ni and Zn on a continuous activated sludge process was evaluated. The inhibitory effect of the heavy metal mixture was quantified by determining the COD removal efficiency, as well as by determining the percentage of inhibition and the main parameters of the activated sludge system. It was observed that the inhibitory effect of a mixture of heavy metal on a control activated sludge (without exposure to heavy metals) was proportional to the heavy metals concentration (short-term inhibition) and in

the last evaluated stage we observed an antagonistic effect. In the system that was acclimated to the heavy metal mixture, peaks of inhibition were observed only when the concentration of heavy metals was increased in each stage, then a period of recovery of the system was observed. Important changes in COD removal efficiency and in biomass concentration were observed throughout the operation time.

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL.

1.1 Proceso de lodos activados.

El proceso de lodos activados, es el proceso más utilizado en el tratamiento de aguas residuales tanto domésticas como industriales (Orton, 2015; Wang et al., 2013). En este proceso una suspensión de microorganismos autótrofos y heterótrofos remueven los contaminantes presentes en las aguas residuales. Generalmente, este bioproceso es un proceso aerobio, donde el principal aceptor de electrones es el oxígeno. Durante el proceso de oxidación biológica, parte de la materia orgánica es transformada en energía (catabolismo) para satisfacer las necesidades de los microorganismos y parte es utilizada en la síntesis de componentes celulares (anabolismo) (Metcalf y Eddy, 2003). Dependiendo del diseño y la aplicación específica, una planta de tratamiento de aguas residuales de lodos activos puede lograr, la remoción de nitrógeno, remoción de fósforo, además de la eliminación de los compuestos orgánicos presentes en las aguas residuales (Gernaey et al., 2004). En consecuencia, diferentes procesos de lodos activados han evolucionados en recientes años (Orhon, 2015).

El diseño más simple del proceso de los activos consiste en (Metcalf y Eddy, 2003): i) un reactor donde la mezcla de microorganismos está suspendida, y es suministrado continuamente el agua residual, así como también oxígeno disuelto (OD). ii) El efluente del reactor, junto con los lodos activados, denominado licor mixto, es traspasado a un segundo tanque (clarificador), donde los lodos activos son separados del agua residual por sedimentación. Generalmente el efluente tratado es sometido a un proceso de desinfección o es directamente descargado en algún cuerpo

receptor. iii) Parte de lodos activados pueden ser recirculados al reactor o removidos para su disposición (Figura 1.1).

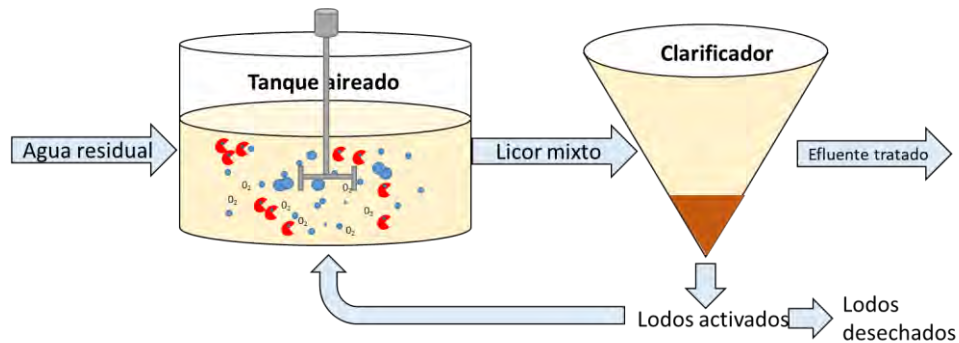


Figura 1.1 Configuración de un proceso convencional de lodos activados.

Las principales ventajas del tratamiento de agua residuales por lodos activados son (Hreiz et al., 2015):

- 1) Altas eficiencias de remoción de carbono orgánico, debido principalmente a los altos tiempos de retención de los lodos activados (STR).
- 2) Bajos costos de operación, donde el principal costo de operación es la aireación.
- 3) Versatilidad de configuraciones del proceso, con la finalidad de remover diferentes contaminantes.
- 4) Relativamente fácil operación.

El funcionamiento de este bioproceso depende principalmente de la cantidad y presencia de compuestos presentes en las aguas residuales. En recientes años, debido al incremento de las actividades antropogénicas, se ha incrementado el volumen de las aguas residuales municipales e industriales generadas, y por consiguiente la presencia de compuestos tóxicos no

biodegradables (Von Sperling y Lemos, 2017). Estos compuestos tóxicos pueden alterar significativamente el funcionamiento del proceso de lodos activados, es decir, pueden disminuir la oxidación de la materia orgánica (Hu et al., 2002), disminuir la eficiencia de separación de sólidos (Ong et al., 2004) o pueden modificar las propiedades físicas de los lodos activados (Liu y Fang, 2003). Dentro de los principales compuestos tóxicos que pueden afectar el comportamiento del sistema de lodos activados se encuentran los pesticidas, herbicidas, fenoles, hidrocarburos, y metales pesados (EPA, 2014; Kim et al., 2008). Adicionalmente a esos contaminantes, más recientemente, la presencia de contaminantes emergentes como los productos de uso personal, compuestos farmacéuticos y nanomateriales ha ido aumentando (Deblonde et al., 2011; Richardson, 2009). En este proyecto trabajamos con metales pesados y nanopartículas de plata. En las siguientes secciones se describirá la importancia de investigar estos contaminantes.

1.2 Importancia de los metales pesados en los procesos de lodos activados.

Los metales pesados son compuestos comúnmente encontrados en las aguas residuales municipales e industriales, debido a su uso extensivo en diversos sectores como la minería, la industria de galvanoplastia, energéticos, la industria del hierro y del acero, así como en diversos productos de uso común como pilas, gasolinas, electrodomésticos por mencionar algunos (Förstner y Wittmann, 2012). Los metales pesados que son comúnmente encontrados en las aguas residuales son Cu, Ni, Cd, Co y Zn (Ahluwalia y Goyal, 2007). Estos metales pesados han sido reportados en concentraciones del orden de g L^{-1} en diferentes tipos de aguas residuales (Tabla 1.1).

Tabla 1.1 Concentraciones de metales pesados en diferentes efluentes de aguas residuales.

Metal pesado	Concentración (mg L ⁻¹)	Efluente	Referencia
Cu	130	Industria papelera	Förestner y Wittmann (2012)
Cu	140	Industria papelera	Förestner y Wittmann (2012)
Cu	2.7	Industria de helados	Klein et al. (1974)
Cu	1.7	Lavanderías	Klein et al., (1974)
Cu	1000	Industria de galvanoplastia	Çeçen et al. (2010)
Zn	3.8	Procesamiento de grasas	Förestner y Wittmann (2012)
Zn	15,500	Industria electronica	Förestner y Wittmann (2012)
Zn	76	Industria de galvanoplastia	Šćiban et al. (2007)
Zn	200-300	Manufactura de caucho	Subbiah et al. (2010)
Zn	1.88	Aguas residuales industriales	Singh et al. (2004)
Ni	2950	Industria de galvanoplastia	Çeçen et al. (2010)
Ni	10-20	Aguas residuales	Wang et al. (2010)
Ni	0.22	Aguas residuales	Singh et al. (2004)
Ni	0.59	Aguas residuales	Üstün et al. (2009)
Cd	2-5	Lixiviados de vertederos	Çeçen y Gürsoy (2000)
Cd	8.52	Aguas residuales	Šćiban et al. (2007)
Cd	0.05	Aguas residuales	Buzier et al. (2006)
Co	29	Industrias del hierro y acero	Çeçen et al. (2010)
Co	0.1	Lixiviados de vertederos	Halim et al. (2004)
Co	6.5	Industria de curtidos	Buzier et al. (2006)

La importancia que tiene el estudio de los metales pesados en el proceso de lodos activados radica en que son potencialmente peligrosos por su elevada toxicidad, persistencia y rápida acumulación en los microorganismos presentes en este proceso. Existen diversos factores que influyen en el grado de toxicidad de los metales pesados tal como, el pH, la concentración del inhibidor, las especies presentes de cationes y aniones, la concentración de sólidos suspendidos, la edad del cultivo, el tipo y concentración de la biomasa. Así como las condiciones de operación del proceso (Bestawy et al., 2013).

Los metales pesados pueden ser clasificados como compuestos esenciales, tal como Cu, Co, Ni y Zn porque estimulan el crecimiento microbiano y están involucrado en funciones metabólicas de diferentes procesos fisiológicos (Gikas, 2008). Mientras que otros metales pesados como el Cd, Ag, Hg y Au son considerados como no esenciales (Cecen et al., 2010). La respuesta de los microorganismos a los metales pesados se puede dividir en tres zonas: 1) estimulación de la actividad de los microorganismos, 2) atenuación de la actividad y 3) toxicidad (Figura 1.2).

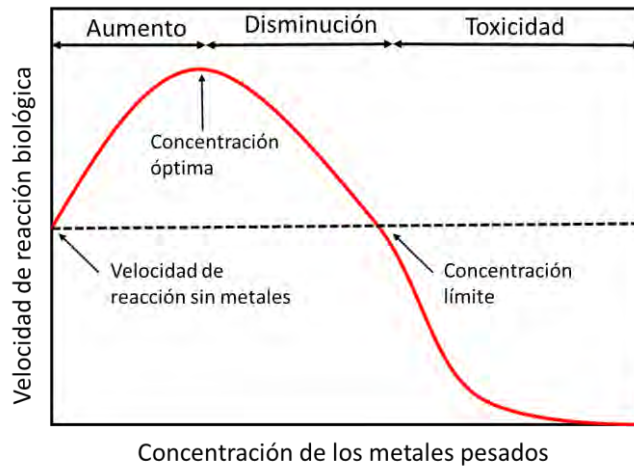


Figura 1.2. Efecto de la concentración de metales pesados en el crecimiento microbiano (Modificado de McCarhy, 1964).

Generalmente los metales pesados en su forma elemental no afectan a la actividad biológica. Mientras que la forma libre o iónica puede afectar considerablemente el comportamiento de los sistemas biológicos (Gikas, 2008; Cecen et al., 2010). Para cuantificar la inhibición que causa los metales pesados en los sistemas de lodos activados el parámetro más utilizado es la concentración media inhibitoria (IC_{50}). La Figura 1.3 muestra los valores de IC_{50} reportados en la literatura para Cu, Co, Cd, Ni y Zn en los sistemas de lodos activados. Donde se puede observar una alta variabilidad de los valores de IC_{50} previamente reportados. Esta variabilidad puede ser atribuida a diferentes factores como son: la composición de las aguas residuales, el tipo y concentración de biomasa utilizada en los ensayos, el medio de cultivo empleado, la especiación de los metales pesados, el pH, el tiempo de exposición, así como los métodos utilizados en los ensayos de toxicidad.

Los métodos más utilizados para determinar el grado de inhibición de los procesos de lodos activados son basados en la determinación del consumo de sustrato u oxígeno, en bioluminiscencia o en la determinación de actividad enzimática, tal como INT-deshidrogenasa. La mayoría de los métodos antes mencionados requieren de un esfuerzo experimental considerable y generalmente son técnicas especializadas que conllevan un error importante en su implementación. Por lo que es necesario implementar técnicas rápidas y que permitan minimizar los errores experimentales. Una alternativa a estos problemas es la respirometría, que se describirá en mayor detalle en las siguientes secciones.

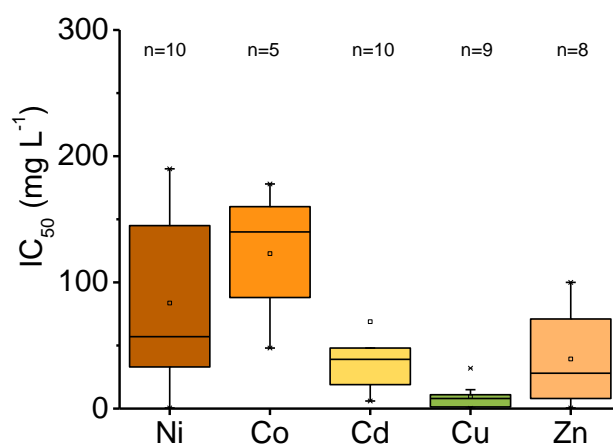


Figura 1.3 Distribución estadística de los valores de IC₅₀ reportados en la literatura para diferentes metales pesados. Donde las cajas muestra la media y los percentiles del 25 al 75. Los bigotes incluyen todos los datos contenidos en el 99% de los valores. Los marcadores cuadrados representan la media de los valores y las equis representan los valores atípicos. *n*, representa el número de trabajos

1.3 Importancia de las nanopartículas en los procesos de lodos activados.

Los nanomateriales son estructuras de poco menos de cien nanómetros. Estos materiales han sido desarrollados por las ventajas que presentan sus propiedades físicas y químicas, como por

ejemplo la capacidad de incrementar el área superficial específica debido a los pequeños tamaños, lo que conduce a un aumento en la reactividad de estos materiales (Varner et al., 2010). Los nanomateriales más reportados son las nanopartículas de plata (AgNPs) y son ampliamente utilizadas en diferentes sectores como medicina, catálisis, electrónica, farmacéutica, energía y aplicaciones en materiales (Ju-Nam y Lead, 2008). La producción de estos nanomateriales está incrementando considerablemente. En el año 2010 el estimado de producción global de las AgNPs fue de 15 000 toneladas y se espera un incremento exponencial de la producción (Whiteley et al., 2013). Debido al incremento en la producción de las AgNPs también ha incrementado la preocupación por su liberación, impacto ambiental y los efectos a la salud humana (Varner et al., 2010). Varios estudios han demostrado que las AgNPs pueden ser liberadas durante el proceso de manufactura en concentraciones de hasta miligramos por litro y pueden encontrarse en las aguas residuales. (Tabla 1.2).

Tabla 1.2 Concentraciones de AgNPs medidas y estimadas en las aguas residuales. PTAR, Planta de tratamiento de aguas residuales.

Concentración ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Influyente/Efluente	Medido/Estimado	Referencia
0.06-1.5	PTAR influente	Medido	Li et al. (2013)
0.001-0.009	PTAR efluente	Medido	Li et al. (2013)
0.375	PTAR influente	Medido	Hartmann y Schuster (2013)
0.011	PTAR efluente	Medido	Hartmann y Schuster (2013)
1.9-2.16	PTAR influente	Medido	Hoque et al. (2012)
0.1-0.2	PTAR efluente	Medido	Mitrano et al. (2012)
21-42	PTAR efluente	Estimado	Gottschalk et al. (2009)
1.58-1.88	PTAR lodo	Estimado	Gottschalk et al. (2009)
0.009-0.51	PTAR efluente	Estimado	Hendren et al. (2013)
840-38400	PTAR lodo	Estimado	Hendren et al. (2013)

Actualmente diversos trabajos se han enfocado en determinar la presencia, el destino y el impacto ambiental de las AgNPs (Benn et al., 2010; Kaegi et al., 2013; Yu et al., 2016). Además, estudios adicionales se han enfocado a conocer los efectos inhibitorios en diferentes microorganismos modelo (Yang et al., 2013; Chen et al., 2014; Jeong et al., 2014). Sin embargo son pocos los estudios que se han enfocado a evaluar el impacto de los AgNPs en el proceso de lodos activados debido a la complejidad de estos sistemas. La Tabla 1.3 muestra un resumen de los trabajos en la literatura sobre el impacto de las AgNPs en los procesos de lodos activados.

Tabla 1.3 Efecto de las nanopartículas de plata en procesos de lodos activados. LA, Lodos activados; LN, Lodos nitrificantes; BAO, Bacterias amonio oxidantes.

Concentración (mg L ⁻¹)	Sistema	Efecto	Referencia
1	LN	43% de la nitrificación fue inhibida.	Liang et al. (2010)
130	LA	30% los microorganismos heterótrofos fueron inhibidos.	García et al. 2012
1-10	LA/LN	Efecto sobre la capacidad de sedimentación de los lodos con cambios de en la estructura y morfología.	Qiu et al. (2016)
3.2-11	LA	50% de la actividad de lodos activados fueron inhibidos.	Geyik y Çeçen (2016)
0.5	BAO	4-50% de la actividad de las bacterias fue inhibida.	Giao et al. (2012)
0.5	BAO	Disminución significativa de la actividad de las BAO	Jeong et al. (2012)
35	LA	Daño significativo en la estructura y función de los gránulos.	Yang et al. (2014)

A pesar de los esfuerzos realizados recientemente, todavía queda mucho por entender sobre el comportamiento de las AgNPs en los sistemas de tratamiento de aguas residuales. En particular no hay estudios donde se evalué sistemáticamente múltiples factores que afectan la inhibición de las AgNPs en los sistemas de lodos activados. Adicionalmente los métodos actuales para caracterizar el impacto de las AgNPs son métodos que conllevan varias limitantes como i) la dificultad de tomar una muestra representativa del sistema, ii) son técnicas analíticas difíciles de implementar y costosas, iii) generalmente no permiten análisis en línea y tiempo real, iv)

están sujetas a importantes errores experimentales debido a los bajos niveles de concentración, v) y no necesariamente reflejan el consumo de sustrato asociado a la actividad metabólica.

1.4 Caracterización de procesos de lodos activados.

Los procesos de tratamiento de lodos activados así como cualquier bioproceso, requiere de modelos matemáticos, que permitan describir el comportamiento de estos sistemas biológicos. Estos modelos matemáticos pueden ser clasificados en modelos no estructurados y modelos estructurados (Tziampazis y Sambanis, 1994). Los modelos no estructurados consideran la dinámica de crecimiento microbiano, consumo de sustrato o producción de metabolitos como consecuencia únicamente de las variables macroscópicas y de las condiciones del reactor. Dentro de los modelos no estructurados, el modelo más utilizado para describir procesos microbianos es el modelo de Monod (Aborhey y Williamson, 1978; Lee et al., 1975; Zeng y Deckwer, 1995). Este modelo describe la relación entre la velocidad específica de crecimiento (μ) y la concentración de sustrato, y ha sido la columna vertebral en el modelamiento microbiano en sistemas mixtos y puros. Por otro lado, los modelos estructurados consideran además el comportamiento intracelular de los nutrientes, enzimas, metabolitos u otros componentes celulares. Este tipo de modelos son capaces de describir la dinámica de regulación metabólica de los microorganismos. A su vez, estos modelos pueden ser clasificados como estructurados simples, estequiométricos o mecanísticos (Jeppsson, 1999).

Independiente del modelo utilizado, para diseñar, caracterizar, controlar u optimizar un bioproceso es necesario determinar los parámetros cinéticos y estequiométricos involucrados en dichos procesos (Sipkema et al., 1998). Siendo tres los parámetros más importantes; la velocidad

específica máxima de crecimiento (μ_{max}), la constante de afinidad por el sustrato (K_S) y el rendimiento celular ($Y_{X/S}$). La determinación de los parámetros antes mencionados resulta de suma importancia para una adecuada calibración de los modelos propuestos. Dependiendo del interés y de los modelos utilizados se pueden determinar diferentes parámetros como: la constante de afinidad por el oxígeno (K_{O_2}), la constante de inhibición (K_I), la constante de mantenimiento, el rendimiento de oxidación (Y_{O_2}) así como diferentes rendimientos estequiométricos. A pesar de la importancia de determinar los parámetros cinéticos y estequiométricos de los bioprocesos, existe relativamente poco interés por esta área de la ciencia debido a la dificultad experimental de obtener datos coherentes y la alta variabilidad de los parámetros (Kovárová-Kovar y Egli, 1998). La Tabla 1.4 muestra ejemplos de parámetros determinados para diferentes cultivos, donde se muestra una alta variabilidad de K_S hasta por dos órdenes de magnitud. Similares ejemplos pueden ser encontrados para cultivos axénicos y mixtos. Esta variabilidad parece ser atribuida a tres factores claves (Grady et al., 1996);

1. El historial del cultivo, es decir, el tipo y la duración de las condiciones anteriores a la caracterización cinética, los cuales determinan la composición y el estado fisiológico de la biomasa (es decir, la concentración de RNA, proteínas y otras macromoléculas).
2. La relación de la concentración de sustrato y biomasa inicial (S_0/X_0), es decir la cantidad de sustrato oxidado por unidad de biomasa. Esta relación es uno de los parámetros más importantes en los cultivos por lote ya que afecta directamente el anabolismo y el catabolismo de los microorganismos y por consiguiente afecta a los valores de los parámetros cinéticos y estequiométricos (Chudoba et al., 1992).
3. Adicionalmente, los aspectos metodológicos utilizados en la determinación de los parámetros. En particular, Grady et al. (1996) subrayaron la identificabilidad de

parámetros (validez matemática del parámetro determinado) como uno de los principales problemas.

Tabla 1.4 Parámetros cinéticos y estequiométricos en diferentes cultivos. LA, Lodos activados; LA, Lodos nitrificantes; BAO, Bacterias amonio oxidantes. AR, agua residual; ARS, Agua residual sintética.

Parámetro	Valores	Sustrato	Cultivo	Referencia
μ_{\max}	0.018 h ⁻¹	Amonio	BAO	Chandran et al. (2008)
μ_{\max}	0.2 h ⁻¹	Glucosa	<i>P.putida</i>	Chandran et al. (2008)
μ_{\max}	0.076-0.011 h ⁻¹	ARS	LA	Esquivel-Rios et al. (2014)
μ_{\max}	58.4-70.3 h ⁻¹	AR	LA	Vanrolleghem y Verstraete (1993)
μ_{\max}	0.64 h ⁻¹	Etilenglicol	LA	Ellis et al. (1996)
μ_{\max}	0.18 h ⁻¹	Acrilamida	LA	Ellis et al. (1996)
OUR _{max}	0.208 mg O ₂ L ⁻¹ min ⁻¹	AR	LA	Volskay y Grady (1990)
OUR _{max}	0.98 mg O ₂ L ⁻¹ min ⁻¹	Acetato	LA	Orupöld et al. (2001)
OUR _{max}	6.8 mg O ₂ L ⁻¹ min ⁻¹	Catecol	LA	Orupöld et al. (2001)
OUR _{max}	53.55 mg O ₂ L ⁻¹ h ⁻¹	Amonio	LN	Ordaz et al. (2008)
OUR _{max}	20.9 mg O ₂ L ⁻¹ h ⁻¹	Amonio	LN	Ramirez-Vargas et al. (2013)
K _S	0.136 mg L ⁻¹	AR	LA	Volskay y Grady (1990)
K _S	20.49 mg L ⁻¹	ARS	LA	Esquivel-Rios et al. (2014)
K _S	0.096-0.182	AR	LA	Vanrolleghem y Verstraete (1993)
K _S	0.36-0.51 mg L ⁻¹	ARS	LA	Drtil et al. (1993)

K_s	0.03 mg L ⁻¹	4-clorofenol	LA	Ellis et al. (1996)
K_s	0.47 mg L ⁻¹	Etilenglicol	LA	Ellis et al. (1996)
K_s	0.37 mg L ⁻¹	Acrilamida	LA	Ellis et al. (1996)
$Y_{X/S}$	0.73 g g ⁻¹	ARS	LA	Esquivel-Rios et al. (2014)
$Y_{X/S}$	0.71-0.91 g g ⁻¹	ARS	LA	Drtil et al. (1993)
$Y_{X/S}$	0.6	ARS	LA	Cokgor et al. (2007)
$Y_{X/S}$	0.6	ARS	LA	Orhon et al. (2009)

Los métodos tradicionales para determinar los parámetros cinéticos y estequiométricos de los bioprocesos se basan en la medición de la concentración de sustrato limitante. Estas técnicas conllevan un error experimental relativamente importante debido a i) la dificultad de tomar una muestra representativa del sistema, ii) la dificultad de medir concentraciones bajas de sustrato, en el rango de la constante de afinidad (frecuentemente inferiores a mg L⁻¹) y iii) la existencia de sustrato intra- y extra-celular difícilmente discernible. Lo anterior destaca la importancia de utilizar metodologías que reduzcan este error experimental, que sean fáciles de implantar y que no sean técnicas específicas. Dentro de las técnicas con mayor relevancia destaca la respirometría.

1.5 Respirometría.

La respirometría consiste en la medición del consumo biológico de oxígeno bajo condiciones definidas (Spanjers et al., 1998). En la mayoría de los casos, la respirometría se lleva a cabo en un respirómetro, el cual es un dispositivo experimental que aísla la muestra del ambiente y mide la evolución de la concentración de oxígeno disuelto en función del tiempo (Spanjers et al.,

1995). Para llevar a cabo las mediciones de oxígeno en el sistema, se hace uso de sondas de oxígeno disuelto que permiten seguir la concentración de oxígeno en tiempo real y determinar así la velocidad de consumo de oxígeno (comúnmente llamada *OUR*, por sus siglas en inglés).

La respirometría utiliza la relación que existe entre el consumo de oxígeno y el consumo de sustrato en los procesos aerobios. Esta relación directa, está dada por el rendimiento de oxidación del sustrato ($Y_{O_2/S}$, g de oxígeno consumido por g de sustrato oxidado). Por lo tanto, se puede determinar la velocidad de oxidación del sustrato a partir del *OUR* (Kong et al., 1994; Ficara et al., 2000) y, a su vez, determinar el metabolismo microbiano. La medición de la concentración de oxígeno disuelto ofrece varias ventajas sobre las técnicas tradicionales de medición de sustrato como lo señalan Riefler et al., (1998). Caben destacar las tres más importantes; (i) el oxígeno disuelto se puede medir en línea y en tiempo real con el uso de una sonda específica, fácilmente disponible y de bajo costo, (ii) la medición del oxígeno disuelto se puede realizar con una alta sensibilidad y precisión (del orden de 0.01 mg/l) y (iii) la medición de la velocidad de respiración se puede realizar en cualquier proceso donde el oxígeno actúa como aceptor final de electrones, al contrario de las técnicas de medición del sustrato que deben ser específicas del sustrato.

La respirometría permite por lo tanto mediciones rápidas y precisas sin perturbaciones importantes del proceso a caracterizar. Adicionalmente, la literatura subraya una mayor validez de los parámetros cinéticos determinados con los métodos respirométricos (Spanjers et al., 1995; Ellis et al., 1996; Vanrolleghem et al., 1998), comparado con técnicas tradicionales de medición de sustrato.

En el pasado se han desarrollado varios métodos respirométricos, pero todos están basados en la medición de la velocidad de consumo de oxígeno. Estos métodos son clasificados de acuerdo a la fase donde es medido el oxígeno (líquido/gas), las condiciones de operación del gas (estático/dinámico) y las condiciones de operación del líquido (estático/dinámico) (Spanjers et al., 1996). Actualmente los métodos más utilizados en respirometría consisten en la medición del oxígeno disuelto en la fase líquida, donde la operación de la fase líquida es estática y el oxígeno puede o no ser suministrado al sistema (estático o dinámico) (Guisasola et al., 2005). En particular dos métodos son los más utilizados, el primero denominado “respirometría estática” se basa en la medición del oxígeno disuelto en un respirómetro donde no hay entrada de oxígeno. En este método se determina la velocidad de consumo de oxígeno a partir de la pendiente del perfil de oxígeno disuelto (Chandran y Smets, 2000). La respirometría estática permite la determinación directa de OUR, sin embargo ésta es limitada por los cortos intervalos de OD, que pueden generar limitación del oxígeno en los cultivos ($< 2 \text{ mg L}^{-1}$). El segundo método es denominado “respirometría dinámica” o “respirometría de pulsos”. Esta técnica, al contrario del método estático, requiere de la suministración continua de oxígeno disuelto al respirómetro, combinada con la inyección de una secuencia de pulsos de sustrato. En comparación con la técnica estática, el método dinámico es relativamente más difícil de interpretar, sin embargo esta técnica permite determinar los parámetros cinéticos del sistema en un amplio intervalo de condiciones experimentales que no están limitadas por la concentración de oxígeno disuelto.

Como se mencionó previamente la respirometría mide la evolución de oxígeno disuelto a través del tiempo, estos perfiles de OD disuelto son conocidos como respirógramas. La Figura 1.4 muestra un ejemplo típico de respirometría dinámica y sus componentes. Donde (a) representa la respiración endógena o línea base inicial antes de la inyección del pulso de sustrato, (b) la

inyección del pulso de sustrato, (c) el área del respirógrama, que corresponde a los miligramos de O_2 consumidos por unidad de sustrato inyectado, (d) la concentración mínima de O_2 alcanzada en el pulso, correspondiente a la OUR_{max} observada, (e) la concentración de saturación de O_2 y (f) la línea base final.

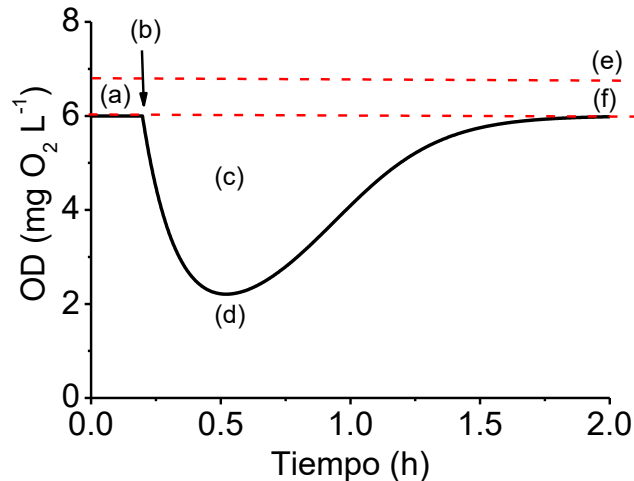


Figura 1.4 Ejemplo de respirógrama obtenido por el método dinámico.

Los métodos respirométricos han sido utilizados en diferentes aplicaciones, siendo tres las principales aplicaciones en los procesos de tratamiento de aguas por lodos activados.

- Control de procesos de lodos activados (Surmacz-Gorska et al., 1995; Spanjers et al., 1998; Moreno et al., 1999; Guisasola et al., 2006).
- Determinación de constantes cinéticas como por ejemplo la constante de afinidad para el sustrato (K_s) y la velocidad específica máxima de crecimiento (μ_{max}) (Roš et al., 1992; Riefler et al., 1998; Avcioglu et al., 2003; Dirks et al., 1999; Chandran et al., 2000a;

Chandran et al., 2000b; Benes et al., 2002; Carvallo et al., 2002; Checchi and Marsili-Libelli., 2005; Guisasola et al., 2005; Chandran et al., 2008).

- Determinación de la actividad biológica y efectos inhibitorios/tóxicos en lodos activados (Kong et al., 1994; Villaverde et al., 2000; Equivel-Rios et al., 2014).

A pesar de sus ventajas, la respirometría requiere de tiempos relativamente largos, para la obtención de datos y su interpretación. Adicionalmente, para limitar el error experimental, se requiere la realización de réplicas. En el estado actual del arte, la respirometría no permite la realización de un gran número de experimentos simultáneos que permitirían determinar los parámetros de manera sistemática y estadísticamente significativa (Kostov et al., 2001). Cabe mencionar que para reducir el número de experimentos se han utilizado métodos matemáticos de optimización (Kim et al., 2005; Nuhoglu et al., 2005; Plattes et al., 2007; Ribes, Keesman and Spanjers, 2004). Sin embargo este enfoque reduce pero no elimina la necesidad de realizar replicas. Otro de los inconvenientes es que los respirómetros actualmente disponibles son relativamente costosos y requieren de volúmenes de muestra del orden de 100 mL (Chandran and Smets 2000) a 1 L (Orupold et al., 2001), y no permiten el procesamiento de varias muestras de forma simultánea. Por lo anterior, se requiere volúmenes de muestra relativamente grandes y replicas con muestras diferentes o con la misma muestra pero en una secuencia de experimentos. Esas características tienen un efecto potencial sobre la repetitividad de los experimentos. Por lo anterior, el desarrollo de métodos respirométricos rápido, fácil y de bajo costo para la determinación de parámetros cinéticos con un gran número de repicas sería una plusvalía importante.

1.6 Microrrespirometría.

Recientemente, se ha desarrollado la tecnología de los microrreactores que son sistemas que permiten la realización de fermentaciones independientes con un gran número de reactores de pequeños volúmenes del orden de μL a mL (Betts y Baganz, 2006; Isett y George, 2007; Kumar et al., 2004). Los sistemas de microrreactores desarrollados hasta ahora generalmente contienen de 6 hasta 348 microrreactores (Kirk y Szita, 2013). Esos microrreactores generalmente incluyen sensores de OD ópticos que poseen varias ventajas sobre los sensores de OD tradicionales, como por ejemplo, son sensores no invasivos, tiene tiempos de respuesta significativamente menores que los sensores electroquímicos (< 10 s), son menos susceptibles a interferencias químicas y presentan altos valores de la señal/ruido, que se traduce en una mejor calidad de la mediciones de OD (Wolfbeis, 2015).

Diferentes configuraciones de microrreactores se han reportado en la literatura, siendo los más simples las microplacas que contiene únicamente sensores de oxígeno o de pH y para controlar la temperatura y agitación es necesario utilizar un dispositivo adicional como una incubadora. Mientras que otros sistemas avanzados contiene sensores de oxígeno, pH, temperatura así como agitación y aireación (Kirk y Szita, 2013). Debido a que los sistemas de microrreactores son considerados como sistemas de alto rendimiento diversas aplicaciones han sido desarrolladas como; sistemas de selección de cultivos de alto rendimiento, desarrollo de productos de alto valor agregado (proteínas recombinantes y plásmido), estabilidad de líneas celulares vegetales y animales (incluidos medios y pruebas de materias primas), así como desarrollo, caracterización, validación y optimización de procesos en diferentes área de interés biotecnológico (Amanullah et al., 2010).

En este contexto, nuestro grupo de investigación ha desarrollado una nueva técnica respirométrica denominada microrrespirometría (Esquivel-Rios et al., 2014; Ramirez-Vargas et al., 2014) es decir, la implementación de la respirometría en sistemas de 24 microrreactores. Por ejemplo Esquivel-Rios et al. (2014) caracterizó la transferencia de masa en un sistema de microplacas sin baffles (PreSens, México). Este sistema no cuenta con aireación ni agitación por lo que la transferencia de oxígeno al sistema, se realiza por aireación superficial colocando el sistema en una agitadora/incubadora y colocando una perla de vidrio en cada microrreactor. En este trabajo se mostró que la transferencia de oxígeno en este sistema, en términos de K_{LA} , puede alcanzar hasta 48 h^{-1} . Asimismo los autores demostraron la aplicabilidad de la técnica microrrespirométrica determinando los principales parámetros cinéticos y estequiométricos de cultivos mixtos y axénicos con desviaciones estándar comparables a trabajos previos en la literatura. Por otro lado, Ramirez-Vargas et al. (2014) caracterizó un sistema de 24 microrreactores (Pall, USA). Este sistema es más especializado, cuenta con sensores de oxígeno, pH y temperatura, además de agitación y aireación. En este trabajo se demostró que los sensores de oxígeno presentan tiempos de respuesta cortos y altos valores de la señal/ruido (SNR), lo que se traduce en una mejor calidad de los datos de OD. La caracterización de la transferencia de oxígeno mostró que se pueden alcanzar valores de K_{LA} en un rango de 9 a 80 h^{-1} . Asimismo, los autores demostraron que en este sistema se pueden determinar valores de OUR en un rango de 0.038 a $3390 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ con errores experimentales menores al 15%.

La microrrespirometría ha demostrado tener significativas ventajas comparado con la respirometría tradicional como por ejemplo: esta técnica permite realizar un mayor número de réplicas de manera simultánea, disminuye el error en la determinación de los parámetros

cinéticos y estequiométricos significativamente, minimiza el esfuerzo y los costos experimentales. Por lo anterior, la microrespirometría es una herramienta potencialmente útil para la determinación del impacto de compuestos tóxicos tradicionales, como los metales pesados y nuevos contaminantes como las nanopartículas de plata, sobre cultivos microbianos.

JUSTIFICACIÓN.

El proceso de lodos activados es importante para la eliminación de diversos compuestos presentes en las aguas residuales tanto urbanas como industriales. Sin embargo este proceso se puede ver alterado significativamente por múltiples factores. Entre estos factores se encuentra la exposición a compuestos tóxicos como nanopartículas y metales pesados. La literatura remarca la importancia de caracterizar estos sistemas de tratamiento de aguas residuales. Sin embargo debido a la complejidad de estos sistemas y al número de variables que influyen sobre el efecto tóxico, es difícil caracterizarlos con las técnicas tradicionales. Por lo que en este trabajo se propone el uso de respirometría acoplada a un sistema de microrreactores (microrrespirometría) para caracterizar sistemáticamente procesos de lodos activados en presencia de compuestos tóxicos como los metales pesados y nanopartículas de plata, analizando un gran número de variables.

HIPÓTESIS.

La microrrespirometría permitirá caracterizar sistemáticamente diversos parámetros que afectan la inhibición por nanopartículas y metales pesados en el proceso de tratamiento de aguas residuales por lodos activados.

OBJETIVOS.

El objetivo general de esta tesis fue caracterizar la inhibición sobre un cultivo modelo de lodos activados en presencia de compuestos tóxicos como nanopartículas de plata y metales pesados.

Para cumplir con este objetivo se plantearon los siguientes objetivos específicos.

1. Establecer y mantener cultivos mixtos de lodos activados como modelo de estudio.
2. Determinar el efecto de las nanopartículas de plata a corto plazo en un cultivo mixto de lodos activados, evaluando diferentes parámetros como la concentración de nanopartículas, la relación sustrato/biomasa (S_0/X_0) inicial, el tiempo de exposición.
3. Determinar el efecto de los metales pesados a corto plazo sobre un cultivo mixto de lodos activados, evaluando múltiples parámetros como la concentración de metales, biomasa y sustrato, así como el tiempo de exposición y la especiación química.
4. Determinar el efecto de una mezcla de metales pesados a largo plazo sobre un cultivo mixto de lodos activados, aplicando microrrespirometría para determinar la inhibición y los parámetros cinéticos durante todo el tiempo de operación del proceso.

Estrategia experimental general.

Es trabajo fue dividido en tres etapas. En la primera etapa (capítulo 2) se implementaron sistemas de lodos activados en régimen continuo alimentados con agua residual sintética como cultivos modelo de sistemas de tratamiento de agua residuales. Asimismo se establecieron las condiciones experimentales para los ensayos microrrespirométricos y se evaluaron múltiples parámetros que afectan la inhibición de las nanopartículas de plata en estos sistemas modelo de lodos activados. Entre los factores que se evaluaron en esta etapa fueron la concentración de las nanopartículas, la relación biomasa/sustrato inicial y el tiempo de exposición. En la segunda etapa se evaluó el efecto inhibitorio a corto plazo de Co, Cd y Ni sobre un sistema de lodos activados (capítulo 3). De igual manera que para las nanopartículas de plata, se evaluaron diversos parámetros como la concentración de metales pesados, sustrato, biomasa, el tiempo de exposición y la especiación de los metales. En la tercera etapa se evaluó el efecto inhibitorio de una mezcla de metales pesados en cultivos de los activados aclimatados y no aclimatados a estos compuestos tóxicos (capítulo 4). Asimismo se determinó el impacto a largo plazo de la mezcla de metales pesados a través de la eficiencia de remoción de DQO pero también a través de la determinación los parámetros cinéticos durante toda la operación de los sistemas. Es importante resaltar que cada una de las etapas antes menciona está en formato artículo. La primera y segunda etapa han sido publicadas en revistas con arbitraje internacional, y la tercera etapa está en proceso de ser publicada.

CAPÍTULO 2.

DETERMINACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DE LAS NANOPARTÍCULAS DE PLATA A CORTO PLAZO EN UN CULTIVO MIXTO DE LODOS ACTIVADOS.

Este capítulo ha sido publicado como:

Hernández-Martínez G.R., Zepeda A., Ordaz A., Sánchez-Catzin L.A., Estrada-Díaz Z.D., Thalasso F. (2018). High-throughput microrespirometric characterization of activated sludge inhibition by silver nanoparticles. *Environmental Science: Water Research & Technology*. 4(5), 721-730.

2.1 Introducción.

Las nanopartículas de plata (AgNPs) se utilizan actualmente en un número cada vez mayor de sectores, como en la química (Zhai et al., 2006), la energía solar (Rand et al., 2004; Cole y Halas, 2006), componentes electrónicos (Kim et al., 2007; Tolaymat et al., 2010) y medicina (Savage y Diallo, 2005; Sambhy et al., 2006; Pal et al., 2007), y ahora se encuentran comúnmente en una amplia gama de productos comerciales cotidianos, incluidos los cosméticos, los filtros, contenedores y sopas, jabones y detergentes (Brar et al., 2010; Ju-Nam y Lead, 2008). La producción de AgNPs está creciendo a un ritmo acelerado, con una producción estimada de 55 t por año (Piccinno et al., 2012) y un incremento de la producción de 670% del 2004 al 2010 (Blaser et al., 2010). Por lo tanto, es muy probable que los AgNP se diseminen en el medio ambiente, y se ha estimado que se podrían encontrar en los sedimentos de los ríos en concentraciones entre 2 y 4 mg Kg⁻¹ (Blaser et al., 2008).

Varios reportes previos han mostrado que AgNPs son principalmente liberadas durante el proceso de manufactura y su subsecuente uso (Benn y Westerhoff, 2008; Geranio et al, 2009; Mueller y Nowack, 2008), y pueden ser encontradas en las plantas de tratamiento de aguas residuales (Brar et al., 2010; Kiser et al., 2010). Las concentraciones de AgNPs que pueden ser encontradas en las plantas de tratamiento de aguas residuales son todavía inciertas. Concentraciones desde 10 ng L⁻¹ hasta 0.1 mg L⁻¹ han sido sugeridas (Gottschalk et al., 2013), pero en sectores específicos como las fábricas textiles, se han encontrado concentraciones de hasta 1.3 mg L⁻¹ (Benn y Westerhoff, 2008). Considerando el ritmo de crecimiento del sector de las nanopartículas, se espera que las concentraciones de las AgNPs en las aguas residuales,

aumente significativamente en el futuro (Blaser et al., 2008; Siripattanakul-Ratpukdi y Fürhacker, 2014; Arvidsson et al., 2011).

Teniendo en cuenta la toxicidad relativamente alta los iones plata (Ag^+) en los lodos activados (Çeçen et al., 2010; Çeçen y Kılıç, 2016), es probable que los AgNPs puedan ejercer un efecto tóxico sobre los cultivos microbianos. Estudios previos (Tabla 2.1) han reportado la toxicidad de los AgNPs en varios cultivos microbianos, a través de la determinación de la concentración que causa un 50% de inhibición (IC_{50} , Ricco et al., 2004), es decir, una disminución del 50% en la velocidad de consumo de oxígeno (OUR), velocidad de producción de nitrito o actividad luminiscente. Malleve et al. (2014) y Xiu et al. (2011) reportaron el impacto de las AgNPs en cultivos bacterianos axénicos, mientras que otras investigaciones reportaron el impacto de las AgNPs sobre cultivos nitrificantes autotróficos (Choi et al., 2008; Choi y Hu, 2009; Gao et al., 2017; Radniecki et al., 2011; Yuan et al., 2013; Mumper et al., 2013; Gao et al., 2012). Asimismo, varios estudios han reportado el efecto a largo plazo de las AgNPs sobre lodos activados (Yuan et al., 2016; Liang et al., 2010; Yuan et al., 2015; Chen et al., 2012; Yang et al., 2014), incluyendo el efecto sobre la velocidad de remoción de la carga orgánica y la remoción de fosforo (Yuan et al., 2015; Chen et al., 2012), el efecto sobre las comunidades microbianas del lodo activado. Sin embargo, solo Geyik y Çeçen (2016) ha cuantificado la IC_{50} de AgNPs en los lodos activados (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Valores reportados de IC_{50} ($mg L^{-1}$) para AgNPs en diferentes cultivos y determinado por diferentes métodos; R, respirometría; VPN, velocidad específica de producción de Nitrito; L, luminiscencia. BAO, bacterias amonio oxidantes; LA, lodos activados; LN, lodos nitrificantes. Glu, glucosa; Pep, peptona; Ac, Acetato.

IC_{50} ($mg L^{-1}$)	Fuente de C and N	pH	T(°C)	AgNPs (nm)	Método	Cultivo	Referencia
3.00	Glu, Ac, Pept	7.0	25	10	R	LA	Geyik and Cecen (2016)
11.10	Glu, Ac, Pept	7.0	25	100	R	LA	Geyik and Cecen (2016)
10.75	$NH_4^+/NaHCO_3$	-	32	44	VPN	LN	Michels et al. (2017)
0.34	$NH_4^+/NaHCO_3$	7.5	25	14	R	LN	Choi et al. (2008)
0.47	$NH_4^+/NaHCO_3$	7.8	25	20	R	BAO	Radniecki et al. (2011)
1.44	$NH_4^+/NaHCO_3$	7.8	25	80	R	BAO	Radniecki et al. (2011)
0.91	$NH_4^+/NaHCO_3$	7.8	30	7	VPN	BAO	Yuan et al. (2013)
2.90	$NH_4^+/NaHCO_3$	7.8	30	40	VPN	BAO	Yuan et al. (2013)
0.39	$NH_4^+/NaHCO_3$	7.8	30	20	VPN	BAO	Mumper et al. (2013)
10.00	$NH_4^+/NaHCO_3$	7-8	25-30	14	R	BAO	Giao et al. (2012)
4-32	-	-	-	15	L	<i>P.putida</i>	Mallevre et al. (2014)

De forma similar que la toxicidad de los metales pesado (Esquivel-Rios et al., 2014; Hernandez-Martinez et al., 2018), se ha sugerido que una gran cantidad de factores pueden afectar la toxicidad de las nanopartículas. Entre estos factores los más importantes son, la fuerza iónica del medio de cultivo (Chambers et al., 2013), las interacciones con los compuestos orgánicos e inorgánicos (Zhang et al., 2017), la forma y el tamaño de las nanopartículas (Pal et al., 2007; Choi et al., 2008), así como también las condiciones de operación de los procesos (Jeong et al.,

2014; Yuan et al., 2015). Sin embargo, estos reportes previos de la toxicidad de los AgNPs fueron basados en valoraciones cualitativas.

Para explorar más a fondo y restringir mejor la potencial toxicidad de los AgNPs sobre el lodo activado, se estudió el efecto inhibitor de los AgNPs sobre un proceso modelo de lodos activados. El objetivo de este trabajo fue realizar un análisis de múltiples parámetros del efecto de los AgNPs en los lodos activados bajo un amplio rango de condiciones experimentales, incluyendo la concentración de AgNPs, la relación sustrato/biomasa inicial (S_0/X_0) y el tiempo de exposición. Además nuestro trabajo incluye una estimación de los efectos tóxicos de las AgNPs en la respiración endógena, que es un mejor indicador del daño celular y la inhibición irreversible, en comparación con la respiración exógena (Okey et al., 1993). Dado que nuestro estudio incluyó un gran cantidad de parámetros y factores, cuantificamos la inhibición con un método microrrespirométrico, que se basa en la medición de la velocidad el consumo de oxígeno bajo condiciones bien definidas (Spanjers et al., 1999) en un sistema de microreactores. Este método de alto rendimiento permite la evaluación simultánea de un gran número de muestras o condiciones en un tiempo experimental relativamente corto, mientras que reduce el error experimental (Esquivel-Rios et al., 2014; Ramirez-Vargas et al., 2014).

2.2 Materiales y Métodos.

2.2.1 Configuración y operación del reactor.

Un reactor de lodos activados fue operado en una columna de burbuja alimentado con agua residual sintética (0.12 m de diámetro, 0.66 m de altura y 6 L de volumen de trabajo). El reactor

fue inoculado con 1 L de lodo obtenido de una planta municipal convencional de tratamiento de aguas residuales (planta de tratamiento urbana de aguas residuales, Ticoman, México) y fue mantenido en condiciones estables durante 6 meses antes de realizar los ensayos respirométricos. El reactor fue aireado a flujo constante de 1 VVM (volumen del aire por volumen del líquido por minuto) a través de un difusor poroso (0.09 m de diámetro) localizado en el fondo del reactor. El reactor fue alimentado continuamente con agua residual sintética que contenía (mg L^{-1}); K_2HPO_4 , 148; NaCl , 37.3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10.6; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 21.2; Urea, 159; Extracto de carne, 585; Peptona, 851. El medio fue alimentado con una bomba peristáltica (Masterflex L/S precisión, Cole-Parmer) con un flujo constante de 0.125 L h^{-1} (tiempo de residencia hidráulico (θ) de 48 h), mientras que el efluente fue evacuado a través de una salida fija y fue desechado. La velocidad de carga volumétrica correspondiente, expresada en demanda química de oxígeno (DQO), fue de $708.4 \text{ mg DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. El pH se mantuvo a 7.0 ± 0.3 mediante la adición de $2\text{M H}_3\text{PO}_4$. El reactor fue mantenido a temperatura ambiente en un cuarto cerrado ($21 \pm 2^\circ\text{C}$).

2.2.2 Métodos analíticos.

La biomasa y el sustrato fueron reportados en unidades de DQO. El método de DQO seleccionado fue colorimetría de flujo cerrada, de acuerdo con los métodos estándar (APHA, 1999). La DQO total se determinó a partir de una muestra homogénea del licor mixto. La DQO soluble se determinó a partir de una muestra centrifugada ($5900 \text{ g por } 15 \text{ min}$; modelo 5810 R, Eppendorf, México) y filtrada ($0.45 \mu\text{m}$). La DQO particulada fue calculada como la diferencia de la DQO total y soluble. El medio de cultivo no contiene sólidos por lo que la DQO particulada fue considerada como la concentración de biomasa (X), mientras que la DQO soluble fue

considerada como la concentración de sustrato. A lo largo de toda la operación del reactor la concentración de biomasa también fue cuantificada a través de los sólidos suspendidos volátiles (SSV), de acuerdo con los métodos estándar (APHA, 1999).

2.2.3 Caracterización de las nanopartículas de plata.

Las nanopartículas utilizadas son un nanopolvo comprado a Novacentrix (Austin, Texas). De acuerdo con el fabricante, estas AgNPs tienen un diámetro promedio de 25 nm y un área específica superficial de $23 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. La morfología y la composición elemental de las nanopartículas fueron analizadas utilizando un microscopio electrónico de barrido acoplado a un analizador de fluorescencia de rayos X por dispersión de energía (SEM-EDX, keveX 7000, Jeol, USA) con una tensión de aceleración de 5 keV. La agregación de las nanopartículas de plata en la fase líquida fue determinada midiendo el diámetro hidrodinámico por medio de dispersión dinámica de la luz (DLS), usando un equipo Malvern Zetasizer (NanoZS90, Malvern, USA) a 25°C. Con este propósito las AgNPs fueron suspendidas en agua desionizada, medio mineral o agua residual sintética que contenía 50 mg DQO L^{-1} de sustrato, de la misma manera que en los ensayos respirométricos. Las cubetas que contenían la muestra fueron inmediatamente puestas en el equipo Malvern Zetasizer. La especiación de las nanopartículas de plata fue calculada teóricamente usando un software de equilibrio químico (Gustafsson, 2013). Esta especiación teórica fue llevada a cabo considerando el pH, la concentración de los metales pesados utilizados en cada ensayo, así como también la concentración de aniones y cationes presentes en el agua residual sintética. El software utilizado no incluye los datos termodinámicos de la peptona y el extracto de carne, los cuales son los principales componentes en el agua residual sintética. Por lo tanto, estos componentes proteínicos fueron considerados como una mezcla de glicina y ácido glutámico, en proporciones iguales, a la misma

concentración que la peptona y el extracto de carne en el agua residual sintética, expresados en DQO. Esta estrategia ha sido previamente reportada para estimar la especiación de Zn y Cr⁶⁺ en un proceso de lodos activados (Friedrichs et al., 2017).

2.2.4 Preparación de las nanopartículas de plata y biomasa.

Antes de los ensayos respirométricos, una solución madre de AgNPs fue preparada, suspendiendo las AgNPs en agua desionizada. La concentración de esta solución fue de 2.18 g L⁻¹. Esta solución se diluyó para obtener las concentraciones deseadas y fue utilizada en todos los experimentos respirométricos. Antes de los ensayos respirométricos, una solución madre de biomasa fue preparada. Esta solución madre fue preparada tomando un muestra del reactor de columna de burbuja y se centrifugó a 5900 g por 15 min (modelo 5810 R, Eppendorf, México), después de esto, la biomasa fue resuspendida en medio fresco sin fuente de carbono, para garantizar la ausencia de cualquier concentración de sustrato residual. La solución madre de biomasa fue diluida para obtener diferentes concentraciones de biomasa. Es importante mencionar que la ausencia de sustrato en la solución madre de biomasa fue confirmada en cada ensayo respirométrico, con ensayos control (sin sustrato adicionado) que no mostraron respiración exógena.

2.2.5 Sistema de microrreactores.

El sistema de microrreactores utilizado para los ensayos mirorrespirométricos fue un sistema de 24 microrreactores con un diámetro de 16 mm y una profundidad 18 mm cada uno (24-microplate system, PreSens, Applikon, México) previamente descrito por Esquivel-Rios et al. (2014). Cada microrreactor contiene un sensor de oxígeno disuelto precalibrado fluorométricamente (OxoDish, PreSens, México). La adquisición de datos de oxígeno disuelto

fue cada 4 min^{-1} a través del software PreSens (SDR-v37). La transferencia de oxígeno en los microrreactores fue lograda por aireación superficial. Para mejorar el mezclado y la transferencia de masa en los microrreactores se adiciono una perla de vidrio (5 mm de diámetro) en cada microrreactor. El sistema de microrreactores fue mantenido a una temperatura fija en un agitador orbital a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y 100 rpm (Ecotron Infors HT, Switzerland).

2.2.6 Experimentos respirométricos de inhibición.

Los experimentos de inhibición fueron realizados por respirometría dinámica de pulsos, en la cual el OD es medido después de la adición de una concentración conocida de sustrato, es decir, una concentración de agua residual sintética. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en respirómetros estándar. (Ordaz et al., 2008; Oliveira et al., 2011) y más recientemente utilizada en un sistema de microrreactores por Esquivel-Rios et al. (2014). Brevemente, el método consiste en; (i) cada microrreactor fue llenado con 1.3 ml de deseada concentración de biomasa sin fuente de carbono; (ii) el sistema de microrreactores fue cerrado y puesto en el agitador orbital para garantizar aireación superficial en el sistema; (iii) la adquisición de datos fue encendida y fue mantenida hasta alcanzar lecturas estables de la concentración de OD, que corresponde a la respiración endógena de los microorganismos (Spanjers y Vanrolleghem, 1995); (iv) la agitación fue parada cerca de 1 min, durante el cual el microrreactor fue abierto y se inyectó 0.1 ml de agua residual sintética concentrada y 0.1 ml de deseada concentración de AgNPs; (v) el microrreactor fue cerrado de nuevo y puesto en agitación orbital para garantizar una medición continua del OD; (vi) la presencia de sustrato causa un decremento de la concentración de OD, proporcional al sustrato añadido; y (vii) después de que el sustrato fue consumido, la concentración de OD lentamente retorna al estado estacionario observado antes

de la inyección del agua residual sintética; (viii) el coeficiente de transferencia de oxígeno fue determinado en cada microrreactor, de acuerdo con el método descrito por Badino et al. (2000). El contenido del microrreactor fue descartado después de cada experimento de pulso, excepto cuando se evaluó el efecto del tiempo de exposición (ver la siguiente sección). Todos los experimentos respirométricos fueron realizados con en triplicado y también triplicado de los experimentos controles, es decir, experimentos sin nanopartículas de plata.

Las condiciones experimentales para cada conjunto de experimentos son mostradas en la Tabla 2.2. Primero, se realizaron experimentos preliminares para establecer las concentraciones de AgNPs convenientes para los siguientes experimentos. El rango utilizado fue de 0-64 mg L⁻¹ de AgNPs. Segundo, el efecto de la concentración de AgNPs fue evaluado en un rango de 1-16 mg L⁻¹ a una concentración de sustrato y biomasa constante. Tercero, el efecto de la relación sustrato/biomasa inicial (S_0/X_0) fue evaluado en un rango de 0.0075-0.126 en unidades DQO. Para cubrir este rango, dos métodos fueron utilizados. Primero, X_0 fue mantenido a una concentración de 1000 mg DQO L⁻¹ mientras S_0 vario en un rango de 8 a 126 mg DQO L⁻¹. A continuación, S_0 fue mantenido constante a 50 mg DQO L⁻¹ mientras X_0 vario de 1000 a 6640 mg DQO L⁻¹. En todos los casos, la concentración de AgNPs se mantuvo constante. Cuarto, se evaluó el tiempo de exposición de las AgNPs para esto se colocó una muestra de biomasa en los microrreactores y se inyectó concentraciones de 2, 4 8 mg AgNPs L⁻¹. Después de transcurridas de 0 a 8 h se inyectó una concentración de sustrato de 64 mg DQO L⁻¹ en cada microrreactor. Experimentos similares fueron realizados sin AgNPs con las mismas secuencias de tiempos (ensayos control).

Tabla 2.2 Condiciones experimentales para cada conjunto de ensayos respirométricos.

1. Ensayos preliminares	Biomasa (mg DQO L ⁻¹): 1029 Sustrato (mg DQO L ⁻¹): 54 AgNPs (mg L ⁻¹): 0, 16, 32, 64 Tiempo de exposición (h): 0
2. Efecto de AgNPs	Biomasa (mg DQO L ⁻¹): 1142,1029 Sustrato (mg DQO L ⁻¹): 50, 54 AgNPs (mg L ⁻¹): 0, 2, 4, 8, 16, 64 Tiempo de exposición (h): 0
3. Efecto de la relación S_0/X_0	Biomasa (mg DQO L ⁻¹): 1000, 1650, 2602, 3301, 6638 Sustrato (mg DQO L ⁻¹): 9.6, 14, 36, 40, 58, 63, 77, 126 AgNPs (mg L ⁻¹): 8 Tiempo de exposición (h): 0
3. Efecto del tiempo de exposición	Biomasa (mg DQO L ⁻¹): 1348 Sustrato (mg DQO L ⁻¹): 50 AgNPs (mg L ⁻¹): 4, 8, 16 Tiempo de exposición (h): 0, 1, 2, 4, 8

2.2.7 Interpretación de datos.

La velocidad de consumo de oxígeno exógeno (OUR_{ex}) fue calculado a partir del balance de masa del oxígeno disuelto (OD) en el sistema de microrreactores. Donde K_{La} , es el coeficiente volumétrico de transferencia de masa (h^{-1}), C es la medición de la concentración de OD ($mg O_2 L^{-1}$) en el experimento respirométrico y C_b es la concentración inicial de la línea base de OD,

que corresponde a la concentración de OD en el estado pseudo-estacionario observado antes de la adición de sustrato (Ordaz et al., 2008).

$$\frac{dC}{dt} = K_L a \cdot (C_b - C) - OUR_{ex} \quad (1)$$

Durante el pulso respirométrico, C_b fue típicamente inferior a la concentración de saturación (C^*). A partir de esta diferencia se determinó velocidad de consumo de oxígeno endógeno ($\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Dos diferentes velocidades de consumo de oxígeno endógeno fueron distinguidas; b_H observada antes de la inyección del pulso de sustrato; donde C_b fue determinada de la línea base inicial (Eq. 2); y b_H' , cuando el sistema retorna al estado estacionario inicial después de la adición del pulso de sustrato; y C_b' determinado de la línea base final (Eq. 3).

$$b_H = \frac{K_L a (C^* - C_b)}{X} \quad (2)$$

$$b_H' = \frac{K_L a (C^* - C_b')}{X} \quad (3)$$

El impacto de las AgNPs sobre el proceso de tratamiento de aguas residuales fue cuantificado por la velocidad específica de consumo de oxígeno máxima (OUR ; $\text{mg O}_2 \text{ mg DQO}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Como se menciona más adelante (sección de resultados y discusión), el proceso de lodos activados es descrito por un modelo cinético de Monod (Ec. 4):

$$OUR = OUR_{max} \cdot \frac{S}{K_S + S} \quad (4)$$

Donde OUR_{max} ($\text{mg O}_2 \text{ mg DQO}^{-1} \text{ h}^{-1}$) es la OUR máxima, S es el sustrato (agua residual sintética) y K_S (mg DQO L^{-1}) es la constante de afinidad por el sustrato, observada en ausencia de las AgNPs. En presencia de las AgNPs, la OUR_{max} (OUR'_{max}) aparente y K_S aparente (K'_S) fueron recuperados de la OUR observada (OUR_{obs}), usando el mismo modelo de Monod (Ec. 5):

$$OUR_{obs} = OUR'_{max} \cdot \frac{S}{K'_S + S} \quad (5)$$

Para recuperar los valores de OUR'_{max} y K'_S , el método utilizado fue basado en la inyección pulsos de concentración creciente. Este método ha sido exhaustivamente descrito (Ramirez-Vargas et al., 2013; Ordaz et al., 2012). Brevemente, inyectamos simultáneamente y en microrreactores separados, 6 diferentes concentraciones de pulsos (S_p), cada uno con al menos 3 diferentes réplicas y con la misma concentración de nanopartículas de plata. A continuación, de cada respirograma, registramos la OUR'_{max} observada ($OUR'_{obs,max}$) Entonces, graficamos $OUR'_{obs,max}$ contra la concentración de sustrato en el pulso. Las gráficas resultantes muestran un comportamiento tipo Monod que fue usado para estimar OUR'_{max} y K'_S con el método de Runge-Kutta usando la optimización de Levenberg-Marquardt (Matlab R2012b software, USA). La bondad de ajuste fue estimada por el coeficiente de correlación (R^2). Además de los parámetros cinéticos determinados, el efecto inhibitor de las AgNPs se cuantifico a través del porcentaje de inhibición ($I\%$). Este parámetro se determinó a partir de la OUR'_{max} máxima observada (en presencia y ausencia del inhibidor) de acuerdo a la Ecuación 6. Donde $IOUR'_{max}$ es la OUR'_{max} observada en presencia de los AgNPs.

$$I\% = \frac{OUR'_{max} - IOUR'_{obs,max}}{OUR'_{max}} \cdot 100 \quad (6)$$

Además, se determinó el porcentaje de inhibición endógena ($I\%_{bH}$) de acuerdo a la Ecuación 7, donde $b_{H'}$ es la velocidad de respiración endógena final (Eq. 3) observada en los experimentos control (sin inhibidor) y $Ib_{H'}$ es la velocidad de respiración endógena en presencia del inhibidor.

$$I\%_{bH} = \frac{b_{H'} - Ib_{H'}}{b_{H'}} \cdot 100 \quad (7)$$

2.2.8 Análisis estadístico

Las diferencias de significativas entre los parámetros fue calculado utilizando la prueba de comparación múltiple (TK) de Tukey-Kramer, que se realizó después del análisis de varianza ($\alpha < 0.05$) usando OriginPro 8 SR0 v8.0724 (OriginLab, Northampton, MA, USA).

2.3 Resultados y discusión

El análisis de SEM-EDX mostró que la morfología de las AgNPs fue esférica con un tamaño promedio de 25 nm (Fig. 2.1), la cual es similar a la reportada por el fabricante. Además se encontró que las AgNPs están compuestas en su mayoría por plata y carbón con porcentajes de concentraciones de 83.99 y 7.86% respectivamente (Fig. 2.1, Tabla interna).

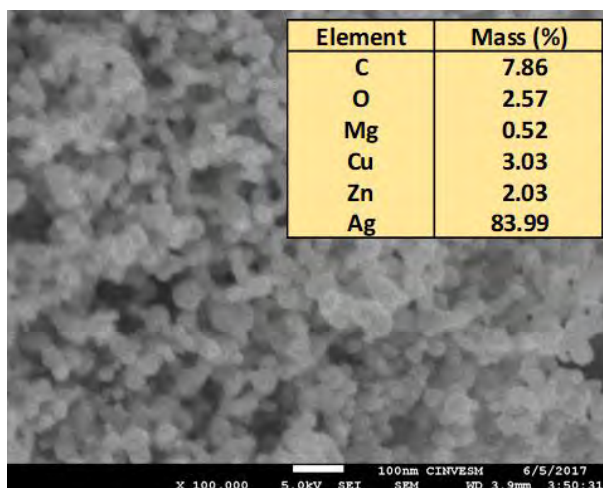


Figura 2.1 Imagen de SEM y composición por EDX de las nanopartículas de plata.

La agregación de las nanopartículas de plata fue determinada a través de la medición del diámetro hidrodinámico por dispersión dinámica de la luz (DLS), durante más de 2.5 h que fue la duración de los experimentos respirométricos. En todos los casos, incluyendo la suspensión de las AgNPs en el agua desionizada, medio mineral y agua residual sintética, se observaron dos diferentes diámetros hidrodinámicos con un promedio de 172.1 ± 14.9 y 35.8 ± 5.2 nm con un porcentaje de intensidad de 84.7 ± 4.6 y $14.0 \pm 3.4\%$, respectivamente (Fig. 2.2A). La Figura 2.2B muestra un ejemplo del diámetro hidrodinámico a través del tiempo con agua residual sintética. No se observaron cambios significativos a lo largo del tiempo en ninguna de las condiciones probadas (resultados no mostrados), lo que sugiere que la agregación de las nanopartículas de plata no cambio a través del tiempo.

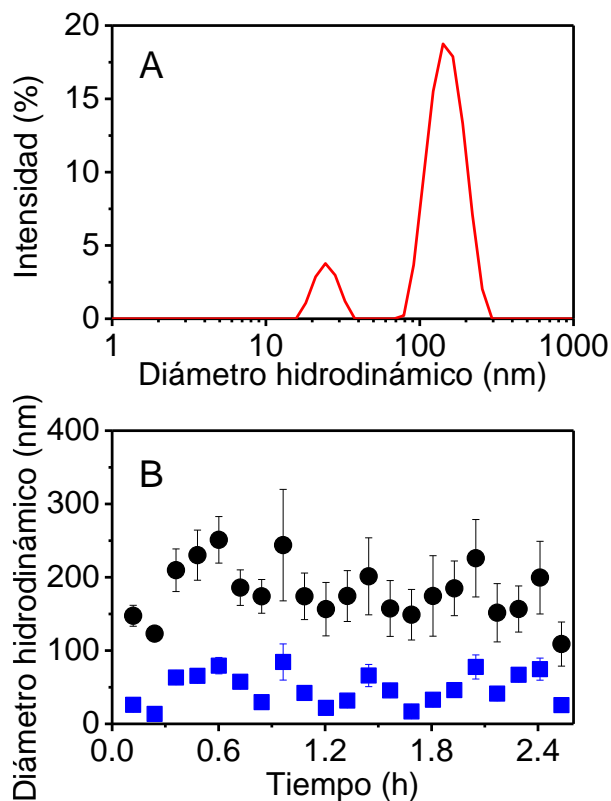


Figura 2.2 Distribución del tamaño de las nanopartículas (A) y la evolución temporal del diámetro hidrodinámico promedio (B), observados en una suspensión de AgNPs en agua residual sintética. Las barras de error muestran una desviación estándar.

La Tabla 2.3 muestra el diámetro hidrodinámico promedio observado para todas las condiciones probadas. En general, se observó que la composición del medio de cultivo tenía poco efecto sobre los diámetros hidrodinámicos. Cuando las AgNPs fueron suspendidas en agua desionizada, las AgNPs formaron agregados más grandes, aunque no siempre con diferencias significativas en comparación con las AgNPs en aguas residual sintética. Además fue observado que la sonicación no tuvo un efecto significativo en los dos diámetros hidrodinámicos observados, en los medios de suspensión evaluados. Esto sugiere que los agregados de las AgNPs son relativamente estables a través del tiempo y no sensibles a las fuerzas mecánicas externas. Lo anterior es contradictorio con los reportes previos que han mostrado que el tamaño de los agregados de las nanopartículas incrementa cuando aumenta el tiempo en la suspensión

(Li et al., 2010; Chen y Zhang, 2012; He et al., 2012) aunque estos reportes se realizaron en diferentes condiciones experimentales, incluyendo una escala de tiempo más pequeña y medios más simples.

Tabla 2.3. Diámetros de las nanopartículas promedio (nm ± DE) y la intensidad de las dos clases dominantes de partículas (% ± DE), por el análisis de DLS, sumergidas en medio mineral (MM), agua residual sintética conteniendo 50 mg DQO L⁻¹ (ARS), y agua desionizada (AD), antes y después de 10 min de sonicación. Las letras entre paréntesis representan los resultados de la prueba de Tukey–Kramer (TK) ($\alpha < 0.05$). Los valores con la misma letra en la misma columna no son significativamente diferentes. Todos los valores son el resultado de 22 mediciones en 2.5 h.

Sonicación	Medio	Tamaño I	Tamaño II
Yes	AD	191.3 ± 25.0 ^(C) ; 88.9 ± 5.1%	40.4 ± 17.3 ^(X,Y) ; 14.8 ± 3.8%
	MM	167.4 ± 17.4 ^(A,B,C) ; 88.4 ± 11.0%	35.6 ± 12.5 ^(X,Y) ; 10.8 ± 5.1%
	ARS	157.7 ± 18.7 ^(A,B) ; 87.1 ± 3.0%	30.0 ± 9.3 ^(Y) ; 11.5 ± 11.0%
No	AD	184.1 ± 29.9 ^(B,C) ; 83.2 ± 5.3%	40.0 ± 15.9 ^(X,Y) ; 14.8 ± 3.8%
	MM	153.8 ± 16.1 ^(A) ; 76.5 ± 11.3%	29.0 ± 18.3 ^(Y) ; 20.0 ± 11.1%
	ARS	177.9 ± 39.2 ^(B,C) ; 83.7 ± 4.4%	40.0 ± 23.9 ^(X) ; 12.2 ± 3.1%

La especiación teórica de las AgNPs es mostrada en la Tabla 2.4, expresada como el porcentaje de Ag acomplejada y Ag libres con respecto a la concentración total de Ag. El porcentaje de Ag libre incremento ligeramente de 28.8 a 30.3% cuando la concentración total de Ag incremento. El complejo dominante fue AgCl, que representa cerca del 63% del total de plata, con un ligero efecto cuando incrementa la concentración de la plata. Estos resultados son congruentes con la literatura, por ejemplo Zhang et al. (2018) mostró que el cloro tiene un importante rol en la secuestración, precipitación y liberación de la Ag en las AgNPs.

Tabla 2.4. Ag libre y acomplejado, expresado como un porcentaje de la concentración total de plata. Medio mineral, glicina y ácido glutámico una concentración de 25 mg de DQO L⁻¹ cada uno, pH 7,0, temperatura de 25 °C.

Especies	Ag total (mg L ⁻¹)			
	2	4	8	16
Ag ⁺	28.78%	28.99%	29.40%	30.25%
AgCl _(aq)	63.09%	62.95%	62.68%	62.12%
AgCl ₂ ⁻	7.08%	7.00%	6.84%	6.53%
AgSO ₄ ⁻	0.02%	0.02%	0.02%	0.02%
AgNH ₃ ⁺	0.81%	0.82%	0.83%	0.86%
Ag(NH ₃) ₂ ⁺	0.09%	0.09%	0.09%	0.09%
Ag-Glicina _(aq)	0.05%	0.05%	0.05%	0.05%
Ag-Glutamato ⁻	0.08%	0.08%	0.08%	0.09%

El proceso de lodos activados fue operado durante 1 año antes de realizar los ensayos respirométricos. La eficiencia promedio de remoción de DQO fue $90 \pm 2\%$, La concentración de biomasa suspendida fue mantenida en 559 ± 35 mg DQO L⁻¹, la cual corresponde a 375 ± 23 mg SSV L⁻¹. Durante la operación del proceso de lodos activados, la conversión de DQO a SSV fue 1.49 ± 0.15 g DQO g⁻¹ SSV. Experimentos respirométricos preliminares fueron conducidos con la finalidad de establecer un rango conveniente de concentraciones de AgNPs a utilizar en los siguientes experimentos. Ejemplos de respirógramas observados durante estos experimentos preliminares son mostrados en la Figura 2.3, estos experimentos mostraron que un rango conveniente es de 0 a 16 mg L⁻¹ de AgNPs, porque causa una inhibición importante del proceso de los activados pero no total.

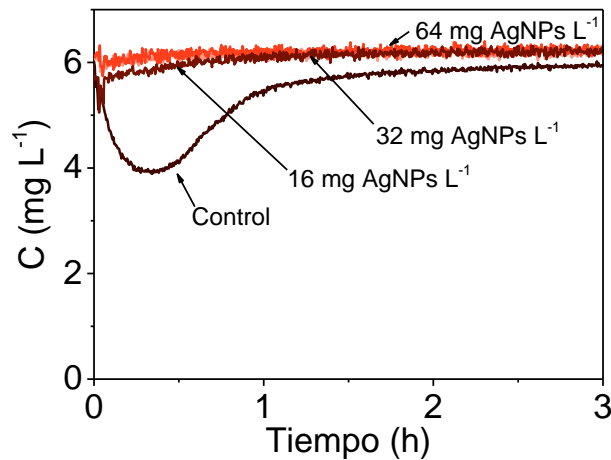


Figura 2.3 Ejemplos de respirogramas en los ensayos preliminares, después de la inyección de una concentración de 50 mg DQO L⁻¹ de sustrato con 0, 16, 32 y 64 mg L⁻¹ de nanopartículas de plata.

La Figura 2.4 muestra un ejemplo de perfiles de OUR_{ex} , observadas después de la inyección de un pulso de sustrato de 50 mg DQO L⁻¹ en la presencia de concentraciones crecientes de AgNPs. En todos los casos OUR_{ex} incrementa rápidamente después de la adición del pulso de sustrato hasta alcanzar un valor máximo, correspondiente a la OUR_{max} observada ($OUR'_{obs,max}$). Después de alcanzar el máximo, OUR_{ex} lentamente retorna a la línea base inicial, que corresponde a la respiración endógena. En todos los casos la concentración de AgNPs tiene un claro efecto inhibitorio, lo que resulta en respirogramas aplanados, así como también en la disminución de los valores de $OUR'_{obs,max}$. Sorprendentemente, a una concentración de 4 mg L⁻¹ de AgNPs fue observado una meseta en los respirogramas después de alcanzar la $OUR'_{obs,max}$. Esta meseta fue observada en las tres réplicas de 5 concentraciones de pulsos de sustrato ensayadas, descartando errores por los instrumentos experimentales. Por una razón desconocida, la meseta nunca se observó en ninguna otra concentración de AgNPs. Vale la pena mencionar que a las concentraciones más altas de AgNP probadas, la Figura 2.4 muestra

valores negativos de OUR_{ex} , al final del pulso. Estos valores negativos de OUR_{ex} se explican por el hecho de que los AgNPs tienen un efecto inhibitorio sobre la respiración endógena, lo que resulta en un aumento de la concentración final de OD en la línea de base, en comparación con la línea base inicial. La diferencia entre las líneas base inicial y final se explotó para determinar la inhibición en la respiración endógena, como se describirá posteriormente.

La disminución observada en $OUR'_{obs,max}$ en presencia de AgNPs permitió la determinación de $I\%$. La figura 2.5 muestra $I\%$ en función de la concentración de AgNPs, que presenta un patrón asintótico, como se describió previamente por Liu et al. (2011) en un lodo nitrificante expuesto a nanopartículas de ZnO y por Michels et al. (2017) en un cultivo de lodo nitrificante expuesto a AgNPs. Dentro del rango de concentración de AgNP probado, el mayor $I\%$ observado fue del 95%. Este último resultado concuerda con una inhibición máxima del 95% reportada por Liu et al. (2011) con nanopartículas de ZnO en un lodo nitrificante y también está de acuerdo con Giao et al. (2012), quienes reportaron una inhibición máxima del 50% en un cultivo axénico nitrificante expuesto a AgNPs. De los resultados presentados en la Figura 2.5, la IC_{50} fue de $3.32 \pm 0.16 \text{ mg L}^{-1}$, que está dentro del rango reportado en la literatura (Tabla 2.1).

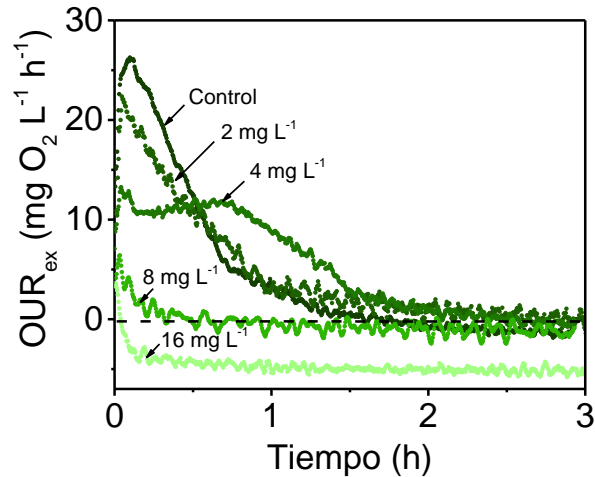


Figura 2.4 Ejemplos de perfiles de OUR_{ex} después de la inyección de una concentración de sustrato (50 mg COD L^{-1}) en presencia de concentraciones crecientes de AgNPs ($1\text{-}16 \text{ mg L}^{-1}$).

Como se muestra en la Figura 2.4, a la concentración más alta de AgNPs probada, se observó un cambio sustancial en la línea base OD antes y después de la inyección de pulso. Esto refleja un cambio en la tasa de respiración endógena (Ecuación 3) y es un fuerte indicador de que los AgNPs causaron la muerte de la biomasa o la inhibición irreversible de una fracción significativa de la comunidad microbiana presente en los lodos activados. Este efecto inhibitor se cuantificó a través de $I\%_{obH}$ en función de la concentración de AgNPs, con un patrón asintótico tal como el observado con $I\%$ (Fig. 2.5), y la IC_{50} para la respiración endógena fue de $7.12 \pm 0.11 \text{ mg L}^{-1}$. Hasta donde sabemos, este es el primer reporte sobre los efectos de las nanopartículas sobre la tasa de respiración endógena de un cultivo microbiano.

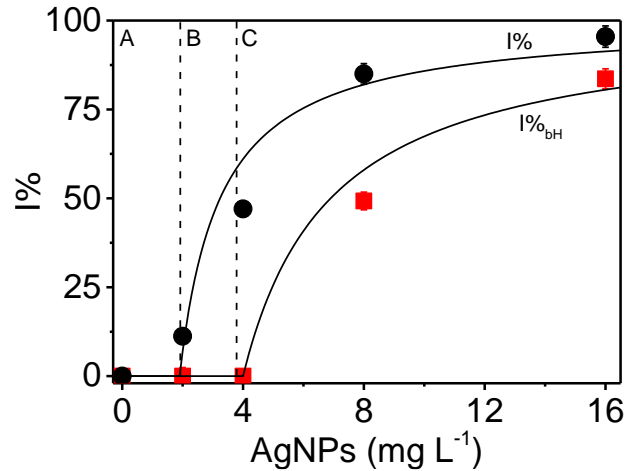


Figura 2.5 Efecto de la concentración de AgNPs en $I\%$ (●) e $I\%_{bh}$ (■). Se pueden denotar tres zonas; (A) sin inhibición, (B) inhibición de la respiración exógena solamente y (C) inhibición de la respiración tanto exógena como endógena ($n_{rep} = 4$). Las líneas oscuras muestran el mejor ajuste del modelo (Ecuación 8 y 9), y las barras de error representan una desviación estándar.

De la Figura 2.5, se pueden distinguir tres zonas: (A) sin inhibición, (B) inhibición de la respiración exógena únicamente y (C) inhibición de la respiración exógena como endógena. Encontramos que un modelo asintótico describía correctamente tanto $I\%$ (Ecuación 8) como $I\%_{bh}$ (Ecuación 9). Donde I_c e I_{cbH} son la concentración mínima de AgNPs a la que se observa un efecto inhibitor exógeno o endógeno, respectivamente; y K_I y K_{IbH} son la constante de inhibición de las velocidades de respiración exógena y endógena, respectivamente. La Tabla 2.5 muestra los valores de I_c , I_{cbH} , K_I y K_{IbH} . Los valores de I_c e I_{cbH} fueron significativamente más altos que el rango de concentraciones de AgNPs actualmente encontradas en aguas residuales, es decir, 10 ng L^{-1} a 0.1 mg L^{-1} (Gottschalk et al., 2013), pero similar a la concentración encontrada en algunos sectores específicos, como las fábricas textiles, donde se han sugerido concentraciones de hasta 1.3 mg L^{-1} (Brar et al., 2010). Por lo tanto, la inhibición de aguas residuales por AgNPs probablemente no sea una amenaza inmediata para los procesos de aguas residuales, excepto en algunos casos específicos, pero podría convertirse

en una preocupación en el futuro ya que la producción y el uso de AgNPs está aumentando exponencialmente.

$$I\% = 0 \quad \text{for } I < I_C$$

$$I\% = \frac{I - I_C}{(I - I_C) + K_I} \cdot 100 \quad \text{for } I \geq I_C \quad (8)$$

$$I\%_{bH} = 0 \quad \text{for } I < I_{CbH}$$

$$I\%_{bH} = \frac{I - I_{CbH}}{(I - I_{CbH}) + K_{IbH}} \cdot 100 \quad \text{for } I \geq I_{CbH} \quad (9)$$

Tabla 2.5 Parámetros cinéticos estimados por el modelo propuesto para AgNPs (Ecuación 8 y 9). DE (Desviación estándar).

Parámetros	valores ±DE
I _C (mg L ⁻¹)	1.90 ± 0.13
I _{CbH} (mg L ⁻¹)	4.00 ± 0.65
K _I (mg L ⁻¹)	1.34 ± 0.02
K _{IbH} (mg L ⁻¹)	2.90 ± 0.30

Cuando se usaron pulsos de concentración creciente, $OUR'_{obs,max}$ vs. Sp se ajustó adecuadamente con el modelo Monod (promedio de $R^2 = 0.97 \pm 0.02$, $n = 20$) y se determinaron OUR'_{max} y $K's$. La Figura 2.6 muestra los valores de OUR'_{max} y $K's$ en función de la concentración de AgNPs. OUR'_{max} fue observada en un rango de 0.0005-0.019 mg O₂ mg DQO⁻¹ h⁻¹, que está dentro del rango previamente reportado por Esquivel-Rios et al. (2014) en un lodo activado alimentado con la misma agua residual sintética. $K's$ fue observada en un rango de 0.24-19.1 mg DQO L⁻¹ y fue similar los valores reportados por Insel et al. (2006) en un lodo activado alimentado con

agua residual sintética. El incremento en la concentración de AgNPs provocó una disminución tanto en OUR'_{max} como en K'_S , que es un indicador de que la inhibición que presentan las AgNPs es del tipo acompetitivo, es decir, cuando el inhibidor que se une al complejo enzima-sustrato (Dunn et al., 2003). Sin embargo, el modelo acompetitivo clásico solo ajustó correctamente a los valores máximos de OUR'_{max} (Ecuación 10, $R^2 = 0.95 \pm 0.01$, $n = 4$), donde K'_I es una constante de inhibición. Los valores de K'_S se describieron mejor mediante el modelo lineal (Ecuación 11, $R^2 = 0.96 \pm 0.001$, $n = 4$), donde K''_I es una constante.

$$OUR'_{max} = OUR_{max} \cdot \frac{K'_I}{K'_I + I} \quad (10)$$

$$K'_S = K_S \cdot I + K''_I \quad (11)$$

La Figura 2.6 muestra $I\%$ e $I\%_{obH}$ como una función de S_0/X_0 , con un comportamiento asintótico. Entre S_0 y X_0 , este último fue el parámetro que tuvo un efecto principal sobre la inhibición. Al aumentar X_0 a una S_0 constante, se observó una disminución significativa en $I\%$ e $I\%_{obH}$, mientras que no se observó efecto en $I\%$ e $I\%_{obH}$ cuando se incrementó S_0 y se mantuvo constante X_0 ($\alpha < 0.05$). Un efecto similar de X_0 en $I\%$ se reportado previamente en aguas residuales expuestas a metales pesados (Stasinakis et al., 2003; Vaňková et al., 1999) y fue explicado por el hecho de que los compuestos tóxicos se pueden absorber en mayor medida en presencia de una mayor concentración de biomasa, lo que resulta en una menor disponibilidad del inhibidor (Stasinakis et al., 2003; Hu et al., 2012). Hasta donde tenemos conocimiento, esta es la primera vez que es reportado el efecto de S_0/X_0 sobre la inhibición por nanopartículas.

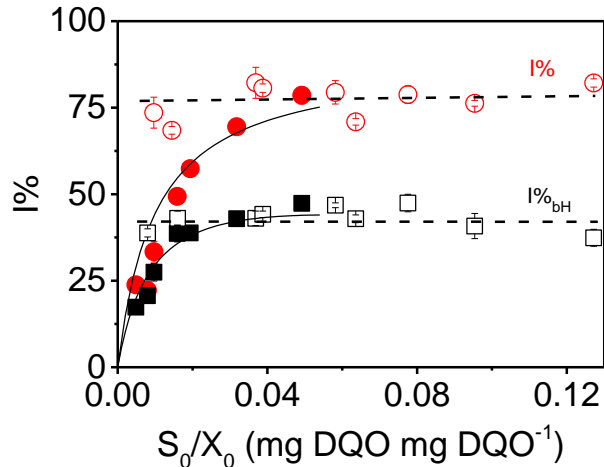


Figura 2.6 Efecto de la relación S_0/X_0 en $I\%$ e $I\%_{bh}$; los símbolos rellenos denotan los resultados obtenidos cuando S_0 fue constante, mientras que los símbolos claros denotan los resultados obtenidos cuando X_0 fue constante ($n_{rep} = 3$). Las líneas continuas y discontinuas muestran el mejor ajuste al modelo, y las barras de error representan una desviación estándar.

Finalmente, el efecto del tiempo de exposición se probó en el sistema de microrreactores, con una concentración de biomasa de $1348 \text{ mg COD L}^{-1}$ ($905 \text{ mg VSS L}^{-1}$). Se inyectó una concentración de AgNPs de 4, 8 o 16 mg de L^{-1} en los microrreactores, y después de un tiempo transcurrido entre 0 a 8 h se inyectó un pulso de sustrato a $50 \text{ mg de DQO L}^{-1}$. Los resultados de ese experimento se muestran en la Figura 2.7. En todas las concentraciones de AgNPs probadas, se observó una disminución asintótica en la inhibición durante el tiempo de exposición. A la concentración más baja de AgNPs probada, se observó una pérdida total del efecto inhibitor después de 8 h de exposición de las AgNPs. En el caso de concentraciones de AgNPs de 8 y $16 \text{ mg de AgNPs L}^{-1}$, $I\%$ disminuyó de $90 \pm 1.6\%$ a $43.5 \pm 1.2\%$ y de $97 \pm 1.8\%$ a $72.8 \pm 2\%$ después de 8 h de exposición, respectivamente. La disminución en $I\%$ a lo largo del tiempo puede explicarse por el hecho de que los AgNPs se pueden acumular en la biomasa de lodo activado a través de los compuestos poliméricos extracelulares que se forman comúnmente en presencia de sustancias tóxicas con fines de protección (Geyik y Çeçen, 2016; Sheng et al., 2011). Otra explicación puede ser que los AgNPs interactúan con diferentes ligandos que están

presentes en el agua residual sintética (como los iones Cl^- , PO_4^- , S^-), que forman complejos con la plata y que están sujetos a la precipitación (Zhang et al., 2016). El efecto del tiempo de exposición en $I\%$ se modeló bien mediante un modelo de inhibición acompetitivo modificado (Ec. 12), donde I_{max} es el porcentaje máximo de inhibición, t es el tiempo de exposición, y K_1 y K_2 son constantes.

$$I\% = I_{max} \cdot \frac{K_1}{K_1+t} \cdot \frac{K_2+t}{K_2} \quad (12)$$

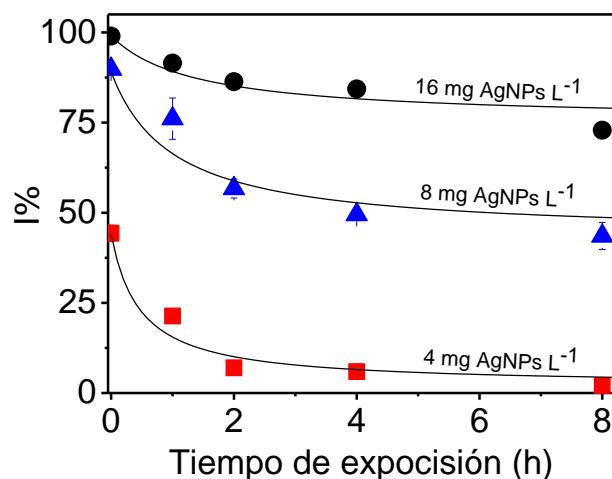


Figura 2.7 Influencia del tiempo de exposición en la inhibición del lodo activado causado por AgNPs ($n_{rep} = 3$). Las barras de error representan una desviación estándar, las líneas oscuras muestran el mejor ajuste de modelo. (Eq. 12); 16 mg L⁻¹ AgNPs, $I_{max} = 99\%$, $K_1 = 1.38$, $K_2 = 1.81$; 8 mg L⁻¹ AgNPs, $I_{max} = 89\%$, $K_1 = 1.00$, $K_2 = 2.05$; 4 mg L⁻¹ AgNPs, $I_{max} = 44\%$, $K_1 = 0.47$, $K_2 = 9.95$.

2.4 Conclusiones.

El método microrrespirométrico se aplicó con éxito para determinar el efecto inhibitorio de los AgNPs en un proceso modelo de lodos activados. El método se aplicó a un gran número de condiciones experimentales, lo que permitió la determinación de varios parámetros clave,

incluidos OUR_{max} , K_S y K_I . El efecto inhibitor de los AgNPs se cuantificó mediante la determinación de $I\%$ y, por primera vez de $I\%_{bbH}$, y se propuso un modelo que describía el efecto inhibitor. Los parámetros cinéticos mostraron que los AgNPs ejercen una inhibición acompetitiva sobre el proceso de lodo activado. La relación S_0/X_0 mostró que un aumento en la concentración de biomasa se correlacionó con una disminución en el efecto inhibitor causado por los AgNPs en el proceso de lodos activados y se determinó que el aumento de la exposición a los AgNPs condujo a una disminución en el efecto tóxico en el proceso de lodos activos. En general, los resultados muestran que los efectos inhibidores de los AgNPs sobre el lodo activado deben verse como una matriz compleja que involucra muchos parámetros que generan respuestas únicas para cada planta de tratamiento de aguas residuales y para cada condición operativa. Sin embargo, se puede concluir que una concentración relativamente alta de biomasa, así como los largos tiempos de exposición son las mejores condiciones para asegurar una mayor resistencia microbiana a la toxicidad de los AgNPs

CAPÍTULO 3.

DETERMINACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO A CORTO PLAZO DE NÍQUEL, CADMIO Y COBALTO EN UN PROCESO DE LODOS ACTIVADOS POR MICRORRESPIROMETRÍA.

Este capítulo ha sido publicado como:

Hernandez-Martinez G.R., Ortiz-Alvarez D., Perez-Roa M., Urbina-Suarez N.A., Thalasso F. (2018). Multiparameter analysis of activated sludge inhibition by nickel, cadmium, and cobalt. *Journal of Hazardous Materials*, 351, 63-70.

3.1 Introducción.

El proceso de lodos activados es a menudo inhibido por metales pesados como: níquel (Ni), cadmio (Cd) y cobalto (Co). Por ejemplo, Ni es encontrado en los efluentes de varias industrias, incluyendo recubrimiento de bobinas, fabricación de cobre, fabricación de componentes eléctricos y electrónicos, procesamiento de hierro y acero así como la galvanoplastia, donde su concentración pueden alcanzar hasta 2950 mg L^{-1} (Çeçen *et al.*, 2010). Grandes cantidades de Cd se descargan de una amplia gama de actividades industriales, incluidas la minería, la combustión de combustibles fósiles o la producción y el uso de baterías (Boparai *et al.*, 2013; Chaudhuri *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2014). El Co es también encontrado en los efluentes de muchas industrias incluidas las industrias de galvanoplastia, metalúrgica, minería, pigmentos, pintura, y electrónica, así como en las plantas de energía nuclear (Manohar *et al.*, 2006). El tratamiento de aguas residuales municipales e industriales se realiza ampliamente a través de procesos de lodos activados (Wang *et al.*, 2013), de tal manera que Ni, Cd y Co podrían potencialmente afectar los agregados bacterianos y otros microorganismos asociados que participan en este proceso (Sun *et al.*, 2017). Los efectos de estos metales pesados ha sido previamente estudiados y la toxicidad, en lodos activados, ha sido previamente establecida (Tabla 3.1), principalmente a través de la determinación de la concentración que causa un 50% de inhibición (IC_{50}). Para Ni se ha reportado una IC_{50} promedio de $89.5 \pm 71.0 \text{ mg L}^{-1}$, que afecta al lodo activado, mientras la IC_{50} para Cd y Co se ha reportado que es 283.6 ± 603.1 y $113.5 \pm 57.2 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente.

Tabla 3.1 Reportes previos de valores de IC_{50} ($mg L^{-1}$) para Ni, Cd y Co en procesos de lodos activados con diferentes sustratos, y determinados por varios métodos. R, respirometría; EA, actividad enzimática. NR, no reportado.

Metal pesado	Sustrato	IC_{50}	Método	Referencia
Ni	Acetato de sodio	38	R	Anderson et al. 1988
	Acetato de sodio	190	EA	Anderson et al. 1988
	Peptona–Extracto de carne	33	R	Cokgor et al. 2007
	Glucosa	180	R	Cokgor et al. 2007
	Almidón–Ácido acético	145	R	Cokgor et al. 2007
	Acetato de sodio	21	R	Wong et al. 1997
	NR	76	R	Kelly et al. 2004
	Peptona–Extracto de carne	33	R	Insel et al. 2006
Cd	Acetato de sodio	14	R/EA	Anderson et al. 1988
	Triptona	48	R	El Bestawy et al. 2013a
	Triptona	40	EA	Elnabarawy et al. 1988
	NR	39	R	Kelly et al. 2004
	NR	19	R	Elnabarawy et al. 1988
	NR	1755	EA	Zare et al. 2015
	Triptona	320	EA	El Bestawy et al. 2013b
	Peptona–Extracto de carne	34	R	Gutiérrez et al. 2002

	Triptona	178	R	El Bestawy et al. 2013a
Co	Triptona	88	EA	El Bestawy et al. 2013a
	NR	48	R	Elnabarawy et al. 1988
	Triptona	140	EA	El Bestawy et al. 2013b

La gran variación en la IC_{50} reportada previamente es probablemente causada por el gran número de factores que afectan la toxicidad de los metales pesados. De hecho, la toxicidad de los metales pesados en el proceso de lodos activados depende muchos factores. Estos factores incluyen la naturaleza y la concentración de los metales pesados (El Bestawy et al., 2013; Ong et al., 2004; Malamis et al., 2012), la concentración de biomasa (Cokgor et al., 2007; Vanková et al., 1999; Esquivel-Rios et al., 2014), el tipo de microorganismo (Gikas y Romanos, 2006; Madoni y Romeo, 2006; Ochoa-Herrera et al., 2011) y el tiempo de exposición (Xiao-Hong et al., 2011). Sin embargo, el pH (Van Nostrand et al., 2005; Smolyakov et al., 2010) de los metales pesados y sus interacciones con otros iones metálicos (Gikas, 2007) y no metálicos (Pai et al., 2009), el cual afecta su especiación (Vanková et al., 1999; Çeçen et al., 2010; Çeçen y Kılı, 2015), también afecta su toxicidad. Además, la toxicidad de los metales pesados en los lodos activados de los procesos de tratamiento de aguas residuales también depende de las condiciones operativas del proceso, la composición del agua residual, la concentración y la edad de la biomasa, así como de la aclimatación relativa de los lodos activados (Kelly et al. 2004; El Bestawy et al., 2014; Madoni et al., 2006).

Dado el gran número de parámetros y factores que afectan la toxicidad de los metales pesados, su efecto inhibitorio debe de ser cuantificado con métodos que permitan explotar un amplio rango de condiciones experimentales. La microrrespirometría, la cual es basada en la medición

de la velocidad del consumo de oxígeno bajo condiciones bien definidas (Spanjers et al., 1999) en microrreactores, es un método para la evaluación simultánea de un gran número de muestras y condiciones. En particular, la microrrespirometría de pulsos, la cual combina la microrrespirometría con la inyección un pulso de sustrato al cultivo microbiano, se ha sugerido como un método de alto rendimiento (Esquivel-Rios et al., 2014; Ramirez-Vargas et al., 2014). Comparado con los respirómetros estándar, las principales características del método de microrrespirometría de pulsos son: (i) una producción de datos alto rendimiento, multiplicando el número de réplicas en un experimento simple, (ii) un requerimiento de volumen de la muestra limite como resultado del pequeño volumen de los microrreactores, es decir, en un rango de mililitros, y (iii) relativamente pequeño error en las mediciones de oxígeno disuelto (OD) por la razón que la señal/ruido de los sensores de oxígeno disuelto son relativamente altos e independientes de la concentración de oxígeno disuelto. Esta última característica permite la medición de pequeñas variaciones de OD con la misma precisión, en todo el rango de OD, de 0 a 100% de variación. Al mejor de nuestro conocimiento, se ha utilizado la microrrespirometría de pulsos para la determinación de los parámetros cinéticos solamente para evaluar el efecto de cobre y zinc sobre lodos activados (Esquivel-Rios et al., 2014) y para caracterizar gránulos aerobios degradando 4-clorofenol (Vital-Jacome et al., 2016).

En el presente trabajo se evaluó el efecto inhibitorio de Ni, Cd y Co sobre un proceso modelo de lodos activados. El objetivo de nuestro trabajo fue no solo reportar valores adicionales de IC_{50} , sino realizar un análisis multiparámetro del efecto de estos metales pesados sobre los parámetros cinéticos y estequiométricos del lodo activado en una amplia gama de condiciones experimentales, incluido el tipo de metales pesados, concentración de sustrato y biomasa, y el tiempo de exposición.

3.2 Materiales y Métodos.

3.2.1 Reactor de lodos activados.

Se montó un reactor de lodos activados en una columna de burbuja alimentado con agua residual sintética (diámetro = 0.12 m, altura = 0.66 m, y volumen de trabajo = 6 L). El reactor fue inoculado con 1 L de lodo obtenido de una planta municipal convencional de tratamiento de aguas residuales (planta de tratamiento urbana de aguas residuales, Ticoman, México) y fue mantenido en condiciones estables durante 6 meses antes de realizar los ensayos respirométricos. El reactor fue aireado a velocidad flujo constante de 6 L min^{-1} a través de un difusor poroso (diámetro = 0.09 m) localizado en el fondo del reactor. El reactor fue alimentado continuamente con agua residual sintética que contenía (mg L^{-1}); K_2HPO_4 , 148; NaCl , 37.3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10.6; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 21.2; Urea, 159; Extracto de carne, 585; Peptona, 851. El medio fue alimentado con una bomba peristáltica (Masterflex L/S precisión, Cole-Parmer) con un flujo constante de 0.125 L h^{-1} (tiempo de residencia hidráulico (θ) de 48 h), mientras que el efluente fue evacuado a través de una salida fija y fue desechado. La velocidad de carga volumétrica correspondiente, expresada en demanda química de oxígeno (DQO), fue de $708.4 \text{ mg DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. El pH se mantuvo a 7.0 ± 0.3 mediante la adición de $2\text{M H}_3\text{PO}_4$. El reactor fue mantenido a temperatura ambiente en un cuarto cerrado ($21 \pm 2^\circ\text{C}$).

3.2.2 Métodos analíticos.

La demanda química de oxígeno (DQO), que es el parámetro más utilizado para estimar el contenido orgánico en las aguas residuales, se utilizó para estimar la concentración de sustrato y biomasa. El método de DQO seleccionado fue colorimetría de flujo cerrada, de acuerdo con

los métodos estándar (APHA, 1999). La DQO total se determinó a partir de una muestra homogénea del licor mixto. La DQO soluble se determinó a partir de una muestra centrifugada (5900 g por 15 min; modelo 5810 R, Eppendorf, México) y filtrada (0.45 μm). La DQO insoluble fue calculada como la diferencia de la DQO total y soluble. El medio de cultivo no contiene sólidos por lo que la DQO insoluble fue considerada como la concentración de biomasa (X), mientras que la DQO soluble fue considerada como la concentración de sustrato. A lo largo de toda la operación del reactor la concentración de biomasa también fue cuantificada a través de los sólidos suspendidos volátiles (*SSV*), de acuerdo con los métodos estándar (APHA, 1999).

3.2.3 Preparación de la muestras de metales pesados y biomasa.

Antes de los ensayos respirométricos, soluciones madre de Ni, Cd y Co fueron preparadas disolviendo $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, y $\text{CdCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en agua desionizada. Estas soluciones madres, se diluyeron para obtener las concentraciones requeridas, fueron utilizadas en todos los experimentos respirométricos. Todos los reactivos fueron grado analítico (Sigma-Aldrich, México). Antes de los ensayos respirométricos, una solución madre de biomasa fue preparada. Esta solución madre de biomasa fue preparada tomando un muestra del reactor de columna de burbuja y centrifugando a 5900 g por 15 min (modelo 5810 R, Eppendorf, México) y resuspendiendo en medio fresco sin fuente de carbono, para garantizar la ausencia de cualquier concentración de sustrato residual. La solución madre de biomasa fue diluida para obtener diferentes concentraciones de biomasa (Tabla 3.2).

3.2.4 Sistema de microrreactores.

El sistema de microrreactores utilizado para los ensayos mirorrespirométricos fue un sistema de 24 microrreactores con un diámetro de 16 mm y 18 mm de profundidad cada uno (24-microplate

system, PreSens, Applikon, México) previamente descrito por Esquivel-Rios et al. (2014). Cada microrreactor contiene un sensor de oxígeno disuelto precalibrado fluorométricamente (OxoDish, PreSens, México). La adquisición de datos de oxígeno disuelto fue cada 4 min^{-1} a través del software PreSens (SDR-v37). La transferencia de oxígeno en los microrreactores fue lograda por aireación superficial. Para mejorar el mezclado y la transferencia de masa en los microrreactores se adiciono una perla de vidrio (diámetro = 5 mm) en cada microrreactor. El sistema de microrreactores fueron mantenidos a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ y 100 rpm en un agitador orbital (Ecotron Infors HT, Switzerland).

3.2.5 Experimentos respirométricos de inhibición.

Los experimentos de inhibición fueron realizados por respirometría dinámica de pulsos, en la cual el OD es medido después de la adición de una concentración conocida de sustrato, es decir, una concentración de agua residual sintética. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en respirómetros estándar. (Ordaz et al., 2008; Oliveira et al., 2011) y más recientemente utilizada en un sistema de microrreactores por Esquivel-Rios et al. (2014). Brevemente el método consiste en los siguientes pasos; (i) cada microrreactor fue llenado con 1.4 ml de deseada concentración de biomasa sin fuente de carbono; (ii) el sistema de microrreactores fue cerrado y puesto en el agitador orbital para garantizar aireación superficial en el sistema; (iii) la adquisición de datos fue encendida y fue mantenida hasta alcanzar lecturas estables de la concentración de OD, que corresponde a la respiración endógena de los microorganismos (Spanjers y Vanrolleghem, 1995); (iv) la agitación fue parada cerca de 1 min, durante el cual el microrreactor fue abierto y se inyectó 0.1 ml de agua residual sintética concentrada conteniendo una deseada concentración de metal pesado; (v) el microrreactor fue cerrado de nuevo y puesto en agitación orbital para

garantizar una medición continua del OD; (vi) la presencia de sustrato causa un decremento de la concentración de OD, proporcional al sustrato añadido; y (vii) después de que el sustrato fue consumido, la concentración de OD lentamente retorna al estado estacionario observado antes de la inyección del agua residual sintética. El contenido del microrreactor fue descartado después de cada experimento de pulso, excepto cuando se evaluó el efecto del tiempo de exposición (ver la siguiente sección). Todos los experimentos respirométricos fueron realizados con réplicas de 3 a 6 experimentos y siempre se incluyó triplicado de los experimentos controles, es decir, experimentos sin metales pesados. Las condiciones experimentales para cada conjunto de experimentos es mostrada en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Condiciones experimentales para cada conjunto de ensayos respirométricos.

1. Efecto de los metales pesados	Biomasa (mg DQO L ⁻¹): 1050 Sustrato (mg DQO L ⁻¹): 64 Metal pesado (mg L ⁻¹): 0, 1, 5, 10, 20, 40 Tiempo de exposición (h): 0
2. Efecto de la biomasa	Biomasa (mg DQO L ⁻¹): 612, 1150, 1695, 2378, 4416 Sustrato (mg DQO L ⁻¹): 64 Metal pesado (mg L ⁻¹): 40 Tiempo de exposición (h): 0
3. Efecto del sustrato	Biomasa (mg DQO L ⁻¹): 1165 Sustrato (mg DQO L ⁻¹): 0, 8, 16, 30, 64, 120, 200 Metal pesado (mg L ⁻¹): 40 Tiempo de exposición (h): 0
4. Efecto del tiempo de exposición	Biomasa (mg DQO L ⁻¹): 1026 Sustrato (mg DQO L ⁻¹): 32 Metal pesado (mg L ⁻¹): 40 Tiempo de exposición (h): 0, 0.5, 1, 2, 4

3.2.6 Efecto del tiempo de exposición.

Para investigar el efecto del tiempo de exposición sobre el efecto inhibitorio de los metales pesados, soluciones de metales pesados (sin sustrato) de 40 mg L⁻¹ fueron inyectadas dentro de

cada microrreactor. Después de un tiempo de retardo que varió de 0 a 4 h, se inyectó un único pulso de sustrato de 32 mg DQO L⁻¹ en cada microrreactor. De igual manera, los experimentos control (sin ningún metal pesado) se realizaron con los mismos tiempos de retrasos (Tabla 3.2).

3.2.6 Especiación de los metales pesados.

La especiación de los metales pesados fue calculada teóricamente usando un software de equilibrio químico (Gustafsson, 2013). Esta especiación teórica fue llevada a cabo considerando el pH, la concentración de los metales pesados utilizados en cada ensayo, así como también la concentración de aniones y cationes presentes en el agua residual sintética. El software utilizado no incluye los datos termodinámicos de la peptona y el extracto de carne, los cuales son los principales componentes en el agua residual sintética. Por lo tanto, estos componentes proteínicos fueron considerados como una mezcla de glicina y ácido glutámico, en proporciones iguales, a la misma concentración que la peptona y el extracto de carne en el agua residual sintética, expresados en DQO. Esta estrategia ha sido previamente reportada para estimar la especiación de Zn y Cr⁶⁺ en aguas residuales (Friedrichs et al., 2017).

3.2.7 Interpretación de datos.

El efecto de los metales pesados sobre el proceso de tratamiento de aguas residuales fue cuantificado por la velocidad específica de consumo de oxígeno máxima, la cual es la velocidad de respiración por unidad de concentración de biomasa y tiempo (*OUR*; mg O₂ mg DQO⁻¹ h⁻¹). Como se menciona más adelante en la sección de resultados y discusión, el proceso de lodos activados es descrito por un modelo cinético de Monod (Ec. 1):

$$OUR = OUR_{max} \cdot \frac{S}{K_S + S} \quad (1)$$

Donde OUR_{max} (mg O₂ mg DQO⁻¹ h⁻¹) es la OUR máxima, S es el sustrato (agua residual sintética) y K_S (mg DQO L⁻¹) es la constante de afinidad por el sustrato, observada en ausencia de los metales pesados. En presencia de los metales pesados, la OUR_{max} (OUR'_{max}) aparente y K_S aparente (K'_S) fueron recuperados de la OUR observada (OUR_{obs}), usando el mismo modelo de Monod (Ec. 2):

$$OUR_{obs} = OUR'_{max} \cdot \frac{S}{K'_S + S} \quad (2)$$

Para recuperar los valores de OUR'_{max} y K'_S , el método utilizado fue basado en la inyección pulsos de concentración creciente. Este método ha sido exhaustivamente descrito (Ramirez-Vargas et al., 2013; Ordaz et al., 2012). Brevemente, inyectamos simultáneamente y en microrreactores separados, 6 diferentes concentraciones de pulsos (S_p), cada uno con al menos 3 diferentes replicas. A continuación, de cada respirograma, registramos la OUR'_{max} observada ($OUR'_{obs,max}$), es decir, la OUR correspondiente al C mínimo observado. Entonces, graficamos $OUR'_{obs,max}$ contra la concentración de sustrato en el pulso. Las gráficas resultantes muestran un comportamiento tipo Monod que fue usado para estimar OUR'_{max} y K'_S con el método de Runge-Kutta usando la optimización de Levenberg-Marquardt (Matlab R2012b software, USA). La bondad de ajuste fue estimada por el coeficiente de correlación (R^2). Además de los parámetros cinéticos determinados, el efecto inhibitor de los metales pesados se cuantifico a través del porcentaje de inhibición ($I\%$). Este parámetro se determinó a partir de la OUR'_{max} máxima observada (en presencia y ausencia del inhibidor) de acuerdo a la Ecuación 3:

$$I\% = \frac{OUR'_{CTL,max} - OUR'_{obs,max}}{OUR'_{CTL,max}} \cdot 100 \quad (3)$$

Donde $OUR'_{CTL,max}$ es la OUR'_{max} observada en ausencia de los metales pesados (experimentos control).

3.2.9 Análisis estadístico.

Las diferencias de significativas entre los parámetros fue calculado utilizando la prueba de comparación múltiple (TK) de Tukey-Kramer, que se realizó después del análisis de varianza ($\alpha < 0.05$) usando OriginPro 8 SR0 v8.0724 (OriginLab, Northampton, MA, USA).

3.3 Resultados y discusión

El proceso de lodos activados fue operado durante 6 meses antes de realizar los ensayos respirométricos (Figura 3.1). La eficiencia de remoción de DQO promedio fue $91 \pm 2\%$, que corresponde a una velocidad de remoción volumétrica de $644.8 \text{ mg DQO L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. La concentración de biomasa suspendida fue mantenida en $559 \pm 35 \text{ mg DQO L}^{-1}$. Durante la operación del proceso de lodos activados, la conversión de DQO a SSV fue $1.49 \pm 0.15 \text{ g DQO g}^{-1} \text{ SSV}$.

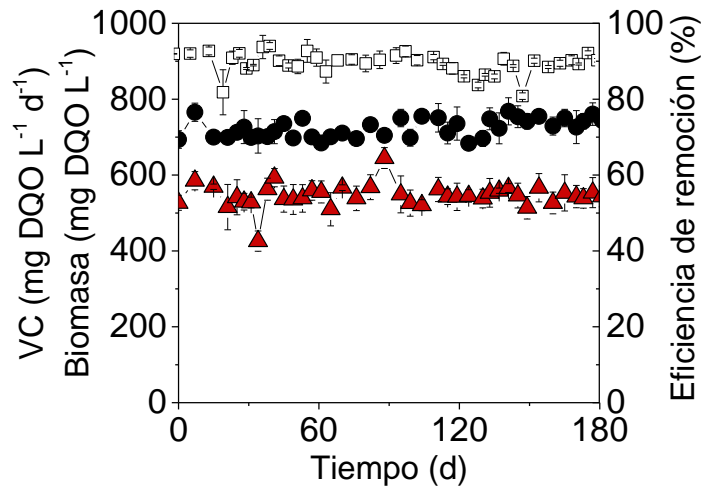


Figura 3.1 Eficiencia de remoción de DQO (\square), velocidad de carga orgánica (VC, \bullet) y concentración de biomasa (\blacktriangle) observado en el proceso modelo de lodos activados antes de los ensayos respirométricos.

Experimentos respirométricos preliminares fueron realizados para determinar la concentración de metales pesados ($0-200 \text{ mg L}^{-1}$ para los tres metales pesados) que causa una inhibición significativa. Durante estos experimentos preliminares, no fue observado una inhibición completa pero un claro efecto inhibitorio fue observado en un rango de $0-40 \text{ mg L}^{-1}$, es decir, una inhibición de 0 a 67%. Este rango de concentración del inhibidor fue considerado como adecuado para los experimentos siguientes. También se realizaron experimentos preliminares para determinar el posible consumo de oxígeno causado por la oxidación de nitrógeno inorgánico (nitrificación), ya que el agua residual sintética utilizada contenía proteínas y urea que pueden hidrolizarse en amonio. Pulsos de urea y amonio fueron inyectados en un rango de $0-60 \text{ mg L}^{-1}$, expresados como demanda de oxígeno por nitrógeno (NOD). Mientras una clara respuesta respirométrica fue observada con agua residual sintética, no fue observada respuesta cuando se inyectó concentraciones de urea y amonio (Figura 3.2). De estos resultados, concluimos que el consumo de oxígeno inducido por la presencia de compuestos nitrogenados no fue significativa.

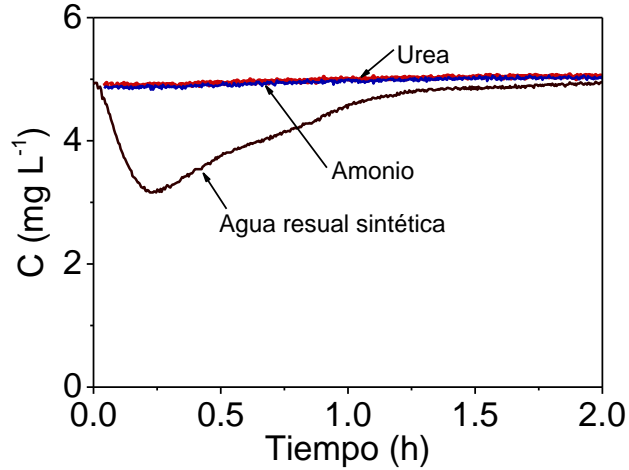


Figura 3.2 Ejemplos de respuestas respirometricas después de la inyección de un pulso de 32 mg DQO L⁻¹ de agua residual sintética, 32 mg NOD L⁻¹ de amonio y 32 mg NOD L⁻¹ de urea.

La especiación teórica de Ni, Cd y Co fue estimada y en la Tabla 3.3 se muestra el porcentaje de concentración de metales pesados libre y el porcentaje de complejos formados con los aminoácidos, en función de la concentración total de los metales pesados. Diferencias significativas fueron observadas entre los tres metales pesados evaluados. Mientras el Ni libre fue presente en un rango de 38.6 a 54.1%, el porcentaje de Cd libre fue entre 67.0 a 71.3% y el cobalto libre fue de 81.6 a 84.3%, con respecto a la concentración total de metales pesados. Los complejos metal-aminoácidos fueron relativamente altos con Ni (42.2–58.3%), comparados con el Cd (2.7–2.8%) y Co (9.1–10.3%). La concentración de agua residual sintética representada por los aminoácidos tuvo el mayor impacto sobre la especiación de los metales pesados. De hecho, cuando incrementamos la concentración de sustrato de 8 a 200 mg DQO L⁻¹, la concentración de Ni libre disminuyó de 87.8 a 22.0% de la concentración total de Ni. Aunque en menor medida, un comportamiento similar fue observado con Cd y Co (Figura 3.3). Estos resultados observados concuerdan con la literatura, por ejemplo: Cecen et al. (2010) reportó que el Ni forma fuertes complejos con compuestos orgánicos, mientras que Taha y Khalil (2005) y

Boruah (2012) han mostrado que Ni presenta grandes valores de las constantes de estabilidad metal-aminoácido que Co.

Tabla 3.3. Porcentaje de los complejos formados de los metales pesados y metales pesados libres, en función de la concentración total de los metales pesados. Considerando el medio mineral, 32 mg DQO L⁻¹ de glicina, 32 mg DQOL⁻¹ de ácido glutámico, pH 7.0, T 25°C.

	Concentración total de los metales pesados (mg L ⁻¹)				
	1	5	10	20	40
Ni ⁺²	38.6%	40.2%	42.3%	46.5%	54.1%
Complejos Ni-AA	58.3%	56.6%	54.4%	50.1%	42.2%
Cd ⁺²	67.0%	67.6%	68.3%	69.5%	71.3%
Complejos Cd-AA	2.7%	2.7%	2.7%	2.8%	2.8%
Co ⁺²	81.6%	81.9%	82.3%	83.1%	84.3%
Complejos Co-AA	10.3%	10.2%	10.0%	9.7%	9.1%

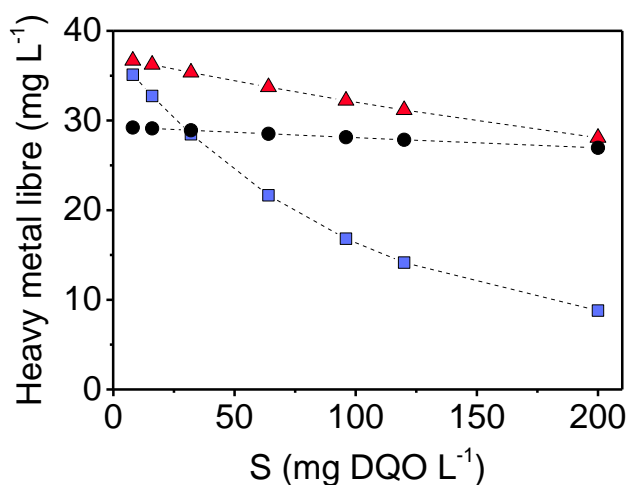


Figura 3.3 Efecto de la concentración de sustrato sobre la concentración de Ni (■), Cd (●) y Co (▲) libre.

La Figura 3.4 muestra ejemplos de respirogramas observados después de la inyección de pulsos de 64 mg DQO L⁻¹ en presencia de Ni, Cd y Co. En todos los casos, C disminuyo

inmediatamente después del pulso y luego alcanzó un valor mínimo que corresponde a la OUR máxima observada ($OUR'_{obs,max}$). Después de alcanzar el valor mínimo, progresivamente C retorna a la concentración observada en la línea base (C_b). En todos los casos, los metales pesados mostraron un claro efecto inhibitorio, lo que dio como resultado en un alargamiento de los respirogramas, así como también una disminución de los valores de $OUR'_{obs,max}$, es decir, aumento de los valores de C mínima. Además, en la concentración más alta de Ni y Cd el valor final de C fue más alto que los valores de C_b inicial, lo que indica una menor velocidad de respiración endógena probablemente causada por la muerte de la biomasa o la inhibición irreversible de una fracción significativa de la comunidad microbiana.

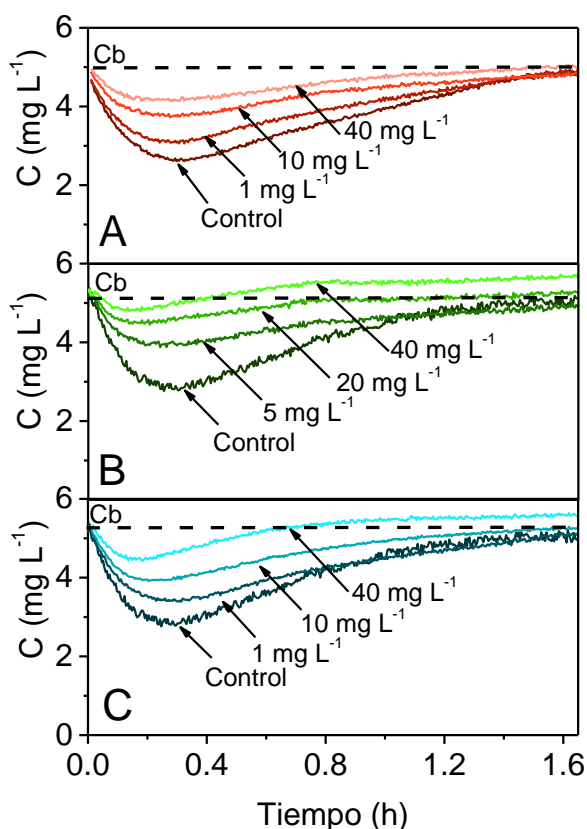


Figura 3.4. Respirogramas observados después de la inyección de un pulso de 64 mg DQO L^{-1} a varias concentraciones totales de metales pesados. Co (A), Ni (B), y Cd (C). Las líneas punteadas representan la concentración de OD inicial (C_b).

El decremento de $OUR'_{obs,max}$ en presencia de los metales pesados permitió la determinación del porcentaje de inhibición ($I\%$). La Figura 3.5 muestra $I\%$ como una función de la concentración total de metales pesados. Las curvas tienen un comportamiento asintótico y fueron similares a las curvas obtenidas por Ong et al. (2004) en un proceso de lodos activados en presencia de 10 a 150 mg L⁻¹ de Ni, y por You et al. (2009) en un proceso de nitrificación en presencia de 2 a 40 mg L⁻¹ de Ni y Cd. Por otro lado, Pai et al. (2009) reportó que $I\%$ varía linealmente cuando se incrementa la concentración de Cd en un rango de 0-0.7 mg L⁻¹. Curvas similares fueron observadas cuando consideramos la concentración de metales pesados en forma libre, según lo estimado por la especiación teórica (Figura 3.6). La forma asintótica observada en la Figura 3.5, indica que la inhibición fue incompleta incluso a altas concentraciones de metales pesados. Con el rango de concentraciones de metales pesados probado en este estudio, la $I\%$ máxima observada fue de 67, 57 y 53% para Ni, Cd y Co, respectivamente. Esto es consistente con los resultados observados por Ong et al. (Una inhibición máxima de 55% en un proceso de lodos activados contaminado con Ni) y por You et al. (Una máxima inhibición de 90% en un proceso de lodos nitrificantes expuesto a Cd).

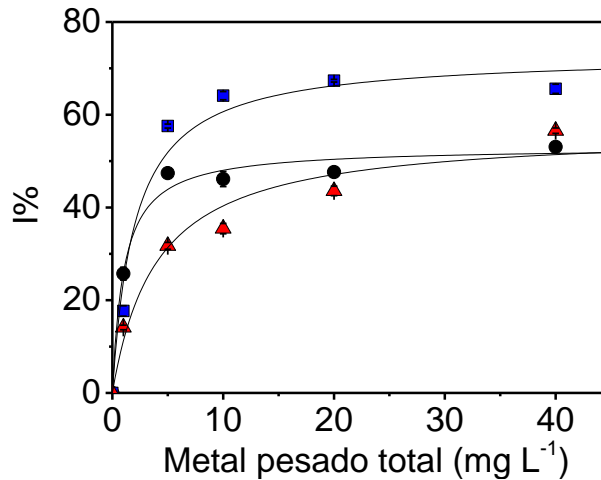


Figura 3.5 $I\%$ vs la concentración total de los metales pesados: Ni (■), Cd (●), and Co (▲). Las líneas negras muestran el mejor ajuste al modelo asintótico.

Cuando la concentración total de metales pesados fue considerada, la IC_{50} determinada fue 4.5 ± 1.2 , 17.3 ± 2.1 , y 30.7 ± 2.3 mg L^{-1} para Ni, Cd y Co, respectivamente. Pero cuando se consideró la concentración de metales pesados libre, estimada por la especiación teórica, la IC_{50} fue reducida a 1.5 ± 0.08 , 11.8 ± 3.8 , y 18.5 ± 1.72 mg L^{-1} para Ni, Cd y Co, respectivamente. Dado que una IC_{50} baja indica una toxicidad más alta, los resultados sugieren que el Ni fue el metal pesado más tóxico, seguido de Cd y Co. Este resultado es consistente con lo reportado por Elnabarawy et al. (1988), quien reportó que el Co es menos tóxico para el lodo activado que Cd. Los valores determinados de IC_{50} para los tres metales pesados fueron inferiores a los valores de IC_{50} previamente reportados (Tabla 3.1).

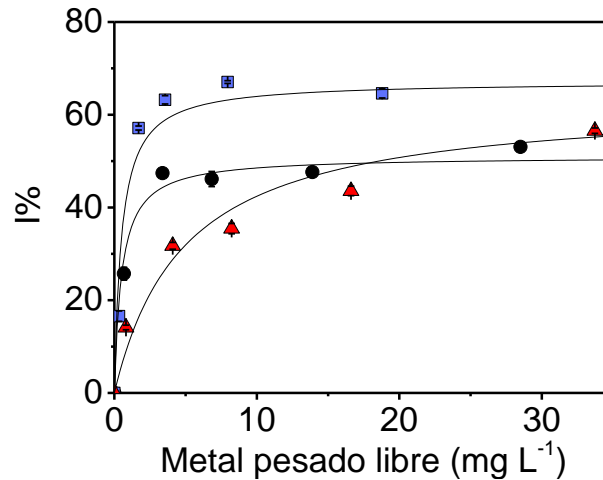


Figura 3.6. $I\%$ vs la concentración libre de los metales pesados: Ni (■), Cd (●), and Co (▲). Las líneas negras muestran el mejor ajuste al modelo asintótico.

El método de pulsos de concentración creciente fue entonces aplicado para la determinación de OUR'_{max} y $K's$. Los resultados muestran que $OUR'_{obs,max}$ vs. S_p se ajusta bien al modelo de Monod (R^2 promedio = 0.97 ± 0.02 ; $n = 24$). El coeficiente de variación promedio (relación de la desviación estándar con respecto a la media) para todas las concentraciones de metales pesados fue de $2.5 \pm 2.0\%$ para OUR'_{max} y de $7.2 \pm 8.2\%$ para $K's$. La validez del método pulsos de concentración creciente fue previamente discutido por Ramirez-Vargas et al. (2013) para un proceso de nitrificación. Los autores llegaron a la conclusión de que este método era el mejor método de interpretación. Los resultados encontrados en este trabajo son consistentes con los obtenidos previamente.

La Figura 3.7 muestra ejemplos de linealización por el método de Lineweaver-Burk (Dunn et al., 2003) con cuatro diferentes concentraciones de Cd, de las seis concentraciones probadas. El incremento en las concentraciones de Cd modifica sustancialmente las gráficas de Lineweaver-Burk, pero sin modificar las pendientes; es decir, con una relación constante entre OUR'_{max} y

$K's$. Resultados similares fueron obtenidos para Ni y Co para todas las concentraciones probadas (datos no mostrados).

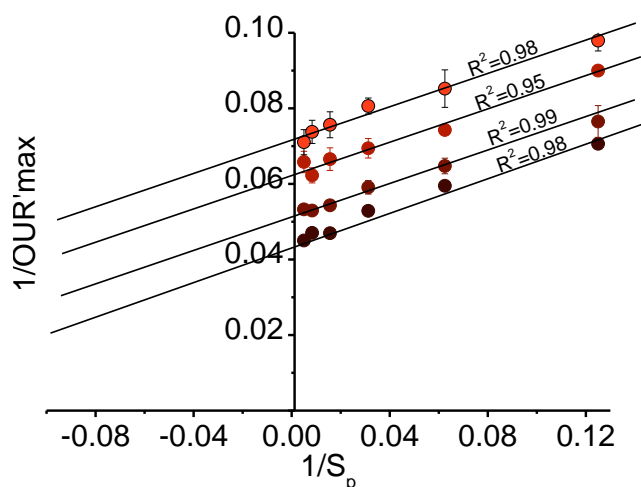


Figura 3.7. Ejemplo de linealización de Lineweaver-Burk observado sin Cd (experimento control, ●), 5 mg Cd (●), 20 mg Cd (●) and 40 mg Cd (●). Las líneas continuas representan el mejor ajuste.

La Figura 3.8 muestra el efecto de la concentración total de metales pesados sobre OUR'_{max} y $K's$. En todos los casos, un incremento de los metales pesados causa un decremento asintótico para OUR'_{max} y $K's$. En conjunto todos estos resultados sugieren una inhibición acompetitiva, es decir, cuando el inhibidor solo se une al complejo enzima-sustrato (Dunn et al., 2003). Esta inhibición acompetitiva es contradictoria con los reportes previos que consideran una inhibición no competitiva para los metales pesados (Insel et al., 2006; Pai et al., 2009; Chandran et al., 2002). Sin embargo, la inhibición acompetitiva fue previamente reportada por Kong et al. (1996) en el proceso de lodos activados expuesto a Cu y por Esquivel-Rios et al. (2014) en un lodo activado expuesto a Cu y Zn.

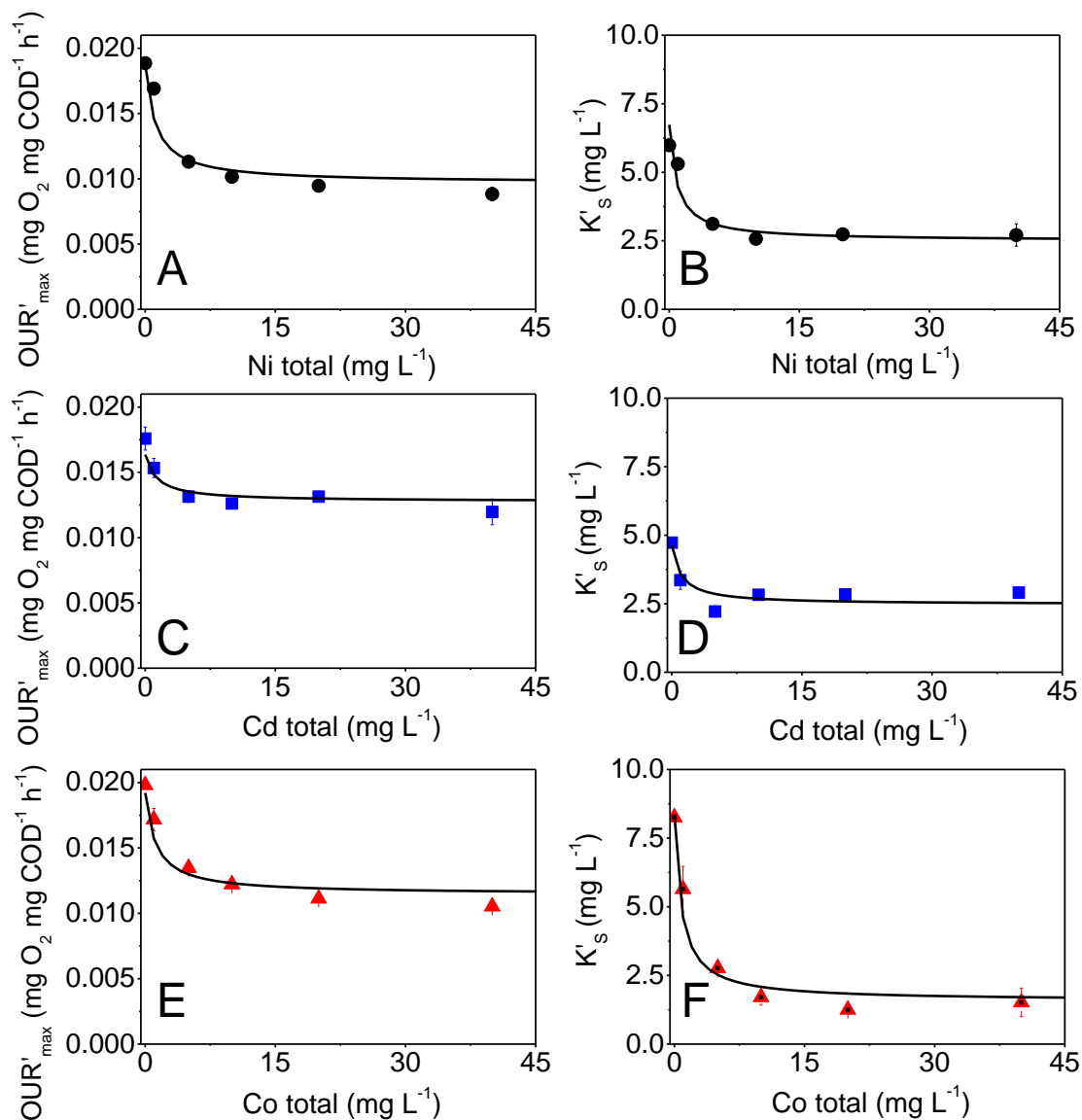


Figura 3.8. Valores de OUR'_{max} y K'_s para diferentes concentraciones totales de metales pesados, Ni (A, B), Cd (C, D), y Co (E, F). Las líneas continuas representan el mejor ajuste al modelo (Ec. 5).

La inhibición acompetitiva observada probablemente se deba a la combinación de inhibición múltiple y efectos tóxicos en una comunidad microbiana compleja, que no se puede describir adecuadamente con una cinética enzimática simple. A pesar de la clara evidencia observada por la linealización, un modelo tradicional de inhibición acompetitivo, que se describe por la Ecuación 4 (donde K_i es la constante de inhibición), fallo al describir el comportamiento

observado para OUR'_{max} y K'_S . Encontramos que un modelo modificado, que incluye un factor de amortiguamiento (Ecuación 5), se ajusta bien a los resultados observados (Fig. 3.7). En este modelo, β es una constante derivada del porcentaje máximo de inhibición ($I\%_{max}$); es decir, el valor $I\%$ observado a la concentración máxima del inhibidor (Ec. 6).

$$OUR'_{max} = OUR_{max} \cdot \frac{K_I}{K_I+I} \quad K'_S = K_S \cdot \frac{K_I}{K_I+I} \quad (4)$$

$$OUR'_{max} = OUR_{max} \cdot \frac{K_I}{K_I+I} \cdot \frac{\beta \cdot K_I + I}{\beta \cdot K_I} \quad K'_S = K_S \cdot \frac{K_I}{K_I+I} \cdot \frac{\beta \cdot K_I + I}{\beta \cdot K_I} \quad (5)$$

$$\beta = \frac{100}{100 - I\%_{max}} \quad (6)$$

Los parámetros determinados con la Ecuación 5 (para el proceso de lodos activados) son mostrados en la Tabla 3.4. Todos los parámetros determinados para el proceso de lodos activados para Ni fueron significativamente diferentes ($\alpha < 0.05$) a los que describen el proceso en presencia de Cd, sugiriendo que estos dos metales pesados presentan diferente efecto inhibitorio en el proceso de lodos activados. Los parámetros que describen el proceso en presencia de Co, en algunos casos no fueron significativamente diferentes de Ni y en algunos casos no fueron significativamente diferentes a los de Cd. El metal pesado que mostro el efecto inhibitorio más importante fue el Ni, como fue previamente sugerido por los valores de IC_{50} . De hecho, en comparación con Cd y Co, Ni presento el mayor $I\%_{max}$ y β ($\alpha < 0.05$) mientras que presento un K_I significativamente menor que Cd pero no que Co.

Tabla 3.4 Parámetros cinéticos estimados por modelo propuesto (Eq. 5) para Ni, Cd y Co (\pm desviación estándar). Las letras entre paréntesis representan los resultados de la prueba de Tukey–Kramer (TK) ($\alpha < 0.05$). Los valores con la misma letra en la misma fila no son significativamente diferentes.

Parámetros	Ni \pm DE	Cd \pm DE	Co \pm DE
OUR _{max} ^a	0.018 \pm 0.0003 (A)	0.016 \pm 0.0006 (B)	0.019 \pm 0.0003 (C)
K _I (mg L ⁻¹)	1.188 \pm 0.0025 (A)	1.339 \pm 0.0652 (B)	1.220 \pm 0.0198 (A)
K _S (mg L ⁻¹)	6.24 \pm 0.37 (A)	4.42 \pm 0.05 (B)	6.94 \pm 0.27 (A)
I% _{max} (%)	52.8 \pm 5.5 (A)	43.1 \pm 2.4 (B)	40.3 \pm 1.9 (B)
β (-)	2.12 \pm 0.34 (A)	1.75 \pm 0.24 (B)	1.67 \pm 0.04 (B)

^a (mg O₂ mg DQO⁻¹ h⁻¹)

A continuación, investigamos el efecto de la concentración de biomasa (X) en la inhibición de los metales pesados con concentraciones de pulsos de sustrato de 64 mg DQO L⁻¹ a una concentración de metales pesados de 40 mg L⁻¹. Las concentraciones de X fueron en un rango de 612 – 4416 mg DQO L⁻¹. La Figura 3.8 muestra que $I\%$ para Cd y Co fue inversamente proporcional a la concentración de biomasa. Estos resultados son consistentes con los reportados por Stasinakis et al. (2003) (para As³⁺ y Hg²⁺), Vankova et al. (1999) (para Cr⁶⁺) y Esquivel-Rios et al. (2014) (para Cu y Zn). Esta observaciones han sido previamente explicadas por el hecho que los compuestos tóxicos pueden ser adsorbidos en mayor medida en la presencia de altas concentraciones de biomasa, lo que resulta en una menor disponibilidad del inhibidor (Stasinakis et al., 2003; Hu et al., 2012). No se observó efecto significativo de X sobre la toxicidad del Ni ($\alpha < 0.05$). Es importante notar que el Ni y Co, que mostraron una menor sensibilidad a la concentración de biomasa, en comparación con el Cd, se ha reportado que

presentan una mayor afinidad por los ligandos disueltos en el medio de cultivo que por la biomasa de los lodos activados (Cecen et al., 2010).

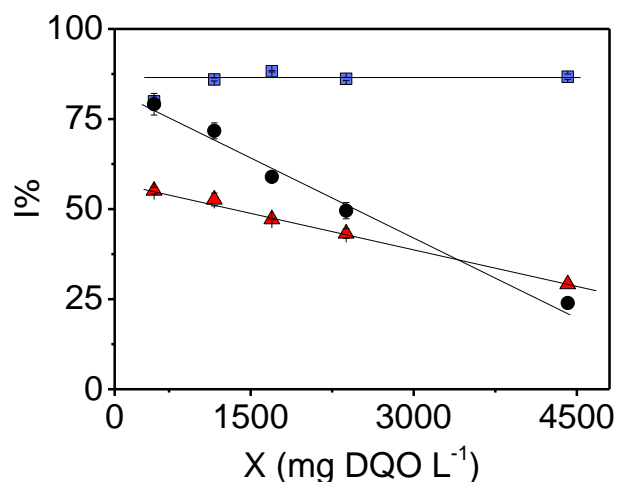


Figura 3.9 Efecto de la concentración de biomasa sobre $I\%$ para Ni (■), Cd (●), and Co (▲). Las líneas continuas representa el mejor ajuste a los datos experimentales.

También fue investigado el efecto de la concentración de sustrato (S) sobre el efecto inhibitorio de los metales pesados (Fig. 3.9). Para esto, concentraciones de pulsos de sustrato en un rango de 8 – 200 mg DQO L⁻¹ fueron inyectados en los microrreactores conteniendo una concentración de biomasa y de metales pesados de 1165 mg DQO L⁻¹ y 40 mg L⁻¹, respectivamente. La figura 3.9 muestra que para los tres metales pesados, una S alta corresponde a un alto efecto inhibitorio, hasta cierto nivel, por encima del cual no se observó un aumento adicional de $I\%$. Este comportamiento fue observado por Esquivel-Rios et al. (2014) en un proceso de lodos activados pero solo para Cu, ya que S no afecto la inhibición en el caso del Zn. Contradictoriamente, Cokgor et al. (2006) reporto que la S no tiene ningún efecto inhibitorio en el proceso de lodos activados en presencia de Ni y Cr⁶⁺. En el presente trabajo, después de alcanzar el máximo efecto inhibitorio, el grado de inhibición causado por Ni y Cd disminuyo ligeramente con un aumento adicional de S . Este comportamiento no se ha reportado previamente, y podría

explicarse parcialmente por la especiación de los metales pesados, ya que un aumento de S mostro una reducción significativa de la concentración de los metales pesados libres (Figura 3.3).

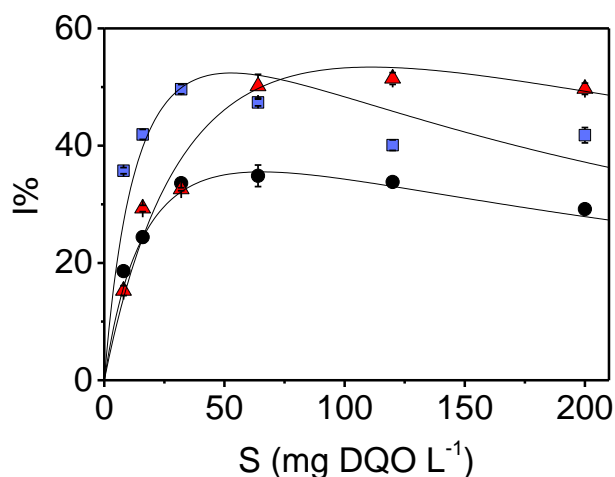


Figura 3.10 Efecto de la concentración de sustrato sobre $I\%$ para Ni (■), Cd (●), and Co (▲). Las líneas continuas representa el mejor ajuste a los datos experimentales.

Es importante mencionar que cuando modificamos S_0 y X_0 , también modificamos la relación sustrato/biomasa inicial (S_0/X_0), la cual ha mostrado tener un efecto sustancial en el metabolismo de los microorganismos (Grady et al., 1996). Sin embargo, la relación S_0/X_0 fue en un rango de 0.006-0.1, en unidades de DQO, que es demasiado baja para observar un cambio fisiológico significativo de la biomasa (Grady et al., 1996) y lo suficientemente baja como para considerar la multiplicación celular durante el consumo de sustrato exógeno (Chudoba et al., 1992). Al combinar los resultados obtenidos con diferentes S con los obtenidos con diferentes X , observamos correlaciones erráticas, lo que sugiere que la relación S_0/X_0 no fue el efecto dominante, en comparación con S_0 y X_0 independientes. Los efectos de S_0 y X_0 independientes, son probablemente los resultados de una matriz de fenómenos, incluida la especiación y la adsorción, tal como se describió anteriormente.

Finalmente, investigamos el efecto del tiempo de exposición sobre la inhibición de los metales pesados en los lodos activados, para esto se utilizó una concentración de biomasa de 1026 mg DQO L⁻¹ y una concentración de metales de pasados de 40 mg L⁻¹. Los resultados de estos experimentos son mostrados en la Figura 3.10. Para el caso del Ni, el grado inhibición aumento cuando aumento el tiempo de exposición y después de 4 h, una inhibición completa de los lodos activados fue observada. De igual manera, en el caso de Cd el grado de inhibición aumento cuando el tiempo de exposición aumento. Sin embargo, este incremento fue moderado y una inhibición máxima de 73.3% fue observado después de 4 h de exposición. Resultados similares fueron observados por Cokgor et al. (2007) y por Hu et al. (2003). Por otro lado, contrastantemente, el efecto inhibitorio de Co disminuyo cuando incrementamos el tiempo de exposición. El *I*% para Co disminuyo de 36 a 22% después de 4 h de exposición. El Bestawy et al. (2013) observo una disminución de la toxicidad del Co cuando el tiempo de exposición fue incrementado, sin embargo estos resultados no fueron explicados. El efecto positivo del tiempo de exposición sobre la toxicidad del Co puede ser un efecto combinado del acomplejamiento y la adsorción del Co sobre la biomasa o polímeros extracelulares (Liu et al., 2001; Chen et al., 2015; Xu et al., 2017).

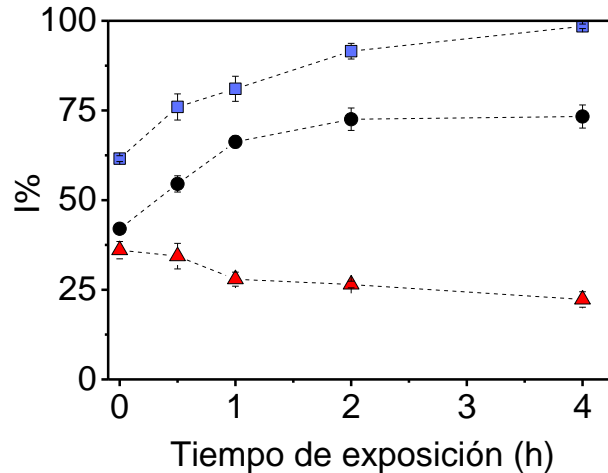


Figura 3.10 Efecto del tiempo de exposición sobre $I\%$ para Ni (■), Cd (●), and Co (▲).

3.4 Conclusiones.

Los efectos inhibitorios de Ni, Cd y Co en un proceso modelo de lodo activado fueron investigados con éxito utilizando un método microrespirométrico. Este método permitió la cuantificación de la inhibición de varias concentraciones de inhibidor, sustrato y biomasa, así como también de varios tiempos de exposición. Además, permitió determinar el porcentaje de inhibición y la IC_{50} , el método también permitió la determinación de OUR'_{max} y $K's$, mostrando que la inhibición de los metales pesados usados fue acompetitiva. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que reporta los efectos de muchas condiciones experimentales sobre la inhibición de un proceso de lodo activado por Ni, Cd y Co. Esto confirma la ventaja de la microrrespirometría sobre los otros métodos comúnmente utilizados, como: el consumo de sustrato, la bioluminiscencia o la actividad enzimática, que consumen mucho tiempo experimental y requieren que cada condición se pruebe por separado. En general, además de la concentración de inhibidor, la inhibición fue sensible a las concentraciones de biomasa y sustrato, así como al tiempo de exposición. Por lo tanto, el efecto inhibitorio de Ni, Cd y Co es una matriz compleja que involucra muchos parámetros, que generan una respuesta única para

cada planta de tratamiento de aguas residuales y para cada condición operativa. Sin embargo, se puede concluir que las bajas concentraciones de sustrato y de biomasa son las mejores condiciones para garantizar una mayor resistencia microbiana a la toxicidad de los tres metales pesados probados.

Capítulo 4.

DETERMINACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO A LARGO PLAZO DE UNA MEZCLA DE METALES PESADOS EN UN PROCESO MODELO DE LODOS ACTIVADOS.

Este capítulo está en preparación para su publicación en *Bioresource Technology*

Título y lista de autores sugeridos.

Hernandez-Martinez G.R, Zavala-Romero D., Ordaz A., Thalasso F. Effects of continuous heavy metals exposure in acclimation-inhibition kinetics of activated sludge process.

4.1 Introducción.

El proceso de lodos activados es una tecnología ampliamente utilizada en el tratamiento de aguas residuales. Este proceso es responsable principalmente de la eliminación de la carga orgánica presente en las aguas residuales industriales y municipales (Wang et al., 2013). Las aguas residuales contienen muchos compuestos químicos, incluidos los metales pesados como Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb y Zn. Entre estos, Cu, Zn y Ni son los metales pesados más reportados en aguas residuales (Ahluwalia y Goyal, 2007). La presencia de estos metales pesados en las aguas residuales depende de las emisiones antropogénicas, como la minería, la galvanoplastia, la industria del hierro, así como su liberación a través de productos de consumo común como las pilas, plásticos, electrodomésticos por mencionar algunos. Por ejemplo, concentraciones de Cu en efluentes industrial han sido reportadas en un rango de 0.03 a 1000 mg L⁻¹ (Çeçen et al., 2010; Stanković et al., 2009). Concentraciones de Ni de hasta 2950 mg L⁻¹ han sido reportadas en los efluentes de la industria de galvanoplastia (Çeçen et al., 2010). De igual manera, se ha reportado concentraciones de Zn en los efluentes industriales. Por ejemplo, Šćiban et al. (2007) reportó concentraciones de 76 mg L⁻¹ de Zn en las aguas residuales de la industria de galvanoplastia y Subbiah et al. (2010) reportó concentraciones en un rango de 250-300 mg L⁻¹ de Zn en los efluentes de la fábrica de caucho. Estos metales pesados han sido reportados que se liberan en las aguas residuales municipales en concentraciones de hasta miligramos por litro (Singh et al., 2004; Üstün, 2009).

Los metales pesados se pueden clasificar como esenciales o no esenciales para el crecimiento microbiano. El Zn, Cu y Ni se consideran metales esenciales en concentraciones del orden de mg

L-1 porque estimulan el crecimiento microbiano (Gikas, 2008), mientras que las altas concentraciones de estos metales pesados podrían causar efectos inhibidores en los microorganismos de los lodos activados (Principi et al., 2006; Sun et al., 2016) y reducir la eficiencia de remoción de la carga orgánica (Gikas, 2008; Hu et al., 2004). La toxicidad por metales pesados depende de varios factores, como la concentración de metales pesados (El Bestawy et al., 2013; Malamis et al., 2012; Ong et al., 2004), pH (Malamis et al., 2012; Ong et al., 2004; Van Nostrand et al., 2005), la especiación (Çeçen et al., 2010; Çeçen et al., 2010; Çeçen y Kılıç, 2016), tipo y concentración del lodo (Cokgor et al., 2007; Esquivel- Rios et al., 2014; Gikas y Romanos, 2006) y el tiempo de exposición (Xiao-Hong et al., 2011). Además, la toxicidad de los metales pesados en el proceso de lodos activados también depende de las condiciones operativas del proceso como, la composición de las aguas residuales, la edad del lodo activado, y la aclimatación relativa del lodo activado (Kelly et al., 2004; Bestawy et al., 2013; Madoni y Romeo, 2006).

En la literatura es común encontrar reportes de investigación centrados en la evaluación del efecto a largo plazo de los metales pesados de forma individual (Li et al., 2011; Wang et al., 2013; Zhang et al., 2017; Ouyang et al., 2016; Han et al. al., 2013) sobre el proceso de lodos activados, cuando en las aguas residuales se encuentran típicamente mezclas de metales pesados. Poco se sabe sobre el efecto combinado de los metales pesados en el proceso de tratamiento de aguas residuales. Por ejemplo, Khor et al. (2011) demostraron que una mezcla de Ni (II) y Cr (VI) ejercía un efecto inhibitorio sinérgico en la eficiencia de eliminación de DQO en el proceso de lodo activado. Aslan y Sozudogru (2017) observaron que una mezcla de Cu (II) y Ni (II) ejercía un mayor efecto inhibitorio sobre los microorganismo de la nitrificación que cuando los microorganismos estaban expuestos a los metales pesados individuales.

Asimismo, los pocos estudios existentes se centraron en seguir la eficiencia de remoción de DQO. Al mejor de nuestro conocimiento, no existen estudios en los que se hayan evaluado los parámetros cinéticos del proceso de lodos activos a largo plazo.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el impacto a corto y largo plazo de la exposición continua de una mezcla de metales pesados sobre la cinética de aclimatación-inhibición de un proceso modelo de lodos activados mediante la determinación no solo de la eliminación de la DQO sino también del porcentaje de inhibición y de los parámetros cinéticos del proceso de lodos activados.

4.2 Materiales y métodos.

4.2.1 Configuración del reactor y medios de cultivo.

En este estudio se utilizaron dos procesos modelo de lodos activados en régimen continuo. Un reactor como sistema control (RC), sin alimentación de metales pesados y el otro reactor con alimentación continua de diferentes concentraciones de metales pesados (RM). Ambos reactores fueron diseñados como una columna de burbujas de vidrio (CR: 0.12 m de diámetro, 0.66 m de altura y 6 L de volumen de trabajo, MR: 0.32 m de diámetro, 0.16 m de altura y 2.6 L de volumen de trabajo). El RC fue inoculado con 1 L de lodo proveniente de una planta de tratamiento de aguas residuales municipales (Planta de aguas residuales urbanas, Ticoman, México) y el RM fue inoculado con 1 L de lodo obtenido del RC. Ambos reactores se airearon a una velocidad constante de 1 VVM (volumen de aire por volumen de reactor por minuto) a través de un difusor poroso (CR: 0.09 m de diámetro, MR: 0.084 m de diámetro) ubicado en el fondo del reactor.

Ambos reactores se alimentaron continuamente con agua residual sintética que contenía (mg L^{-1}); Peptona, 851; Extracto de carne, 585; Urea, 159; K_2HPO_4 , 148; NaCl , 37,3; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10.6; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 21.2. Los reactores se alimentaron con una bomba peristáltica (Masterflex L / S de precisión, Cole-Parmer, EE. UU.) A un flujo constante del líquido de 0.125 L h^{-1} (tiempo de residencia hidráulica de 48 h). El pH se mantuvo a 7.0 ± 0.5 mediante la adición de H_3PO_4 1M. Los reactores se mantuvieron a temperatura ambiente ($21 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$).

4.2.2 Estrategia experimental de los reactores de lodos activados.

Los reactores de lodos activados se operaron durante 166 días. En la primera etapa, el RM fue previamente aclimatado al agua residual sintética durante 22 días. Después de ese período, la estrategia experimental consistió en adicionar una mezcla de Cu, Ni y Zn de acuerdo con la Tabla 4.1. La mezcla añadida de metales pesados fue basada en la concentración que causa el 50% de inhibición (IC_{50}) reportada previamente por Esquivel-Rios et al. (2014) para Zn y Cu, y Cokgor et al. (2007) para Ni. Después de iniciar la adición de los metales pesados se observó un período de inhibición-aclimatación en el RM (Mas detalle en la sección de resultados y discusión). Al final de este periodo se incrementó la concentración de la mezcla de metales pesados. Los valores IC_{50} utilizados en este trabajo se seleccionaron a partir de reportes previos que trabajaron con la misma composición del agua residual sintética en procesos similares de lodos activados.

Tabla 4.1. Configuración experimental del RM.

Etapa	Tiempo de operación (d)	de IC ₅₀ (%)	Concentración (mg L ⁻¹)		
			Cu	Zn	Ni
I	0-22	0	0	0	0
II	23-30	5	0.5	2	1.65
III	31-38	10	1	4	3.3
IV	39-63	20	2	8	6.6
V	64-108	40	4	16	13.2
VI	109-166	100	10	40	33

4.2.3 Métodos analíticos.

La biomasa (X) y la concentración del sustrato (S) fueron reportados como demanda química de oxígeno (DQO), medidos por el método colorimétrico de reflujo cerrado, de acuerdo con los métodos estándar (APHA, 1999). La DQO total se determinó a partir de una muestra homogenizada del licor mixto. La DQO soluble se determinó a partir de una muestra centrifugada (5900 g durante 15 minutos, modelo 5810 R, Eppendorf, México) y filtrada (filtro de 0.45 μm , 66601, Pall Inc., México). La DQO insoluble se determinó como la diferencia entre la DQO total y la DQO soluble. La concentración de la biomasa fue considerada como la DQO insoluble, ya que el medio de cultivo no contenía sólidos en suspensión.

4.2.4 Preparación de las soluciones de metales pesados y biomasa.

Se prepararon soluciones de cada metal pesado de 50 g L⁻¹ disolviendo CuSO₄·5H₂O, NiCl₂·6H₂O y ZnSO₄·7H₂O en agua desionizada y fueron almacenadas a 4 ° C. Estas soluciones concentradas se utilizaron para alimentar al RM y también para realizar experimentos respirométricos en cada etapa del RM. Todos los reactivos químicos fueron de grado analítico (Sigma-Aldrich, México). Antes de cada experimento respirométrico, también se preparó un stock de biomasa. Con ese propósito, se tomó una muestra de biomasa de ambos reactores, se centrifugó a 5900 g durante 15 minutos (Modelo 5810 R, Eppendorf, México) y se resuspendió en medio fresco sin fuente de carbono, para asegurar la ausencia de sustrato residual en la solución de biomasa.

4.2.5 Sistema de microrreactores.

El sistema de microrreactores utilizado para los ensayos mirorrespirométricos fue un sistema de 24 microrreactores con un diámetro de 16 mm y 18 mm de profundidad cada uno (24-microplate system, PreSens, Applikon, México) previamente descrito por Esquivel-Rios et al. (2014). Cada microrreactor contiene un sensor de oxígeno disuelto precalibrado fluorométricamente (OxoDish, PreSens, México). La adquisición de datos de oxígeno disuelto fue cada 4 min⁻¹ a través del software PreSens (SDR-v37). La transferencia de oxígeno en los microrreactores fue lograda por aireación superficial. Para mejorar el mezclado y la transferencia de masa en los microrreactores se adiciono una perla de vidrio (5 mm diámetro) en cada microrreactor. El sistema de microrreactores fueron mantenidos a 25 °C y 100 rpm en un agitador orbital (Ecotron Infors HT, Switzerland).

4.2.6 Experimentos respirométricos de inhibición.

Los experimentos de inhibición fueron realizados por respirometría dinámica de pulsos, en la cual el OD es medido después de la adición de una concentración conocida de sustrato, es decir, una concentración de agua residual sintética. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en respirómetros estándar. (Ordaz et al., 2008; Oliveira et al., 2011) y más recientemente utilizada en un sistema de microrreactores por Esquivel-Rios et al. (2014). Brevemente el método consiste en los siguientes pasos; (i) cada microrreactor fue llenado con 1.4 ml de deseada concentración de biomasa sin fuente de carbono; (ii) el sistema de microrreactores fue cerrado y puesto en el agitador orbital para garantizar aireación superficial en el sistema; (iii) la adquisición de datos fue encendida y fue mantenida hasta alcanzar lecturas estables de la concentración de OD, que corresponde a la respiración endógena de los microorganismos (Spanjers y Vanrolleghem, 1995); (iv) se inyectó 0.1 ml de agua residual sintética concentrada conteniendo una deseada concentración de metales pesados; (v) la concentración de OD fue medida hasta que el sistema retornó al estado estacionario, es decir, hasta que la concentración de OD se observó constante. El contenido del microrreactor fue descartado después de cada experimento de pulso. Todos los experimentos respirométricos fueron realizados con réplicas de 3 experimentos y siempre se incluyó triplicado de los experimentos controles, es decir, experimentos sin metales pesados.

4.2.7 Interpretación de datos.

El impacto de la inhibición en los dos sistemas de lodos activados fue cuantificado a través de la eficiencia de remoción de DQO pero también a través de la velocidad específica de consumo de oxígeno máxima ($SOUR$; $\text{mg O}_2 \text{ mg DQO}^{-1} \text{ h}^{-1}$). Como se menciona más adelante en la sección de resultados y discusión, el proceso de lodos activados es descrito por un modelo cinético de Monod (Ec. 1):

$$OUR = OUR_{max} \cdot \frac{S}{K_S + S} \quad OUR_{obs} = OUR'_{max} \cdot \frac{S}{K'_S + S} \quad (1)$$

Donde OUR_{max} (mg O₂ mg DQO⁻¹ h⁻¹) es la máxima OUR , S es el sustrato (agua residual sintética) y K_S (mg DQO L⁻¹) es la constante de afinidad por el sustrato, observada en ausencia de los metales pesados. En presencia de los metales pesados, la OUR_{max} aparente (OUR'_{max}) y K_S aparente (K'_S) fueron recuperados de la OUR observada (OUR_{obs}), usando el mismo modelo de Monod (Ec. 1).

Para recuperar los valores de OUR'_{max} y K'_S , el método utilizado fue basado en la inyección pulsos de concentración creciente. Este método ha sido exhaustivamente descrito anteriormente (Ramirez-Vargas et al., 2013; Ordaz et al., 2012). Brevemente, inyectamos simultáneamente y en microrreactores separados, 6 diferentes concentraciones de pulsos (S_p), cada uno con al menos 3 diferentes replicas. A continuación, de cada respirograma, registramos la OUR'_{max} observada ($OUR'_{obs,max}$), es decir, la OUR correspondiente al C mínimo observado. Entonces, graficamos $OUR'_{obs,max}$ contra la concentración de sustrato en el pulso. Las gráficas resultantes muestran un comportamiento tipo Monod que fue usado para estimar OUR'_{max} y K'_S con el método de Runge-Kutta usando la optimización de Levenberg-Marquardt (Matlab R2012b software, USA). La bondad de ajuste fue estimada por el coeficiente de correlación (R^2). Además de los parámetros cinéticos determinados, el efecto inhibitor de los metales pesados se cuantificó a través del porcentaje de inhibición ($I\%$). Este parámetro se determinó a partir de la OUR máxima observada ($OUR'_{obs,max}$) en presencia y ausencia del inhibidor de acuerdo a la Ecuación 2. Donde $IOUR'_{obs,max}$ es la $OUR'_{obs,max}$ observada en

presencia de los metales pasados. También I% fue determinada a través de la eficiencia de remoción de DQO ($I_E\%$) en presencia y en ausencia de metales pesados, de acuerdo a la Ecuación 3; donde ER_{RC} es la eficiencia de remoción de DQO en el sistema RC y ER_{RM} es la eficiencia de remoción de DQO en el sistema RM

$$I\% = \frac{OUR'_{obs,max} - IOUR'_{obs,max}}{OUR'_{obs,max}} \cdot 100 \quad (2)$$

$$I_E\% = \frac{ER_{RC} - ER_{RM}}{ER_{RC}} \cdot 100 \quad (3)$$

4.2.8 Análisis estadístico

Las diferencias de significativas entre los parámetros fue calculado utilizando la prueba de comparación múltiple (TK) de Tukey-Kramer, que se realizó después del análisis de varianza ($\alpha < 0.05$) usando OriginPro 8 SR0 v8.0724 (OriginLab, Northampton, MA, USA).

4.3 Resultados y discusión.

4.3.1 Impacto de la mezcla de metales pesados en la eficiencia de remoción de DQO.

Los reactores de lodos activados fueron operados durante 166 días. El RC se operó con una velocidad de carga orgánica promedio (VCO) de 708.3 ± 29.2 mg DQO L⁻¹ d⁻¹. La velocidad de remoción de la carga orgánica promedio (VRO) fue de 644.8 mg COD L⁻¹ d⁻¹ que correspondió

a una eficiencia de remoción de DQO de $91 \pm 1.9\%$ (Fig. 4.1A). La eficiencia de remoción de DQO en el RC se mantuvo constante durante el tiempo de operación del sistema.

El reactor RM se alimentó durante los primeros 22 días con agua residual sintética de la misma manera que el RC, antes de la adición de la mezcla de Cu, Ni y Zn. En ese período, se observó una VRO promedio de $515.2 \text{ mg COD L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ que correspondía a una eficiencia de remoción de DQO de $89.2 \pm 2.7\%$ (Etapa I, Fig. 4.1B), no se observaron diferencias significativas con respecto al reactor MR ($\alpha < 0.05$). El día 23, se comenzó la alimentación de 5% de IC_{50} de la mezcla de Cu, Ni y Zn, y después de 7 días de adicionar los metales pesados, no se observó un cambio significativo en la eficiencia de remoción de DQO (Etapa II, Fig. 4.1B). El día 31, se incrementó el porcentaje de IC_{50} al 10% y después de 8 días de operación del reactor bajo esta condición, no se observó ningún cambio en la eficiencia de remoción de DQO manteniéndose en $88.4 \pm 0.91\%$ (Etapa III, Fig. 4.1B) Sin embargo, al incrementar el porcentaje al 20% en el día 39, se observó una disminución abrupta en la eficiencia de remoción de DQO hasta $58 \pm 2.6\%$ después de 3 días de exposición de la mezcla de metales pesados (Etapa IV, Fig. 4.1B). Después de 24 días en la Etapa IV, la eficiencia de remoción de DQO se recuperó hasta $76.3 \pm 1.0\%$ En esta Etapa se observó una disminución del 14% en la eficiencia de remoción de DQO en comparación con la Etapa I. A continuación, se aumentó la concentración de metales pesados al 40% de IC_{50} (Etapa V, Fig. 1B) donde también se observó una disminución importante en la eficiencia de remoción de DQO con un valor promedio de $51 \pm 3.3\%$ al día 83. El período de aclimatación se observó el día 86 con una eficiencia de remoción de DQO de $75 \pm 0.6\%$. Finalmente, cuando se incrementó el porcentaje de IC_{50} al 100% (Etapa VI, Fig. 4.1B), la eficiencia de remoción de DQO cayó hasta $41 \pm 1.1\%$ al día 126 y después de 10 días, se observó una ligera recuperación de hasta $63 \pm 0.4\%$ de la eficiencia de remoción de DQO al día 149. En

general, este hallazgo demostró que la biomasa de lodo activado era capaz de aclimatarse a la adición continua de metales pesados. Sin embargo, la eficiencia de remoción de DQO no fue totalmente recuperada al final de las Etapas IV, V y VI. Resultados similares fueron observados por Wang et al. (2013) para un proceso de lodo activado en presencia de 10 mg de Ni L⁻¹ y por Feng et al., (2016) para un proceso de lodo activado en presencia de 20 mg de Cu L⁻¹.

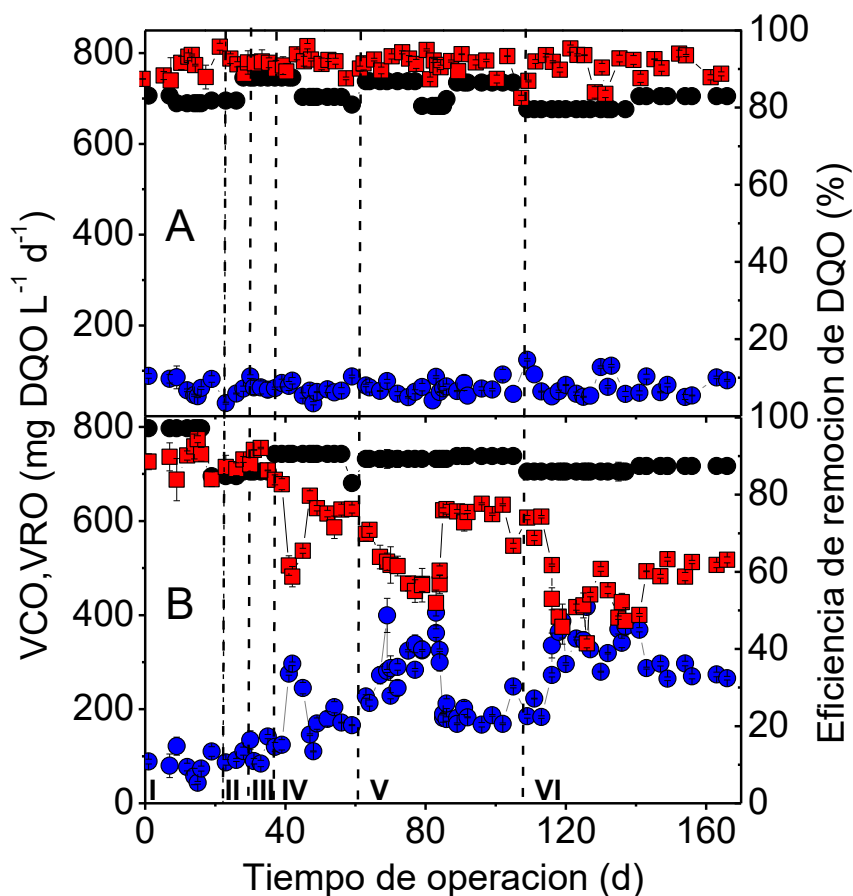


Figura 4.1 Reactor de control (A) y reactor alimentado con metal pesado (B) durante todo el tiempo de operación. (■) Eficiencia de remoción de DQO, (●) VCO y (●) VRO. Las líneas punteadas muestran los cambios de etapa de los reactores en funcionamiento.

4.3.2 Impacto de los metales pesados en la concentración de biomasa.

La Figura 4.2 muestra la concentración de biomasa para ambos reactores durante todo el tiempo de operación. En el RC, la concentración de biomasa se mantuvo con una concentración promedio de 546 ± 79 mg DQO L⁻¹ durante todo el tiempo de operación. Por otro lado, la biomasa en el RM se mantuvo con una concentración promedio de 512.8 ± 43.9 mg DQO L⁻¹ en las primeras cuatro etapas, no se observaron diferencias significativas con respecto al sistema RC. En la Etapa V, se observó una disminución lenta en la concentración de biomasa hasta 153.7 ± 40 mg DQO L⁻¹ correspondiente a la eficiencia mínima de remoción de DQO al día 83. Después de ese período sorprendentemente, se observó un aumento rápido en la concentración del lodo activado hasta de 879.6 ± 56.1 mg DQO L⁻¹ al día 92. Este aumento en la concentración de biomasa se relacionó con la aparición de biomasa filamentosa en el reactor. Estos resultados observados están en concordancia con reportes anteriores donde muestran que los microorganismos filamentosos son más resistentes que las bacterias a la exposición a metales pesados. Sin embargo, la concentración de biomasa disminuyó significativamente al día 143, con una concentración promedio de 411 ± 2.5 mg DQO L⁻¹. Estos resultados mostraron que la inhibición del proceso de lodos activados se ve afectado significativamente por la mezcla de metales pesados.

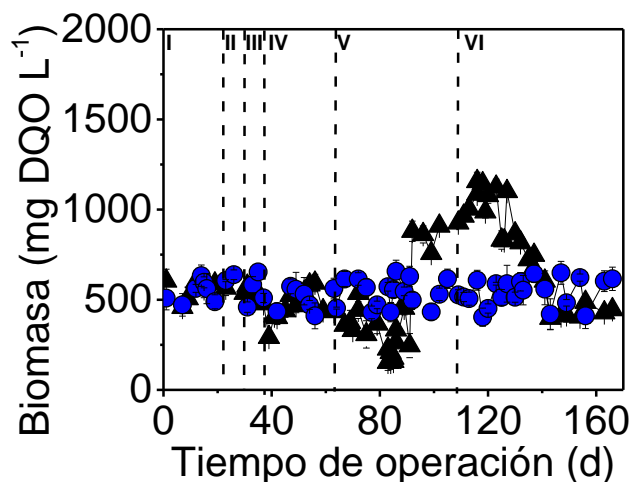


Figura 4.2 Concentración de biomasa para el sistema RC (●) y RM (▲) durante todo el tiempo de operación del reactor. Las líneas punteadas denotan los cambios de etapa en los sistemas.

4.3.3 Evaluación microrrespirométrica.

El día 5 se inició los experimentos de microrrespirométricos en ambos procesos de lodos activados. La Figura 4.3 muestra un ejemplo de perfil de OUR_{ex} específico ($SOUR_{ex}$) al inicio de cada etapa (Tabla 4.1) con una concentración de 64 mg DQO L^{-1} , en todos los casos después de inyectar el sustrato se observó un incremento rápido de la $SOUR_{ex}$ hasta alcanzar un máximo correspondiente a la $SOUR_{ex,max}$ y después decrecen los valores lentamente en un periodo de 2 horas hasta alcanzar valores cercanos a cero. La forma de los perfiles de $SOUR_{ex}$ es típica de los lodos activados. En el RC se observó que a medida que aumenta la concentración de la mezcla de metales pesados disminuyó el valor de $SOUR_{ex,max}$ (aumento de la etapa) mientras que cuando los perfiles de $SOUR_{ex}$ del RC sin metales pesados (experimentos control) no presentan diferencias significativas. Por otro lado, en el RM se puede observar que tanto los experimentos con/sin metales pesados presentaron el mismo comportamiento en todas las etapas evaluadas, así mismo al incrementar la concentración de los metales pesados se observó un decremento en la respuesta de $SOUR_{ex}$, La disminución en la respuesta de $SOUR_{ex}$ es

significativa y esto demuestra que a pesar de que los lodos activados son capaces de aclimatarse a los metales pesados hay un daño importante y permanente en el proceso metabólico de la biomasa.

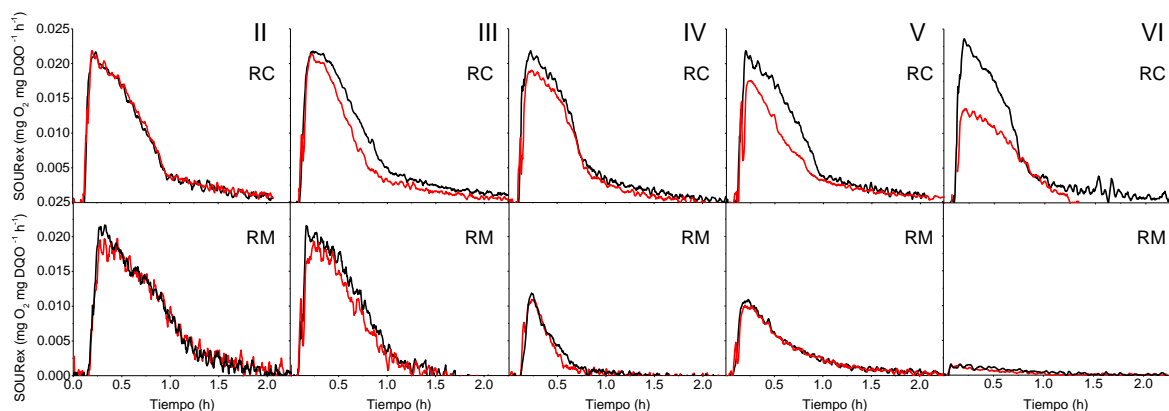


Figura 4.3 Ejemplo de perfiles de $SOUR_{ex}$ en cada etapa observada después de la inyección de 64 mg DQO L^{-1} con (-) y sin (-) la mezcla de metales pesados para el sistema RC y RM.

4.3.4 Efecto de la inhibición a corto plazo en el proceso de lodos activados.

La inhibición a corto plazo se evaluó con la biomasa no aclimatada a metales pesados (sistema RC) con las mismas concentraciones que se muestran en la Tabla 4.1 mediante los experimentos respirométricos de inhibición (Ec. 2 y 3). La Figura 4.3 muestra $I\%$ en función de la concentración de metales pesados, se puede observar que $I\%$ aumentó proporcionalmente a medida que aumenta la concentración de metales pesados en cada etapa probada y también que en cada etapa $I\%$ se mantuvo constante. El $I\%$ máximo observado fue el 49% correspondiente a IC_{50} de la mezcla de Cu, Ni y Zn. Reportes anteriores mostraron que la mezcla de metales pesados podría causar efectos sinérgicos, antagónicos o aditivos en el proceso del lodo activado (Khor et al., 2011; Gikas, 2008; Aslan y Sozudogru, 2017). Sin embargo, en este trabajo, ninguno de los efectos antes mencionados se observó durante las primeras cinco fases. En la

fase VI, el $I\%$ fue menor que el $I\%$ teórico, esto sugiere un efecto antagónico en el proceso del lodo activado.

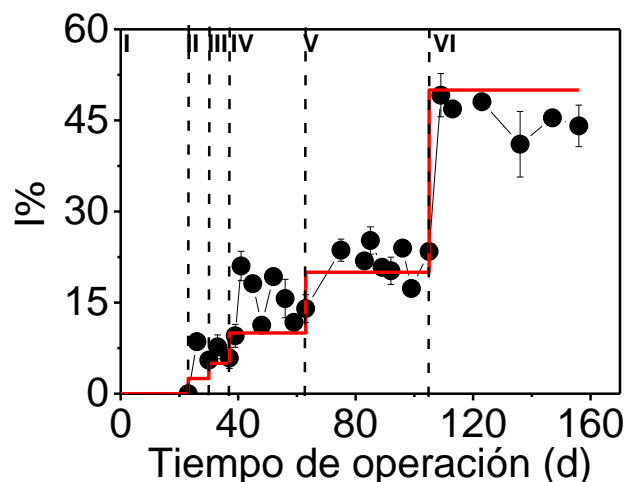


Figura 4.4 $I\%$ estimado en el sistema CR (●) durante todo el tiempo de operación. Las línea continua (-) representan la inhibición teórica. Las barras de error representan una desviación estándar. Las líneas punteadas muestran los cambios de etapa del reactor en funcionamiento.

4.3.5 Efecto de inhibición a largo plazo en el proceso de lodos activados.

La inhibición a largo plazo se evaluó con la biomasa aclimatada a metales pesados (sistema RM) durante todo el tiempo de operación. El $I\%$ se determinó mediante los experimentos respirométricos y la eficiencia de remoción de DQO. La Figura 4.4 muestra el porcentaje de inhibición ($I\%$) durante todas las etapas en el sistema RM. En este sistema se puede observar que solamente al inicio de cada etapa $I\%$ aumento significativamente, después de este periodo $I\%$ retorno a valores de cercanos a cero. Estos resultados observados son una sugerencia de que la biomasa se aclimató al final de cada etapa. Aunque esta aclimatación de la biomasa no resulto en una recuperación total de la eficiencia de remoción de DQO (Figura 4.1). Los valores de $IE\%$

muestran un comportamiento similar a los de $I\%$, en todas las etapas evaluadas. Sin embargo las diferencias significativas entre ambos valores de inhibición pueden ser atribuidas a los cambios poblacionales en las comunidades microbianas presentes en los lodos activados. Mientras que los valores de $I\%$ están directamente relacionados al metabolismo de los microorganismos activos en cada etapa, los valores $I_E\%$ son fuerte indicador de la capacidad de biodegradar el sustrato presente en el sistema.

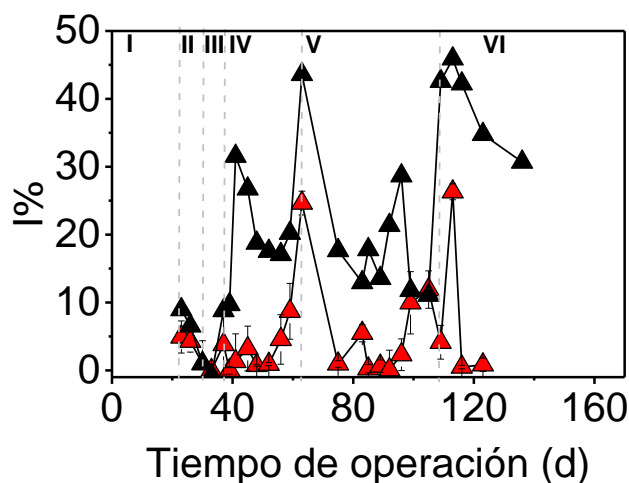


Figura 4.5 $I\%$ (▲) e $I_E\%$ (▲) en el sistema MR durante todo el tiempo de operación. Las líneas punteadas muestran los cambios de etapa en el funcionamiento del reactor.

4.3.6 Parámetros cinéticos durante todo el tiempo de operación.

La Figura 4.6 muestra parámetros cinéticos aparentes e intrínsecos determinados en el sistema RC. Los valores de K_S se mantuvieron constantes durante todo el tiempo de operación con un valor promedio de $23.7 \pm 2.3 \text{ mg L}^{-1}$. Mientras que los valores de K'_S disminuyeron proporcionalmente cuando se aumentó la mezcla de metales pesados en un rango de 24.8 a 4.5 mg L^{-1} (Fig. 4.6A). De la misma manera, los valores de OUR_{max} se mantuvieron constantes

durante todo el tiempo de operación con un valor promedio de $0.019 \pm 0.001 \text{ mg O}_2 \text{ mg DQO}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Mientras que los valores de OUR'_{max} disminuyeron cuando la concentración de metales pesados aumento en un rango de 0.021 a $0.008 \text{ mg O}_2 \text{ mg DQO}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Fig. 4.6B). Resultados similares fueron observados por Esquivel-Rios et al. (2014) para Cu (II) y Zn (II) y Hernandez-Martinez et al. (2018) para Ni (II), estos reportes previos trabajaron con un proceso de lodos activados alimentado con la misma aguas residual sintética. Estos resultados demuestran que la inhibición observada, cuando el proceso de lodos activados no es aclimatado, es una inhibición acompetitiva, En este tipo de inhibición, la característica principal es la disminución tanto de $K's$ y OUR'_{max} como previamente se describió en el capítulo anterior (Kong et al 1994; Esquivel-Rios et al., 2014). Contradictoriamente, Insel et al. (2006) y Pai et al. (2009) han reportado una inhibición no competitiva cuando realizaron experimentos de metales pesados a corto plazo. Sin embargo los trabajos antes mencionados fueron realizados con concentraciones de metales pesados de forma individual. Al mejor de nuestro conocimiento no hay literatura que reporte el tipo de inhibición en una mezcla de metales pesados.

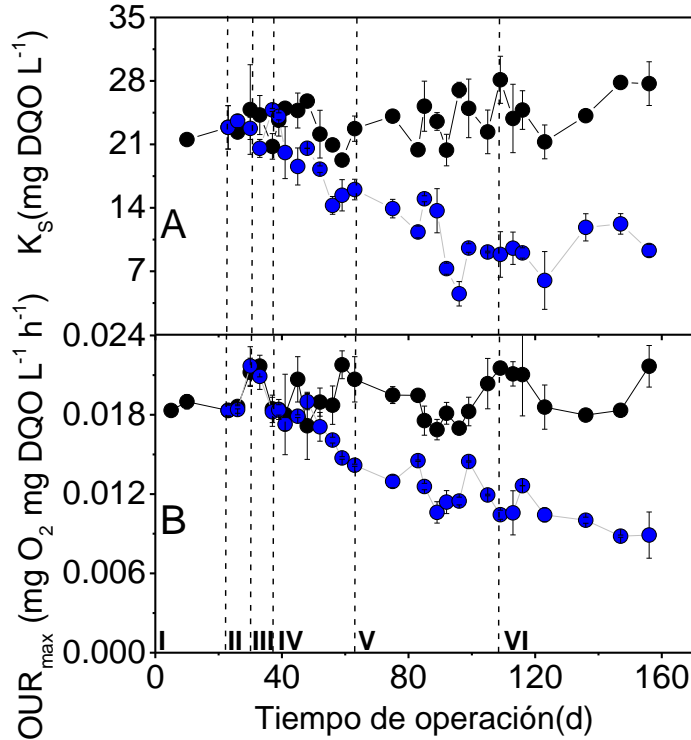


Figura 4.6 K_S (A) y OUR_{max} (B) en el sistema RC (●) sin concentración de metales pesados y (●) con metales pesados durante todo el tiempo de operación. Las líneas punteadas denotan el cambio de etapa en el reactor. Las barras de error representan una desviación estándar.

La Figura 4.7 muestra los parámetros cinéticos aparentes e intrínsecos determinados en el sistema RM durante todo el tiempo de operación. Tanto la K_S y K'_s mostraron la misma respuesta durante todo el tiempo de operación. En las primeras tres etapas K_S no mostró ningún cambio significativo ($\alpha < 0.05$) pero cuando el $IC_{50\%}$ aumentó en 20% (Etapa IV, Fig. 4.7A) se observó un aumento en los valores de K_S de 25.2 a 45.6 mg L⁻¹. El aumento de K_S confirma el efecto causado por la carga de choque en la etapa IV en la eficiencia de remoción de DQO (Fig. 4.1B). En la fase V se observó una disminución en la K_S de 45.6 a 12.1 mg L⁻¹. La disminución de K_S estuvo directamente relacionada con un aumento en la concentración de biomasa después del período de aclimatación. Este resultado está en concordancia con la recuperación de la eficiencia de remoción DQO. De la misma manera, los valores de OUR_{max} en las primeras tres

etapas se observaron constantes con un valor promedio de $0.021 \pm 0.001 \text{ mg O}_2 \text{ mg DQO}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Fig. 4.7B). Es importante denotar que no se observaron diferencias significativas en comparación con el sistema CR ($\alpha < 0.05$), esto nos indica que los dos sistemas operaron similarmente en este periodo. En la etapa IV se observó una disminución en los valores de OUR_{max} hasta $0.005 \text{ mg O}_2 \text{ mg DQO}^{-1} \text{ h}^{-1}$ al día 86, después de eso, los valores de OUR_{max} aumentaron hasta $0.016 \text{ mg O}_2 \text{ mg DQO}^{-1} \text{ h}^{-1}$. El aumento de los valores de OUR_{max} concordó con la recuperación de la eficiencia de remoción de DQO. Asimismo, en la etapa V, los valores de OUR_{max} disminuyeron de 0.016 a $0.002 \text{ mg O}_2 \text{ mg DQO}^{-1} \text{ h}^{-1}$, seguido por un ligero aumento de OUR_{max} . Por último, cuando el $IC_{50\%}$ aumentó al 100%, se observó una ligera disminución en los valores de OUR_{max} relaciona con el impacto de los metales pesados en la eficiencia de remoción de DQO. Al final de la etapa VI se observó una ligera recuperación de OUR_{max} .

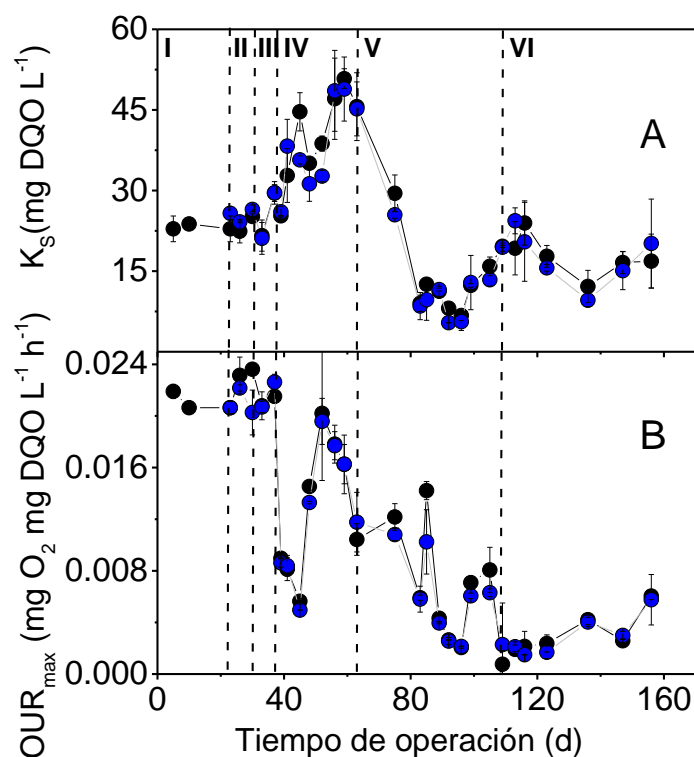


Figura 4.7 K_S (A) y OUR_{max} (B) en el sistema RM, (●) sin concentración de metales pesados y (●) con metales pesados durante todo el tiempo de operación. Las líneas punteadas denotan el cambio de etapa en el reactor.

4.4 Conclusiones

El efecto inhibitorio a corto y largo plazo de una mezcla de Cu, Ni y Zn en sistemas modelo de lodos activados fue investigada exitosamente a través de la eficiencia de remoción de DQO así como también por microrrespirometría. Este último método permitió determinar los parámetros cinéticos intrínsecos y aparentes durante todas las etapas de operación de los sistemas y se demostró que el sistema RC presenta una inhibición acompetitiva. En el sistema RC fue observado un incremento proporcional $I\%$ cuando se incrementó la concentración de la mezcla de Cu, Ni y Zn en todas las etapas y solamente en la etapa VI fue observado un efecto antagónico. En el sistema RM fueron observados periodos de aclimatación-inhibición sin una recuperación total del sistema en las últimas etapas evaluadas.

CONCLUSIONES GENERALES

En este trabajo se exploró el potencial de la microrrespirometría para caracterizar sistemas modelo de tratamiento de aguas residuales expuestas a compuestos tóxicos. Los resultados obtenidos demostraron que con un mediano esfuerzo experimental y un diseño experimental simple la microrrespirometría es un método adecuado para caracterizar el efecto inhibitorio de nanopartículas y de metales pesados sobre lodos activados y que esta caracterización incluía el efecto de varios factores sobre la inhibición en general y sobre los parámetros cinéticos y estequiométricos en particular. Al mejor de nuestro conocimiento, este nivel de caracterización no ha sido reportado previamente.

La aplicación de la microrrespirometría para determinar el efecto inhibitorio de las nanopartículas de plata en un sistema modelo de lodos activados permitió evaluar múltiples factores como la concentración de inhibidor, la relación sustrato biomasa inicial y el tiempo de exposición. Los parámetros cinéticos permitieron determinar que las nanopartículas de plata presentan una inhibición acompetitiva. El efecto inhibitorio de las nanopartículas de plata fue observado por primera vez tanto en la respiración exógena como en la respiración endógena de los lodos activados. Estos resultados mostraron que las nanopartículas pueden generar daños irreversibles sobre las comunidades bacterianas del sistema de lodos activados.

El efecto de Ni, Cd y Co sobre un proceso modelo de lodos activados fue determinado por microrrespirometría. Este método permitió evaluar varios parámetros importantes como la concentración del inhibidor, sustrato y biomasa así como el tiempo de exposición. De igual manera que para las nanopartículas de plata se determinaron los parámetros cinéticos del sistema y se concluyó que el tipo de inhibición que presentan esos metales pesados es acompetitiva.

Asimismo, se observó que el metal pesado que tiene el mayor efecto inhibitorio sobre los lodos activados es el Ni, seguido del Cd y por último el Co. Se pudo concluir que el efecto inhibitorio de Ni, Cd y Co, es una matriz que involucra muchos parámetros y que la respuesta observada depende de las características de las aguas residuales así como de las condiciones de operación del sistema.

Finalmente, la microrrespirometría permitió caracterizar el efecto a corto y largo plazo de una mezcla de Cu, Ni, y Zn en un sistema de lodos activados. Esta caracterización incluyó la determinación del grado de inhibición y la determinación de los principales parámetros cinéticos del bioproceso. Cuando el efecto inhibidor de la mezcla de metales fue valorado sobre un sistema que no fue aclimatado a los metales pesados, se observó que la inhibición incrementa proporcionalmente con la concentración de metales pesados, solo en la última etapa se observó un efecto antagónico. Sin embargo, cuando el efecto inhibitorio fue valorado en un sistema de lodos activados previamente aclimatado a la mezcla de metales pesados, solo se observaron efectos transitorios de inhibición al inicio de cada etapa, seguido por una rápida adaptación a la nueva concentración de inhibidor. Se puede concluir que la microrrespirometría permitió cuantificar los periodos de aclimatación-inhibición de los microorganismos en el sistema de lodos activados. Sin embargo a pesar de que los microorganismos demostraron ser capaces de aclimatarse a la presencia de metales pesados, un daño importante en la operación del sistema fue observado.

Concluyendo este trabajo, podemos confirmar que la microrrespirometría es una herramienta de alto rendimiento que permitió caracterizar exhaustivamente sistemas de tratamiento de aguas residuales expuestos a compuestos tóxicos. El uso de este método puede ayudar a entender de mejor manera estos bioprocesos, para su diseño, control y optimización. La principal ventaja

del método de microrespirometría es que permite realizar simultáneamente ensayos respirométricos, en una gama de 24 condiciones diferentes. Las aplicaciones potenciales de este método son elevadas, por lo cual la microrespirometría podría superar los límites actuales de nuestro conocimiento de los bioprocesos aerobios.

BIBLIOGRAFÍA.

Aborhey S., Williamson D. (1978) State and parameter estimation of microbial growth processes. *Automatica*, 14:493-498.

Ahluwalia S.S., Goyal D. (2007) Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresour. Technol.* 98:2243-2257.

Amanullah A., Otero J.M., Mikola M., Hsu A., Zhang J., Aunins J., Schreyer H.B., Hope J.A., Russo A.P. (2010) Novel micro-bioreactor high throughput technology for cell culture process development: Reproducibility and scalability assessment of fed-batch CHO cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 106:57-67.

Anderson K., Koopman B., Bitton G. (1988) Evaluation of int-dehydrogenase assay for metal pesado inhibition of activated sludge, *Water Res.* 22:349–353.

Arvidsson R., Molander S., Sandén B.A. (2011) Impacts of a silver-coated future. *J. Ind. Ecol.* 15:844-854.

Aslan S., Sozudogru O. (2017) Individual and combined effects of nickel and copper on nitrification organisms. *Ecol. Eng.* 99:126-133.

Avcioglu E., Karahan-Gül Ö., Orhon D. (2003) Estimation of stoichiometric and kinetic coefficients of ASM3 under aerobic and anoxic conditions via respirometry. *Water Sci. Technol.* 48:185-194.

- Badino A.C., Facciotti M., Schmidell W. (2000) Improving k_{La} determination in fungal fermentation, taking into account electrode response time. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 75:469-474.
- Benes O., Spanjers H., Holba M. (2002) Respirometry techniques and activated sludge models. *Water Sci. Technol.* 46:1-6.
- Benn T.M., Westerhoff P. (2008) Nanoparticle silver released into water from commercially available sock fabrics. *Environ. Sci. Technol.* 42:4133-4139.
- Bestawy E.E., Helmy S., Hussien H., Fahmy M., Amer R. (2013) Bioremediation of heavy metal-contaminated effluent using optimized activated sludge bacteria. *Appl. Water Sci.* 3:181-192.
- Blaser S.A., Scheringer M., MacLeod M., Hungerbühler K. (2008) Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: contribution of nano-functionalized plastics and textiles *Sci. Total Environ.* 390:396-409.
- Boparai H.K., Joseph M., O'Carroll D.M. (2013) Cadmium (Cd^{2+}) removal by nano zerovalent iron: surface analysis, effects of solution chemistry and surface complexation modeling. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20:6210–6221.
- Boruah D. (2012) Interaction of Cobalt (II) and Nickel (II) ions with Amino acids in Aqueous solution: A Spectrophotometric Study, *Int. J. Sci. Res. Publ.* 2:366.
- Brar S.K., Verma M., Tyagi R.D., Surampalli R.Y. (2010) Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge—Evidence and impacts. *Waste. Manag.* 30:504-520.

- Buzier R., Tusseau-Vuillemin M.H., Dit Meriadec C.M., Rousselot O., Mouchel J.M. (2006) Trace metal speciation and fluxes within a major French wastewater treatment plant: impact of the successive treatments stages. *Chemosphere* 65:2419-2426.
- Carvalho G., Novais J.M., Vanrolleghem P.A., Pinheiro H.M. (2002) Optimal operation for timely adaptation of activated sludge plants to changes in the surfactant composition of wastewater. *Water Sci. Technol.* 45:345-353.
- Çeçen F., Gürsoy G. (2000) Characterization of landfill leachates and studies on heavy metal removal. *J. Environ. Monit.* 2:436-442.
- Çeçen F., Kılıç B. (2016) Inhibitory effect of silver on activated sludge: effect of organic substrate and the carbon to nitrogen ratio. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91:1190-1198.
- Çeçen F., Semerci N., Geyik A.G. (2010) Inhibition of respiration and distribution of Cd, Pb, Hg, Ag and Cr species in a nitrifying sludge. *J. Hazard. Mater.* 178:619-627.
- Çeçen F., Semerci N., Geyik A.G. (2010) Inhibitory effects of Cu, Zn, Ni and Co on nitrification and relevance of speciation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85:520-528.
- Chambers B.A., Afrooz A.N., Bae S., Aich N., Katz L., Saleh N.B., Kirisits M.J. (2013) Effects of chloride and ionic strength on physical morphology, dissolution, and bacterial toxicity of silver nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 48:761-769.
- Chandran K., Hu Z., Smets B.F. (2008) A critical comparison of extant batch respirometric and substrate depletion assays for estimation of nitrification biokinetics. *Biotechnol. Bioeng.* 101:62-72.

Chandran K., Smets B.F. (2000a) Single-step nitrification models erroneously describe batch ammonia oxidation profiles when nitrite oxidation becomes rate limiting. *Biotechnol. Bioeng.* 68:396-406.

Chandran K., Smets B.F. (2000b) Applicability of two-step models in estimating nitrification kinetics from batch respirograms under different relative dynamics of ammonia and nitrite oxidation. *Biotechnol. Bioeng.* 70:54-64.

Chaudhuri D., Majumder A., Misra A. K., Bandyopadhyay K. (2014) Cadmium removal by *Lemna minor* and *Spirodela polyrhiza* *Int. J. Phytoremediation.* 16:1119-1132.

Cecchi N., Marsili-Libelli S. (2005) Reliability of parameter estimation in respirometric models. *Water Res.* 39:3686-3696.

Chen G., Zhou Y., Zeng G., Liu H., Yan M., Chen A., He J. (2015) Alteration of culture fluid proteins by cadmium induction in *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Basic Microbiol.* 55:141-147.

Chen H.B., Wang D.B., Li X.M., Yang Q., Luo K., Zeng G.M., Tang M.L. (2014) Effects of Cd (II) on wastewater biological nitrogen and phosphorus removal. *Chemosphere.* 117:27-32.

Chen J., Tang Y.Q., Li Y., Nie Y., Hou L., Li X.Q., Wu X.L. (2014) Impacts of different nanoparticles on functional bacterial community in activated sludge. *Chemosphere* 104:141-148.

Chen S.F., Zhang H. (2012) Aggregation kinetics of nanosilver in different water conditions. *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.* 3:035006.

Chen Y., Chen H., Zheng X., Mu H. (2012) The impacts of silver nanoparticles and silver ions on wastewater biological phosphorous removal and the mechanisms. *J. Hazard. Mater.* 239:88-94.

Choi O., Deng K.K., Kim N.J., Ross Jr, L., Surampalli R.Y., Hu Z. (2008) The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water. Res.* 42:3066-3074.

Choi O.K., Hu Z.Q. (2009) Nitrification inhibition by silver nanoparticles. *Water. Sci. Technol.* 59:1699-1702.

Chudoba P., Capdeville B., Chudoba J. (1992) Explanation of biological meaning of the S_0/X_0 ratio in batch cultivation. *Water Sci. Technol.* 26:743-751.

Clesceri L.S., Eaton A.D., Greenberg A.E., American Public Health A., American Water Works A., Water E.F., Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association, 1998.

Cokgor E.U., Insel G., Katipoglu T., Orhon D. (2011). Biodegradation kinetics of peptone and 2, 6-dihydroxybenzoic acid by acclimated dual microbial culture. *Bioresour. Technol.* 102:567-575.

Cokgor E.U., Ozdemir S., Karahan O., Insel G., Orhon D., (2007) Critical appraisal of respirometric methods for metal inhibition on activated sludge, *J. Hazard. Mater.* 139:332–339.

Cole J.R., Halas N.J. (2006) Optimized plasmonic nanoparticle distributions for solar spectrum harvesting. *Appl. Phys. Lett.* 89:153120.

Deblonde T., Cossu-Leguille C., Hartemann P. (2011) Emerging pollutants in wastewater: a review of the literature. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 214:442-448.

Dircks K., Pind P.F., Mosbæk H., Henze M. (1999) Yield determination by respirometry-The possible influence of storage under aerobic conditions in activated sludge. *Water Sa* 25:69-74.

Drtil M., Nemeth P., Bodik I. (1993) Kinetic constants of nitrification. *Water Res.* 27:35-39.

Dunn I.J., Ingham J., Heinzle E., Prenosil J.E., *Biological Rection Engineering*, Weinheim: VCH, 2nd edn., 2003, pp 68-74.

El Bestawy E., Helmy S., Hussein H., Fahmy M. (2013a) Optimization and/or acclimatization of activated sludge process under metal pesados stress, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29:693–705.

El Bestawy E., Helmy S., Hussien H., Fahmy M., Amer R. (2013b) Bioremediation of metal pesado-contaminated effluent using optimized activated sludge bacteria, *Appl. Water Sci.* 3:181–192.

Ellis T.G., Barbeau D.S., Smets B.F., Grady Jr C.L. (1996) Respirometric technique for determination of extant kinetic parameters describing biodegradation. *Water Environ. Res.* 68:917-926.

Elnabarawy M.T., Robideau R.R., Beach S.A. (1988) Comparison of three rapid toxicity test procedures: Microtox, polytox, and activated sludge respiration inhibition, *Environ. Toxicol.* 3:361–370.

Esquivel-Rios I., González I., Thalasso F. (2014a) Microrespirometric characterization of activated sludge inhibition by copper and zinc. *Biodegradation* 25:867-879.

Esquivel-Rios I., Ramirez-Vargas R., Hernandez-Martinez G.R., Vital-Jacome M., Ordaz, A., Thalasso F. (2014b) A microrespirometric method for the determination of stoichiometric and kinetic parameters of heterotrophic and autotrophic cultures. *Biochem. Eng. J.* 83:70-78.

Feng Q., Xiao Y., Li X., Xue Z., Fang F., Cao J., Oleyiblo J.O. Hu Z. (2016) Using the dehydrogenase activity for alert of activated sludge system under different copper concentrations. *Desalin. Water Treat.* 57:17836-17843.

Ficara A. (2000) Comparison and combination of titrimetric and respirometric techniques to estimate nitrification kinetics parameters. *Water Sa* 26:217-224.

Förestner U., Wittmann G.T. (2012). *Metal pollution in the aquatic environment.* Springer-Verlag. 2ed ed, Berlin Heidelberg New York Tokyo 1983

Friedrichs F., Rudolph K.U., Nguyen B.H., Meinardi D., Genthe W., Trung D.Q. (2017) Improving the sensitivity of the activated sludge respiration inhibition test and verifying the results using an oxidation-reduction potential electrode. *Water Sci. Technol.* 75:247–254.

Geranio L., Heuberger M., Nowack B. (2009) The behavior of silver nanotextiles during washing. *Environ. Sci. Technol.* 43:8113-8118.

Gernaey K.V., van Loosdrecht M.C., Henze M., Lind M., Jørgensen, S.B. (2004) Activated sludge wastewater treatment plant modelling and simulation: state of the art. *Environ. Modell. Softw.* 19:763-783.

Geyik A. G., Çeçen F. (2016) Exposure of activated sludge to nanosilver and silver ion: Inhibitory effects and binding to the fractions of extracellular polymeric substances. *Bioresour. Technol.* 211:691-697.

- Giao N.T., Limpiyakorn T., Kunapongkiti P., Thuptimdang P., Siripattanakul-Ratpukdi S. (2017) Influence of silver nanoparticles and liberated silver ions on nitrifying sludge: ammonia oxidation inhibitory kinetics and mechanism. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24:9229-9240.
- Giao N.T., Limpiyakorn T., Siripattanakul-Ratpukdi S. (2012) Inhibition kinetics of ammonia oxidation influenced by silver nanoparticles. *Water, Air, Soil, Pollut.* 223:5197-5203.
- Gikas P. (2007) Kinetic responses of activated sludge to individual and joint nickel (Ni(II)) and cobalt (Co(II)): An isobolographic approach, *J. Hazard. Mater.* 143:246–256.
- Gikas P. (2008) Single and combined effects of nickel (Ni (II)) and cobalt (Co (II)) ions on activated sludge and on other aerobic microorganisms: a review. *J. Hazar. Mater.* 159:87-203.
- Gikas P., Romanos P. (2006) Effects of tri-valent (Cr (III)) and hexa-valent (Cr (VI)) chromium on the growth of activated sludge. *J. Hazar. Mater.* 133:212-217.
- Gottschalk F., Sonderer T., Scholz R.W., Nowack B. (2009) Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. *Environ. Sci. Technol.* 43:9216-9222.
- Gottschalk F., Sun T., Nowack B. (2013) Environmental concentrations of engineered nanomaterials: review of modeling and analytical studies. *Environ. Pollut.* 181:287-300.
- Grady C.L., Smets B.F., Barbeau D.S. (1996) Variability in kinetic parameter estimates: a review of possible causes and a proposed terminology. *Water Res.* 30:742-748.
- Guisasola A., Jubany I., Baeza J.A., Carrera J., Lafuente J. (2005) Respirometric estimation of the oxygen affinity constants for biological ammonium and nitrite oxidation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 80:388-396.

Guisasola A., Pijuan M., Baeza J.A., Carrera J., Lafuente J. (2006) Improving the start-up of an EBPR system using OUR to control the aerobic phase length: a simulation study. *Water Sci. Technol.* 53:253-262.

Gustafsson J.P., Visual MINTEQ Version 3.1, Department of Sustainable Development, Environmental Science and Engineering, KTH, Stockholm, 2013.

Gutiérrez M., Etxebarria J., De Las Fuentes L. (2002) Evaluation of wastewater toxicity: Comparative study between Microtox and activated sludge oxygen uptake inhibition, *Water Res.* 36:919–924.

Halim C.E., Scott J.A., Natawardaya H., Amal R., Beydoun D., Low G. (2004) Comparison between acetic acid and landfill leachates for the leaching of Pb (II), Cd (II), As (V), and Cr (VI) from cementitious wastes. *Environ Sci Technol.* 38:3977-3983.

Han J. C., Liu Y., Liu X., Zhang Y., Yan Y.W., Dai R.H., Zha X.O., Wang C.S. (2013) The effect of continuous Zn (II) exposure on the organic degradation capability and soluble microbial products (SMP) of activated sludge. *J. Hazard. Materials*, 244, 489-494.

Hartmann G., Schuster M. (2013) Species selective preconcentration and quantification of gold nanoparticles using cloud point extraction and electrothermal atomic absorption spectrometry. *Anal. Chem. Acta*, 761:27-33.

He D., Bligh M.W., Waite T.D. (2013) Effects of aggregate structure on the dissolution kinetics of citrate-stabilized silver nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 47:9148-9156.

Hendren C.O., Badireddy A.R., Casman E., Wiesner M.R. (2013) Modeling nanomaterial fate in wastewater treatment: Monte Carlo simulation of silver nanoparticles (nano-Ag). *Sci. Total Environ.* 449:418-425.

Hernandez-Martinez G.R., Ortiz-Alvarez D., Perez-Roa M., Urbina-Suarez N.A., Thalasso F. (2018) Multiparameter analysis of activated sludge inhibition by nickel, cadmium, and cobalt. *J. Hazard. Mater.* 351:63-70

Hoque M.E., Khosravi K., Newman K., Metcalfe C.D. (2012) Detection and characterization of silver nanoparticles in aqueous matrices using asymmetric-flow field flow fractionation with inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1233:109-115.

Hreiz R., Latifi M.A., Roche N. (2015) Optimal design and operation of activated sludge processes: state-of-the-art. *Chem Eng. J.* 281:900-920.

Hu J.L., He X.W., Wang C.R., Li J.W., Zhang C.H. (2012) Cadmium adsorption characteristic of alkali modified sewage sludge, *Bioresour. Technol.* 121:25-30.

Hu J.L., He X.W., Wang C.R., Li J.W., Zhang C.H. (2012) Cadmium adsorption characteristic of alkali modified sewage sludge. *Bioresour. Technol.* 121:25-30.

Hu Z., Chandran K., Grasso D., Smets B.F. (2002) Effect of nickel and cadmium speciation on nitrification inhibition. *Environ. Sci. Technol.* 36:3074-3078.

Hu Z., Chandran K., Grasso D., Smets B.F. (2003) Impact of metal sorption and internalization on nitrification inhibition, *Environ. Sci. Technol.* 37:728-734.

Hu Z., Chandran K., Grasso D., Smets B.F. (2004) Comparison of nitrification inhibition by metals in batch and continuous flow reactors. *Water Res.* 38:3949-3959.

Insel G., Karahan O., Özdemir S., Pala L., Katipoglu T., Cokgör E.U., Orhon D. (2006) Unified basis for the respirometric evaluation of inhibition for activated sludge, *J. Environ. Sci. Heal. Part A.* 41:1763-1780.

Jeong E., Im W.T., Kim D.H., Kim M.S., Kang S., Shin H.S., Chae S.R. (2014) Different susceptibilities of bacterial community to silver nanoparticles in wastewater treatment systems. *J. Environ. Sci. Health, Part A: Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng.* 49:685-693.

Jeppsson U. *Modelling Aspects of Wastewater Treatment Processes.* Tesis doctoral, Lund Institute of Technology, 1996.

Ju-Nam Y., Lead J.R. (2008) Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Sci. Total Environ.* 400:396-414.

Kaegi R., Voegelin A., Ort C., Sinnet B., Thalmann B., Krismer J., Hagendorfer H., Elumelu E., Mueller, E. (2013) Fate and transformation of silver nanoparticles in urban wastewater systems. *Water Res.* 47:3866-3877.

Karahan Ö., Dogruel S., Dulekgurgen E., Orhon D. (2008) COD fractionation of tannery wastewaters-particle size distribution, biodegradability and modeling. *J. Environ. Sci. Health, Part A: Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng.* 41:1763-1780.

Kelly C.J., Tumsaroj N., Lajoie C.A. (2004) Assessing wastewater metal toxicity with bacterial bioluminescence in a bench-scale wastewater treatment system. *Water Res.* 38:423-431.

Khor S.M., Ng S.L., Lim P.E., Seng C.E. (2011) The effects of nickel (II) and chromium (VI) on oxygen demand, nitrogen and metal removal in a sequencing batch reactor. *Environ. Technol.* 32:1903-1914.

- Kim S.H., Choi B.S., Kang K., Choi Y. S., Yang, S. I. (2007) Low temperature synthesis and growth mechanism of Ag nanowires. *J. Alloys Compd.* 433:261-264.
- Kim Y.M., Park D., Lee D.S., Park J.M. (2008) Inhibitory effects of toxic compounds on nitrification process for cokes wastewater treatment. *J. Hazard. Mater.* 152:915-921.
- Kirk T.V., Szita N. (2013) Oxygen transfer characteristics of miniaturized bioreactor systems. *Biotechnol. Bioeng.* 110:1005-1019.
- Kiser M.A., Ryu H., Jang H., Hristovski K., Westerhoff P. (2010) Biosorption of nanoparticles to heterotrophic wastewater biomass. *Water Res.* 44:4105-4114.
- Kong Z., Vanrolleghem P., Verstraete W. (1994) Automated respiration inhibition kinetics analysis (ARIKA) with a respirographic biosensor. *Water Sci. Technol.* 30:275-284.
- Kong Z., Vanrolleghem P., Willems P., Verstraete W. (1996) Simultaneous determination of inhibition kinetics of carbon oxidation and nitrification with a respirometer, *Water Res.* 30:825-836.
- Kostov Y., Harms P., Randers-Eichhorn L., Rao G. (2001). Low-cost microbioreactor for high-throughput bioprocessing. *Biotechnol. Bioeng.* 72:346-352.
- Kovárová-Kovar K., Egli T. (1998) Growth kinetics of suspended microbial cells: from single-substrate-controlled growth to mixed-substrate kinetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62:646-666.
- Lee S.S., Jackman A.P., Schroeder E.D. (1975) A two-state microbial growth kinetics model. *Water Res.* 9:491-498.

Levard C., Mitra S., Yang T., Jew A.D., Badireddy A.R., Lowry G.V., Brown Jr G.E. (2013) Effect of chloride on the dissolution rate of silver nanoparticles and toxicity to *E. coli*. *Environ. Sci. Technol.* 47:5738-5745.

Li J., Liu X., Liu Y., Ramsay J., Yao C., Dai R. (2011) The effect of continuous exposure of copper on the properties and extracellular polymeric substances (EPS) of bulking activated sludge. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 18:1567-1573.

Li L., Hartmann G., Doublinger M., Schuster M. (2013) Quantification of nanoscale silver particles removal and release from municipal wastewater treatment plants in Germany. *Environ. Sci. Technol.* 47:731-723.

Li X., Lenhart J.J., Walker H.W. (2010) Dissolution-accompanied aggregation kinetics of silver nanoparticles. *Langmuir* 26:16690-16698.

Liang Z., Das A., Hu Z. (2010) Bacterial response to a shock load of nanosilver in an activated sludge treatment system. *Water Res.* 44:5432-5438.

Liu G., Wang D., Wang J., Mendoza C. (2011) Effect of ZnO particles on activated sludge: role of particle dissolution. *Sci. Total Environ.* 409:2852-2857.

Liu Y., Fang H.H. (2003) Influences of extracellular polymeric substances (EPS) on flocculation, settling, and dewatering of activated sludge. *Crit. Rev. Environ Sci. and Technol.* 33:237-273

Liu Y., Lam M.C., Fang H.H. (2001) Adsorption of metal pesados by EPS of activated sludge. *Water Sci. Technol.* 43:59-66.

Madoni P., Romeo M.G. (2006) Acute toxicity of metal pesados towards freshwater ciliated protists, *Environ. Pollut.* 141:1-7.

Malamis S., Katsou E., Daskalakis N., Haralambous K.J. (2012) Investigation of the inhibitory effects of metal pesados on heterotrophic biomasa activity and their mitigation through the use of natural minerals., *J. Environ. Sci. Health. Part A-Tox/ Hazard. Subst. Environ. Eng.* 47:1992-1999.

Mallevre F., Fernandes, T.F., Aspray T.J. (2014) Silver, zinc oxide and titanium dioxide nanoparticle ecotoxicity to bioluminescent *Pseudomonas putida* in laboratory medium and artificial wastewater. *Environ. Pollut.* 195:218-225.

Manohar D.M., Noeline B.F., Anirudhan T.S. (2006) Adsorption performance of Al-pillared bentonite clay for the removal of cobalt (II) from aqueous phase. *Appl. Clay Sci.* 31:194-206.

McCarthy P.L. (1964) Anaerobic waste treatment fundamentals. Part III: toxic materials and their control. *Public works*, 95:91-94.

Metcalf and Eddy, Burton, F.L., Stensel H.D., Tchobanoglous G. (2003) *Wastewater engineering: treatment and reuse*. 4th ed. McGraw Hill.

Michels C., Perazzoli S., Soares H. M. (2017) Inhibition of an enriched culture of ammonia oxidizing bacteria by two different nanoparticles: Silver and magnetite. *Sci. Total Environ.*, 586:995-1002.

Mitrano D.M., Leshner E.K., Bednar A., Monserud J., Higgins C.P., Ranville J.F. (2012) Detecting nanoparticulate silver using single-particle inductively coupled plasma–mass spectrometry. *Environ. Toxicol. Chem.* 31:115-121.

- Moore M.N. (2006) Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment?. *Environ. Int.* 32:967-976.
- Moreno J. (1999) Optimal time control of bioreactors for the wastewater treatment. *Optim. Contr. Appl. Met.* 20:145-164.
- Mueller N.C., Nowack B. (2008) Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environ. Sci. Technol.* 42:4447-4453.
- Mumper C.K., Ostermeyer A.K., Semprini L., Radniecki T.S. (2013) Influence of ammonia on silver nanoparticle dissolution and toxicity to *Nitrosomonas europaea*. *Chemosphere* 93:2493-2498.
- Nowack B., Bucheli T.D. (2007) Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ. Pollut.* 150:5-22.
- Ochoa-Herrera V., León G., Banihani Q., Field J.A., Sierra-Alvarez R. (2011) Toxicity of copper(II) ions to microorganisms in biological wastewater treatment systems, *Sci. Total Environ.* 412-413:380-385.
- Okey R.W., Stensel H.D. (1993) Uncouplers and activated sludge—the impact on synthesis and respiration. *Toxicol. Environ. Chem.* 40:235-254.
- Oliveira C.S., Ordaz A., Ferreira E.C., Alves M., Thalasso F. (2011) In situ pulse respirometric methods for the estimation of kinetic and stoichiometric parameters in aerobic microbial communities. *Biochem. Eng. J.* 58:12-19.

- Ong S.A., Toorisaka E., Hirata M., Hano T. (2004) Effects of nickel(II) addition on the activity of activated sludge microorganisms and activated sludge process, *J. Hazard. Mater.* 113:111–121.
- Ordaz A., Oliveira C.S., Aguilar R., Carrión M., Ferreira E.C., Alves M., Thalasso F. (2008) Kinetic and stoichiometric parameters estimation in a nitrifying bubble column through “in-situ” pulse respirometry. *Biotechnol. Bioeng.* 100:94-102.
- Ordaz A., Oliveira C.S., Quijano G., Ferreira E.C., Alves M., Thalasso F. (2012). Kinetic and stoichiometric characterization of a fixed biofilm reactor by pulse respirometry. *J. Biotechnol.* 157:173-179.
- Orhon D. (2015) Evolution of the activated sludge process: the first 50 years. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 90:608-640.
- Orhon D., Cokgor E.U., Insel G., Karahan O., Katipoglu T. (2009). Validity of Monod kinetics at different sludge ages–peptone biodegradation under aerobic conditions. *Bioresour. Technol.* 100:5678-5686.
- Orupõld K., Maširin A., Tenno T. (2001) Estimation of biodegradation parameters of phenolic compounds on activated sludge by respirometry. *Chemosphere* 44:1273-1280.
- Ouyang F., Zhai H., Ji M., Zhang H., Dong Z. (2016) Physiological and transcriptional responses of nitrifying bacteria exposed to copper in activated sludge. *J. Hazard. Mater.* 301:172-178
- Pai T.Y., Wang S.C., Lo H.M., Chiang C.F., Liu M.H., Chiou R.J., Chen W.Y., Hung P.S., Liao W.C., Leu H.G. (2009) Novel modeling concept for evaluating the effects of cadmium and

copper on heterotrophic growth and lysis rates in activated sludge process, *J. Hazard. Mater.* 166:200–206.

Pal S., Tak Y.K. Song J.M. (2007) Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:1712-1720.

Piccinno F., Gottschalk F., Seeger S., Nowack B. (2012) Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *J. Nanopart. Res.* 14:1109.

Principi P., Villa F., Bernasconi M., Zanardini E. (2006) Metal toxicity in municipal wastewater activated sludge investigated by multivariate analysis and in situ hybridization. *Water Res.* 40:99-106.

Radniecki T.S., Stankus D.P., Neigh A., Nason J.A., Semprini L. (2011) Influence of liberated silver from silver nanoparticles on nitrification inhibition of *Nitrosomonas europaea* *Chemosphere* 85:43-49.

Ramirez-Vargas R., Ordaz A., Carrion M., Hernandez-Paniagua I.Y., Thalasso F. (2013). Comparison of static and dynamic respirometry for the determination of stoichiometric and kinetic parameters of a nitrifying process. *Biodegradation* 24:675-684.

Ramirez-Vargas R., Vital-Jacome M., Camacho-Perez E., Hubbard, L., Thalasso F. (2014) Characterization of oxygen transfer in a 24-well microbioreactor system and potential respirometric applications. *J. Biotechnol.* 186:58-65.

Rand B.P., Peumans P., Forrest S.R. (2004) Long-range absorption enhancement in organic tandem thin-film solar cells containing silver nanoclusters. *J. Appl. Phys.* 96:7519-7526.

- Ricco G., Tomei M.C., Ramadori R., Laera G. (2004) Toxicity assessment of common xenobiotic compounds on municipal activated sludge: comparison between respirometry and Microtox®. *Water Res.* 38:2103-2110.
- Richardson S.D. (2009) Water analysis: emerging contaminants and current issues. *Anal. Chem.* 81:4645-4677.
- Riefler R.G., Ahlfeld D.P., Smets B.F. (1998) Respirometric assay for biofilm kinetics estimation: parameter identifiability and retrievability. *Biotechnol. Bioeng.* 57:35-45.
- Roš M., Dular M. (1992) Determination of some kinetic parameters by respirometry. *Water Sci. Technol.* 26:2535-2538.
- Sambhy V., MacBride M.M., Peterson B.R., Sen A. (2006) Silver bromide nanoparticle/polymer composites: dual action tunable antimicrobial materials. *Chem. Soc.* 128:9798-9808.
- Savage N., Diallo M.S. (2005) Nanomaterials and water purification: opportunities and challenges. *J. Nanopart. Res.* 7:331-342.
- Šćiban M., Radetić B., Kevrešan Ž., Klačnjak M. (2007) Adsorption of heavy metals from electroplating wastewater by wood sawdust. *Bioresour. Technol.* 98:402-409.
- Sheng Z., Liu Y. (2011) Effects of silver nanoparticles on wastewater biofilms. *Water Res.* 45:6039-6050.
- Singh K.P., Mohan D., Sinha S., Dalwani R. (2004) Impact assessment of treated/untreated wastewater toxicants discharged by sewage treatment plants on health, agricultural, and environmental quality in the wastewater disposal area. *Chemosphere.* 55:227-255.

- Sipkema E.M., De Koning W., Ganzeveld K.J., Janssen D.B., Beenackers A.A.C.M. (1998) Experimental pulse technique for the study of microbial kinetics in continuous culture. *J. Biotechnol.* 64:159-176.
- Siripattanakul-Ratpukdi S., Fürhacker M. (2014) Issues of silver nanoparticles in engineered environmental treatment systems. *Water Air Soil Pollut.* 225:1939.
- Smolyakov B.S., Ryzhikh A.P., Bortnikova S.B., Saeva O.P., Chernova N.Y. (2010) Behavior of metals (Cu, Zn and Cd) in the initial stage of water system contamination: Effect of pH and suspended particles, *Appl. Geochemistry.* 25:1153–1161.
- Spanjers H., Takács I., Brouwer H. (1999) Direct parameter extraction from respirograms for wastewater and biomass characterization. *Water Sci. Technol.* 39:137-145.
- Spanjers H., Vanrolleghem P. (1995) Respirometry as a tool for rapid characterization of wastewater and activated sludge. *Water Sci. Technol.* 31:105-114.
- Spanjers H., Vanrolleghem P., Nguyen K., Vanhooren H., Patry G.G. (1998) Towards a simulation-benchmark for evaluating respirometry-based control strategies. *Water Sci. Technol.* 37:219-226.
- Stanković V., Božić D., Gorgievski M., Bogdanović G. (2009) Heavy metal ions adsorption from mine waters by sawdust. *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* 15:237-249.
- Stasinakis A.S., Thomaidis N.S., Giannes A.S., Lekkas T.D. (2003) Effect of arsenic and mercury speciation on inhibition of respiration rate in activated sludge systems. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 10:177-182.

Subbiah R.M., Sastry C.A., Agamuthu P. (2000) Removal of zinc from rubber thread manufacturing industry wastewater using chemical precipitant/flocculant. *Environ. Prog. Sustain. Energy.* 19:299-304.

Sun F.L., Fan L.L., Xie G.J. (2016) Effect of copper on the performance and bacterial communities of activated sludge using Illumina MiSeq platforms. *Chemosphere.* 156:212-219.

Sun J., Yang Q., Wang D., Wang S., Chen F., Zhong Y., Yi K. Yao F., Jiang C., Li S., Li X. Zeng G. (2017) Nickel toxicity to the performance and microbial community of enhanced biological phosphorus removal system. *Chem. Eng. J.* 313:415-423.

Surmacz-Gorska J., Gernaey K., Demuynck C., Vanrolleghem P., Verstraete W. (1995) Nitrification process control in activated sludge using oxygen uptake rate measurements. *Environ. Technol.* 16:569-577.

Taha M., Khalil M.M. (2005) Mixed-ligand complex formation equilibria of cobalt (II), nickel (II), and copper (II) with N, N-bis (2-hydroxyethyl) glycine (bicine) and some amino acids, *J. Chem. Eng. Data.* 50:157–163.

Tolaymat T.M., El Badawy A.M., Genaidy A., Scheckel K.G., Luxton T.P., Suidan M. (2010) An evidence-based environmental perspective of manufactured silver nanoparticle in syntheses and applications: a systematic review and critical appraisal of peer-reviewed scientific papers. *Sci. Total Environ.* 408:999-1006.

Tziampazis E., Sambanis A. (1994) Modeling of cell culture processes. *Cytotechnology* 14:191-204.

Üstün G.E. (2009) Occurrence and removal of metals in urban wastewater treatment plants. *J. Hazard. Mater.* 172:833-838.

Van Nostrand J.D., Sowder A.G., Bertsch P.M., Morris P.J. (2005) Effect of pH on the toxicity of nickel and other divalent metals to *Burkholderia cepacia* PR1301. *Environ. Toxicol. Chem.* 24:2742-2750.

Vanková S., Kupec J., Hoffmann J. (1999) Toxicity of chromium to activated sludge. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 42:16–21.

Vanrolleghem P.A., Gernaey K., Petersen B., De Clercq B., Coen F., Ottoy J. P. (1998) Limitations of short-term experiments designed for identification of activated sludge biodegradation models by fast dynamic phenomena. *IFAC Proceedings Volumes*, 31:535-540.

Vanrolleghem P.A., Verstraete W. (1993) Simultaneous biokinetic characterization of heterotrophic and nitrifying populations of activated sludge with an on-line respirographic biosensor. *Water Sci. Technol.* 28:377-387.

Varner K., Sanford J., El-Badawy A., Feldhake D., Venkatapathy R. (2010) State of the science literature review: everything nanosilver and more. US E.P.A, Washington DC, 363.

Villaverde S., Fdz-Polanco F., Lacalle M.L., Garcia P.A. (2000) Influence of the suspended and attached biomass on the nitrification in a two submerged biofilters in series system. *Water Sci. Technol.* 41:169-176

Vital-Jacome M., Buitrón G., Moreno-Andrade I., Garcia-Rea V., Thalasso F. (2016) Microrespirometric determination of the effectiveness factor and biodegradation kinetics of

aerobic granules degrading 4-chlorophenol as the sole carbon source, *J. Hazard. Mater.* 313:112–121.

Volskay Jr V.T., Grady Jr C.L. (1990) Respiration inhibition kinetic analysis. *Water Res.* 24:863-874.

Von Sperling M., de Lemos Chernicharo C.A. (2017) Biological wastewater treatment in warm climate regions. IWA publishing. pp. 857

Wang L., Liu Y., Li J., Liu X., Dai R., Zhang Y., Zhang S., Li, J. (2010) Effects of Ni²⁺ on the characteristics of bulking activated sludge. *J. Hazard. Mater.* 181:460-467.

Wang W., Li X., Wang P., Song X., Jiang D., Wang K. (2013) Long-term effects of Ni (II) on the performance and activity of activated sludge processes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 92:144-149.

Whiteley C.M., Dalla Valle M., Jones K.C., Sweetman A. J. (2013) Challenges in assessing release, exposure and fate of silver nanoparticles within the UK environment. *Environ. Sci. Process Impact.* 15:2050-2058

Wolfbeis O.S. (2015) Luminescent sensing and imaging of oxygen: Fierce competition to the Clark electrode. *BioEssays* 37:921-928.

Wong K.Y., Zhang M.Q., Li X.M., Lo W. (1997) A luminescence-based scanning respirometer for metal pesado toxicity monitoring, *Biosens. Bioelectron.* 12:125-133.

Xiao-Hong Z., Tong Y., Han-Chang S., Hui-Ming S. (2011) Temporal and spatial inhibitory effects of zinc and copper on wastewater biofilms from oxygen concentration profiles determined by microelectrodes. *Water Res.* 45:953-959.

Xiu Z.M., Ma J., Alvarez P.J. (2011) Differential effect of common ligands and molecular oxygen on antimicrobial activity of silver nanoparticles versus silver ions. *Environ. Sci. Technol.* 45:9003-9008.

Xu Q., Li X., Ding R., Wang D., Liu Y., Wang Q., Zhao J., Chen F., Zeng G., Yang Q., Li H. (2017) Understanding and mitigating the toxicity of cadmium to the anaerobic fermentation of waste activated sludge. *Water Res.* 124:269-279.

Yang Y., Quensen J., Mathieu J., Wang Q., Wang J., Li M., Tiedje J.M., Alvarez, P.J. (2014) Pyrosequencing reveals higher impact of silver nanoparticles than Ag⁺ on the microbial community structure of activated sludge. *Water Res.* 48:317-325.

Yang Y., Wang J., Xiu Z., Alvarez P.J. (2013) Impacts of silver nanoparticles on cellular and transcriptional activity of nitrogen-cycling bacteria. *Environ. Toxicol. Chem.* 32:1488-1494.

You S.J., Tsai Y.P., Huang R.Y. (2009) Effect of metal pesados on nitrification performance in different activated sludge processes, *J. Hazard. Mater.* 165:987–994.

Yu S., Yin Y., Zhou X., Dong L., Liu J. (2016) Transformation kinetics of silver nanoparticles and silver ions in aquatic environments revealed by double stable isotope labeling. *Environ. Sci. Nano.* 3:883-893.

Yuan Z., Li J., Cui L., Xu B., Zhang H., Yu C.P. (2013) Interaction of silver nanoparticles with pure nitrifying bacteria. *Chemosphere* 90:1404-1411.

Yuan Z.H., Yang X., Hu A., Yu C.P. (2015) Long-term impacts of silver nanoparticles in an anaerobic–anoxic–oxic membrane bioreactor system. *Chem. Eng. J.* 276:83-90.

Yuan Z.H., Yang X., Hu A., Zheng Y.M., Yu C.P. (2016) Assessment of the fate of silver nanoparticles in the A2O-MBR system. *Sci. Total Environ.* 544:901-907.

Zare M.R., Amin M.M., Hemmati-Borji S., Nikaeen M., Bina B., Mirhosseini S.H., Asadi A. (2015) Modified dehydrogenase enzyme assay for evaluation of the influence of Hg, Cd, and Zn on the bacterial community structure of a wastewater treatment plant. *Toxicol. Environ. Chem.* 97:552–562.

Zeng A.P., Deckwer W.D. (1995) A kinetic model for substrate and energy consumption of microbial growth under substrate-sufficient conditions. *Biotechnol. Prog.* 11:71-79.

Zhai H.J., Sun D.W., Wang H.S. (2006) Catalytic properties of silica/silver nanocomposites. *Nanosci. Nanotechnol.* 6:1968-1972

Zhang W., Xiao B., Fang, T. (2018) Chemical transformation of silver nanoparticles in aquatic environments: mechanism, morphology and toxicity. *Chemosphere* 191:324-334.

Zhang X., Zhou Y., Zhang N., Zheng K., Wang L., Han G., Zhang H. (2017). Short-term and long-term effects of Zn (II) on the microbial activity and sludge property of partial nitrification process. *Bioresour. Technol.* 228:315-321.

Zhang Z., Gao P., Li M., Cheng J., Liu W., Feng Y. (2016) Influence of Silver nanoparticles on nutrient removal and microbial communities in SBR process after long-term exposure. *Sci. Total Environ.* 569:234-243.

Zhang Z.Z., Xu J.J., Shi Z.J., Cheng Y.F., Ji Z.Q., Deng R., Jin R.C. (2017) Combined impacts of nanoparticles on anammox granules and the roles of EDTA and S²⁻ in attenuation. *J. Hazard. Mater.* 334:49-58.

ANEXO 1. ARTICULOS PUBLICADOS.



Multiparameter analysis of activated sludge inhibition by nickel, cadmium, and cobalt

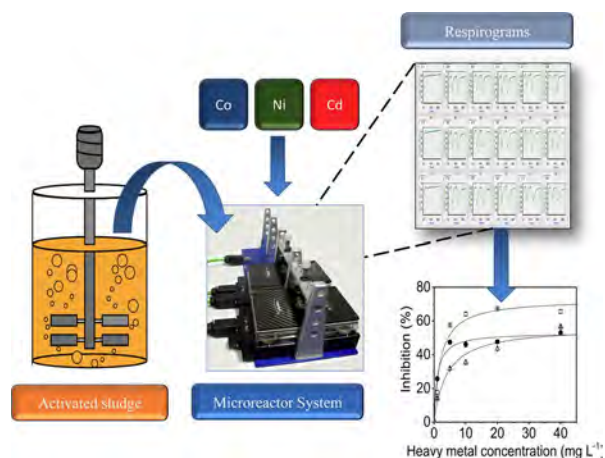


Gabriel R. Hernandez-Martinez^a, Daniela Ortiz-Alvarez^{a,b}, Michael Perez-Roa^{a,b},
Nestor Andres Urbina-Suarez^b, Frederic Thalasso^{a,*}

^a Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (Cinvestav), Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Av. IPN 2508, San Pedro Zacatenco, 07360, Mexico City, Mexico

^b Universidad Francisco de Paula Santander, Av. Gran Colombia 12E-96, San José de Cúcuta, Colombia

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Keywords:

Microrespirometry
Models
Kinetic parameters
Exposure time
Toxicity

ABSTRACT

Activated sludge processes are often inhibited by nickel, cadmium, and cobalt. The inhibitory effect of these heavy metals on a synthetic wastewater treatment process was tested through pulse microrespirometry; i.e., pulse of substrate injected in a microreactor system. The inhibitory effect was tested under different conditions including the heavy metals, substrate and biomass concentrations, and exposure time. The inhibitory effect was quantified by the percentage of inhibition, half saturation constant (K_s), inhibition constant (K_I), and maximum oxygen uptake rate (OUR_{max}). The results indicated that, in a range of concentration from 0 to 40 mg L⁻¹, the three heavy metals exerted an uncompetitive and incomplete inhibitory effect, with a maximum inhibition of 67, 57, and 53% for Ni, Co, and Cd, respectively. An increase of the biomass concentration by 620% resulted in a decrease of the inhibition by 47 and 69% for Co and Cd, respectively, while no effect was observed on Ni inhibition. An increase of the substrate concentration by 87% resulted in an increase of the inhibition by 24, 70, and 47% for Ni, Co and Cd, respectively. In the case of nickel and cadmium, an increase in the exposure time to the heavy metals also increased the inhibition.

* Corresponding author.

E-mail address: thalasso@cinvestav.mx (F. Thalasso).

1. Introduction

Activated sludge processes are often inhibited by heavy metals such as nickel (Ni), cadmium (Cd), and cobalt (Co). For example, Ni is found in the effluents of several industries, including coil coating, copper forming, electrical and electronic components manufacturing, iron and steel processing and electroplating, where its concentration can reach up to 2950 mg L⁻¹ [1]. Large quantities of Cd are discharged from a wide range of industrial activities including mining, combustion of fossil fuels, or the production and use of batteries [2–4]. Cobalt is also found in the effluents of many industries including the electroplating, metallurgical, mining, pigments and paints, and electronics industries, as well as nuclear power plants [5]. The treatment of municipal sewage and industrial wastewater is widely done through activated sludge processes [6], in such manner that Ni, Cd, and Co might potentially affect the bacterial aggregates and other associated organisms involved in these processes [7]. The effects of these heavy metals have been previously studied and the toxicity of each one of them, to activated sludge, has been established (Table 1), mostly through the determination of the concentration that causes a 50% inhibition (*IC*₅₀). Ni has been reported to affect activated sludge at an average *IC*₅₀ of 89.5 ± 71.0 mg L⁻¹, while the *IC*₅₀ for Cd and Co has been reported to be 283.6 ± 603.1 and 113.5 ± 57.2 mg L⁻¹, respectively.

The large variation of *IC*₅₀ reported is probably caused by the large number of factors that affect heavy metal toxicity. Indeed, the toxicity of heavy metals to activated sludge processes depends on many factors. These factors include the nature and concentration of the heavy metal [13,18,19], biomass concentration [9,20,21], type of microorganisms [22–24], and exposure time [25]. Moreover, the pH [26,27] of heavy metals and their complex interactions with other metallic [28] and nonmetallic ions [29], which affect their speciation [22,30,31], also affect their toxicity. Furthermore, the toxicity of heavy metals to activated sludge in wastewater treatment also depends on the operational conditions of the process, wastewater composition, concentration and age of the biomass, and relative acclimation of the activated sludge [11,16,23].

Given the large number of parameters and factors affecting the toxicity of heavy metals, their inhibitory effect should be quantified with methods that allow to explore a wide range of experimental conditions. Microrespirometry, which is based on the measurement of the oxygen consumption rate under well-defined conditions [32] in

Table 1

Previously reported *IC*₅₀ (mg L⁻¹) values for Ni, Cd, and Co in activated sludge processes with different substrates, and determined by several methods. R, Respirometry; EA, enzymatic activity. NR, Not Reported.

Heavy Metal	Substrate	<i>IC</i> ₅₀	Method	References
Ni	Sodium acetate	38	R	[8]
	Sodium acetate	190	EA	[8]
	Peptone–meat extract	33	R	[9]
	Glucose	180	R	[9]
	Starch–acetic acid	145	R	[9]
	Sodium acetate	21	R	[10]
	NR	76	R	[11]
	Peptone–meat extract	33	R	[12]
Cd	Sodium acetate	14	R/EA	[8]
	Tripton	48	R	[13]
	Tripton	40	EA	[14]
	NR	39	R	[11]
	NR	19	R	[14]
	NR	1755	EA	[15]
	Tripton	320	EA	[16]
	Peptone–meat extract	34	R	[17]
Co	Tripton	178	R	[13]
	Tripton	88	EA	[13]
	NR	48	R	[14]
	Tripton	140	EA	[16]

microreactor arrays, is a method for the simultaneous evaluation of a large number of samples or conditions. In particular, pulse microrespirometry, which combines microrespirometry with the injection of a pulse of substrate to the microbial culture, has been suggested as a high-throughput method [33,34]. Compared to standard respirometers, the main features of the pulse microrespirometric method are; (i) a high-throughput data production by multiplying the number of replicates in a single experiment, (ii) a limited sample volume requirement as a result of the small volume of the microreactor wells; i.e., in the mL range, and (iii) relatively low errors in dissolved oxygen (DO) measurements for the reason that the signal to noise ratio of the quenching DO sensors are relatively high and independent of the DO concentration. This last feature allows for the measurement of small DO variations with the same accuracy, in the entire DO range, from 0 to 100% saturation. To the best of our knowledge, pulse microrespirometry for kinetic parameters determination has been used, so far, only to evaluate the inhibitory effects of copper and zinc on activated sludge [21] and to characterize aerobic granules degrading 4-chlorophenol [35].

In the present work, the inhibitory effect of Ni, Cd, and Co on a model activated sludge process was studied. The objective of our work was not to just report additional *IC*₅₀ data, but to carry out a multi-parameter analysis of the effect of these heavy metals on the kinetic and stoichiometric parameters of activated sludge under a wide range of experimental conditions including the type of heavy metals, substrate and biomass concentrations, and exposure time.

2. Experimental

2.1. Activated sludge culture

A model activated sludge-assisted wastewater treatment process was carried out using synthetic wastewater in a glass bubble column (diameter = 0.12 m, height = 0.66 m, and working volume = 6 L). The reactor was inoculated with 1 L of sludge obtained from a conventional municipal activated sludge process (urban wastewater plant, Ticoman, México) and was maintained under steady-state conditions for six months prior to the respirometric experiments. The reactor was aerated at a constant flow rate of 6 L min⁻¹ through a porous diffuser (diameter = 0.09 m) located at the reactor bottom. The reactor was fed continuously with the synthetic wastewater containing (mg L⁻¹) peptone: 851, meat extract: 585, urea: 159, K₂HPO₄: 148, NaCl: 37.3, MgSO₄·7H₂O: 10.6, and CaCl₂·2H₂O: 21.2. The reactor was fed at a constant liquid flow rate of 0.125 L h⁻¹ (48h of hydraulic residence time) with a peristaltic pump (Masterflex L/S precision, Cole-Parmer, USA), while the effluent was evacuated through a fixed outflow and disposed. The corresponding volumetric loading rate, expressed in chemical oxygen demand (COD), was 708.4 mg COD L⁻¹ d⁻¹. The pH was maintained at 7.0 ± 0.3 by adding 2M H₃PO₄. The reactor was maintained at ambient temperature (21 ± 2 °C).

2.2. Analytical methods

Chemical oxygen demand (COD), which is the most widely employed parameter to estimate organic content in wastewater, was used to determine the biomass and substrate concentrations. The selected COD method was closed reflux colorimetry, in accordance with standard methods [36]. The total COD was determined from a homogenized sample of the mixed liquor. The soluble COD was determined from a centrifuged (5900 g for 15 min; model 5810 R, Eppendorf, México) and filtered sample (0.45 µm filter). The insoluble COD was calculated as the difference between the total COD and the soluble COD. Since the culture media contained no suspended solids, the insoluble COD was considered as the biomass concentration (*X*), while the soluble COD was considered as the substrate concentration. Along the operation of the reactor, the biomass concentration was also quantified through volatile

suspended solids (VSS), in accordance with standard methods [36].

2.3. Heavy metal and biomass sample preparation

Prior to the respirometric tests, a stock solution of heavy metals was prepared by dissolving $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, and $\text{CdCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ in deionized water. This stock solution, diluted as required, was used in all the respirometric experiments. All chemicals were of analytical grade (Sigma-Aldrich, México). Prior to the respirometric tests, a stock of biomass was also prepared. For preparing the biomass stock, a biomass sample was taken from the bubble column, centrifuged at 5900 g for 15 min (Model 5810 R, Eppendorf, México), and re-suspended in a fresh media without a carbon source to ensure the absence of any residual substrate. The biomass stock was then diluted to achieve different biomass concentrations (see the results section).

2.4. Microreactor system

The microreactor system used for the microrespirometric tests was an un baffled 24-well (16 mm diameter, 18 mm depth) microflask system (PreSens, México), previously described by Esquivel-Rios et al. [33]. Each well included a fluorometric dissolved oxygen (DO) sensor (OxoDish, PreSens, México). The sensors were read at a data acquisition frequency of 4 min^{-1} with a 24-channel sensor dish reader (SDR-281, PreSens, México) connected to a personal computer with a data acquisition software (SDR_v37 software, PreSens, México). The oxygen transfer to the microreactors was achieved by superficial aeration. For improved mixing and mass transfer, one glass bead (diameter = 5 mm) was introduced into each well. The microreactor system was maintained at $25 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ and 100 rpm in an orbital shaker (Ecotron Infors HT, Switzerland).

2.5. Inhibition respirometry experiments

The inhibition tests were carried out by pulse dynamic respirometry, in which the DO concentration is measured, after the addition of a known substrate pulse; i.e., concentrated synthetic wastewater. This technique that has been widely used in standard respirometers [37,38] and was more recently used in a microreactor system by Esquivel-Rios et al. [33], is described in detail in the Supplementary material. All the respirometric experiments were carried out in 3–6 replicates and always included triplicate control experiments with no heavy metal. The experimental conditions for each set of experiments are shown in Table 2.

Table 2
Experimental conditions of each respirometric test.

1. Effect of heavy metals	Biomass (mg COD L^{-1}): 1050 Substrate (mg COD L^{-1}): 64 Heavy Metal (mg L^{-1}): 0, 1, 5, 10, 20, 40 Exposure time (h): 0
2. Effect of biomass	Biomass (mg COD L^{-1}): 612, 1150, 1695, 2378, 4416 Substrate (mg COD L^{-1}): 64 Heavy Metal (mg L^{-1}): 40 Exposure time (h): 0
3. Effect of substrate	Biomass (mg COD L^{-1}): 1165 Substrate (mg COD L^{-1}): 0, 8, 16, 30, 64, 120, 200 Heavy Metal (mg L^{-1}): 40 Exposure time (h): 0
4. Effect of exposure time	Biomass (mg COD L^{-1}): 1026 Substrate (mg COD L^{-1}): 32 Heavy Metal (mg L^{-1}): 40 Exposure time (h): 0, 0.5, 1, 2, 4

2.6. Effect of exposure time

To investigate the effect of the exposure time on the inhibition effect of the heavy metals, solutions with a heavy metal concentration (without any substrate) of 40 mg L^{-1} were injected into the wells of the microreactor system. After a delay time varying from 0 to 4 h, a single substrate pulse (synthetic wastewater) of 32 mg COD L^{-1} was injected into each well. Similarly, control experiment with no heavy metal, were done at the same delay times (Table 2).

2.7. Heavy metal speciation

Heavy metals speciation was theoretical calculated using a chemical equilibrium software [39]. This theoretical speciation was carried out considering the pH, the initial heavy metal concentration used in each test, as well as the total anions and cations concentration of the synthetic wastewater. The software used does not include the thermodynamic data of peptone and meat extract, which are major components of the synthetic wastewater. Therefore, these proteinic compounds were mimicked as a mixture of glycine and glutamic acid, in equal proportions, at the same concentration than peptone and meat extract in the synthetic wastewater, in COD units. This strategy has been previously reported to estimate speciation in wastewater inhibited by Zn and Cr^{6+} [40].

2.8. Data interpretation

The effect of the heavy metals on the wastewater treatment process was quantified by the specific oxygen uptake rate, which is the respiration rate per unit of the biomass concentration and time (OUR ; $\text{mg O}_2 \text{ mg COD}^{-1} \text{ h}^{-1}$). As mentioned later in the results section, the activated sludge process was well-described by a Monod kinetic model (Eq. (1)):

$$OUR = OUR_{\max} \cdot \frac{S}{K_S + S} \quad (1)$$

where OUR_{\max} ($\text{mg O}_2 \text{ mg COD}^{-1} \text{ h}^{-1}$) is the maximum OUR , S is the substrate (synthetic wastewater) concentration (mg COD L^{-1}), and K_S (mg COD L^{-1}) is the substrate affinity constant, observed in absence of the heavy metals. In presence of the heavy metals, the apparent OUR_{\max} (OUR'_{\max}) and K'_S (K'_S) were retrieved from the observed OUR (OUR_{obs}), using the same Monod model (Eq. (2)):

$$OUR_{\text{obs}} = OUR'_{\max} \cdot \frac{S}{K'_S + S} \quad (2)$$

To retrieve OUR'_{\max} and K'_S , the method was based on the injection of pulses of increasing concentration. This method has been exhaustively described [41,42]. Briefly, we injected simultaneously in separated wells, pulses of six different substrate concentrations (S_p), each one with three independent replicates. Next, from each respirogram, we registered the observed OUR'_{\max} ($OUR'_{\text{obs,max}}$); i.e., the OUR corresponding to the minimum observed C . Then, we plotted $OUR'_{\text{obs,max}}$ against the substrate pulse concentration. The resulting graphs showed a clear Monod shape that was used to estimate OUR'_{\max} and K'_S , with a Runge-Kutta method using the Levenberg-Marquardt optimization (Matlab R2012b software, USA). The goodness of the fit was estimated by the coefficient of determination (R^2). Apart from the kinetic parameters, the inhibitory effect of the heavy metals was also quantified by the percentage of inhibition ($I\%$). This parameter was determined from the maximum observed OUR'_{\max} (both in the presence and absence of the inhibitor) according to Eq. (3):

$$I\% = \frac{OUR'_{\text{CTL,max}} - OUR'_{\text{obs,max}}}{OUR'_{\text{CTL,max}}} \cdot 100 \quad (3)$$

where $OUR'_{\text{CTL,max}}$ is the observed OUR'_{\max} in the absence of the heavy

metals (control).

2.9. Statistical analysis

Significance difference between the parameters was calculated using the Tukey-Kramer's multiple comparison (TK) test, which was performed after the variance analysis ($\alpha < 0.05$) using OriginPro 8 SR0 v8.0724 (OriginLab, Northampton, MA, USA).

3. Results and discussion

The activated sludge process was operated for about six months prior to the respirometric experiments (Fig. S1). The average COD removal efficiency was $91 \pm 2\%$, which corresponded to a volumetric removal rate of $644.8 \text{ mg COD L}^{-1} \text{ d}^{-1}$. The suspended biomass concentration was $559 \pm 35 \text{ mg COD L}^{-1}$. During the operation of the activated sludge process, the biomass COD to VSS conversion was $1.49 \pm 0.15 \text{ g COD g}^{-1} \text{ VSS}$. Preliminary respirometric experiments were carried out, first, to determine the total heavy metal concentration ($0\text{--}200 \text{ mg L}^{-1}$ for all the three heavy metals) that caused a significant inhibition. During these preliminary tests, no complete inhibition was observed but a clear effect was observed in the $0\text{--}40 \text{ mg L}^{-1}$ range; i.e., inhibition ranging from 0 to 67%. This range of inhibitor concentration was considered adequate for further testing. Preliminary tests were also done to determine potential oxygen uptake caused by inorganic nitrogen oxidation (nitrification), since the synthetic wastewater contained proteins and urea that may hydrolyze into ammonium. Pulses of urea and of ammonia were injected, at concentrations, expressed in Nitrogen Oxygen Demand (NOD), from 0 to 60 mg NOD L^{-1} . While a clear respirometric response was observed with synthetic wastewater, no response was observed at any concentration of ammonium and urea (Fig. S2). From these results, we concluded that the oxygen uptake induced by the presence of organic nitrogen was not significant.

The theoretical speciation of Ni, Cd and Co was estimated and Table S1 shows the percentage of free metals concentration and of the total complexes formed with the amino acids. Significant differences were observed between the three heavy metals tested. While free Ni was present in a proportion varying from 38.6 to 54.1%, free Cd percentage was between 67.0 and 71.3%, and free Co represented from 81.6 to 84.3% of the total concentration. Complexes with amino acids were relatively higher with Ni (42.2–58.3%), compared to Cd (2.7–2.8%), and Co (9.1–10.3%). The major impact on speciation was the concentration of the mimicked synthetic wastewater. Indeed, when increasing the substrate concentration from 8 to $200 \text{ mg COD L}^{-1}$, the free Ni concentration was reduced from 87.8 to 22.0% of the total Ni concentration. Although to a lesser extent, similar behaviors were observed with Cd and Co (Fig. S3). This is in accordance to the literature, as Çeçen et al. [1] have previously reported that Ni forms strong complexes with organic compounds, while Taha and Khalil [43] and Boruah [44] have shown that Ni present higher metal-amino acids stability constants than Co.

Fig. 1 shows some of the respirograms observed after the injection of substrate pulses of 64 mg COD L^{-1} in the presence of Co, Ni, and Cd. In all the cases, C decreased sharply immediately after the pulse injection and then reached a minimum value, which corresponded to the maximum observed OUR ($OUR'_{obs,max}$). After reaching the minimum value, C progressively returned to the baseline concentration (C_b). In all the cases, the heavy metals showed a clear inhibitory effect, resulting in flatter respirograms as well as lower $OUR'_{obs,max}$; i.e., a higher minimum C value. Moreover, at higher Ni and Cd concentrations, the final value of C was higher than the initial baseline C_b , which indicates a lower endogenous respiration rate probably caused by biomass death or irreversible inhibition of a significant fraction of the complex microbial community.

The observed decrease in $OUR'_{obs,max}$ in the presence of the heavy metals allowed for the determination of $I\%$. Fig. 2 shows $I\%$ as a

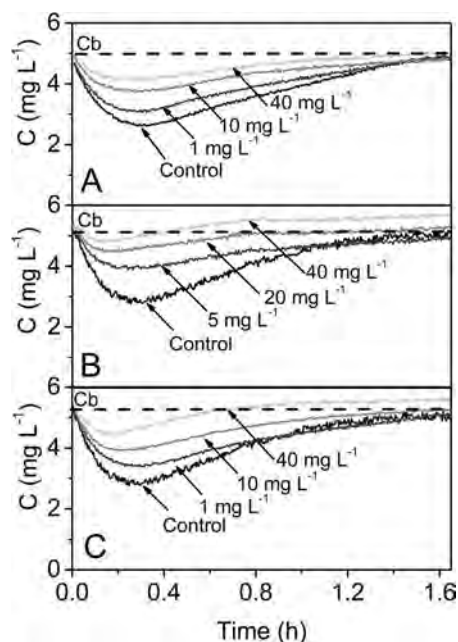


Fig. 1. Respirograms observed after the injection of a pulse of substrate (64 mg COD L^{-1}) at various total heavy metal concentrations ($1\text{--}40 \text{ mg L}^{-1}$); Co (A), Ni (B), and Cd (C). Dark dashed lines represent the baseline DO concentration (C_b).

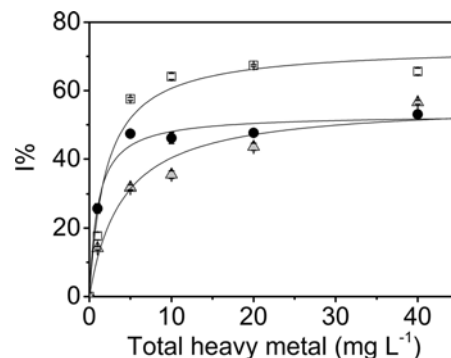


Fig. 2. $I\%$ vs. total heavy metal concentration; Ni (\square), Cd (\bullet), and Co (\blacktriangle). The dark lines show the best asymptotic fitting.

function of the total heavy metal concentration. The curves had an asymptotic pattern and were similar to the curves obtained by Ong et al. [18] for an activated sludge process in the presence of $10\text{--}150 \text{ mg L}^{-1}$ of Ni, and by You et al. [45] for a nitrification process in the presence of $2\text{--}40 \text{ mg L}^{-1}$ of Ni and Cd. On the other hand, Pai et al. [29] have also reported a $I\%$ varying linearly in presence of increasing concentrations of Cd, ranging $0\text{--}0.7 \text{ mg L}^{-1}$. Similar curves were observed when considering the free heavy metals concentration, as estimated by theoretical speciation (results not shown). The asymptotic shape observed in Fig. 2, indicates that the inhibition was incomplete even at high heavy metal concentrations. Within the heavy metal concentration range tested in this study, the highest observed $I\%$ for Ni, Co, and Cd was 67, 57, and 53%, respectively. This is consistent with the results obtained by Ong et al. (a maximum inhibition of about 55% in an activated sludge process polluted by Ni) [18] and You et al. (a maximum nitrification inhibition of about 90% by Cd) [45].

When the total heavy metals concentration was considered the IC_{50} was 4.5 ± 1.2 , 17.3 ± 2.1 , and $30.7 \pm 2.3 \text{ mg L}^{-1}$ for Ni, Cd, and Co, respectively. When considering the free heavy metal concentration, estimated by theoretical speciation, the IC_{50} were reduced to 1.5 ± 0.08 , 11.8 ± 3.8 , and $18.5 \pm 1.72 \text{ mg L}^{-1}$ for Ni, Cd, and Co, respectively. Since lower IC_{50} indicates higher toxicity, our results

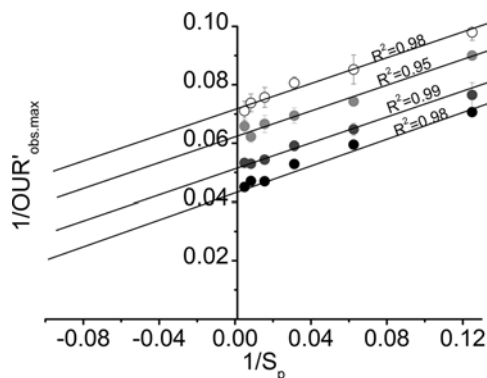


Fig. 3. Examples of Lineweaver-Burk plots observed with no heavy metal (control experiments, ●), 5 mg Cd (●), 20 mg Cd (●) and 40 mg Cd (○). The dark lines show the best fit.

suggest that Ni was more toxic than Cd and Co. This result is consistent with the results obtained by Elnabarawy et al. [14], who reported that Co is less toxic to activated sludge than Cd. The IC_{50} values for the three heavy metals tested were lower than the IC_{50} values reported previously (Table 1).

The method of pulses of increasing concentration was then applied for the determination of OUR'_{max} and K'_S . The results showed that $OUR'_{obs,max}$ vs. S_p was well fitted by the Monod model (average R^2 of 0.97 ± 0.02 ; $n = 24$). The average coefficient of variation (ratio of the standard deviation to the mean) for all the heavy metal concentrations was $2.5 \pm 2.0\%$ for OUR'_{max} and $7.2 \pm 8.2\%$ for K'_S . The validity of the method using the pulses of increasing concentration was previously discussed by Ramirez-Vargas et al. [41] for a nitrifying process. They concluded that this method was the best interpretation method. The results obtained in the present work seem consistent with those obtained previously.

Fig. 3 shows examples of linearization by the Lineweaver-Burk method [46], with four different Cd concentrations, out of the six concentrations tested (for graphical clarity purpose). The effect of increasing Cd concentrations modified substantially the Lineweaver-Burk plots, but with unchanged slopes; i.e., with constant ratio between OUR'_{max} and K'_S . Similar Lineweaver-Burk plots were obtained with the six concentrations of Cd, as well as with Ni and Co (data not shown). Fig. 4 shows the effect of the total heavy metal concentration on OUR'_{max} and K'_S . In all the cases, the presence of heavy metals caused an asymptotic decrease of both OUR'_{max} and K'_S . Together, these results suggest an uncompetitive inhibition; i.e., the inhibitor binds only to the enzyme-substrate complex [46]. This uncompetitive inhibition is contradictory to previous reports that considered non-competitive inhibition [12,29,47]; i.e., effect on OUR'_{max} but not on K'_S . However, uncompetitive inhibition was also previously observed by Kong et al. [48] in an activated sludge process exposed to Cu and by Esquivel-Rios et al. [21] in an activated sludge inhibited by Cu and Zn. The observed uncompetitive inhibition is probably due to the combination of multiple inhibition and toxic effects on a complex microbial community, which cannot be properly described with simple enzymatic kinetics. Despite the clear evidence obtained by linearization, a traditional uncompetitive inhibition model, which is described by Eq. (4) (where K_I is the inhibition constant), failed to describe the observed patterns of OUR'_{max} and K'_S . We found that a modified model, which included a buffer factor (Eq. (5)), fitted well the observed results (Fig. 4). In this model, β is a constant derived from the maximum percentage of inhibition ($I\%_{max}$); i.e., the $I\%$ value observed at the maximum inhibitor concentration (Eq. (6)).

$$OUR'_{max} = OUR'_{max} \cdot \frac{K_I}{K_I + I} \quad K'_S = K'_S \cdot \frac{K_I}{K_I + I} \quad (4)$$

$$OUR'_{max} = OUR'_{max} \cdot \frac{K_I}{K_I + I} \cdot \frac{\beta \cdot K_I + I}{\beta \cdot K_I} \quad K'_S = K'_S \cdot \frac{K_I}{K_I + I} \cdot \frac{\beta \cdot K_I + I}{\beta \cdot K_I} \quad (5)$$

$$\beta = \frac{100}{100 - I\%_{max}} \quad (6)$$

The parameters determined from Eq. (5) (for the activated sludge process) are given in Table 3. All the parameters describing the activated sludge process in the presence of Ni were significantly different ($\alpha < 0.05$) from those describing the process in the presence of Cd, suggesting that these two heavy metals exerted a different inhibitory effect. The parameters describing the process in the presence of Co, were in some case not significantly different from Ni and in some case not significantly different from Cd. The heavy metal that was the most toxic on the activated sludge process was Ni, as previously suggested by the IC_{50} values. Indeed, compared to Co and Cd, Ni presented the highest $I\%_{max}$ and β ($\alpha < 0.05$) while it presented a K_I significantly lower than Cd but not than Co.

Next, we investigated the effect of X on the inhibitory effect of the heavy metals with substrate pulses of 64 mg COD L^{-1} at a heavy metal concentration of 40 mg L^{-1} . The value of X ranged from 612 to $4416 \text{ mg COD L}^{-1}$. Fig. 5 shows that $I\%$ for Cd and Co was inversely proportional to the biomass concentration. This behavior is consistent with the results obtained by Stasinakis et al. [49] (for As^{3+} and Hg^{2+}), Vankova et al. [20] (for Cr^{6+}), and Esquivel-Rios et al. [21] (for Cu and Zn). This observation has been previously explained by the fact that toxic compounds can be adsorbed to a greater extent in the presence of higher concentration of biomass, which results in a lower availability of the inhibitor [49,50]. No significant effect of X on the toxicity of Ni was observed ($\alpha < 0.05$). It is worthwhile to mention that Ni and Co, which showed a lower sensitivity to biomass concentration, compared to Cd, have been reported to present a higher affinity for dissolved ligands than for activated sludge [1].

We also investigated the effect of S on the inhibitory effect of the heavy metals (Fig. 6). For this, substrate pulses ranging from 8 to $200 \text{ mg COD L}^{-1}$ were injected into the wells containing $1165 \text{ mg COD L}^{-1}$ of biomass at a heavy metal concentration of 40 mg L^{-1} . Fig. 6 shows that for all the three heavy metals, a higher S corresponded to a higher inhibitory effect, up to a certain level, above which no further increase of $I\%$ was observed. This trend was also observed by Esquivel-Rios et al. [20] in their study on the inhibition of an activated sludge process but only for Cu, as S did not affect the inhibition in the case of Zn. Cokgor et al. [9] have also reported that S does not affect the inhibition of activated sludge by Ni and Cr^{6+} . In the present work, after reaching a maximum $I\%$, the degree of inhibition caused by Ni and Cd slightly decreased with a further increase in S . This behavior, that has not been reported before, could be partially explained by speciation, as an increase in substrate concentration showed a significant reduction of the free heavy metals concentration, estimated by theoretical speciation (Fig. S3).

It is worth mentioning that when modifying S_0 and X_0 , we also modified the substrate to biomass ratio (S_0/X_0), also called food to microorganism (F/M) ratio, which has been shown to have a substantial effect on the microbial metabolism [49]. However, the S_0/X_0 was ranging 0.006–0.10, in COD units, which is too low to observe a significant physiological change of the biomass [51] and sufficiently low to consider no cell multiplication during the exogenous substrate removal [52]. When combining the results obtained at several S with those obtained at several X , we obtained erratic correlations, which suggests that S_0/X_0 was not the dominant effect, compared to S_0 and X_0 , alone. The effects of S_0 and X_0 , alone are probably the results of a matrix of phenomena, including speciation and adsorption, as described above.

The effect of the exposure time on the inhibitory effect of the heavy metals was investigated in the wells of the microreactor system using a biomass concentration of $1026 \text{ mg COD L}^{-1}$ and a heavy metal

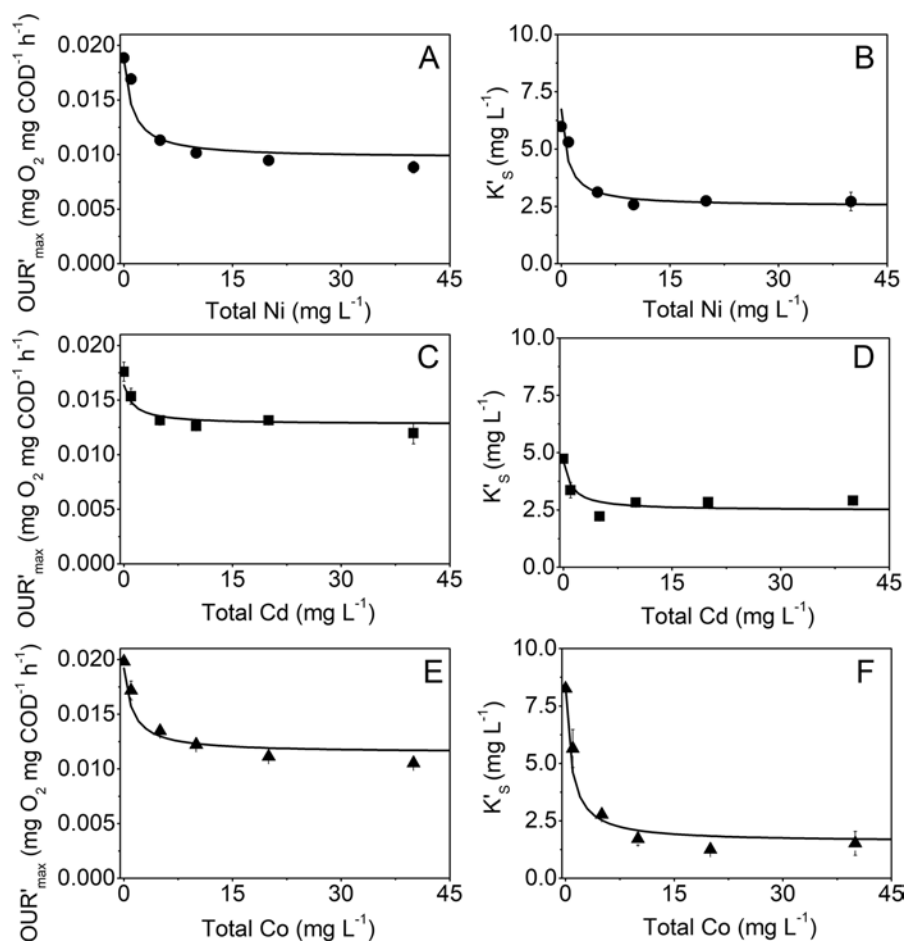


Fig. 4. OUR'_{max} and K'_s values for several total Ni (A, B), Cd (C, D), and Co (E, F) concentrations. The dark lines show the best model fitting (Eq. (5)).

Table 3

Kinetic parameters estimated by the proposed model (Eq. (5)) for Ni, Cd, and Co (\pm standard deviation). The Letters in parenthesis are Tukey–Kramer (TK) test results ($\alpha < 0.05$). The values with the same capital letter in the same row are not significantly different.

Parameters	Ni \pm SD	Cd \pm SD	Co \pm SD
OUR'_{max}^a	0.018 ± 0.0003 (A)	0.016 ± 0.0006 (B)	0.019 ± 0.0003 (C)
K_i ($mg\ L^{-1}$)	1.188 ± 0.0025 (A)	1.339 ± 0.0652 (B)	1.220 ± 0.0198 (A)
K_s ($mg\ L^{-1}$)	6.24 ± 0.37 (A)	4.42 ± 0.05 (B)	6.94 ± 0.27 (A)
$I\%_{max}$ (%)	52.8 ± 5.5 (A)	43.1 ± 2.4 (B)	40.3 ± 1.9 (B)
β (-)	2.12 ± 0.34 (A)	1.75 ± 0.24 (B)	1.67 ± 0.04 (B)

^a ($mg\ O_2\ mg\ COD^{-1}\ h^{-1}$).

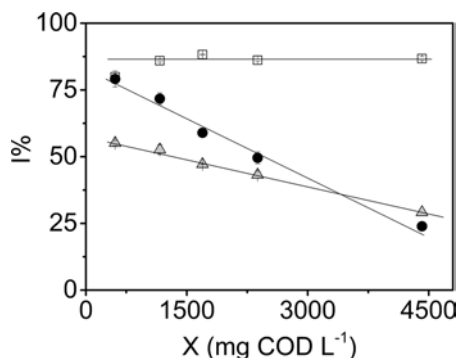


Fig. 5. Effect of biomass concentration on $I\%$ for Ni (\square), Cd (\bullet), and Co (\blacktriangle). The dark lines show the best linear fitting.

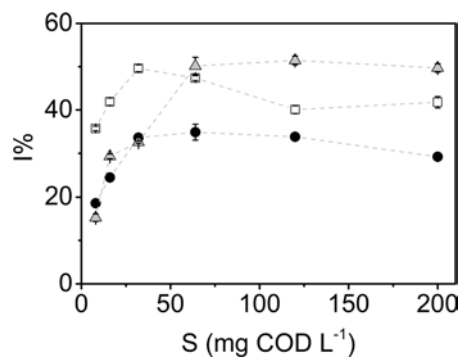


Fig. 6. Effect of substrate concentration on $I\%$ for Ni (\square), Cd (\bullet), and Co (\blacktriangle).

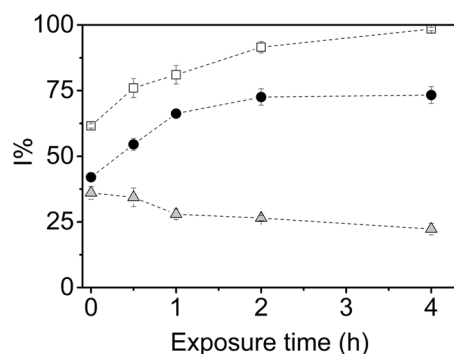


Fig. 7. Effect of exposure time on the inhibition of the activated sludge by Ni (□), Cd (●), and Co (▲).

concentration of 40 mg L^{-1} . The microreactor system was put under operation without any substrate. The substrate was added 0–4 h later, with pulses of 32 mg COD L^{-1} . The results of this experiment are shown in Fig. 7. In the case of Ni, the degree of inhibition increased with an increase in the exposure time and after an exposure time of 4 h, a complete inhibition was observed. Similarly, in the case of Cd also the degree of inhibition increased with an increase in the exposure time. However, this increase was moderate and a maximum inhibition of 73.3% was obtained after an exposure time of 4 h. Similar results were reported by Cokgor et al. [9] (with Cr^{6+} and Ni for an activated sludge process) and Hu et al. [53] (with Cu and Zn in a nitrification process). On the other hand, Contrastingly, the inhibitory effect of Co decreased with an increase in the exposure time. The % for Co decreased from 36 to 22% after an exposure of 4 h. A decrease of Co toxicity over exposure time was previously reported but not explained by El Bestawy et al. [13]. This positive effect of the exposure time on toxicity of Co might be a combined effect of Co complexation, and adsorption on biomass or extracellular polymers [54,55,56].

4. Conclusions

The inhibitory effects of Ni, Cd, and Co on a model activated sludge process were investigated successfully using a microrespirometric method. This method allowed for the quantification of inhibition at various inhibitor, substrate, and biomass concentrations, as well as after various exposure times. Apart from the determination of the percentage of inhibition or IC_{50} , the method also allowed for the determination of OUR'_{max} and K'_s , showing that the inhibition was uncompetitive. To the best of our knowledge, this is the first study reporting the effects of these many experimental conditions on the inhibition of an activated sludge process by Ni, Cd, and Co. This confirms the advantage of microrespirometry over the other commonly used methods, which are the substrate uptake, bioluminescence, or enzymatic activity and are relatively time-consuming and require each condition to be tested separately. Overall, in addition to the inhibitor concentration, the inhibition was sensitive to the biomass and substrate concentrations as well as to the exposure time. Thus, it can be concluded that the inhibitory effect of Ni, Cd, and Co is a complex matrix involving many parameters, which certainly generate a unique response for each wastewater treatment plant and for each operating condition. It can be however concluded that low substrate and high biomass concentrations are the best conditions to ensure a higher microbial resistance to the toxicity of the three heavy metals tested.

Acknowledgments

This work was supported by “Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología” (Conacyt, project 133338 and grant). We also gratefully acknowledge Conacyt for the financial support to Gabriel R. Hernández-Martínez (grant # 261685). The authors are thankful to Victoria T.

Velázquez-Martínez, Juan Corona-Hernández, and Francisco Silva-Olmedo for their technical assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.02.032>.

References

- [1] F. Çeçen, N. Semerci, A.G. Geyik, Inhibitory effects of Cu, Zn, Ni and Co on nitrification and relevance of speciation, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 85 (2010) 520–528.
- [2] H.K. Boparai, M. Joseph, D.M. O'Carroll, Cadmium (Cd^{2+}) removal by nano zero-valent iron: surface analysis, effects of solution chemistry and surface complexation modeling, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20 (2013) 6210–6221.
- [3] D. Chaudhuri, A. Majumder, A.K. Misra, K. Bandyopadhyay, Cadmium removal by Lemna minor and Spirodela polyrhiza, *Int. J. Phytorem.* 16 (2014) 1119–1132.
- [4] H.B. Chen, D.B. Wang, X.M. Li, Q. Yang, K. Luo, G.M. Zeng, M.L. Tang, Effects of Cd (II) on wastewater biological nitrogen and phosphorus removal, *Chemosphere* 117 (2014) 27–32.
- [5] D.M. Manohar, B.F. Noeline, T.S. Anirudhan, Adsorption performance of Al-pillared bentonite clay for the removal of cobalt(II) from aqueous phase, *Appl. Clay Sci.* 31 (2006) 194–206.
- [6] W. Wang, X. Li, P. Wang, X. Song, D. Jiang, K. Wang, Long-term effects of Ni (II) on the performance and activity of activated sludge processes, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 92 (2013) 144–149.
- [7] J. Sun, Q. Yang, D. Wang, S. Wang, F. Chen, Y. Zhong, K. Yi, F. Yao, C. Jiang, S. Li, X. Li, G. Zeng, Nickel toxicity to the performance and microbial community of enhanced biological phosphorus removal system, *Chem. Eng. J.* 313 (2017) 415–423.
- [8] K. Anderson, B. Koopman, G. Bitton, Evaluation of int-dehydrogenase assay for heavy metal inhibition of activated sludge, *Water Res.* 22 (1988) 349–353.
- [9] E.U. Cokgor, S. Ozdemir, O. Karahan, G. Insel, D. Orhon, Critical appraisal of respirometric methods for metal inhibition on activated sludge, *J. Hazard. Mater.* 139 (2007) 332–339.
- [10] K.Y. Wong, M.Q. Zhang, X.M. Li, W. Lo, A luminescence-based scanning respirometer for heavy metal toxicity monitoring, *Biosens. Bioelectron.* 12 (1997) 125–133.
- [11] C.J. Kelly, N. Tumsaroj, C.A. Lajoie, Assessing wastewater metal toxicity with bacterial bioluminescence in a bench-scale wastewater treatment system, *Water Res.* 38 (2004) 423–431.
- [12] G. Insel, O. Karahan, S. Ozdemir, L. Pala, T. Katipoglu, E.U. Cokgor, D. Orhon, Unified basis for the respirometric evaluation of inhibition for activated sludge, *J. Environ. Sci. Health Part A* 41 (2006) 1763–1780.
- [13] E. El Bestawy, S. Helmy, H. Hussein, M. Fahmy, Optimization and/or acclimatization of activated sludge process under heavy metals stress, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29 (2013) 693–705.
- [14] M.T. Elnabarawy, R.R. Robideau, S.A. Beach, Comparison of three rapid toxicity test procedures: Microtox, polytox, and activated sludge respiration inhibition, *Environ. Toxicol.* 3 (1988) 361–370.
- [15] M.R. Zare, M.M. Amin, S. Hemmati-Borji, M. Nikaeen, B. Bina, S.H. Mirhosseini, A. Asadi, Modified dehydrogenase enzyme assay for evaluation of the influence of Hg, Cd, and Zn on the bacterial community structure of a wastewater treatment plant, *Toxicol. Environ. Chem.* 97 (2015) 552–562.
- [16] E. El Bestawy, S. Helmy, H. Hussien, M. Fahmy, R. Amer, Bioremediation of heavy metal-contaminated effluent using optimized activated sludge bacteria, *Appl. Water Sci.* 3 (2013) 181–192.
- [17] M. Gutiérrez, J. Etxebarria, L. De Las Fuentes, Evaluation of wastewater toxicity: comparative study between Microtox and activated sludge oxygen uptake inhibition, *Water Res.* 36 (2002) 919–924.
- [18] S.A. Ong, E. Toorisaka, M. Hirata, T. Hano, Effects of nickel(II) addition on the activity of activated sludge microorganisms and activated sludge process, *J. Hazard. Mater.* 113 (2004) 111–121.
- [19] S. Malamis, E. Katsou, N. Daskalakis, K.J. Haralambous, Investigation of the inhibitory effects of heavy metals on heterotrophic biomass activity and their mitigation through the use of natural minerals, *J. Environ. Sci. Health Part A-Tox./Hazard. Subst. Environ. Eng.* 47 (2012) 1992–1999.
- [20] S. Vanková, J. Kupec, J. Hoffmann, Toxicity of chromium to activated sludge, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 42 (1999) 16–21.
- [21] I. Esquivel-Rios, I. González, F. Thalasso, Microrespirometric characterization of activated sludge inhibition by copper and zinc, *Biodegradation* 25 (2014) 867–879.
- [22] P. Gikas, P. Romanos, Effects of tri-valent (Cr(III)) and hexa-valent (Cr(VI)) chromium on the growth of activated sludge, *J. Hazard. Mater.* 133 (2006) 212–217.
- [23] P. Madoni, M.G. Romeo, Acute toxicity of heavy metals towards freshwater ciliated protists, *Environ. Pollut.* 141 (2006) 1–7.
- [24] V. Ochoa-Herrera, G. León, Q. Banihani, J.A. Field, R. Sierra-Alvarez, Toxicity of copper(II) ions to microorganisms in biological wastewater treatment systems, *Sci. Total Environ.* 412–413 (2011) 380–385.
- [25] Z. Xiao-Hong, Y. Tong, S. Han-Chang, S. Hui-Ming, Temporal and spatial inhibitory effects of zinc and copper on wastewater biofilms from oxygen concentration profiles determined by microelectrodes, *Water Res.* 45 (2011) 953–959.
- [26] J.D. Van Nostrand, A.G. Sowder, P.M. Bertsch, P.J. Morris, Effect of pH on the

- toxicity of nickel and other divalent metals to *Burkholderia cepacia* PR1(301), *Environ. Toxicol. Chem.* 24 (2005) 2742–2750.
- [27] B.S. Smolyakov, A.P. Ryzhikh, S.B. Bortnikova, O.P. Saeva, N.Y. Chernova, Behavior of metals (Cu, Zn and Cd) in the initial stage of water system contamination: effect of pH and suspended particles, *Appl. Geochem.* 25 (2010) 1153–1161.
- [28] P. Gikas, Kinetic responses of activated sludge to individual and joint nickel (Ni(II)) and cobalt (Co(II)): an isobolographic approach, *J. Hazard. Mater.* 143 (2007) 246–256.
- [29] T.Y. Pai, S.C. Wang, H.M. Lo, C.F. Chiang, M.H. Liu, R.J. Chiou, W.Y. Chen, P.S. Hung, W.C. Liao, H.G. Leu, Novel modeling concept for evaluating the effects of cadmium and copper on heterotrophic growth and lysis rates in activated sludge process, *J. Hazard. Mater.* 166 (2009) 200–206.
- [30] F. Çeçen, N. Semerci, A.G. Geyik, Inhibition of respiration and distribution of Cd, Pb, Hg, Ag and Cr species in a nitrifying sludge, *J. Hazard. Mater.* 178 (2010) 619–627.
- [31] F. Çeçen, B. Kılıç, Inhibitory effect of silver on activated sludge: effect of organic substrate and the carbon to nitrogen ratio, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 91 (2015) 1190–1198.
- [32] H. Spanjers, I. Takacs, H. Brouwer, Direct parameter extraction from respirograms for wastewater and biomass characterization, *Water Sci. Technol.* 39 (1999) 137–145.
- [33] I. Esquivel-Rios, R. Ramirez-Vargas, G.R. Hernandez-Martinez, M. Vital-Jacome, A. Ordaz, F. Thalasso, A microrespirometric method for the determination of stoichiometric and kinetic parameters of heterotrophic and autotrophic cultures, *Biochem. Eng. J.* 83 (2014) 70–78.
- [34] R. Ramirez-Vargas, M. Vital-Jacome, E. Camacho-Perez, L. Hubbard, F. Thalasso, Characterization of oxygen transfer in a 24-well microbioreactor system and potential respirometric applications, *J. Biotechnol.* 186 (2014) 58–65.
- [35] M. Vital-Jacome, G. Buitrón, I. Moreno-Andrade, V. Garcia-Rea, F. Thalasso, Microrespirometric determination of the effectiveness factor and biodegradation kinetics of aerobic granules degrading 4-chlorophenol as the sole carbon source, *J. Hazard. Mater.* 313 (2016) 112–121.
- [36] L.S. Clesceri, A.D. Eaton, A.E. Greenberg, A. American Public Health, A. American Water Works, E.F. Water, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association, 1998.
- [37] A. Ordaz, C.S. Oliveira, R. Aguilar, M. Carrion, E.C. Ferreira, M. Alves, F. Thalasso, Kinetic and stoichiometric parameters estimation in a nitrifying bubble column through “in-situ” pulse respirometry, *Biotechnol. Bioeng.* 100 (2008) 94–102.
- [38] C.S. Oliveira, A. Ordaz, E.C. Ferreira, M. Alves, F. Thalasso, In situ pulse respirometric methods for the estimation of kinetic and stoichiometric parameters in aerobic microbial communities, *Biochem. Eng. J.* 58–59 (2011) 12–19.
- [39] J.P. Gustafsson, Visual MINTEQ Version 3.1, Department of Sustainable Development, Environmental Science and Engineering, KTH, Stockholm, 2013.
- [40] F. Friedrichs, K.U. Rudolph, B.H. Nguyen, D. Meinardi, W. Genthe, D.Q. Trung, Improving the sensitivity of the activated sludge respiration inhibition test and verifying the results using an oxidation-reduction potential electrode, *Water Sci. Technol.* 75 (2017) 247–254.
- [41] R. Ramirez-Vargas, A. Ordaz, M. Carrión, I.Y. Hernández-Paniagua, F. Thalasso, Comparison of static and dynamic respirometry for the determination of stoichiometric and kinetic parameters of a nitrifying process, *Biodegradation* 24 (2013) 675–684.
- [42] A. Ordaz, C.S. Oliveira, G. Quijano, E.C. Ferreira, M. Alves, F. Thalasso, Kinetic and stoichiometric characterization of a fixed biofilm reactor by pulse respirometry, *J. Biotechnol.* 157 (2012) 173–179.
- [43] M. Taha, M.M. Khalil, Mixed-ligand complex formation equilibria of cobalt (II), nickel (II), and copper (II) with N,N-bis (2-hydroxyethyl) glycine (bicine) and some amino acids, *J. Chem. Eng. Data* 50 (2005) 157–163.
- [44] D. Boruah, Interaction of cobalt (II) and nickel (II) ions with amino acids in aqueous solution: a spectrophotometric study, *Int. J. Sci. Res. Publ.* 2 (2012) 366.
- [45] S.J. You, Y.P. Tsai, R.Y. Huang, Effect of heavy metals on nitrification performance in different activated sludge processes, *J. Hazard. Mater.* 165 (2009) 987–994.
- [46] I.J. Dunn, J. Ingham, E. Heinzle, J.E. Prenosil, *Biological Reaction Engineering: Dynamic Modelling Fundamentals With Simulation Examples*, second ed., Wiley-VCH, Weinheim, 2003.
- [47] Z. Hu, K. Chandran, D. Grasso, B.F. Smets, Effect of nickel and cadmium speciation on nitrification inhibition, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 3074–3078.
- [48] Z. Kong, P. Vanrolleghem, P. Willems, W. Verstraete, Simultaneous determination of inhibition kinetics of carbon oxidation and nitrification with a respirometer, *Water Res.* 30 (1996) 825–836.
- [49] A.S. Stasinakis, N.S. Thomaidis, A.S. Giannes, T.D. Lekkas, Effect of arsenic and mercury speciation on inhibition of respiration rate in activated sludge systems, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 10 (2003) 177–182.
- [50] J.L. Hu, X.W. He, C.R. Wang, J.W. Li, C.H. Zhang, Cadmium adsorption characteristic of alkali modified sewage sludge, *Bioresour. Technol.* 121 (2012) 25–30.
- [51] C.L. Grady, B.F. Smets, D.S. Barbeau, Variability in kinetic parameter estimates: a review of possible causes and a proposed terminology, *Water Res.* 30 (1996) 742–748.
- [52] P. Chudoba, B. Capdeville, J. Chudoba, Explanation of biological meaning of the S_0/X_0 ratio in batch cultivation, *Water Sci. Technol.* 26 (1992) 743–751.
- [53] Z. Hu, K. Chandran, D. Grasso, B.F. Smets, Impact of metal sorption and internalization on nitrification inhibition, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 728–734.
- [54] Y. Liu, M.C. Lam, H.H. Fang, Adsorption of heavy metals by EPS of activated sludge, *Water Sci. Technol.* 43 (2001) 59–66.
- [55] G. Chen, Y. Zhou, G. Zeng, H. Liu, M. Yan, A. Chen, J. He, Alteration of culture fluid proteins by cadmium induction in *Phanerochaete chrysosporium*, *J. Basic Microbiol.* 55 (2015) 141–147.
- [56] Q. Xu, X. Li, R. Ding, D. Wang, Y. Liu, Q. Wang, J. Zhao, F. Chen, G. Zeng, Q. Yang, H. Li, Understanding and mitigating the toxicity of cadmium to the anaerobic fermentation of waste activated sludge, *Water Res.* 124 (2017) 269–279.



Cite this: DOI: 10.1039/c7ew00563f

High-throughput microrespirometric characterization of activated sludge inhibition by silver nanoparticles†

Gabriel R. Hernández-Martínez,^a Alejandro Zepeda,^{ib}*^b Alberto Ordaz,^{id}^c
Luis A. Sánchez-Catzin,^{ab} Zaira D. Estrada-Díaz^{ab} and Frederic Thalasso^a

Silver nanoparticles (AgNPs) are widely used in a high number of industrial applications and are becoming prevalent in wastewater effluents. It is known that AgNPs exert a toxic effect on activated sludge processes, but to what extent and under which conditions are still largely unknown. The inhibitory effect of AgNPs on a synthetic wastewater treatment process was tested using pulse microrespirometry (*i.e.*, a pulse of substrate is injected into a microreactor system). Several conditions were tested, including AgNP concentration, substrate to biomass ratio (S_0/X_0) and exposure time. The inhibitory effects were quantified through the percentage of inhibition of the exogenous and endogenous respiration rates as well as through determination of the half saturation constant (K_S), inhibition constant (K_I) and maximum oxygen uptake rate (OUR_{max}). The results indicated that AgNPs exert uncompetitive inhibition and the concentration that caused a 50% of inhibition (IC_{50}) of the exogenous respiration rate was $3.32 \pm 0.16 \text{ mg L}^{-1}$. The inhibitory effect of AgNPs on the endogenous respiration was relatively lower, with an IC_{50} of $7.12 \pm 0.11 \text{ mg L}^{-1}$. Overall, it was observed that an increase in the S_0/X_0 ratio resulted in higher inhibition and that the inhibitory effects of AgNPs decreased with exposure time.

Received 20th December 2017,
Accepted 2nd April 2018

DOI: 10.1039/c7ew00563f

rscl.li/es-water

Water impact

Nanoparticles are becoming rapidly of broader use, and the concerns about their toxicity have increased in recent years. Nanoparticles can reach wastewater treatment plants, which are an expected step in their disposal. In this study, we characterized the impact of silver nanoparticles on the activated sludge process, which should be considered for clean and efficient operation of these treatment plants.

1. Introduction

Silver nanoparticles (AgNPs) are currently used in an increasing number of sectors, such as chemistry,¹ solar energy,^{2,3} electronic components,^{4,5} and medicine^{6–8} and are now commonly found in a wide range of everyday commercial products, including cosmetics, filters, containers, and soaps and detergents.^{9,10} The production of AgNPs is grow-

ing at an accelerated rate, with an estimated global production of 55 t per year,¹¹ and a 670% increase in production from 2004 to 2010.¹² Therefore, AgNPs are likely to be spread in the environment, and it has been estimated that they could be found in river sediments at concentrations ranging from 2 to 14 mg kg⁻¹.¹²

Several previous reports have shown that AgNPs are principally released during manufacturing processes and subsequent use,^{13–15} and can be found in wastewater treatment plants.^{9,16} The concentration at which AgNPs can be found in wastewater is highly uncertain. Ranges from 10 ng L⁻¹ to 0.1 mg L⁻¹ have been suggested,¹⁷ but in some specific sectors, such as textile factories, concentrations of up to 1.3 mg L⁻¹ have been proposed.¹³ Considering the growth rate of the nanoparticles sector, the concentration of AgNPs in wastewater is expected to increase significantly in the future.^{12,18,19}

Considering the relatively high toxicity of silver ions (Ag⁺) in activated sludge,^{20,21} it is likely that AgNPs can exert a toxic effect on microbial cultures. Previous studies (Table 1) have reported the toxicity of AgNPs on several microbial

^a Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (Cinvestav), Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Av. IPN 2508, San Pedro Zacatenco, 07360, Mexico City, Mexico

^b Universidad Autónoma de Yucatán, Facultad de Ingeniería Química, Campus de Ingenierías y Ciencias Exactas, Periférico Norte km 33.5, C.P. 97203 Mérida, Yucatán, Mexico. E-mail: alejandro.zepeda@correo.uady.mx, zepeda74@yahoo.com; Fax: +52 999 9460956; Tel: +52 999 9460956

^c Laboratory of environmental bioengineering, Universidad Mexiquense del Bicentenario, Unidad de Estudios Superiores de Tultitlán, Av. Ex-Hacienda de Portales s/n Villa Esmeralda, C.P. 54910 Tultitlán de Mariano Escobedo, Mexico

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c7ew00563f

Table 1 Previously reported IC₅₀ (mg L⁻¹) values for AgNPs in different cultures and determined by different methods; R, respirometry; SNPR, specific nitrite production rate; L, luminescence. AOB, ammonia oxidizing bacteria; AS, activated sludge; NS, nitrifying sludge. Glu, glucosa; Pept, peptone; Ac, acetate

IC ₅₀ (mg L ⁻¹)	C and N sources	pH	T (°C)	AgNPs size (nm)	Method	Culture	Ref.
3.00	Glu, Ac, Pept	7.0	25	10	R	AS	Geyik and Cecen, ³⁷
11.10	Glu, Ac, Pept	7.0	25	100	R	AS	Geyik and Cecen, ³⁷
10.75	NH ₄ ⁺ /NaHCO ₃	—	32	44	SNPR	NS	Michels <i>et al.</i> , ³⁸
0.34	NH ₄ ⁺ /NaHCO ₃	7.5	25	14	R	NS	Choi <i>et al.</i> , ²⁵
0.47	NH ₄ ⁺ /NaHCO ₃	7.8	25	20	R	AOB	Radniecki <i>et al.</i> , ²⁸
1.44	NH ₄ ⁺ /NaHCO ₃	7.8	25	80	R	AOB	Radniecki <i>et al.</i> , ²⁸
0.91	NH ₄ ⁺ /NaHCO ₃	7.8	30	7	SNPR	AOB	Yuan <i>et al.</i> , ²⁹
2.90	NH ₄ ⁺ /NaHCO ₃	7.8	30	40	SNPR	AOB	Yuan <i>et al.</i> , ²⁹
0.39	NH ₄ ⁺ /NaHCO ₃	7.8	30	20	SNPR	AOB	Mumper <i>et al.</i> , ³⁰
10.00	NH ₄ ⁺ /NaHCO ₃	7–8	25–30	14	R	AOB	Giao <i>et al.</i> , ³¹
4–32	—	—	—	15	L	<i>P. putida</i>	Malleve <i>et al.</i> , ²³

cultures, through the determination of the concentration that causes a 50% inhibition (IC₅₀ (ref. 22)); *i.e.*, 50% decrease in the oxygen uptake rate (OUR), nitrite production rate or luminescent activity. Malleve *et al.*,²³ and Xiu *et al.*,²⁴ previously reported the impact of AgNPs on axenic bacterial cultures, while other reports evaluated the impact of AgNPs on autotrophic nitrifying cultures.^{25–31} Several studies have also reported the long-term effect of AgNPs on activated sludge,^{32–36} including chemical oxygen demand (COD) and phosphorus removal,^{34,35} or on the activated sludge microbial community.³⁶ However, to our knowledge, only Geyik and Çeçen,³⁷ have quantified the IC₅₀ of AgNP on activated sludge (Table 1).

Similar to the toxicity of heavy metals,^{39,40} it has been suggested that a large number of factors may affect nanoparticle toxicity. Among them, the ionic strength⁴¹ of the medium, the complex interactions with organic and inorganic compounds,⁴² the size and shape of the nanoparticles,^{8,25} as well as the operating condition of the process^{34,43} have been suggested. However, these previous reports on AgNP toxicity were based on qualitative assessment.

To further explore and better constrain the potential toxicity of AgNPs on activated sludge, the inhibitory effect of AgNPs on a simulated activated sludge process was studied. The objective of our work was to conduct a multiparameter analysis of the effect of AgNPs on activated sludge under a wide range of experimental conditions, including the AgNP concentration, substrate to biomass ratio (S_0/X_0), and exposure time. Moreover, our work included an estimation of the inhibitory effects of AgNPs on the endogenous respiration, which is a better indicator of cell damage and irreversible inhibition compared to exogenous respiration.⁴⁴ Given that our study included a large number of parameters and factors, we quantified inhibition with a microrespirometry method, which is based on the measurement of the oxygen consumption rate under well-defined conditions⁴⁵ in microreactor arrays. This high-throughput method allows for the simultaneous evaluation of a large number of samples or conditions in a relatively short experimental time while significantly reducing experimental error.^{46,47}

2. Materials and methods

2.1. Reactor setup and operation

A simulated activated sludge process fed with synthetic wastewater was operated in a glass bubble column (0.12 m diameter, 0.66 m height and 6 L working volume). The reactor was inoculated with 1 L of sludge obtained from a conventional municipal activated sludge process (Ticomán urban wastewater plant, Mexico City) and maintained under steady state for 1 year prior to the respirometric experiments. The reactor was aerated at a constant flow rate of 1 VVM (volume of air per volume of reactor per minute) through a porous diffuser (0.09 m diameter) located at the bottom of the reactor. The reactor was fed continuously with a synthetic wastewater containing (mg L⁻¹): peptone, 851; meat extract, 585; urea, 159; K₂HPO₄, 148; NaCl, 37.3; MgSO₄·7H₂O, 10.6; CaCl₂·2H₂O, 21.2. The synthetic wastewater was fed with a peristaltic pump (Masterflex L/S precision, Cole-Parmer, USA) at a constant liquid flow rate of 0.125 L h⁻¹ (hydraulic residence time of 48 h), while the effluent was evacuated through a fixed outflow and disposed. The corresponding volumetric loading rate, expressed as chemical oxygen demand (COD) was 708.4 mg COD L⁻¹ d⁻¹. The pH was maintained at 7.0 ± 0.5 by addition of 1 M H₃PO₄. The reactor was kept at an ambient temperature (21 ± 2 °C).

2.2. Analytical methods

The biomass and substrate concentration were reported in COD units and measured *via* the closed reflux colorimetric method, in accordance with standard methods.⁴⁸ Total COD was determined from a homogenized sample of the mixed liquor. Soluble COD was determined from a centrifuged (5900 g for 15 min; model 5810 R, Eppendorf, Mexico) and filtered sample (0.45 µm filter, 66 601, Pall Inc., Mexico). Particulate COD was determined as the difference between the total and soluble COD. Since the synthetic wastewater fed into the reactor contained no suspended solids, it was assumed that the particulate COD was primarily composed of biomass (X), and it was therefore considered as such, while the soluble COD was considered as the substrate concentration (S). The biomass concentration was also quantified through volatile suspended solids (VSS), in accordance with standard methods.⁴⁸

2.3. Characterization of silver nanoparticles

AgNPs were a silver nanopowder purchased from Novacentrix (Austin, Texas). According to the manufacturer, these AgNPs are characterized by a mean particle size of 25 nm and a specific surface area of $23 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. The morphology and elemental composition of the silver nanoparticles were analyzed using a scanning electron microscope coupled with dispersive X-ray fluorescence analyzer (SEM-EDX, kevox 7000, JEOL, USA) with an accelerating voltage of 5 keV. The aggregation of the AgNPs in the liquid phase was determined through the measurement of the hydrodynamic diameter by dynamic light scattering (DLS), using a Malvern Zetasizer instrument (NanoZS90, Malvern, USA) at 25 °C. With that purpose AgNPs were suspended in deionized water, mineral medium or synthetic wastewater containing 50 mg COD L^{-1} of substrate, in the same manner than during respirometric tests. The cuvettes containing the samples were immediately placed in the Malvern Zetasizer instrument, and measured over 2.5 h, which was the approximate duration of the respirometric experiments. The theoretical speciation of Ag was also estimated through a chemical equilibrium software,⁴⁹ considering the pH, several Ag concentrations, and the anions and cations concentration of the synthetic wastewater. The software used does not include the thermodynamic data of peptone and meat extract, which are major components of the synthetic wastewater. Therefore, these proteinic compounds were mimicked as a mixture of glycine and glutamic acid, in equal proportions, at the same total COD concentration than the peptone and meat extract concentration in the synthetic wastewater. This strategy has been previously reported to estimate speciation in wastewater inhibited by heavy metals.^{39,50}

2.4. Silver nanoparticles and biomass sample preparation

Prior to the respirometry tests, a stock solution of AgNPs was prepared by suspension of AgNPs in deionized water. This solution had a final concentration of 2.18 g L^{-1} , and it was used during all respirometric experiments after proper dilution to obtain the desired final concentration in the microreactors. Prior to each respirometry test, a stock of biomass was also prepared. A biomass sample was taken from the bubble column and, centrifuged at $5900g$ for 15 min (Model 5810 R, Eppendorf). The supernatant was discarded, and the pellet was re-suspended in fresh media (composition reported in section 2.1.), without a carbon source, to ensure the absence of any residual substrate. Then, the stock biomass was diluted to obtain the desired biomass concentration. It is worth noting that the absence of any significant residual substrate was confirmed during each respirometry experiment, with control tests (no added substrate) showing no exogenous respiration.

2.5. Microreactor system

The microreactor system used during the microrespirometric tests was an unbaffled 24-well (16 mm diameter, 18 mm depth) microflask system (PreSens, Mexico), which was previ-

ously described by Esquivel-Rios *et al.*⁴⁶ Each well included a pre-calibrated fluorometric dissolved oxygen (DO) sensor (OxoDish, PreSens, Mexico). The sensors were read with a 24-channel Sensor Dish Reader (SDR-281, PreSens, Mexico) connected to a personal computer with data acquisition software (SDR_v37 software, Presens, Mexico) that utilized a data acquisition frequency of 4 min^{-1} . Because the microreactor system did not include an aeration device, the oxygen transfer to the 24 microwells was achieved *via* superficial aeration, which naturally occurred in the wells by transfer from the headspace to the liquid content. To improve mixing and mass transfer, one glass bead (5 mm diameter) was introduced into each well. The microreactor system was placed at a fixed temperature in an orbital shaker (Ecotron Infors HT, Switzerland), at $25 \pm 0.5 \text{ °C}$ and 100 rpm.

2.6. Inhibition microrespirometry experiments

The inhibitory effects of AgNPs on the simulated activated sludge process was determined through microrespirometry, using the pulse dynamic method, which consisted of the on-line measurement of DO concentration after the addition of a substrate pulse of a known concentration. This technique has been widely described for standard respirometers^{51,52} and more recently for a microreactor system by Esquivel-Rios *et al.*⁴⁶ Briefly, the method included the following steps; (i) each well of the microreactor system was filled with 1.3 mL of biomass solution at the desired concentration and without a carbon source; (ii) the microreactor was closed and placed in the orbital shaker to ensure superficial aeration, (iii) the online acquisition software was maintained until stable DO concentration readings were obtained, which corresponded to the endogenous respiration state⁵³ and was defined as the initial baseline; (iv) the orbital shaker was briefly stopped for approximately 1 min, during which the microreactor was opened and, a pulse of a known AgNP concentration and a pulse of 0.1 mL of substrate at the desired concentration were then injected combinedly into each well; (v) the microreactor was closed and, the orbital shaking, as well as continuous DO concentration measurement was resumed; (vi) the presence of the substrate caused a transient decrease of the DO concentration, which was proportional to the substrate concentration; (vii) in the course of substrate uptake, the DO concentration slowly returned to an apparent steady state, which was defined as the final baseline, and (viii) the oxygen mass transfer coefficient ($K_L a$) was determined in each well, according to the method described by Badino *et al.*⁵⁴ Microreactor contents were discarded after each pulse. All respirometric experiments were conducted with replicates (n_{rep}) of three, unless otherwise specified, and triplicate control experiments without AgNPs were always included.

The experimental condition for each set of respirometric experiments are shown in Table 2. First, preliminary respirometric experiments were conducted, to establish a convenient span of AgNP concentrations that caused a significant range of inhibition. The range of the tested conditions was from

0 to 64 mg L⁻¹ of AgNPs. Second, the effect of AgNP concentration was evaluated in a range from 0 to 16 mg L⁻¹, at a constant biomass and substrate concentration. Third, the effect of substrate and biomass initial ratio (S_0/X_0) was tested in a range of 0.0075–0.126, in COD units. To cover that S_0/X_0 range, two methods were used. First, X_0 was kept constant at 1000 mg COD L⁻¹ while S_0 was varied in a range from 8 to 126 mg COD L⁻¹. Next, S_0 was kept constant at 50 mg COD L⁻¹ while X_0 was varied from 1000 to 6640 mg COD L⁻¹. In all cases, a constant AgNP concentration was maintained. Fourth, to evaluate the effects of exposure time on the toxicity of AgNPs, biomass samples placed in the wells of the micro-reactor system were exposed to AgNPs, at concentrations of 4, 8 and 16 mg L⁻¹, and maintained from 0 to 8 h. Then, a substrate pulse of 64 mg COD L⁻¹ was injected into each well. Similarly, control experiments without AgNPs were performed with the same time sequences.

2.7. Data interpretation

The exogenous oxygen uptake (OUR_{ex}) rate was calculated from the DO mass balance in the microreactors (eqn (1)), where $K_L a$ is the volumetric oxygen mass transfer coefficient (h⁻¹), C is the measured DO concentration (mg O₂ L⁻¹) of the respirometric experiment, and C_b is the initial baseline DO concentration (mg O₂ L⁻¹) that corresponds with the DO concentration during the pseudo steady state prior to pulse injection. More details on these equations can be found elsewhere.⁵¹

$$\frac{dC}{dt} = K_L a (C_b - C) - OUR_{ex} \quad (1)$$

During the pulse respirometry, C_b was typically inferior to the saturation concentration (C^*). This difference accounted for the endogenous respiration rate (mg O₂ mg COD h⁻¹). Two endogenous respiration rates were distinguished; b_H , observed before

pulse injection; C_b , determined from the initial baseline (eqn (2)); b'_H , when the system returned to steady state after the pulse injection; and C'_b , determined from the final baseline (eqn (3)).

$$b_H = \frac{K_L a (C^* - C_b)}{X} \quad (2)$$

$$b'_H = \frac{K_L a (C^* - C'_b)}{X} \quad (3)$$

The impact of AgNPs on the wastewater treatment process was quantified through determination of the specific oxygen uptake rate (OUR ; mg O₂ mg⁻¹ COD h⁻¹). As described in the results section, the activated sludge process was well described by a Monod kinetic (eqn (4)), where OUR_{max} (mg O₂ mg⁻¹ COD h⁻¹) and K_S (mg COD L⁻¹) are the maximum OUR and the substrate affinity constant, respectively, observed in the absence of AgNPs.

$$OUR = OUR_{max} \frac{S}{K_S + S} \quad (4)$$

In the presence of AgNPs, the apparent OUR_{max} (OUR'_{max}) and the apparent K_S (K'_S) were retrieved from the observed (OUR'), using the same Monod model (eqn (5)).

$$OUR' = OUR'_{max} \frac{S}{K'_S + S} \quad (5)$$

To retrieve OUR'_{max} and K'_S , the method was based on the injection of pulses of increasing concentration, which has been exhaustively described^{55,56} and consisted of determining the observed OUR'_{max} ($OUR'_{obs,max}$) at several pulse concentrations (S_p), all of which were conducted at the same nanoparticle concentration. Both, OUR'_{max} and K'_S were determined by Monod model fitting (eqn (5)) to $OUR'_{obs,max}$ vs. S_p , with the Runge–Kutta method using Levenberg–Marquardt optimization (Matlab R2012b software). Goodness of fit was estimated by the coefficient of determination (R^2). The same protocol for determining OUR_{max} and K_S was applied during the experiments in the absence of AgNPs.

In addition to the kinetic parameters, the effect of AgNPs was also quantified through the percentage of inhibition ($I\%$). This parameter was determined from the $OUR'_{obs,max}$ in the presence and absence of the inhibitor, according to eqn (6), where $IOUR'_{obs,max}$ is the $OUR'_{obs,max}$ in the presence of AgNPs.

Table 2 Condition of each set of respirometric experiments

1. Preliminary tests	Biomass (mg COD L ⁻¹): 1029 Substrate (mg COD L ⁻¹): 54 AgNPs (mg L ⁻¹): 0, 16, 32, 64 Exposure time (h): 0
2. Effect of AgNPs	Biomass (mg COD L ⁻¹): 1142, 1029 Substrate (mg COD L ⁻¹): 50, 54 AgNPs (mg L ⁻¹): 0, 2, 4, 8, 16, 64 Exposure time (h): 0
3. Effect of S_0/X_0	Biomass (mg COD L ⁻¹): 1000, 1650, 2602, 3301, 6638 Substrate (mg COD L ⁻¹): 9.6, 14, 36, 40, 58, 63, 77, 126 AgNPs (mg L ⁻¹): 8 Exposure time (h): 0
4. Effect of exposure time	Biomass (mg COD L ⁻¹): 1348 Substrate (mg COD L ⁻¹): 50 AgNPs (mg L ⁻¹): 4, 8, 16 Exposure time (h): 0, 1, 2, 4, 8

$$I\% = \frac{OUR'_{\text{obs.max}} - IOUR'_{\text{obs.max}}}{OUR'_{\text{obs.max}}} \times 100 \quad (6)$$

In addition, the percentage of endogenous respiration inhibition ($I\%_{b_{\text{H}}}$) was determined according to eqn (7), where b'_{H} is the final endogenous respiration rate (eqn (3)) observed in the control experiment with no inhibitor, and Ib'_{H} is the observed b'_{H} in the presence of AgNPs.

$$I\%_{b_{\text{H}}} = \frac{b'_{\text{H}} - Ib'_{\text{H}}}{b'_{\text{H}}} \times 100 \quad (7)$$

2.8. Statistical analysis

The significance difference between parameters was calculated using the Tukey–Kramer's multiple comparison (TK) test performed after analyzing variance ($\alpha < 0.05$) using the OriginPro 8 SR0 v8.0724 software (OriginLab, Northampton, MA).

3. Results and discussion

SEM-EDX analysis showed that the morphology of AgNPs were spherical with an average size of 25 nm (Fig. 1), which is similar to what is reported by the manufacturer. It was further found that the AgNPs were mostly composed of silver and carbon with concentrations of 83.99 and 7.86% respectively (inner Table in Fig. 1). Aggregation of the nanoparticles was determined through the measurement of the hydrodynamic diameter by dynamic light scattering (DLS), over 2.5 h, which was the approximate duration of the respirometric tests. In all cases, including AgNPs suspended in deionized water, mineral medium and synthetic wastewater, two hydrodynamic diameter classes were observed, with an average of 172.1 ± 14.9 and 35.8 ± 5.2 nm, and with an intensity percentage of 84.7 ± 4.6 and $14.0 \pm 3.4\%$, respectively (Fig. S1A†). Fig. S1B† also shows an example of the hydrodynamic diameter over time, observed with synthetic wastewater. No significant changes over time was observed, in any of the conditions tested (results not shown), suggesting that AgNPs aggregation was not changing over time. Table 3 shows the average hydrodynamic diameter observed under all tested conditions. Overall, it was observed that the composition of the suspension medium had little effect on the hydrodynamic diameters. When suspended in deionized water, AgNPs formed larger aggregates, although not always with a significant difference compared to synthetic wastewater. It was further observed that sonication had no effect of the hydrodynamic diameter of both sizes classes, for a given suspension media. These results suggest that the nanoparticle aggregates were relatively stable over time and not sensitive to external mechanical forces. The latter is contradictory to previous reports, showing a size increase of AgNPs aggregates

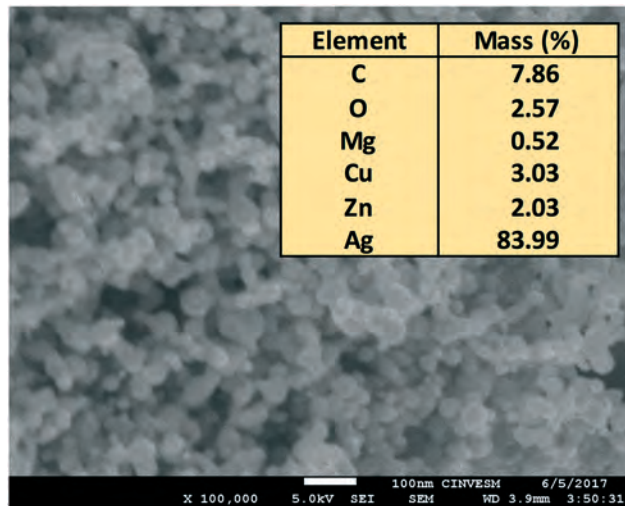


Fig. 1 SEM image and EDX composition of silver nanoparticles.

over time,^{57–59} although these previous reports were done under different experimental conditions, including shortest time scale and simpler media.

The theoretical speciation of the AgNPs was analyzed and is presented in Table S1,† expressed as the percentage of free Ag and Ag-complexes with respect to the total Ag concentration (Table S1†). Free Ag increased slightly from 28.8 to 30.3% when the total Ag concentration increased. The dominant complex was AgCl, which represented about 63% of the total Ag, with little effect of the Ag concentration. This is in accordance to the literature, since Levard *et al.*⁶⁰ have previously reported that Ag forms strong complexes with chlorine. Complexes formation with chlorine in wastewater may result of major importance, as Zhang *et al.*⁶¹ showed that the chlorine to Ag ratio plays a predominant role in sequestration, precipitation and release of Ag from AgNPs.

The activated sludge process was operated for approximately 1 year prior to the respirometric experiments. The COD removal efficiency was stable at $90 \pm 2\%$, and the biomass concentration was maintained at an average value of 559 ± 35 mg COD L⁻¹, which corresponded to 375 ± 23 mg VSS L⁻¹. The average ratio between COD and VSS observed during the year of operation ($n = 55$) was 1.49 ± 0.15 g COD g⁻¹ VSS. Preliminary respirometric experiments were conducted to establish a convenient range of AgNP concentrations. Examples of the respirograms observed during these preliminary tests are presented in Fig. S2,† showing that an AgNP concentration ranging from 0 to 16 mg L⁻¹ was adequate, because it caused a significant but not total inhibition.

Fig. 2 shows some examples of OUR_{ex} profiles, observed after the injection of a substrate pulse of 50 mg COD L⁻¹ in the presence of increasing concentrations of AgNPs. In all cases, OUR_{ex} increased sharply and reached a maximum OUR_{ex} (OUR'_{\text{obs.max}}) immediately after pulse injection. After reaching the maximum, OUR_{ex} slowly returned to the initial baseline, which corresponded to the endogenous respiration, *i.e.*, no exogenous

Table 3 Results of the AgNPs light scattering analysis; average particles diameter (nm \pm SD); and intensity of the two dominant diameter classes (% \pm SD), submerged in mineral medium (MM), synthetic wastewater containing 50 mg COD L⁻¹ of substrate (SW), and deionized water (DW), before and after 10 min sonication. Letters in parenthesis are the Tukey–Kramer (TK) test results, values with the same capital letter are not significantly different ($\alpha < 0.05$). All data are the results of 22 measurements, measured over 2.5 h

Sonication	Medium	Class I	Class II
Yes	DW	191.3 \pm 25.0 ^(C) ; 88.9 \pm 5.1%	40.4 \pm 17.3 ^(X,Y) ; 14.8 \pm 3.8%
	MM	167.4 \pm 17.4 ^(A,B,C) ; 88.4 \pm 11.0%	35.6 \pm 12.5 ^(X,Y) ; 10.8 \pm 5.1%
	SW	157.7 \pm 18.7 ^(A,B) ; 87.1 \pm 3.0%	30.0 \pm 9.3 ^(Y) ; 11.5 \pm 11.0%
No	DW	184.1 \pm 29.9 ^(B,C) ; 83.2 \pm 5.3%	40.0 \pm 15.9 ^(X,Y) ; 14.8 \pm 3.8%
	MM	153.8 \pm 16.1 ^(A) ; 76.5 \pm 11.3%	29.0 \pm 18.3 ^(Y) ; 20.0 \pm 11.1%
	SW	177.9 \pm 39.2 ^(B,C) ; 83.7 \pm 4.4%	40.0 \pm 23.9 ^(X) ; 12.2 \pm 3.1%

respiration. In all cases, the presence of AgNPs had a clear inhibitory effect, which resulted in flatter respirograms, as well as lower $OUR'_{obs,max}$. Surprisingly, at an AgNP concentration of 4 mg L⁻¹, a plateau in the respirograms was observed after $OUR'_{obs,max}$ was reached. This plateau was observed in each of the 3 replicates of each of the five substrate concentrations tested, discarding experimental artifacts. For an unknown reason, the plateau was never observed at any other AgNP concentration. It is worth mentioning that at the higher AgNP concentrations tested, Fig. 2 shows negative OUR_{ex} values, at the end of the pulse. Such unrealistic OUR_{ex} are easily explained by the fact that AgNPs had an inhibitory effect on the endogenous respiration, resulting in an increase of the final baseline DO concentration, compared with the initial baseline. The difference between the initial and final baselines was exploited to determine the endogenous inhibition, as will be described subsequently.

The observed decrease in $OUR'_{obs,max}$ in the presence of AgNPs allowed for the determination of $I\%$. Fig. 3 shows $I\%$ as a function of AgNP concentration, which exhibits an asymptotic pattern, as previously described by Liu *et al.*,⁶² in a nitrifying sludge exposed to ZnO nanoparticles and by Michels *et al.*,³⁸ in a nitrifying sludge culture exposed to AgNPs. Within the range of AgNP concentration tested, the highest observed $I\%$ was 95%. The latter result agrees with a 95% maximum inhibition reported by Liu *et al.*,⁶² with ZnO nanoparticles in a nitrifying sludge and is also in agreement with Giao *et al.*,³¹ who reported a maximum inhibition of 50% in a nitrifying axenic

culture exposed to AgNPs. From the results presented in Fig. 3, the IC_{50} was 3.32 ± 0.16 mg L⁻¹, which is within the range reported in the literature (Table 1).

As shown in Fig. 2, at the higher AgNP concentration tested, a substantial change in the DO baseline was observed before and after pulse injection. This reflects a change in the endogenous respiration rate (eqn (3)) and is a strong indicator that AgNPs caused biomass death or irreversible inhibition of a significant fraction of the complex microbial community. This inhibitory effect was quantified through $I\%_{b_{hi}}$ as a function of AgNP concentration, with an asymptotic pattern such as that observed with $I\%$ (Fig. 3), and the IC_{50} for endogenous respiration was 7.12 ± 0.11 mg L⁻¹. To our knowledge, this is the first report on the nanoparticle effects on the endogenous respiration rate of a microbial culture. From Fig. 3, three distinctive zones can be denoted: (A) no-inhibition, (B) inhibition of exogenous respiration only and (C) inhibition of both exogenous and endogenous respiration. We found that an asymptotic model properly described both $I\%$ (eqn (8)) and $I\%_{b_{hi}}$ (eqn (9)).

$$I\% = 0 \quad \text{for } I < I_c$$

$$I\% = \frac{I - I_c}{(I - I_c) + K_1} \times 100 \quad \text{for } I \geq I_c \quad (8)$$

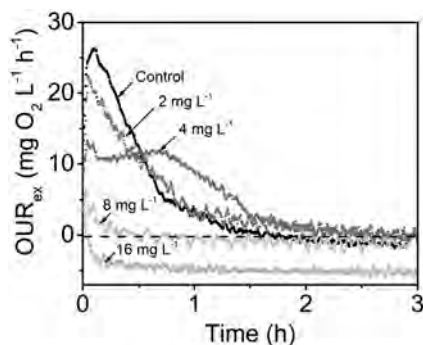


Fig. 2 Examples of the observed OUR curves after the injection of a single substrate concentration (50 mg COD L⁻¹) in the presence of increasing AgNP concentrations (1–16 mg L⁻¹).

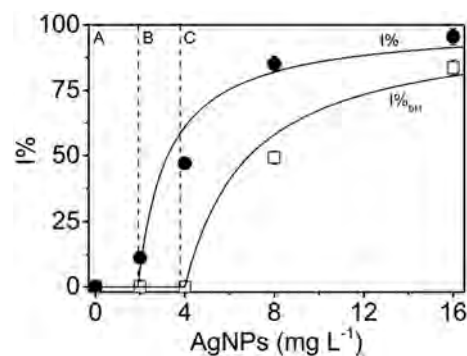


Fig. 3 $I\%$ (●) and $I\%_{b_{hi}}$ (□) effect of increasing concentration of AgNPs. Three distinctive zones can be denoted; (A) no-inhibition, (B) inhibition of exogenous respiration only and (C) inhibition of both exogenous and endogenous respiration ($n_{rep} = 4$). Dark lines show the best model fitting (eqn (8) and (9)), and error bars represent one standard deviation.

$$I\%_{b_{hi}} = 0 \quad \text{for } I < I_{C_{hi}}$$

$$I\%_{b_{hi}} = \frac{I - I_{C_{hi}}}{(I - I_{C_{hi}}) + K_{I_{hi}}} \times 100 \quad \text{for } I \geq I_{C_{hi}} \quad (9)$$

where I_C and $I_{C_{hi}}$ are the minimum AgNP concentration at which an exogenous or an endogenous inhibitory effect are observed, respectively; and K_I and $K_{I_{hi}}$ are the inhibition constant of the exogenous and endogenous respiration rates, respectively. The values of I_C , $I_{C_{hi}}$, K_I and $K_{I_{hi}}$ are reported in Table 4. The values of I_C and $I_{C_{hi}}$ were significantly higher than the range of AgNP concentrations currently found in wastewater, *i.e.*, 10 ng L⁻¹ to 0.1 mg L⁻¹,¹⁷ but similar to the concentration found in some specific sectors, such as textile factories, where concentrations of up to 1.3 mg L⁻¹ have been suggested.¹³ Therefore, wastewater inhibition by AgNPs is probably not an immediate threat for wastewater processes, except in few specific cases, but it might become a concern in the future as AgNP production and use is increasing exponentially.

When pulses of increasing concentration were used, $OUR'_{obs,max}$ vs. S_p was properly fitted by the Monod model (average $R^2 = 0.97 \pm 0.02$, $n = 20$) and OUR'_{max} and K'_S could be determined. Fig. 4 shows OUR'_{max} and K'_S values as a function of the AgNP concentration. OUR'_{max} was in the range of 0.0005–0.019 mg O₂ mg COD⁻¹ h⁻¹, which was within the range previously reported by Esquivel-Rios *et al.*,⁴⁰ in an activated sludge fed with the same synthetic wastewater. K'_S was in the range of 0.24–19.1 mg COD L⁻¹ and was similar to the value reported by Insel *et al.*,⁶³ in an activated sludge fed with synthetic wastewater. An increase in AgNP concentration caused a decrease in both OUR'_{max} and K'_S , which is an indicator of uncompetitive inhibition, *i.e.*, inhibitor that binds the enzyme–substrate complex.⁶⁴ However, the classical uncompetitive model only properly fitted the OUR'_{max} values (eqn (10), $R^2 = 0.95 \pm 0.01$, $n = 4$), where K'_I is an inhibition constant. K'_S values were better described by the linear model (eqn (11), $R^2 = 0.96 \pm 0.001$, $n = 4$), where K''_I is a constant.

Table 4 Kinetic parameters estimated by the model proposed for AgNPs (eqn (8) and (9)). SD (standard deviation)

Parameters	Average ± SD
I_C (mg L ⁻¹)	1.90 ± 0.13
$I_{C_{hi}}$ (mg L ⁻¹)	4.00 ± 0.65
K_I (mg L ⁻¹)	1.34 ± 0.02
$K_{I_{hi}}$ (mg L ⁻¹)	2.90 ± 0.30

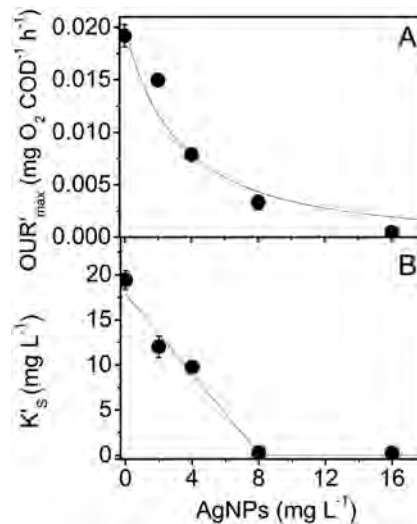


Fig. 4 (A) OUR'_{max} and (B) K'_S parameters determined at several AgNP concentrations ($n_{rep} = 4$). Dark lines show the best model fitting (eqn (10) and (11)), and error bars represent one standard deviation.

$$OUR'_{max} = OUR_{max} \cdot \frac{K'_I}{K'_I + I} \quad (10)$$

$$K'_S = K'_S \cdot I + K''_I \quad (11)$$

Fig. 5 shows $I\%$ and $I\%_{b_{hi}}$ as a function of S_0/X_0 , with an asymptotic pattern. Among S_0 and X_0 , the latter was the parameter that had a major effect on inhibition. When increasing X_0 at a constant S_0 , a significant decrease in $I\%$ and $I\%_{b_{hi}}$ was observed, while no effect was observed on $I\%$ and $I\%_{b_{hi}}$ when changing S_0 at a constant X_0 ($\alpha < 0.05$). A similar effect of X_0 on $I\%$ was previously reported in wastewater exposed to heavy metals^{65,66} and was explained by the fact that toxic compounds can be absorbed to a greater extent in the presence of a higher concentration of biomass, which results in lower availability of the inhibitor.^{65,67} To the best of our knowledge, this is the first time that the effect of S_0/X_0 on inhibition by nanoparticles is reported.

Finally, the effect of the exposure time was tested in the wells of the microreactor system, with a biomass concentration of 1348 mg COD L⁻¹ (905 mg VSS L⁻¹). A AgNP concentration of 4, 8 or 16 mg L⁻¹ was injected into the wells, and an exposure time from 0 to 8 h was provided before a pulse of substrate at 50 mg COD L⁻¹ was injected. The results of that experiment are shown in Fig. 6. At all AgNP concentrations tested, an asymptotic decrease in inhibition was observed over the exposure time. At the lowest AgNP concentration tested, a total loss of the inhibitory effect was observed after 8 h of exposure time. In the case of AgNP concentrations of 8 and 16 mg AgNPs L⁻¹, $I\%$ decreased from $90 \pm 1.6\%$ to $43.5 \pm 1.2\%$ and from $97 \pm 1.8\%$ to $72.8 \pm 2\%$ after 8 h of exposure time, respectively. The decrease in $I\%$ over time can be explained by the fact that AgNPs can be accumulated in the activated sludge biomass through

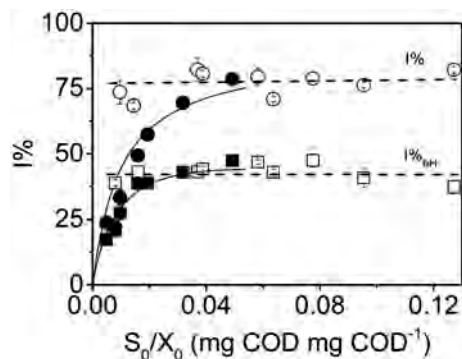


Fig. 5 Effect of S_0/X_0 ratio on $I\%$ and $I\%_{bH}$; filled symbols denote results obtained under the constant substrate concentration, while light symbols denote results obtained under the constant biomass concentration ($n_{rep} = 3$). Solid and dashed lines shows the best model fitting, and error bars represent one standard deviation.

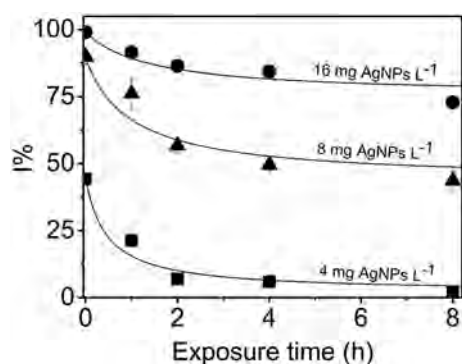


Fig. 6 Influence of exposure time on the inhibition of activated sludge caused by AgNPs ($n_{rep} = 3$). Error bars represent one standard deviation, dark lines show the best model fitting (eqn (12)); 16 mg L⁻¹ AgNPs, $I_{max} = 99\%$, $K_1 = 1.38$, $K_2 = 1.81$; 8 mg L⁻¹ AgNPs, $I_{max} = 89\%$, $K_1 = 1.00$, $K_2 = 2.05$; 4 mg L⁻¹ AgNPs, $I_{max} = 44\%$, $K_1 = 0.47$, $K_2 = 9.95$.

extracellular polymeric substances that are commonly formed in the presence of toxic substances for protection purposes.^{37,68} Another explanation may be that AgNPs interact over time with different ligands that are present in the synthetic wastewater (like a Cl^- , PO_4^- , S^- ions), which form silver-complexes that are subject to precipitation.⁶⁹ The effect of exposure time on $I\%$ was modeled well by a modified uncompetitive inhibition model (eqn (12)), where I_{max} is the maximum percentage inhibition, t is the exposure time, and K_1 and K_2 are the constants.

$$I\% = I_{max} \cdot \frac{K_1}{K_1 + t} \cdot \frac{K_2 + t}{K_2} \quad (12)$$

4. Conclusion

The microrespirometric method was successfully applied to determine the inhibitory effect of AgNPs on a simulated activated sludge process. The method was applied to a large number of experimental conditions, which allows for determination of several key parameters including OUR_{max} , K_S and

K_I . The inhibitory effect of AgNPs was quantified through determination of $I\%$ and, for the first time, $I\%_{bH}$, and a model describing the inhibitory effect was proposed. The kinetic parameters showed that AgNPs exert uncompetitive inhibition on the activated sludge process. Furthermore, the S_0/X_0 ratio showed that an increase in the biomass concentration was correlated with a decrease in the inhibitory effect caused by AgNPs on the activated sludge process. In addition, it was determined that the increase in the exposure time to AgNPs led to a decrease in the toxic effect on the active sludge process. Overall, the results show that the inhibitory effects of AgNPs on activated sludge must be seen as a complex matrix that involves many parameters that generate unique responses for each wastewater treatment plant and for each operating condition. However, it can be concluded that a relatively high biomass concentration, as well as long exposure times are the best conditions to ensure higher microbial resistance to the toxicity of AgNPs.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This research was supported by the ‘‘Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología’’ (CONACYT, project #133338 and #284140), which also provided financial support for Gabriel R. Hernández-Martínez (grant #261685). The authors also acknowledge the program ‘‘Verano de Investigación Científica de la Península de Yucatán Jaguar’’ for the financial support for Luis A. Sanchez-Catzin and Zaira D. Estrada-Díaz. The authors are thankful to Victoria T. Velázquez-Martínez and Juan Corona-Hernández for their technical assistance. The authors wish to give special acknowledgment to Omar Solorza Feria and Miriam Tellez-Cruz for their key support in the dynamic light scattering analysis.

References

- H. J. Zhai, D. W. Sun and H. S. Wang, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2006, **6**, 1968–1972.
- B. P. Rand, P. Peumans and S. R. Forrest, *J. Appl. Phys.*, 2004, **96**, 7519–7526.
- J. R. Cole and N. J. Halas, *Appl. Phys. Lett.*, 2006, **89**, 153120.
- S. H. Kim, B. S. Choi, K. Kang, Y. S. Choi and S. I. Yang, *J. Alloys Compd.*, 2007, **433**, 261–264.
- T. M. Tolaymat, A. M. El Badawy, A. Genaidy, K. G. Scheckel, T. P. Luxton and M. Suidan, *Sci. Total Environ.*, 2010, **408**, 999–1006.
- N. Savage and M. S. Diallo, *J. Nanopart. Res.*, 2005, **7**, 331–342.
- V. Sambhy, M. M. MacBride, B. R. Peterson and A. Sen, *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, **128**, 9798–9808.
- S. Pal, Y. K. Tak and J. M. Song, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, **73**, 1712–1720.
- S. K. Brar, M. Verma, R. D. Tyagi and R. Y. Surampalli, *Waste Manage.*, 2010, **30**, 504–520.

- 10 Y. Ju-Nam and J. R. Lead, *Sci. Total Environ.*, 2008, **400**, 396–414.
- 11 F. Piccinno, F. Gottschalk, S. Seeger and B. Nowack, *J. Nanopart. Res.*, 2012, **14**, 1109.
- 12 S. A. Blaser, M. Scheringer, M. MacLeod and K. Hungerbühler, *Sci. Total Environ.*, 2008, **390**, 396–409.
- 13 T. M. Benn and P. Westerhoff, *Environ. Sci. Technol.*, 2008, **42**, 4133–4139.
- 14 L. Geranio, M. Heuberger and B. Nowack, *Environ. Sci. Technol.*, 2009, **43**, 8113–8118.
- 15 N. C. Mueller and B. Nowack, *Environ. Sci. Technol.*, 2008, **42**, 4447–4453.
- 16 M. A. Kiser, H. Ryu, H. Jang, K. Hristovski and P. Westerhoff, *Water Res.*, 2010, **44**, 4105–4114.
- 17 F. Gottschalk, T. Sun and B. Nowack, *Environ. Pollut.*, 2013, **181**, 287–300.
- 18 S. Siripattanakul-Ratpukdi and M. Fürhacker, *Water, Air, Soil Pollut.*, 2014, **225**, 1939.
- 19 R. Arvidsson, S. Molander and B. A. Sandén, *J. Ind. Ecol.*, 2011, **15**, 844–854.
- 20 F. Çeçen, N. Semerci and A. G. Geyik, *J. Hazard. Mater.*, 2010, **178**, 619–627.
- 21 F. Çeçen and B. Kılıç, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2016, **91**, 1190–1198.
- 22 G. Ricco, M. C. Tomei, R. Ramadori and G. Laera, *Water Res.*, 2004, **38**, 2103–2110.
- 23 F. Mallevre, T. F. Fernandes and T. J. Aspray, *Environ. Pollut.*, 2014, **195**, 218–225.
- 24 Z. M. Xiu, J. Ma and P. J. Alvarez, *Environ. Sci. Technol.*, 2011, **45**, 9003–9008.
- 25 O. Choi, K. K. Deng, N. J. Kim, L. Ross, R. Y. Surampalli and Z. Hu, *Water Res.*, 2008, **42**, 3066–3074.
- 26 O. K. Choi and Z. Q. Hu, *Water Sci. Technol.*, 2009, **59**, 1699–1702.
- 27 N. T. Giao, T. Limpiyakorn, P. Kunapongkiyti, P. Thuptimrang and S. Siripattanakul-Ratpukdi, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2017, **24**, 9229–9240.
- 28 T. S. Radniecki, D. P. Stankus, A. Neigh, J. A. Nason and L. Semprini, *Chemosphere*, 2011, **85**, 43–49.
- 29 Z. Yuan, J. Li, L. Cui, B. Xu, H. Zhang and C. P. Yu, *Chemosphere*, 2013, **90**, 1404–1411.
- 30 C. K. Mumper, A. K. Ostermeyer, L. Semprini and T. S. Radniecki, *Chemosphere*, 2013, **93**, 2493–2498.
- 31 N. T. Giao, T. Limpiyakorn and S. Siripattanakul-Ratpukdi, *Water, Air, Soil Pollut.*, 2012, **223**, 5197–5203.
- 32 Z. H. Yuan, X. Yang, A. Hu, Y. M. Zheng and C. P. Yu, *Sci. Total Environ.*, 2016, **544**, 901–907.
- 33 Z. Liang, A. Das and Z. Hu, *Water Res.*, 2010, **44**, 5432–5438.
- 34 Z. H. Yuan, X. Yang, A. Hu and C. P. Yu, *Chem. Eng. J.*, 2015, **276**, 83–90.
- 35 Y. Chen, H. Chen, X. Zheng and H. Mu, *J. Hazard. Mater.*, 2012, **239**, 88–94.
- 36 Y. Yang, J. Quensen, J. Mathieu, Q. Wang, J. Wang, M. Li, J. M. Tiedje and P. J. Alvarez, *Water Res.*, 2014, **48**, 317–325.
- 37 A. G. Geyik and F. Çeçen, *Bioresour. Technol.*, 2016, **211**, 691–697.
- 38 C. Michels, S. Perazzoli and H. M. Soares, *Sci. Total Environ.*, 2017, **586**, 995–1002.
- 39 G. R. Hernandez-Martinez, D. Ortiz-Alvarez, M. Perez-Roa, N. A. Urbina-Suarez and F. Thalasso, *J. Hazard. Mater.*, 2018, **351**, 63–70.
- 40 I. Esquivel-Rios, I. González and F. Thalasso, *Biodegradation*, 2014, **25**, 867–879.
- 41 B. A. Chambers, A. N. Afrooz, S. Bae, N. Aich, L. Katz, N. B. Saleh and M. J. Kirisits, *Environ. Sci. Technol.*, 2013, **48**, 761–769.
- 42 Z. Z. Zhang, J. J. Xu, Z. J. Shi, Y. F. Cheng, Z. Q. Ji, R. Deng and R. C. Jin, *J. Hazard. Mater.*, 2017, **334**, 49–58.
- 43 E. Jeong, W. T. Im, D. H. Kim, M. S. Kim, S. Kang, H. S. Shin and S. R. Chae, *J. Environ. Sci. Health, Part A: Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng.*, 2014, **49**, 685–693.
- 44 R. W. Okey and H. D. Stensel, *Toxicol. Environ. Chem.*, 1993, **40**, 235–254.
- 45 H. Spanjers, I. Takács and H. Brouwer, *Water Sci. Technol.*, 1999, **39**, 137–145.
- 46 I. Esquivel-Rios, R. Ramirez-Vargas, G. R. Hernandez-Martinez, M. Vital-Jacome, A. Ordaz and F. Thalasso, *Biochem. Eng. J.*, 2014, **83**, 70–78.
- 47 R. Ramirez-Vargas, M. Vital-Jacome, E. Camacho-Perez, L. Hubbard and F. Thalasso, *J. Biotechnol.*, 2014, **186**, 58–65.
- 48 L. S. Clesceri, A. D. Eaton, A. E. Greenberg, A. American Public Health, A. American Water Works and E. F. Water, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, American Public Health Association, 1998.
- 49 J. P. Gustafsson, *Visual MINTEQ Version 3.1*, Department of Sustainable Development, Environmental Science and Engineering, KTH, Stockholm, 2013.
- 50 F. Friedrichs, K. U. Rudolph, B. H. Nguyen, D. Meinardi, W. Genthe and D. Q. Trung, *Water Sci. Technol.*, 2017, **75**, 247–254.
- 51 A. Ordaz, C. S. Oliveira, R. Aguilar, M. Carrión, E. C. Ferreira, M. Alves and F. Thalasso, *Biotechnol. Bioeng.*, 2008, **100**, 94–102.
- 52 C. S. Oliveira, A. Ordaz, E. C. Ferreira, M. Alves and F. Thalasso, *Biochem. Eng. J.*, 2011, **58**, 12–19.
- 53 H. Spanjers and P. Vanrolleghem, *Water Sci. Technol.*, 1995, **31**, 105–114.
- 54 A. C. Badino, M. Facciotti and W. Schmidell, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2000, **75**, 469–474.
- 55 R. Ramirez-Vargas, A. Ordaz, M. Carrion, I. Y. Hernandez-Paniagua and F. Thalasso, *Biodegradation*, 2013, **24**, 675–684.
- 56 A. Ordaz, C. S. Oliveira, G. Quijano, E. C. Ferreira, M. Alves and F. Thalasso, *J. Biotechnol.*, 2012, **157**, 173–179.
- 57 X. Li, J. J. Lenhart and H. W. Walker, *Langmuir*, 2010, **26**, 16690–16698.
- 58 S. F. Chen and H. Zhang, *Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.*, 2012, **3**, 035006.
- 59 D. He, M. W. Bligh and T. D. Waite, *Environ. Sci. Technol.*, 2013, **47**, 9148–9156.
- 60 C. Levard, S. Mitra, T. Yang, A. D. Jew, A. R. Badireddy, G. V. Lowry and G. E. Brown Jr, *Environ. Sci. Technol.*, 2013, **47**, 5738–5745.

- 61 W. Zhang, B. Xiao and T. Fang, *Chemosphere*, 2018, **191**, 324–334.
- 62 G. Liu, D. Wang, J. Wang and C. Mendoza, *Sci. Total Environ.*, 2011, **409**, 2852–2857.
- 63 G. Insel, O. Karahan, S. Ozdemir, L. Pala, T. Katipoglu, E. U. Cokgor and D. Orhon, *J. Environ. Sci. Health, Part A: Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng.*, 2006, **41**, 1763–1780.
- 64 I. J. Dunn, J. Ingham, E. Heinzle and J. E. Prenosil, *Biological Reaction Engineering*, VCH, Weinheim, 2nd edn, 2003, pp. 68–74.
- 65 A. S. Stasinakis, N. S. Thomaidis, A. Giannes and T. D. Lekkas, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 2003, **10**, 177–182.
- 66 S. Vaňková, J. Kupec and J. Hoffmann, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 1999, **42**, 16–21.
- 67 J. L. Hu, X. W. He, C. R. Wang, J. W. Li and C. H. Zhang, *Bioresour. Technol.*, 2012, **121**, 25–30.
- 68 Z. Sheng and Y. Liu, *Water Res.*, 2011, **45**, 6039–6050.
- 69 Z. Zhang, P. Gao, M. Li, J. Cheng, W. Liu and Y. Feng, *Sci. Total Environ.*, 2016, **569**, 234–243.