

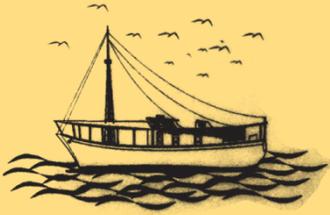
BOLETÍN DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

- DINÁMICA REPRODUCTIVA DEL CANGREJO (*CALLINECTES DANAE*) (DECAPODA: PORTUNIDAE) DE LA ISLA DE MARGARITA, VENEZUELA.**
Idar Quijada, Leo Walter González, Nora Eslava y Francisco Guevara 112
- LA HARINA DE LOMBRIZ DE TIERRA (*EISENIA FETIDA*) COMO ALTERNATIVA PROTEICA EN EL ENGORDE DE PRE-JUVENILES DEL CAMARÓN *PENAEUS VANNAMEI*.**
Ángela Zambrano, Rodolfo Panta-Vélez, Juan Vélez, Vanessa Acosta y Fernando Isea-León..... 134
- RIQUEZA Y COMPOSICIÓN DE LA AVIFAUNA DEL MANGLAR CAPITAN CHICO, MARACAIBO, VENEZUELA.**
Sonsirée Ramírez, Enrique Narváez y Anderson Saras..... 149
- ¿QUÉ SABEMOS DE LAS ESPECIES EXÓTICAS EL TEJEDOR AFRICANO (*PLOCEUS CUCULLATUS*), LA MONJITA (*LONCHURA MALACCA*) Y LA ALONDRA (*LONCHURA ORYZIVORA*) EN VENEZUELA?**
Cristina Sainz-Borgo..... 165
- FLORÍSTICA Y ESTRUCTURA DE LOS BOSQUES RIBEREÑOS DEL HUMEDAL LAGUNA OJO DE AGUA, LA URBANA, MUNICIPIO CEDEÑO, ESTADO BOLÍVAR, VENEZUELA.**
Wilmer Díaz-Pérez, Nathalit Mojica y Judith Rosales..... 186

Vol.55, N^o 2, Julio-Diciembre 2021
Pp. 112- 311.

UNA REVISTA INTERNACIONAL DE BIOLOGÍA
PUBLICADA POR LA
UNIVERSIDAD DEL ZULIA, MARACAIBO, VENEZUELA





BOLETÍN DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS

NUEVAS ESPECIES DE PARACYMUS THOMSON, 1867 (COLEOPTERA: HYDROPHILIDAE: LACCOBIINI). PARTE II: NUEVOS REGISTROS DE VENEZUELA. <i>Mauricio García</i>	199
EFFECTO TÓXICO DEL Ni(II) SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA UREASA EN UN LODO ANAERÓBICO GRANULAR. <i>Julio Marín, Karelis Fernández, Laugeny Díaz y Nancy Angulo</i>	222
NOTAS SOBRE LA FAMILIA TORRIDINCOLIDAE EN VENEZUELA (INSECTA: COLEOPTERA). <i>Mauricio García</i>	240
PHANOCERUS GUAQUIRA NUEVA ESPECIE DE ESCARABAJA ACUÁTICO (COLEOPTERA: ELMIDAE) DE YARACUY, VENEZUELA. <i>María Leal-Duarte, Alfredo Briceño-Santos y José Elí Rincón Ramírez</i>	254
INSTRUCCIONES A LOS AUTORES	262
INSTRUCTIONS FOR AUTHORS	302

Vol.55, N^o 2, Julio-Diciembre 2021

Pp. 112- 311.

UNA REVISTA INTERNACIONAL DE BIOLOGÍA
PUBLICADA POR LA
UNIVERSIDAD DEL ZULIA, MARACAIBO, VENEZUELA



EFFECTO TÓXICO DEL Ni(II) SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA UREASA EN UN LODO ANAERÓBICO GRANULAR

Julio Marín^{1,*}, Karelis Fernández¹, Laugeny Díaz², Nancy Angulo³

¹Departamento de Ingeniería Sanitaria y Ambiental (DISA), Escuela de Ingeniería Civil, Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela. Julio Marín, <https://orcid.org/0000-0003-2770-5978>. *Autor de correspondencia: jmarin@fing.luz.edu.ve

²Laboratorio de Microorganismos Fotosintéticos, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela. Laugeny Díaz, <https://orcid.org/0000-0002-82-63-081X>.

³Centro de Investigación del Agua (CIA), Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela. Nancy Angulo, <https://orcid.org/0000-0001-6850-8706>.

RESUMEN

La entrada de sustancias tóxicas como metales, metaloides y otros, en los sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales ocasiona la inhibición de la actividad microbiana, conduciendo a la disminución de la eficiencia de remoción de contaminantes. Ante esta situación, se pueden implementar ciertas técnicas para comprobar la estabilidad fisiológica microbiana, como la medición de la actividad enzimática, la cual es altamente sensible, confiable y representativa ante los cambios ocurridos en los biorreactores. En este trabajo se evaluó el efecto tóxico del níquel (Ni) sobre la actividad de la ureasa en un lodo anaeróbico granular, mediante ensayos de laboratorio a condiciones mesofílicas. Se utilizaron 5 reactores alimentados con agua residual sintética que contenía concentraciones de 0 (control); 0,5 (R1); 10 (R2); 50 (R3) y 100 (R4) mgNi(II)/L, aplicando un tiempo de retención hidráulico de 24 h durante 30 d. Cada 3 d se cuantificaron los niveles de pH, alcalinidad total, demanda química de oxígeno, volumen de biogás y metano, inhibición de la producción de metano (IPM) y actividad de la ureasa. El incremento de las concentraciones de Ni(II) condujo a la disminución significativa ($p < 0,001$) de actividad de la ureasa, desde 1,21 (control) hasta 0,27 (R4) mg/dL, acompañado del aumento de la IPM hasta 13,3 %. Se evidenció el efecto tóxico de Ni(II) sobre el estado fisiológico de los microorganismos anaerobios presentes en el lodo granular, con inhibición de actividad de la ureasa y afectación del proceso de digestión anaeróbica, lo cual reduce la eficiencia de estos sistemas de tratamiento biológico.

Palabras clave: actividad enzimática; aguas residuales; demanda química de oxígeno; inhibición microbiana; producción de metano; tratamiento biológico.

TOXIC EFFECT OF Ni(II) ON UREASE ACTIVITY IN A ANAEROBIC GRANULAR SLUDGE

ABSTRACT

The entrance of toxic substances such as metals, metalloids and others into biological wastewater treatment systems causes the inhibition of microbial activity, leading to a decrease in the efficiency of pollutant removal. Therefore, certain techniques can be implemented to check the physiological stability of microorganisms, such as the measurement of enzymatic activity, which is highly sensitive, reliable and representative to the changes that occur in bioreactors. In this work, the toxic effect of nickel (Ni) on urease activity was evaluated in a granular anaerobic sludge, through laboratory tests at mesophilic conditions in batch reactors. Five reactors fed with synthetic wastewater containing concentrations of 0 (control), 0.5 (R1), 10 (R2), 50 (R3) and 100 (R4) mgNi(II)/L were used, applying a hydraulic retention time of 24 h for 30 d. Every 3 d the levels of pH, total alkalinity, chemical oxygen demand, volume of biogas and methane, inhibition of methane production (IMP) and urease activity were quantified. The increase in Ni(II) concentrations led to a significant decrease ($p < 0.001$) in urease activity, from 1.21 (control) to 0.27 (R4) mg/dL, accompanied by an increase in IMP up to 13.3 %. The toxic effect of Ni(II) on the physiological state of anaerobic microorganisms present in the granular sludge was evidenced, with urease activity inhibition and impairment of anaerobic digestion process, which reduces the efficiency of these biological treatment systems.

Keywords: biological treatment; chemical oxygen demand; enzymatic activity; methane production; microbial inhibition; wastewaters.

Recibido / Received: 08-10-2021 ~ **Aceptado / Accepted:** 22-11-2021

INTRODUCCIÓN

La digestión anaeróbica es un proceso catabólico llevado a cabo por un consorcio microbiano en el que el aceptor final de la cadena transportadora de electrones es una molécula inorgánica oxidada diferente al oxígeno (p. ej. NO_3^- , SO_4^{2-} , CO_2 , metales y otros), y en el que se genera biogás (mezcla gaseosa de CH_4 , CO_2 , N_2 , O_2 , H_2 y H_2S) (Madigan *et al.* 1998; Lorenzo y Obaya 2005; Amin *et al.* 2020). Este proceso se lleva a cabo mediante las siguientes etapas (Figura 1): i) hidrólisis: las bacterias

hidrolíticas descomponen los carbohidratos complejos, lípidos y proteínas en azúcares, ácidos grasos y aminoácidos simples y solubles, respectivamente. Esta etapa se lleva a cabo mediante la actividad sincronizada de bacterias filogenéticamente diversas, que actúan tanto como productoras de enzimas hidrolíticas como ejecutoras de hidrólisis (Li *et al.* 2019); *ii*) acidogénesis: los componentes formados durante la hidrólisis se dividen aún más durante esta etapa, siendo transformados a ácidos grasos volátiles por bacterias acidogénicas (o fermentativas), junto con NH_3 , CO_2 , H_2S y otros subproductos (Appels *et al.* 2008); *iii*) acetogénesis: las bacterias acetogénicas descomponen los alcoholes y ácidos grasos volátiles en acetato, formiato, H_2 y CO_2 , que luego son utilizados por los metanógenos (Amani *et al.* 2010; Wang *et al.* 2018); y *iv*) metanogénesis: se produce CH_4 por dos grupos de bacterias metanogénicas; el primer grupo divide el acetato en CH_4 y CO_2 , mientras que el segundo utiliza H_2 como donador de electrones y CO_2 como aceptor para producir CH_4 (Appels *et al.* 2008).

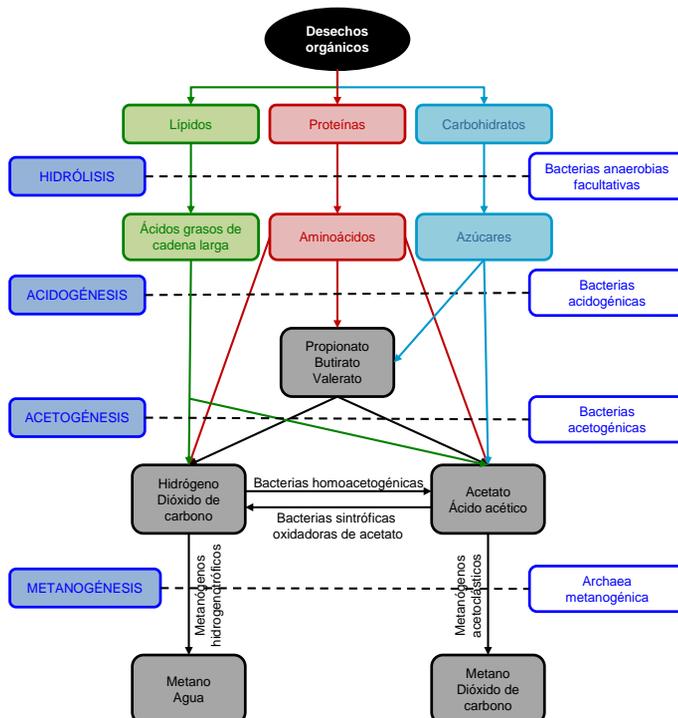


Figura 1. Esquema del proceso de digestión anaeróbica de materia orgánica (modificado de Amin *et al.* 2020).

La urea formada durante la biodegradación inicial de compuestos nitrogenados (p. ej. proteínas y ácidos nucleicos) es hidrolizada por la ureasa (urea amidohidrolasa, EC 3.5.1.5) a amoníaco y ácido carbámico (Kappun *et al.* 2018; Mazzei *et al.* 2020; Svane *et al.* 2020); este ácido se hidroliza espontáneamente y genera ácido carbónico y una segunda molécula de amoníaco (Figura 2). El sitio activo de la ureasa consta, además de los dos átomos de níquel (Ni), de una lisina carbamilada, cuatro histidinas y un residuo de aspartato. La lisina carbamilada une los dos átomos de Ni, con Ni-1 coordinado adicionalmente por dos histidinas y Ni-2 por las otras dos histidinas y por el residuo de aspartato. Además, un ion hidróxido une los dos átomos de Ni, que, junto con otras tres moléculas de agua terminales, forman un grupo tetraédrico de agua con enlaces H en el sitio activo (Mazzei *et al.* 2017; Kappaun *et al.* 2018). Si bien, el Ni actúa como cofactor de la ureasa, también resulta tóxico para el crecimiento microbiano, ya que puede: *i*) reemplazar el metal esencial en las metaloproteínas, *ii*) unirse a los residuos catalíticos de las no metaloenzimas, *iii*) unirse fuera del sitio catalítico de una enzima para inhibirla alostéricamente, y *iv*) provocar indirectamente estrés oxidativo (Macomber y Hausinger 2011; Genchi *et al.* 2020). En este sentido, Peters *et al.* (2014) reportaron concentraciones efectivas (CE₅₀) para la microalga *Chlorella* sp. Entre 0,212 y 2,640 mgNi/L, mientras que Le y Dao (2016) encontraron concentraciones letales (CL₅₀) entre 0,302 y 0,726 mgNi/L para el microcrustáceo *Daphnia lumholtzi*.

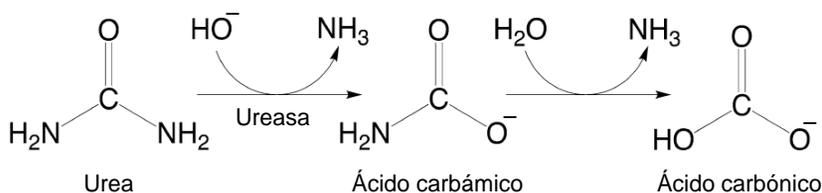


Figura 2. Reacción general de hidrólisis de la urea catalizada por la ureasa (modificado de Mazzei *et al.* 2020; Svane *et al.* 2020).

Muchos residuos líquidos industriales contienen cantidades importantes de sustancias potencialmente tóxicas como Ni y otros metales y no metales (p. ej. industrias metalmecánicas, tenerías, galvanizado y cromado, pintura, plásticos, baterías, entre otras) (Nemerow y Dasgupta 1998). Dichos componentes a menudo

pueden causar dificultades en los procesos de tratamiento biológico de aguas residuales, particularmente en la etapa de nitrificación/desnitrificación debido a la inhibición microbiana (Juliastuti *et al.* 2003; Appels *et al.* 2008), y pueden dificultar la eliminación de lodos. El efecto de metales, y de elementos químicos relacionados, en los procesos de tratamiento biológico de aguas residuales y lodos, ha sido ampliamente discutido en la literatura (Nemerow y Dasgupta 1998; Zayed y Winter 2000; Juliastuti *et al.* 2003; Mudhoo y Kumar 2013; Tsapekos *et al.* 2018; Genchi *et al.* 2020). Si bien muchas enzimas y coenzimas dependen de una cantidad mínima de ciertas trazas de metales para su activación y actividad, cuando están presentes en grandes cantidades, provocan un efecto inhibitor o tóxico sobre los microorganismos (Appels *et al.* 2008).

En el presente trabajo se evaluó el efecto tóxico del Ni(II) sobre la actividad de la ureasa en un lodo anaeróbico granular, mediante ensayos de laboratorio bajo condiciones mesofílicas en reactores por carga. Se describe el comportamiento de las variables operacionales que incluyen la remoción de materia orgánica, volumen de biogás y proporción de metano, así como inhibición de la producción de metano, de las concentraciones desde 0 hasta 100 mgNi(II)/L, con la finalidad de establecer su influencia sobre la eficiencia del proceso de digestión anaeróbica en los sistemas de tratamiento biológico de aguas y lodos residuales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sistema experimental

Se utilizaron simultáneamente 5 reactores de 500 mL (matraces Erlenmeyer) inoculados con 100 mL de un lodo anaeróbico granular procedente de un reactor de manto de lodo de flujo ascendente instalado en una industria cervecera de la ciudad de Maracaibo, y alimentados diariamente (tiempo de retención hidráulico, TRH, de 24 h) con 400 mL de agua residual sintética. Estos reactores se encontraban acoplados herméticamente a cilindros graduados de 500 mL contenidos en una trampa de biogás con agua acidificada (H_2SO_4 0,1 N), para reducir la solubilidad del CO_2 (Fernández 1993), mediante los cuales se registraba el volumen de biogás producido durante el tratamiento (Figura 3). La temperatura de experimentación se mantuvo a $37,0 \pm 0,5^\circ C$; utilizando un baño de agua GEMMY modelo YCW-03S sin agitación.

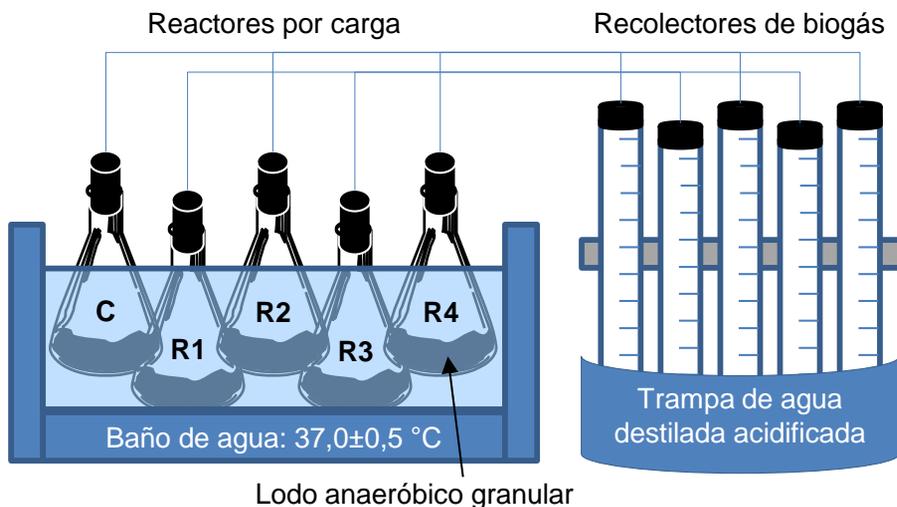


Figura 3. Sistema experimental de reactores anaeróbicos por carga (C, control; R1; R2; R3 y R4), usado para evaluar el efecto del Ni(II) sobre la actividad de la ureasa.

En 4 de los reactores se aplicaron concentraciones de Ni(II) de 0,5 (R1); 10 (R2); 50 (R3) y 100 (R4) mg/L a partir de nitrato de níquel ($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Merck, Alemania); el quinto reactor fungió como control sin metal. El recambio del agua residual sintética se realizaba manualmente, inclinando los matraces cuidadosamente, sin dejar salir el lodo granular y reponiendo el volumen con una porción nueva de agua residual.

Agua residual sintética

El agua residual sintética se preparó según Chacín (1993), incluyendo glucosa (Merck, Alemania) como única fuente de carbono, para aplicar una carga orgánica de $3 \text{ kgDQO}/\text{m}^3 \cdot \text{d}$ en los reactores. Las condiciones experimentales en el sistema de ensayo, se detallan en la Tabla 1. Antes de iniciar las mediciones de los parámetros operacionales, los reactores se aclimataron a las condiciones experimentales durante 10 d.

Tabla 1. Condiciones experimentales en los reactores anaeróbicos por carga provistos de lodo granular.

Reactor	Carga orgánica (kgDQO/m ³ .d)	Ni(II) (mg/L)	TRH (h)	Días de experimentación
Control	3	0	24	30
R1	3	0,5	24	30
R2	3	10	24	30
R3	3	50	24	30
R4	3	100	24	30

Parámetros operacionales

Cada tres días se tomaban muestras del efluente tratado en cada reactor, para analizar los siguientes parámetros: pH (método electrométrico), alcalinidad total (método volumétrico estándar) y remoción de materia orgánica (medida como demanda química de oxígeno, DQO, método volumétrico estándar), de acuerdo con los métodos estandarizados (APHA *et al.* 2017). También se cuantificaba el volumen de biogás producido y el porcentaje de metano en dicho biogás, según Marín *et al.* (2002). El porcentaje de inhibición de metano, se calculó con respecto al reactor control (Castro *et al.* 2004).

Actividad enzimática

La actividad de la enzima ureasa se cuantificó cada tres días aplicando el método colorimétrico ($\lambda = 690$ nm, espectrofotómetro JENGAY modelo 6405 UV/Vis), de acuerdo con Kandeler y Gerber (1988). Se pesó 1,0 g de lodo húmedo y se añadieron 4 mL de tampón de borato (pH 10,0) y 0,5 mL de sustrato (solución de urea 0,72 M). Esta mezcla se incubó bajo agitación constante durante 2 h en un baño de agua a $37,0 \pm 0,5$ °C. Seguidamente se adicionaron 6 mL de cloruro de potasio (KCl, 1 M), se agitó durante 30 min y se centrifugó a 3500 rpm por 10 min. Al final, se determinó la concentración del amonio liberado en el líquido sobrenadante (Kandeler y Gerber 1988; Henríquez *et al.* 2014). Los resultados se expresan en miligramos por decilitro (mg/dL).

Análisis estadístico de datos

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor y la prueba *a posteriori* de Tukey, con la finalidad de determinar diferencias significativas de las variables monitoreadas (pH, alcalinidad total, DQO, volumen de biogás y porcentaje de metano) en relación con las concentraciones de Ni(II) aplicadas, usando el programa SPSS Statistics versión 20. Como paso previo, se comprobaron tanto la homogeneidad de las varianzas (prueba de Levene), como la distribución normal de los residuos (prueba de Shapiro-Wilk). También se efectuó un análisis de correlaciones de Pearson de la actividad de la ureasa con relación a los parámetros operacionales de los reactores por carga.

RESULTADOS

Comportamiento de las variables operacionales

Durante los ensayos se observó un ligero aumento de los valores de pH y alcalinidad total a medida que se incrementaba la concentración de Ni(II). Los valores medios de pH fueron de $7,41 \pm 0,17$; $7,46 \pm 0,13$; $7,52 \pm 0,10$; $7,67 \pm 0,14$ y $7,85 \pm 0,18$; mientras que los de alcalinidad total se ubicaron en $2777,1 \pm 142,2$; $2857,0 \pm 150,1$; $2917,3 \pm 106,4$; $2986,8 \pm 96,4$ y $3005,2 \pm 186,3$ mgCaCO₃/L, para el control; 0,5; 10; 50 y 100 mgNi(II)/L, respectivamente. Dichas variaciones fueron significativamente diferentes ($p < 0,001$).

Las concentraciones finales de materia orgánica (DQO) en los reactores, por su parte, alcanzaron niveles de $104,2 \pm 8,9$; $106,5 \pm 10,2$; $180,9 \pm 27,5$; $228,8 \pm 27,8$ y $278,3 \pm 11,8$ mg/L, con porcentajes de remoción de $96,5 \pm 0,3$; $96,1 \pm 0,4$; $94,0 \pm 0,9$; $92,4 \pm 0,9$ y $90,7 \pm 0,4$ %, respectivamente, para el control; 0,5; 10; 50 y 100 mgNi(II)/L (Figura 4). Estas variaciones resultaron significativamente diferentes ($p < 0,001$), con los menores valores de remoción en R4 y los mayores en el control y R1 (prueba de Tukey).

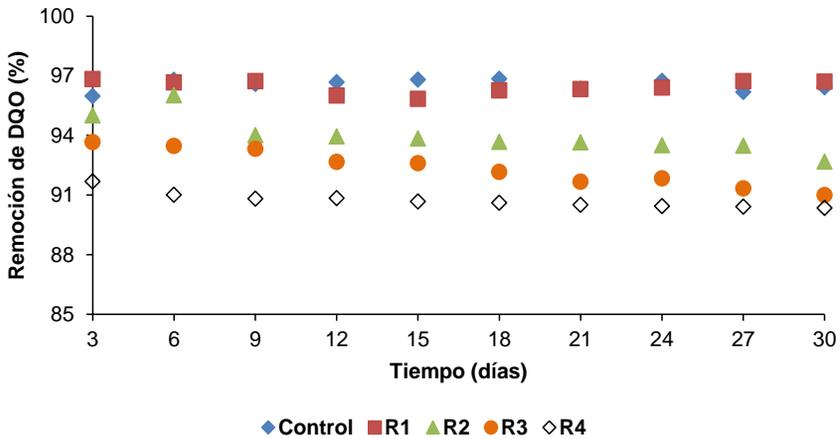


Figura 4. Variación de la remoción de demanda química de oxígeno (DQO) en los reactores por carga respecto a las concentraciones de Ni(II) aplicadas. Control^d: 0 mgNi(II)/L; R1^d: 0,5 mgNi(II)/L; R2^c: 10 mgNi(II)/L; R3^b: 50 mgNi(II)/L y R4^a: 100 mgNi(II)/L. Los subíndices diferentes representan diferencias significativas según prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Variación de actividad de la ureasa

En la Figura 5 se presentan las variaciones de actividad de la ureasa con relación a las concentraciones de Ni(II) aplicadas, las cuales se caracterizaron por un decrecimiento significativo ($p < 0,001$), con los siguientes valores medios: $1,21 \pm 0,02$ (control); $1,18 \pm 0,05$ (R1); $0,92 \pm 0,12$ (R2); $0,63 \pm 0,18$ (R3) y $0,56 \pm 0,22$ (R4) mg/dL. Estos niveles de actividad correlacionaron significativamente ($p < 0,01$) con las magnitudes de Ni(II) ($r = -0,813$), pH ($r = -0,718$), alcalinidad total ($r = -0,464$), remoción de materia orgánica ($r = 0,944$), biogás ($r = 0,877$), metano ($r = 0,941$) e inhibición de producción de metano ($r = -0,901$), de acuerdo con la Tabla 2.

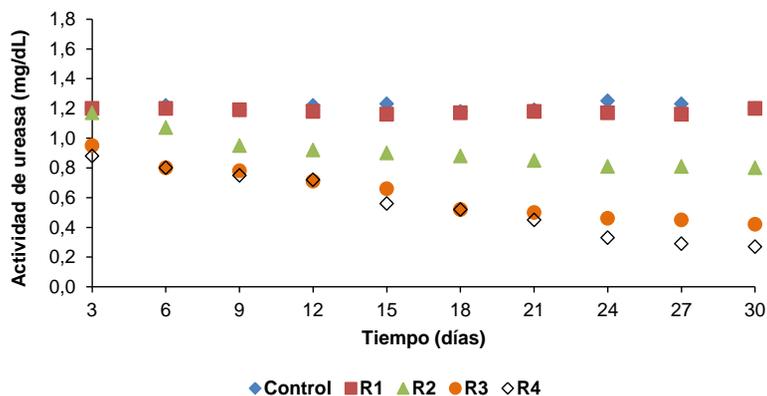


Figura 5. Variación de actividad de la ureasa en los reactores por carga respecto a las concentraciones de Ni(II) aplicadas. Control^c: 0 mgNi(II)/L; R1^c: 0,5 mgNi(II)/L; R2^b: 10 mgNi(II)/L; R3^a: 50 mgNi(II)/L y R4^a: 100 mgNi(II)/L. Los subíndices diferentes representan diferencias significativas según prueba de Tukey ($p < 0,05$).

Tabla 2. Matriz de correlaciones de Pearson para los parámetros operacionales en los reactores por carga ($n = 50$).

Variable	Ni(II)	pH	AT	DQO (final)	Remoción de DQO	Biogás	Metano	Ureasa	Inhibición de CH ₄
Ni(II)	-	0,738*	0,561*	0,903*	-0,903*	-0,834*	-0,895*	-0,813*	0,798*
pH		-	0,688*	0,739*	-0,739*	-0,729*	-0,747*	-0,718*	0,668*
AT			-	0,547*	-0,547*	-0,566*	-0,542*	-0,464*	0,472*
DQO (final)				-	-1,000*	-0,881*	-0,931*	-0,943*	0,906*
Remoción de DQO					-	0,880*	0,931*	0,944*	-0,906*
Biogás						-	0,900*	0,877*	-0,800*
Metano							-	0,941*	-0,917*
Ureasa								-	-0,901*
Inhibición de CH ₄									-

*: correlación significativa al nivel de 0,01; AT: alcalinidad total; DQO: demanda química de oxígeno.

Producción de biogás y metano

En los reactores por carga se obtuvo una disminución de la producción de biogás y de metano a medida que se aumentaba la concentración de Ni(II) (diferencias significativas $p < 0,001$), con tenores de $408,2 \pm 11,8$; $401,4 \pm 15,4$; $388,4 \pm 14,4$; $371,5 \pm 10,3$ y $347,7 \pm 15,7$ mL y de $94,4 \pm 1,2$; $93,4 \pm 1,2$; $89,8 \pm 4,5$; $82,4 \pm 3,6$ y $73,8 \pm 8,8$ % para el control, R1, R2, R3 y R4, respectivamente (Figuras 6A y 6B). Para el biogás la prueba de Tukey mostró la conformación de 3 grupos ($p < 0,05$); cuyos niveles mayores se presentaron en el control y R1, intermedios en R2 y R3, y menores en R4; de igual manera para el metano ($p < 0,05$), con concentraciones mayores en el control, R1 y R2, intermedios en R3 y menores en R4.

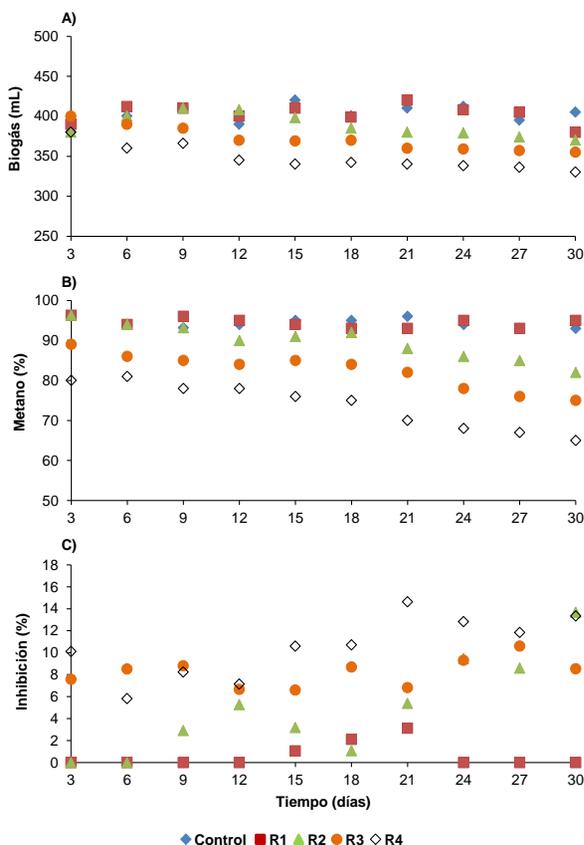


Figura 6. Variación de los niveles de biogás (A), metano (B) e inhibición de la producción de metano (C) en los reactores por carga respecto a las concentraciones de Ni(II) aplicadas. Control: 0 mgNi(II)/L; R1: 0,5 mgNi(II)/L; R2: 10 mgNi(II)/L; R3: 50 mgNi(II)/L y R4: 100 mgNi(II)/L.

La inhibición de la producción de metano, por su parte, estuvo en el orden de 0 % para el control; $0,6 \pm 1,1$ % para R1; $5,0 \pm 4,5$ % para R2; $8,2 \pm 1,3$ % para R3 y $10,5 \pm 2,8$ % para R4 (Figura 6C), con diferencias significativas entre los valores ($p < 0,001$) y la conformación de 3 grupos con el control y R1 (bajo); R2 y R3 (medio); y R4 (alto), según prueba de Tukey ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN

El comportamiento de las variables químicas en los reactores anaeróbicos, particularmente pH y alcalinidad total, garantizaron una capacidad amortiguadora y el desarrollo de una comunidad microbiana mixta (Speece 1983). Por ejemplo, las bacterias metanogénicas son extremadamente sensibles al pH con un óptimo entre 6,5 y 7,2; en tanto que los microorganismos fermentativos son menos sensibles y pueden funcionar en un rango más amplio de pH (4,0 a 8,5); a pH bajo los productos principales son ácido acético y butírico, mientras que a pH 8,0 se producen principalmente ácido acético y propiónico (Boe 2006; Appels et al. 2008).

La variación de actividad de la ureasa fue dependiente de los niveles de Ni(II) aplicados en los reactores (Figura 5), con mayor efecto negativo a 100 mgNi(II)/L (R4). Al respecto, Tsapekos et al. (2018) no obtuvieron variaciones en la remoción de materia orgánica (DQO) al aplicar niveles de hasta 10 mgNi/kg de sólidos volátiles en ensayos de biodegradabilidad anaeróbica de un lodo residual. Similarmente, Vintiloiu et al. (2013) señalaron que concentraciones entre 8 y 10 mgNi/kg de sólidos totales son extremadamente beneficiosas para el sistema microbiano en la digestión anaeróbica, mientras que Miśkowiec y Olech (2020), experimentando con muestras de suelo, encontraron correlaciones altamente positivas entre la actividad de ureasa, el contenido de materia orgánica y el contenido de Ni. Además, confirmaron correlaciones positivas entre la actividad de la ureasa y dos formas geoquímicas de níquel (activa y residual). En contraste, Chengy Cord-Ruwisch (2013) describieron la producción sostenible y no estéril de una industria de enzimas utilizando lodos activados como inóculo, mediante el uso de condiciones selectivas (pH alto, alta concentración de amoníaco y presencia de urea) con bacterias ureolíticas activas, fisiológicamente parecidas *Sporosarcina pasteurii*, en un sistema de biorreactor continuo (quimioestado), obteniendo concentraciones entre 0 y 21621,6 mg/dL/h

(60 μ moles/mL/min) de ureasa, las cuales resultan mucho mayores a las de este estudio (entre 0,01 y 0,05 mg/dL/h), debido al escalado industrial del proceso descrito por los autores, donde se maximiza su producción con fines comerciales.

Por otro lado, exposiciones constantes y/o altas concentraciones de Ni también pueden provocar el desarrollo de resistencia en ciertos grupos microbianos, debido a (Volesky 1990): *i*) la capacidad para resistir la presencia de altas concentraciones de metales en el citoplasma intracelular; es decir, bioacumulación; y *ii*) la precipitación/quelación del metal en la matriz exterior de la célula; es decir bioadsorción, que impide al metal llegar a los componentes intracelulares sensibles. Por ello, se han conseguido valores de tolerancia extremadamente elevados a metales y otros compuestos tóxicos en muchas comunidades microbianas, como en el caso del trabajo realizado por Fang y Hui (1994), quienes encontraron que los metales pesados inhibían la actividad metanogénica de los gránulos anaeróbicos que degradan el almidón en el orden Zn >Ni >Cu >Cr >Cd, y que el lodo granular tenía una mayor resistencia a la toxicidad que el lodo floculante, como resultado de la estructura estratificada.

Como se ha mencionado anteriormente, el efecto negativo de metales y otras sustancias tóxicas sobre la eficiencia de remoción de materia orgánica y otras variables operacionales, en sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales, ha sido ampliamente reportado. En este sentido, Malakahmad *et al.* (2012) indicaron que se requiere de al menos 9 d para aclimatar a los microorganismos en un reactor por carga secuencial, para poder resistir una concentración más alta de níquel; ya que el incremento de carga del metal condujo a una disminución de la eficiencia de eliminación de materia orgánica en el sistema, al igual que en este trabajo (Figura 4). Análogamente, Ashley *et al.* (1982) establecieron que concentraciones superiores a 1 mgNi(II)/L fueron dañinas al proceso metanogénico, observando que muchas especies de bacterias hidrolíticas se inhibieron a valores >12 mgNi(II)/L. Las poblaciones de bacterias amilolíticas y lipolíticas exhibieron un aumento inicial luego de las adiciones de Ni(II), seguido de un declive significativo del número de células. Esto sugiere que el aumento de las concentraciones de níquel es capaz de seleccionar una población de organismos que muestra mayor actividad proteolítica y contrasta marcadamente con los organismos amilolíticos que son inhibidos consecuentemente.

Otro efecto tóxico de la incorporación de níquel en los reactores fue el descenso en la producción de biogás y de metano (Figura 6A y 6B). En este aspecto, Ashley *et al.* (1982) encontraron que los niveles de metano disminuyeron desde 27 hasta 0,25 mL/h para 0,2 y 100 mgNi(II)/L, respectivamente, en un digestor anaeróbico alimentado con agua residual sintética; cuyo análisis de la producción de metano develó que los metanógenos son más susceptibles a la toxicidad del níquel en concentraciones bajas o se intoxican por los productos metabólicos finales de los organismos degradadores presentes en números más altos de lo habitual, debido a la selección de níquel. También Castro *et al.* (2004) reportaron un descenso en la producción de metano desde 15 hasta 5 mL, aplicando una concentración de 0-2000 mg(Ni)/L durante 24 h en un sistema de reactores anaeróbicos de manto de lodo con flujo ascendente, para una inhibición entre 0 y 65 %, la cual resulta mayor a la observada en este estudio (Figura 6C). De esta manera, el decrecimiento en la producción de biogás y de metano ha sido identificado como un indicador de estrés durante la digestión anaeróbica, estando relacionado con diversas causas, entre las que se encuentran: cambios en las condiciones ambientales, tales como pH, temperatura, potencial de óxido-reducción; disponibilidad de nutrientes y metales trazas/pesados y/o contaminación y toxicidad. Cuando un sistema de tratamiento anaeróbico falla debido a la falta de factores ambientales adecuados o al lavado de biomasa, el sistema puede tardar varios meses en volver a su condición de funcionamiento normal, debido a la tasa de crecimiento extremadamente lenta de los metanógenos (Khanal 2008; Mudhoo y Kumar 2013). Zayed y Winter (2000), en un reactor anaeróbico de lecho fijo, mostraron que se produjo una inhibición del 50 % de la metanogénesis en presencia de concentraciones ≥ 60 mgNi(II)/L.

Finalmente, se evidenció el efecto tóxico de Ni(II) sobre el estado fisiológico de los microorganismos anaerobios presentes en el lodo granular, con declive de actividad de la ureasa (77,6 % a 100 mgNi(II)/L), inhibición de la producción de metano (13,3 % a 100 mgNi(II)/L) y afectación del proceso de digestión anaeróbica en general, lo cual reduce considerablemente la eficiencia de estos sistemas de tratamiento biológico, repercutiendo en la calidad del efluente final y perturbando el equilibrio ecológico de los ecosistemas naturales receptores.

CONCLUSIONES

La actividad de la ureasa en el lodo anaeróbico granular decrece considerablemente a medida que aumentan las concentraciones de Ni(II). Durante este proceso, también se afectan el pH, alcalinidad total, remoción de materia orgánica y producción de biogás, resultando en el incremento de inhibición de la producción de metano. Este efecto tóxico del níquel repercute directamente sobre la estabilidad fisiológica de la comunidad microbiana del lodo, reduciendo la eficiencia del proceso de digestión anaeróbica e interviniendo negativamente sobre la calidad del efluente tratado.

LITERATURA CITADA

AMANI, T., M. NOSRATI y T. R. SREEKRISHNAN. 2010. Anaerobic digestion from the viewpoint of microbiological, chemical, and operational aspects – a review. *Environ. Rev.* 18: 255-278.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA), AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION (AWWA) y WATER ENVIRONMENT FEDERATION (WEF). 2017. Standard methods for the examination of water and wastewater. 23th Edition. American Public Health Association, Washington, D.C. USA.

AMIN, F. R., H. KHALID, H. EL-MASHAD, C. CHENA, G. LIUA y R. ZHANG. 2020. Functions of Bacteria and Archaea participating in the bioconversion of organic waste for methane production. *Sci. Total Environ.* 763: 143007.

APPELS, L., J. BAEYENS, J. DEGRÈVE y R. DEWIL. 2008. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. *Prog. Energy Combust. Sci.* 34: 755-781.

ASHLEY, N. V., M. DAVIES y T. HURST. 1982. The effect of increased nickel ion concentrations on microbial populations in the anaerobic digestion of sewage sludge. *Water Res.* 16: 963-971.

BOE, K. 2006. Online monitoring and control of the biogas process. Tesis doctoral. Technical University of Denmark, Lyngby.

CASTRO, C., J. LONDOÑO y J. MORALES. 2004. Efecto de los metales pesados cadmio y níquel sobre la producción de metano de un lodo anaerobio a escala de laboratorio. Trabajo de grado. Universidad de Antioquia, Medellín.

CHACÍN, E. 1993. Treatment characteristics of two phase anaerobic system using an UASB reactor. Tesis doctoral. University of Birmingham, England.

CHENG, L. y R. CORD-RUWISCH. 2013. Selective enrichment and production of highly urease active bacteria by non-sterile (open) chemostat culture. *J. Indian Microbiol. Biotechnol.* 40: 1095-1104.

FANG, H. H. P. y H. H. HUI. 1994. Effect of heavy metals on the methanogenic activity of starch-grading granules. *Biotechnol. Lett.* 16: 1091-1096.

FERNÁNDEZ, N. 1993. An examination of anaerobic treatment of wastewater from coffee industries. Tesis doctoral. University of Birmingham, England.

GENCHI, G., A. CAROCCI, G. LAURIA, M. S. SINICROPI y A. CATALANO. 2020. Nickel: human health and environmental toxicology. *Int. J. Environ. Res. PublicHealth* 17: 679-685.

HENRÍQUEZ, C., L. URIBE, A. VALENCIANO y R. NOGALES. 2014. Actividad enzimática del suelo –deshidrogenasa, β -glucosidasa, fosfatasa y ureasa– bajo diferentes cultivos. *Agronomía Costarricense*, 38(1): 43-54.

JULIASTUTI, S. R., J. BAEYENS, C. CREEMERS, D. BIXIO y E. LODIEWYCKX. 2003. The inhibitory effects of heavy metals and organic compounds on the net maximum specific growth rate of the autotrophic biomass in activated sludge. *J. Hazard. Mater.* 100: 271-83.

KANDELER, E. y H. GERBER. 1988. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biol. Fertil. Soils* 6: 68-72.

KAPPAUN, K., A. R. PIOVESAN, C. R. CARLINI y R. LIGABUE-BRAUN. 2018. Ureases: historical aspects, catalytic, and non-catalytic properties – a review. *J. Adv. Res.* 13: 3-17.

KHANAL, S. K. 2008. Overview of anaerobic biotechnology. Chapter 1. pp. 1-27, *en Anaerobic Biotechnology for Bioenergy Production: Principles and Applications*. Wiley and Blackwell Publishing, Iowa, USA.

LE, V. N. y T. S. DAO. 2016. Highly potent toxicity of nickel in river water to *Daphnia lumholtzi*. *Int. J. Dev. Res.* 6(9): 9526-9531.

LI, Y., Y. CHEN y J. WU. 2019. Enhancement of methane production in anaerobic digestion process: a review. *Applied Energy* 240: 120-137.

LORENZO, Y. y M. OBAYA. 2005. La digestión anaerobia. Aspectos teóricos. Parte I. ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar XXXIX(1): 35-48.

MACOMBER, L. y R. P. HAUSINGER. 2011. Mechanisms of nickel toxicity in microorganisms. *Metallomics* 3(11): 1153-1162.

MADIGAN, M. T., J. M. MARTINKO y J. PARKER. 1998. Brock, biología de los microorganismos. 8^{va} edición. Prentice-Hall, Inc., Madrid.

MALAKAHMAD, A., S. ISHAK, U. N. NASOHA, M. H. ISA Y S. R. KUTTY. 2012. Application of sequencing batch reactor (SBR) for treatment of refinery wastewater containing nickel. *WIT Transactions on Ecology and The Environment* 164: 403-411.

MARÍN, J., M. CHÁVEZ, A. DÍAZ, L. POZO y N. FERNÁNDEZ. 2002. Monitoreo y control de reactores anaeróbicos utilizando presiones parciales de hidrógeno. *Rev. Téc. Fac. Ing. LUZ* 25(3): 140-148.

MAZZEI, L., F. MUSIANI y S. CIURLI. 2017. Urease. pp. 60-97, *en* D. B. Zamble, M. Rowinska-Zyrek y H. Kozłowski (eds.), *The Biological Chemistry of Nickel*. The Royal Society of Chemistry, London, UK.

MAZZEI, L., F. MUSIANI y S. CIURLI. 2020. The structure based reaction mechanism of urease, a nickel dependent enzyme: tale of a long debate. *J. Biol. Inorg. Chem.* 25: 829-845.

MIŚKOWIEC, P. y Z. OLECH. 2020. Searching for the correlation between the activity of urease and the content of nickel in the soil samples: the role of metal speciation. *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 20:1904-1911.

MUDHOO, A. y S. KUMAR. 2013. Effects of heavy metals as stress factors on anaerobic digestion processes and biogas production from biomass. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 10: 1383-1398.

NEMEROW, N. L. y A. DASGUPTA. 1998. Tratamiento de vertidos industriales y peligrosos. Ediciones Díaz de Santos, S. A., Madrid.

PETERS, A., G. MERRINGTON y S. KOSMALA-GRZECHNIK. 2014. Parameterisation of biotic ligand models for nickel to Australian test species. WCA Environment Ltd Report to NiPERA, WCA Environment, Faringdon, UK.

SPEECE, R. 1983. Anaerobic biotechnology for industrial wastewater treatment. *Environ. Sci. Technol.* 45(12): 1-11.

SVANE, S., J. J. SIGURDARSON, F. FINKENWIRTH, T. EITINGER y H. KARRING. 2020. Inhibition of urease activity by different compounds provides insight into the modulation and association of bacterial nickel import and ureolysis. *Scientific Reports* 10: 8503.

TSAPEKOS, P., M. ALVARADO-MORALES, J. TONG E I. ANGELIDAKI. 2018. Nickel spiking to improve the methane yield of sewage sludge. *Bioresour. Technol.* 270: 732-737.

VINTILOIU, A., M. BOXRIKER, A. LEMMER, H. OECHSNER, T. JUNGBLUTH, E. MATHIES y D. RAMHOLD. 2013. Effect of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) on the bioavailability of trace elements during anaerobic digestion. *Chem. Eng. J.* 223: 436-441.

VOLESKY, B. 1990. *Biosorption of heavy metals.* CRC Press, Boca Raton, USA.

WANG, S., U. JENA y K. C. DAS. 2018. Biomethane production potential of slaughterhouse waste in the United States. *Energy Conv. Manag.* 173: 143-157.

ZAYED, G. y J. WINTER. 2000. Inhibition of methane production from whey by heavy metals –protective effect of sulfide. *Appl. Environ. Microbiol.* 53(6): 726-731.

BOLETÍN
DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
AN INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGY
PUBLISHED BY THE UNIVERSITY OF ZULIA, MARACAIBO, VENEZUELA
Vol. 55, N° 2, 2021

CONTENTS

REPRODUCTIVE DYNAMICS OF THE CRAB <i>CALLINECTES DANAE</i> (DECAPODA: PORTUNIDAE) FROM MARGARITA ISLAND, VENEZUELA. <i>Idar quijada, Leo Walter González, Nora Eslava y Francisco Guevara</i>	112
EARTHWORM MEAL (<i>EISENIA FETIDA</i>) AS A PROTEIN ALTERNATIVE FOR PRE-JUVENILES SHRIMP BREEDING <i>PENAEUS VANNAMEI</i>. <i>Ángela Zambrano, Rodolfo Panta-Vélez, Juan Vélez, Víctor Dávila, Vanessa Acosta y Fernando Isea-León</i>	134
SPECIES RICHNESS AND COMPOSITION OF CAPITAN CHICO MANGROVE BIRD, MARACAIBO, VENEZUELA. <i>Sonsirée Ramírez, Enrique Narváez y Anderson Saras</i>	149
WHAT DO WE ABOUT <i>PLOCEUS CUCULLATUS</i>, <i>LONCHURA MALACCA</i> AND <i>LONCHURA ORYZIVORA</i> IN VENEZUELA? <i>Cristina Sainz-Borgo</i>	165
FLORÍSTIC AND ESTRUCTURE OF THE LAGUNA OJO DE AGUA WETLAND'S RIPARIAN FORESTS, LA URBANA, CEDEÑO MUNICIPALITY, BOLÍVAR STATE, VENEZUELA. <i>Wilmer Díaz-Pérez, Nathalit Mojica y Judith Rosales</i>	186

BOLETÍN
DEL CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
AN INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGY
PUBLISHED BY THE UNIVERSITY OF ZULIA, MARACAIBO, VENEZUELA
Vol. 55, N° 2, Pp. 2021

CONTENTS

NEW SPECIES OF PARACYMUS THOMSON, 1867 (COLEOPTERA: HYDROPHILIDAE: LACCOBIINI). PART II: NEW RECORD FROM VENEZUELA. <i>Mauricio García</i>	199
TÓXIC EFFECT OF Ni(II) ON UREASE SOBRE ACTIVITY IN ANAEROBIC GRANULAR SLUDGE. <i>Julio Marín, Karelis Fernández, Laugeny Díaz y Nancy Angulo</i>	222
NOTES ON THE TORRIDINCOLIDAE FAMILY IN VENEZUELA (INSECTA: COLEOPTERA). <i>Mauricio García</i>	240
PHANOCERUS GUAQUIRA NEW SPECIE OF ACUÁTIC BEETLE (COLEOPTERA: ELMIDAE) FROM YARACUY, VENEZUELA. <i>María Leal-Duarte, Alfredo Briceño-Santos y José Elí Rincón Ramírez</i>	254
INSTRUCTIONS FOR AUTHORS	302