

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

**INSTITUTO DE INGENIERÍA
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA**



**BIOSORCIÓN DE COBRE EN UN REACTOR DE LECHO DE LODO
ANAEROBIO DE FLUJO ASCENDENTE (UASB)**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA
MARÍA TERESA CERTUCHA BARRAGÁN**

**DIRECTOR
DRA. EVELIA ACEDO FÉLIX**

**CODIRECTOR
DR. FRANCISCO JAVIER ALMENDARIZ TAPIA**

Mexicali, B. C.

Agosto, 2009

CONTENIDO

	Página
CONTENIDO	i
LISTA DE TABLAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN	2
1. <i>Planteamiento del problema</i>	2
2. <i>Justificación</i>	11
3. <i>Objetivos</i>	13
4. <i>Hipótesis</i>	14
5. <i>Explique la responsabilidad de cada autor respecto a las publicaciones presentadas</i>	14
II. PRESENTACIÓN DEL ESTUDIO	17
CHEMICAL SPECIATION AND BIOAVAILABILITY	17
REVISTA DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL.....	18
MINERAL PROCESSING AND EXTRACTIVE METALLURGY REVIEW	19
XXVIII CONVENCIÓN INTERNACIONAL DE MINERÍA	20
REFERENCIAS	21
ANEXO A.....	26
CHEMICAL SPECIATION AND BIOAVAILABILITY	26
COPPER BIOACUMULATION IN AN UPFLOW ANAEROBIC SLUDGE BLANKET (USAB) REACTOR.....	26
ANEXO B.....	33
REVISTA INTERNACIONAL	33
DE CONTAMINACION AMBIENTAL	33
ESTUDIO DE LA BIOSORCIÓN DE COBRE	36
UTILIZANDO LODO ANAEROBIO ACIDOGÉNICO.....	36
Reactivos	40
ANEXO C	59
MINERAL PROCESSING &.....	59
EXTRACTIVE METALLURGY REVIEW	59

Iron Influence on Copper Biosorption using Anaerobic Sludge and its Microstructural Characterization	61
ANEXO D	76
XXVIII CONVENCIÓN INTERNACIONAL DE MINERÍA.....	76
DIVERSIDAD MICROBIANA DE LODOS ANAEROBIOS METANOGENICOS USANDO DGGE	78

LISTA DE TABLAS

		Página
ANEXO B		
Cuadro 1	Características del lodo anaerobio	53
ANEXO D		
Tabla 1	Descripción de las muestras analizadas	80
Tabla 2	Secuencia de los primers y de la grapa utilizada para amplificación de los fragmentos de ADNr16S de los dominios Archea y Bacteria	81
Tabla 3	Identidad de los fragmentos de ADN obtenidos por DGGE	84

LISTA DE FIGURAS

	Página
ANEXO A	
Figura 1 Diagrama esquemático del reactor UASB	30
Figura 2 Remoción de cobre en el reactor UASB, alimentado con 20mg/L Cu (II). b) Bioacumulación de cobre en el lodo anaerobio del reactor UASB	30
Figura 3 Eficiencia de remoción COD en el reactor UASB alimentado con 20 mgCu(II)/L	30
Figura 4 Concentración inhibitoria del cobre en la actividad metanogénica de los lodos	30
ANEXO B	
Figura 1 Distribución de tamaño de partícula del lodo anaerobio acidogénico	54
Figura 2 Gráfica de AME contra concentración de acetato	54
Figura 3 Cinética de biosorción de cobre utilizando lodo anaerobio viable	55
Figura 4 Cinética de biosorción de cobre utilizando lodo anaerobio no viable	55
Figura 5 Isotherma de biosorción de cobre en lodo anaerobio viable	56
Figura 6 Isotherma de biosorción de cobre en lodo anaerobio no viable	56
Figura 7 a) Patrón de DRX b) fotomicrografía de MEB Correspondiente a los lodos	57
Figura 8 Fotomicrografía de MEB correspondiente a los Microorganismos presentes en los lodos: a) diatomeas b) biopelícula (bacterias y exopolímero)	57
Figura 9. A) Fotomicrografía de MEB con sus respectivos Espectros representativos de EDS correspondiente al análisis cualitativo puntual , b) matriz de los lodos, c) diatomeas	58

	Página
ANEXO C	
Figura 1	Influencia del hierro (III) durante la biosorción de cobre 71
Figura 2	Influencia del hierro (III) en la producción de metano durante la biosorción de cobre 71
Figura 3	Influencia del hierro (III) en la actividad metanogénica 72
Figura 4	a) Patrón de DRX, b) fotomicrografía de MEB, correspondiente al lodo anaerobio después de las pruebas de bioremoción 73
Figura 5	Fotomicrografía de MEB correspondiente a los Microorganismos presentes en el lodo a) diatomeas, b) biopelícula 73
Figura 6	Fotomicrografía de MEB del lodo y b) Espectro de EDS para la matriz del lodo, c) diatomeas 74
ANEXO D	
Figura 1	A) Electroforesis del ADN metagenómico de las muestras analizadas (pocillos del 1-10). B) Electroforesis de las bandas de aproximadamente 180pb, amplificadas por PCR (1-7) 82
Figura 2	Electroforesis con gradiente desnaturalizante DGGE de la amplificación de los fragmentos obtenidos en las muestras analizadas 83
Figura 3	Fotografía de los productos de amplificación PCR de las 37 bandas de ADN separadas por DGGE 85

NOMENCALTURA Y ECUACIONES

Nomenclatura

Símbolo	
C_i	Concentración inicial en solución (g/L)
q	Capacidad de biosorción de cobre (g de cobre/g de biosorbente)
C_f	Concentración final en solución (g/L)
X_0	Concentración de sólidos volátiles suspendidos (g/L)
q_{max}	Capacidad máxima de retención
C_e	Concentración residual del metal en solución
b	Constante relacionada con la energía de adsorción
K_s	Constante de saturación
μ_{max}	Máxima actividad metanogénica específica
DQO	Demanda química de oxígeno
C_{acet}	Concentración de acetato
μ	Actividad metanogénica específica
$K_{sacetato}$	Constante de saturación de acetato

Ecuaciones

Ecuación para determinar la capacidad de retención de cobre (q) de la biomasa

$$q = \frac{C_i - C_f}{X_0} \quad (1)$$

La isoterma de Langmuir se representa por la ecuación

$$q = \frac{bC_e q_{max}}{1 + bC_e} \quad (2)$$

Modelo de Monod

$$[\mu_{DQO-CH_4}(C_{acet.}) = \mu_{max} C_{acet.} / (K_s + C_{acet.})] \quad (3)$$

RESUMEN

La actividad industrial y minera arroja al ambiente metales pesados como plomo, mercurio, cromo, cobre, muy perjudiciales para la salud humana y para la mayoría de las formas de vida. Estos metales pueden detectarse en el medio ambiente en su estado elemental lo que implica que no están sujetos a biodegradación o a formación de complejos salinos por lo que no pueden ser mineralizados. Teniendo en cuenta los efectos que provocan los metales pesados. En el presente trabajo se utilizó un reactor de lecho de lodo anaerobio de flujo ascendente (UASB) para estudiar la factibilidad del uso de lodo metanogénico para remover cobre de soluciones acuosas. Se evaluaron los parámetros que influyen en la biosorción del cobre en un reactor UASB, pH, concentración, tiempo de residencia hidráulica, carga orgánica volumétrica y se hicieron los estudios para determinar la cinética de biosorción del cobre en el sistema continuo. Además se realizaron pruebas en lote para determinar la cinética de biosorción de cobre, evaluar el efecto del hierro y el cobre sobre los procesos metanogénicos, el efecto del pH sobre el lodo metanogénico y determinar la cinética de biosorción y bioacumulación. La caracterización de los lodos se hizo utilizando técnicas de microscopía como MEB, EDS y DRX, y la dinámica de la población microbiana se realizó mediante el uso de técnicas de biología molecular basados en el estudio del gen 16S del operón ribosomal, mediante PCR-DGGE y la secuenciación de los fragmentos de ADN. Las secuencias de ADN se compararon con las secuencias depositadas en la base de datos RDP (ribosomal database project). Los resultados se encuentran en los artículos de los anexos A, B, C, y D.

I. INTRODUCCIÓN

1. Planteamiento del problema

El uso incorrecto de los recursos naturales y la contaminación de los ecosistemas acuáticos impacta negativamente en suministros básicos como: los alimentos y el agua potable. Un problema a nivel mundial es la descarga de grandes cantidades de metales pesados a los medios acuáticos, los sistemas sanitarios, el suelo y el subsuelo que genera un deterioro en el ambiente (Pineda 2004, Garza 2005; Morais *et al.*, 2006, Torres, 2007). En los últimos años, en varios países se han realizado trabajos de investigación enfocados en el desarrollo de alternativas aplicables en la prevención y/o restauración de los daños ocasionados por acciones antropogénicas, las cuales son responsables en gran parte de la liberación de metales pesados hacia el medio ambiente acuático. Lo anterior, es ocasionado por la descarga de varias clases de desechos generados en las actividades urbanas, agrícolas, mineras, combustión de fósiles y la industria electrónica que dan lugar a la pérdida irreversible de los recursos naturales, porque los metales pesados no son biodegradables. Por lo cual, es necesaria la implementación de acciones correctivas que permitan la reducción de los niveles de contaminación y minimizar los elevados costos de restauración de suelos y cuerpos de agua contaminados, lo que representa un enorme reto para la humanidad (Alloway y Ayres, 1993,; Pineda 2004; Garza, 2005).

La acumulación de desechos sobre todo en áreas urbanas, genera la dispersión de gran diversidad de compuestos en suelos, aguas superficiales y aire,

con la consecuente filtración de los mismos hacia las aguas subterráneas y superficiales que constituyen las reservas de agua potable. En distintas industrias, y en forma muy especial en la minera, la concentración de metales pesados en sus efluentes representa un problema significativo debido a los costos y dificultades que involucra la remoción de los mismos, especialmente, cuando se necesita cumplir con estándares de descarga, ya sean para su uso como agua de riego o desechados en los cuerpos de agua superficial o subterráneo (Etzel y Tseng, 1987; Hammen *et al.*, 1994).

En los Estados Unidos de Norteamérica, los desechos mineros generados de sitios activos e inactivos y actividades de beneficio, han tenido un serio impacto sobre la salud humana, el medio ambiente y por consiguiente, ha generado nuevos retos ambientales al gobierno (EPA, 1996). Uno de los retos importantes, es El Río Coeur d' Alene en el estado de Idaho, que ha recibido desechos ácidos de un distrito minero con niveles altos de metales pesados como Zn (23 mg/L), Cd (0.35 mg/L) y Pb (2.8 mg/L) (Elder, 1988). También, en el Lago de British Columbia se ha observado un incremento substancial en las concentraciones de metales debido a las descargas de desechos mineros provenientes de una mina de Pb, Zn y Cu, lo cual ha ocasionado una disminución en la diversidad de organismos (Austin *et al.*, 1985). En la región central del estado de Indiana, existe una significativa actividad minera de carbón, lo cual ha resultado en un gran número de lugares contaminados por desechos ácidos (Allen *et al.*, 1996).

En México la minería ha sido una actividad económica de gran importancia, desde los tiempos de la colonia española. Los procesos de beneficio han generado, en estos 400 años de actividad, una gran cantidad de desechos, que han sido depositados en los alrededores de las minas y en los lechos de los ríos (Monge, *et al.*, 2007; Torres, 2007). En algunas partes de México el desarrollo industrial y el manejo inadecuado de los residuos que contienen metales pesados, ha generado una problemática muy grave. La mayor fuente de abastecimiento de agua para el valle de Toluca es el río Lerma, considerado el segundo río más importante de México. Desde 1960, la Organización Mundial de la Salud lo calificó como uno de los ríos más contaminados con metales pesados de México (Garza, 2005). En el Golfo de México, especialmente en algunas lagunas de Campeche, Tamaulipas, Tabasco y Veracruz se han encontrado concentraciones elevadas de algunos metales como: plomo, cromo, níquel, zinc, cadmio y cobre. Esto ha conducido a un deterioro de los recursos acuíferos en la medida que la población ha crecido (Garza, 2005; Torres, 2007).

Sonora es uno de los Estados más importantes en el Noroeste de México en lo que se refiere al desarrollo de industrias minero-metalúrgicas, debido principalmente a que se encuentran las minas de cobre más importantes a nivel nacional e internacional. La tecnología utilizada para el manejo de los desechos ácidos y arenas de molienda (“jales”) no siempre ha sido la adecuada, lo cual ha traído como consecuencia que esos desechos que se generan a través del procesamiento del mineral (molienda, trituración, fundición y refinación), sean

fuentes de contaminación de las corrientes formadoras de los Ríos San Pedro, Sonora y Bacanuchi (Gómez-Álvarez *et al.*, 2001, 2004, 2007 y 2008).

Si bien, los metales como: el cobre (Cu), el zinc (Zn), el hierro (Fe), el manganeso (Mn), el cromo (Cr) y el cobalto (Co) son componentes esenciales para llevar a cabo funciones bioquímicas en concentraciones fisiológicas normales, cuando se encuentran en altas concentraciones pueden ser tóxicos (Förstner y Muller, 1973; Bell, 1980, Wang 2006). Por otra parte, los metales como la plata (Ag), el mercurio (Hg), el cobre (Cu), el cadmio (Cd) y el plomo (Pb), son particularmente tóxicos e inhiben algunas enzimas debido a la formación de compuestos denominados mercáptidos con los grupos sulf-hidrilos, los cuales son responsables de la actividad catalítica (Connell y Miller, 1984). Autores como Connell y Miller (1984); Vásquez-Botello y Páez-Osuna (1986) y Torres (2007), describieron que la toxicidad de los metales depende de diversos factores, tales como: la presencia de otros metales que ocasionan sinergismo o antagonismo, la influencia de parámetros fisicoquímicos del agua (temperatura, potencial redox, oxígeno disuelto, salinidad, luz y materia orgánica) y las características biológicas del organismo potencialmente afectado (especie, sexo, tamaño, edad, actividad, estadio de vida y hábitat).

Considerando lo anterior, la remoción efectiva de metales pesados, por ejemplo, zinc, cadmio, hierro, arsénico, mercurio, cobre, plomo y cromo a partir de efluentes es un problema que se ha incrementado, especialmente en la industria minero-metalúrgica. En los últimos años, las regulaciones ambientales son más

estrictas para el control de la mayor parte de los contaminantes metálicos de los efluentes (Valenzuela y Tiburcio, 1995). Actualmente existen normativas que establecen valores máximos permisibles para la descargas de corrientes que contienen desechos con metales. Por ejemplo, la Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología (S.E.D.U.E., 1989) establece valores máximos permisibles para uso como fuente de abastecimiento de agua, los siguientes: cobre (1 mg/L), hierro (0.3 mg/L), manganeso (0.1 mg/L) y zinc (5 mg/L), respectivamente (NOM 001-ECOL 1996).

Desde hace varias décadas, se estudian y desarrollan métodos para remediar la contaminación que producen los metales tóxicos de la industria minero-metalúrgica. Como resultado de estos estudios, actualmente se dispone de métodos electroquímicos, técnicas de precipitación, membranas semipermeables, resinas de intercambio iónico, entre otras. Si bien cada técnica es efectiva, para una situación particular, el problema estriba en la aplicación de procesos complicados y costosos. Lo cual, ha promovido la búsqueda de métodos más económicos y de fácil aplicación. Entre las desventajas que presentan los métodos disponibles se incluyen: los altos costos de operación, la baja selectividad, el alto consumo de energía y la generación de lodos tóxicos que son difíciles de eliminar (Kaduková *et al.*, 2005; Morais 2006).

Una disciplina emergente es la microbiología ambiental aplicada, que en base a las investigaciones realizadas y gracias al acelerado desarrollo de la biología molecular, ha podido determinar la función metabólica de la mayor parte

de los grupos de microorganismos conocidos, generando nuevas aplicaciones para ellos, como en la biorrestauración.

La biorremediación de ambientes contaminados es una estrategia que aprovecha el uso de la diversidad metabólica que poseen los microorganismos, que en su conjunto ayudan a depurar el hábitat contaminado. En cualquier situación, por adversa que sea, siempre existen algunas formas de vida que son resistentes o indiferentes a la presencia y concentración de diversas sustancias tóxicas, e incluso, son capaces de degradarlas para alimentarse o para transformarlas en compuestos asimilables por otros microorganismos. Lo cual, permite establecer un nuevo equilibrio biológico de modo que, la desaparición de las poblaciones sensibles permite el crecimiento y expansión de las poblaciones tolerantes (Viera *et al.*, 2000; Ilhan *et al.*, 2004; Qaiser *et al.*, 2007).

El uso de microorganismos como bacterias, algas y hongos, constituyen una alternativa viable para la descontaminación-recuperación de ambientes naturales y para el tratamiento de efluentes industriales o municipales. Se estima que los mejores microorganismos para la eliminación de tóxicos presentes en un medio, son aquellos que han sido aislados del ambiente que se desea detoxificar. Otra alternativa es la manipulación genética de los microorganismos aislados de ambientes distintos al de interés, que puede fortalecer considerablemente la capacidad de remoción de compuestos tóxicos. Lo anterior se sustenta en la observación de que los microorganismos que son capaces de habitar en un medio contaminado y realizar sus funciones vitales, poseen en su metabolismo celular

dispositivos efectivos para llevar a cabo la descontaminación del medio en que se encuentren. Estos mecanismos, se aprovechan para purificar el agua empleando microorganismos capaces de adsorber metales pesados sobre su propia pared celular (Steciow 2005). Una característica química importante de la pared celular microbiana, es la presencia de diferentes grupos funcionales. Las técnicas analíticas nos muestran que en ellas están presentes polímeros sustituidos con grupos aminos, amidos, carboxílicos, hidroxílicos y fosfatos (Fontúrbel e Ibáñez, 2004).

La biomasa deshidratada obtenida de los desechos de las industrias que emplean procesos de fermentación, es considerada un adsorbente eficaz para la remoción de especies metálicas en los efluentes. A este proceso se le denomina bioadsorción, que al igual que en el caso de la bioacumulación, el tipo de microorganismo determina los biopolímeros presentes en la biomasa seca y la concentración de los grupos funcionales disponibles como sitios de adsorción. El conocimiento de lo anterior, ha permitido que otras investigaciones se orienten al uso directo de los biopolímeros, desarrollando aún más la biosorción como técnica de biorremediación de metales tóxicos desde efluentes mineros (Mihova *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2005). Las investigaciones sobre la biosorción de metales a partir de soluciones, señalan que la habilidad de los microorganismos permite recuperar hasta el 100% de plomo, mercurio, zinc, cobre, níquel y cobalto en soluciones diluidas. La biosorción de metales conduce a la acumulación de estos en la biomasa y el mecanismo involucra a la pared celular. El uso específico de hongos permite recuperar entre 96 y 98% de oro y plata. También es posible la

recuperación del cobre con hongos a partir de óxidos, debido a que producen ácidos orgánicos que forman complejos con este metal. Muchas levaduras, hongos, algas, bacterias y cierta flora acuática tienen la capacidad de concentrar metales a partir de soluciones acuosas diluidas y de acumularlos dentro de la estructura microbiana. Actualmente los procesos biotecnológicos más eficientes son la biosorción y la bioprecipitación, pero otros procesos tales como la unión a macromoléculas específicas pueden tener un potencial en el futuro (Fontúrbel e Ibáñez, 2004; Reyes *et al.*, 2006). Las tecnologías que usan estos procesos son comúnmente utilizadas para el control de la contaminación de diversas fuentes. El término biosorción abarca la utilización de biomasa total (viva o muerta) vía mecanismos fisicoquímicos, tales como la adsorción y el intercambio iónico. Asimismo se mencionan sistemas que emplean mezclas de microorganismos así como plantas superiores (Cañizares-Villanueva 2000).

En estudios realizados en suelos contaminados con metales pesados y contaminantes orgánicos, se ha reportado los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Arthrobacter* para la descontaminación de cadmio ya que son capaces de resistir distintas concentraciones de este metal. Algunas especies de *Pseudomonas* y *Bacillus* sp, presentan un mecanismo de acumulación intracelular del metal con una resistencia de hasta 225 y 275 µg/mL, respectivamente. Mientras que otras especies de *Pseudomonas* y *Arthrobacter*, resisten una concentración de 20 y 50 µg/mL del metal, respectivamente. La especie *Rhizopus arrhizus* por medio de un mecanismo extracelular, produce una pared polimérica a la cual se une el metal y actúa como bioadsorbente del hierro (Mijares, 2003). Otra especie reportada es

la *Pseudomonas fluorescens* la cual ha sido empleada en la biorremoción de plomo (Rivas *et al.*, 2004). Duarte *et al.*, (1997) y Ruíz-Manríquez *et al.*, (1998), reportaron el potencial de *Thiobacillus ferrooxidans* como un biosorbente para Cu (II) y Ni (II).

El aprovechamiento del metabolismo de los microorganismos como los que se mencionan en el párrafo anterior, ha facilitado la construcción de reactores biológicos a mucho menor costo que los fisicoquímicos. También ha permitido la construcción de plantas de tratamiento de sistema mixto, para una mayor eficiencia. La construcción de bioreactores y biodigestores se basa en hacer que los contaminantes se conviertan en el sustrato (alimento) de los microorganismos, y que éstos, al mismo tiempo que se alimentan y aumenta su población, descontaminan el agua. El proceso consiste en mantener un sistema con un tiempo de retención celular (TRC) mucho mayor que el tiempo de residencia hidráulico (TRH) (Schmidt y Ahring, 1996). Tales características permiten al reactor acumular grandes cantidades de biomasa y consecuentemente, soportar grandes cargas orgánicas volumétricas (Lettinga *et al.*, 1980). La formación y estabilidad de los gránulos son esenciales para el éxito del reactor, ya que esta acción los inmoviliza o fija dentro del reactor. El uso de bioreactores para la descontaminación de aguas residuales es una alternativa interesante por su bajo costo. Es lo que se denomina biosorción o filtro biológico, que se preparan a partir de algas, hongos o bacterias, que es material abundante y económico. Esta biomasa no necesariamente tiene que estar viva, y en algunos casos el material puede inmovilizarse en una matriz polimérica (Basso *et al.*, 2002).

El concepto de reactor de lecho de lodo anaerobio de flujo ascendente (UASB), fue desarrollado en los años 70. Hoy en día el reactor UASB es uno de los más utilizados para el tratamiento anaerobio de aguas residuales, muchos de estos reactores están en operación en varias partes del mundo. El reactor UASB se ha venido utilizando debido a la formación del lodo anaerobio con una alta capacidad de sedimentación y actividad metanogénica. La formación de esta acción los inmoviliza o fija dentro del reactor. Es por esto que la implementación del reactor UASB al tratamiento de aguas residuales de origen industrial y doméstico, ha sido de mucho éxito, y es una alternativa interesante por su bajo costo (Almendáriz 2001). Este tipo de reactores se han empleado principalmente en el tratamiento de aguas residuales provenientes de la industria de alimentos y descargas municipales. Por otra parte, la literatura disponible muestra que se ha usado escasamente en el tratamiento de efluentes contaminados con metales pesados. En estos trabajos se han investigado aspectos sobre la remoción simultánea de metales, pero no se han encontrado trabajos enfocados en la remoción específica del cobre.

2. Justificación

Dada la problemática existente y los retos implicados en la restauración de medios contaminados con metales pesados, para el desarrollo de la presente investigación se consideró lo siguiente:

- Sonora es uno de los Estados más importantes en el Noroeste de México, en lo que se refiere al desarrollo de industrias minero-metalúrgicas, debido principalmente a que se encuentran las minas de cobre más importantes a nivel nacional e internacional. La falta de control en las antiguas operaciones para el manejo de los desechos ácidos y arenas de molienda (“jales”) no siempre ha sido la adecuada, lo cual ha provocado la contaminación de las corrientes formadoras de los Ríos San Pedro y Bacanuchi con metales pesados.
- El cobre es uno de los principales metales de descarga por la industria minero-metalúrgica al río San Pedro. Aunque, es un elemento traza requerido para el crecimiento celular, a elevadas concentraciones de cobre en el medio puede ser altamente tóxico para el humano, animales y los microorganismos. Debido a esto, se han creado normas que establecen valores máximos permisibles para la descargas de corrientes que contienen desechos con metales. Para el uso de agua como fuente de abastecimiento, los niveles de cobre no deben ser superiores a 1 mg/L y en el caso del hierro este es de 0.3 mg/L (NOM 001-ECOL 1996).
- La bioremediación constituyen una alternativa viable para la descontaminación-recuperación de ambientes naturales y para el tratamiento de efluentes contaminados con metales pesados.

- Los reactores UASB se han empleado principalmente en el tratamiento de aguas residuales provenientes de la industria de alimentos, papel y descargas municipales. Por otra parte, la literatura disponible muestra que se ha usado escasamente en el tratamiento de efluentes contaminados con metales pesados. En estos trabajos se han investigado aspectos sobre la remoción simultánea de metales, pero no se han encontrado trabajos enfocados en la remoción específica del cobre.

Por lo cual, se considera necesario llevar a cabo una investigación sistemática que permitan generar conocimientos relacionados con la biosorción de cobre, determinar el comportamiento de estos sistemas, identificar a los microorganismos presentes en el sistema estudiado y los microorganismos responsables de la biosorción de cobre, establecer los mecanismos involucrados en la biosorción de cobre y generar parámetros asociados a la biosorción y al sistema. Por lo tanto, en éste trabajo se plantearon los siguientes objetivos.

3. Objetivos

Objetivo General:

Desarrollar un proceso para la biosorción de cobre utilizando un reactor de lecho de lodo anaerobio de flujo ascendente.

Objetivos Específicos:

- Determinar la cinética de biosorción del cobre en un sistema en lote.

- Evaluar el efecto del hierro y el cobre sobre los procesos metanogénicos en sistema en lote.
- Evaluar el efecto del pH sobre el lodo metanogénico y determinar la cinética de biosorción y bioacumulación.
- Evaluar los parámetros que influyen en la biosorción del cobre en un reactor UASB (pH, concentración, tiempo de residencia hidráulica, carga orgánica volumétrica).
- Determinar la cinética de biosorción del cobre en un sistema continuo.
- Evaluar la sucesión poblacional de los lodos anaerobios durante las cinéticas de biosorción de cobre por electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE).

4. Hipótesis

- Un reactor de lecho de lodo anaerobio de flujo ascendente por sus características puede ser alternativa viable para la biosorción de cobre de soluciones acuosas.

5. Explique la responsabilidad de cada autor respecto a las publicaciones presentadas

Revista: **CHEMICAL SPECIATION AND BIOAVAILABILITY**

Título del artículo: Copper bioaccumulation in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor.

Autor	Responsabilidad
Dra. Evelia Acedo Félix	Directora de Tesis
Dr. Francisco Javier Almendariz Tapia	Co-Director de Tesis
Dr. Jesús Leobardo Valenzuela García	Asesor y responsable técnico del proyecto ante CONACyT
Dra. Onofre Monge Amaya	Asesora durante las pruebas de biosorción
Dra. Ana Lilia Leal Cruz	Asesora en la caracterización mediante las técnicas de MEB, EDS y DRX para el establecimiento de mecanismos de biosorción en los lodos.

Revista: **REVISTA INTERNACIONAL DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL**

Título del artículo: Estudio de la biosorción de cobre utilizando lodo anaerobio acidogénico.

Autor	Responsabilidad
Dra. Evelia Acedo Félix	Directora de Tesis
Dr. Francisco Javier Almendariz Tapia	Co-Director de Tesis
Dr. Jesús Leobardo Valenzuela García	Asesor y responsable técnico del proyecto ante CONACyT
Dra. Onofre Monge Amaya	Asesora durante las pruebas de biosorción
Dra. Ana Lilia Leal Cruz	Asesora en la caracterización mediante las técnicas de MEB, EDS y DRX para el establecimiento de mecanismos de biosorción en los lodos.
Pl.Q. Glenda Rigel Duarte Rodríguez	Asistente en el desarrollo de pruebas experimentales.

Revista: **MINERAL PROCESSING & EXTRACTIVE METALLURGY REVIEW**

Título del artículo: Iron Influence on Copper Biosorption using Anaerobic Sludge and its Microstructural Characterization.

Autor	Responsabilidad
Dra. Evelia Acedo Félix	Directora de Tesis
Dr. Francisco Javier Almendariz Tapia	Co-Director de Tesis
Q.B. Rosalva Pérez Moreno	Asistente en el desarrollo de pruebas experimentales
Dra. Ana Lilia Leal Cruz	Asesora en la caracterización mediante las técnicas de MEB, EDS y DRX para el establecimiento de mecanismos de biosorción en los lodos.
Dr. Jesús Leobardo Valenzuela García	Asesor y responsable técnico del proyecto ante CONACyT

Congreso: **XXVIII CONVENCION INTERNACIONAL DE MINERIA**

Título del artículo: Diversidad microbiana de lodos anaerobios metanogénicos usando DGGE

Autor	Responsabilidad
Dra. Evelia Acedo Félix	Directora de Tesis
Q.B. Rosalva Pérez Moreno	Asistente en el desarrollo de técnicas de biología molecular

II. PRESENTACIÓN DEL ESTUDIO

Los métodos, resultados y conclusiones de este estudio son presentados en los artículos contenidos en los anexos de esta disertación. El siguiente es un resumen de las contribuciones más relevantes de esta investigación:

CHEMICAL SPECIATION AND BIOAVAILABILITY

En este artículo se presentó un estudio de la capacidad de bioacumulación de cobre en un reactor UASB, como una alternativa para el tratamiento de desechos ácidos de mina.

Aportaciones. Para este tipo de reactores y bajo las condiciones experimentales, se determinó que:

- La eficiencia de remoción COD a los 30 días es del 90%.
- La producción de metano es de 0.253 L/L·d.
- La bioacumulación de cobre es de 98% y que esta ocurre gradualmente hasta alcanzar un valor de 61.6 mg Cu(II)/gST.
- La concentración de cobre a la cual la actividad metanogénica específica de los lodos se reduce al 50% (CI_{50}) corresponde a 280 mg Cu(II)/L.
- Es factible el uso de lodo metanogénico para remover cobre de soluciones acuosas.
- Es viable el uso de reactores UASB para el tratamiento de desechos ácidos de mina presentes en el Río San Pedro.

REVISTA DE CONTAMINACIÓN AMBIENTAL

En este trabajo se presentó un estudio de la biosorción de cobre utilizando lodo anaerobio acidogénico viable y no viable.

Aportaciones. Para este estudio y bajo las condiciones experimentales, se estableció que:

- La remoción de cobre es más evidente en las pruebas de biosorción en lote utilizando medio acuoso sintético con concentraciones de 50 a 300 mgCu(II)/L durante los primeros 15 minutos.
- La capacidad de biosorción de cobre para el lodo viable y no viable tienen comportamientos similares que se ajustan al modelo de Langmuir, con valores de q_{\max} de 25.4 y 27.67 mg Cu(II)/gSSV, con un valor de la constante b igual a 0.00739 y 0.00699, respectivamente.
- La biosorción de cobre utilizando reactores con lodos acidogénicos anaerobios viable y no viable presenta una interacción soluto-adsorbente de segundo orden bajo las condiciones experimentales.
- De acuerdo al estudio cinético, es factible el uso de lodo acidogénico viable y no viable para remover cobre empleando reactores anaerobios acidogénicos.
- Este proceso es más eficiente si, se trabaja con soluciones acuosas con baja concentración de cobre. Sin embargo, se obtienen valores de remoción ligeramente superiores cuando se trabaja con lodo no viable.

- Los lodos presentan las siguientes características: ST 60.57 g/L, SSV 30.95, IVL 43 mL_{lodo}/gSSV, tamaño de partícula de 0.25 a 0.6 mm, μ_{\max} de 0.69 gDQO-CH₄/gSSV·d, y K_S_{acetato} de 81.53 mM.
- Los lodos empleados en la remoción de cobre están compuestos por bacterias, diatomeas (sílice amorfa) y una matriz de sílice (cristobalita).
- El análisis cualitativo y cuantitativo por EDS de los lodos reveló la formación de una biopelícula y la presencia de cobre en los lodos empleados en la biosorción. En base a lo anterior se estableció que el cobre se encuentra bioacumulado en las diatomeas y adsorbido en la biopelícula.

MINERAL PROCESSING AND EXTRACTIVE METALLURGY REVIEW

En este artículo se presentó un estudio del efecto del hierro en la bioadsorción de cobre usando lodos anaeróbicos y su caracterización microestructural.

Aportaciones. Para este estudio y bajo las condiciones experimentales, se determinó que:

- El análisis cualitativo y cuantitativo por EDS mostró que el hierro en concentraciones de 50-300 mg/ L favorece la bioadsorción de cobre.
- A concentraciones superiores de 300mg/L se inhibe la biosorción del cobre.
- En esta investigación, se observó que el hierro no tiene un efecto sobre la actividad metanogénica, ni en la producción de metano.

- El análisis cualitativo y cuantitativo por EDS muestra que la cantidad de cobre en las diatomeas corresponde al 2.66% en peso y este puede estar asociado a la biosorción de cobre al consorcio bacteriano y la matriz polimérica.

XXVIII CONVENCION INTERNACIONAL DE MINERIA

En este artículo se presentó un estudio de la diversidad microbiana de lodos anaerobios metanogénicos usando DGGE.

Aportaciones. Para esta investigación y bajo las condiciones experimentales, se determinó que:

- Se obtuvieron los ADN metagenómicos utilizando DGGE de las muestras de lodo y efluentes del bioreactor.
- Se analizaron por PCR, se purificaron y secuenciaron.
- De los 30 fragmentos analizados se identificaron 9 pertenecientes al dominio de Archea y 21 al dominio de Bacteria con un 95% de confiabilidad.
- En todas las muestras se encontró la presencia de archeas metanógenos.
- Se observó la producción de metano durante el estudio, a pesar de la presencia de hierro y cobre.

REFERENCIAS

- Allen, S.K., Allen, J.M. and Lucas S. (1996). Dissolved metal concentrations in surface waters from West-Central Indiana contaminated with acidic mine drainage. *Bulletin of Environmental contamination and Toxicology* 56:240-243.
- Alloway, B.J. and Ayres, D.C. (1993). *Chemical Principles of Environmental Pollution*. Blackie Academic & Professional. New York, USA. Pp. 291.
- Austin, A., Deniseger, J. and Clark, M.J.R. (1985). Lake algal populations and physico-chemical changes after 14 years input of metallic mining wastes. *Water Research* 19:3 Pp 299-308.
- Basso, M.C., Cerella, E.G., Cukierman, A.L. (2002). Empleo de algas marinas para la biosorción de metales pesados de aguas contaminadas. *Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente*. Argentina. 6:1
- Bell, F.C. 1980. *Quelación de Metales: Principios y aplicaciones*. Serie Oxford de Química. Editorial El Manual Moderno. S.A. México, D.F. Pp. 196.
- Cañizares- Villanueva, R. O. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 42:131-143.
- Connell, W.D. and Miller, J.G. 1984. *Chemistry and Ecotoxicology of Pollution*. John Willey & Sons. New York, U.S.A. Pp. 446.
- Chen H., Pan S. 2005. Bioremediation potential of spirulina: toxicity and biosorption studies of lead. *Journal Zhejiang Univ SCI* 6B, 3 Pp 171-174.
- Duarte S. D. (1997). Evaluación de la capacidad de biosorción de Ni(II) por *Thiobacillus Ferrooxidans*. *Revista del Instituto Mexicano de Ingenieros Químicos*, 11:12, Pp.5-11.

- Elder, F.J. 1988. Metal biogeochemistry in surface-water systems. A review of principles and concepts, U. S. Geological Survey Circular 1013, U.S.A.
- Etzel, E.J. and Tseng.D.H. (1994). Cation exchange removal of heavy metals with a recoverable chelant regenerant. In: Metals Speciation, Separation, and Recovery. Lewis Publishers, Inc. Michigan, USA. Pp. 779.
- Fontúrbel R. F. e Ibáñez N.C. 2004. Empleo del Metabolismo Microbiano para la Descontaminación de Aguas. Biología y Ciencias de la Salud. No. 17.
- Förstner, U. and Muller, G. 1973. Heavy Metal Accumulation in River Sediments. A Response to Environment Pollution. Geoforum 14, Pp. 53-61.
- Garza G.M.T. (2005). Aislamiento de microorganismos con alta capacidad de tolerar y remover Pb(II), Cr(VI), Cd(II), Cu(II), Zn(II) y Ni(II). Tesis Doctoral. Universidad de La Habana. LaHabana, Cuba.
- Gómez-Álvarez, A. (2001). Evaluación de la calidad física y química del agua y sedimento del Río San Pedro, Sonora, México, Durante el Periodo 1997-1999. Tesis de Maestría en Ciencias de la Ingeniería. Universidad de Sonora.
- Gómez-Álvarez, A., Villalba-Atondo, A. Acosta-Ruiz G., Castañeda-Olivares, M. y Kamp, D. (2004). Metales Pesados en el Agua Superficial del Río San Pedro Durante 1997 y 1999. Rev. Int. Contam. Ambient. V. 20(1), p. 5-12.
- Gómez-Álvarez, A., Valenzuela-García, J. L., Aguayo-Salinas, S., Meza-Figueroa, D., Ramirez-Hernández, J., Ochoa-Ortega, G. (2007). Chemical partitioning of sediment contamination by heavy metals in the San Pedro River, Sonora, Mexico. Chemical Speciation and Bioavailability. 19, 25-36.
- Gómez-Alvarez, A., Meza-Figueroa D., Villalva-Atondo A., Valenzuela-García J.L., Ramírez-Hernández J., Almendariz-Tapia J. (2008). Estimation of potential

pollution from mine tailings in the San Pedro River (1993-2005), México-US border. Environ. Geol. Springer.

Hammen, R.F., Pang, D.P., Loftsgaarden, E., Van Der Sluysand Cook, C.G. (1994). Copper extraction from complexing solutions. In: Extraction and processing for the treatment and minimization of wastes. A publication of The Minerals, Metals & Materials, Society, USA. Pp. 323-329.

Ilhan S., Nourbakhsh M.N., Kilicarslan S., Ozdag H. (2004). Removal of chromium, lead and copper ions from industrial waste waters by *Staphylococcus saprophyticus*. Turkish Electronic Journal of Biotechnology. 2, 50-57.

Kaduková J., Virciková E. (2005). Comparison of differences between copper bioaccumulation and biosorption. Environment International 31, Pp 227-232

Lettinga, G., van Velsen, A.F.M., Hobma, S.W., De Zeeuw, W. y Klapwijk, A. 1980. Use of the Upflow Sludge Blanket (UASB) Reactor Concept for Biological Wastewater Treatment, Especially for Anaerobic Treatment. Biotechnol. Bioeng., V.22, p. 699-734.

Mijares, M. A. P. (2003). Aislamiento y caracterización de Bacterias con Capacidad para Inmovilizar Cadmio. Tesis Licenciatura. Biología con área en Biotecnología. Universidad de las Américas, Puebla. Capítulo dos.

Monge, A. O., Almendariz, T.F.J., Acedo, F.E., Certucha, b. M.T., Valenzuela, G. J.L. (2007). Identificación de microorganismos presentes en efluentes mineros contaminados con metales pesados. Taller de salud ambiental global. Centro binacional Estados Unidos-México para ciencias ambientales y toxicología. 12-14 Marzo 2007, Tucson, Arizona. Resúmenes de los ponentes Pp. 59.

- Morais B.A. J., Prasad S., Duarte L.V. y Gouveia S.A. (2006). The process of biosorption of heavy metals in bioreactors loaded with sanitary sewage sludge. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 23:02, Pp.153-162.
- Nabizadeh R., Naddafi K., Saeedi R. (2006). Biosorption of lead(II) and cadmium (II) from aqueous solutions by protonated *Sargassum sp.* Biomass. *Biotechnology* 5:1Pp 21-26.
- Pineda H. R. (2004). Presencia de hongos micorrízicos arbusculares y contribución de *Glomus intraradices* en la absorción y translocación de zinc y cobre en girasol (*Helianthus annuus L.*) crecido en un suelo contaminado con residuos de mina. Tesis Doctoral. Universidad de Colima. Tecomán, Colima.
- Qaiser, S., Saleemi A.R., Ahmad, M.M.(2007). Heavy metals uptake by agro based waste materials. *Electronic Journal of Biotechnology*. 409-416.
- Reyes E. D., Cerino C. F. y Suárez H. M. A. (2006). Remoción de metales pesados con carbón activado como soporte de biomasa. *Ingenierías*. IX, No. 31.Pp.59-64.
- Rivas B.G.A., Gutierrez, S., Merino F. (2004). Bioremoción de metales pesados en solución por *Pseudomonas fluorescens* M1A-45 aisladas de ambientes minero. Segunda Semana de Ciencia y Tecnología.
- Ruiz –Manriquez, A., Magaña, P.I., López V. y Guzmán, R. (1998). Biosorption of Cu by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Bioproc. Engin.* 18, Pp.113-118.
- SEDUE (Secretaria de Desarrollo Urbano y Ecología) (1989). Acuerdo por el que se establecen los Criterios Ecológicos de Calidad de Agua CE-CCA-001/89.

Publicado en el diario Oficial de la Federación del 2 de diciembre de 1989.

Tomo CDXXX, No.9. México, D.F.

Schmidt, J.E. y Ahring, B.K. 1996. Granular sludge formation in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Biotechnol Bioeng.* John Wiley & Sons inc. USA V.49, p. 229-246.

Stecio M. (2005). *Microbiología ambiental* Accesado diciembre.

<http://www.cricyt.edu.ar/enciclopedia/términos/Biorremed.htm> Torres V. M.

(2007). Reducción de pasivos ambientales en el beneficio de concentrados minerales de zinc. *Revista Sistemas Ambientales.* 1: 2 Pp. 17-26.

Vásquez-Botello, A. y Páez-Osuna, F. 1986. El Problema Crucial: la contaminación. Serie Medio Ambiente en Coatzacoalcos. Centro de Ecodesarrollo. México, D. F. Pp. 180.

Viera R.H.S.F., Volesky B.(2000). Biosorption: a solution to pollution? *Internatl Microbiol* 3, 17-24

Wang, J., Chen, C. (2006) Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review, *Biotech. Adv.* 2, Pp. 427-451.

ANEXO A

ARTICULO PUBLICADO EN:

CHEMICAL SPECIATION AND BIOAVAILABILITY

**COPPER BIOACUMULATION IN AN UPFLOW ANAEROBIC
SLUDGE BLANKET (USAB) REACTOR**

CHEMICAL SPECIATION & BIOAVAILABILITY

Volume 20, No. 4, 2008

ISSN 0954-2299

An international journal with a multidisciplinary perspective, reporting on the bioavailability, the chemical toxicological and ecological effects of chemical species in the environment, and on methodologies for the determination of chemical species and of their bioavailability and effects

CHEMICAL SPECIATION AND BIOAVAILABILITY IS ABSTRACTED/CITED IN:
BIOSIS-CAB International-CABS (Current awareness in Biological Sciences)-Cambridge Scientific Abstracts-
Chemical Abstracts Service-Chemistry Citation Index-Current Contents/Agriculture, Biology and
Environmental Sciences-Research Alert-Scisearch-UK National Coordinating Input Centre

Copper bioaccumulation in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor

María Teresa Certucha-Barragán^{a,b*}, Evelia Acedo-Félix^c, Onofre Monge-Amaya^b, Jesús L. Valenzuela-García^b, F. Javier Almendariz-Tapia^b and Ana L. Leal-Cruz^b

^aInstitute of Engineering, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California, México

^bDepartamento de Ingeniería Química y Metalurgia, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México

*E-mail:mtcertucha@iq.uson.mx

^cCentro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo, Sonora, México

ABSTRACT

The main objective of this work was to study the capacity of bioaccumulation of copper in an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor, for the treatment of acid mine drainages (AMD). UASB reactor of 0.8 L was fed with sodium acetate, the organic loading rate (OLR) was set at 2.0 gCOD/L.d, and experiments were performed in the reactor during 115 days. After 30 days, the COD removal efficiency was 90%. In the stationary stage, the higher production methane was 0.253 L/L.d. The reactor was added with 20 mgCu(II)/L during 30 days. The copper bioaccumulation was 98% and it was accumulated gradually in sludge until reaching a 61.6 mgCu(II)/gTS. The toxicity study demonstrated that the copper concentration at which the level of specific methanogenic activity (SMA) of the biogranules was reduced to 50% of the control (IC₅₀), was 280 mgCu(II)/L.

Keywords: acid mine drainages, bioaccumulation, copper, UASB reactor

1. INTRODUCTION

It is well-known that the use of the water drainage basins are the primary sources for anthropogenic unloads; it represents a risk for human health, particularly the pollution caused by the high concentrations of some heavy metals, such as, zinc (Zn), nickel (Ni), chromium (Cr), lead (Pb) and copper (Cu) (Topalián *et al.*, 1999; Karri *et al.*, 2006; Upadhyay *et al.*, 2006). Those metals go through the aquatic environment principally by direct loads of industrial sources, soils and sediments and are distributed in the water, biota, being the mining industry one of the most important source (Elder, 1988; Alloway and Ayres, 1993; Gomez-Alvarez *et al.*, 2007). An example of contamination by heavy metals in water and sediment can be found in the San Pedro River basin, one of the most important rivers of the north of Sonora, Mexico. This river has been severely contaminated by the wastewater discharges with high concentration of copper gener-

ated during the mining activity of the region. In addition, wastewaters discharge untreated raw sewage coming from the city of Cananea, Sonora (Gómez-Álvarez *et al.*, 2001a, 2007b) which also contribute to the pollution of this source of water. Considering the importance and impact of this problem on the community of Cananea city, different kinds of research have been developing. Monge-Amaya *et al.* (2008) report the sampling stations in the San Pedro River and the propagation and isolation of the bacteria and the copper biosorption in an aerobic bioreactor. However, it is necessary to undertake more studies that suggest other alternatives for the treatment of acid mine drainages (AMD) and, consequently, reduce the concentration of the heavy metals in the San Pedro River, until acceptable levels according to Mexican regulations (NOM-001). The main objective of this work was to study the capacity of bioaccumulation of copper in an upflow anaerobic sludge blanket reactor (UASB), for the treatment of acid mine drainage (AMD).

doi: 10.3184/095422909X12470568098587

www.scilet.com

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Continuous systems

These studies were performed in a UASB reactor (Figure 1) of volume 0.8 L, 0.25 m in height with an internal diameter of column of 7.2 cm, a flow of 1.2 mL min⁻¹, an hydraulic residence time of 12.0 h that was housed at 35°C. The reactor was seeded with 240 mL of anaerobic sludge with a concentration of volatile suspended solid (VSS) of 46.24 g L⁻¹ by feeding with 1 g L⁻¹ of chemical oxygen demand (COD) of dextrose, with an organic volumetric load of 2.0 COD/L d. To determine the bioaccumulation of the sludge in the UASB reactor, 20.0 mg L⁻¹ were added as Cu(II). The mineral medium (pH 7.0) used was designed by Visser (1995), consisted (in mg L⁻¹): NH₄Cl 1044, KCl 544, MgSO₄·7H₂O 370, KH₂PO₄ 340, CaCl₂·2H₂O 100, yeast extract 100, trace elements solution 1 mL L⁻¹. The solution of trace elements consisted of (in mg L⁻¹): FeCl₂·4H₂O 2000, MnCl₂ 500, EDTA 500, Na₂SeO₃ 100, H₃BO₃ 50, ZnCl₂ 50, (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O 50, AlCl₃ 50, NiCl₃·6H₂O 50, CoCl₂·2H₂O 50, CuCl₂·2H₂O 50.

2.2 Batch system

Methanogenic activity was carried out in serological bottles (250 mL) in duplicate, with a volume of operation of 175 mL. Each container were seeded with 2.0 g VSS/L of anaerobic sludge and fed with sodium acetate (2.0 g COD/L). Bottles were incubated for 24 h at 35°C for the adaptation of the sludge to the average conditions. Over the next few days, the headspace was again fed with sodium acetate. Methane production was measured for displacement of a solution of NaOH (3.0%) (Jawed and Tared, 1999).

For the kinetic toxicity of copper, after 24 h of incubation, the ion was added for example, Cu(II), to concentrations of 0, 100, 250, 500, 750 and 1000 mg L⁻¹. The metal exposition was for 72 h, they were later again fed with acetate (1.0 g COD/L). Methane production was measured as before and COD consumption by the APHA (1995). The mineral medium was the same as before (Visser, 1995).

2.3 Analytical methods

Volatile suspended solids (VSS) were measured gravimetrically, the chemical demand of oxygen (COD) according to the standard methods (APHA, 1995), and the relation of alkalinity “ α ” (Castilla,

2006; Bouvier *et al.*, 2008), metal content was measured with Perkin-Elmer model 3110 atomic absorption spectrophotometer at 324.8 nm wavelength and 0.7 nm slit.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The reactor UASB was kept in operation for 115 days. On the first 25 days, a minor value of alkalinity ratio (α) of 0.5 was observed (α = carbonate/volatile fatty acids). Anaerobic degradation is a multi-stage process. At the beginning, complex organic substrates are hydrolysed by enzymes to form soluble acids and sugars. Then they are degraded by acidogenic bacteria into volatile fatty acids (VFA). Furthermore, intermediate VFA are degraded by acidogenic bacteria forming acetate, formate, carbon dioxide and hydrogen. Finally, intermediates are converted to methane by the methanogenic bacteria. According to this, the mineral media was modified, adding sodium bicarbonate to increase α up to 0.5. The ratio of alkalinity lower than 0.5 indicates that there is no buffer capacity in the system and consequently, the system can change from methanogenic to acidogenic. On day 30, the activity of the sludge reached a higher removal efficiency of COD to 90% and it was kept during the 115 days of the conditioning period. In the stationary stage, a maximum production of methane of 0.253 L/L d was observed. Figure 2a shows the bioaccumulation level of the UASB reactor fed with CuSO₄ (20 mg L⁻¹). These results reveal that all the copper remain in the anaerobic sludge since the effluent had the lowest levels of copper compared with the influent.

In Figure 2b, it can be observed that the fed copper is accumulated gradually in the anaerobic sludge. On day eight, the bioaccumulation of copper in the sludge was 11.2 mg Cu(II)/gTS (TS = total solids). Whereas, at the end of the test (on day 29), it was 61.6 mg Cu(II)/gTS.

Figure 3 shows COD removal efficiencies of the UASB reactor fed with copper. COD remained overhead of 98% and the specific methanogenic activity (SMA) was 0.34 L/L d. The toxic effect of the copper diminished, since the reactor UASB was fed with copper sulfate. The sulfate is used as an electron acceptor changing the methanogenic activity to sulfate reduction activity, and copper precipitates in the sludge. Karri *et al.* (2006) reported that the toxicity of the copper is low in the culture media that contains sulfides due to precipitation of metal sulfides.

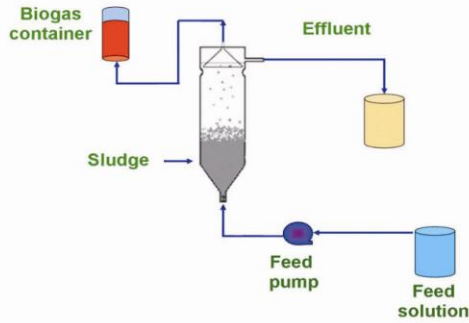
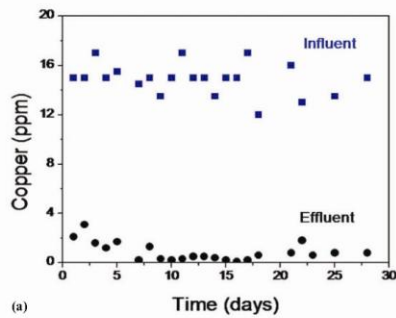
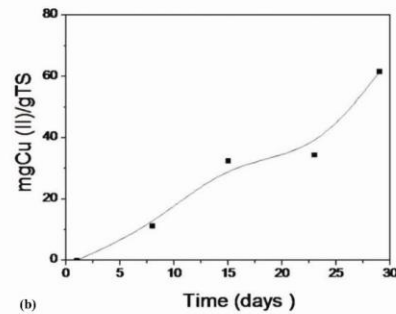


Figure 1 Diagram of UASB reactor.

Batch systems were used to find the toxicity of copper, this parameter can be expressed by a simple IC_{50} value, representing the copper concentration at which level the SMA of the biogranules was reduced to 50% of the control (IC_{50}). In this investigation, the IC_{50} value obtained was 280 mg Cu(II)/L where 100% represents the SMA without copper (see Figure 4). Higher IC_{50} values, as in this case, mean that the sludge exhibited better resistance to copper toxicity. On the other hand, the maximum production of the methane of the control was 80 mL, and 0.16 of chemical oxygen demand (gCOD/gVSS.d). Fang (1997) reported similar values for IC_{50} of copper using a UASB reactor packed with anaerobic biogranules.



(a)



(b)

Figure 2 (a) Copper removal in the reactor UASB, fed with Cu(II) 20 mg/L. (b) Bioaccumulation of copper in the anaerobic sludge of the UASB reactor.

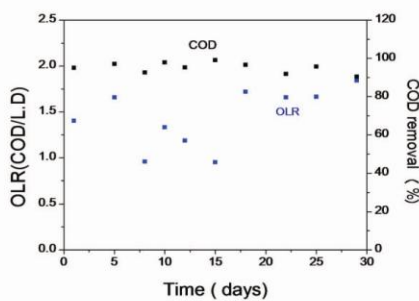


Figure 3 Efficiency of removal of the COD in the UASB reactor during the fed with culture medium containing 20 mgCu (II)/L.

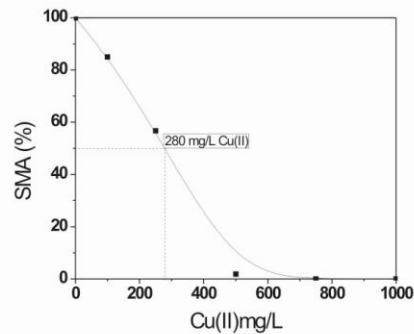


Figure 4 Inhibitory concentration of copper towards the methanogenic activity of the sludge in batch system.

4. CONCLUSIONS

The copper concentration of the acid mines drainage of San Pedro River, is lower than the IC_{50} (280 mg of Cu(II)/L); therefore, it could be treated in the UASB reactor, packed with anaerobic sludge. The bioaccumulation of the copper in the sludge of reactor was gradual until reaching a concentration of 61.6 mg Cu(II)/gTS in 30 days without biomass inhibition.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to the Center for Research and Advanced Studies (CINVESTAV - Saltillo) for the characterization of sludge. We also thank the Department of Chemical Engineering and Metallurgy of the University of Sonora for support in the realization of this research. This research was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT- ID project 82561).

REFERENCES

- Alloway, B.J. and Ayres, D.C. (1993) *Chemical principles of environmental pollution*, pp. 291. Blackie Academic & Professional, New York, USA.
- APHA Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (1995). 19th edn, *American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation*, Washington DC, USA.
- Bouvier, J.C., Steyer, J.P. and Delgenes, J.P. (2002) On-line titrimetric sensor for control of VFA and/or alkalinity in anaerobic digestion processes treating industrial vinasses. <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/unam7/onl> (accessed 21 July 2008).
- Castilla-Hernández, P. (2006) Anaerobic Biodegradación of Petrochemical Compounds. Ph.D Thesis, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México, D.F.
- Elder, F.J. (1988) *Metal biogeochemistry in surface-water systems*. A review of principles and concepts, U.S. Geological Survey Circular 1013, U.S.A.
- Fang, H.P. (1997) Inhibition of bioactivity of UASB biogranules by electroplating metals. *Pure Appl. Chem.*, **69**(11), 2425-2429.
- Gómez-Álvarez, A. (2001) Evaluation of the physical quality and chemistry of the water and sediment of the Rio San Pedro River, Sonora, Mexico, during the period 1997-2000. Master's thesis, Universidad de Sonora, Sonora, México.
- Gómez-Álvarez, A., Valenzuela-García, J.L., Aguayo-Salinas, S., Meza-Figueroa, D., Ramirez-Hernández, J. and Ochoa-Ortega, G. (2007) Chemical partitioning of sediment contamination by heavy metals in the San Pedro River, Sonora, Mexico. *Chem. Speciat. Bioavail.*, **19**, 25-36.
- Jawed, M. and Tare, V. (1999) Microbial composition assessment of anaerobic biomass through methanogenic activity tests. *Water S.A.*, **25**(3), 345-350.
- Karri, S., Sierra-Alvarez, R. and Field, J.A. (2006) Toxicity of copper to acetoclastic and hydrogenotrophic activities of methanogens and sulfate reducers in anaerobic sludge. *Chemosphere*, **62**, 121-127.
- Topalián, M.L., Castañé, P.M., Rovedatti, M.G. and Salibián, A. (1999) Principal component analysis of dissolved heavy metals in water of the Reconquista River (Buenos Aires, Argentina). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **63**, 484-490.
- Upadhyay, A.K., Gupta, K.K., Sircar, J.K., Deb, M.K. and Mundhara, G.L. (2006) Heavy metals in freshly deposited sediments of the rivers Subernarenkha, India: an example of lithogenic and anthropogenic effects. *Environ. Geol.*, **50**, 397-403.
- Visser, A. (1995) The Anaerobic treatment of sulfate containing wastewater. PhD thesis. Wageningen Agricultural University, Wageningen, Holland.

ANEXO B

ARTICULO ACEPTADO PARA SU PUBLICACION EN:

**REVISTA INTERNACIONAL
DE CONTAMINACION AMBIENTAL**



REV. INT. CONTAM. AMBIENT.

ISSN - 0188 4999

VOLUMEN 24

REVista INternacional
de
CONTAMinación
AMBIENTal

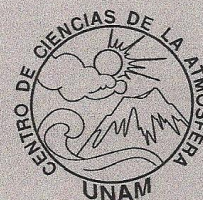
NÚMERO 3

AGOSTO

2008



Programa
Universitario de
Medio
Ambiente



De: Oliver Davidson Vejar oliver@atmosfera.unam.mx

Para: [mtcertucha certucha@correom.uson.mx](mailto:mtcertucha_certucha@correom.uson.mx)

Enviado: Miércoles 22 de Abril de 2009 12:10 p.m.

Asunto: Trabajo Revisado

Estimada M. en C. María Teresa Certucha Barragán

Hemos recibido las respuestas de los revisores a quienes se envió su trabajo

ESTUDIO CINÉTICO DE REMOCIÓN DE COBRE CON LODO ANAEROBIO

ACIDOGÉNICO, mismas que le hacemos llegar en documento adjunto. Le

pedimos que considere las correcciones que le hacen para una nueva versión del

texto, misma que agradeceremos enviar a la brevedad. Adicionalmente, le

pedimos que responda a los comentarios de cada revisor por separado.

Esperando que tenga buena tarde,

Oliver Davidson Vejar

Asistente Editorial

Revista Internacional de Contaminación Ambiental

<http://www.atmosfera.unam.mx/editorial/rica.html>

Publicación incluida en Science Citation Index Expanded (SciSearch®) y Journal

Citation Reports/Science Edition por Thomson Reuters

ESTUDIO DE LA BIOSORCIÓN DE COBRE UTILIZANDO LODO ANAEROBIO ACIDOGÉNICO

María Teresa CERTUCHA-BARRAGÁN^{1,2}, Glenda DUARTE-RODRÍGUEZ²,
Evelia ACEDO-FÉLIX³, F. Javier ALMENDARIZ-TAPIA², Onofre MONGE-
AMAYA², Jesús L. VALENZUELA-GARCÍA² y A.L. LEAL-CRUZ⁴

¹ Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California, México.

² Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora, México. mtcertucha@iq.uson.mx

³ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo, Sonora, México.

⁴ CINVESTAV-Salttillo, Saltillo, Coahuila, México.

Palabras claves: biosorción, cobre, isotermas, lodo-anaerobio-acidogénico, remoción.

RESUMEN

En este trabajo se presenta un estudio de la biosorción de cobre utilizando lodo anaerobio acidogénico viable y no viable, con las siguientes características: ST 60.57 g/L, SSV 30.95, IVL 43 mL_{lodo}/gSSV, tamaño de partícula de 0.25 a 0.6 mm, μ_{\max} de 0.69 gDQO-CH₄/gSSV·d, y $K_{s_{\text{acetato}}}$ de 81.53 mM. Las pruebas de biosorción utilizando medio acuoso sintético y concentraciones de 50 a 300 mgCu(II)/L, muestran que la remoción de cobre es más evidente en los primeros 15 minutos. La capacidad de biosorción de cobre para el lodo viable y no viable presentaron comportamientos similares que se ajustan al modelo de Langmuir, con valores de q_{\max} de 25.4 y 27.67 mgCu(II)/gSSV, con un valor de la constante b igual a 0.00739 y 0.00699, respectivamente. El estudio cinético indica que es

factible el uso de lodo acidogénico viable y no viable para remover cobre empleando reactores anaerobios acidogénicos. Los resultados de la caracterización de los lodos por MEB, EDS y DRX revelaron la presencia de bacterias, diatomeas (sílice amorfa) y una matriz de sílice (cristobalita) en los lodos empleados en esta investigación. El análisis cualitativo y cuantitativo por EDS de los lodos muestra la presencia de Cu bioacumulado en las diatomeas y adsorbido en la biopelícula.

Key words: biosorption, copper, isotherm, anaerobic-acidogenic-sludge, removal

ABSTRACT

In this paper a study of biosorption of copper was carried out using living and non-living acidogenic anaerobic sludge. Characterization results of sludge are as follows: TS 60.57 g/L, VSS 30.95, SVI 43 mL_{sludge}/gVSS, particle size from 0.25 to 0.6 mm, μ_{\max} of 0.69 gCOD-CH₄/gVSS·d, and $K_{s_{\text{acetate}}}$ of 81.53 mM. Biosorption trials using copper concentration from 50 to 300 mg Cu(II)/L show that copper removal is more evidently during the first 15 minutes. Biosorption capacity of copper in living and non-living sludge has the same behavior and there are a well fitting with Langmuir model in both systems, where q_{\max} is 25.4 and 27.67 mgCu(II)/gVSS, and b corresponds to 0.00739 y 0.00699, respectively. In addition, living and non-living sludge can be used to remove copper using acidogenic anaerobic reactors. SEM, EDS and XRD results for sludge reveal the presence of bacteria, diatoms (amorphous silica) and silica (cristobalite) matrix. Qualitative and

quantitative analysis by EDS showed the presence of copper bioaccumulated into diatoms and on the biofilms.

INTRODUCCIÓN

Varios factores son importantes en la retención de metales pesados usando biomasa anaerobia. Estos factores incluyen las propiedades químicas de la superficie celular, el tamaño de partícula, la actividad metabólica de la biomasa, entre otros. Diversos microorganismos, tales como: levaduras, hongos y bacterias han sido reportados para la remoción de metales pesados (Cd, Hg, Cr, Zn, Co, Sn, Fe y Cu) de efluentes contaminados (Vieira y Volezky, 2000 y Wang y Chen, 2006). Específicamente para la remoción de cobre se han empleado algas (*Scenedesmus incrassatulus*, *Ecklonia máxima*, *Lessonia flavicans*, *Durvillea patatorum*, alga verde-*Phaeophyta*, alga verde-*chlorophyta* y alga roja-*Rhodophyta*); bacterias (*Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp., *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomona aeruginosas*, *Pseudomonas* sp., *Micrococcus* sp., *Pseudomonas ambigua*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Enterobacter cloacae*, *Alcaligenes eutrophus*, *Dinococcus radiodurans*); y levaduras (*Sacaromices cerevisiae*) (Mullen, *et al.*, 1989; Vieira y Volesky, 2000; Wang, 2002; Mack, *et al.*, 2004; Peña-Castro *et al.*, 2004). Estos microorganismos tienen la habilidad de remover cobre mediante la biosorción. El proceso de biosorción puede ser definido como la captación de contaminantes desde una solución acuosa por un material biológico a través de mecanismos fisicoquímicos o metabólicos. Los dos mecanismos diferenciados para la captación de los metales pesados por parte de la biomasa son la bioacumulación y la bioadsorción (Volesky, 2004; Reyes *et al.*, 2006). El

primer mecanismo se basa en la capacidad de absorción de las especies metálicas hacia el interior de las células que componen la biomasa, mientras que el segundo, se basa en la adsorción de los iones en la superficie de la célula, este fenómeno puede ocurrir por intercambio iónico, precipitación, complejación o atracción electrostática (Vieira y Volesky, 2000; Reyes *et al.*, 2006). La remoción de metales pesados como el cobre mediante biosorción ha sido estudiada desde los setentas. El cobre es un metal esencial que regula algunas funciones celulares y está involucrado en la producción de proteínas. Sin embargo, el cobre en altas concentraciones puede provocar efectos tóxicos y cambios fisiológicos en organismos heterotróficos y fototróficos (Boivin, 2005). Por otra parte, debido a la diversidad de materiales biológicos que se pueden emplear para la remoción de éste, existe la necesidad de estudiar la biosorción de cobre utilizando microorganismos específicos, identificar los mecanismos y entender las interacciones microorganismo-metal. En base a lo anterior, en este trabajo se plantearon como objetivos, los siguientes: evaluar la cinética de biosorción de cobre en lodo anaerobio acidogénico viable y no viable en reactores por lotes y determinar los mecanismos de biosorción de cobre mediante técnicas de difracción de rayos X (DRX), microscopía electrónica de barrido (MEB) y espectroscopía de energía dispersiva de rayos X (EDS).

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos

Todos los reactivos empleados en esta investigación fueron de grado analítico de la marca Sigma-Aldrich y las soluciones de cobre (Cu(II)) se prepararon a partir de sulfato de cobre (CuSO_4) disuelto en agua deionizada.

Lodos anaerobios

Los lodos se obtuvieron de una planta de tratamiento de agua de la industria cervecera y fueron analizados para determinar sólidos totales (ST), sólidos suspendidos volátiles (SSV), cenizas, índice volumétrico de lodo (IVL) (APHA, 1995) y distribución de tamaño de partícula (Laguna *et al.*, 1999). Para realizar las pruebas de biosorción con lodos no viables, estos se esterilizaron en una autoclave a 16 psi durante 15 minutos. Mientras que, las pruebas con lodo viable, se realizaron con los lodos previamente acondicionados en un medio acidogénico.

Activación y acondicionamiento de lodos

Para llevar a cabo esta etapa, se transfirieron 300 mL de lodo a matraces de 1 L y se activaron con medio mineral (g/L): 1.045 NH_4Cl , 0.27 KCl , 0.17 KH_2PO_4 , 0.185 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05 $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.5 dextrosa, 0.02 extracto de levadura, 0.5 CH_3COONa , 0.125 NaHCO_3 y 1 mL solución de elementos traza (Visser, 1995). El período de incubación fue de 12 a 20 días en una incubadora con agitación (New Brunswick Scientific modelo C76) a una temperatura de 35° C y a 50 rpm. Posteriormente, se hizo la conversión del lodo metanogénico a acidogénico, sobrealimentando el lodo metanogénico con 5 $\text{gDQO}_{\text{acetato}}/\text{L}$ para tener una mayor

producción de ácidos grasos y de esta forma, disminuir la actividad metanogénica y estabilizar el pH entre 4-4.5.

Determinación de la constante de saturación (Ks)

Este estudio se llevó a cabo en botellas serológicas de 150 mL con un volumen de operación de 100 mL, las cuales se alimentaron con acetato de sodio a concentraciones de 0.25, 0.5, 1, 2, 3 y 5 gDQO/L y se inocularon con 10 mL de lodo en el medio mineral de Visser. Posteriormente, fueron incubadas durante 24 h en un cuarto con temperatura controlada a 35° C. Se determinó la demanda química de oxígeno (DQO), de acuerdo a los *métodos estándares* (APHA, 1995) y el metano por desplazamiento de una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 3%. Las muestras para la determinación de DQO y metano se tomaron cada tres horas.

Biosorción

Las pruebas de biosorción se hicieron en matraces de 250 mL, con 200 mL de medio mineral ajustado a un pH de 4.5 para evitar la precipitación de iones de cobre. En estas pruebas, se utilizaron las siguientes concentraciones de cobre en mg Cu(II)/L: 50, 100, 150, 200 y 300. A cada una de las soluciones, se les adicionaron 12 mL de lodo (0.37g SSV) y se incubaron a 37° C durante 75 minutos en una incubadora con agitación a 50 rpm. Se tomaron muestras cada 15 minutos para cuantificar el ión metálico en el sobrenadante con un espectrofotómetro de absorción atómica (Perkin Elmer 3100).

Isotermas de bioacumulación y bioadsorción

La capacidad de retención de cobre (q) de la biomasa se calculó mediante la siguiente ecuación (Mesquita, *et al.*, 2007; Gutiérrez-Cerón *et al.*, 1997):

$$q = \frac{C_i - C_f}{X_0}$$

(1)

donde q corresponde a la capacidad de biosorción de cobre (g de cobre/g de biosorbente), C_i es la concentración inicial de Cu(II) en solución (g/L), C_f es la concentración final de Cu(II) en solución (g/L) y X_0 es la concentración de sólidos volátiles suspendidos (biosorbente) (g/L).

Las isotermas de biosorción se obtuvieron graficando la capacidad de retención del metal (g de cobre/ g de biomasa) contra la concentración residual del metal en solución (g/L). En el presente trabajo, los datos experimentales se ajustaron al modelo de adsorción de Lagmuir. De acuerdo a este modelo, las isotermas se pueden definir como se muestra en la siguiente ecuación:

$$q = \frac{bC_e q_{\max}}{1 + bC_e}$$

(2)

donde, q_{\max} es la capacidad máxima que presentó el lodo, para biosorber cobre (gCu(II)/gSSV), C_e es la concentración de Cu (II) remanente en la solución bajo condiciones de equilibrio y b es una constante relacionada con la energía de

adsorción. Este modelo considera que las isothermas de biosorción tienen un comportamiento parabólico y permite obtener parámetros (q_{max} y b) útiles descritos anteriormente y que representan características importantes del sistema.

Caracterización de lodos por MEB, EDS y DRX

Con el propósito de establecer los mecanismos de biosorción de cobre en los lodos anaerobios, se realizó un estudio sistemático que involucró la observación de los microorganismos presentes en los lodos, mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) y microanálisis general y puntual por espectroscopia por dispersión de energía de rayos X (EDS), sobre la matriz que componen los lodos y los microorganismos presentes en este. El microscopio electrónico de barrido (MEB, Philips, modelo XL30 ESEM) utilizado en este estudio está provisto de un dispositivo (EDAX, modelo Falcon) para realizar microanálisis mediante espectroscopia por dispersión de energía de rayos X (EDS). El análisis por MEB de los lodos, se realizó en condiciones de bajo vacío y ambiental a diferentes magnificaciones de 200 a 2000X. Para cada magnificación, se hizo microanálisis puntual sobre los microorganismos, así como, análisis general de los lodos para la determinación de Cu por EDS. Las señales empleadas fueron: electrones secundarios de baja energía (*SE, secondary electrons*) para la adquisición de las imágenes y rayos X característicos para el análisis elemental cualitativo y cuantitativo de Cu. Previo al análisis, las muestras se prepararon colocándolas sobre substratos conductores de aluminio y recubiertos con cinta de grafito. Después, las muestras se recubrieron con oro para hacer conductora la muestra y obtener las imágenes. La identificación de las fases presentes en los lodos se

llevó a cabo mediante la técnica de difracción de rayos X. Las muestras fueron preparadas previamente con el propósito de homogeneizarlas. Esta preparación consistió en la pulverización de las muestras hasta obtener un tamaño de partícula menor a 100 mallas. Posteriormente, los polvos fueron colocados sobre portamuestras para su análisis en un difractómetro de rayos X (Philips 3040). Las condiciones de análisis fueron las siguientes: radiación K α de cobre, $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$, el ángulo de barrido se varió en el rango de 10 a 80° y la velocidad de barrido fue de 0.02°/seg. El voltaje de excitación del ánodo fue de 30 kV y la corriente aplicada fue 97000 nA (Leal, 2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización de lodos

En el **cuadro I** se muestran los resultados de la caracterización del lodo anaerobio empleado para la remoción de cobre.

La cuantificación de los SSV es una manera indirecta para determinar la biomasa y se obtienen al restar las cenizas (SF) a los ST, de este modo la biomasa contenida en el lodo fue la mitad del total de sólidos. El IVL indica que el lodo presentó una velocidad de sedimentación rápida. Los valores superiores a un IVL de 150, se asocian en general con el crecimiento de bacterias filamentosas y una baja sedimentación (Crites y Tchobanoglous, 2000). Los resultados del análisis granulométrico (**Fig. 1**) muestra que los sólidos totales y volátiles presentes en los lodos están constituidos en su mayoría por gránulos con tamaño de partícula de 0.355 mm.

Determinación de la constante de saturación (Ks)

La **figura 2** muestra los resultados de la AME (actividad metanogénica específica, μ_{DQO-CH_4}) evaluada a diferentes concentraciones de acetato del lodo anaerobio, previamente activado.

Para determinar la constante de saturación (Ks) y la máxima AME (μ_{max}) se empleó una herramienta de cálculo de Excel denominada Solver. Esta herramienta permite una optimización a partir de datos experimentales (Fig. 2) para la determinación de los valores Ks y μ_{max} , que posteriormente son empleados para hacer un ajuste al modelo de Monod [$\mu_{DQO-CH_4}(C_{acet.}) = \mu_{max} C_{acet.} / (Ks + C_{acet.})$], (Olguin-Lora *et al.*, 2003). De acuerdo a este análisis, los valores de parámetros $Ks_{acetato}$ y μ_{max} corresponden a 81.53 mM y 0.69 gDQO-CH₄/gSSV·d, respectivamente.

Cinética de Biosorción

Los resultados experimentales de la cinética de biosorción de cobre utilizando lodo anaerobio viable se muestran en la **figura 3**. De acuerdo a los resultados, la remoción del cobre es más marcada en los primeros 15 minutos. También se observa que la remoción de cobre aumenta al disminuir la concentración de este en las soluciones acuosas y a mayores tiempos de contacto. La máxima remoción (24 %) se obtuvo en las pruebas de biosorción empleando soluciones acuosas con 50 mg Cu(II)/L y tiempos de contacto de 75 minutos. Los resultados correspondientes al blanco sin biomasa y empleado como control, mostraron que la precipitación del cobre fue menor al 5%. En base a lo anterior, se considera que la remoción de cobre bajo las condiciones experimentales es más eficiente si se trabaja con soluciones acuosas con baja concentración de cobre.

En la **figura 4** se presentan las curvas de biosorción de cobre, en las cuales se utilizó lodo anaerobio no viable variando el tiempo y la concentración de cobre de las soluciones acuosas (50, 100, 150, 200 y 300 mg Cu(II)/L). En esta gráfica se puede observar que a la concentración de 50 mg/L de cobre, la remoción máxima es del 27.5% a los 75 minutos y al aumentar la concentración a 300 mg/L de cobre se observa una reducción en la remoción hasta el 12% para el mismo tiempo.

Los resultados de la cinética de biosorción de cobre utilizando lodo viable y no viable revelaron que existe una mayor remoción de cobre en el lodo no viable bajo condiciones similares. Dicho comportamiento, es atribuido a un incremento de la capacidad de retención de la biomasa durante la esterilización en autoclave, que se debe a un aumento del área superficial generado por el rompimiento de las células y gránulos (Haytoglu *et al.*, 2001).

Isotermas de biosorción

En las **figuras 5 y 6** se presentan los resultados correspondientes a las isotermas de biosorción de cobre utilizando lodo viable y no viable. Después de hacer el ajuste de los datos experimentales al modelo de Langmuir mediante la herramienta de cálculo de Excel Solver, se determinaron los siguientes parámetros: el límite máximo de retención (q_{max}) que corresponde a la capacidad del material para retener iones metálicos en soluciones concentradas y la ordenada al origen b que es la capacidad del material de retener metales en soluciones diluidas (Gutiérrez-Cerón *et al.*, 1997). De acuerdo a estos resultados, los valores de q_{max} para el lodo viable y no viable fueron de 25.4 y 27.67 mg Cu(II)/gSSV respectivamente. Mientras que, los valores de la constante b fueron

0.00739 para el lodo viable y 0.00699 para el lodo no viable. El ajuste de los datos experimentales al modelo Langmuir indica: que existe una interacción soluto-adsorbente de segundo orden bajo las condiciones experimentales utilizadas, que toda la superficie tiene la misma actividad para la biosorción del cobre y que no existe interacción entre las especies adsorbidas. Por otra parte, se considera que la biosorción del cobre se lleva a cabo mediante el mismo mecanismo y el grado de biosorción es inferior a una monocapa molecular completa en la superficie del lodo acidogénico. Dado que, los resultados anteriores no muestran diferencias significativas en el comportamiento de la capacidad de biosorción de cobre para los dos tipos de lodo, es posible considerar como una alternativa el uso de biomasa viable y no viable para remover cobre utilizando reactores anaerobios.

Caracterización de lodos por DRX, MEB y EDS

Las **figuras 7a y 7b** muestran los resultados de las características microestructurales de los lodos.

Los resultados de DRX revelaron que los lodos están constituidos por fases amorfa y cristalina. La **figura 7a** muestra un patrón de DRX representativo correspondiente a los lodos, en el cual se observan una joroba típica de materiales amorfos que se atribuyen a la sílice amorfa y algunas reflexiones que pertenecen a la fase cristobalita de la sílice (JCPDS 77-1316; 21.990, 36.109, 31.453; tetragonal; $a=4.9709\text{\AA}$ y $c=6.9278\text{\AA}$; Cristobalita-SiO₂). La sílice cristalina está asociada a la matriz que compone los lodos y la sílice amorfa a las diatomeas que se encuentran embebidas en la matriz de sílice, como se muestra en la fotomicrografía de MEB **figura 7b**.

En las **figuras 8a y 8b** se muestra la morfología típica de los microorganismos observados en los lodos, así como las formas del material exopolimérico que compone la biopelícula.

La **figura 9** muestra los resultados de la cuantificación de cobre en los lodos y diatomeas por EDS.

Los resultados de la caracterización por MEB y EDS revelan que el cobre no se encuentra en la matriz (cristobalita) que compone a los lodos, sino en las diatomeas y en la biopelícula (ver Figura 8b) que consiste básicamente de bacterias y sustancias poliméricas extracelulares, EPS, por sus siglas en inglés (Donlan, 2002). Dado que, el análisis cualitativo y cuantitativo por EDS sobre las diatomeas muestra la presencia de Cu en cantidades promedio de 2.66 % en peso. Además, considerando que las diatomeas se encuentran recubiertas por una biopelícula, se asume que el cobre se encuentra bioacumulado en las diatomeas y adsorbido en la biopelícula, ya que los rayos X característicos empleados para el análisis por EDS, son generados cuando el haz de electrones penetra en la muestra a profundidades de 300-1000 nm (0.3 a 1 μ m) (Pantano y Kelso, 1984).

CONCLUSIONES

El uso de biomasa viable y no viable constituye una alternativa apropiada para remover cobre utilizando reactores anaerobios. La biosorción de cobre utilizando reactores con lodos acidogénicos anaerobios viable y no viable, presenta una interacción soluto-adsorbente de segundo orden bajo las condiciones

experimentales, ya que se ajusta al modelo de Langmuir. Este proceso es más eficiente si, se trabaja con soluciones acuosas con baja concentración de cobre. Sin embargo, se obtienen valores de remoción ligeramente superiores cuando se trabaja con lodo no viable. De acuerdo a los resultados de la caracterización microestructural, los lodos empleados en la remoción de cobre están compuestos por diatomeas (sílice amorfa) y una matriz de sílices (cristobalita). La formación de la biopelícula y la presencia de cobre en los lodos empleados en la biosorción, permiten establecer que el cobre se encuentra bioacumulado en las diatomeas y adsorbido en la biopelícula.

AGRADECIMIENTOS

El presente estudio forma parte del proyecto de investigación científica básica 2007 No. 82561 Apoyado por CONACyT. Los autores expresan su agradecimiento al Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) Unidad Saltillo y a su auxiliar de investigación Felipe de Jesús Márquez Torres por su apoyo y asesoría con la caracterización por microscopía electrónica de barrido, espectroscopia de energía dispersiva y difracción de Rayos X, como parte del convenio de cooperación CINVESTAV Unidad Saltillo/ Universidad de Sonora 2006. Al Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia, en forma muy especial a Q.B. Maria Elena Ochoa, Ángel Antonio Romero y Jesús Cervantes por su apoyo en los análisis realizados.

BIBLIOGRAFÍA

- Alexander M. (1999). *Biodegradation and Bioremediation*. ED. Academic Press. Ed. 2nd. USA. 377-390.
- APHA. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (1995). 19th edn., American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation, Washington DC, USA.
- Boivin M.Y., Breure A. M., Van den Ende F. P., Greve G.D., Rutgers M., Admiraal W. (2005). Effects of copper and temperature on aquatic bacterial communities. *Aquatic Toxicol.* 71, 345–356.
- Crites R. y Tchobanoglous G. (2000). *Tratamiento de aguas residuales en pequeñas poblaciones*. ED. McGraw-Hill. Colombia. 344-473.
- Donlan R. M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases* Vol. 8, No. 9.
- Gutiérrez Cerón M. A., González González L. R., Sanchez Mora E. y Mellado Peralta D. (1997). Biosorción de Pb (II) por biomasa de *Saccharomyces cerevisiae*. XI Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Realizado del 4 al 7 de noviembre, Zacatecas, Zacatecas, Mex.
- Haytuglu B., Demier G. N. y Yetis U. (2001). Effectiveness of anaerobic biomass in adsorbing heavy metals. *Water Sci and Technol.* 44, 245-252.
- Laguna A., Ouattara A., González R. O., Barón O., Fama G., El Mamouni R., Guiot S., Monroy O. y Macarie H. (1999). A simple and low cost technique for determining the granulometry of upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Water Sci. Technol.* 40, 1-8.

- Leal C. A. L. (2007). Estudio termodinámico, cinético y microestructural de la descomposición de Na_2SiF_6 -formación de nitruros de silicio en sistemas Na_2SiF_6 -precursor de nitrógeno-diluyente. Tesis Doctoral. CINVESTAV, Unidad Saltillo. México.
- Mack C., Burgess J.E. y Ducan J.R. (2004) Membrane bioreactors for metal recovery from wastewater: A review. *Water S.A.* 30, 521-532.
- Mesquita V. D., Augusto C. A. C., Assumpção H. C., Luiz C. V. y Pessôa F. F. (2007) Biosorption of lead by the brown seaweed *Sargassum filipendula*-batch and continuous pilot studies. *Electron J. Biotechnol.* 10, 368-375.
- Mullen M.D., Wolf D.C., Ferris F.G., Beveridge T.J., Flemming C.A. y Bailey G. W. (1989). Bacterial sorption of heavy metals. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 3143-3149.
- Olguin-Lora P., Puig-Grajales L. y Razo-Flores E. (2003). Inhibition of the acetoclastic methanogenic activity by phenol and alkyl phenols. *Environ. Technol.* 24, 999-1006.
- Pantano C.G. y Kelso J. C., (1984). Chemical analysis of fracture surface, fractography of ceramic and metal failures, ASTM STP 827, J.J. Mecholsky, Jr., and S.R. Powell, Jr., Eds., American Society for Testong and Materials. 139-156.
- Peña Castro J.M., Martínez Jerónimo F., Esparza García F. y Cañizares Villanueva R.O. (2004). Heavy metals removal by the microalgae *Scenedesmus incrassatulus* in continuos cultures. *Bioresource Technol.* 94, 219-222.

- Reyes E. D., Cerino C. F. y Suárez H. M. A. (2006). Remoción de metales pesados con carbón activado como soporte de biomasa. Ingeniería Química. Facultad de Ciencias Químicas, UANL. Ingenierías, Abril-Junio. IX, 59-64.
- Vieira R. H. y Volesky B. (2000) Biosorption: a solution to pollution?. Internatl. Microbiol. 3, 17-24
- Visser A: (1995). The anaerobic treatment of sulfate containing wastewater. Ph. D. Thesis. Wageningen Agricultural University, Wageningen, Holanda.
- Volesky, B. (2004). *Biosorption of heavy metals*. CRC Press, Boca Raton, Florida. 408.
- Wang J. (2002). Biosorption of copper(II) by chemically modified biomass of *Saccharomyces cerevisiae*. Process Bioch. 37, 847-850.
- Wang J. y Chen C. (2006). Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. Biotechnology Adv. 24, 427-451.

CUADRO I. Características del lodo anaerobio.

<i>Parámetro</i>	<i>Cantidad</i>
Sólido totales (ST)	60.57 g/L
Sólidos suspendidos volátiles (SSV)	30.95 g/L
Sólidos fijos (SF)	29.6 g/L
Índice volumétrico de lodo (IVL)	43 mL _{lodo} /gSSV
Velocidad de sedimentación	12.93 mL _{lodo} /s

FIGURAS

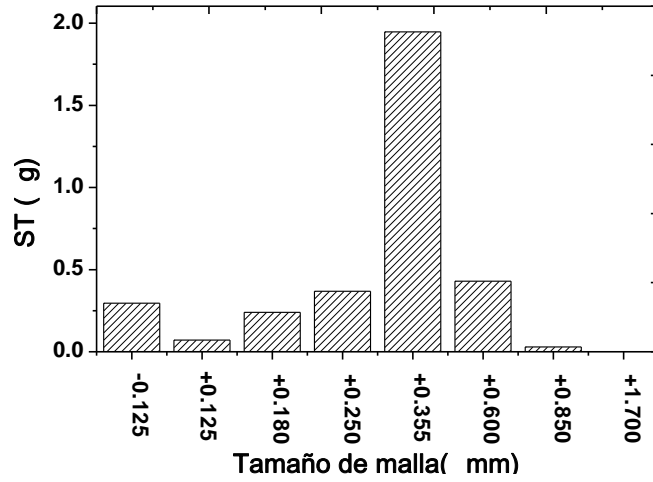


Fig. 1. Distribución de tamaño de partícula del lodo anaerobio acidogénico.

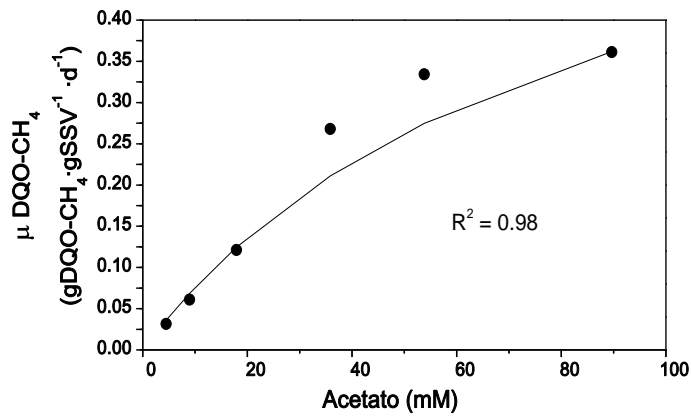


Fig. 2. Gráfica de AME contra concentración de acetato.

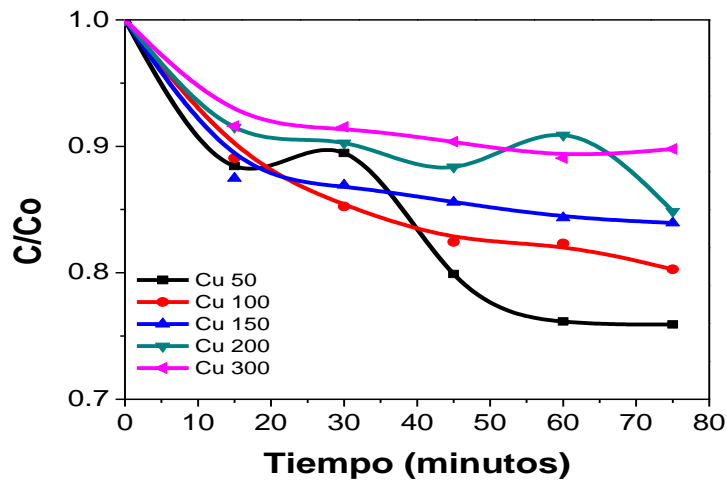


Fig. 3. Cinética de biosorción de cobre utilizando lodo anaerobio viable.

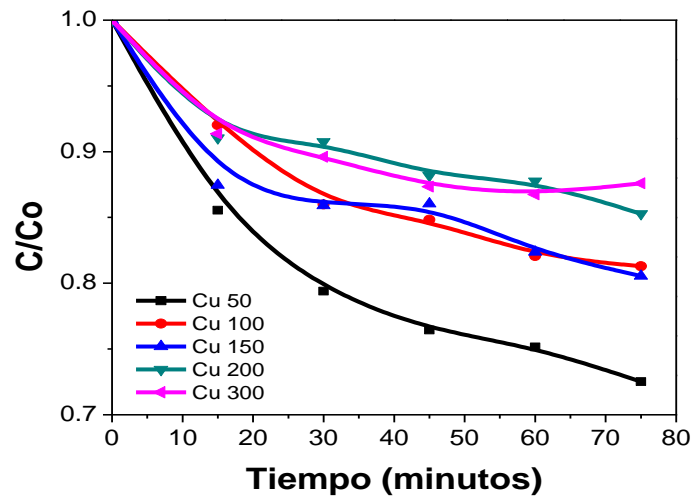


Fig. 4. Cinética de biosorción de cobre utilizando lodo anaerobio no viable.

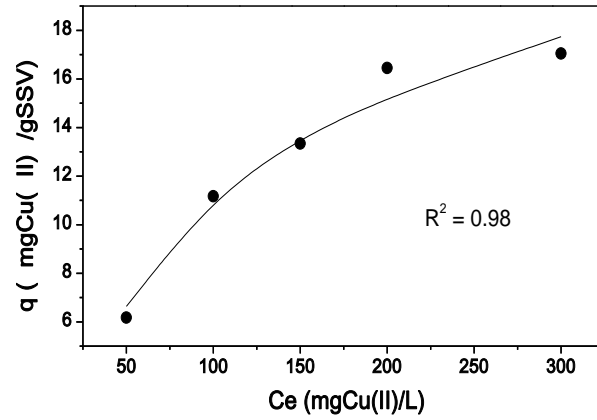


Fig. 5. Isotherma de biosorción de cobre en lodo anaerobio viable. (●) Datos experimentales y (—) ajuste al modelo de Langmuir.

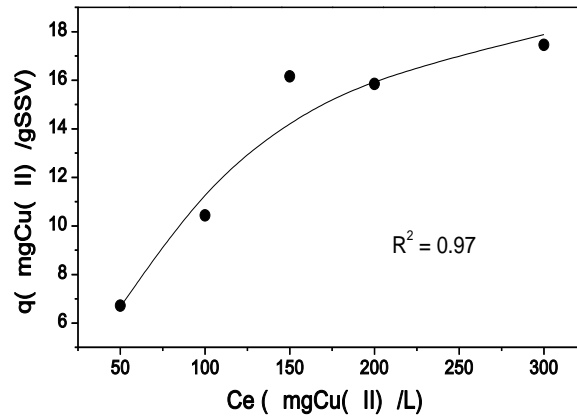


Fig. 6. Isotherma de biosorción de cobre en lodo anaerobio no-viable. (●) Datos experimentales y (—) ajuste al modelo de Langmuir.

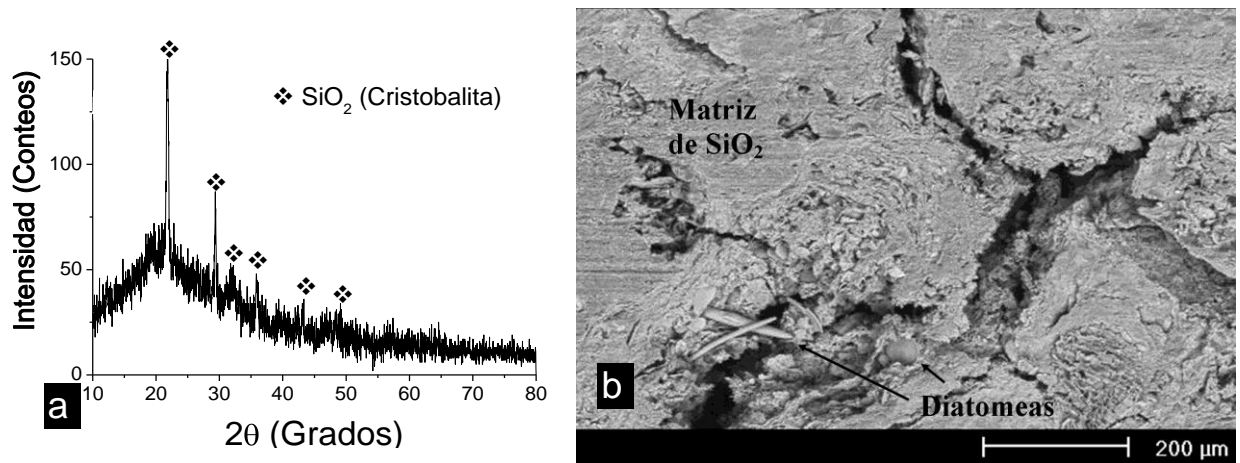


Fig. 7. a) Patrón de DRX y b) Fotomicrografía de MEB correspondientes a los lodos

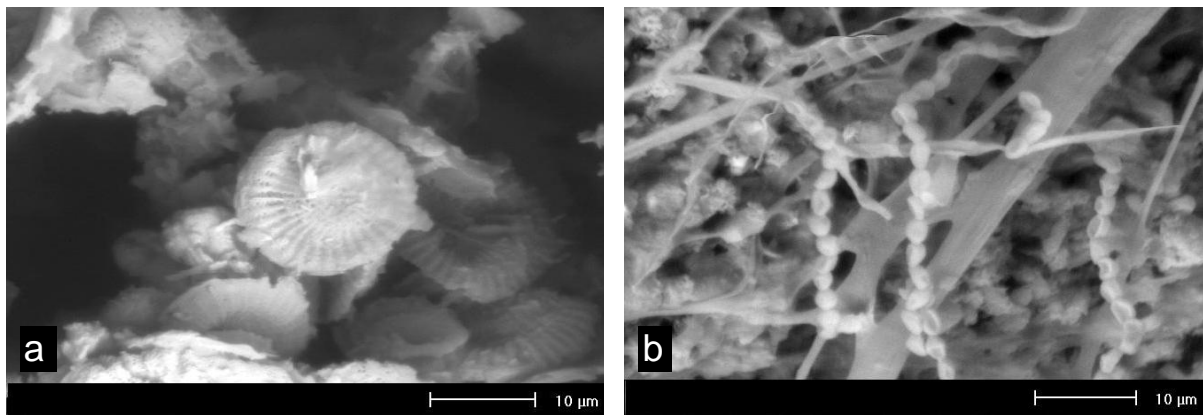


Fig. 8. Fotomicrografías de MEB correspondiente a los microorganismos presentes en los lodos: a) diatomeas y b) biopelícula (bacterias y exopolímero).

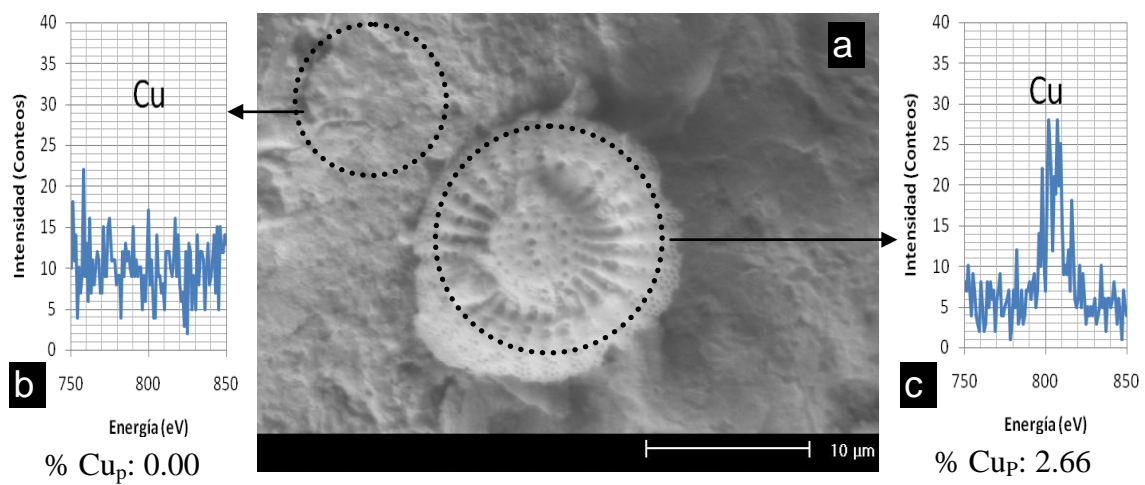


Fig. 9.a) Fotomicrografía de MEB con sus respectivos espectros representativos de EDS correspondientes al análisis cualitativo puntual sobre b) la matriz de los lodos y c) las diatomeas. P = promedio.

ANEXO C

ARTICULO ENVIADO PARA SU REVISIÓN A:

**MINERAL PROCESSING &
EXTRACTIVE METALLURGY REVIEW**

Dear Maria:

Thank you very much for your manuscript. I am traveling and we will get back to you. Thank you very much for your interest in the MP&EMR Journal.

Komar

----- Original Message -----

From: "MTCERTUCHA" <certucha@correom.uson.mx>

To: skkawatr@mtu.edu

Sent: Friday, June 12, 2009 7:15:41 PM GMT -05:00 US/Canada Eastern

Subject: Paper submission

S. Komar Kawatra

Editor-in-Chief

Mineral Processing & Extractive Metallurgy Review
Chemical Engineering Department, Michigan Technological University
1400 Townsend Drive, Houghton, Michigan 49931 USA
Fax: 906-487-3213
E-mail: skkawatr@mtu.edu

Subject : Paper submission to be considered for publication in the Mineral Processing & Extractive Metallurgy Review

Dear S. Komar Kawatra

As an attachment, please find the manuscript entitled:

“ Iron Influence on Copper Biosorption using Anaerobic Sludge and its Microstructural Characterization”

By

M. T. Certucha-Barragán 1,2 , E. Acedo-Félix 3 , F.J. Almendariz-Tapia, O. Monge Amaya 1, A. L. Leal-Cruz 1 , R. Pérez-Moreno 3 , and J. L. Valenzuela-García 1

Attached to this letter, please find the following files: version of the manuscript, figures, and captions list.

Yours sincerely,

María Teresa Certucha-Barragán

Corresponding Author

mtcertucha@iq.uson.mx , terecertucha_@hotmail.com

+52 (662) 259-2105

-- S. Komar Kawatra

Professor, Chemical Engineering

Michigan Technological University

1400 Townsend Drive, Houghton, MI 49931. U. S. A.

E skkawatr@mtu.edu, T 1-906-487-3132 F 1-906-487-3213

http://www.admin.mtu.edu/urel/news/media_relations/17/

www.chem.mtu.edu/asisc

Iron Influence on Copper Biosorption using Anaerobic Sludge and its Microstructural Characterization

M. T. Certucha-Barragán^{1,2}, E. Acedo-Félix³, F.J. Almendariz-Tapia, O. Monge Amaya¹, A. L. Leal-Cruz¹, R. Pérez-Moreno³, and J. L. Valenzuela-García¹

¹ Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia, Universidad de Sonora, Rosales y Boulevard Luis Encinas s/n, Hermosillo, Sonora, México. ² Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California, México. ³ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Carr. La Victoria Km 0.5, Hermosillo, Sonora, México.

ABSTRACT

Copper biosorption mechanism, iron influence on the bioremoval, methane production and sludge characterization was studied in a batch system using anaerobic sludge. DRX, MEB, EDS techniques were used for the sludge characterization. Fe (III) has effect on copper biosorption. At neutral pH and concentrations from 50-300 mg/L, copper biosorption increase. However, at concentrations >300 mg/L a depletion is observed. During biosorption, Fe (III) does not have an effect on both methane production and methanogenic activity. EDS analysis reveals the copper presence into diatoms (2.66 w%). In addition, copper is biosorted by diatoms-bacteria-polimeric matrix, and also, it is bioacummulated into diatoms.

INTRODUCTION

Water is an important resource, vital for both social and economic growth. It is thus imperative that water is managed according to the principles of sustainable development to counteract the combination of increasing economic development and environmental degradation. The constantly increasing degree of industrialization and urbanization, rising standards of living, increasing population growth and agricultural activities are strongly impacting on the use of available water sources and on the quality of water that is found therein. This exhaustive use of limited resources and energy by modern society implies a need for changes in present and future urban water and wastewater treatment systems. According to convention, the majority of current metal removal and recovery technologies are physical or chemical in nature, and there are a number of strategies available, including cementation, solvent extraction, evaporation, ion exchange, chemical precipitation and membrane processing. However, biological technologies are gaining in popularity as they are increasingly being proved to be as effective as physical methods while operating at substantially lower costs (Mack, et al. 2004). Those characteristics allow the application of this method on the treatment of acid mine drainage, one of the main problems associated with mining activities. The increase in heavy metal solubility results in the accumulation of these toxic elements in the environment. In consequence, the sites become inhospitable and just those microorganisms able to tolerate the acidity and the high concentration of heavy metals can survive. Thus, the bioremediation processes of natural selected organisms represent an important strategy in order to remove heavy metals, such

as, copper and iron (Castro-Silva, et al. 2003). Removal of metal ions from wastewater in all biological systems includes two important phenomena: bioadsorption and bioaccumulation. These phenomena can occur in both plant and microbial species. Bioaccumulation is an active process, whereby the biomass transports the metal ions into the cells where the metal is then sequestered. The disadvantage of this process is that the concentration of the metal may reach a level that is toxic to the organism, and kill it. Bioadsorption is a passive process in which the metal adsorbs to functional groups on the outer surface of the biomass. This process can occur on both living and dead biomass and thus, the only limiting factor is the availability of binding sites onto which the metal can adsorbed (Volesky, 2004). One of the most important heavy metals related with the mining process is copper (Cu). This metal is an essential element for human health since low concentrations play an important role in enzyme-mediated systems. However, high levels of copper are non-degradable and can accumulate in living tissues. Therefore, excessive copper (Cu^{2+}) in water should be removed to a permitted level of less than 1 mg/L that makes the water safe and suitable for drinking purposes. On the other hand, several studies have shown that methane production is severely inhibited under iron reducing condition during bioremoval. This phenomenon is often explained by competition between Fe (III)-reducing and methanogenic microorganism for common substrates such as acetate and hydrogen. However, other studies show that substrate competition cannot completely explain that strong inhibition of methanogenesis during Fe (III)-reducing (van Bodegom, et al. 2004). A number of copper and iron reducing bacteria have been studied, these include *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina* and

Desulfonema that specialize in the oxidation of fatty acids, particularly acetate (Madigan et al. 2003). The study of the microbiological structure and composition of complex ecosystems such as soil and sediments is important for a better understanding of bacterial community physiology, for the development of new approaches in bioremediation and recycling, and for discovering new biotechnology applications. In order to determine the mechanism of copper biosorption, the iron influence on the bioremoval, methane production and sludge characterization, a systematic study in the batch system was carried out using an anaerobic sludge and techniques such as DRX, MEB and EDS were used for the sludge characterization.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Conditions for Copper Removal and Iron Influence Study

To determine methane production, removal tests were carried out by duplicate in serum bottles (250 mL), with a volume of operation of 175 mL. Each serum bottles were seeded with 2.0 gVSS/L of anaerobic sludge and fed with acetate of sodium to a concentration of 2.0 g COD/L. The serum bottles were incubated for 24 h at 35° C for the adaptation of the sludge to the medium conditions. On the following day, the headspace was again fed with acetate of sodium. The measured methane volume was for displacement of a solution of NaOH (3.0%) (Castilla 2006). For the kinetic toxicity of copper, after 24 h of incubation, the ion was added like Cu (II), and Fe (III). Copper concentration was considered as a constant parameter (50 mg/L), and iron concentration was varied as follow 50, 100, 150, 300, and 600

Fe(III) mg/L. Metal exposition was during 72 h, later, they were replenished with acetate (1.0 g COD/L). Methane production was measured like before and COD consumption by the APHA method (1995). The mineral medium consisted (in mg/L) of NH_4Cl : 522, KH_2PO_4 : 376, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 194, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 5, yeast extract: 20, NaHCO_3 2000 and the trace elements solution, in 1 mL/L (pH 7.0). Analytical methods: Volatile suspended solids (VSS) were measured gravimetrically, the chemical demand of oxygen (COD) according to the standard methods (APHA 1995), and the copper concentration by spectrometry atomic absorption (Perkin Elmer 3100).

Chemical and Microstructural Characterization of Sludge

After the copper removal and iron influence tests, the specimens were removed from the batch reactor for chemical and microstructural characterization by X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM), and energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS). The XRD analysis was performed using a Philips XRD equipment (Cu $\text{K}\alpha$ radiation, anode excitation of 40 kV, and current of 30 mA). For the analysis by XRD, sludge samples were previously prepared by drying at room temperature, and subsequently, finely grinding (500 mesh) in an agate mortar. Afterward, they were placed on the sample hole for XRD scanning at a step size of 0.02° , and a rate/count time of 1° per minute, from 15° to 80° . The microstructural characterization of sludge was carried out in environmental conditions, at an acceleration voltage of 30 kVe, in a Philips SEM equipment provided with a FalconTM EDS device. Previous to the SEM analysis, the samples were coated with

gold to improve the image quality. To evaluate the influence of iron on the copper biosorption, copper and iron were quantified by EDS.

RESULTS AND DISCUSSION

Iron Influence on Cu Removal

Figure 1 shows the results of EDS for the effect of Fe (III) on the biosorption of Cu. These results reveal that at neutral pH, the biosorption of copper increase at concentrations from 50 to 300 mg/L. However, at concentrations up to 300 mg/L a depletion is observed, this can explained by the transition of Fe (III) to Fe (II) and the formation others toxic compounds for the bacteria consortium, where ferric iron-reducing bacteria play an important role and the increase in the concentration of Fe-ions. The redox change between Fe (II) and Fe (III) are especially important in redox processes in anoxic soils and sediments. Fe (II), ferrous iron, forms minerals such as siderite (FeCO_3), vivianite [$\text{Fe}(\text{PO}_4)_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_8$] or iron sulfide (FeS) only in anoxic habitats under weakly acidic to neutral conditions. The formation of these minerals can be occurred under experimental conditions because, the medium used contains carbonates, phosphates and sulfates. In addition, under the presence of oxygen, ferrous iron is stable only under acidic conditions. However, at neutral pH it is rapidly oxidized to Fe (III). Ferric iron forms minerals that are widespread in both oxic and anoxic habitats (Straub 2001).

Iron Influence on Methanogenic Activity

In previous researches by other authors, it was reported that an inhibition of the production of methane is present under iron reducing conditions in systems containing pure culture (van Bodegom, et al. 2004), owing to an acompetition

between the Fe(III) and the methanogenic microorganisms for common substrates such as acetate and hydrogen. In this investigation an anaerobic microbial community was used to evaluate the effect of Fe (III) on the methane production and the methanogenic activity during the biosorption of Cu. According to these results, it can be observed that the iron does not have an effect on both the production of methane and on methanogenic activity, as Figure 2 and 3 illustrate, respectively. This behavior can be associated to the anaerobic microbial community used in this research, which allows a synergy between microorganisms in this community, diminishing the competition for the common substrate, owing to other carbon sources can be available and ferric iron-reducing bacteria can be present modifying the system, and consequently, an insignificant effect of Fe (III) on the methane production and the methanogenic activity.

Chemical and Microstructural Characterization of Anaerobic Sludge by XRD, SEM and EDS .

Figures 4a y 4b show XRD and SEM characterization of the sludge after bioremoval tests. XRD results reveal that anaerobic sludge is constituted by both amorphous and crystalline phases. The representative XRD pattern corresponding to anaerobic sludge after bioremoval tests present a typical hump attributed to amorphous materials. Additionally, it is evident the presence of some reflexions corresponding to silica (SiO_2) as cristobalite mineral phase, as it can be observed in the Figure 4a. Cristobalite is attributed to the matrix of sludge and amorphous silica to the diatoms present into silica matrix as show in the Figure 4b.

Figures 5a y 5b show the typical morphology of microorganisms present in the sludge and the exopolimeric material asociatted with the biofilm formation.

Figure 6 show the SEM photomicrograph corresponding to the sludge (b) and representative EDS spectra for the analysis of sludge matrix (a) and diatoms (c).

SEM and EDS results show that copper is not present into the matrix but it into diatoms, and on the biofilm. The qualitative and quantitative analysis of copper by EDS reveal that the amount of copper on the diatoms is 2.66 w %, and this can be asociatted to biosorption of copper by the consorptium of diatoms-bacteria-polimeric matrix. Because of that, it can establish that copper is bioacummulated into diatoms, since characteristic X rays using for the EDS analysis are generated when the beam of electrons penetrate within the sample at 300-1000 nm (0.3-1 μ m) (Pantano and Kelso 1984).

CONCLUSIONS

Iron (III) has an effect on the biosorption of Cu. At neutral pH and concentrations from 50 to 300 mg/L, the capacity of copper biosorption increase. However, at concentrations up to 300 mg/L a depletion is observed, this change is asociated with both the transition of Fe (III) to Fe (II) and the formation others toxic compounds for the bacteria consortium, where ferric iron-reducing bacteria play an important role and the increase in the concentration of Fe-ions. In addition, Fe(III) does not have an effect on both the production of methane and on metahnogenic

activity. The amount of copper on the diatoms is 2.66 w %. This can be associated to biosorption of copper by the consortium of bacteria-polymeric matrix. In addition, copper also is bioaccumulated into diatoms.

REFERENCES

APHA. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 1995, Washington DC, USA: American Public Health Association/American Water Works Association/Water Environment Federation.

Castilla Hernández P., 2006, Tesis de Doctorado: Biodegradación Anaerobia de Compuestos Petroquímicos., Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México, D.F.

Castro-Silva, M. A., Oliveira de Souza Lima, A., Gerchenski, A. V., Batista Jaques, D., Rodrigues, A. L., Lima de Souza, P. and Rubi Rörig, L., 2003, "Heavy metal resistance of microorganisms isolated from coal mining environments of Santa Catarina", *Brazilian Journal of Microbiology*, 34-1, pp. 45-47.

Mack C., Burgess J.E. and Duncan J.R., 2004, "Membrane bioreactors for metal recovery from wastewater: A review", *Water SA*, 30, pp. 521-532.

Madigan, M.T., Martinko, J y Parker, J., 2003, *BROCK Biología de los Microorganismos. (Biology of Microorganisms)*, Madrid, Pearson Educación.

Pantano C.G. and Kelso J. C., 1984, *Chemical Analysis of Fracture Surface, Fractography of Ceramic and Metal Failures*, West Conshohocken, PA, USA, American Society for Testing and Materials (ASTM).

Straub, K. L., Benz, M., and Schink, B., 2001, “ Iron metabolism in anoxic environments at near neutral pH”, *FEMS Microbiology Ecology*, 34- 3, pp. 181-186

van Bodegom, P. M., Scholten, J. C. M., Stams, A. J. M., 2004, “Direct inhibition of methanogenesis by ferric iron, *FEMS Microbiology Ecology*, **49-2**, pp. **261 – 268**.

Volesky, B., 2004, *“Biosorption of Heavy Metals”*, Florida, CRC Press.

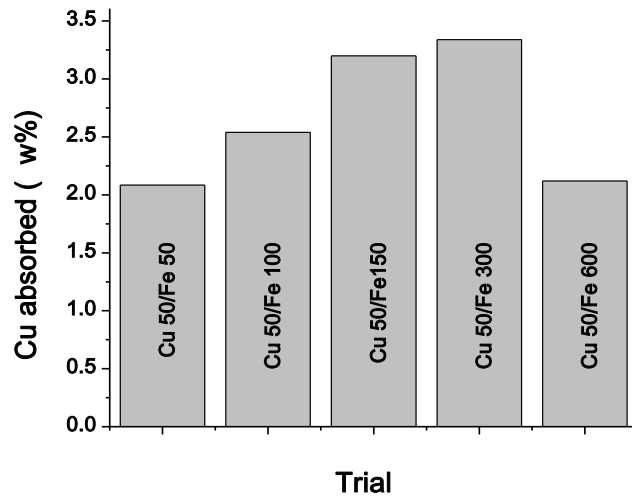


Figure 1

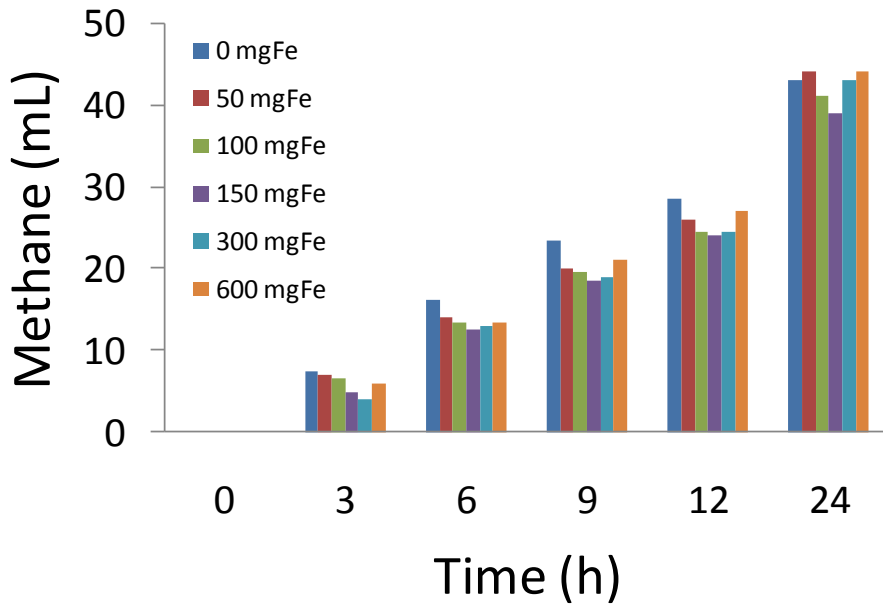


Figure 2

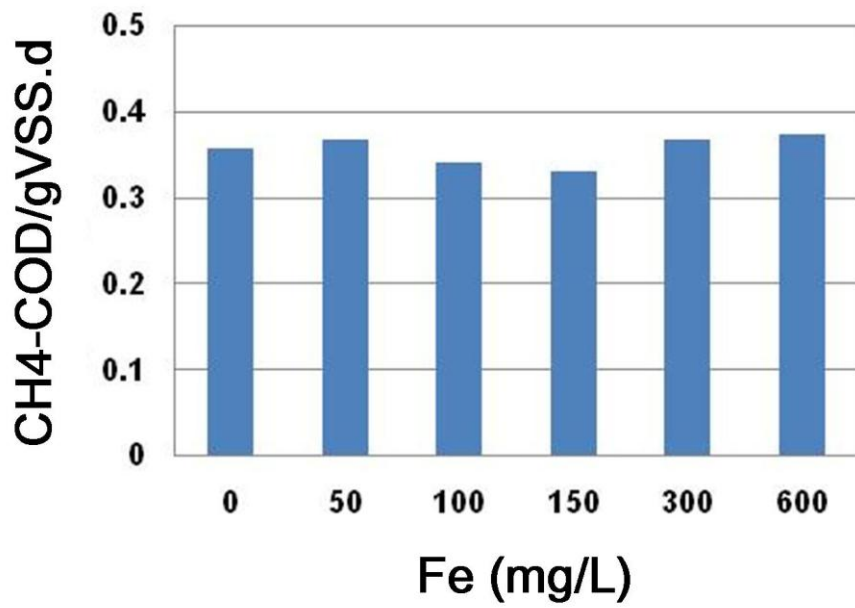


Figure 3

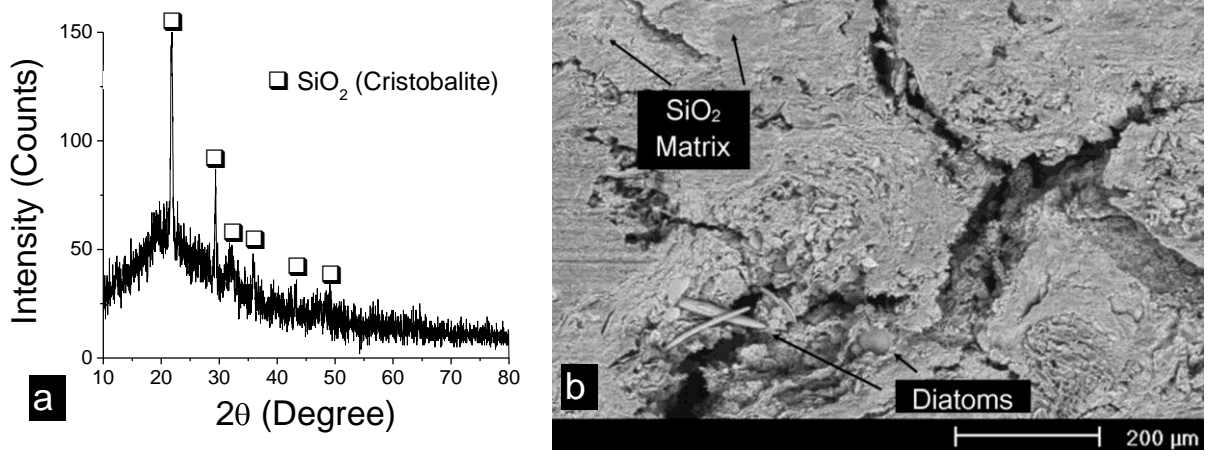


Figure 4

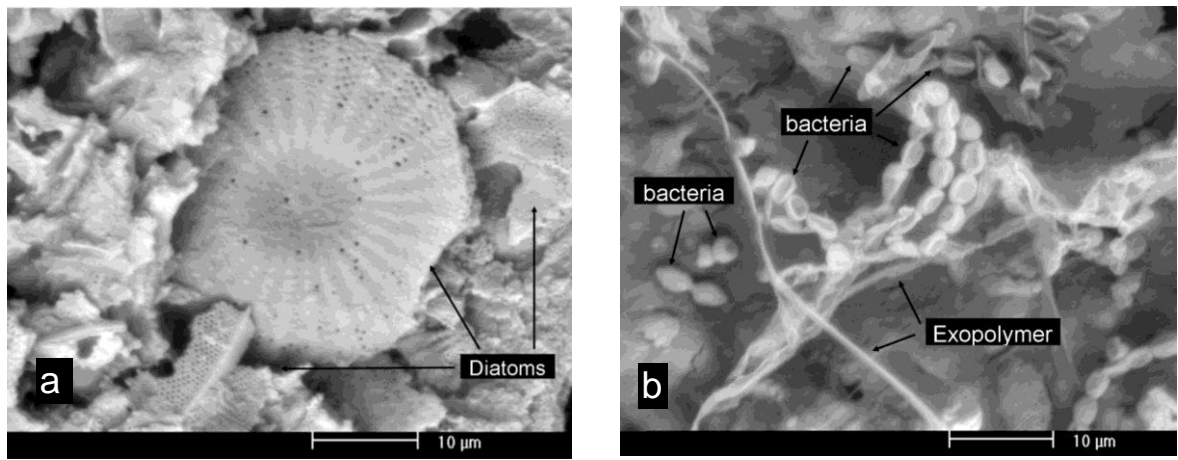


Figure 5

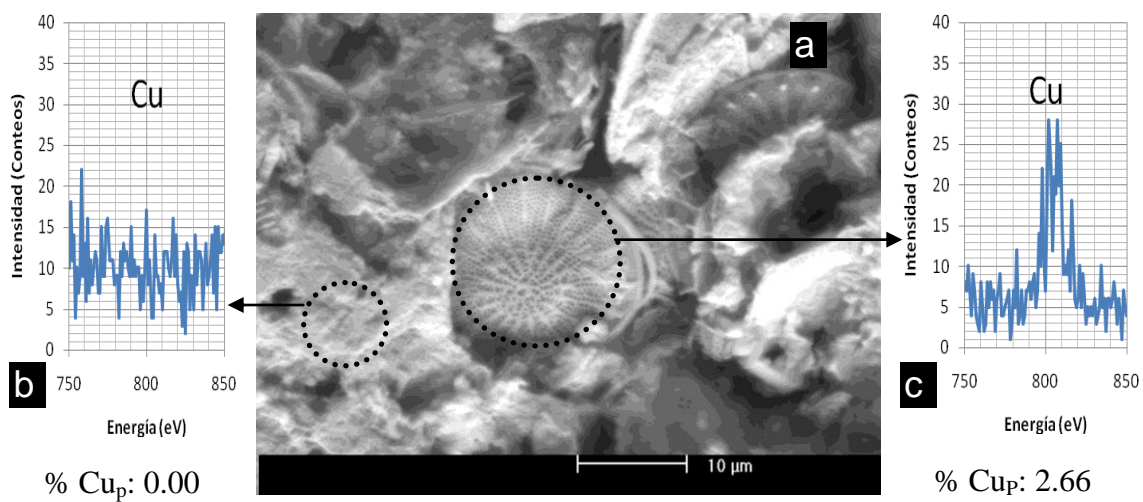


Figure 6

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Influence of Fe (III) during biosorption of Cu.

Figure 2. Influence of Fe (III) on the production of methane during biosorption of Cu.

Figure 3. Influence of Fe (III) on the methanogenic activity.

Figure 4. XRD pattern (a) and SEM photomicrograph (b) corresponding to anaerobic sludge after bioremoval tests.

Figure 5. SEM Photomicrographs corresponding to microorganisms present in the sludge: a) diatoms and b) biofilm and bacteria.

Figure 6. SEM photomicrograph of the sludge (b) and representative EDS spectra for the sludge matrix (a) and diatoms (c). *Note: p is the average values of copper determined in the matrix or diatoms by EDS.

ANEXO D

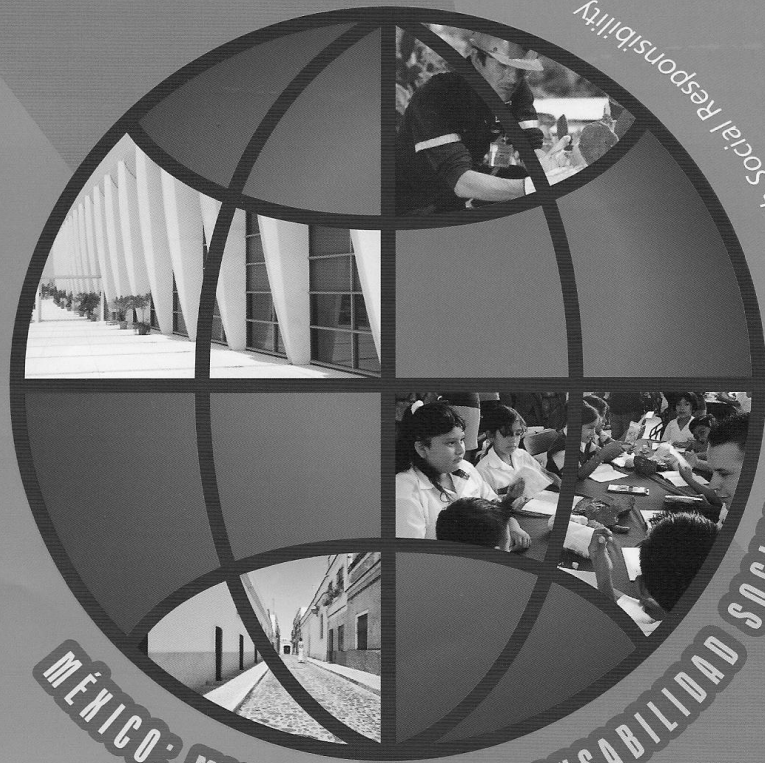
ARTICULO ENVIADO PARA PRESENTACIÓN EN LA:

XXVIII CONVENCIÓN INTERNACIONAL DE MINERÍA

XXXVIII Convención Internacional de Minería

XXVIII International Mining Congress and Exhibit

XXVIII International Mining Congress and Exhibit



MEXICO: MINERÍA CON RESPONSABILIDAD SOCIAL

MEXICO: Mining with Social Responsibility

Primera Circular / First Call

World Trade Center, Veracruz, México. 28 al 31 de octubre de 2009

World Trade Center, Veracruz, Mexico. October 28th to 31st, 2009



DIVERSIDAD MICROBIANA DE LODOS ANAEROBIOS METANOGÉNICOS USANDO DGGE

M. T. Certucha-Barragán^{1,2}, E. Acedo-Félix³, R. Pérez-Morales³

¹ Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia, Universidad de Sonora, Rosales y Boulevard Luis Encinas s/n, Hermosillo, Sonora, México. ² Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, Baja California, México. ³ Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Carr. La Victoria Km 0.5, Hermosillo, Sonora, México.

RESUMEN

Se realizó un estudio de la diversidad microbiana mediante DGGE, en lodos anaerobios metanogénicos alimentados con soluciones sintéticas de Cu y Fe. Se encontró que la técnica utilizada, fue útil en la separación de los diferentes microorganismos y se pudieron identificar a nivel de género. La población microbiana de los lodos estuvo formada dentro de los dominios de Bacterias y de Archeas, predominando las primeras. Se identificaron bacterias metanogénicas, enterobacteraceas, pseudomonales, bacterias reductoras de hierro y otras clases que han sido involucradas en la reducción de Cu y Fe. Se puede concluir que los lodos metanogénicos se pueden emplear como una alternativa para la remoción de Cu de diferentes ambientes contaminados.

INTRODUCCIÓN

El estudio de la estructura microbiológica y la composición de los ecosistemas complejos, tales como: suelo y sedimentos, es importante para entender mejor la fisiología de la comunidad bacteriana presente en ellos y desarrollar nuevas aplicaciones en reciclaje, biotecnología y biorremediación (Rojas, 2008). En esta última se pueden emplear diversos microorganismos tal como los metanotrófos, los cuales

han atraído el interés de los microbiólogos, debido a su potencial para ser usados en biorremediación, a la importancia que tienen en el ciclo del metano, y a que se encuentran ampliamente distribuidos en hábitats naturales. El cultivo por métodos tradicionales de metanótrofos, está limitado debido a que muchos de éstos son difíciles de cultivar. Actualmente se sabe que es posible estudiar la diversidad microbiana no cultivable o de difícil cultivo, por medio de técnicas moleculares (Tani *et al.*, 2001; Díaz *et al.*, 2006). La extracción de ADN (ácido desoxirribonucleico) bacteriano a partir de ambientes naturales mediante técnicas de biología molecular, se ha convertido en una herramienta útil para la detección de bacterias que no pueden ser cultivadas, revelar la diversidad genética y su cambio en ecosistemas microbianos (Zhou, 1996).

Se ha estimado que aproximadamente el 99% o más de los microorganismos aún no han sido identificados, debido a la dificultad de obtenerlos como cultivos puros y bajo condiciones de laboratorio (Park *et al.*, 2005). Sin embargo, para el estudio de las poblaciones microbianas, se han desarrollado diferentes técnicas de biología molecular (Myzer *et al.*, 1993; Rojas-Herrera *et al.*, 2008). Existen diferentes métodos para extraer el ADN de suelo y sedimentos, todos varían en el proceso de preparación de la muestra y remoción de los contaminantes que afectan la calidad de ADN extraído. Durante la extracción del ADN puede ocurrir la coextracción de sustancias húmicas que interfieren en la detección y medición del ADN, este contaminante inhibe a la *Taq* ADN polimerasa en el PCR (reacción en cadena de la polimerasa) e interfiere en la digestión del ADN restricción por las enzimas de restricción, reduciendo la eficiencia de varias técnicas de análisis del ADN (Zhou, 1996; Fang, 2002; Escalante-Lozada *et al.*, 2004; Rojas-Herrera *et al.*, 2008). Debido a que las sustancias húmicas son

difíciles de remover, la purificación del ADN es una etapa crítica seguida de la extracción directa para obtener un ADN con pureza apropiada para ser caracterizado mediante análisis genómico. En esta investigación se tiene como objetivo recuperar el ADN bacteriano de lodos anaerobios metanogénicos provenientes de diferentes fuentes e identificar la diversidad microbiana presentes en los mismos, mediante la técnica de electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE, por sus siglas en inglés).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de lodo. Para la caracterización microbiológica, se tomaron muestras de diferentes fuentes, en la Tabla 1 se presenta la descripción de las muestras.

Tabla 1. Descripción de las muestras analizadas.

IDENTIFICACIÓN	DESCRIPCIÓN
1	Lodos del río San Pedro
2	Lodo con 20 mg de cobre
3	Efluente del reactor con 50 mg de cobre tiempo cero
4	Efluente del reactor con 50 mg de cobre a los 4 días
5	Sólido cinética 50 mg de cobre
6	Sólido cinética 100 mg de cobre y 150 mg de hierro
7	Sólido cinética 200 mg de cobre y 150 mg de hierro
8	Lodo del reactor después del lavado con 50 mg de cobre

Extracción de ADN. La extracción de ADN, se realizó mediante la técnica descrita por Rojas-Herrera et al. (2008), modificando el número de lavados del ADN por 7 ó 10 ocasiones, hasta que estuvo limpio. Para probar la eficacia del ADN, se realizó un PCR del ADNr 16S, con los iniciadores universales 27F y 1492R (Tabla 2).

Amplificación por PCR y DGGE. La amplificación del ADNr, se realizó con los primers (Tabla 2), las condiciones de amplificación y la electroforesis del ADN amplificado, de

acuerdo a las recomendaciones de Mayzurier et al. (2003) y Rojas-Herrera et al. (2008).

Purificación de las bandas de ADNr. Una vez realizado la electroforesis, se seleccionaron las bandas de ADN, se amplificaron nuevamente con los primers 357F y 518R, pero sin la grapa del primer utilizado para el primer PCR (357F-GC). La pureza de los fragmentos de aproximadamente 180 pb, se cortaron del gel y se purificaron con una columna (Qiagen, Qiaquick purification Kit) y se enviaron a secuenciar.

Análisis de las secuencias. La identificación de las secuencias se realizó en la base de datos RDP (Ribosomal Database Project), utilizando las herramientas desarrolladas por Cole et al. (2008), para la búsqueda de la identidad de las secuencias.

Tabla 2. Secuencias de los primers y de la grapa utilizada para la amplificación de los fragmentos de ADNr 16S, de los dominios Archea y Bacteria.

Primer	Secuencia	Autor
27F 1492R	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG TACGGYTACCTTGTTACGACTT	Lane, 1991
F357GC	CGC CCG CCG CGC GGC GGG CGG GGC GGG GGC ACG GGG CCT ACG GGA GGC AGC AG	Mayzurier, 2003
F357	CCT ACG GGA GGC AGC AG	Mayzurier, 2003
R518	ATT ACC GCG GCT GCT GG	Mayzurier, 2003

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron los ADN metagenómicos de las muestras de lodo y efluentes del bioreactor anaerobio, de los cuales se observa ejemplos en la Figura 1A. A pesar de que no estaban completamente puras, se logró amplificar tanto el fragmento de 1500 pb (datos no mostrados), como el de 180 pb, que se observan en la Figura 1B.

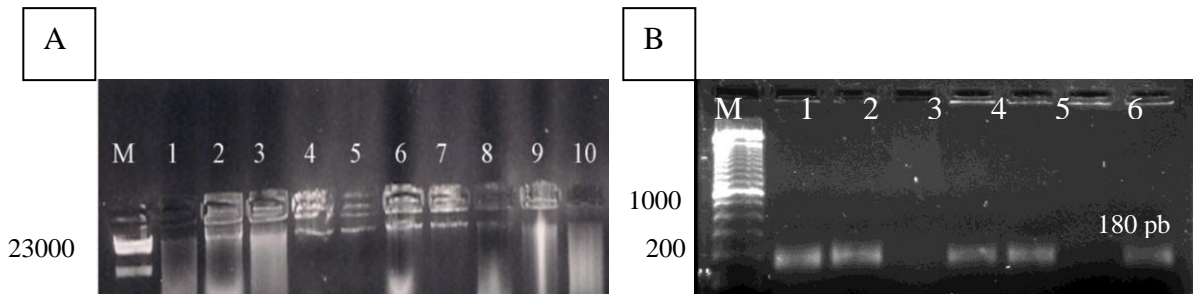


Figura1. A. Electroforesis del ADN metagenómico de las muestras analizadas (pocillos de 1 al 10); M, marcador de peso molecular $\lambda_{HindIII}$. B. Electroforesis de las bandas de aproximadamente 180 pb, amplificadas por PCR (1-7); Marcador de peso molecular para PCR 100pb (Promega).

En la Figura 2 se muestra el patrón de bandas de la electroforesis utilizando DGGE, después de la amplificación por PCR con los primers F357GC y R518. Se obtuvieron 37 fragmentos de ADN, mismos que fueron enviados a secuencias, sin embargo, 7 de ellos no pudieron ser analizados, ya que la secuencias aparentemente correspondían a más de 1 bacteria y no fue posible separar por la técnica utilizada, a pesar de las repeticiones de la electroforesis y la pureza aparente de las bandas obtenidas, como se observa en la Figura 3. De los 30 fragmentos analizados, se identificaron 9 de ellas pertenecientes al dominio Archea y 21 al dominio Bacteria. En la Tabla 3, se muestra la identidad de cada una de las bandas, de acuerdo al RDP, ésta identidad se obtuvo con un 95% de confiabilidad.

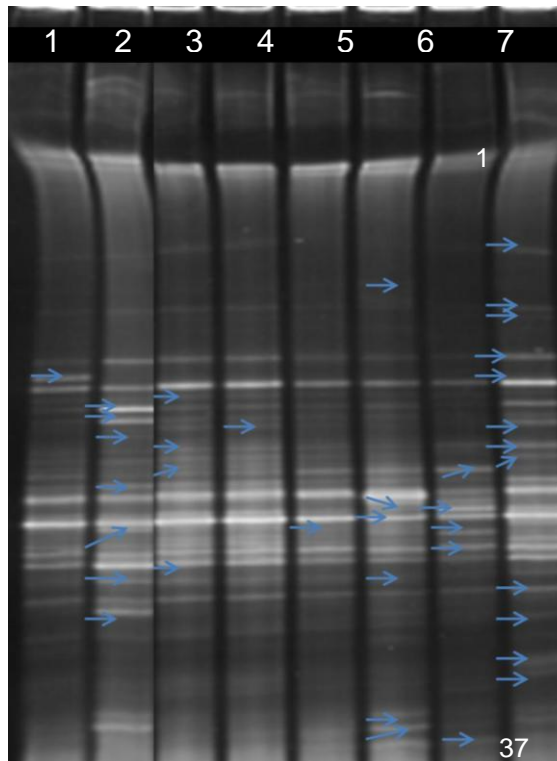


Figura 2. Electroforesis con gradiente desnaturalizante (DGGE), de la amplificación de los fragmentos obtenidos en las muestras analizadas. Las bandas señalizadas con flechas, fueron las que se recortaron para amplificar y enviar a secuenciar. La numeración se hizo en orden descendente.

Tabla 3. Identidad de los fragmentos de ADN obtenidos por DGGE.

Fragmento	Dominio	Familia	Género
2	Bacteria	Flavobacteriaceae	<i>Lutibacter</i>
4	Archea	Methanocaldococcaceae	<i>Methanocaldococcus</i>
5	Bacteria	Nautiliaceae	<i>Nautilia</i>
6	Bacteria	Cryomorphaceae	<i>Fluviicola</i>
7	Archaea	Methanobacteriaceae	<i>Methanosphaera</i>
8	Archaea	Pyrodictiaceae	<i>Pyrolobus</i>
9	Bacteria	Veillonellaceae	<i>Anaerosinus</i>
10	Bacteria	Enterobacteriaceae	<i>Samsonia</i>
11	Bacteria	Chromatiaceae	<i>Thiococcus</i>
12	Bacteria	Nitrospinaceae	<i>Nitrospina</i>
14	Bacteria	Rhodocyclaceae	<i>Sterolibacterium</i>
15	Bacteria	Flexibacteraceae	<i>Leadbetterella</i>
16	Archaea	Desulfurococcaceae	<i>Sulfophobococcus</i>
17	Bacteria	Deferribacteraceae	<i>Denitrovibrio</i>
18	Archaea	Halobacteriaceae	<i>Natronobacterium</i>
19	Archaea	Halobacteriaceae	<i>Halorhabdus</i>
21	Bacteria	Flexibacteraceae	<i>Fabibacter</i>
22	Bacteria	Moraxellaceae	<i>Acinetobacter</i>
23	Bacteria	Neisseriaceae	<i>Formivibrio</i>
24	Bacteria	Aurantimonadaceae	<i>Martelella</i>
26	Bacteria	Moraxellaceae	<i>Alkanindiges</i>
27	Archaea	Halobacteriaceae	<i>Halalkalicoccus</i>
29	Bacteria	Enterobacteriaceae	<i>Thorsellia</i>
34	Bacteria	Incertae Sedis XI	<i>Finegoldia</i>
35	Bacteria	Flexibacteraceae	<i>Leadbetterella</i>
36	Bacteria	Verrucomicrobiaceae	<i>Akkermansia</i>
37	Bacteria	Flavobacteriaceae	<i>Donghaeana</i>
38	Bacteria	Caldilineales	<i>Levilinea</i>
39	Bacteria	Caldilineales	<i>Leptolinea</i>
40	Bacteria	Actinomycetales	<i>Micrococcineae</i>

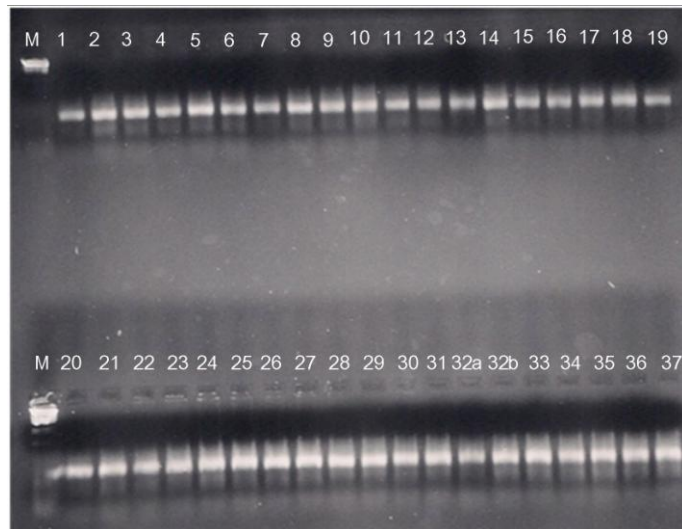


Figura 3. Fotografía de los productos de amplificación (PCR) de las 37 bandas de ADN separadas por DGGE y que fueron enviadas a secuenciar.

El uso del ADN_r 16S como marcador molecular para identificar la población microbiana es una técnica de rutina empleada en la Ecología microbiana, a partir de muestras de diferentes ambientes para explorar la diversidad de comunidades microbiológicas, sin la necesidad de cultivarlas (Muzer, 1999). Como ya se mencionó anteriormente, el objetivo de éste trabajo era el de estudiar la cinética de los microorganismos, si al realizar cambios en las condiciones ambientales de los lodos, las bacterias y archeas desaparecían, o bien, cuáles de ellas se mantenían, ya que se estuvo haciendo cambios en el contenido del medio mineral utilizado. Se observaron cambios químicos en los estudios de biosorción de Cu y cómo afectaba la presencia de hierro.

Se incluyó una muestra del Rio San Pedro (muestra 1), para conocer la flora microbiana que sobrevive a las condiciones de contaminación que se presentan en él

(Gómez-Alvarez *et al.*, 2004). No se observan muchas diferencias en cuanto a las especies de bacterias y archeas en la microflora del río y de los lodos activados. Una de las especies identificadas sólo en el río fue *Fluviicola* spp, un género perteneciente a las Flavobacterias, que son un grupo de bacterias ambientales (Bergey' s, 2001).

En todas las muestras se encontró la presencia de archeas metanógenos (banda 7), que son microorganismos procariotes que viven en medios estrictamente anaerobios y que obtienen energía mediante la producción de gas metano (CH₄). Durante todo el tiempo que se realizó el estudio en el reactor, hubo producción de metano (Certucha-Barragán *et al.*, 2009, en prensa), a pesar de la presencia de hierro y cobre.

CONCLUSIONES

Las técnicas de biología molecular utilizadas, fueron útiles para conocer la diversidad microbiana en los lodos anaerobios que llevó a cabo la bioacumulación de Cu y se encontró además la presencia de bacterias que reducen el Fe. No se observaron cambios en las familias que componen la microflora microbiana, cuando se utilizó Cu con diferentes concentraciones de Fe, por lo que se puede concluir que los lodos metanogénicas se pueden emplear como una alternativa para la remoción de Cu de diferentes ambientes contaminados.

REFERENCIAS

- Bergey's. 2001. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd ed., vol. 1 (The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria) (D.R. Boone and R.W. Castenholz, eds.), Springer-Verlag, New York. pp. 465-466.
- Certucha-Barragan, María Teresa, Evelia Acedo F., Onofre Monge A., Jesús L. Valenzuela G. y F. Javier Almendariz T. 2009. Copper bioaccumulation in an UASB reactor. *Chemical Speciation and Bioavailability*. En prensa.
- Díaz, E.E., Stams J.M.M., Amils R., Sanz J.L., 2006, Phenotypic properties and microbial diversity of methanogenic granules from a full-scale upflow anaerobic sludge bed reactor treating brewery wastewater. *Applied and Environmental Microbiology*. p. 4942-4949.
- Escalante-Lozada, A., Gosset-Lagarda G., Martínez-Jiménez A., Bolívar-Zapata F., 2004. Diversidad bacteriana del suelo: Métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas. *Agrociencia*, 38, p.583-592.
- Fang, H. H. P., Liu H., Zhang T., 2002, Characterization of a hydrogen-producing granular sludge, *Biotechnology and Bioengineering*, 78-1, p. 45-52.
- Gomez-Alvarez, A., A. Villalba-Atondo, G. Acosta-Ruiz, M. Castañeda-Olivares y D. Kamp.2004. Metales pesados en el agua superficial del Rio San Pedro durante 1997 y 1999. *Rev. Contam. Ambient.* 20:5-12.
- Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, p. 115–175. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, John Wiley & Sons, New York, N.Y.

- Muyzer, G., 1999, Genetic fingerprinting of microbial communities-present status and future perspectives. *Microbial Biosystems: New Frontiers*, Proceeding of the 8th International Symposium on Microbial Ecology.
- Rojas-Herrera R., Narváez-Zapata J., Zamudio-Maya M., Mena-Martínez M.E., 2008, A simple silica-based method for metagenomic DNA extraction from soil and sediments. *Mol Biotechnol.*40:1, p. 13-17.
- Tani, K., Iwamoto T., Fujimoto K., Nasu M. 2001. Dynamics of methanotrophs during in situ bioremediation. *Microbes and Environments.* 16:1, p.37-42.
- Zhou, J., Bruns M.A., Tiedje J.M. 1996. DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 316-322.