

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

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



**BIOSORCIÓN DE COBRE CON BACTERIAS
AEROBIAS INMOVILIZADAS EN ZEOLITA**

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

PRESENTA

ONOFRE MONGE AMAYA

**DIRECTOR
DR. JESÚS LEOBARDO VALENZUELA GARCÍA**

**CODIRECTORA
DRA. EVELIA ACEDO FÉLIX**

Mexicali, B. C.

Enero, 2009.

DEDICATORIAS

A Dios

Su infinito amor, presencia y fortaleza me han sostenido

A mi esposo Antonio y a mis hijos Isaí David y Ana Luz

Ustedes que son la razón de mi esfuerzo y que por su paciencia, amor y comprensión pude llegar a la meta, los amo

A mis padres Roberto (†) y Ana María

La mayor bendición de ser su hija, te amo mamita

A mis hermanos Polo, Gumer, Esther, Roberto, Fran, Vicky y Gely

Por su apoyo y cariño, gracias

A toda mi familia

A mi suegra María Luz, mis cuñadas Paty y Martha, y toda mi familia política (que son muchos) por estar cerca de mi en todo tiempo, a mis demás cuñadas y cuñados y a todos mis sobrinos, porque juntos somos una gran familia

A mis amigos

Aquellos que me alentaron en los momentos difíciles y me animaron a seguir adelante

¡Gracias a todos!

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Sonora y a la Universidad Autónoma de Baja California, a través del Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia, y el Instituto de Ingeniería, por el apoyo brindado para la realización del presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Dirección de Desarrollo Académico de la Universidad de Sonora, por el apoyo brindado en el otorgamiento de una beca para realizar los estudios de doctorado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), en forma muy especial al Laboratorio de Microbiología Molecular, a Rosalva Pérez por su apoyo en los análisis realizados.

Al Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV Unidad Saltillo), a la Dra. Ana Lilia Leal Cruz, por los análisis realizados de DRX, MEB y EDS.

Al Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia y a la División de Ingeniería, por su apoyo en la adquisición de materiales y reactivos para la realización del trabajo de campo y de laboratorio.

Mi más sincero reconocimiento al Dr. Jesús Leobardo Valenzuela García, director de tesis, por su apoyo, paciencia y conocimientos transmitidos para concluir este trabajo.

A la Dra. Evelia Acedo Félix, codirectora de tesis, por saber transmitir sus experiencias y conocimientos de una manera eficaz, se lo agradezco de todo corazón, espero poder hacer lo mismo.

Al Dr. F. Javier Almendariz, por su valiosa colaboración en la elaboración de este trabajo, sus conocimientos transmitidos fueron acertados y fundamentales.

Al Dr. Armando Tejeda Mansir, Dra. Gisela Montero y Dra. Concepción Carreón Díasconti, por el tiempo dedicado e importantes sugerencias a este trabajo de tesis.

Al Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales de la Universidad de Sonora, al Dr. Francisco Brown Bojórquez, por los análisis realizados en el Microscopio Electrónico de Barrido.

Al laboratorio de Metalurgia del Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia de la Universidad de Sonora, a Q. Ángel Romero y Jesús Cervantes, por el apoyo brindado en las lecturas realizadas en el equipo de Absorción atómica.

A las I.Q. Erika Nevarez Llamas y Carmen Astorga Valenzuela, por el apoyo brindado en la realización de algunos de los análisis de de este trabajo, y demás alumnos que prestaron su servicio social en el laboratorio de biorremediación.

Al personal del Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia, M.C. Leonel Servin, por su eficiencia en la compra de material y reactivos de laboratorio; Q.B. María Elena Ochoa, por su ayuda en la prestación de servicios en el laboratorio; Adelita Corona y Adriana Monge, por su apoyo en lo administrativo; Darío, Juan Manuel y Rodolfo, sin su ayuda técnica en el laboratorio difícilmente se hubiera arreglado aquella fuga de gas, de agua y demás cosas indispensables en el laboratorio, gracias a todos por su apoyo.

Al Instituto de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California, unidad Mexicali, al Dr. Benjamín Valdez Salas y Dra. Sara Ojeda Benítez, por tener esa disposición para apoyar a los estudiantes, y a ti Dolores Delgadillo, que con tu apoyo y amabilidad se pudieron hacer todos los trámites administrativos desde Hermosillo, evitándonos vueltas a Mexicali, mil gracias.

A mi amiga Patricia, compañera de generación y de trabajo, por tu valiosa ayuda y por estar siempre dispuesta a enseñar.

A Tere, mi amiga, mi maestra, que estuviste conmigo en el transcurso de este trabajo, que luchamos juntas para seguir adelante, que a pesar que tuvimos ganas de detenernos y no seguir, hemos llegado a feliz término, muchas gracias amiga.

También se agradece a todas aquellas personas que de alguna manera contribuyeron en la realización del presente trabajo. De forma especial a la M.C. Guadalupe Martínez y Dr. Agustín Gómez.

CONTENIDO

	Página
CONTENIDO	i
LISTA DE TABLAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
NOMENCLATURA Y ECUACIONES	ix
RESUMEN	1
ABSTRACT	3
I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	5
1. 1 Objetivo General	7
1.1.1 Objetivos específicos	7
II. ANTECEDENTES	9
2.1 Contaminación del agua	9
2.1.1 Contaminación de aguas superficiales, por metales pesados	9
2.1.2 Metales pesados	11
2.1.3 Toxicidad de metales pesados	12
2.1.3.1 El cobre	13
2.1.4. Tecnologías para el tratamiento de aguas contaminadas con metales	15
2.2 Ecología microbiana	18
2.2.1 Empleo del metabolismo microbiano para la descontaminación de aguas.	20
2.2.2 Bacterias en la descontaminación	21
2.2.3 Curvas de crecimiento	23
2.2.4 Cinética de reacciones	25
2.3 Clasificación de los reactores	26
2.3.1 Biorreactores	31
2.3.1.1 Procesos aerobios y anaerobios	31
2.3.2 Proceso de biosorción	33

2.4 Soportes de inmovilización de biomasa	36
2.4.1 Tipos de soportes utilizados	36
2.4.2 Zeolita natural	37
2.5 Modelos teóricos para el tratamiento de datos experimentales del proceso de biosorción	39
2.6 Investigaciones relacionadas	43
III. MATERIALES Y MÉTODOS	49
3.1 Muestreo y Análisis	51
3.1.1 Localización del muestreo.	51
3.1.1.1 Determinaciones analíticas de temperatura y pH	51
3.2 Desarrollo de microorganismos	51
3.2.1 Aislamiento	51
3.2.1.1 Caracterización macroscópica y microscópica	52
3.2.2 Caracterización de cepas	52
3.2.2.1 Caracterización bioquímica y selección de cepas	52
3.2.2.2 Cinética de crecimiento	53
3.2.2.3 Producción de biomasa de las cepas seleccionadas	53
3.3 Biosorción de cobre en sistema por lote	54
3.3.1 Pruebas de biosorción con bacterias	54
3.3.2 Pruebas de biosorción con bacterias y zeolita como soporte	55
3.3.3 Constantes de velocidad (K)	56
3.4 Biosorción de cobre en sistema continuo	56
3.4.1 Acondicionamiento del Reactor Aerobio con Flujo Ascendente Empacado con Zeolita (RAEFA-EZ)	56
3.4.2 Pruebas de biosorción de cobre en RAEFA-EZ	58
3.5 Cinética de adsorción del cobre por biosorción	59
3.6 Métodos analíticos	60
3.6.1 Digestión de lodos	60
3.6.2 Determinación de cantidad de biomasa adherida a la zeolita	61
3.6.3 Biomasa producida en el RAEFA-EZ	62
3.6.4 Concentración inhibitoria media (CI_{50})	62

3.6.5 Demanda química de oxígeno (DQO)	63
3.6.6 Identificación de fases por Difracción de Rayos X (DRX)	63
3.6.7 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Espectroscopía por Dispersión de Energía de Rayos X (EDS)	64
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
4.1 Muestreo, aislamiento y caracterización de microorganismos	66
4.1.1 Muestreo	66
4.1.2 Aislamiento, caracterización e identificación bacteriana	67
4.2 Selección de cepas	68
4.2.1 Escherichia coli (Ec) y Burkholderia cepacia (Bc)	68
4.2.2 Cinética de crecimiento de Ec y Bc	68
4.2.3 Producción de biomasa de Ec y Bc	69
4.3 Estudio de biosorción de cobre en sistema por lotes	71
4.3.1 Pruebas de biosorción por lotes con las cepas Ec y Bc	71
4.3.2 Pruebas de biosorción por lote con Ec y Bc soportadas en zeolita	73
4.3.3 Determinación de constantes cinéticas de velocidad (K)	75
4.4 Estudio de biosorción en sistema continuo con el consorcio bacteriano	77
4.4.1 Acondicionamiento del Reactor Aerobio de Flujo Ascendente Empacado con Zeolita (RAEFA-EZ) a pH de 3-4	77
4.4.2 Efecto inhibitorio del cobre sobre el consorcio bacteriano utilizado como biomasa (CI50)	77
4.4.3 Biosorción de cobre en RAEFA-EZ a pH de 3-4	78
4.4.4 Acondicionamiento de RAEFA-EZ a pH de 4-5	82
4.4.5 Biosorción de cobre en RAEFAEZ a pH de 4-5	82
4.4.6 Análisis de biomasa producida en el reactor	85
4.5 Isotermas de biosorción de cobre	87
4.6 Caracterización por Difracción de Rayos X (DRX), Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Espectroscopia de Energía Dispersiva de Rayos X (EDS)	90
4.6.1 Identificación por Difracción de Rayos X (DRX)	90
4.6.2 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)	93

4.6.3 Espectroscopia de Energía Dispersiva de Rayos X (EDS)	97
V. CONCLUSIONES	100
VI. REFERENCIAS	103
ANEXOS	112
Publicaciones (Artículos anexos)	133

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Organismos utilizados para biosorber metales pesados	48
2	Medio mineral ácido	58
3	Temperatura y pH de la estación 1 (E1) y estación 2 (E2)	67
4	Resultados de control en el reactor, para la producción de biomasa del consorcio bacteriano	86
5	Estándares del nefelómetro de McFarland	114
6	Identificación Bioquímica	116
7	Datos experimentales para la curva de crecimiento de <i>Burkholderia cepacia</i>	118
8	Datos experimentales para la curva de crecimiento de <i>Escherichia coli</i>	118
9	Datos experimentales de biosorción de cobre con <i>Burkholderia cepacia</i>	119
10	Datos experimentales de biosorción de cobre con <i>Escherichia coli</i>	119
11	Datos experimentales de las curvas de biosorción del Cu(II) de <i>Ec</i> y <i>Bc</i> soportadas en zeolitas	120
12	Datos experimentales de biosorción de Cu (II) en RAEFA-EZ a pH de 3-4 a 50 y 20 mgCu(II)/L, de las corridas experimentales E1, E2, E3	121
13	Datos experimentales de biosorción de cobre a pH 4-5 a 20 mgCu(II)/L de las corridas experimentales E4 y E5	122
14	Biomasa producida en g/L.d. y pH en E4 y E5	123
15	Datos experimentales de la cinética de biosorción	126
16	Máxima capacidad de adsorción de Cu(II) (q_0) de biosorbentes reportados	127

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Crecimiento microbiano en un cultivo discontinuo	23
2	Mecanismos de interacción entre metales pesados y microorganismos	35
3	Estructura tetraédrica básica de las zeolitas	38
4	Interacción entre metales y microorganismos	40
5	Isotermas de adsorción más comunes. (a) Lineal, (b) Langmuir, (c) Freundlich	42
6	Diagrama de flujo de la metodología utilizada	50
7	Diagrama esquemático del Reactor Aeróbico de Flujo Ascendente Empacado con Zeolita (RAEFA-EZ)	57
8	Curvas de crecimiento en caldo nutritivo a pH 5.0, de Burkholderia cepacia (Bc) y Escherichia coli (Ec) aisladas de las aguas del Río San Pedro	69
9	Producción de biomasa en mg/L (peso seco) de Escherichia coli y Burkholderia cepacia aisladas de las aguas del Río San Pedro, durante 45 horas	70
10	Estimación de la biomasa producida en base al nefelómetro de MacFarland, de Escherichia coli y Burkholderia cepacia aisladas de las aguas del Río San Pedro	71
11	Curvas de biosorción del Cobre utilizando <i>Ec</i> y <i>Bc</i>	72
12	Curvas de biosorción del Cu(II) de <i>Ec</i> y <i>Bc</i> soportadas en zeolita	74
13	Datos cinéticos experimentales que muestran la reacción de primer orden para <i>Ec</i> y <i>Bc</i> en sistema por lotes	76
14	Datos cinéticos experimentales que muestran la reacción de primer orden para <i>Ec</i> y <i>Bc</i> con zeolita como soporte en sistema por lotes	76

15	Efecto inhibitorio de la concentración del cobre sobre la velocidad de crecimiento de la biomasa a 48 horas	78
16	Biosorción de Cu(II) en RAEFA-EZ a pH de 3-4.	79
17	Curva de ruptura de Cu(II) en RAEFA-EZ a pH de 3-4 con el consorcio bacteriano seleccionado del Río San Pedro	79
18	Control del pH en el reactor durante las corridas experimentales E1, E2 y E3 de biosorción del cobre con el consorcio bacteriano	81
19	Curvas de ruptura en la biosorción de cobre a pH de 4-5, con el consorcio bacteriano seleccionado del Río San Pedro	83
20	Seguimiento del pH en el reactor durante las pruebas E4 y E5 de biosorción del cobre con el consorcio bacteriano	84
21	Determinación de la biomasa producida en el reactor	85
22	Producción de biomasa en E4 y E5	86
23	Isoterma de biosorción de cobre utilizando biomasa producida en el reactor a pH 3-4, T= 35°C, 100 rpm en disoluciones de 10 a 200 mgCu(II)/L ajustados al modelo de Langmuir	88
24	Isotermas de biosorción de cobre utilizando biomasa producida en el reactor con el modelo de Langmuir y ecuación de Freundlich	90
25	Difractogramas correspondientes a las muestras de clinoptilolita (M1), clinoptilolita con <i>Escherichia coli</i> (M2) y clinoptilolita con <i>Burkholderia cepacia</i> (M3)	91
26	Difractogramas correspondientes a las muestras de zeolitas sin tratar (Z) y zeolitas tomadas a diferentes alturas del reactor (1, 2, 3 y 4)	92
27	Fotomicrografías (MEB) del consorcio bacteriano utilizado en la biosorción de cobre en el RAEFAEZ (a) 750X y (b) 1500X	93
28	Fotomicrografías de MEB correspondiente a la zeolita sin tratar a 2000X	94

29	Fotomicrografías de las zeolitas a 4 alturas del reactor después de ser tratadas con el consorcio bacteriano a 2000X	94
30	Magnificación del análisis superficial de las muestras de zeolitas sin tratar (Z) y zeolitas tratadas con el consorcio bacteriano a 4 alturas del reactor sin montar en resina a 2000X	96
31	Espectros de las zeolitas a dos alturas del reactor a) parte alta del reactor; b) parte baja del reactor; c) zeolita sin tratar	98
32	Espectros del análisis puntual realizado a las diatomeas (a) parte baja del reactor; (b) parte alta del reactor	99
33	Curvas estándares de nefelómetro con transmitancia (%) y densidad celular	114

NOMENCLATURA Y ECUACIONES

Nomenclatura

Símbolo	
$r_A V$	Desaparición del reactante por reacción química
N_A	Número de moles de la especie A en el sistema en el tiempo t
X_A	Número de moles de la especie A producidas en el tiempo t
F_{Ao}	Velocidad de flujo molar con que A se alimenta al sistema
F_A	Velocidad de flujo molar de salida de A del sistema
U_o	Velocidad de flujo volumétrico entrante
C_{Ao}	Concentración entrante
R	Retorno de la corriente de salida
t	Ecuación de diseño del reactor
q	Cantidad de soluto adsorbido por cantidad de absorbente, mg/g
K	Constante de equilibrio
q _o	Cantidad máxima de soluto adsorbido, mg/g
C _e , y	Concentración en el equilibrio, mg/L
K _d	Constante de la isoterma de Langmuir, mg/L
A	Absorbancia
%T	Porcentaje de Transmitancia
E	Eficiencia de biosorción
C _o	Cantidad inicial, mg/L
C _f	Cantidad final, mg/L
C _A	Concentración remanente, mg/L
K	Constante de velocidad, min ⁻¹
C	Cantidad determinada, µg/g
V _i	Volumen final del afore, mL
\mathcal{L}	Lectura del equipo, µg/L
fd	Factor de dilución
w	Peso de la muestra, g
X _{b/z}	Cantidad de biomasa en g/g de zeolita
W _{f_b}	Peso final de zeolita con biomasa, g
W _{i_b}	Peso inicial de zeolita con biomasa, g
W _{z/cb}	Peso de zeolita utilizada, g
W _{f_z} , W _{i_z} y W _{z/sb}	Peso de zeolita sin bacteria como control, g
W	Peso de biomasa seca del día, mg
W _f	Peso de filtro con biomasa seca, g
W _i	Peso del filtro, g
V _t	Volumen producido en el día, mL
q _{eq}	Cantidad de cobre adsorbida por la biomasa, mg/L
m _o	Masa inicial, mg
m _{eq}	Masa en el equilibrio, mg
V _{ads}	Volumen de biomasa utilizada en L
S _o , S _f	Sustrato de entrada y salida, g/L

Ecuaciones

Balance de materia para un reactor por lotes o intermitente (Ecuación 1, 2, 3 y 4):

$$r_A V = - \frac{dN_A}{dt} \quad (1)$$

$$r_A V = N_{A0} \frac{dX_A}{dt} \quad (2)$$

$$t = N_{A0} \int_0^{X_A} \frac{dX_A}{r_A V} \quad (3)$$

$$t = C_{A0} \int_0^{X_A} \frac{dX_A}{r_A} = - \int_{C_{A0}}^{C_A} \frac{dC_A}{r_A} \quad (4)$$

Balance de materia para un reactor de flujo continuo (Ecuaciones 5, 6 y 7):

$$F_{A0} dX_A = r_A dV \quad (5)$$

$$\int_0^V \frac{dV}{F_{A0}} = \int_0^{X_{Af}} \frac{dX_A}{r_A} \quad (6)$$

$$\tau = \frac{V}{V_0} = C_{A0} \int_0^{X_{Af}} \frac{dX_A}{r_A} \quad (7)$$

Balance de materia para un reactor en continuo cuando hay recirculación del caudal (Ecuaciones 8, 9 y 10):

$$R = \frac{\text{caudal que se recicla}}{\text{caudal que sale}} \quad (8)$$

$$\frac{V}{V_1} = - \int_{C_{A1}}^{C_{Af}} \frac{dC_A}{r_A} \quad (9)$$

$$\tau = \frac{V}{V_0} = -(R+1) \int_{\left(\frac{C_{A0} + RC_{Af}}{R+1}\right)}^{C_{Af}} \frac{dC_A}{r_A} \quad (10)$$

La isoterma lineal puede ser descrita por la ecuación de una línea recta que pasa por el origen (Ecuación 11):

$$q = K \cdot y \quad (11)$$

La isoterma de Freundlich se describe por medio de una ecuación exponencial empírica (Ecuación 12):

$$q = K \cdot y^n \quad (12)$$

La isoterma de Langmuir se representa por la ecuación 13:

$$q = \frac{q_0 C_e}{K_d + C_e} \quad (13)$$

Ecuación de Langmuir para representarla en forma grafica (Ecuación 14):

$$\frac{1}{q} = \frac{K_d}{q_0 C_e} + \frac{1}{q_0} \quad (14)$$

Determinación de las curvas de crecimiento (Ecuación 15):

$$A = 2 - \log_{10} (\%T) \quad (15)$$

La eficiencia de bioacumulación (E), ecuación 16.

$$E = \left(\frac{C_o - C_f}{C_o} \right) * 100 \quad (16)$$

Velocidad de primer orden (Ecuaciones 17 y 18):

$$\frac{dC}{dt} = K C^n \quad (17)$$

$$K = t^{-1} \ln \frac{C_0}{C_A} \quad (18)$$

Determinación de la cantidad de cobre adsorbida por la biomasa (Ecuación 19):

$$q_{eq} = \frac{m_0 - m_{eq}}{V_{ads}} \quad (19)$$

Determinación de cobre por digestión de lodos (Ecuación 20):

$$C = \frac{V_i * r * fd}{W} \quad (20)$$

Determinación de sólidos volátiles suspendidos (Ecuación 21):

$$X_{b/z} = \frac{Wf_b - Wi_b}{W_{z/cb}} - \frac{Wf_z - Wi_z}{W_{z/sb}} \quad (21)$$

Determinación de peso seco de biomasa (Ecuación 22):

$$W = \frac{W_f - W_i}{V} * V_t \quad (22)$$

Determinación de la eficiencia de DQO (Ecuación 23):

$$\eta_{DQO}(\%) = \frac{S_o(gDQOent/L) - S_f(gDQOsal/L)}{S_o(gDQOent/L)} * 100 \quad (23)$$

RESUMEN

En el presente trabajo se desarrolló un proceso de biosorción para reducir la concentración de cobre con biomasa aerobia utilizando como soporte zeolita clinoptilolita sin activar. Se realizaron muestreos de aguas superficiales en el Río San Pedro, de sitios reportados con mayor contaminación de cobre, de los cuales se aislaron 123 cepas bacterianas y se conocieron los géneros y especies. De ellas se seleccionaron aquellas que crecieron en medio mineral ácido y que han sido reportadas en la literatura que adsorben metales. Se seleccionaron *Burkholderia cepacia* y *Escherichia coli*, para realizar las pruebas en sistema por lotes, utilizando concentraciones de 50 y 100 mgCu(II)/L. Se obtuvieron porcentajes de remoción de 72% a 75% en 75 minutos de una solución de 50 mgCu(II)/L, mientras que la concentración de 100 mgCu(II)/L fue tóxica para las bacterias. Las pruebas de biosorción de cobre en sistema continuo utilizando un reactor aerobio de flujo ascendente empacado con zeolita (RAEFA-EZ), se hicieron con un consorcio bacteriano de 10 cepas que crecieran en medio ácido para inocular el reactor. Se llevaron a cabo 5 corridas experimentales, la primera a una concentración inicial de 50 mgCu(II)/L, la segunda a 20 mgCu(II)/L y la tercera a 20 mgCu(II)/L, recirculando la biomasa, durante estas tres corridas experimentales el pH se mantuvo entre 3 y 4. En estas pruebas se obtuvieron resultados de remoción de cobre similares en los tres experimentos (96%), solo que en el tercer experimento el porcentaje de remoción se mantuvo por 6 días consecutivos. El pH ácido afecta al proceso de biosorción, por lo que se realizaron

dos corridas experimentales más, variando el pH de entrada entre 4-5. En la cuarta y quinta corrida experimental, el reactor mantuvo por 10 días el porcentaje de remoción de cobre por arriba del 86%. La cinética de biosorción del cobre con el consorcio bacteriano se hizo variando las concentraciones iniciales (10-200 mg/Cu(II)/L), a pH entre 3-4, 35°C y 100 rpm, los datos obtenidos de concentración de cobre se aplicaron a las ecuaciones de los modelos de Langmuir y Freundlich. Por medio del modelo de Langmuir, dio un valor máximo de adsorción de $q_0 = 198 \text{ mg/g}$ (3.08 mmol/g). La identificación de fases presentes en las zeolitas empleadas se llevó a cabo mediante la técnica de Difracción de Rayos X (DRX) y los resultados de la caracterización revelaron que no existen cambios en el tipo de fases presentes antes y después del tratamiento con las bacterias, lo cual indica que la zeolita sólo actúa como soporte para la biomasa. Además, el estudio sistemático que involucra la observación y microanálisis elemental de las bacterias presentes en las zeolitas empleando las técnicas de Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) y espectroscopia por Dispersión de Energía de Rayos X (EDS), revelaron que el cobre no es adsorbido por las zeolitas, sino por las bacterias presentes que se encuentran en la superficie de las zeolitas. En este trabajo se ha demostrado que la biomasa viva utilizada es capaz de biosorber metales como el cobre y que el proceso de biosorción es una alternativa de gran interés para la limpieza de sitios contaminados con metales pesados, ya que es efectivo cuando se tienen concentraciones bajas de los metales (<65 mgCu(II)/L), así como la importancia del uso de consorcios bacterianos como biosorbente natural y el de la zeolita como soporte de biomasa.

ABSTRACT

A biosorption process was developed to reduce the copper concentration with aerobic biomass using like support clinoptilolite zeolite without activating. Superficial water samplings were made in the River San Pedro, of sites reported with greater copper contamination, of which 123 bacterial strains were isolated and the genus and species were known. Of them those were selected that grew in the mineral media acid and which they have been reported in literature that adsorb metals. *Burkholderia cepacia* and *Escherichia coli* were selected, to make the tests in batch system, were used concentrations of 100 and 50 mgCu(II)/L. Removal of 72% to 75% were obtained from a solution of 50 mgCu(II)/L in 75 minutes of a solution of were obtained 50 mgCu (II)/L, whereas the concentration of 100 mgCu (II)/L was toxic for the bacteria. Biosorption tests of copper in continuous ascending flow reactor packed with zeolite (AFAR-PZ), took control of a bacterial consortium of 10 strains that grew in the mineral media acid to inoculate the reactor. Five experimental assays were carried out, the first an initial concentration of 50 mgCu (II)/L, second a 20 mgCu(II)/L and third a 20 mgCu(II)/L, recirculating the biomass, during these three experimental tests pH stayed between 3 and 4. In these assays similar results of copper removal were obtained in the three experiments (96%), however in the third experiment the percentage of removal stayed by 6 days consecutive. The pH acid affects the biosorption process, reason why two experimental assays were made more, varying pH of entrance between 4-5. In the fourth and fifth experimental assays, the reactor maintained by 10 days copper

removal by above of 86%. The kinetic one of biosorption of copper with the bacterial consortium was done varying the initial concentrations (10-200 mg/Cu(II)/L), to pH between 3-4, 35°C and 100 rpm, the collected data of copper concentration were applied to the equations of the models of Langmuir and Freundlich. By means of the model of Langmuir, gave to a maximum value of adsorption of $q_o = 198$ mg/g (3,08 mmol/g). The identification of present phases in the used zeolites was carried out by means of the technique of X Ray Diffraction (XRD) and the results of the characterization revealed that changes in the type of present phases do not exist before and after the treatment with the bacteria, which indicates that the zeolite only acts like support for the biomass. In addition, the systematic study that involves the observation and elementary microanalysis of the present bacteria in the zeolites using the techniques of Scanning Electronic Microscope (SEM) and Energy Dispersion Spectroscopy (EDS) revealed that the copper is not adsorbed by the zeolites, but by the present bacteria that are in the surface of the zeolites. In this work has demonstrated that biomass alive used is able to biosorb metals as copper and that process of biosorption is alternative of great interest for cleaning of sites contaminated with heavy metals, since it is effective for low concentration of metals in solution (<65 mgCu(II)/L), as well as the importance of the use of bacterial consortium like natural biosorbent and the one of the zeolite like biomass support.

I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La contaminación del agua, aire y suelo por metales pesados es uno de los problemas ambientales más severos, además de ser muy difícil de resolver. Las fuentes más comunes de contaminación por dichos metales son los procesos de petróleo, las plantas generadoras de energía y los procesos metalúrgicos (Acosta *et al.*, 2007).

Las fuentes de los metales no son renovables y las reservas naturales están siendo consumidas, por lo tanto, es imperativo que aquellos metales considerados peligrosos desde el punto de vista ambiental, o aquellos de importancia tecnológica, de significado estratégico o de valor económico, deban ser removidos/recuperados en su lugar de origen, utilizando sistemas de tratamiento apropiados (Cañizares-Villanueva, 2000).

En el país existen una gran cantidad de sitios contaminados por metales pesados y residuos, provenientes de la industria minera. Hasta la fecha los trabajos realizados para la recuperación y remediación de estos sitios en México, han sido sumamente escasos, razón por la cual es de gran importancia que instituciones de investigación evalúen y desarrollen alternativas tecnológicas, acordes a las condiciones específicas de cada sitio, que permitan su remediación a través de la remoción y/o estabilización de los contaminantes inorgánicos (Volke *et al.*, 2004).

Un ejemplo de lo anterior se encuentra en el Estado de Sonora, donde por varias décadas, se ha explotado principalmente Ag y Cu. Los distritos mineros

más explotados en el estado se ubican en el municipio de Cananea, donde se han realizado estudios de calidad de agua superficial del río San Pedro durante los años 1997 y 1999, desde su origen cerca de la ciudad de Cananea, Sonora, México hasta el límite con Estados Unidos de América (Gómez-Álvarez *et al.*, 2004) y recientemente Gómez-Álvarez *et al.*, (2007) han realizado estudios sobre la evaluación de metales pesados (Cd, Cu, Fe, Mn, Pb y Zn) en los sedimentos del río San Pedro.

Para el tratamiento de los efluentes líquidos que contienen metales pesados, existen diferentes métodos físico-químicos, siendo los más utilizados en la actualidad los siguientes: precipitación, intercambio iónico, ósmosis inversa y adsorción. Estos, aunque efectivos presentan varias desventajas cuando son aplicados a efluentes industriales constituidos por soluciones metálicas diluidas, entre las cuales se puede mencionar los costos importantes en términos energéticos y/o de consumo de productos químicos (Reyes *et al.*, 2006).

La tecnología de biosorción, basada en la habilidad de ciertas biomasas de capturar especies metálicas de soluciones acuosas, ha recibido especial atención por su potencialidad para el tratamiento de aguas residuales (Volesky, 1990). En la última década, el potencial para la biorremediación (bioadsorción o biosorción) de metales por biomasa ha quedado bien establecido. Por razones económicas, resultan de particular interés los tipos de biomasa abundantes, como los desechos generados por fermentaciones industriales, algunos de estos tipos de biomasa que absorben metales en cantidades elevadas, sirven como base para los procesos de biosorción, previendo su uso particularmente como medios muy competitivos para

la detoxificación de efluentes industriales que contienen metales y para la recuperación de metales preciosos (Cañizares-Villanueva, 2000).

En el presente estudio se generó información científica que permite dar a conocer el tipo de tecnología alternativa (biorremediación) que puede ser utilizada para la detoxificación de aguas contaminadas con metales pesados. Para ello, se realizaron muestreos en las aguas del Río San Pedro con el propósito de aislar, caracterizar y seleccionar los microorganismos aerobios, para evaluar la capacidad de eliminación de cobre realizando pruebas de biosorción en sistema por lotes y continuo en un reactor aerobio de flujo ascendente empacado con zeolita (RAEFA-EZ), además se planteó el uso de la zeolita clinoptilolita sin activar, como soporte para la biomasa. Este estudio presenta una alternativa de remediación ante los procesos tradicionales, lo cual puede permitir el desarrollo de metodologías y estrategias relacionadas para la limpieza de sitios contaminados con diferentes metales.

1. 1 Objetivo General

Desarrollar un proceso de biosorción para reducir la concentración de cobre con biomasa aerobia utilizando zeolita como soporte.

1.1.1 Objetivos específicos

- Aislar, caracterizar y seleccionar los microorganismos aerobios presentes en las muestras de las aguas del río San Pedro con mayor resistencia al pH ácido y a concentraciones de cobre.

- Determinar la cinética de biosorción del cobre en sistema por lotes con las bacterias seleccionadas y con zeolita clinoptilolita como soporte.
- Determinar la cinética de biosorción de cobre en sistema continuo con un consorcio de bacterias en el Reactor Aerobio de Flujo Ascendente Empacado con Zeolita (RAEFA-EZ).
- Evaluar la capacidad del consorcio bacteriano para biosorber al cobre mediante isotermas de adsorción.
- Determinar la capacidad de la zeolita clinoptilolita como soporte de biomasa por técnicas de Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Difracción de Rayos X (DRX).

II. ANTECEDENTES

2.1 Contaminación del agua

La calidad del agua es un concepto amplio. Se dice que el agua está contaminada cuando su composición no reúne las condiciones necesarias para el tipo de utilización a que estaba destinada en su estado natural. El agua se contamina cuando la descarga de residuos perjudica su calidad, o perturba el equilibrio ecológico. En muchas ocasiones el agua de un río o un lago se filtra a los mantos freáticos de donde (mediante pozos), es extraída para consumo humano y animal, o bien, es transportada desde un cuerpo de agua hasta depósitos de purificación. Si el agua de dichos cuerpos se ha contaminado mediante sustancias tóxicas como ácidos, solventes orgánicos, pinturas, metales y demás, derivadas de actividades industriales, agrícolas, ganaderas, domésticas o escolares, dicha agua ya no es apta para el consumo. La descarga de contaminantes específicos no es la única causa de contaminación del agua, también la construcción de presas, embalses y desviaciones de ríos pueden degradar seriamente su calidad (Henry y Heinke, 1999).

2.1.1 Contaminación de aguas superficiales por metales pesados

Debido al desarrollo industrial en nuestro país y a la falta de normatividad sobre sus residuos, previo a 1990 y la falta de control en las operaciones mineras, esta industria ha generado por décadas una gran cantidad de desechos y sitios contaminados a lo largo de todo el país. El beneficio de minerales, como parte de

las actividades de la minería metálica (la mayoritaria en México), provoca problemas como la producción de sulfatos y residuos ácidos o de metales pesados. El impacto ambiental causado por la contaminación por metales, depende de la capacidad de acomplamiento de estos con el suelo y agua, así como de las condiciones fisicoquímicas y biológicas del entorno, los cuales pueden cambiar el estado de oxidación de los metales. El cambio de estado de oxidación y el pH pueden incrementar o disminuir el riesgo potencial de biodisponibilidad de un metal en el suelo y afectar la fertilidad y/o uso posterior de los mismos, mientras que en el caso de cuerpos de agua, pueden afectar seriamente el uso para el consumo humano (Volke *et al.*, 2004)

Las actividades industriales generan diariamente distintos productos contaminantes, que por descuido y mal manejo de ellos, trae como consecuencia la acumulación en el ambiente, provocando daños al entorno, la salud humana y animal (Mijares, 2003).

Las aguas procedentes de las industrias como la minera, la de recubrimientos metálicos y otras más, contaminan el agua con diversos metales. Las normas oficiales mexicanas contra la contaminación ambiental (NOM-001-ECOL-1996; NOM-002-ECOL-1996; NOM-003-ECOL-1996, publicadas en el Diario Oficial el 6 de Enero de 1997), consideran metales contaminantes del agua, por ejemplo, las sales de metales como plomo, zinc, mercurio, plata, níquel, cadmio, aluminio, cobre y arsénico ya que son muy tóxicos para la flora y la fauna terrestres y acuáticas. La presencia de metales pesados en ambientes acuáticos se sabe que pueden causar daño severo a la vida acuática, además del hecho de

que estos metales envenenan a microorganismos durante el tratamiento biológico de las aguas residuales. La mayoría de los metales pesados son solubles en agua y forman soluciones acuosas y por lo tanto, no pueden separarse por medios físicos ordinarios (Lomelí y Tamayo, 2008).

2.1.2 Metales pesados

Los metales se cuentan entre los materiales más útiles que se conocen. En el proceso de su aprovechamiento, estos se extraen, benefician, funden y se convierten en bienes de consumo que, después de usados, se desechan y/o reciclan (Suárez y Reyes, 2002).

Los metales pesados son un grupo de elementos traza de gran interés. Algunos pueden ser esenciales para la vida, aunque también pueden causar daño a diferentes organismos vivos, como seres humanos, microorganismos, plantas y animales, cuando se encuentran en niveles altos en el medio ambiente (Volke *et al.*, 2004). Constituyen un grupo de aproximadamente 40 elementos de la tabla periódica que tienen una densidad mayor o igual a 5 g/cm^3 en su forma elemental. Estos están conformados por 38 elementos, pero son 12 los considerados tóxicos y que son descargados como parte de una serie de residuos al medio ambiente: Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Sn y Zn. El rasgo distintivo de la fisiología de los metales pesados, es que aun cuando muchos de ellos son esenciales para el crecimiento como el Mg, Ca, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn y Mo, se ha reportado que también tienen efectos tóxicos para las células, al estar en concentraciones superiores a las fisiológicas normales, principalmente como resultado de su capacidad para alterar o desnaturalizar las proteínas (Cañizares-Villanueva, 2000).

2.1.3 Toxicidad de metales pesados

Los metales pesados, están considerados como uno de los grupos más peligrosos debido a su no biodegradabilidad, su alta toxicidad a bajas concentraciones y su capacidad para acumularse en diferentes organismos (Reyes *et al.*, 2006). El estudio de los metales es de gran importancia en términos de contaminación ambiental debido a sus efectos tóxicos sobre los organismos vivos (Suárez y Reyes, 2002).

El grado de toxicidad potencial de los metales pesados depende de una serie de factores. En primer lugar, depende de la propia naturaleza del metal y también de su disponibilidad en el ambiente. Atendiendo a estos dos factores, se clasificaron los metales en tres categorías:

No críticos: Fe, Mn y Al.

Tóxicos pero muy insolubles: Ti, Hf, Nb, Ta, Re, Ga, Os, Rh, Ir, Ru y Ba.

Muy tóxicos y relativamente disponibles: Be, Co, Ni, Zn, Sn, Cr, As, Se, Te, Pd, Ag, Cd, Pt, Au, Hg, Tl, Pb, Sb y Bi.

Otros factores que influyen en la toxicidad del elemento, son entre otros el estado molecular que presenta el metal, el tiempo de residencia en el sistema, el pH, el potencial redox del ambiente, los iones inorgánicos presentes en las aguas, la temperatura y diversos factores biológicos (Torres y Juvina, 2005).

La toxicidad de los metales pesados en los microorganismos es muy importante, se pretende indicar con este término aquellos metales que, considerados elementos pesados, son “tóxicos” para la célula. Sin embargo en realidad cualquier elemento que a *priori* es beneficioso para la célula, en

concentraciones excesivas puede llegar a ser tóxico, ya que se puede inhibir su mecanismo enzimático, aunque en algunas cepas se ha reportado la tolerancia a dichos metales (Navarro-Aviñó *et al.*, 2007; Rivas *et al.*, 2004).

Un elemento indispensable para un ser vivo en concentraciones traza puede llegar a ser tóxico en concentraciones elevadas. Por otra parte, la mayoría de metales pesados se combina con otras formas químicas, antes de entrar en los organismos o cuando se encuentra en el interior de los mismos; por tanto, antes de determinar la toxicidad de un elemento es necesario determinar la forma química en la que se encuentra. La persistencia se define como el tiempo que tarda un contaminante en transformarse en una forma no tóxica. Los metales pesados están considerados como muy peligrosos para los seres vivos en general, pues poseen una gran toxicidad, en parte debido a su elevada tendencia a bioacumularse (Navarro-Aviñó *et al.*, 2007).

2.1.3.1 El cobre

Elemento químico, de símbolo Cu, uno de los metales de transición e importante metal no ferroso. Su utilidad se debe a la combinación de sus propiedades químicas, físicas y mecánicas, así como a sus propiedades eléctricas y su abundancia en la naturaleza. El cobre fue uno de los primeros metales usados por los humanos. La mayor parte del cobre del mundo se obtiene de los sulfuros minerales como la calcocita, covelita, calcopirita, bornita y enargita (Holding, 2005).

El cobre es desechado por la industria minera, las actividades agrícolas y de manufactura, y por la descarga de aguas residuales a ríos y lagos. Las fuentes naturales de cobre son los volcanes, polvo que acarrea el viento, la vegetación en descomposición y los incendios forestales. El cobre liberado al ambiente generalmente se adhiere a partículas de materia orgánica, arcilla tierra o arena (Camarillo, 2004). El cobre está ampliamente distribuido en la naturaleza, se presenta principalmente en forma de sulfatos, carbonatos, sulfuros de fierro, cobre, calcopirita, bornita, cuprita, malaquita y azurita (Rodríguez, 2001).

La solubilidad, movilidad y biodisponibilidad del cobre en los sedimentos dependen fundamentalmente del valor del pH en que se encuentra la matriz que lo contiene. La biodisponibilidad del cobre se reduce drásticamente en los sedimentos a pH por encima de 7 y aumenta por debajo de pH 6. En soluciones acuosas, el cobre puede presentarse en la forma Cu^{2+} o Cu^+ , pero las condiciones redox en aguas oxigenadas y la tendencia del Cu^+ a la forma Cu^{2+} , favorece la existencia de las formas más oxidadas. En ausencia de materia orgánica, el ión Cu^{2+} precipita como hidróxido a pH's mayores de 6 (Torres y Juvina, 2005).

El cobre es un elemento traza requerida para el crecimiento celular, debido a que es un cofactor para numerosas enzimas, ya que las proteínas que contienen cobre son importantes acarreadores de electrones. Sin embargo, a elevadas concentraciones de cobre en el medio puede ser altamente tóxico para el humano, animales y los microorganismos. En los humanos, la toxicidad de este metal puede estar relacionada con una ingestión excesiva del mismo, por encima de los requerimientos nutricionales, en forma aguda provoca hemólisis, necrosis hepática

y hemorragias gastrointestinales. Si se produce intoxicación crónica, aparece irritación respiratoria, alteraciones gastrointestinales y dermatitis por contacto. Existen dos alteraciones genéticas del metabolismo del cobre: *Enfermedad de Wilson*: trastorno hereditario que provoca la acumulación de cobre en el hígado y otros órganos pudiendo producir hepatitis, alteraciones renales y otros trastornos si no se recibe tratamiento a tiempo. *Síndrome de Menke*: degeneración cerebral por acumulación de cobre (Trevors y Cotter, 1990).

2.1.4. Tecnologías para el tratamiento de aguas contaminadas con metales

Los métodos convencionales para el tratamiento de aguas residuales con metales que incluyen: precipitación, oxidación, reducción, intercambio iónico, filtración, tratamiento electroquímico, tecnologías de membrana y recuperación por evaporación resultan costosas e ineficientes, especialmente cuando la concentración de los metales es muy baja. El uso de sistemas biológicos para la eliminación de metales pesados a partir de soluciones diluidas tiene el potencial para hacerlo mejor. Los métodos químicos resultan costosos debido a que el agente activo no puede ser recuperado para su posterior reutilización. Además, el producto final es un lodo con alta concentración de metales lo que dificulta su eliminación (Cañizares-Villanueva, 2000).

Sin embargo, la efectividad de un método de remediación para un sitio contaminado con compuestos inorgánicos, depende del conocimiento de los factores hidrológicos y geológicos del sitio, de la solubilidad y especiación de los

metales, de los procesos de atenuación e inmovilización y de la medida en que estos puedan migrar en el suelo, caracterización de la población microbiana y consideraciones de tipo climatológico, además de determinar el rango de contaminación presente. Por otra parte, el costo y el tiempo de la remediación de un sitio son también factores a considerar para elegir un método de tratamiento para un contaminante y un sitio en particular (Levin y Gealt, 1997; Flores *et al.*, 2001; Volke *et al.*, 2004).

Los métodos fisicoquímicos, aunque efectivos presentan varias desventajas cuando son aplicados a efluentes industriales que contienen soluciones metálicas diluidas (soluciones de 1-100 mg/L), entre las cuales podemos mencionar los costos importantes en términos energéticos y/o de consumo de productos químicos (Volesky, 1990; Reyes *et al.*, 2006).

Actualmente, se están desarrollando nuevas tecnologías para la eliminación de metales pesados, las cuales se pretende tengan bajos costos de operación y sean fáciles de implementar (Reyes *et al.*, 2006). Existen en la práctica tres categorías generales de procesos biotecnológicos para el tratamiento de residuos líquidos que contienen metales tóxicos: la biosorción (bioacumulación y bioadsorción), la precipitación extracelular y la captación a través de biopolímeros purificados y de otras moléculas especializadas, derivadas de células microbianas. Estos procesos no son excluyentes y pueden involucrar fenómenos fisicoquímicos y biológicos. Las tecnologías que utilizan estos procesos se encuentran actualmente en uso para controlar la contaminación de diversas fuentes,

incluyendo las actividades de tratamiento de efluentes en plantas metalúrgicas (Cañizares-Villanueva, 2000).

El uso de sistemas biológicos para la eliminación de metales pesados, a partir de soluciones diluidas, tiene el potencial para hacerlo mejor y a menor costo, este método se conoce como biorremediación. La biorremediación se define como un procedimiento natural, a lo largo del cual distintos microorganismos son capaces de eliminar los contaminantes orgánicos e inorgánicos de un determinado ambiente (Cotoras, 2003). En el proceso de biorremediación, existen distintos objetivos a evaluar; principalmente se busca evitar un efecto nocivo a largo plazo a otros organismos, así como a recursos naturales; se busca recuperar el equilibrio ecológico existente en el medio ambiente; y por último, se busca lograr que la zona contaminada, con un posterior tratamiento mediante procesos biológicos, pueda ser reutilizada con fines recreativos o productivos (Mijares, 2003).

Cuando en un sistema biológico existe contaminación con metales pesados, las alternativas de biorremediación se reducen a movilización e inmovilización. Esto depende de las características hidrológicas del sitio, las propiedades químicas del metal contaminante, la geoquímica del suelo, así como el uso actual y futuro del suelo contaminado; generalmente es más fácil inmovilizar un metal que movilizarlo y posteriormente recuperarlo. A diferencia de los compuestos orgánicos, los metales no pueden ser degradados y por tanto, la mayor parte de la remediación biológica de estos consiste en la detoxificación e inmovilización del metal, reduciendo de este modo su toxicidad biológica y retardando el transporte de estos en el ambiente (Sanz, 2005).

2.2 Ecología microbiana

Está relacionada con los problemas de contaminación y con la interacción que el hombre tiene con su ambiente (Sousa *et al.*, 2007). La Ecología Microbiana es el puente de unión entre la Ecología y la Microbiología, aborda el complejo estudio del papel que juegan los microorganismos en la biosfera. Esta disciplina, surgida con fuerza a partir de la segunda mitad del siglo XX, nos muestra hoy en día como todos los seres vivos de la tierra dependen de la enorme diversidad de sus actividades.

Este mundo invisible, presente en todo tipo de ambientes, cuyas condiciones son compatibles con la existencia de vida, ha sido durante largo tiempo ignorado o tratado de forma muy rudimentaria en los estudios de Ecología clásicos. La posición clave de los niveles nutritivos de los ecosistemas, las funciones centrales en los ciclos biogeoquímicos, la importancia básica de sus interacciones con el resto de los seres vivos y, en definitiva, su papel fundamental para mantener la salud de los ecosistemas, ha puesto de manifiesto, en los últimos años, la necesidad de integrar a los microorganismos como un componente esencial en los estudios ecológicos para la comprensión del funcionamiento de la biosfera (Atlas y Bartha, 2002; Guerrero *et al.*, 2005).

Uno de los objetivos fundamentales de Ecología Microbiana es el estudio de la actividad metabólica de los microorganismos en su ambiente natural o bajo condiciones de laboratorio que intentan simular el ambiente natural. En las últimas décadas, la liberación de contaminantes al ambiente, producida principalmente como consecuencia del desarrollo industrial, ha superado con

creces los mecanismos naturales de reciclaje y autodepuración de los ecosistemas receptores. Este hecho ha conducido a una evidente acumulación de contaminantes en los distintos ecosistemas hasta niveles preocupantes.

En este contexto, la biorremediación, proceso que utiliza las habilidades catalíticas de los organismos vivos para degradar y transformar contaminantes, tanto de ecosistemas terrestres como acuáticos, presenta un enorme potencial en la mitigación de la contaminación ambiental. La biorremediación se ha centrado en la explotación de la diversidad genética y versatilidad metabólica que caracteriza a las bacterias para transformar contaminantes en productos inocuos o, en su defecto, menos tóxicos, que pueden entonces integrarse en los ciclos biogeoquímicos naturales. No obstante, existen casos aislados de utilización de otros tipos de organismos como, por ejemplo, los hongos, así como las plantas (proceso llamado "fitorremediación") (Garbisu *et al.*, 2002).

La mayoría de los microorganismos son capaces de utilizar compuestos presentes en su entorno y transformarlos en precursores ó en sus constituyentes celulares, ya que obtienen la energía que necesitan para realizar los procesos biosintéticos. En distintas industrias, en forma muy especial en la minería, la concentración de metales pesados de algunos de los efluentes representa un problema significativo debido a los costos y dificultades que involucra su eliminación, cuando se necesita cumplir con estándares de descarga, ya sean para su uso como agua de riego o evacuadas a cuerpo de agua, superficial o subterráneo (Cotoras, 2003).

2.2.1 Empleo del metabolismo microbiano para la descontaminación de aguas

El metabolismo microbiano está orientado hacia la reproducción de los organismos, y estos requieren que esos constituyentes químicos, componentes de la célula, estén disponibles para la asimilación y síntesis de nuevo material celular. El proceso de oxidación biológica conlleva a una serie de reacciones en las cuales se separan los electrones del compuesto y la energía desprendida se emplea en la síntesis de nuevo material celular (crecimiento), reparación del material dañado y transporte de nutrientes en sentido opuesto al gradiente de concentraciones, a través de la pared celular. Las bacterias usan materia orgánica como fuente de carbono y de energía, al oxígeno como aceptor de electrones y, en ausencia de oxígeno emplean nitratos (NO_3^-). Los compuestos biodegradables se encuentran inicialmente vinculados a enzimas extracelulares y son transportados a través de la pared celular (Eweis *et al.*, 1999).

Una de las estrategias que usan las bacterias para tolerar la presencia de los metales pesados es precisamente, su capacidad para transformar algunos metales en formas menos tóxicas (Cervantes, 2006). Las aguas naturales tienen una capacidad inherente de autopurificación. Los microorganismos acuáticos heterótrofos utilizan y mineralizan los nutrientes orgánicos. El amonio se nitrifica, y junto con otros nutrientes inorgánicos, es utilizado e inmovilizado por las algas y las plantas acuáticas superiores. Las poblaciones alóctonas (no del lugar) de bacterias entéricas (móviles) y otros patógenos se reducen, y finalmente se eliminan por las presiones de competencia y depredación ejercidas por las

poblaciones acuáticas autóctonas. De este modo, las aguas naturales pueden aceptar una cantidad moderada de aguas residuales sin depurar, sin que se produzca un deterioro significativo de la calidad (Atlas y Bartha, 2002).

2.2.2 Bacterias en la descontaminación

Microorganismo es un organismo microscópico, termino habitualmente empleado para describir a una célula o varias, incluyendo los virus (Madigan *et al.*, 2004). Esta definición incluye a todas las procariotas, al igual que a las eucariotas unicelulares: protozoos, algas y hongos. Las bacterias son un grupo extremadamente diverso de organismos con variaciones extensivas de las propiedades morfológicas, ecológicas y fisiológicas, que debido a su diversidad, se encuentran regularmente en comunidades heterogéneas (Eweis *et al.*, 1999).

Los microorganismos se utilizan ampliamente en el tratamiento biológico de residuos sólidos y líquidos (Atlas y Bartha, 2002). Es importante observar a los microorganismos empleados en el tratamiento biológico como una asociación, una comunidad o un consorcio (Eweis *et al.*, 1999).

En la actualidad existe una corriente cada vez más importante en el sentido de utilizar microorganismos, en especial bacterias, algas y hongos, para ayudar a la descontaminación y 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 en principio aislados del propio ambiente de donde han sido seleccionados naturalmente, aunque en una segunda instancia la manipulación genética de los

mismos puede fortalecer considerablemente la capacidad en microorganismos de las colecciones de cultivo y aisladas de ambientes distintos al de interés. Ello está sustentado en la observación de que los microorganismos capaces de habitar en un medio contaminado, y por ende realizar las funciones vitales, poseen en su metabolismo celular dispositivos sumamente efectivos para realizar descontaminación. De conocerse en detalle estos mecanismos, podrían ser aprovechados para purificar el agua, como por ejemplo empleando bacterias capaces de captar metales pesados sobre su pared celular (Steciow, 2005).

Es así, que este avance vertiginoso de la ciencia y el desarrollo tecnológico ha permitido utilizar microorganismos en la descontaminación de las aguas. El utilizar el metabolismo de los microorganismos ha posibilitado la construcción de reactores biológicos a mucho menor costo que los fisicoquímicos, y también la construcción de plantas de tratamiento de sistema mixto, para una mayor eficiencia (Fontúrbel e Ibáñez, 2004). Países desarrollados usan actualmente estos procesos de biominería mediante la intervención de bacterias como *Thiobacillus ferrooxidans*. Algunas especies de *Klebsiella* y *Pseudomonas* tienen capacidad de degradación de reactivos contaminantes. Así mismo, se reconoce la habilidad de algunos microorganismos o de sus enzimas, para degradar bajo ciertas condiciones al cianuro reactivo, empleado en la lixiviación y recuperación de oro y plata (Saigi y López, 2004).

2.2.3 Curvas de crecimiento

La curva del crecimiento bacteriano resulta de la representación gráfica de la determinación periódica del número de células viables por mililitro que existen en un líquido inoculado con células microbianas provenientes de un cultivo que ha crecido previamente hasta la saturación.

Las curvas de crecimiento microbiano, de forma general, poseen cuatro fases en el tiempo (Figura 1) (Fontúrbel e Ibañez, 2004; Henry y Heinke, 1999):

- A. Fase de latencia
- B. Fase de crecimiento logarítmico (fase exponencial)
- C. Fase de crecimiento menguante (fase estacionaria)
- D. Fase endógena (fase de muerte)

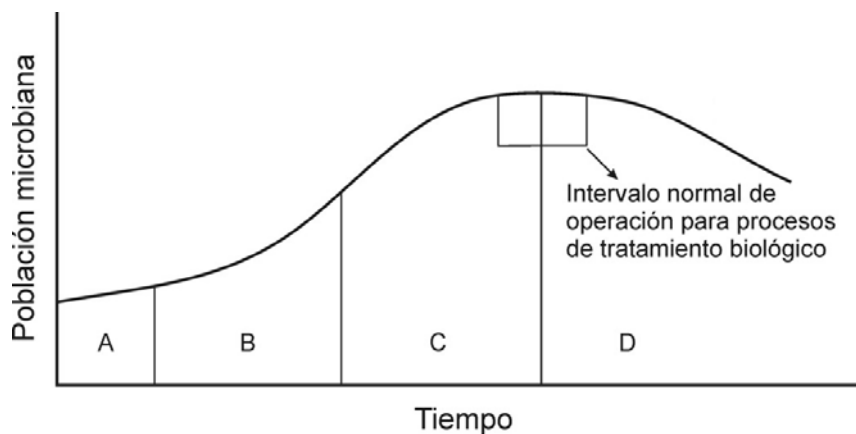


Figura 1. Crecimiento microbiano en un cultivo discontinuo
Fuente: Fontúrbel e Ibañez (2004)

La fase de latencia consiste en la adaptación de las células microbianas a su nuevo ambiente. En esta fase, las células microbianas se encuentran empobrecidas en cuanto a metabolitos y enzimas, esto debido a las condiciones desfavorables que representaba el cultivo previo. Por lo anterior, en este lapso de tiempo se forman las enzimas y los metabolitos intermedios hasta alcanzar las concentraciones necesarias para reiniciar el crecimiento.

La fase exponencial, como el nombre lo indica, en esta fase las células se encuentran en un estado de crecimiento sostenido. Se sintetiza nuevo material celular a una tasa constante, pero éste material es en sí catalítico y la masa aumenta de manera exponencial. Lo anterior continúa hasta que uno o más nutrientes se agoten, o hasta que se acumule tal cantidad de metabolitos tóxicos que se inhiba el crecimiento. El crecimiento se denomina exponencial porque la biomasa se incrementa exponencialmente con respecto al tiempo. De lo anterior se deriva que, si graficamos el logaritmo de la concentración de la biomasa (o celular) en función del tiempo, como ocurre en la curva del crecimiento, obtendremos una línea recta como representación de esta fase. Esta fase puede prolongarse indefinidamente si las células se transfieren repetidamente a un medio nuevo (fresco) de composición idéntica al anterior.

Ante el agotamiento de nutrientes en el medio o la acumulación de metabolitos tóxicos el crecimiento cesa por completo después de un periodo en la tasa de crecimiento, lo cual corresponde a la fase estacionaria. No obstante, por lo general en esta fase se puede observar recambio celular, lo cual se debe a que, aunque existe una pérdida lenta de células por muerte, dicha pérdida se

compensa exactamente por la formación de nuevas células a través de crecimiento y división. Así, la cifra de células viables se mantiene constante, aunque en realidad en el conteo aumente poco a poco el número de células, si se cuentan también las muertas. La duración de esta fase depende de la naturaleza del microorganismo y de las condiciones del medio.

La fase conocida como fase de muerte, representa el decremento de células debido al aumento progresivo de la tasa de mortalidad, misma que tarde o temprano alcanza un valor sostenido. Por lo general, una vez que la mayoría de las células ha muerto, la tasa de mortalidad disminuye bruscamente, por lo que un número pequeño de sobrevivientes pueden persistir en cultivo por meses o años. Dicha persistencia puede deberse a que las células consiguen crecer gracias a los nutrimentos liberados por las células que mueren y se lisan, observándose recambio celular (Brooks *et al.*, 1999).

2.2.4 Cinética de reacciones

La cinética de las reacciones del proceso de biosorción depende de varios factores: La concentración de la solución a tratar, las soluciones de altas concentraciones pueden inhibir el crecimiento bacteriano y retardar la velocidad de reacción. La temperatura, a una mayor temperatura puede acelerar las reacciones químicas pero también los microorganismos mueren. El pH es un factor importante que influye en el desarrollo microbiano y en la absorción de metales pesados.

En los factores ambientales se incluyen humedad, aireación, temperatura, pH y disponibilidad de nutrientes. Dentro de las propiedades del sustrato que

pueden afectar la biotransformación se incluyen toxicidad, concentración, solubilidad, separación de la fase sólida y estructura química. Entre los factores microbiológicos se encuentran la presencia de microorganismos con rutas para la degradación de los compuestos de interés, aclimatación de las poblaciones microbianas y factores ecológicos (Eweis *et al.*, 1999).

2.3 Clasificación de los reactores

Los equipos en los que se efectúan reacciones homogéneas pueden ser de tres tipos generales: discontinuos (lotes), continuos de flujo estacionario, y semicontinuos de flujo no estacionario.

Los reactores discontinuos son sencillos de operar e industrialmente se utilizan cuando se han de tratar pequeñas cantidades de sustancias. Los reactores continuos son ideales para fines industriales cuando han de tratarse grandes cantidades de sustancia y permiten obtener un buen control de la calidad del producto. Los reactores semicontinuos son sistemas más flexibles pero de más difícil análisis y operación que los anteriores; en ellos la velocidad de la reacción puede controlarse con una buena estrategia en la dosificación de los reactantes (Borzacconi y López, 2003).

El punto de partida para el diseño de un reactor isotérmico es un balance de materia referido al reactante (o producto), que se realiza sobre determinado volumen de control.

$$\left[\begin{array}{l} \text{Entrada de} \\ \text{reactante al} \\ \text{volumen de} \\ \text{control} \end{array} \right] = \left[\begin{array}{l} \text{Salida de} \\ \text{reactante} \\ \text{del} \\ \text{volumen} \\ \text{de control} \end{array} \right] + \left[\begin{array}{l} \text{Desaparición} \\ \text{de reactante} \\ \text{por reacción} \\ \text{química} \end{array} \right] + \left[\begin{array}{l} \text{Acumulación} \\ \text{de reactante} \\ \text{en el} \\ \text{volumen de} \\ \text{control} \end{array} \right]$$

En un reactor discontinuo ideal no hay entrada ni salida de reactante. Se supone además que el reactor está perfectamente agitado, esto es, que la composición es la misma en todos los puntos del reactor para un instante de tiempo dado. Como la entrada y la salida son nulas el balance de materia queda:

$$\left[\begin{array}{l} \text{Desaparición} \\ \text{de reactante} \\ \text{por reacción} \\ \text{química} \end{array} \right] = - \left[\begin{array}{l} \text{Acumulación} \\ \text{de reactante} \\ \text{en el volumen} \\ \text{de control} \end{array} \right]$$

Todos los puntos tienen la misma composición, el volumen de control para realizar el balance es todo el reactor. Evaluando los términos:

$$r_A V = - \frac{dN_A}{dt} \quad \text{(Ecuación 1)}$$

Y teniendo en cuenta que $N_A = N_{A0}(1 - X_A)$ resulta

$$r_A V = N_{A0} \frac{dX_A}{dt} \quad \text{(Ecuación 2)}$$

Integrando se obtiene la ecuación de diseño para el reactor discontinuo:

$$t = N_{A0} \int_0^{X_A} \frac{dX_A}{r_A V} \quad \text{(Ecuación 3)}$$

Si el volumen de reacción permanece constante puede expresarse en función de la concentración de reactivo $C_A = N_A / V$

$$t = C_{A0} \int_0^{X_A} \frac{dX_A}{r_A} = - \int_{C_{A0}}^{C_A} \frac{dC_A}{r_A} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Este reactor por lotes o intermitente se caracteriza por la variación en el grado de reacción y en las propiedades de la mezcla reaccionante con el transcurso del tiempo (Smith, 1991).

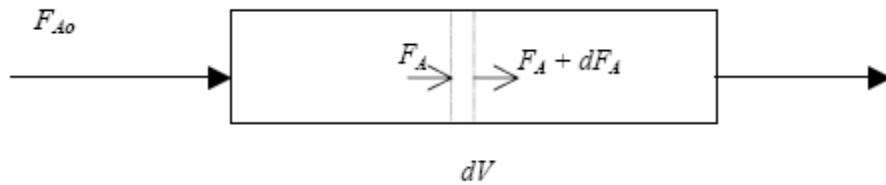
Un reactor por lotes no tiene flujo de entrada de reactivos ni flujo de salida de productos mientras la reacción se está efectuando. En casi todos los reactores por lotes, cuanto más tiempo permanezca un reactivo en el reactor, más de él se convertirá en producto hasta que se llegue al equilibrio o bien se agote el reactivo (Fogler *et al.*, 2001).

El reactor del tipo de flujo continuo, en el cual el grado de reacción puede variar con respecto a la posición en el reactor, pero no en función del tiempo. Por tanto, una de las clasificaciones de los reactores se basa en el método de operación (Smith, 1991). Normalmente, la conversión aumenta con el tiempo que los reactivos permanecen en el reactor. En el caso de los sistemas de flujo continuo, este tiempo por lo regular se incrementa al aumentar el volumen del reactor; por lo tanto, la conversión X es función del volumen del reactor V (Fogler *et al.*, 2001).

El reactor tubular de flujo en pistón (RTFP) se caracteriza porque el flujo es ordenado, sin ningún elemento del mismo sobrepase o se mezcle con cualquier

otro elemento situado antes o después de aquel, esto es, no hay mezcla en la dirección de flujo (dirección axial). Como consecuencia, todos los elementos de fluido tienen el mismo tiempo de residencia dentro del reactor (Borzacconi y López, 2003).

Como la composición del fluido varía a lo largo del reactor el balance de materia debe realizarse en un elemento diferencial de volumen transversal a la dirección del flujo.



Entrada = Salida + Desaparición por reacción

$$F_{A0} = F_A + dF_A + r_A dV$$

Teniendo en cuenta que $dF_A = d[F_{A0}(1-X_A)] = -F_{A0}dX_A$ por sustitución queda

$$F_{A0}dX_A = r_A dV \quad \text{(Ecuación 5)}$$

Que integrada queda

$$\int_0^V \frac{dV}{F_{A0}} = \int_0^{X_{Af}} \frac{dX_A}{r_A} \quad \text{(Ecuación 6)}$$

O bien

$$\tau = \frac{V}{V_0} = C_{A0} \int_0^{X_{Af}} \frac{dX_A}{r_A} \quad \text{(Ecuación 7)}$$

En algunos casos es conveniente dividir la corriente de salida de un reactor en flujo pistón haciendo retornar parte de ella a la entrada del reactor.



La relación de recirculación se define

$$R = \frac{\text{caudal que se recicla}}{\text{caudal que sale}} \quad (\text{Ecuación 8})$$

Planteando la ecuación de diseño para el reactor (dentro del lazo de reciclo) sin expansión

$$\frac{V}{v_1} = - \int_{C_{A1}}^{C_{Af}} \frac{dC_A}{r_A} \quad (\text{Ecuación 9})$$

Si se considera que no hay expansión ni contracción en el reactor, planteando en el punto de unión de la entrada y el reciclo, $V_1 = (R + 1) V_0$ y además $C_{A1} = (C_{A0} + C_{Af}) / (R + 1)$, por lo que la ecuación de diseño del reactor queda:

$$\tau = \frac{V}{V_0} = -(R + 1) \int_{\left(\frac{C_{A0} + RC_{Af}}{R+1}\right)}^{C_{Af}} \frac{dC_A}{r_A} \quad (\text{Ecuación 10})$$

Otra de las clasificaciones se refiere a la forma. Si un recipiente de laboratorio esta equipado con un agitador eficiente, la composición y la temperatura de la masa reaccionante tenderán a ser iguales en todas las zonas del reactor. Un recipiente en el cual existe uniformidad de propiedades recibe el

nombre de reactor de tanque con agitación (o con buen mezclado) o RTA (Borzacconi y López, 2003).

2.3.1 Biorreactores

La construcción de biorreactores se basa en un principio muy sencillo: hacer que los contaminantes se conviertan en el sustrato (alimento) de los microorganismos, y que estos, al mismo tiempo que se alimentan y aumenta su población, descontaminan el agua. Para la construcción de un biorreactor es necesario conocer el tipo de microorganismos con los que se está trabajando y la curva de crecimiento característica de ellos (Fontúrbel e Ibañez, 2004).

El factor clave de un biorreactor es lograr mantener a los microorganismos en la fase de crecimiento la mayor parte del tiempo que sea posible, es decir, mantener a la población microbiana a su máximo nivel, para optimizar la eficiencia de los procesos de degradación. Esto se logra regulando las condiciones del medio (temperatura, pH, aireación y disponibilidad de nutrientes) y los flujos de entrada y salida, de manera que nunca falte alimento y no se llegue a la fase de muerte ó endógena (Eweis *et al.*, 1999; Fontúrbel e Ibañez, 2004).

2.3.1.1 Procesos aerobios y anaerobios

Dentro de los procesos biológicos empleados para la construcción de biorreactores, existen dos tipos fundamentales de procesos: los aerobios y los anaerobios.

Los procesos aerobios son aquellos que necesitan de oxígeno. Existen procesos aerobios estrictos, que son aquellos que solamente pueden funcionar si hay oxígeno, y los procesos aerobios facultativos, que son los que pueden alternar con anaerobios, de acuerdo a la concentración de oxígeno disponible.

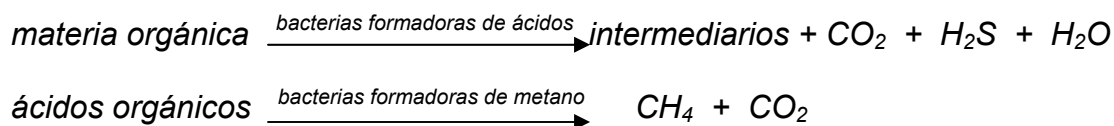
De manera general, los procesos aerobios tienen la siguiente reacción:



Como se puede observar en la reacción anterior, fundamentalmente, el metabolismo aerobio se encarga de catalizar moléculas más grandes en bióxido de carbono, agua y células nuevas. Cabe mencionar que los diferentes grupos de microorganismos tienen metabolismos diferentes, y por lo tanto son capaces de catalizar una amplia gama de sustancias, aunque a veces se obtienen otros productos secundarios además de los mencionados.

Los procesos aerobios son muy eficientes, funcionan con una amplia gama de sustancias posibles de degradar, en ciclos relativamente sencillos, son estables, se tiene rápida conversión de los contaminantes orgánicos en células microbianas y su operación relativamente libre de malos olores.

Contrario a los aerobios son los procesos anaerobios, que se realizan en ausencia de oxígeno por grupos de bacterias heterótrofas, que en un proceso de licuefacción/gasificación en dos etapas, convierten un 90% de la materia orgánica presente primero en intermediarios (productos finales parcialmente estabilizados que incluyen ácidos orgánicos y alcoholes) y después en metano y dióxido de carbono gaseosos:



El proceso se aplica de manera universal en los digestores anaerobios calientes, en donde los lodos primarios y biológicos se mantienen durante unos 30 días a 35° C para reducir su volumen (alrededor del 30%) y su capacidad de putrefacción, con lo cual se simplifica la eliminación de lodos. La ventaja de este tipo de digestión es que genera energía en forma de metano y la producción de lodos es solo del 10% (Henry y Heinke, 1999; Fontúrbel e Ibañez, 2004).

2.3.2 Proceso de biosorción

A partir de la década de los ochenta se empezaron a demostrar las capacidades que tienen algunos microorganismos para remover grandes cantidades de metales pesados de efluentes líquidos. Estas capacidades han sido estudiadas con la finalidad de desarrollar nuevos sistemas de tratamientos que puedan reemplazar de una manera eficiente a los métodos convencionales (Reyes *et al.*, 2006).

El término de biosorción se utiliza para referirse a la captación de metales que llevan diferentes microorganismos (vivos o muertos), a través de mecanismos fisicoquímicos como la absorción o el intercambio iónico (Cañizares-Villanueva, 2000).

Cuando se utiliza biomasa viva, los mecanismos metabólicos de captación también pueden contribuir en el proceso, ya que está basada en la absorción de las especies metálicas mediante los mecanismos de acumulación en el citoplasma

de los microorganismos, considerando su transporte a través de la membrana celular, gracias a las diferentes proteínas de transporte (Figura 2). Estos dos procesos intervienen en la biorremediación de metales pesados en acuíferos (Sanz, 2005; Reyes *et al.*, 2006).

Las interacciones con la superficie celular dependen del tipo de bacteria, ya que el metal interactúa con los grupos específicos cargados negativamente. A nivel intracelular, como consecuencia de la acumulación del metal ocurren transformaciones enzimáticas o la síntesis de proteínas específicas conocidas como metalotioninas. La síntesis de metalotioninas en bacterias constituye un mecanismo posible para explicar los procesos de biosorción de metales pesados, y representa una herramienta potencial para el tratamiento biológico de ambientes contaminados por metales. Las interacciones a nivel intracelular entre las bacterias y los metales pesados, se inician con un proceso activo conocido como bioacumulación, que es la absorción de iones metálicos, dependiente del metabolismo celular y capaz de atrapar mayor cantidad de iones (Suárez y Reyes, 2002).

El proceso de biosorción involucra una fase sólida (sorbente) y una fase líquida (solvente, que es normalmente el agua), que contiene las especies disueltas que van a ser sorbidas (sorbato, como iones metálicos). Debido a la gran afinidad del sorbente por las especies del sorbato, este último es atraído hacia el sólido y enlazado por diferentes mecanismos. Este proceso continúa hasta que se establece un equilibrio entre el sorbato disuelto y el sorbato enlazado al sólido. La afinidad del sorbente por el sorbato determina su distribución entre fases sólidas y

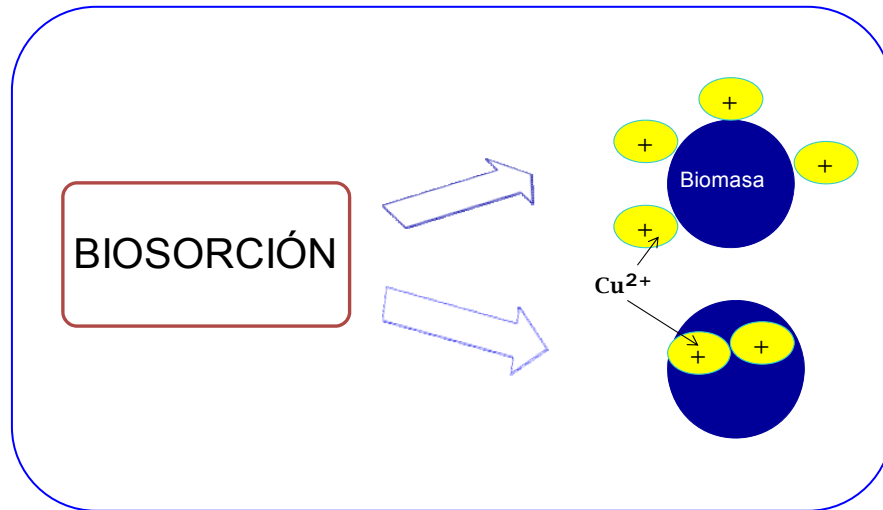


Figura 2. Mecanismos de interacción entre metales pesados y microorganismos

líquidas. La calidad del sorbente está dada por la cantidad del sorbato que puede atraer y retener en forma inmovilizada. Algunos tipos de biomasa que absorben metales en cantidades elevadas, sirve como base para los procesos de biosorción de metales, previendo su uso particularmente como medio muy competitivo para la detoxificación de efluentes industriales, que contienen metales y para la recuperación de metales preciosos (Cañizares-Villanueva, 2000).

El objetivo de la biosorción se centra en dos necesidades que surgen de las actividades mineras: Proteger el medio ambiente de los metales tóxicos contenidos en los efluentes líquidos, eliminándolos en los residuos, previo a su disposición, para recuperar los metales que se encuentran en baja concentración en los procesos mineros. Estos objetivos los sustentan razones de orden legal, social y productivo en los países industrializados, la toxicidad de los denominados

metales pesados, confirma su impacto sobre el medio ambiente y la salud de las poblaciones. En estas circunstancias, la búsqueda de tecnologías para la eliminación y recuperación metálica, se orienta por criterios de eficiencia y bajo costo. La ventaja de la biosorción está en que cumple con estos requisitos: Es una tecnología limpia; utiliza materiales naturales o los residuos de la industria (utilizando productos crudos, no sintéticos), es al mismo tiempo una técnica de fácil implementación (Flores *et al.*, 2001).

2.4 Soportes de inmovilización de biomasa

Como el diseño de reactores para la remoción de metales pesados a partir de efluentes líquidos debe considerar un contacto óptimo entre estos y la biomasa, se ha considerado el uso de diferentes tipos de soporte para la inmovilización de la biomasa con la finalidad de lograr una mayor eficiencia en la eliminación de metales pesados. Esto logra evitar que el biosorbente sea removido del reactor en la corriente de salida y al mismo tiempo se obtiene una mayor estabilidad mecánica disminuyendo de esta manera los esfuerzos de corte que podrían dañar a la estructura del microorganismo lo cual afecta a su eficiencia de eliminación de metales pesados (Reyes *et al.*, 2006).

2.4.1 Tipos de soportes utilizados

La biomasa viva inmovilizada, tiene primero que tomar la forma de biopelícula sobre soportes preparados a partir de una variedad de materiales inertes. Uno de los materiales que se han estudiado como soporte de biomasa es el carbón activado por su porosidad y su gran superficie específica, además de ser

un producto abundante que se obtiene como subproducto de la producción de aceite a partir de coco, oliva y el procesamiento de caña de azúcar (Reyes *et al.*, 2006). Otros materiales que se han utilizado como soporte de biomasa son la sílica, gel de poliacrilamida y poliuretano, incluyen el agar, la celulosa, los alginatos, las poliacrilamidas, la sílica gel, arenas, fibras textiles, alginato de calcio, polisulfona, glutaraldehído y otros compuestos orgánicos, y se han utilizado para la eliminación de metales pesados (Cañizares-Villanueva, 2000; Gupta *et al.*, 2000).

Existen otros materiales que pudieran ser utilizados para soportes de biomasa, como son las zeolitas naturales de las que se conocen importantes aplicaciones industriales debido a su gran afinidad por el agua y que sus cavidades solamente permiten el paso de moléculas de cierto tamaño. Se han empleado como aditivos en alimentos para animales, como mejoradores de suelo en la agricultura debido a que incrementan la retención de nitrógeno y de la humedad de los suelos, y como catalizadores en los procesos industriales de refinación, petroquímica y química fina (Leyva-Ramos *et al.*, 2005).

2.4.2 Zeolita natural

Las zeolitas son aluminosilicatos cristalinos, tridimensionales, microporosos, basados en un esqueleto estructural aniónico rígido, con canales y cavidades bien definidas. Estas cavidades contienen cationes metálicos intercambiables (Na^+ , K^+ , etc.) y pueden también retener moléculas huésped removibles y reemplazables (agua en las zeolitas naturales). Hasta la fecha se han caracterizado aproximadamente 40 estructuras de zeolitas naturales y se han desarrollado más de 130 estructuras sintéticas. Las zeolitas naturales más importantes son la

analcima, chabazita, clinoptilolita, erionita, ferrierita, heulandita, laumontita, mordonita y filipsita (Leyva-Ramos *et al.*, 2001).

Las zeolitas están compuestas por aluminio, silicio, sodio, hidrógeno y oxígeno. La estructura cristalina está basada en las tres direcciones de la red con SiO_4 en forma tetraédrica con sus cuatro oxígenos compartidos con los tetraedros adyacentes. Las propiedades físicas proveen aspectos únicos para una variedad amplia de aplicaciones prácticas. En la Figura 3 se muestra la estructura tetraédrica básica de la zeolita (Servin, 2006).

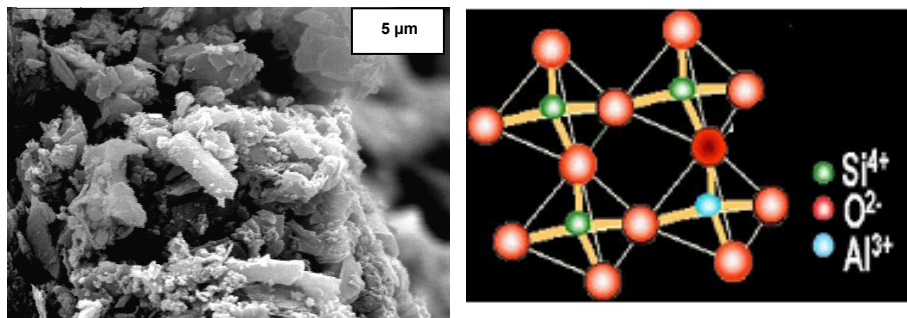


Figura 3. Estructura tetraédrica básica de las zeolitas

Las propiedades físicas de la zeolita es que poseen características brillantes, dureza y resistencia al desgaste. Las aplicaciones de las zeolitas naturales hacen uso de uno o más de sus propiedades químicas, que generalmente incluye la adsorción, el intercambio de iones y catálisis. Estas propiedades están en función de la estructura del cristal de cada especie, su estructura y composición catiónica (Servin, 2006).

La clinoptilolita es de los minerales zeolíticos más conocidos por sus usos y aplicaciones. Es una zeolita natural formada a partir de cenizas volcánicas en

lagos o aguas marinas hace millones de años. La clinoptilolita, es de las más estudiadas y es considerada de mayor utilidad, ya que se conoce como adsorbente de ciertos gases tóxicos: como el sulfuro de hidrógeno y el dióxido de azufre. En realidad son pocos los países que han contado con yacimientos en explotación, entre ellos: Japón, Italia, Estados Unidos, Rusia, Hungría, Bulgaria, Cuba, Yugoslavia y México (Nevarez y Astorga, 2007).

Se reconoce la capacidad de las zeolitas naturales de adsorber metales pesados y otro tipo de contaminantes de aguas. En ciertos casos, se requiere un pre-tratamiento de la zeolita para modificar o mejorar sus propiedades de adsorción (Aguayo y Mejía, 2006).

2.5 Modelos teóricos para el tratamiento de datos experimentales del proceso de biosorción

Los métodos biológicos tales como bioacumulación-bioadsorción para retirar los iones del metal pesado pueden proporcionar una alternativa atractiva a los métodos fisicoquímicos (Kapoor y Viraraghavan, 1995; Hussein *et al.*, 2004).

Los fenómenos de biosorción se caracterizan por la retención del metal mediante una interacción fisicoquímica del metal con ligandos, pertenecientes a la superficie celular (Figura 4). Esta interacción se produce con grupos funcionales expuestos hacia el exterior celular pertenecientes a partes de moléculas componentes de las paredes celulares, como por ejemplo carboxilo, amino, hidroxilo, fosfato y sulfhidrilo. Es un mecanismo de cinética rápida, que no presenta una alta dependencia con la temperatura y en muchos casos, puede

estudiarse en detalle mediante la construcción de los modelos de isothermas de Langmuir y Freundlich (Vullo, 2003).

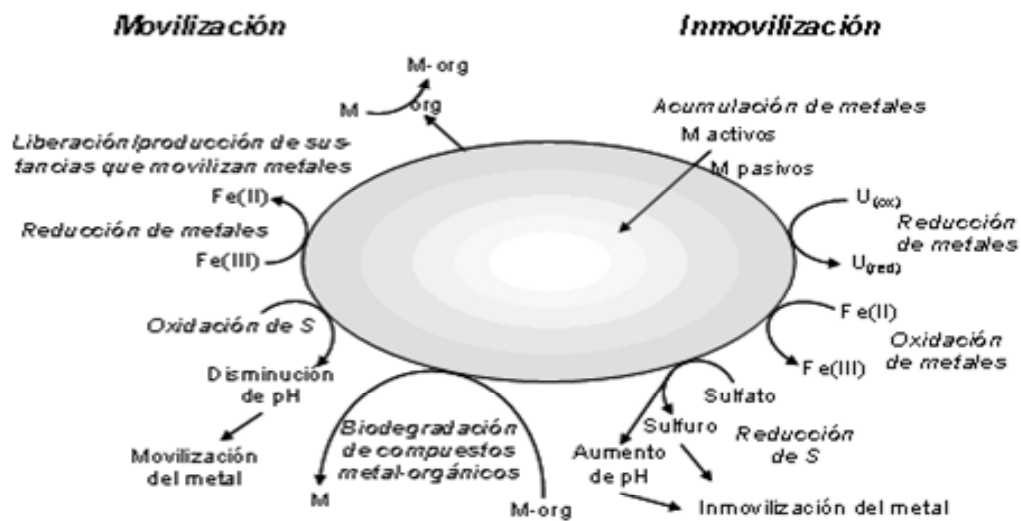


Figura 4. Interacción entre metales y microorganismos
Fuente: INE, 2005

Para el análisis de la operación de adsorción es necesario considerar las relaciones de equilibrio, la rapidez de adsorción y los balances de masa y energía del sistema (Duarte, 1997). La relación de equilibrio, que se expresan normalmente como isothermas de adsorción, son gráficas en las que el eje de las abscisas está dado por la concentración de soluto en equilibrio de la solución, y el eje de las ordenadas está conformado por la concentración de soluto en equilibrio en la superficie del adsorbente. Cualquier isoterma de adsorción que es cóncava hacia las abscisas o sea cuando $n < 1$, se dice que es favorable, ya que se puede obtener una buena adsorción, aun en soluciones diluidas. Las isothermas cóncavas

hacia el eje de las ordenadas o sea para $n > 1$, se llaman desfavorables (Tejeda *et al.*, 1995).

La capacidad de biosorción de metales de los diferentes biosorbentes es evaluada generalmente con los modelos de adsorción de Langmuir y Freundlich.

En la Figura 5 se muestra los tipos de isothermas más comunes. La isoterma lineal puede ser descrita por la ecuación de una línea recta que pasa por el origen, de la forma:

$$q = K \cdot y \quad (\text{Ecuación 11})$$

Donde:

q = Cantidad de soluto adsorbido por cantidad de absorbente

y = Concentración de soluto en solución

K = Constante de equilibrio

La isoterma de Freundlich se describe por medio de una ecuación exponencial empírica de la forma:

$$q = K \cdot y^n \quad (\text{Ecuación 12})$$

Donde:

n = Constante adimensional

K = Constante de equilibrio cuyas unidades dependen de n

n y K se determinan experimentalmente.

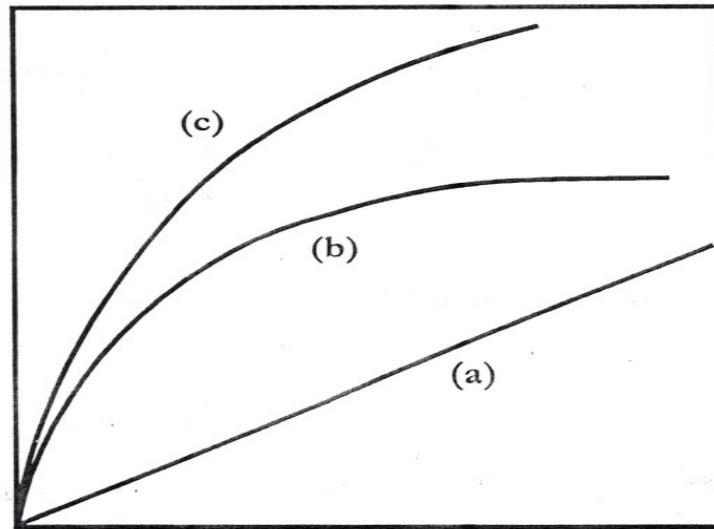


Figura 5. Isothermas de adsorción más comunes.
 (a) Lineal, (b) Langmuir, (c) Freundlich

La isoterma de Langmuir se representa por la siguiente expresión:

$$q = \frac{q_0 Ce}{K_d + Ce} \quad \text{(Ecuación 13)}$$

q_0 y K_d se determinan experimentalmente en una grafica de q^{-1} vs Ce^{-1} en la cual K_d/q_0 es la pendiente y $1/q_0$ es la ordenada en el origen de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\frac{1}{q} = \frac{K_d}{q_0 Ce} + \frac{1}{q_0} \quad \text{(Ecuación 14)}$$

Teóricamente el modelo de Langmuir representa una interacción soluto-adsorbente de segundo orden y puede expresarse de la siguiente forma: toda la superficie tiene la misma actividad para la adsorción; no hay interacción entre las

especies adsorbidas; toda la adsorción tiene lugar mediante el mismo mecanismo y el grado de adsorción es inferior a una capa monomolecular completa en la superficie (Smith, 1995).

2.6 Investigaciones relacionadas

La preocupación por la contaminación ambiental, ha dado como resultado investigación más intensa y desarrollo de tecnologías sustentables, así como una normatividad cada vez más estricta. Como resultado, la introducción de tecnologías limpias en los procesos industriales ha logrado disminuir las descargas de sustancias contaminantes al ambiente. Sin embargo, en la mayoría de las empresas todavía se generan aguas residuales con concentraciones de sustancias contaminantes de consideración (Reyes *et al.*, 2006).

En México, como consecuencia del desarrollo industrial, se registra una creciente y preocupante contaminación ambiental, sobre todo debido a la poca educación ambiental durante varios siglos de actividad minera y, desde hace décadas, por la intensa explotación petrolera. La industria minera es una de las actividades económicas de mayor tradición en México, la cual es mayoritariamente metálica y se dedica principalmente a la producción de Cu, Zn, Pb, Ag y Au. Esta actividad tiene un alto impacto ambiental, ya que afecta desde el subsuelo hasta la atmósfera, incluyendo suelos y cuerpos de agua. Debido al procesamiento de los recursos minerales, se han generado grandes cantidades de residuos sólidos, líquidos y gaseosos que han ocasionado muchos sitios contaminados a lo largo de todo el país (Volke *et al.*, 2004).

Un ejemplo de contaminación debido a la actividad minera lo constituye el Río San Pedro, localizado en la porción noroeste del Estado de Sonora, México. Este río ha recibido en varias ocasiones desechos ácidos provenientes del Depósito “Concentradora Vieja”, el cual se localiza dentro del área de explotación del mineral de cobre; así como descargas de aguas residuales (aguas negras) sin tratamiento provenientes de un sector de la ciudad de Cananea, Sonora. Las principales consecuencias dañinas de este tipo de contaminación son el pH ácido, así como la formación de sedimentos de color amarillo originados por la oxidación del hierro (Gomez-Álvarez *et al.*, 2007).

La cuenca del Río San Pedro se encuentra al norte del Estado de Sonora, México, entre los paralelos 30° 52' y 31° 20' latitud norte y los meridianos 110° 06' y 110° 31' longitud Oeste. Partiendo desde la ciudad de Cananea, en el Estado de Sonora, a 1660 metros sobre el nivel del mar (MSNM) y hacia el norte, hasta la estación hidrométrica Palominas en el Estado de Arizona (EUA), aproximadamente a 1280 MSNM (INEGI, 1993).

La contaminación de las corrientes formadoras del río San Pedro ha sido evidente, ya que ha recibido en varias ocasiones desechos ácidos con elevados niveles de metales pesados provenientes del almacenamiento de aguas ácidas ferrocupríferas. Esto ha ocasionado problemas a nivel internacional con el vecino Estado de Arizona, ya que dichos desecho ácidos llegaron al río Gila provocando una gran mortandad de peces (Gómez-Álvarez *et al.*, 2004).

Con el fin de eliminar metales tóxicos de aguas de desecho, existen diferentes métodos y destacan: filtración, electro-deposición, resinas de

intercambio iónico, osmosis, micro-precipitación, etc. obteniendo satisfactorios resultados. Desafortunadamente, dichos métodos no encuentran efectividad antes bajas concentraciones de metales pesados en solución, tornándose altamente costosos y de bajo rendimiento a esas condiciones (Navarro *et al.*, 2006).

El uso de microorganismos como herramientas de descontaminación es bastante reciente. Los avances más grandes en el tema se realizaron luego del derrame de petróleo del Exxon Valdez en las costas de Prince William, en Alaska (1990). Puesto que este desastre ecológico dejó gran cantidad de petróleo en el agua, se buscaron formas alternativas de lidiar con la contaminación.

Los científicos que desarrollaron las primeras experiencias exitosas de biorremediación de petróleo a gran escala en Alaska, se basaron en la premisa de que todos los ecosistemas naturales poseen microorganismos capaces de metabolizar los compuestos tóxicos y xenobióticos, aunque estos suelen encontrarse en proporciones menores al 1% de la comunidad microbiana. Esta premisa se cumplió en Alaska y en casi todos los casos estudiados posteriormente (Fontúrbel e Ibañez, 2004).

Varios estudios han demostrado que la biomasa de diferentes especies de bacterias, hongos y algas son capaces de concentrar en sus estructuras iones metálicos que se encuentran en ambientes acuáticos (Basso *et al.*, 2002).

Se han detectado bacterias como del género *Pseudomonas* de ambientes mineros que presenta resistencia a metales pesado como Cd, Cu y Pb (Rivas *et al.*, 2004). Algunas especies de microalgas marinas para biosorción de cadmio (Basso *et al.*, 2002). Se ha determinado la bioadsorción de cadmio con biomasa

celular a partir de quince hongos (Acosta *et al.*, 2007) y para la remoción de cromo, plomo y cobre de aguas residuales, se ha utilizado *Staphylococcus saprophyticus* (Ilhan *et al.*, 2004). En otras investigaciones se tiene conocimiento de cepas microbianas que tienen la capacidad de biorremediar suelos contaminados con distintos metales y compuestos orgánicos. Se sabe que *Escherichia coli* es capaz de bioacumular cadmio en concentraciones de 5 mg/L, así como cobre y zinc que son tomados del medio de cultivo, mediante un proceso en el cual ocurre una unión a péptidos secretados por la bacteria (Lasat, 2002).

Leung *et al.* (2000) aislaron especies de *Pseudomonas* sp, *Bacillus* sp y *Aeromonas* sp de efluentes industriales y aguas residuales municipales, para llevar a cabo la biosorción de metales pesados y reportan a *Pseudomonas cepacia* como una de las cepas que tiene buena capacidad de biosorción de cobre y plomo. En estudios de suelos contaminados tanto con metales pesados como con contaminantes orgánicos, utilizando los géneros *Pseudomonas* sp, *Bacillus* sp y *Arthrobacter* sp, se ha encontrado que resisten distintas concentraciones de cadmio. Algunas especies de *Pseudomonas* sp 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* sp y *Arthrobacter* sp, resisten una concentración de 20 y 50 µg/mL del metal, respectivamente, por medio de un mecanismo extracelular, formando una pared polimérica extracelular a la cual se une el metal (Mijares, 2003).

Tada e Inoue (2000), al usar las bacterias *Sphingomonas paucimobilis* y *Burkholderia cepacia*, encontraron que son altamente susceptibles a metales pesados y potencialmente útiles como sensores para evaluar la toxicidad.

En la Tabla 1, se reportan algunos organismos que han sido utilizados para adsorber metales.

Las ventajas de los biosorbentes en comparación con los sorbentes tradicionales son numerosas, entre ellas el bajo precio, ya que muchos son residuos industriales sin ningún valor a diferencia de otros materiales con un elevado costo y que requieren de tratamientos previos, como sería el caso del carbón activado. Otra ventaja de los biosorbentes es su disponibilidad ya que muchos de ellos se encuentran de forma abundante en la naturaleza. Un aspecto importante para que los biosorbentes puedan sustituir a los tratamientos convencionales es la regeneración del material. Existen una gran variedad de biosorbentes, materiales tan diversos como el corcho, hueso de oliva, quitosan y el raspo de uva es otro biosorbente que se ha utilizado en la biosorción de cobre (Torres y Juvina, 2005).

En base a lo anterior y debido a que el uso de biomasa viva o muerta es un método que tiene muchas ventajas sobre los tratamientos convencionales, es importante promover este tratamiento para la limpieza de efluentes industriales contaminados con metales pesados. En este sentido, los procesos de biosorción de metales pesados, particularmente aquéllos que utilizan hongos, levaduras y bacterias, podrían encontrar aplicación en México, ya que es un país que cuenta con una industria de fermentación importante, que pudiera proveer de la biomasa

microbiana que sería utilizada como biosorbente. Como en cualquier proceso industrial, entre más cerca se encuentra la fuente de la materia prima (biomasa) del punto de su aplicación, el proceso se vuelve más factible (Cañizarez-Villanueva, 2000).

Tabla 1. Organismos utilizados para biosorber metales pesados

Biosorbente	Metal	Referencia
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cu(II)	Jianlong, 2002 Goksungur <i>et al.</i> , 2003
Biomosas fúngicas (hongos)	Cd(II)	Acosta <i>et al.</i> , 2007
<i>Mucor rouxii</i>	Pb(II), Cd(II), Ni(II), Zn(II)	Yan y Viraraghavan, 2003
<i>Aspergillus niger</i>	Cd(II), Pb(II), Cu(II)	Kappor y Viraraghavan, 1995
<i>Bacillus sp.</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus sphaericus</i> y <i>Bacillus subtilis</i>	Cu(II), Zn(II), Cd (II), Pb (II)	Da Costa y Pereira, 2001
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Pb(II), Cu(II), Cd(II)	Chang <i>et al.</i> , 1997
<i>Sargassum filipendula</i>	Pb(II)	Mesquita <i>et al.</i> , 2007
<i>Thiobacillus Ferrooxidans</i>	Ni(II)	Duarte, 1997
<i>Candida utilis</i>	Cu(II)	Yuan-gang <i>et al.</i> , 2006
<i>Klebsiella pneumoniae</i> y <i>Bacillus subtilis</i>	Cd(II)	Mijares, 2003
<i>Burkholderia cepacia</i> y <i>Escherichia coli</i>	Cu(II)	Nevarez y Astorga, 2007
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Pb(II)	Rivas <i>et al.</i> , 2004
Nipa palm	Pb(II), Cu (II)	Wankasi <i>et al.</i> , 2006
<i>Micrococcus luteus</i> y <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	Cu(II), Ni(II), Zn(II), Pb(II), Cr(II)	Leung <i>et al.</i> , 2000
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Cr (II), Pb(II), Cu(II)	Ilhan <i>et al.</i> , 2004

III. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología empleada se muestra en el diagrama de flujo de la Figura 6 y se presenta en las siguientes secciones.

1. Muestreo y análisis de las aguas del Río San Pedro (sección 3.1).
2. Estudios realizados a las muestras de aguas de aislamiento, caracterización y selección de microorganismos (sección 3.2).
3. Pruebas de biosorción de cobre en sistema por lote con las cepas seleccionadas del aislamiento realizado a las muestras de aguas del río San Pedro (sección 3.3).
4. Pruebas de biosorción de cobre en sistema continuo en un Reactor Aerobio de Flujo Ascendente Empacado con Zeolita (RAEFA-EZ) con un consorcio de bacterias seleccionadas del aislamiento realizado a las muestras de aguas del Río San Pedro (sección 3.4).
5. Estudio cinético de biosorción de cobre con el consorcio bacteriano para determinar la capacidad de adsorción de cobre (sección 3.5).
6. Métodos analíticos empleados durante las pruebas de biosorción de cobre (sección 3.6).
7. Estudios de caracterización a la zeolita por Difracción de Rayos X (DRX), zeolita y biomasa por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Espectroscopia de Energía de Rayos X (EDS) (Sección 3.6).

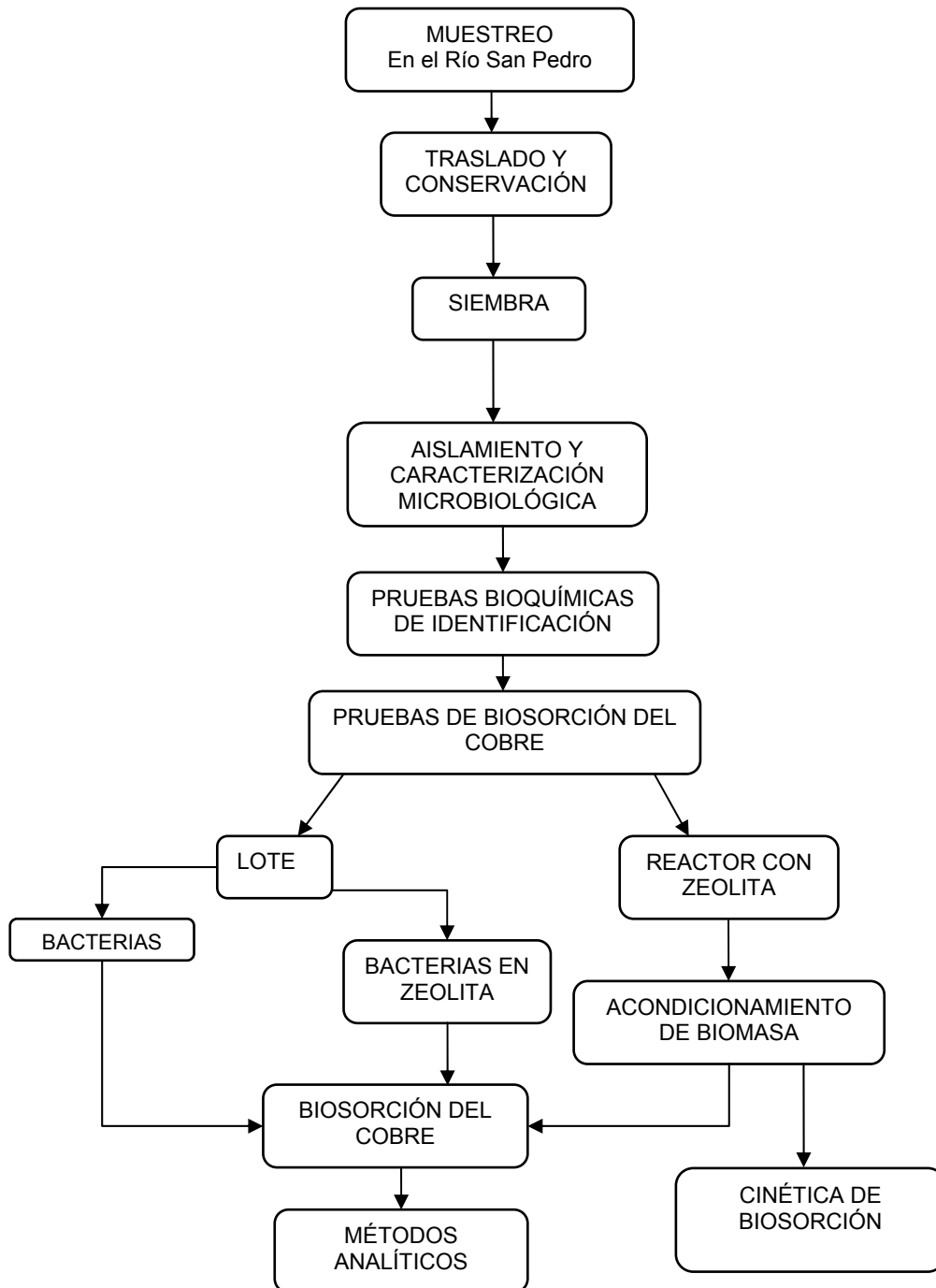


Figura 6. Diagrama de flujo de la metodología utilizada

3.1 Muestreo y Análisis

3.1.1 Localización del muestreo

El muestreo de las aguas fue realizado en el Río San Pedro, en los sitios reportados con concentraciones de cobre de 2.08-136 mg/L (Gómez-Álvarez *et al.*, 2001, 2004, 2007, 2008). El Río San Pedro se encuentra localizado al norte del estado de Sonora, México, entre los paralelos 30 ° 52 ' y 31 ° 20' latitud norte y entre 110 ° 06 ' y 110 ° 31' longitud oeste. Partiendo desde la ciudad de Cananea, en el Estado de Sonora, a 1660 metros sobre el nivel del mar (MSNM) y hacia el norte, hasta la estación hidrométrica Palominas en el estado de Arizona (EUA), aproximadamente a 1280 MSNM (INEGI, 1993). Los lugares muestreados fueron: estación 1 (Jales), latitud 30°59`45" y longitud 110°17`22" y estación 2 (Mezcla), latitud 30°59`57" y longitud 110°17`01".

3.1.1.1 Determinaciones analíticas de temperatura y pH

Las muestras de aguas fueron tomadas de las estaciones 1 y 2, y se les realizaron lecturas de pH y temperatura *in situ*, posteriormente fueron almacenadas en hielo para su transporte al laboratorio de Biorremediación de la Universidad de Sonora-Hermosillo.

3.2 Desarrollo de microorganismos

3.2.1 Aislamiento

Para llevar a cabo el análisis microbiológico y aislamiento de las cepas se recolectaron muestras de agua en recipientes de plástico estériles de 500 mL. Se

realizó enriquecimiento, para asegurar un acondicionamiento favorable de las bacterias que puedan estar estresadas por las condiciones del medio y garantizar un mejor aislamiento.

Se incubaron a 35° C/24 horas y se resembraron en los medios de cultivo específicos seleccionados: agar nutritivo para *Bacillus* sp y *Pseudomonas* sp; agar EMB (Eosina azul de metileno) para *Enterobacterias*; agar M17 para *Enterococcus*. También se hicieron siembras de las muestras de agua directamente en agar PDA (Agar Papa Dextrosa) para el aislamiento de hongos y levaduras, incubándose a 22° C (VWR Scientific modelo 1500E).

3.2.1.1 Caracterización macroscópica y microscópica

La caracterización macroscópica de las colonias se determinó de acuerdo a la observación de su apariencia general: forma, color, tamaño, consistencia, elevación y margen. La caracterización microscópica para observar forma, color y tamaño se llevó a cabo por medio de tinción Gram para bacterias, con colorante azul de lactofenol para hongos y solución salina para levaduras (Aquiahuatl y Pérez, 2004).

3.2.2 Caracterización de cepas

3.2.2.1 Caracterización bioquímica y selección de cepas

A las cepas seleccionadas se les realizaron las siguientes pruebas bioquímicas, con el propósito de conocer su identificación: producción de catalasa, reducción de nitratos, movilidad, producción de indol, utilización de citrato como

fuelle de carbono, producción de ureasa, rojo de metilo, Voges-Proskauer, fermentación de carbohidratos, hidrólisis del almidón, hidrólisis de gelatina e hidrólisis de esculina (Koneman *et al.*, 1999; Carrillo, 2001; Mc Faddin, 2003). Para determinar la resistencia a bajo pH, este se modificó en los medios de cultivo de 3 a 6. El pH se midió con un potenciómetro marca Fisher scientific Accumet, se ajustó con NaOH 10 M (hidróxido de sodio) y HCl_(ac) (ácido clorhídrico).

3.2.2.2 Cinética de crecimiento

En el estudio de la cinética de crecimiento de las bacterias seleccionadas, se utilizaron 5 mL de cultivo de 24 h de ambas cepas y se inocularon en 30 mL de caldo nutritivo. Las condiciones fueron: pH de 5, a 35° C y 100 rpm de agitación. Las muestras se leyeron cada 30 minutos en un espectrofotómetro visible Spectronic 20D+ a 600 nm, sustituyendo las lecturas de transmitancia (%T) en la ecuación siguiente:

$$A = 2 - \log_{10} (\%T) \quad (\text{Ecuación 15})$$

Donde A, es la absorbancia.

Las diferentes fases de la cinética de crecimiento se observan al graficar el log (%T) contra tiempo (Pelcsar *et al.*, 1993; Madigan *et al.*, 2004).

3.2.2.3 Producción de biomasa de las cepas seleccionadas

La producción de biomasa fue cuantificada como el peso seco producido en diferentes matraces por espacio de 48 horas. Se preparó caldo nutritivo fresco y se inoculó la bacteria en 50 mL en 4 matraces diferentes. Se colocaron en

incubadora con agitación (C76 New Brunswick Scientific) a 100 rpm, temperatura de 35° C y pH de 5. Cada 12 horas, uno de los matraces con una cepa diferente, fue centrifugada a 3500 rpm por 5 minutos, se hicieron 2 lavados con agua deionizada, finalmente se secaron en estufa a 105° C durante 2 h y enfriado en el desecador, antes de registrar el peso. El peso seco se expresa en mg/L de biomasa. Se graficó el peso (mg/L) contra el tiempo y por intersección se conoció el tiempo en el que se produjo 1 g/L de biomasa (Plascencia, 2004).

3.3 Biosorción de cobre en sistema por lote

3.3.1 Pruebas de biosorción con bacterias

Las pruebas de biosorción de cobre en sistema por lotes se llevaron a cabo con cada cepa seleccionada, en matraces erlenmeyer de 500 mL, se agregaron 90 mL de una solución sintética de cobre en caldo nutritivo a una concentración inicial de 50 y 100 mgCu(II)/L (CuSO₄ como fuente del ión cobre) y adicionando 10 mL de cultivo de 24 h de cada cepa, con una concentración de biomasa de 1 g/L. Como blanco se usaron 100 mL de la solución de cobre sin bacterias. Las muestras fueron analizadas por duplicado para ambas cepas. Se utilizó el nefelómetro de McFarland para estimar la cantidad de células/mL (Koneman *et al.*, 1999; Monge, 2003). Las condiciones que se establecieron fueron: pH entre 4 y 5, 35° C y 100 rpm de agitación (Duarte, 1997; Oliveira, 2003). Para leer la concentración de cobre por espectrofotometría de absorción atómica (Marca Perkin Elmer, modelo 3100), fueron tomadas 5 mL de muestra cada 15 minutos y se prepararon de la forma descrita por Agemian *et al.* (1975) y Gómez-Álvarez *et*

al. (2007) (Anexo 1 y 2) y la concentración fue calculada de la curva de calibración preparada con solución estándar de cobre. Los límites de detección para cobre fueron de 0.02 mg/L, analizándolas por duplicado.

3.3.2 Pruebas de biosorción con bacterias y zeolita como soporte

Para las pruebas de biosorción con zeolita como soporte, se utilizaron 5 g de zeolita clinoptilolita lavada sin activar (de la región de Rayón, Sonora), seleccionada para la inmovilización de la biomasa. La zeolita se encuentra en gran cantidad en la región, no se conoce que sea tóxica para las bacterias, además de su bajo costo. Se agregaron 90 mL de una solución sintética de cobre a una concentración inicial de 50 y 100 mgCu(II)/L, 10 mL de biomasa de 1 g/L y como blanco, 100 mL de solución de cobre con 5 g de zeolita. Las condiciones fueron las mismas que las pruebas con bacterias. Todos los experimentos se llevaron a cabo por duplicado y los valores promedios de concentración de cobre fueron los utilizados en los análisis de resultados.

La eficiencia de biosorción (E) puede calcularse usando la ecuación:

$$E = \left(\frac{C_o - C_f}{C_o} \right) * 100 \quad (\text{Ecuación 16})$$

Donde:

C_o y C_f cantidades inicial y final de cobre (mg/L).

3.3.3 Constantes de velocidad (K)

Este estudio permite determinar la velocidad de biosorción y la variación de la concentración con respecto al tiempo, la cual se determinó con las siguientes ecuaciones de velocidad de primer orden:

$$\frac{dC}{dt} = K C^n \quad (\text{Ecuación 17})$$

$$K = t^{-1} \ln \frac{C_o}{C_A} \quad (\text{Ecuación 18})$$

Donde,

C_o es la concentración inicial del soluto (cobre), C_A es la concentración remanente en mg/L en el tiempo t y K es la constante de velocidad de reacción en min^{-1} (Maron y Prutton, 2004).

3.4 Biosorción de cobre en sistema continuo

3.4.1 Acondicionamiento del Reactor Aerobio con Flujo Ascendente

Empacado con Zeolita (RAEFA-EZ)

Para llevar a cabo pruebas de biosorción de cobre en sistema continuo primeramente fue acondicionado el reactor de 3 L (Figura 7), el cual consta de una columna de vidrio de 1.20 m de largo por 4.7 cm de diámetro interno, la parte superior del reactor con abertura de 12 cm de diámetro, con cuatro salidas laterales para la toma de muestras. El reactor fue empacado con 1450 g de zeolita clinoptilolita sin activar solo como medio de soporte de biomasa con un tamaño de partícula entre 1 y 6 mm, diámetro de poro $3.22\text{E}-03 \mu\text{m}$ y la relación Si/Al de 4.53. Tanto el medio mineral ácido (Tabla 2) como el aire, se alimentó por la parte

inferior del reactor para favorecer el crecimiento de las bacterias y evitar que el cobre precipite antes de la biosorción. El medio mineral fue inoculado con 350 mL de un cultivo mixto de 10 cepas (*Pseudomonas putida*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Burkholderia cepacia*, dos cepas *Enterobacter* spp y cuatro de *Micrococcus* spp), que se desarrollaron en medio ácido en tres horas y el reactor se mantuvo en recirculación por 15 días. En este tiempo se produjo 1 g/L de biomasa y se estimó la concentración de la biomasa midiendo la absorbancia a una densidad óptica a 600 nm (Spectronic 20D+) y para conocer la cantidad de biomasa producida en células/mL se determinó con la tabla del nefelómetro de McFarland, descrita por Koneman *et al.* (1999) y Monge (2003) (Anexo 3).

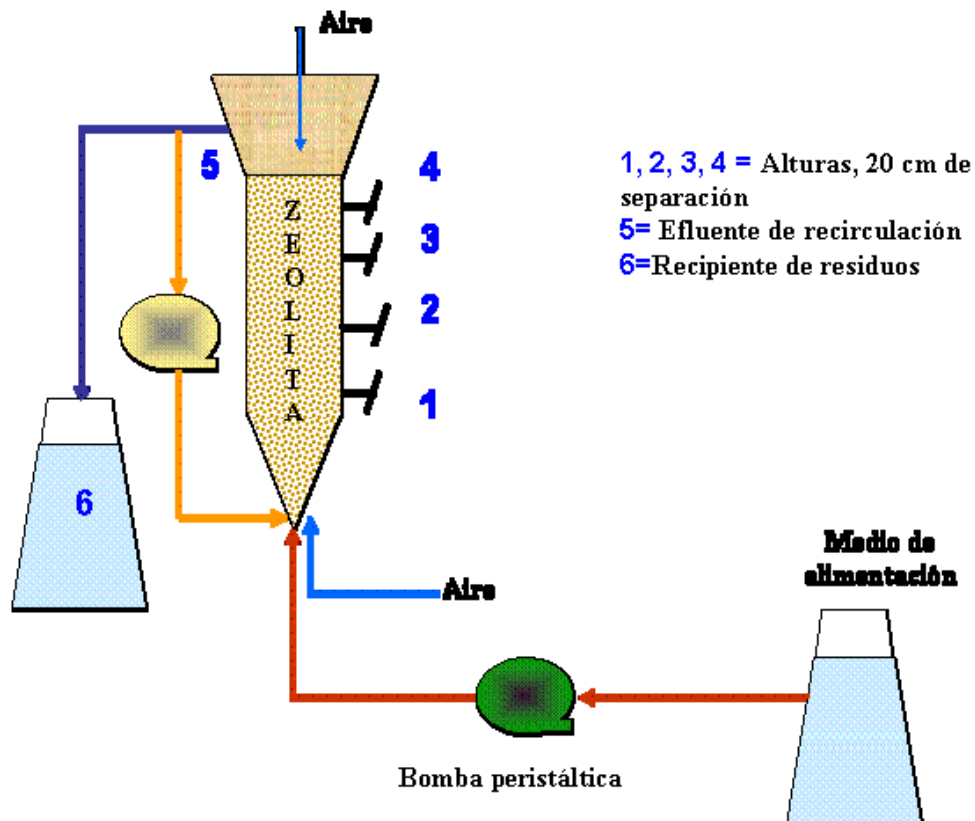


Figura 7. Diagrama esquemático del Reactor Aeróbico de Flujo Ascendente Empacado con Zeolita (RAEFA-EZ)

Tabla 2. Medio mineral ácido

Componente	g/L
Fosfato de amonio	1
Glucosa	5
Cloruro de sodio	5
Sulfato de magnesio	0.2
Fosfato de potasio	1

Pelckzar *et al.*, 1993

3.4.2 Pruebas de biosorción de cobre en RAEFA-EZ

Cuando en el reactor se produjo 1 g/L de biomasa y esta se encontraba inmovilizada en la zeolita, se establecieron condiciones constantes de operación del reactor como: flujo de aire de 36 mL/min, flujo de alimentación 2.5 mL/min, tiempo de retención hidráulica (TRH) de 0.87 d y temperatura ambiente de 30° C. Las condiciones que se variaron a la entrada fueron la concentración de cobre y el pH (Mesquita *et al.*, 2007).

Se realizaron las siguientes corridas experimentales de biosorción en RAEFA-EZ:

1. La primer corrida experimental consistió en alimentar el reactor con una solución sintética de cobre a 50 mg Cu(II)/L a pH de 3-4, y por 28 días se tomaron muestras a la entrada, a diferentes alturas del reactor y en la salida para conocer la concentración de cobre.
2. En una segunda corrida experimental se varió la concentración de alimentación a 20 mgCu(II)/L al mismo pH que en la primer prueba.

3. En la tercera corrida experimental, la concentración de alimentación del cobre y el pH no variaron, se recirculó la biomasa para tener más tiempo de contacto entre la bacteria y el cobre.
4. Por último, las corridas experimentales 4 y 5 se realizaron a pH de 4-5 con recirculación de biomasa y 20 mgCu(II)/L.

En las 5 corridas experimentales realizados se analizó el pH, la concentración del cobre por absorción atómica y para conocer la concentración de células/mL de la biomasa se midió el porcentaje de transmitancia en el Espectronic 20+ y se comparaba por la técnica del Nefelómetro de Mc Farland. En el experimento 3 y 5, se analizó además la biomasa y la zeolita por digestión de lodos. En los experimentos 4 y 5, se hicieron análisis de biomasa producida por día y demanda química de oxígeno (DQO). Al término del experimento 5 se realizaron análisis a la zeolita por Difracción de Rayos X (DRX), Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Espectroscopía por Dispersión de Energía de Rayos X (EDS) a diferentes alturas de la columna.

3.5 Cinética de adsorción del cobre por biosorción

Con la biomasa producida en el reactor se determinó la isoterma de adsorción del cobre por biosorción. En matraces Erlenmeyer de 500 mL se agregó el Medio Mineral ácido (sustrato) a diferentes concentraciones (0, 10, 30, 50, 80, 100, 130 y 200 mgCu(II)/L), con 10 ml de biomasa y 5 g de zeolita sin activar, a pH 3-4, colocándolos en incubadora con agitación (C76 New Brunswick Scientific) a 100 rpm y 35° C. Se tomaron muestras de 5 mL de la solución cada 15 minutos

durante 90 minutos, las cuales fueron filtradas para quitar impurezas con filtros Whatman #40 y por último se leyó la concentración de cobre en un espectrofotómetro de absorción atómica. Todos los experimentos fueron realizados por duplicado.

La cantidad de cobre adsorbida por la biomasa (q_{eq}) puede calcularse usando la ecuación:

$$q_{eq} = \frac{m_o - m_{eq}}{V_{ads}} \quad (\text{Ecuación 19})$$

Donde,

m_o es la masa inicial (mg), que equivale a la concentración inicial (mg/L) por el volumen inicial; m_{eq} la masa en el equilibrio (mg), que equivale a la concentración en el equilibrio por el volumen en el equilibrio; V_{ads} es el volumen de biomasa utilizada (L).

Se utilizaron las ecuaciones de Langmuir y Freundlich, para calcular la concentración de cobre máxima adsorbida por la biomasa.

3.6 Métodos analíticos

3.6.1 Digestión de lodos

Para conocer la cantidad de cobre que se adhería a la biomasa y a la zeolita, se llevaron a cabo análisis por el método de digestión de lodos en los experimentos 3 y 5. Las muestras de zeolita se tomaron de la parte alta del reactor y para el análisis de la biomasa se tomó muestra del efluente, sedimentándose y seguidamente se dejó secar para finalmente tomar una muestra de 0.25 g para su

análisis (Anexo 4). El análisis de la zeolita y la biomasa se llevó a cabo por duplicado (Agemian y Chau, 1975).

La cantidad de cobre se determinó por la ecuación siguiente:

$$C = \frac{Vi * r * fd}{w} \quad (\text{Ecuación 20})$$

Donde,

C es el elemento a determinar, en este caso es el cobre en $\mu\text{g/g}$, Vi es el volumen final del afore en mL, r es la lectura directa en $\mu\text{g/mL}$, fd es el factor de dilución y w es el peso de la muestra en g.

3.6.2 Determinación de cantidad de biomasa adherida a la zeolita

La cantidad de biomasa adherida a la zeolita fue determinada por el método gravimétrico, el cual consistió en secar 5 g de zeolita a 105°C , seguidamente fue incinerada en horno a 500°C para determinar cenizas por diferencia de peso y la biomasa fue calculada como sólidos volátiles suspendidos por la ecuación siguiente:

$$X_{b/z} = \frac{Wf_b - Wi_b}{W_{z/cb}} - \frac{Wf_z - Wi_z}{W_{z/sb}} \quad (\text{Ecuación 21})$$

Donde,

$X_{b/z}$ es la cantidad de biomasa en g/g de zeolita, W_{fb} es el peso final de zeolita con biomasa, W_{ib} el peso inicial de zeolita con biomasa, $W_{z/cb}$ es el peso de zeolita utilizada, W_{fz} , W_{iz} y $W_{z/sb}$ es la muestra de zeolita sin bacteria como control.

3.6.3 Biomasa producida en el RAEFA-EZ

Con el propósito de conocer la biomasa producida por día, se tomó una muestra de 25 ml del efluente y se filtró a vacío utilizando papel filtro Whatman estándar (Glass microfibre filters), se dejó secar al ambiente por 24 h y se colocó en el desecador por media hora antes de registrar el peso.

El peso seco de biomasa se determinó por diferencia con la siguiente ecuación.

$$w = \frac{W_f - W_i}{V} * V_t \quad (\text{Ecuación 22})$$

Donde:

w es el peso de biomasa seca total del día (mg), W_f es el peso del filtro con biomasa seca, W_i es el peso del filtro, V es el volumen utilizado (mL) y V_t es el volumen producido en el día.

3.6.4 Concentración inhibitoria media (CI₅₀)

Para conocer el efecto tóxico del cobre para estas bacterias se realizaron las pruebas de toxicidad. Para ello se determinó la concentración inhibitoria media (CI₅₀) que es la concentración de cobre a la cual inhibe el 50% del crecimiento de la biomasa. En matraces Erlenmeyer de 500 mL, se agregaron 10 mL de biomasa, 90 mL de medio mineral con cobre a diferentes concentraciones (0, 20, 50, 80, 150, 300 y 500 mg Cu(II)/L) a un pH de 3-4, los matraces fueron colocados en incubadora con agitación a 100 rpm y temperatura de 35° C. La lectura de

densidad poblacional se realizó en un espectrofotómetro cada 8 horas a 600 nm por 48 horas (Almendáriz, 2005). Las CI_{50} fueron calculadas por análisis Probit con intervalos de confianza de 95%, utilizando el programa estadístico NCSS 2001 (NCSS Inc., USA).

3.6.5 Demanda química de oxígeno (DQO)

Se determinó la DQO mediante la técnica de reflujo cerrado. Se tomaron las muestras a la entrada y salida del reactor. A 2 mL de muestra, se le adicionó 1 mL de solución digestora de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) y 2 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) con sulfato de plata ($AgSO_4$), posteriormente se homogenizaron suavemente y se digirieron en una parrilla de calentamiento a $150^\circ C$ durante 2 horas. La concentración de las muestras fue determinada a 620 nm y haciendo uso de la curva estándar de glucosa anhidrida ($C_6H_{12}O_6$), se cuantificó la DQO (Almendáriz, 2005). La eficiencia de DQO se calculó por medio de la siguiente ecuación:

$$\eta_{DQO}(\%) = \frac{S_o(gDQO_{ent}/L) - S_f(gDQO_{sal}/L)}{S_o(gDQO_{ent}/L)} * 100 \quad (\text{Ecuación 23})$$

Donde:

η es la eficiencia de DQO; S_o es el sustrato de entrada y S_f es el sustrato de salida, ambas en g/L.

3.6.6 Identificación de fases por Difracción de Rayos X (DRX)

La identificación de las fases se llevó a cabo mediante la técnica de Difracción de Rayos X en el laboratorio de Cerámicos de CINVESTAV, Unidad

Saltillo. 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 de -100 mallas. Posteriormente, los polvos fueron colocados sobre porta muestras para su análisis en un Difractómetro de Rayos X (Philips 3040). Las condiciones de análisis fueron las siguientes: radiación $K\alpha$ 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 $0.02^\circ/\text{seg}$. El voltaje de excitación del ánodo fue de 30 kV y la corriente aplicada fue 97000 nA (Leal, 2007).

3.6.7 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Espectroscopía por Dispersión de Energía de Rayos X (EDS)

Las observaciones de microscopía electrónica se realizaron a la zeolita sin activar, la biomasa con cobre y biomasa con cobre soportada en zeolita con cobre. Las observaciones se realizaron tomando una muestra pequeña del material (zeolita o biomasa) fijándolas por inmersión total en solución de glutaraldehído al 5% (v/v) durante 24 h a 4° C , continuando con una post-fijación en solución de tetróxido de osmio al 1% (p/v) durante 2 h a 4° C . Posteriormente las muestras fueron deshidratadas utilizando una serie de soluciones de acetona (al $30, 40, 50, 70, 80, 90$ y 100%) (Plascencia, 2004), y cubiertas con carbón y oro antes de su observación en el Microscopio Electrónico de Barrido marca JEOL (Scanning Electronic Microscope) JSM-5410LV, en el laboratorio de Microscopía del Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales de la Universidad de Sonora.

Otras observaciones fueron por medio de la siguiente técnica, la cual se llevó a cabo en CINVESTAV, Unidad Saltillo, Coahuila.

Preparación de las muestras: se prepararon fijándolas sobre substratos conductores (aluminio o cinta de grafito). Con el propósito de hacer conductora la muestra y obtener mejores resultados se consideran para el recubrimiento de éstas dos materiales: oro y grafito.

Técnicas y condiciones de análisis: se empleó un microscopio electrónico de barrido (MEB) de la marca comercial Philips, modelo XL30 ESEM. Está provisto de un dispositivo para realizar microanálisis mediante espectroscopía por dispersión de energía de rayos X (EDS). El dispositivo de EDS es de la marca EDAX, modelo Falcon. El análisis bacterial se realizó en condiciones de bajo vacío y ambiental, considerando diferentes magnificaciones (1000, 2000, 4000, 8000 y 12000X) para la adquisición de las imágenes y para cada magnificación microanálisis elemental (Cu y otros elementos presentes) por EDS (análisis puntual, lineal y mapeos). Las señales consideradas en el equipo de MEB para la adquisición de las imágenes son: electrones secundarios de baja energía (*SE, secondary electrons*) y electrones retrodispersados de alta energía (*BSE, backscattered or reflected electrons*) (Leal, 2007).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos utilizando cepas aisladas de un ambiente contaminado con metales pesados hasta obtener resultados de biosorción de cobre, los cuales se muestran en 5 etapas fundamentales:

1. Muestreo, aislamiento y caracterización microbiana (sección 4.1).
2. Selección de las cepas microbianas (sección 4.2).
3. Estudio en sistema por lotes de biosorción con las bacterias seleccionadas e inmovilizadas en zeolita (sección 4.3).
4. Estudio en sistema continuo de biosorción con el consorcio bacteriano (sección 4.4).
5. Isotermas de adsorción del cobre con el consorcio de bacterias (sección 4.5).
6. Resultados de la identificación de fases por Difracción de Rayos X (DRX), Microscopía Electrónica de barrido (MEB) y Espectroscopia de Energía Dispersiva de Rayos X (EDS) (sección 4.6).

4.1 Muestreo, aislamiento y caracterización de microorganismos

4.1.1 Muestreo

Los tres muestreos de las aguas del Río San Pedro se realizaron en enero, marzo y septiembre del 2006. Los valores de pH de la Estación 1 fueron ácidos, esto posiblemente es porque el lugar está más cercano a la explotación minera,

mientras que las aguas de la Estación 2 presentaron pH neutros debido a que son mezclas de la Estación 1 y de las aguas negras de la ciudad de Cananea, además este punto de muestreo se encuentra más alejado de los desechos industriales. Las temperaturas variaron debido a la época del año que se llevaron a cabo los muestreos del río (Tabla 3).

Tabla 3. Temperatura y pH de la estación 1 (E1) y estación 2 (E2)

Muestreo	Temperatura °C		pH	
	E1	E2	E1	E2
1	10	10	3.36	6.96
2	15	15	2.86	7.22
3	26	26	3.73	7.30

4.1.2 Aislamiento, caracterización e identificación bacteriana

Con base en el uso de medios específicos y a la morfología colonial, se aislaron 113 cepas de bacterias, 7 de levaduras y 3 de hongos. La tinción Gram mostró 58 bacterias gramnegativas y 55 bacterias grampositivas, con morfologías de bacilos y cocos.

La primera selección de las 113 bacterias, se realizó en medio de cultivo ácido (pH entre 3 y 6), con el fin de seleccionar aquellas que crecieran a las condiciones ácidas a las que se someterían en las pruebas de biosorción de metales, 70 de ellas crecieron en estas condiciones. Posteriormente, mediante caracterización bioquímica, se identificaron *Enterococcus* spp, *Pseudomonas* spp,

Klebsiella spp, *Bacillus* spp, *Enterobacter* spp, *Micrococcus* spp, *Escherichia coli* y *Burkholderia cepacia*, anteriormente conocida como *Pseudomonas cepacia* (Holmes *et al.*, 1998; Mac Faddin, 2003) (Anexo 5).

4.2 Selección de cepas

4.2.1 *Escherichia coli* (*Ec*) y *Burkholderia cepacia* (*Bc*)

De las cepas aisladas del río San Pedro se seleccionaron (*Bc*) y (*Ec*) para realizar experimentos de biosorción en sistema por lotes, debido a que se desarrollaron a pH ácidos y están reportados en la literatura como buenos bioadsorbentes de metales pesados (Leung *et al.*, 2000; Lasat, 2002; Mijares, 2003; Rivas *et al.*, 2004; Vázquez, 2005). A las demás cepas se les hicieron pruebas de resistencia a pH ácidos y en el medio mineral, seleccionando aquellas que se desarrollaron y de esta manera se formó un consorcio de bacterias para hacer las pruebas de biosorción en columna.

4.2.2 Cinética de crecimiento de *Ec* y *Bc*

Para llevar a cabo pruebas de biosorción se realizó la curva de crecimiento característica de cada microorganismo y así conocer el tiempo en que se alcanza la fase de crecimiento exponencial, ya que es cuando la bacteria se encuentra en su máximo periodo de desarrollo. En la Figura 8 se muestra la cinética de crecimiento para *Ec* y *Bc*, donde se observa que la fase exponencial para ambas bacterias empieza a los 30 minutos y se mantienen en esta fase por 150 minutos.

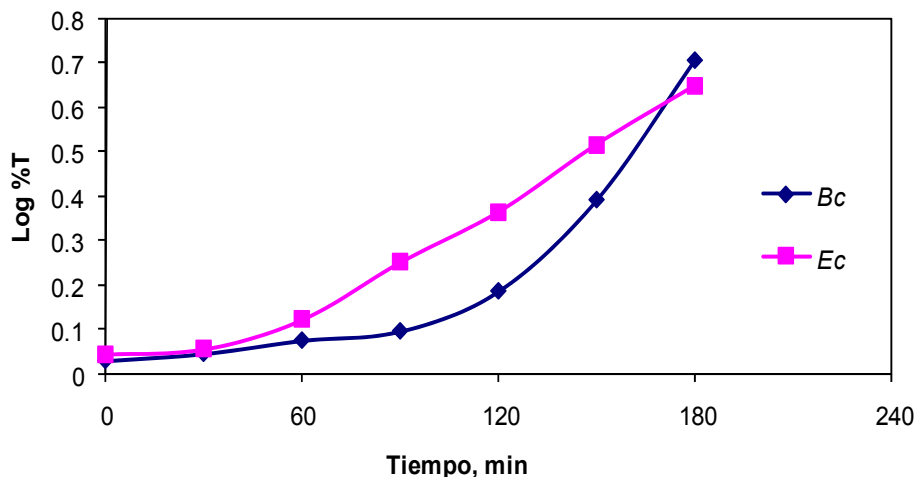


Figura 8. Curvas de crecimiento en caldo nutritivo a pH 5.0, de *Burkholderia cepacia* (Bc) y *Escherichia coli* (Ec) aisladas de las aguas del Río San Pedro

4.2.3 Producción de biomasa de *Ec* y *Bc*

Se elaboró una gráfica de la biomasa producida en 48 horas y se cuantificó en peso seco, ya que se recomienda que para las pruebas de biosorción se utilice 1 g/L de biomasa (p/v) (Göksungur *et al.*, 2003; Mijares, 2003; Rivas *et al.*, 2004; Vázquez 2005). Se graficaron los mg/L producidos contra el tiempo y por intersección se conoció el tiempo en que se produce 1 g/L de biomasa. Tanto para *Ec* y *Bc*, se obtuvo esa cantidad entre 25 y 30 horas de iniciado el crecimiento (Figura 9).

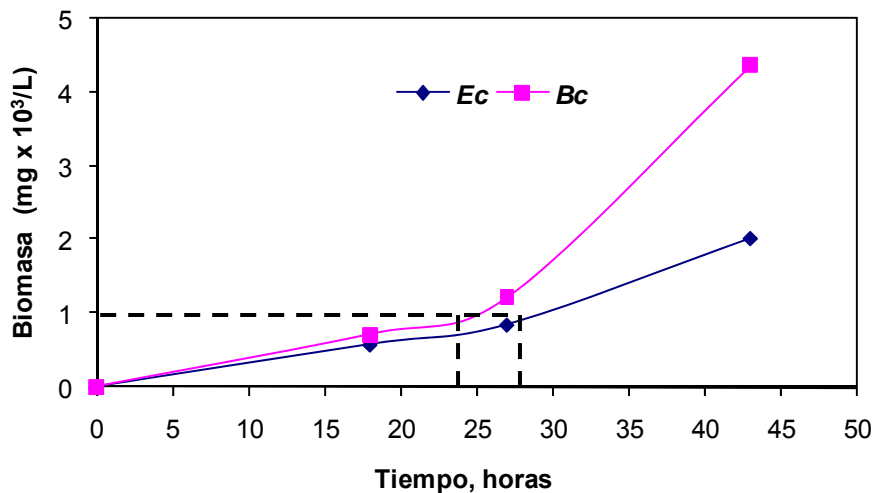


Figura 9. Producción de biomasa en mg/L (peso seco) de Escherichia coli y Burkholderia cepacia aisladas de las aguas del Río San Pedro, durante 45 horas

Posteriormente, se ajustaron los datos experimentales de la densidad poblacional, comparándolas con el nefelómetro de McFarland. La cantidad de biomasa que había sido pesada, se estimó con el número de tubo de McFarland que fue de 6 a 8 (concentración aproximada de 18×10^8 UFC/mL), como se muestra en la Figura 10 y se presenta la evolución de la biomasa mediante una curva de crecimiento. La densidad poblacional se monitoreó tomando lecturas de % de transmitancia, que comparando con el nefelómetro de McFarland, las lecturas de transmitancia deben ser menores de 10% para que se mantenga esa densidad poblacional (Anexo 3). Esta técnica se empleó con el fin de conocer el tiempo y turbidez de forma más práctica para alcanzar la cantidad de biomasa deseada durante los experimentos de biosorción en sistema por lotes y continuo.

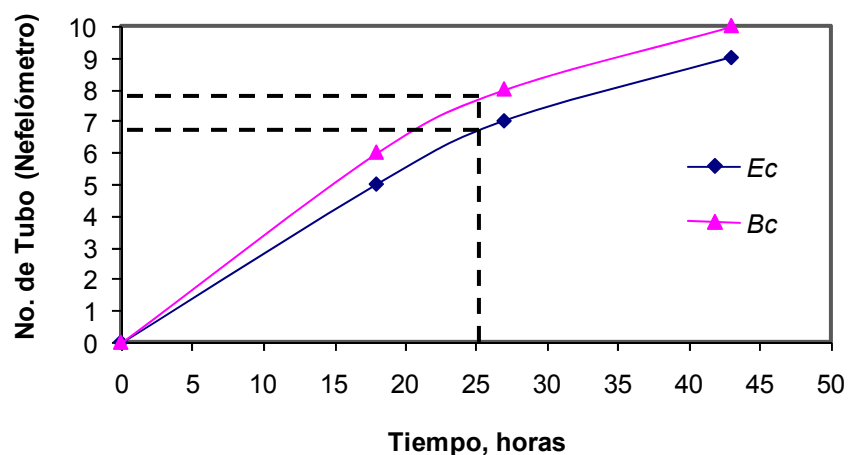


Figura 10. Estimación de la biomasa producida en base al nefelómetro de MacFarland, de *Escherichia coli* y *Burkholderia cepacia* aisladas de las aguas del Río San Pedro

4.3 Estudio de biosorción de cobre en sistema por lotes

4.3.1 Pruebas de biosorción por lotes con las cepas *Ec* y *Bc*

Los resultados de la biosorción de cobre, utilizando un medio sintético de 50 y 100 mgCu(II)/L, se muestran en la Figura 11. Con 50 mgCu(II)/L a los 75 minutos, el porcentaje de remoción obtenida con *Ec* y *Bc* fue de 72 y 73%, respectivamente. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Vásquez (2005), donde observó un porcentaje de remoción del 75% con una concentración inicial de cobre de 20 mg/L utilizando *Enterobacter cloacae* y Leung *et al.* (2000) reportaron arriba del 61% de remoción de cobre y plomo, a una concentración inicial de 100 mg/L, con *Pseudomonas* y *Micrococcus*. Mientras que al aumentar la concentración a 100 mgCu(II)/L el crecimiento de las cepas se inhibió y no se dio la biosorción. Esto fue porque las altas concentraciones de cobre pueden ser

tóxicas para algunas bacterias, como se demostró en los estudios de toxicidad que se discuten más adelante. Además, en otros reportes, Mijares (2003) menciona que *Pseudomonas* y *Arthrobacter*, resisten una concentración de 20 y 50 mg/L de cobre, con la ayuda de un mecanismo extracelular, ya que producen un exopolímero que se une al metal. Reyes *et al.* (2006) reporta que se han llevado a cabo estudios de adsorción con bacterias del género *Bacillus* para diferentes metales, en varias concentraciones, desde 1 hasta 88 mg/L.

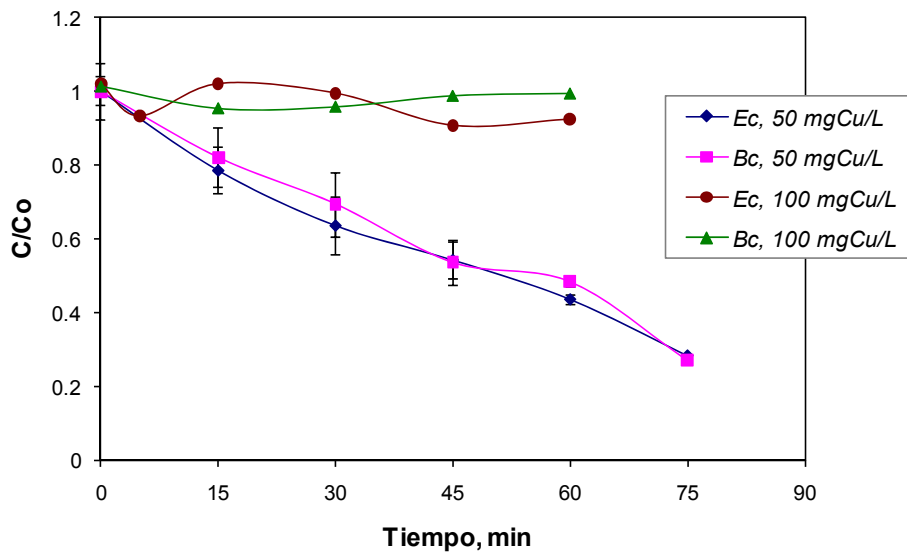


Figura 11. Curvas de biosorción del Cobre utilizando *Ec* y *Bc*

4.3.2 Pruebas de biosorción por lote con *Ec* y *Bc* soportadas en zeolita

En la biosorción del cobre, se realizaron pruebas con 50 y 100 mgCu(II)/L con las dos cepas utilizando zeolita sin activar como soporte de biomasa. Los resultados se muestran en la Figura 12, donde se puede observar que a una concentración inicial de 100 mgCu(II)/L, las bacterias fueron inhibidas y no hubo remoción de cobre, mientras que a 50 mgCu(II), a los 75 minutos, la remoción obtenida con *Bc* y *Ec* fue de 74 y 75%, respectivamente y en el control sin bacterias con 50 mgCu(II)/L y zeolita, se mantiene la concentración de cobre y al final de los 45 minutos, sólo hubo una disminución de cobre menor del 20%. Rivera-Utrilla *et al.* (2003), realizaron estudios de la biosorción de metales pesados (Pb, Cd y Cr) al utilizar una cepa de *Escherichia coli* sobre soporte de carbón activado, obteniendo mejor biosorción al utilizar la bacteria en el soporte. Gupta *et al.* (2000) y Reyes *et al.* (2006), reportan diferentes materiales que se han utilizado como soportes para biomasa: poliuretano, silica, polisulfona, gel de poliacrilamida y aligato de calcio, la biomasa inmovilizada fue eficaz en la eliminación de los metales pesados y radiactivos utilizados (Cu, Fe, Zn, U, Cd, Pb, Hg, As, Co, U).

El porcentaje de remoción de cobre en soluciones acuosas depende de la cantidad del metal que adsorbe la biomasa y esta cantidad a su vez, es función de la capacidad de intercambio de la biomasa-metal. Con base en esto, se consideró que bajo las mismas condiciones experimentales, la biomasa que tiene la mayor capacidad de intercambio del ión cobre, es aquella que exhibe el mayor porcentaje de remoción.

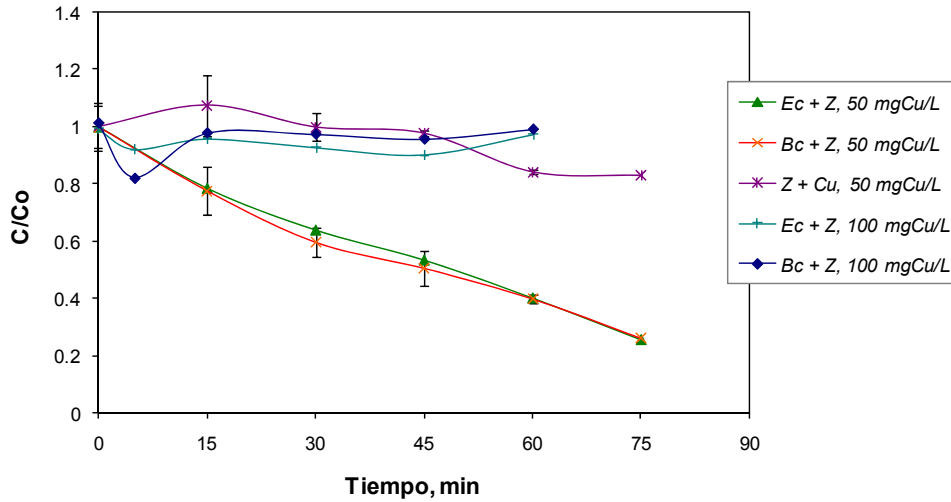


Figura 12. Curvas de biosorción del Cu(II) de *Ec* y *Bc* soportadas en zeolita

Ilhan *et al.* (2004), comparó la capacidad de adsorción con *Staphylococcus saprophyticus* para remover Cr, Pb y Cu, variando la temperatura, pH y concentración, y reporta que en todas las pruebas realizadas en dos horas, se alcanza el 70% de adsorción en los primeros 15 minutos.

En estos experimentos, se calculó la eficiencia de remoción por medio de la ecuación 16. Los resultados de los porcentajes de remoción de cobre de los 4 tratamientos y 50 mgCu(II)/L, el comportamiento fue similar, esto se debe a la capacidad que poseen estas bacterias para biosorber al cobre. La zeolita no interviene en el intercambio, debido a que no está activada y solo se utiliza como soporte para la biomasa, lo que se comprobó con los resultados anteriores de biosorción. El mayor porcentaje de cobre biosorbido se obtuvo a los 75 minutos,

diferentes trabajos han demostrado que la cinética de adsorción en la superficie bacteriana presenta un equilibrio muy rápido con una adsorción total de 5 a 30 minutos (Chang, 1997; Atkinson *et al.*, 1998; Ilhan *et al.*, 2004; Vázquez, 2005). Asimismo, los resultados obtenidos de remoción de cobre en sistema por lotes con estas bacterias indican que son buenos biosorbentes de cobre, por lo que se hizo un consorcio con las demás cepas que se aislaron y que se desarrollaron en las mismas condiciones ácidas y medio mineral para realizar pruebas de biosorción en sistema continuo.

4.3.3 Determinación de constantes cinéticas de velocidad (K)

Los datos experimentales de las pruebas de biosorción en sistema por lotes correspondieron a las constantes cinéticas de una reacción de primer orden, puesto que el producto se forma a medida que desaparece el reactivo, donde existe una relación lineal entre el $\ln C_A$ y el tiempo, como se puede observar en las Figuras 13 y 14, donde se muestran las ecuaciones con un factor de correlación de 0.98, las cuales fueron calculadas utilizando la ecuación 18 que se deduce de la ecuación de velocidad (Ecuación 17). En estas pruebas de biosorción, las constantes cinéticas fueron de 0.0163 min^{-1} cuando se utilizó las bacterias sin zeolita, 0.0177 min^{-1} en las pruebas de bacteria con zeolita, resultados muy similares, lo que confirman que la zeolita no participa en la biosorción del cobre.

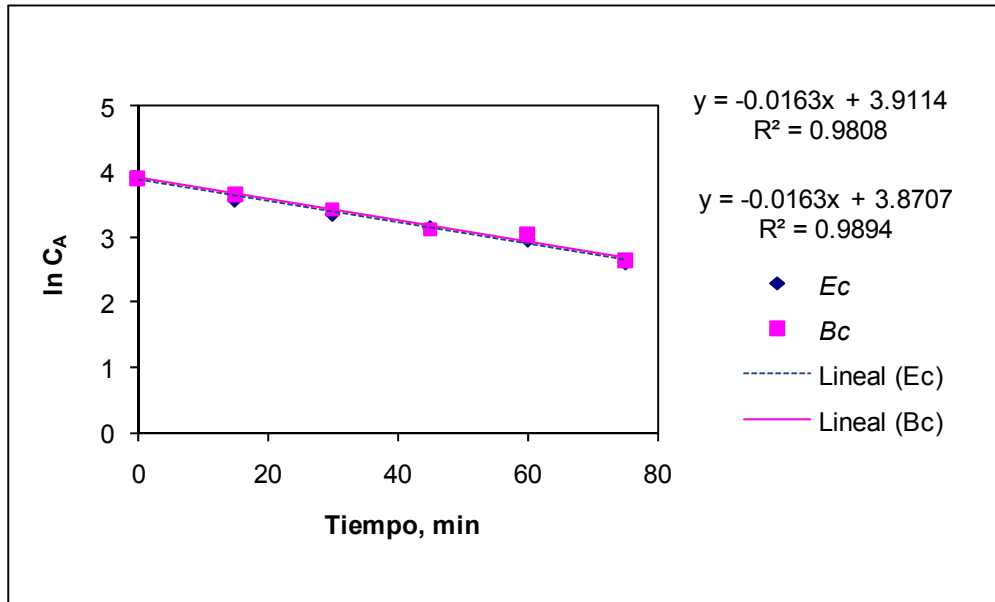


Figura 13. Datos cinéticos experimentales que muestran la reacción de primer orden para *Ec* y *Bc* en sistema por lotes

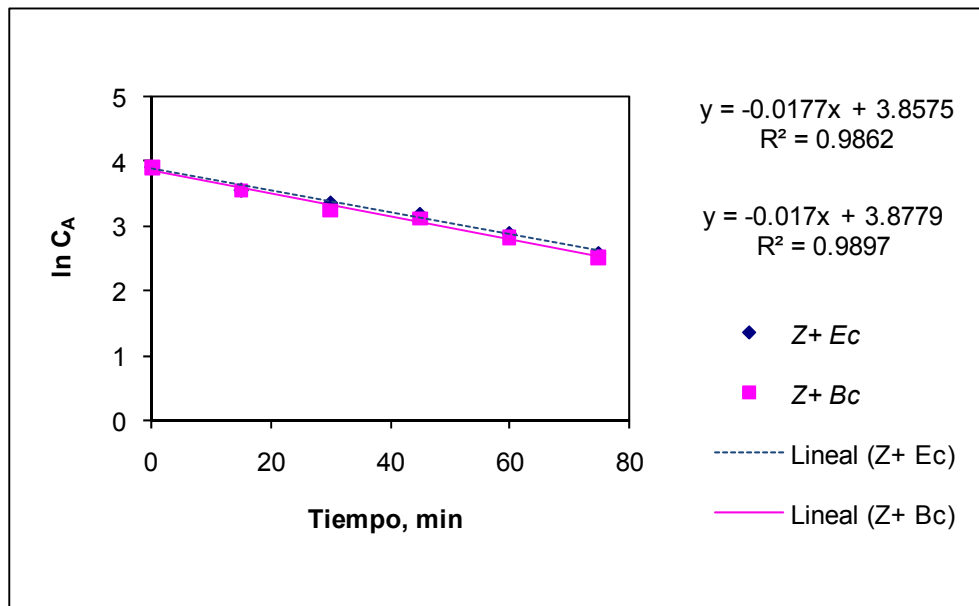


Figura 14. Datos cinéticos experimentales que muestran la reacción de primer orden para *Ec* y *Bc* con zeolita como soporte en sistema por lotes

4.4 Estudio de biosorción en sistema continuo con el consorcio bacteriano

4.4.1 Acondicionamiento del Reactor Aerobio de Flujo Ascendente

Empacado con Zeolita (RAEFA-EZ) a pH de 3-4

Fueron seleccionadas 10 cepas (*Pseudomonas putida*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Burkholderia cepacia*, dos cepas *Enterobacter* spp y cuatro de *Micrococcus* spp), consorcio aislado de las aguas del Río San Pedro y que crecieron en el medio mineral ácido. Al inocular el reactor aerobio de flujo ascendente empacado con zeolita (RAEFA-EZ) con el consorcio bacteriano en medio ácido (pH de 3-4), se observó un rápido desarrollo poblacional. A partir del tercer día la biomasa alcanzó una concentración de 0.6 g/L y el reactor se mantuvo en recirculación por 12 días hasta obtener una concentración de biomasa de 1 g/L.

4.4.2 Efecto inhibitorio del cobre sobre el consorcio bacteriano

utilizado como biomasa (CI_{50})

El cobre presentó un efecto inhibitorio sobre la velocidad de crecimiento poblacional, obteniendo mayor inhibición a concentraciones altas de cobre (Figura 15). Al graficar la velocidad de crecimiento del consorcio bacteriano contra la concentración de cobre, se encontró que la concentración inhibitoria media (CI_{50}) fue de 65 mgCu(II)/L, esto indica que para esta biomasa no se recomienda llevar a cabo pruebas de biosorción a concentraciones más elevadas de cobre. Castillo (2004) reportó CI_{50} de 0.43 y 1.02 μ g/L en diferentes organismos para la reutilización de raspo, procedente de la industria vinícola para la extracción de

metales en efluentes líquidos, lo cual coincide con los resultados reportados en este estudio, sobre el crecimiento de los microorganismos.

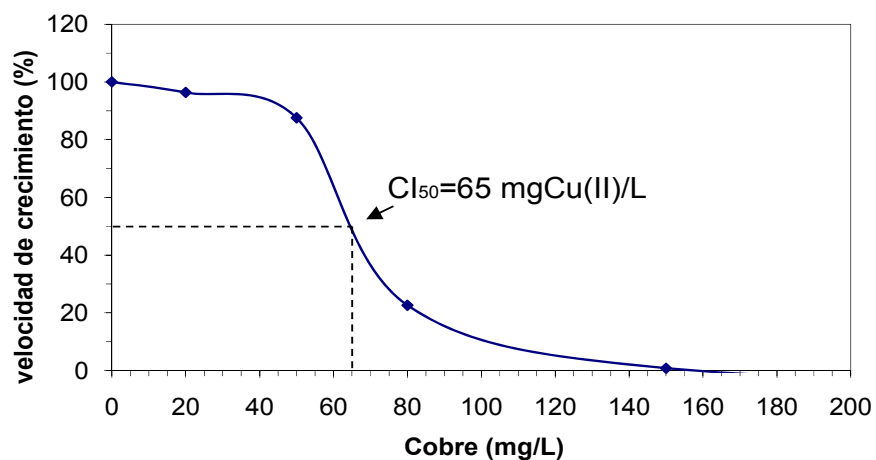


Figura 15. Efecto inhibitorio de la concentración del cobre sobre la velocidad de crecimiento de la biomasa a 48 horas

4.4.3 Biosorción de cobre en RAEFA-EZ a pH de 3-4

La Figura 16 muestra la variación de la concentración en cobre en la entrada y salida de RAEFA-EZ durante 133 días de experimentación a pH de 3-4, y en la Figura 17 se muestran las curvas de ruptura de los tres primeras corridas experimentales de biosorción de cobre. En la corrida experimental 1 (E1), a una concentración de 50 mgCu(II)/L, se observó una rápida acumulación del cobre en la biomasa, en el primer día se obtuvo un 96% de remoción del metal. Con el propósito de disminuir el efecto tóxico del cobre en la biomasa se llevó a cabo la

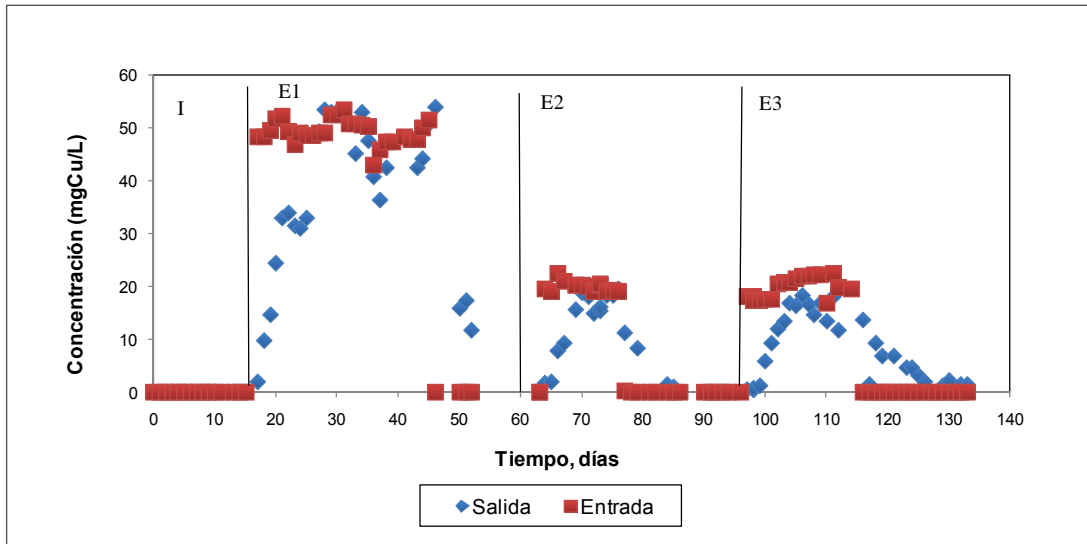


Figura 16. Biosorción de Cu(II) en RAEFA-EZ a pH de 3-4.
 (I) es cuando se inoculó el consorcio de bacterias;
 (E1) corrida experimental 1; (E2) corrida experimental 2;
 (E3) corrida experimental 3

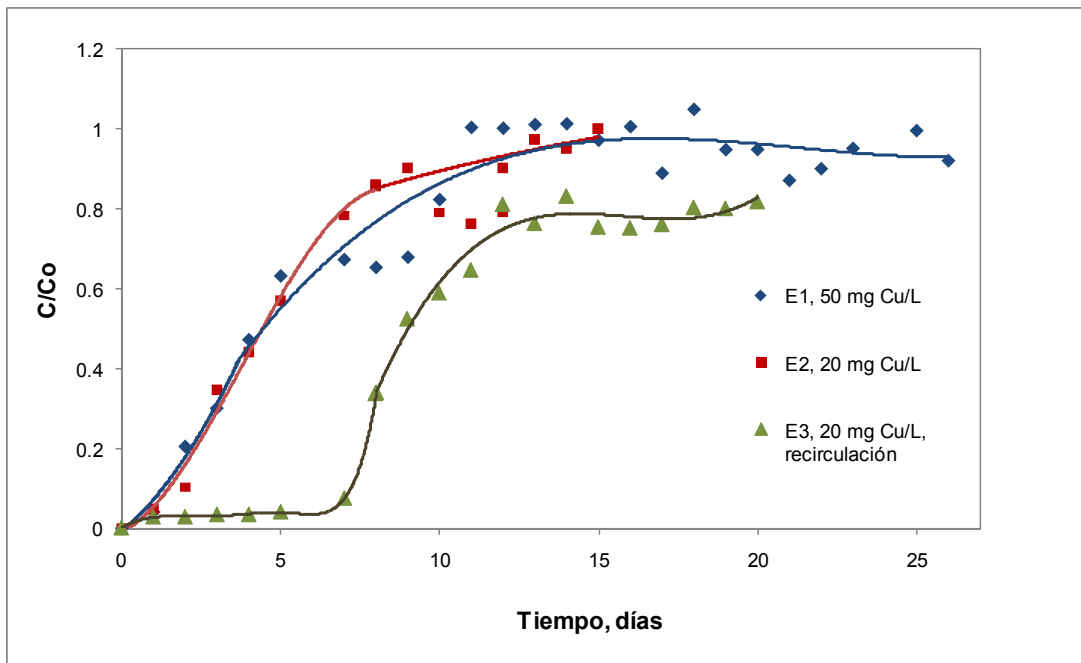


Figura 17. Curva de ruptura de Cu(II) en RAEFA-EZ a pH de 3-4 con el consorcio bacteriano seleccionado del Río San Pedro

corrida experimental 2 (E2), disminuyendo la concentración a 20 mgCu(II)/L, se observó el mismo comportamiento que en E1, ya que los dos primeros días se removió un 90%, y a partir del quinto día la biomasa perdió la capacidad de absorber el cobre. En E1 y E2 se muestra una ruptura muy rápida, iniciando el primer día, en estas dos corridas experimentales no hubo recirculación de la biomasa.

En la corrida experimental 3 (E3) se cambió la condición a recirculación de biomasa para aumentar el contacto bacteria-metal y se obtuvo una remoción del 97% del cobre durante 6 días consecutivos, la ruptura se presenta del sexto al onceavo día. En estos resultados se observó que al no recircular la biomasa, se llega a la saturación rápidamente de los sitios de unión disponibles en la biomasa para el metal, lo que implica que la biomasa se saturó con el metal en los siguientes días de los experimentos. Mientras que en el caso de la recirculación, hay movimiento de las bacterias, dejando una mayor cantidad de sitios de unión disponibles y se llega a la saturación en un tiempo mayor.

Estudios específicos con *Pseudomonas aeruginosa* para la inmovilización de Cu, Cd y Pb, demuestran que a los 5 minutos del proceso de biosorción se ha removido un 90% de los metales (Chang y Chang, 1997). Hadi *et al.* (2003) al trabajar en la adsorción de cadmio con cepas de levaduras reportaron un 90% de adsorción en 5 minutos a pH de 5. Wankasi *et al.*, (2006) trabajaron con Nipah palm y reportan que de 5 a 10 minutos la biomasa fue capaz de remover 55.6-92.2% de metal para plomo y cobre respectivamente. La remoción del metal depende de diversos factores, como la composición química de la pared celular de

las biomásas, pH, temperatura, materia orgánica, textura de la biomasa y presencia de otros iones (Acosta, 2007).

La Figura 18 muestra el seguimiento del pH en la entrada y salida del reactor durante las tres corridas experimentales y se observa como se mantuvo en valores de 3 a 4. El pH es un parámetro muy importante que influye en la biosorción, este afecta la solubilidad de los metales ó la activación de los grupos funcionales en la biomasa. Por lo tanto, la interacción de los cationes metálicos con los sitios de unión de la biomasa son muy sensibles a los valores de pH (Vázquez, 2005; Torres y Juvina, 2005).

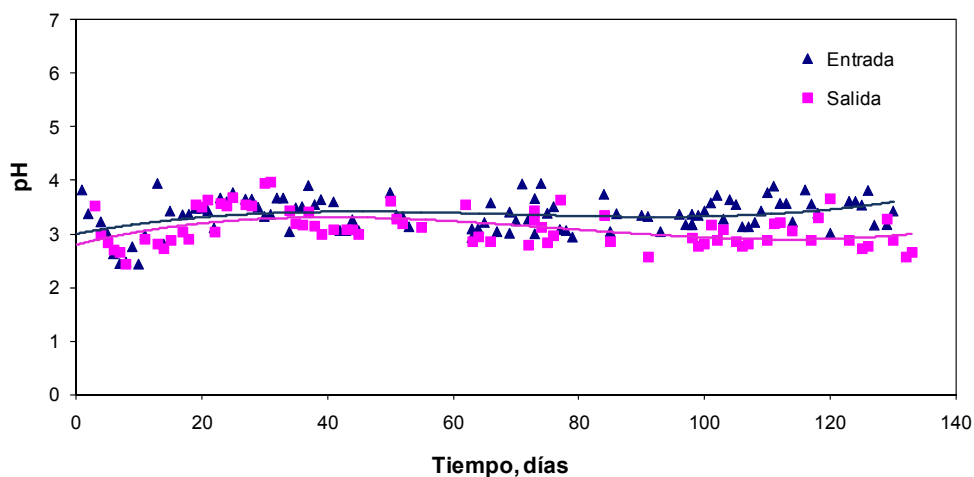


Figura 18. Control del pH en el reactor durante las corridas experimentales E1, E2 y E3 de biosorción del cobre con el consorcio bacteriano

4.4.4 Acondicionamiento de RAEFA-EZ a pH de 4-5

El reactor fue empacado nuevamente con la misma variedad y tamaño de zeolita clinoptilolita y se recirculó el medio mineral inoculando el consorcio de bacterias seleccionado, solo que variando el pH entre 4 y 5. El desarrollo microbiano se realizó en 15 días con recirculación constante hasta obtener 1 g/L de biomasa.

4.4.5 Biosorción de cobre en RAEFAEZ a pH de 4-5

Las pruebas de biosorción a pH de 4-5 y 20 mgCu(II)/L (corridas experimentales E4 y E5) con recirculación de biomasa, se llevaron a cabo con el propósito de obtener una remoción de cobre durante más tiempo, ya que el pH afecta al desarrollo poblacional bacteriano. Cuando el pH disminuye, la superficie de la célula tiende a estar más cargada positivamente, reduciendo la atracción entre la biomasa y los iones metálicos. En contraste, a pH más altos se facilitan la inmovilización de los metales, ya que la superficie de la pared celular se encuentra cargada negativamente (Chang y Chang, 1997; Vázquez, 2005). Al realizar la corrida experimental cuatro (E4), el cobre empezó a precipitar a pH mayores de 4.65. En estudios previos reportan que pH's mayores de 5 el cobre precipita y se forman hidroxicomplejos (Göksungur *et al.*, 2003; Torres y Juvina, 2005).

En la Figura 19, se muestran las curvas de rompimiento de E4 y E5, y se observa como la remoción del metal es del 84-96% en los primeros 10 días. Estos resultados demuestran que efectivamente el pH afecta a la biosorción de cobre, ya que ésta se mantiene por más tiempo al aumentar el pH sin que el cobre precipite.

Finalmente se llega a la saturación a partir del día catorce, como se observó en la corrida experimental cinco (E5).

En este estudio se demuestra que el pH afecta a la remoción del cobre y coincide con los reportados por Torres y Juvina (2005) quienes demostraron que experimentalmente se tiene la máxima adsorción de cobre a pH de 3.5 a 4.5 y Göksungur *et al.* (2003) reportan que la mayor remoción de cobre fue a pH de 4.

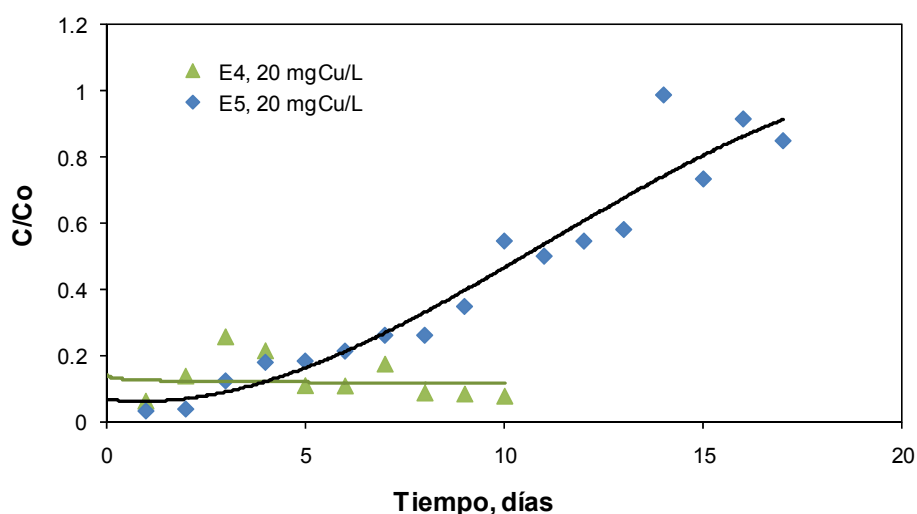


Figura 19. Curvas de ruptura en la biosorción de cobre a pH de 4-5, con el consorcio bacteriano seleccionado del Río San Pedro

En otras investigaciones también se ha reportado la adsorción de cobre a pH's bajos para diferentes microorganismos y han encontrado que para la biosorción de cobre el pH óptimo es de 4-5 (Göksungur *et al.*, 2003; Hadi *et al.*, 2003; Padilha *et al.*, 2005; De França *et al.*, 2006).

En diversas investigaciones reportan que la variación de pH afecta considerablemente al proceso de biosorción, en estos experimentos varió a menos de 3 conforme avanzaba el tiempo (Figura 20) y este efecto, reduce la atracción entre la biomasa y el metal, lo cual implica que la biosorción depende en parte de la protonación o desprotonación de los polímeros que forman parte de la pared celular, a pHs menores de 3, se encuentran protonados y restringen la entrada de los iones de Cu(II), y a pH mayores, los grupos responsables de la retención del metal se encuentran cargados negativamente facilitando el enlace de los iones Cu(II) positivos (Holan y Volesky, 1995; Yan y Viraraghavan, 2003; Vázquez, 2005; Acosta *et al.*, 2007; Moreira *et al.*, 2008).

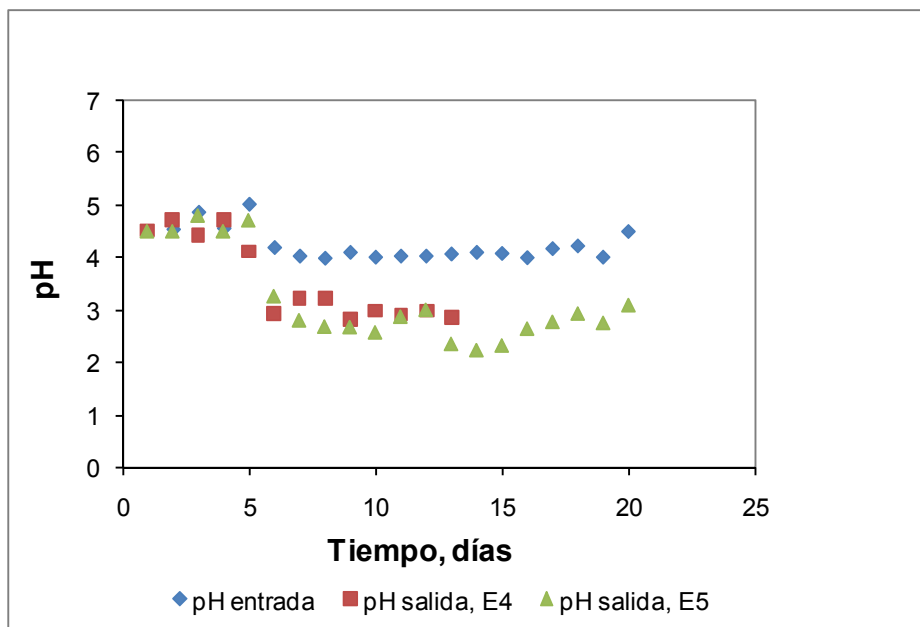


Figura 20. Seguimiento del pH en el reactor durante las pruebas E4 y E5 de biosorción del cobre con el consorcio bacteriano

4.4.6 Análisis de biomasa producida en el reactor

La biomasa fue cuantificada como el peso seco producido en mg/L, graficando % de transmitancia contra mg/L de biomasa producidos (Figura 21). Con los datos de la recta se calcularon los valores aproximados de biomasa producida por día para cada uno de los experimentos, el rendimiento (Y_x/s , biomasa/sustrato) y la cantidad de glucosa consumida por los microorganismos fue medida como porcentaje de DQO, estos resultados se muestran en la Tabla 4.

El análisis de sedimentos en los experimentos 3 y 5 dio un valor promedio de biosorción de 0.4-0.8 mgCu(II)/g.biomasa.día y la inmovilización de la biomasa fue 0.12 g de biomasa/g de zeolita. Estos resultados demuestran que el cobre se encontraba en la biomasa inmovilizada.

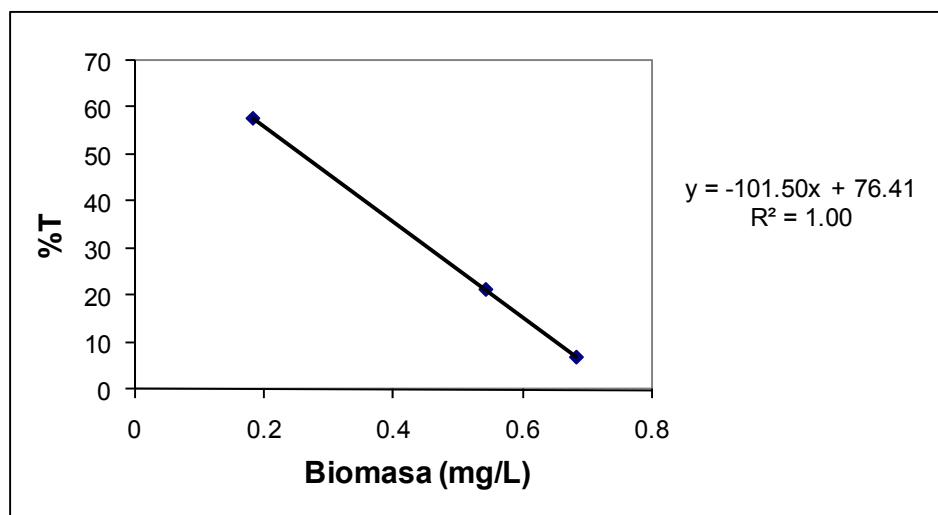


Figura 21. Determinación de la biomasa producida en el reactor

Tabla 4. Resultados de control en el reactor, para la producción de biomasa del consorcio bacteriano

Corrida Experimental	Producción de biomasa (g/L)	Rendimiento (Yx/s)	η DQO (%)
1	0.6	0.59	50
2	0.51	0.50	50
3	0.33	0.32	30
4	0.47	0.50	55
5	0.68	0.62	50

η DQO (%): Eficiencia de Demanda Química de Oxígeno

En la Figura 22 se muestra el seguimiento de la producción de biomasa por día que se obtuvo en las corridas experimentales 4 y 5, en la cual se observa una producción arriba de 1 g/L durante la realización de los experimentos. Moreira *et al.* (2008), reporta que la cantidad de biomasa no afecta el proceso de forma significativa y la remoción se mantiene prácticamente constante como se observó en este estudio en E4 y E5.

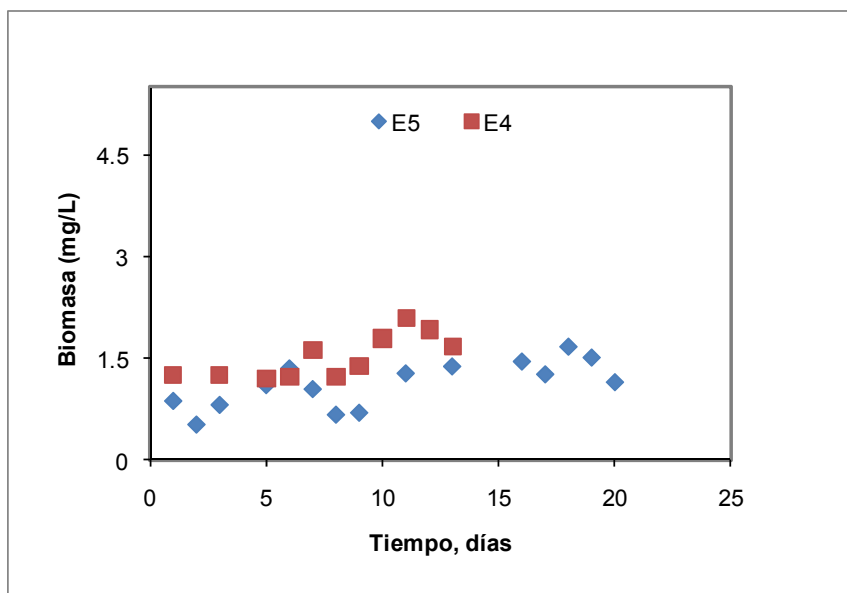


Figura 22. Producción de biomasa en E4 y E5

4.5 Isotermas de biosorción de cobre

El equilibrio existente entre la concentración del ión cobre en solución y la masa que se intercambia de ese ión en la biomasa, se puede representar por la isoterma de biosorción. Los datos experimentales de las isotermas de intercambio de Cu(II) sobre la biomasa utilizando zeolita sin activar como soporte se muestran en la Figura 23.

Los datos experimentales se interpretaron por medio del modelo de la isoterma de Langmuir que se representa matemáticamente de la manera siguiente (Ecuación 13).

$$q = \frac{q_0 Ce}{kd + Ce}$$

Linealizando la ecuación (Ecuación 14)

$$\frac{1}{q} = \frac{Kd}{q_0} \frac{1}{Ce} + \frac{1}{q_0}$$

Donde,

Ce es la concentración en el equilibrio, mgCu(II)/L; q es la cantidad de Cu(II) intercambiado por gramo de biomasa, mg/g; q_0 es la cantidad máxima de soluto biosorbido, mgCu(II)/g biomasa; Kd constante de la isoterma de Langmuir, mg/L.

En esta figura se representa la ordenada al origen ($1/q_0$) de 0.0051, por lo que $q_0 = 196$ mg/g (3.08 mmol/g o 6.17 meq/g) y $Kd = 59.96$ mg/L, este valor indica que hay una gran afinidad del metal por el biosorbente. Estos datos coinciden con Göksungur *et al.* (2002), quienes reportaron una q_0 de 181.8 mg/g y Kd de 32.03 mg/L con biomasa de *Sacchromyces cerevisiae*.

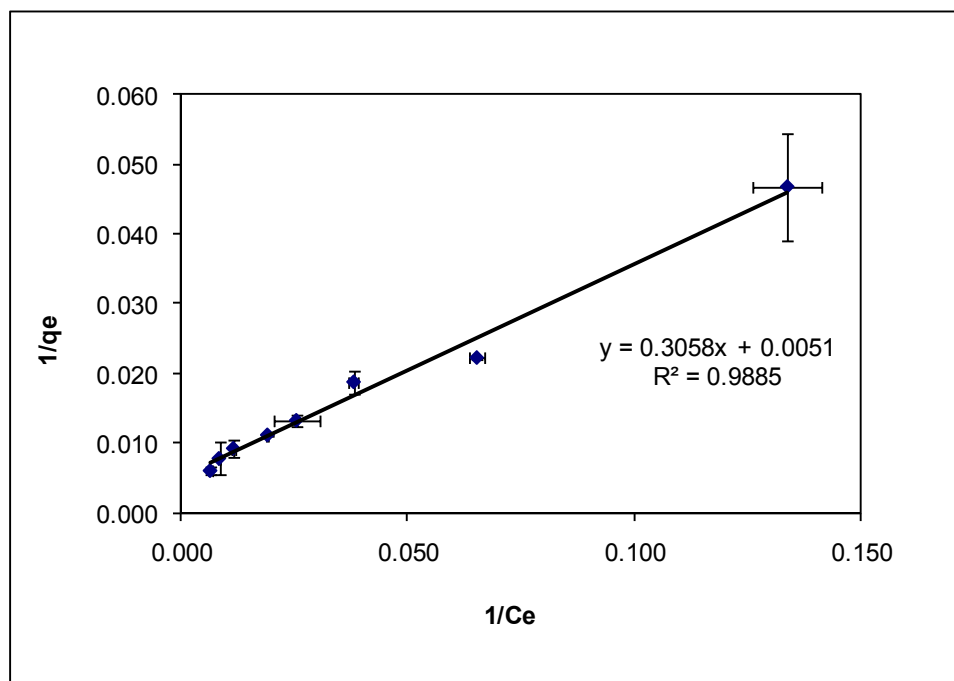


Figura 23. Isotherma de biosorción de cobre utilizando biomasa producida en el reactor a pH 3-4, T= 35°C, 100 rpm en disoluciones de 10 a 200 mgCu(II)/L ajustados al modelo de Langmuir

Otros estudios que reportan la máxima capacidad de adsorción utilizando diferentes biomazas son: *Aspergillus oryzae* (10.1 mg/g), perlas de alginato de calcio (80.6 mg/g), desechos de cassava (127.3 mg/g), nipah palm (21.85 mg/g) y *Sargassum wightii* (115 mg/g) (Huang et al., 1996; Oliveira, 2003; Horsfall et al., 2004; Wankasi et al., 2006; Vijayaraghavan y Prabu, 2006).

Hay que destacar que en la mayoría de los trabajos reportados se ha utilizado biomasa seca, sin embargo, el reactor utilizado en el presente trabajo fue más dinámico, ya que se pudo mantener la biomasa activa mediante la

recirculación de ésta y del uso de medio mineral fresco para el desarrollo y mantenimiento del consorcio bacteriano.

La Figura 24, se representan los datos experimentales ajustados a las isotermas de Langmuir y Freundlich. En este estudio ajustaron mejor a una isoterma de Langmuir ($R^2= 0.988$), debido a que este modelo se ajusta generalmente cuando hay adsorción por afinidad, como ocurrió en este estudio que existe una afinidad de la biomasa por el adsorbente (Cu), varios trabajos reportan el equilibrio de adsorción con biomasa representadas por las isotermas de Langmuir (Leung *et al.*, 2000; Göksungur *et al.*, 2002; Stanley y Ogden, 2003; Yan y Viraraghavan, 2003); y bien aunque la ecuación de Freundlich ($R^2= 0.982$) también describe adecuadamente el proceso de biosorción, sin embargo, esta ecuación se aplica normalmente a los sistemas de adsorción por intercambio iónico, ya que la masa del ión intercambiado (Cu^{+2}) sobre la biomasa crece continuamente al aumentar la concentración del ión; esto no puede ocurrir en la biomasa ya que se satura la pared celular de las bacterias y no hay sitios disponibles para adherirse (Tejeda *et al.*, 1995). La Tabla 16 del Anexo 11, muestra diferentes biosorbentes, incluyendo los del presente trabajo de investigación. Se observa que el valor de $q_o = 196 \text{ mg/g}$ (3.08 mmol/g) obtenido por el consorcio bacteriano supera a los valores reportados de algunos tipos de biomasas naturales y algunas biomasas químicamente tratadas.

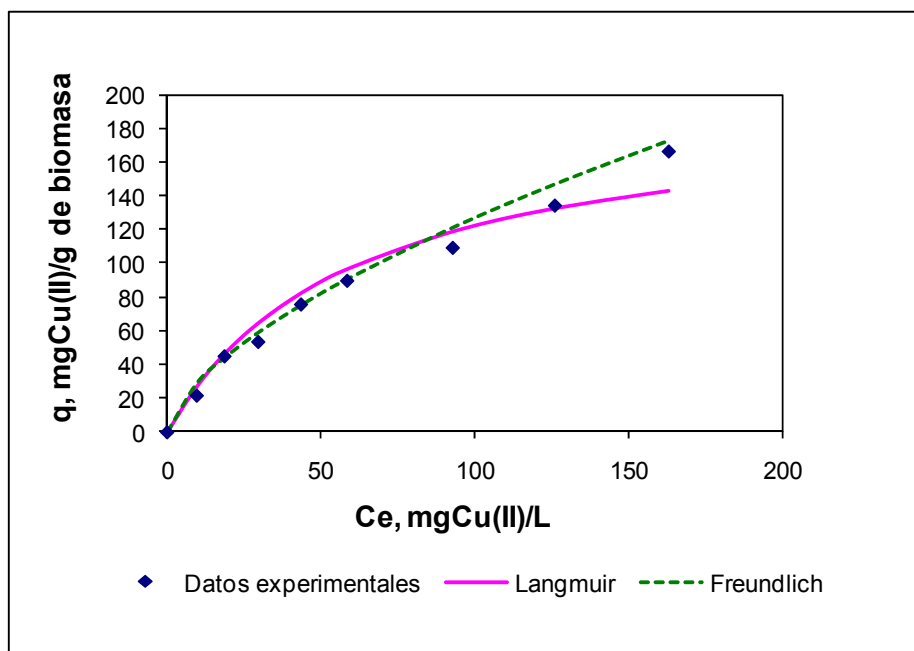


Figura 24. Isotermas de biosorción de cobre utilizando biomasa producida en el reactor con el modelo de Langmuir y ecuación de Freundlich

4.6 Caracterización por Difracción de Rayos X (DRX), Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Espectroscopia de Energía Dispersiva de Rayos X (EDS)

4.6.1 Identificación por Difracción de Rayos X (DRX)

La identificación de las fases presentes en la zeolita empleada en las pruebas en sistema por lotes se llevó a cabo mediante la técnica de difracción de rayos X (DRX). Las muestras de zeolita se analizaron antes y después de tratarlas con cobre y bacterias. En la Figura 25 se presentan los difractogramas correspondientes a las muestras de clinoptilolita (M1), clinoptilolita con *Escherichia coli* (M2) y clinoptilolita con *Burkholderia cepacia* (M3).

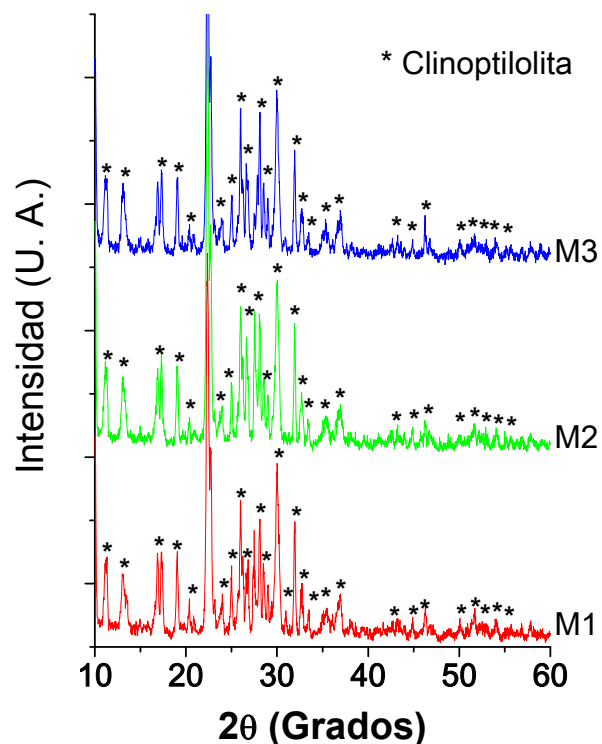


Figura 25. Difractogramas correspondientes a las muestras de clinoptilolita (M1), clinoptilolita con *Escherichia coli* (M2) y clinoptilolita con *Burkholderia cepacia* (M3)

El análisis de la caracterización por DRX reveló que las muestra M1, M2 y M3 corresponden a la fase clinoptilolita-Na (JCPDS 83-1261; 9.869, 22.477, 11.177; Monoclínica; $a=17.662$, $b=17.911$ y $c=7.407$; aluminosilicato de sodio hidratado, potasio, magnesio y calcio- $\text{Ca}_{1.24} \text{Na}_{1.84} \text{K}_{1.76} \text{Mg}_{0.2} \text{Al}_6 \text{Si}_{30} \text{O}_{72} (\text{H}_2\text{O})_{21.32}$).

En la Figura 26 se muestran los difractogramas correspondientes a la zeolita sin tratar (Z) y las zeolitas tomadas a diferentes alturas del reactor (1, 2, 3 y 4), después de ser tratada con bacterias en las pruebas realizadas en RAEFA-EZ.

Los resultados de caracterización por DRX revelan que no existen cambios en el tipo de fases presentes antes y después del tratamiento con las bacterias, por lo cual indica que la zeolita actúa como soporte para la biomasa. También indican que la zeolita no está adsorbiendo los iones metálicos, ni está ocurriendo un intercambio iónico entre los iones metálicos presentes en la solución y la zeolita, debido a que la presencia de cobre no fue detectada en las muestras de zeolita analizadas por DRX.

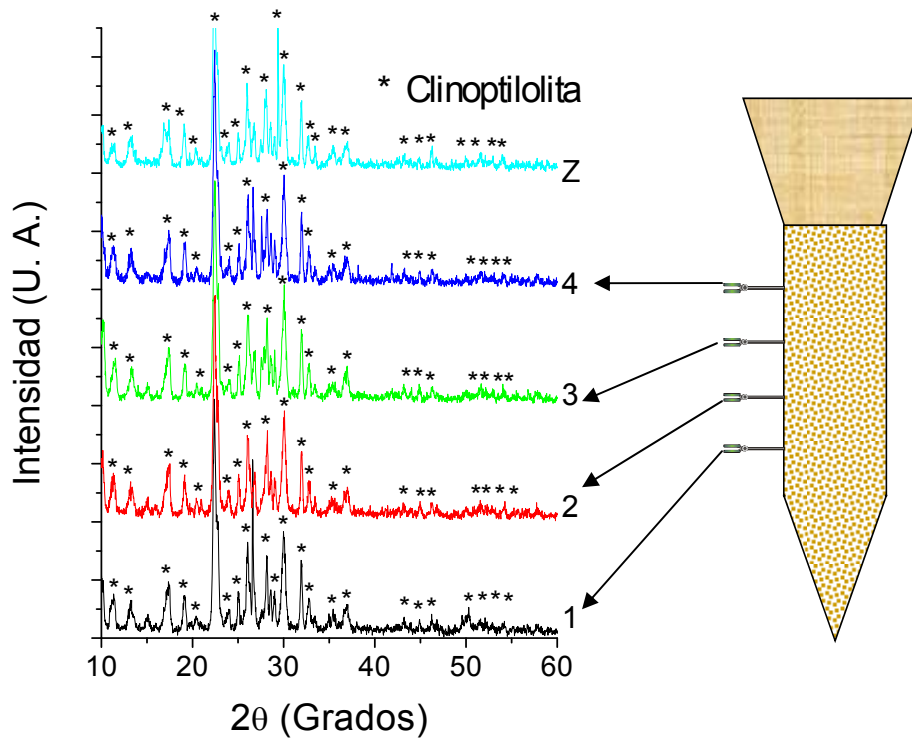


Figura 26. Difractogramas correspondientes a las muestras de zeolitas sin tratar (Z) y zeolitas tomadas a diferentes alturas del reactor (1, 2, 3 y 4)

4.6.2 Microscopía Electrónica de Barrido (MEB)

Los resultados de la caracterización por MEB del consorcio bacteriano durante las pruebas de biosorción de cobre en el RAEFA-EZ se muestran en la Figura 27. En las fotomicrografías MEB se observan la forma de cocos, bacilos y cocobacilos, y en el análisis elemental por EDS reveló la presencia de cobre en el consorcio bacteriano (3.04%).

En las Figura 28 y 29 se muestran las fotomicrografías de MEB correspondientes a las zeolitas sin tratar y tomadas a 4 alturas del reactor, respectivamente.

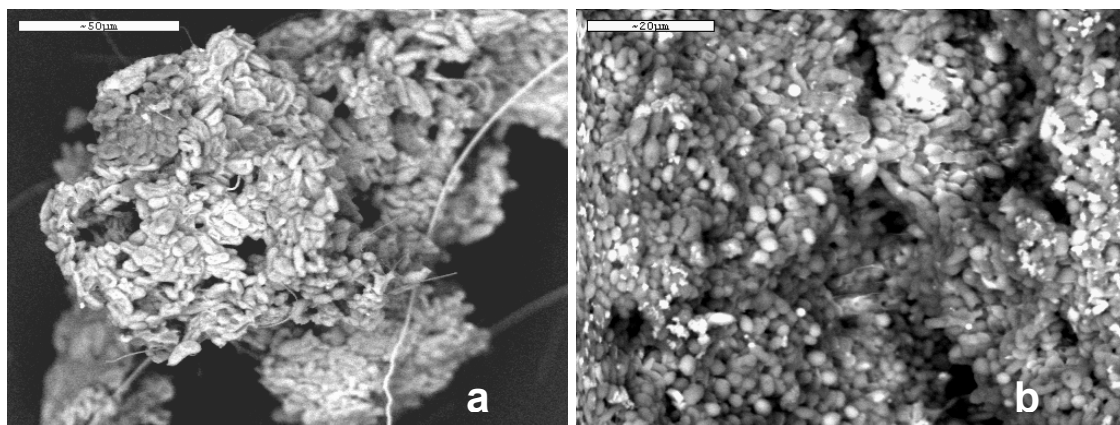


Figura 27. Fotomicrografías (MEB) del consorcio bacteriano utilizado en la biosorción de cobre en el RAEFAEZ (a) 750X y (b) 1500X.

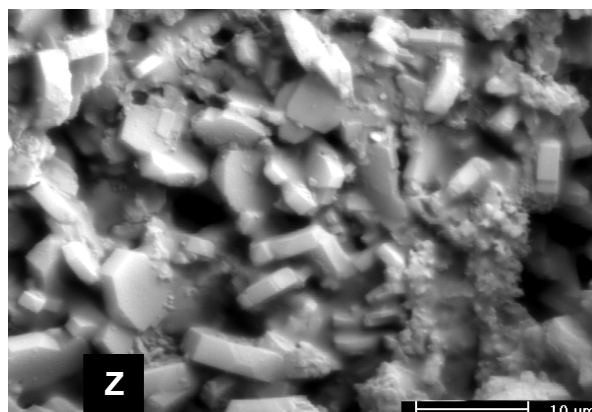


Figura 28. Fotomicrografías de MEB correspondiente a la zeolita sin tratar a 2000X

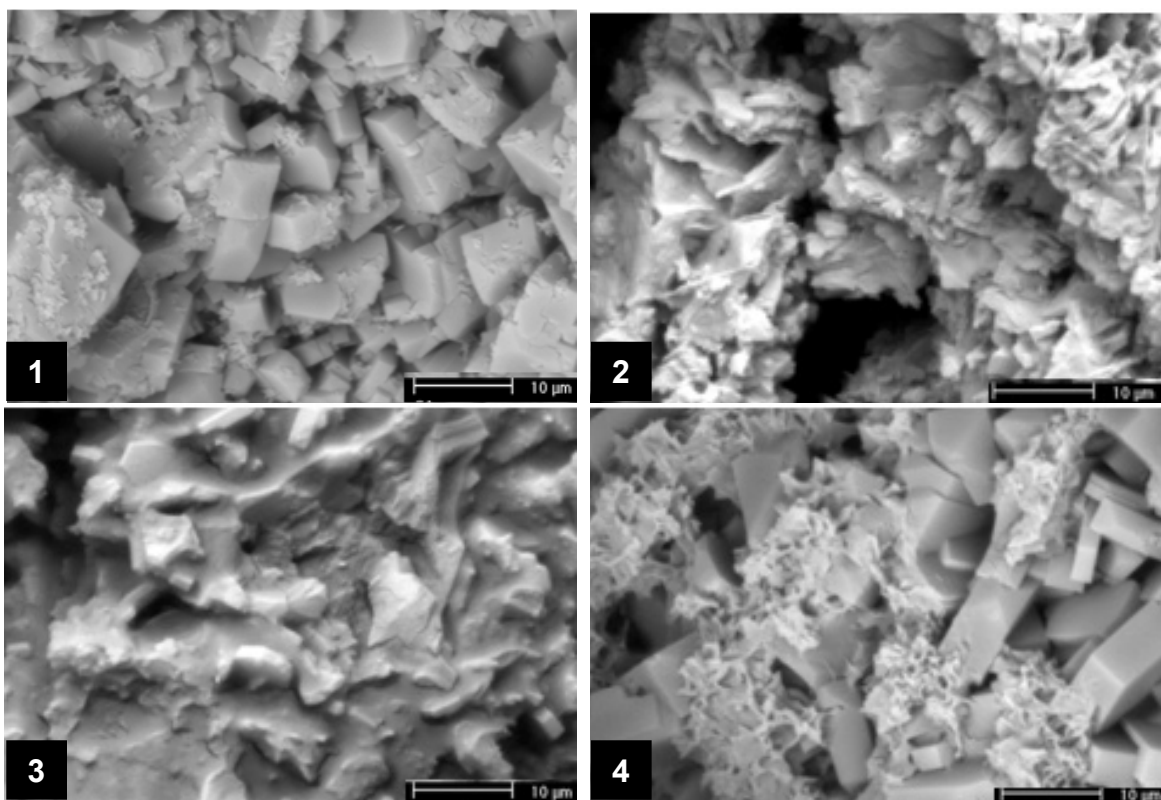


Figura 29. Fotomicrografías de las zeolitas a 4 alturas del reactor después de ser tratadas con el consorcio bacteriano a 2000X

De acuerdo a estos resultados, las zeolitas sin tratar exhiben morfologías que corresponden a cristales en forma de plaquetas con espesores entre 2.00-2.25 μm y diámetro promedio entre 2.44-8.90 μm . Los resultados de la caracterización de MEB de las muestras de las zeolitas tratadas tomadas a 4 alturas del reactor se muestran en la Figura 29.

Las fotomicrografías de MEB tomadas de las muestras de zeolita después de ser tratadas muestran que aun con la biomasa, los cristales de zeolita se pueden observar. Sin embargo, en la muestra tomada a la altura 4 del reactor (ver Figura 26) se observan depósitos con apariencia porosa, que según revela el análisis elemental por EDS están compuestos principalmente por hierro (Fe). Por otra parte, el análisis elemental por EDS sobre los cristales de zeolita presentes en las muestras tomadas a las 4 diferentes alturas indica que la relación Si/Al se mantiene relativamente constante (4.53 - 4.85), para zeolitas clinoptilolitas la relación Si/Al es de 4.25 a 5.25 (Hernández-Huesca y Aguilar-Armenta, 2002), y que presentan cantidades de cobre (0.002-0.009 % en peso) relativamente bajas. Los resultados anteriores permiten establecer que la zeolita sólo actúa como soporte para la biomasa y que no adsorbe el cobre. Por lo tanto, se asume que el cobre es absorbido por la biomasa, tal como se muestra en el análisis elemental por EDS realizado sobre las bacterias.

La Figura 30 corresponde a fotomicrografías representativas de la superficie de las muestras de zeolitas tratadas y tomadas a las 4 alturas del reactor. En las fotomicrografías se observan algas conocidas como diatomeas (Bacillaryophyta), son muy abundantes en casi todos los hábitats acuáticos, el rasgo más distintivo

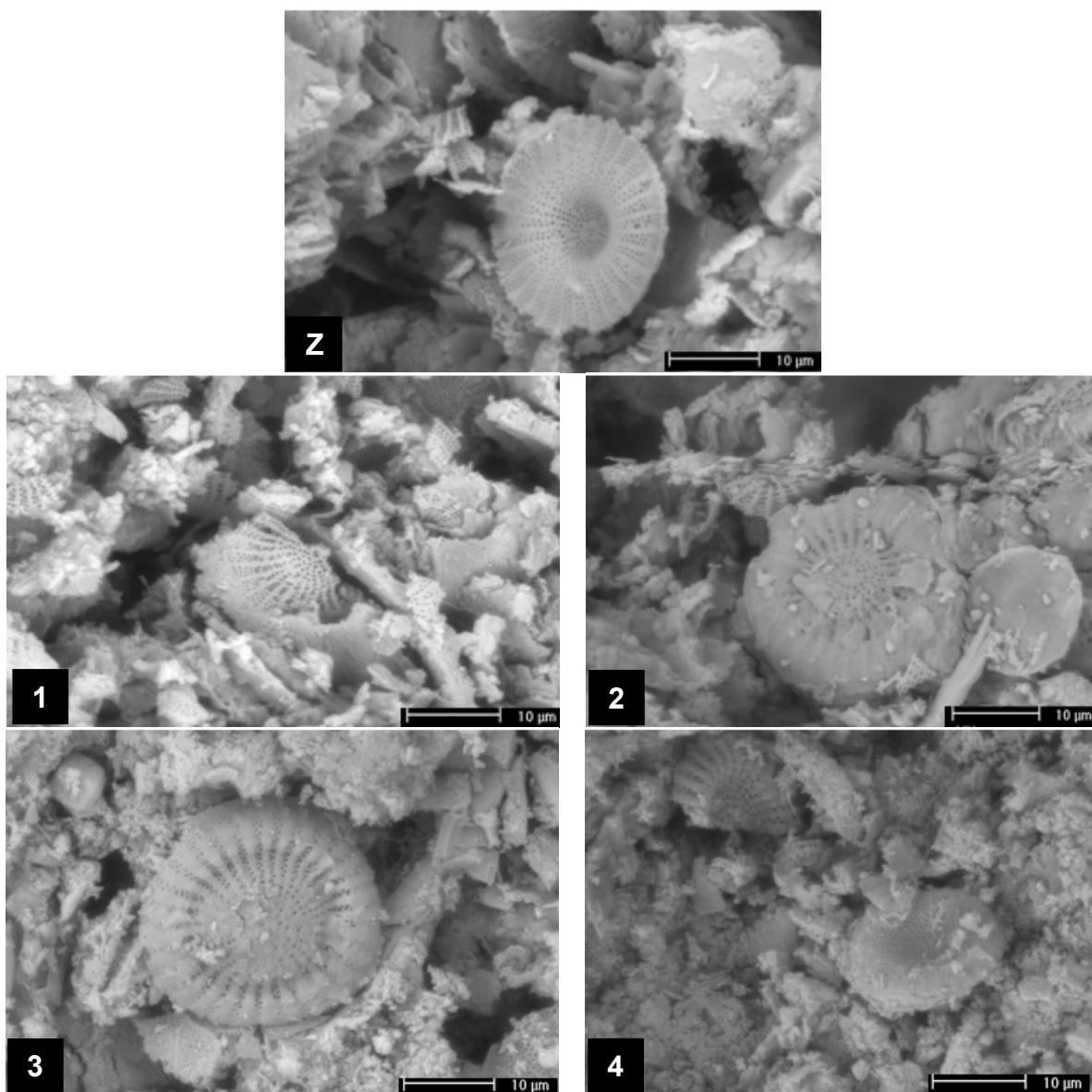


Figura 30. Magnificación del análisis superficial de las muestras de zeolitas sin tratar (Z) y zeolitas tratadas con el consorcio bacteriano a 4 alturas del reactor sin montar en resina a 2000X

de las diatomeas es su pared celular, compuesta de sílice (SiO_2) hidratada, es común encontrarlas en aguas con alta concentración de sílice (Oliva-Martínez *et al.*, 2005). También se puede observar como se van recubriendo de la biomasa formando una biopelícula y dependiendo de la altura donde fueron tomadas las muestras, se aprecia un recubrimiento mayor, según los resultados del análisis químico puntual que se realizó se encuentra depositado el cobre (2.54-4.01%).

4.6.3 Espectroscopia de Energía Dispersiva de Rayos X (EDS)

En la Figura 31, se observan los espectros de los elementos de la zeolita, 31 (a) es una muestra de zeolita de la parte de arriba, 31 (b) corresponde a la parte baja del reactor y 31 (c) a zeolita pura. En cada uno de ellos se observa que no hay presencia de cobre en la zeolita, este estudio indica que el cobre no se adsorbe a la zeolita. Por otra parte en la Figura 32, se muestran los espectros de EDS correspondientes al análisis superficial. Los resultados del análisis puntual de la biopelícula sobre las diatomeas indican que el cobre se encuentra en la superficie formada por la biopelícula de bacterias, lo cual demuestra que la biomasa esta removiendo el cobre y que se bioacumula en ella.

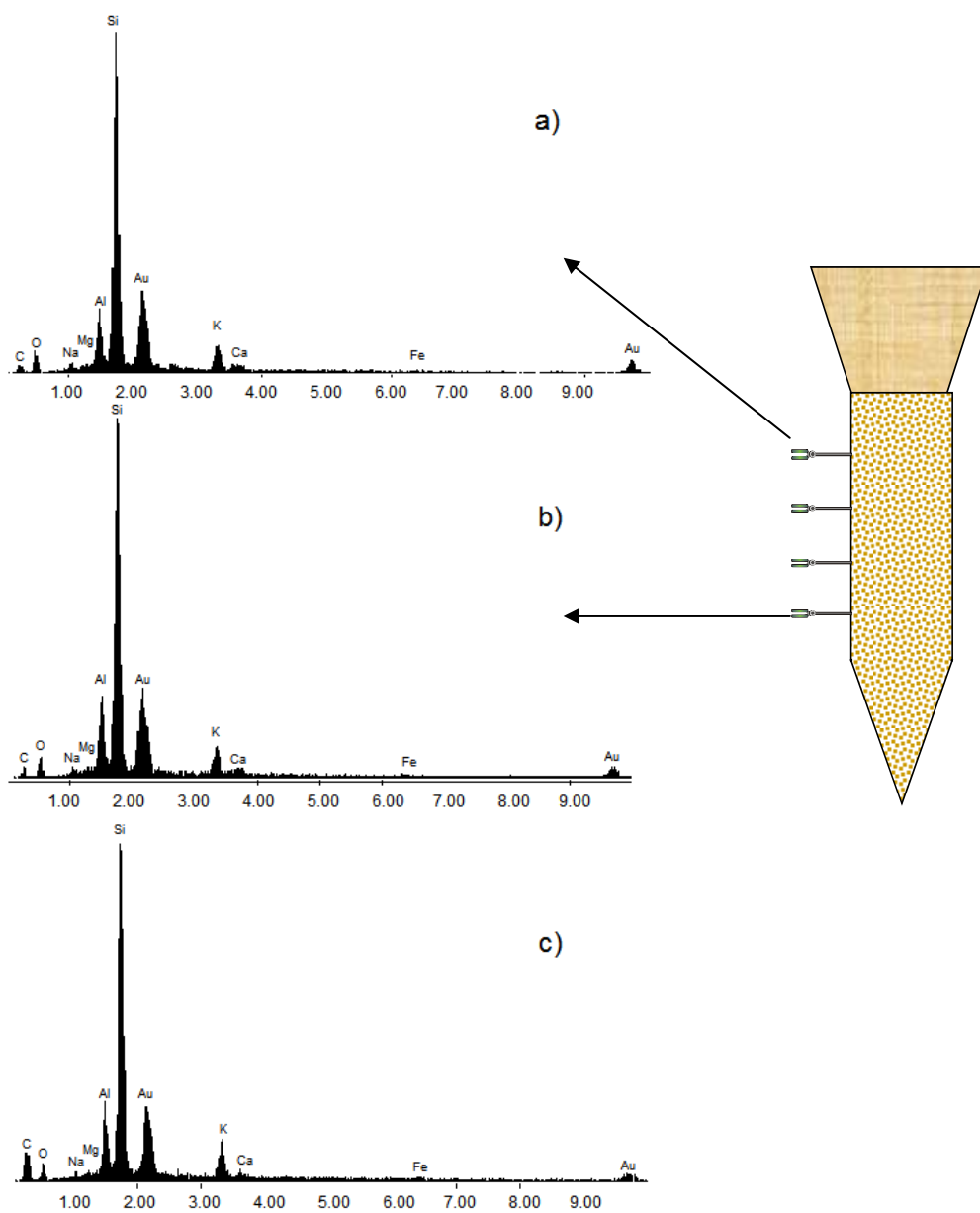


Figura 31. Espectros de las zeolitas a dos alturas del reactor
 a) parte alta del reactor
 b) parte baja del reactor
 c) zeolita sin tratar

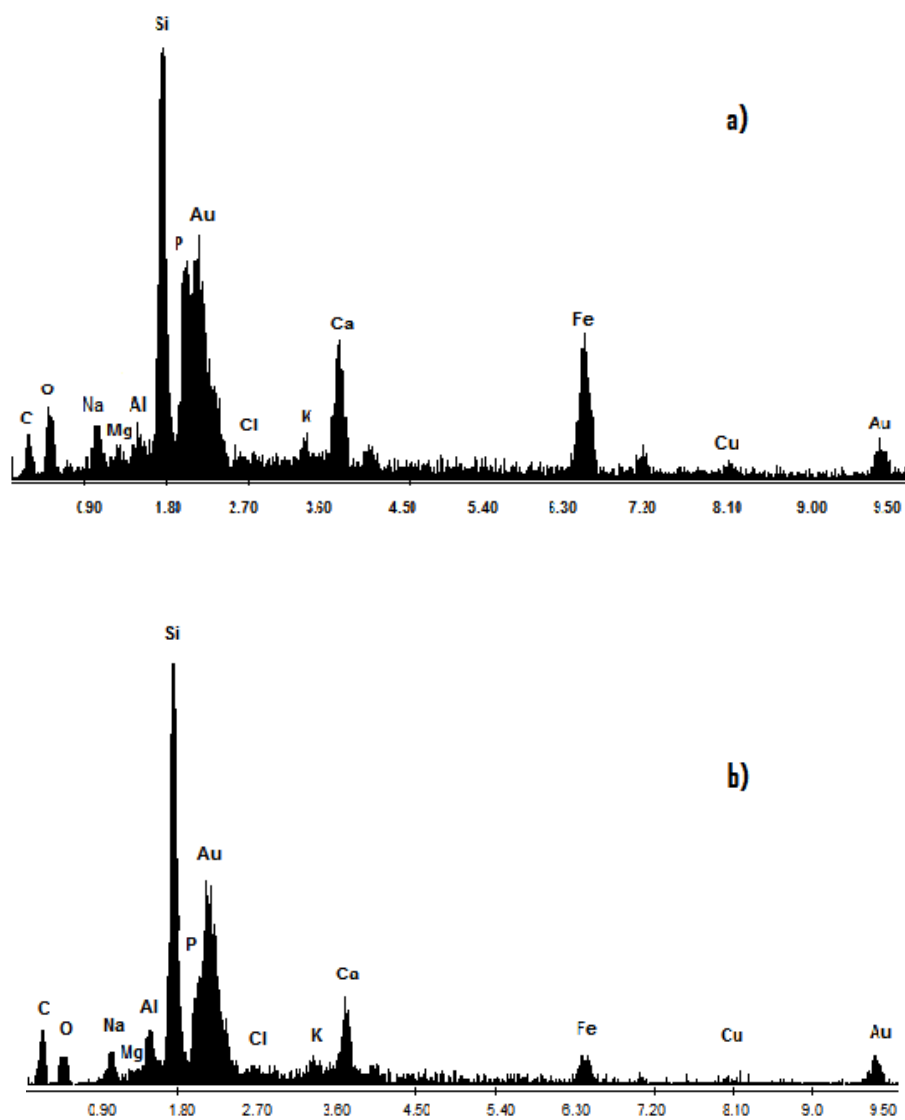


Figura 32. Espectros del análisis puntual realizado a las diatomeas (a) parte baja del reactor; (b) parte alta del reactor

V. CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados obtenidos en el presente estudio del proceso de biosorción para la eliminación de metales pesados, específicamente el cobre, se concluye lo siguiente:

De los muestreos realizados en dos sitios de las aguas del Río San Pedro, en la estación 1 se reportan aguas con valores de pH ácidos, debido a que esta estación se encuentra más cercana a la explotación minera, mientras que en la estación 2 se encontraron valores de pH neutros, debido a que es una mezcla de las aguas negras de la ciudad de Cananea y de la estación 1, por lo que al mezclarse se neutralizan.

Se lograron aislar y caracterizar diferentes bacterias, hongos y levaduras, de las aguas muestreadas en el río San Pedro adaptados al pH ácido y a la presencia de metales. Fueron seleccionadas *Burkholderia cepacia* y *Escherichia coli* para realizar las pruebas de biosorción en sistema por lotes y un consorcio bacteriano de 10 cepas (*Pseudomonas putida*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Burkholderia cepacia*, dos cepas de *Enterobacter* spp y cuatro de *Micrococcus* spp), para realizar pruebas en sistema continuo. Estas cepas demostraron su capacidad de crecimiento en condiciones establecidas de pH ácido y medio mineral, por lo que se utilizaron para determinar su capacidad en la remoción de metales de efluentes ácidos.

En los experimentos por lotes, las bacterias *Burkholderia cepacia* y *Escherichia coli*, mostraron la capacidad de biosorber al cobre, ya que se obtuvo

un 73% de biosorción con ambas cepas en 75 minutos. Al inmovilizarlas en zeolita natural no activada, la biosorción fue del 75% en el mismo tiempo, esto indica que la zeolita solo actúo como soporte de biomasa y no esta absorbiendo al cobre, debido a que no hubo variación significativa en las dos pruebas, asimismo se confirmó con la determinación de las constantes de velocidad (K) de retención del cobre.

El proceso de biosorción utilizando el consorcio bacteriano en un Reactor Aerobio de Flujo Ascendente Empacado con Zeolita (RAEFA-EZ), a pH 3-4 y sin recirculación de biomasa, fue de 96% en el primer día de contacto. Al recircular la biomasa, esta biosorción de cobre se mantiene durante seis días, esto es debido a que se aumenta la interacción entre el sorbato y el biosorbente.

El pH influye en el proceso de biosorción, ya que al aumentarlo (pH 4-5) la remoción de cobre en el proceso continuo se mantuvo por diez días (entre 84-96%), debido que se facilita el enlace de los iones Cu(II) positivos con los polímeros que forman parte de la pared celular.

El estudio de la cinética de biosorción de los iones de cobre reflejó la efectividad del consorcio bacteriano utilizado ya que la capacidad máxima de adsorción fue de $196 \text{ mgCu(II)/g biomasa } (q_0)$, de acuerdo al modelo de Langmuir.

La zeolita no activada sólo sirvió como soporte de biomasa, ya que la adhesión a ella por parte de las bacterias, ayuda a que la biomasa se mantenga por más tiempo de contacto y evita que se pierda en el efluente. Esta propiedad se demostró en los experimentos de biosorción por lotes, donde no hubo variación significativa de remoción de cobre al utilizarla para inmovilización de la biomasa.

Estos resultados fueron corroborados por medio de los difractogramas obtenidos por Difracción de Rayos X (DRX), que mostraron que no hubo cambios en las fases de la zeolita después de agregarles las bacterias y los estudios de Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) no detectaron presencia de cobre en la zeolita analizada en las 4 alturas del reactor.

Los estudios realizados por MEB y Espectroscopia de Energía Dispersiva de Rayos X (EDS) en la superficie de las zeolitas detectaron la presencia de diatomeas y una biopelícula de bacterias donde estaba depositado el cobre.

En este trabajo se logró demostrar que el uso de microorganismos para remover el cobre, puede ser una alternativa de limpieza de sitios contaminados con metales pesados en sistemas continuos.

El proceso de biosorción de cobre utilizado en el presente trabajo, se puede recomendar para biosorber metales como el cobre y se considera una alternativa al empleo de agentes químicos para la limpieza de sitios contaminados con metales pesados, a concentraciones bajas ($< 65 \text{ mgCu(II)/L}$) y controlando el pH (entre 4-5), para evitar que el cobre precipite y a la vez que no afecte al desarrollo de las bacterias.

VI. REFERENCIAS

- Acosta I., Moctezuma-Zárate M.G., Cárdenas J. F. y Gutiérrez C. (2007). Bioadsorción de cadmio (II) en solución acuosa por biomasa fúngica. *Inf. Tec.* 18, 9-14.
- Agemian H. y Chau A. S. Y. (1975). An atomic absorption method for the determination of 20 elements in lake sediments after acid digestion. *Analytica Chimica Acta* 80:61-66.
- Aguayo, S.S. y Mejía, Z. F. A. (2006). Adsorción de arsénico en zeolitas naturales pre-tratadas. *Memorias del XVI Congreso Internacional de Metalurgia Extractiva*. Saltillo, Coahuila. Pp. 303-310.
- Aquihuatl R. M.A. y Pérez Ch. M.L. (2004). *Manual de prácticas del laboratorio de microbiología general*. Primer edición. UAM. México. P.p 37-49.
- Almendáriz T. F. J. (2005). Tratamiento de sosas gastadas en un reactor de lecho expandido de lodos granulares anaerobios (EGSB). Tesis Doctoral. UAM-Iztapalapa. México.
- Atkinson B. W., Box F. y Kusan H.C. (1998). Considerations for application of biosorption technology to remediate et al contaminated industrial effluents. *Water SA*. 24, 129-135.
- Atlas. M.R. y Bartha R. (2002). *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. 4ª Ed. Pearson educación. Madrid, España. Pp. 3-24.
- Basso, M. C., Cerrella, E.G. y 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. 69-74.
- Borzacconi L. y López I. (2003). Cinética de ingeniería de reacciones. Notas de curso. Facultad de Ingeniería. <http://www.fing.edu.uy/iq/reactores/cursos/reactores1.pdf> consulta: 11-agosto-2008.
- Brooks G. F., Bute, J. S. y Morse S. A. (1999). *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. 16ª Ed. Manual Moderno. México. Pp. 110-111.
- Camarillo, J. (2004). Enfermedades por deficiencia o trastorno del metabolismo del cobre. *Mediclopedia*. ICD-10:E61.0.

- Cañizares- Villanueva, R. O. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 42:131-143.
- Carrillo, P. E. (2001). Aislamiento, identificación y evaluación de un consorcio de microorganismos con capacidad para degradar DDT. Tesis de Maestría en Ciencias de la Ingeniería. Universidad de Sonora.
- Castillo B. S. (2004). Reutilización de raspo procedente de la industria vinícola para la extracción de metales en efluentes líquidos. Tesis. Universitat Politècnica de Catalunya. Barcelona.
- Cervantes C. (2006). Las bacterias y los metales ¿relaciones peligrosas? *Carisma de la Ciencia*. México. 3:5-8.
- Chang J.S, Law R. y Chang C. C. (1997). Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU21. *Water Research*. 31, 1651-1658.
- Cotoras T. D. (2003). Bacterias para descontaminar aguas residuales de la minería y la industria. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile. *Induambiente* 13(14): 27-29.
<http://www.estrucplan.com.ar/Secciones/Noticias/Noticia.asp>.
 Consulta: noviembre-2006.
- Da Costa A. C. A. y Pereira D. F. (2001). Bioaccumulation of copper, zinc, cadmium and lead by *Bacillus* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus subtilis*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 32:1-5.
- De França F.P., Padilha F. P., Da Costa A.C. 2006. Continuous biotreatment of copper-concentrated solutions by biosorption with *Sargassum* sp. *Appl Biochem Biotechnol*. 128 (1): 23-32.
- Duarte S. D. (1997). Evaluación de la capacidad de biosorción de Ni(II) por *Thiobacillus Ferrooxidans*. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Química. Universidad de Sonora.
- Eweis J. B., Ergas S. J., Chang D. P., Schroeder E. D., Tejero M. I., Amieva del Val J.J. (1999). *Principios de biorrecuperación (Bioremediation)*. Primera Edición. Mac Graw Hall Interamericana de España. México. Pp. 4, 12, 21, 94.
- Finey D. J. (1952). *Probit análisis*. Cambridge University Press, second Edition.
- Flores J., Maubert A., Martin N. (2006). Evaluación de los intercambios iónicos en una zeolita natural Mexicana para la separación de N₂-O₂ en el aire atmosférico. *Rev. Mex. de Ing. Quim.*5:002. Pp 119-129.

- Flores-Vásquez, J., Ly M., Tapia, H. N., Maldonado G. H. (2001). Biorremediación de metales tóxicos en efluentes mineros aplicando biosorción. Revista del Instituto de Investigación de la Facultad de Geología, Minas, Metalurgia y Ciencias Geográficas. Vol. 4 N° 07.
- Fogler, H. S., Escalona G. R. L. y Ramírez S. J. F. (2001). *Elementos de ingeniería de las reacciones químicas*. Pearson Educación. México. Pp. 8-11; 34-39.
- Fontúrbel e Ibáñez (2004). Fuentes de energía biológica: empleo del metabolismo microbiano para la descontaminación de aguas. Biología. Org.: portal de biología y Ciencias de la Salud. La revista: número 17: 1-6. 10-agosto-2005.
- Gaballah I., Kilbertus G. D. (1993). Descontamination of synthetic solutions containing copper ions using modified bark. In: Proc. 122nd TMS Annual Meeting & Exhibition. Denver, USA, 1993.
- Garbisu, C., Amézaga, I. y Alkorta, I. (2002). Biorremediación y Ecología. Ecosistemas 2002/3 España. <http://www.aet.org/ecosistemas/023/opinion1.htm> Consulta: Mayo 2008.
- 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. 20(1) 5-12.
- Gómez-Álvarez, A., Valenzuela-García, J. L., Aguayo-Salinas, S., Meza-Figueroa, D., Ramírez-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.
- Göksungur Y., Üren S., Güvenc U. (2003). Biosorption of copper ions by caustic treated waste baker's yeast biomass. Turk J. Biol. 27, 23-29.
- Guerrero S., López A. A. I. y Botella J. A. (2005). Ecología microbiana. Revista científica y técnica de ecología y medio ambiente. Ecosistemas. 14:2.
- Gupta R., Prerna Ahuja, Seema Khan, R. K. Saxena and Mohapatra H. (2000). Microbial biosorbents: Meeting challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. CURRENT SCIENCE, 78, No. 8, 967-973.

- Hadi B., Margaritis A., Berruti F. and Bergougnou M. (2003). Kinetics and equilibrium of Cadmium biosorption by Yeast Cells *S. cerevisiae* and *K. fragilis*. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*. Vol. 1, A 47. 1-15.
- Henry J. G. y Heinke W.G. (1999). *Ingeniería Ambiental*. Segunda edición. Ed Prentice Hall. México. Pp. 195, 196, 431.
- Hernández-Huesca, R. y Aguilar-Armenta G. (2002). Calores isostéricos de adsorción de CO₂ en zeolita naturales mexicanas. *Journal of the Mexican Chemical Society*. 46:002. Pp. 109-114.
- Holan, Z.R. y Volesky, B. (1995). Accumulation of cadmium, lead and nickel by fungal and wood biosorbents. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 53, 133-146.
- Holding, B. V. (2005). <http://www.lenntech.com/espanol/tabla-peiodica/Cu.htm>. Consulta: Enero-2007.
- Holmes A., Govan J., Goldstein R. (1998). Agricultural use of Burkholderia (*Pseudomonas*) *cepacia*: a threat to human health? *Emergyn Infectious Diseases*. 4, No. 2, 221-227.
- Horsfall, M. J., Ayebaemi I. and ABI, A.A. (2004). Studies on the influence of mercaptoacetic acid (MAA) modification of Cassava (*Manihot sculenta cranz*) waste biomass on the adsorption of Cu²⁺ and Cd²⁺ from aqueous solution. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 25:7. Pp 969-976.
- Huang, J.P., Huang, C.P. and Morehart, A.L. (1998). Removal of heavy metals by fungal (*Aspergillus oryzae*) adsorption. In: VERNET, J.P. ed *Trace metals in the environment 1. Heavy metals in the environment*. Elsevier, Amsterdam. pp. 329-349.
- Hussein H., Ibrahim S.F., Kandeel K. y Moawad H. (2004). Biosorption of metals heavy of water using the Sp *pseudomonas*. *Biotechnology microbiana*. Chile. Vol. 7.
- Ilhan S., Nurbas. M. N., Kilicarslan S. and 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.
- Jianglong W. (2002). Biosorption of copper (II) by chemically modified biomass of *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*. (37).Pp. 847-850.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática) (1993). Cartas topográficas H12B32, H12B33, H12B34, H12B42, H12B43, H12B44, H12B52, H12B53 Y H12B54. Esc 1:50, 000. México, D. F.

- Kappor A. y Viraraghavan T. (1995). Fungal biosorption an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters; a review, *Bioresource Technology*: 53, 195-206.
- Koneman E. W., Allen S., Janda W., Schrenberger P., Winn W. (1999). *Diagnóstico microbiológico*. Médica Panamericana. México. Pp. 1-349; 1258-1357.
- Kuyucak N. y Volesky, B. (1989). Accumulation of cobalt by marine alga. *Biotechnol. Bioeng.* 33, 809-814.
- Lasat M. M. (2002). Phytoextraction of toxic metals: A review of biological mechanisms. *J. Environ. Qual.* 31,109-120.
- 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.
- Leyva Ramos R., Sánchez C. M., Hernández S. M., Guerrero C. R. (2001). Remoción de metales pesados de solución acuosa por medio de clinoptilolitas naturales. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 17 (3) 129-136.
- Leyva Ramos R., Medellín C. N. A., Guerrero C. R.M., Berber M. M.S., Aragón P. A. y Jacobo A. A. (2005). Intercambio iónico de plata (I) en solución acuosa sobre clinoptilolita. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 21 (4) 193-200.
- Leung W.C., Wong M-F., Chua H., Lo W., Yu P.H.F. y Leung C.K. (2000). Removal and recovery of heavy metals by bacteria isolated from activated sludge treating industrial effluents and municipal wastewater. *Water Science and Technology.* 41, No 12, 233–240.
- Levin M. y Gealt M. A. (1997). *Biotratamiento de Residuos Tóxicos y Peligrosos*. Primera Edición. Mc. Graw-Hill. México. pp. 2-7.
- Lomelí R. y Tamayo R. (2008). <http://www.sagan-gea.org/hojared/CAgua.html>, (Consulta: Junio 2008).
- Lu Y. y Wilkins E. (1995). Heavy metal removal by caustic-treated yeast immobilized in alginate. *Bioremediation of Inorganic*. Pp. 117-123.
- Mac Faddin J. F. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Médica Panamericana. México. 54 -421.

- Madigan M.T., Martinko J. M., Parker J. (2004). *Brock. Biología de los microorganismos*. Décima edición. Pearson Prentice Hall. España. Pp. 137-166.
- Maron, S.H. y Prutton C. F. (2004). *Fundamentos de Fisicoquímica*. Limusa. Wiley, S.A. México. Pp. 558-560.
- Mesquita V. D., Da Costa A. C. A., Assumpção H. C., Luiz C. V. y Pessoa F. F. (2007). Biosorption of lead by the brown seaweed *Sargassum filipéndula*-batch and continuous pilot studies. *Electronic Journal of Biotechnology*. Vol. 10 No. 3, 368-375.
- 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., 2003. Biorrestauración de suelos contaminados por cianuro, utilizando *Bacillus* sp. Tesis de Maestría en Ciencias de la Ingeniería. Universidad de Sonora.
- Moreira A.S., Duarte M. M. L., Nandenha J. y Macedo G.R. (2008). Estudio del mecanismo de remoción de hierro y cobre presentes en aceites lubricantes usados mediante bioadsorción. *Revista Inf. Tecnol.* Vol. 9(1). Fuente on line: www.scielo.cl. 17- Junio- 2008.
- Muraleedharan R., Venkobachar C. y Leela I. (1994). Investigation of fungal fruiting bodies as biosorbents for the removal of heavy metals from Industrial Processing Streams. *Separation Science Technology*. 29(14), 1983-1903.
- Muzzarelli R. A. A. y Tanfani F. (1980). Chelating films forming and foagulating ability of the chitosan glucan complexes from *Aspergillus niger* industrial waste. *Biotechnol. Bioeng.* V. 22, 885-896.
- Navarro-Aviño, I. A.A. y López-Moya J.R. (2007). Aspectos bioquímicos y genéticos de la tolerancia y acumulación de metales pesados en plantas. *Ecosistemas* 16 (2): 10-25.
- Nevarez LI.E.D. y Astorga V.C.R. (2007). Biosorción de cobre utilizando bacterias (*Burkholderia cepacia* y *Escherichia coli*), aisladas del río San Pedro. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Química y Metalurgia. Universidad de Sonora. México.
- Oliveira M. J. (2003). Estudio de la biosorción de cobre por perlas de alginato de calcio. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Perú.

- Padilha, F. P.; De França, Pessôa F. and Da Costa, A. C. A. (2005). The use of waste biomass of *Sargassum* sp. for the biosorption of copper from simulated semiconductor effluents. *Bioresource Technology*. 96, 13, pp. 1511-1517
- Plascencia J. M. (2004). Estudio de la actividad antifúngica del quitosano en solución y en películas. Tesis Doctoral. UAM- Iztapalapa. México.
- Pelczar, J. M., Reid R. D., Chan E. C. S. (1993). *Microbiología*. Mc Graw- Hill. México. 18-119.
- Pessôa F. F., Pinto P. F. y Da Costa A. C. A. (2006). Continuous biotreatment of copper-concentrated solutions by biosorption with *Sargassum* sp. *Appl Biochem Biotechnol*. 1, 23-32.
- 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. 31.59-64.
- Rivas B.G.A., Gutiérrez S. y Merino F. (2004). Biorremoción de metales pesados en solución por *Pseudomonas fluorescens* M1A-4S aisladas de ambientes mineros. En: Segunda Semana de Ciencia y Tecnología II-SCT-2004. Asociación Chotana de Ciencias. Perú.
- Rivera-Utrilla J., Bautista-Toledo I., Ferro-García M. A. y Moreno-Castilla C. (2003). "Bioadsorption of Pb(II), Cd(II) and Cr(VI) on activated carbon from aqueous solutions". *Pergamon. Carbon*:41, 323-330.
- Rodríguez, H. (2001). Estudio de la contaminación por metales pesados en la Cuenca de Llobregat. Tesis Doctoral. Barcelona.
- Saigí F. y López A. (2004). Las ciencias de la vida y la biotecnología en la nueva sociedad del conocimiento. La base de la nueva economía. <http://www.uoc.edu/dt/esp/saigi1104.pdf>. Agosto-2008.
- Sanz J. L. (2005) *Microbiología Ambiental*.
<http://www2.cbm.uam.es/jlsanz/docencia/archivos/21.pdf>
Consulta: Diciembre 2005.
- Steciw M. (2005). Biorremediación.
<http://www.cricyt.edu.ar/enciclopedia/terminos/Biorremed.htm>
Consulta: Diciembre 2005.
- Schneider I. A. H. y Rubio J. (1999). Sorption of heavy metals ions by the nonliving biomass of freshwater macrophytes. *Environ. Sci. Technol.*, V. 33, 2213-2217.

- Servin R. L. (2006). Metalurgia de minerales no metálicos, zeolitas.
<http://www.monografias.com/trabajos/zeolitas/zeolitas.htm>. Consulta: Enero 2007.
- SEDUE (Secretaría 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.
- Smith J. M. (1995). *Ingeniería de la Cinética Química*. Novena Edición, ed. McGraw-Hill. México. Pp. 47-48.
- Sousa V., Escalante A. E., Noguez A.M., Expinoza L., Cerritos R. y Eguiarte L. E. (2007). Ecología Microbiana: una nueva ciencia para un nuevo siglo. Instituto Nacional de Ecología. Consulta: junio-2008.
<http://www.ine.gob.mx/publicaciones/libros/440/cap5.html>
- Stanley L., Ogden K. (2003). Biosorption of copper (II) from chemical mechanical planarization wastewaters. *Journal of Env. Man.* (69). pp 289-297.
- Suárez P. y Reyes R. (2002). La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia para el ambiente. *Interciencia*. Venezuela. Vol. 27 (4) 160-164.
- Tada Y. and Inoue T. (2000). Use of oligotrophic bacteria for the biological monitoring of heavy metals. *Journal of Applied Microbiology* 88, 154-160.
- Tejeda A., Montesinos R. M. y Guzmán R. (1995). *Bioseparaciones*. Editorial Unison. México. Pp. 307-363.
- Torres R. A. y Juvina P. J. (2005). Desarrollo e implementación de un sistema de monitorización mediante sensores químicos de un proceso de biosorción para la recuperación de ion cobre (II) en efluentes acuosos. Universitat Politècnica de Catalunya. Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona. 26-septiembre-2006.
http://biblioteca.upc.es/pfc/mostrar_dades_PFC.asp?id=41356.
- Trevors J. T. and Cotter C. M. (1990). Copper toxicity and uptake in microorganisms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 6: 77-84.
- Vázquez V. R. (2005). Biosorción de metales pesados en solución acuosa mediante biomasa bacteriana muerta. Tesis Licenciatura en Biología. Departamento de Química y Biología, Escuela de Ciencias, Universidad de las Américas, Puebla.

- Vijayaraghavan K., Prabu D. (2006). Potential of *Sargassum wightii* biomass for copper (II) removal from aqueous solutions: application of different mathematical models to batch and continuous biosorption data. *J Hazard Mater.* 137(1):558-564.
- Volesky, B. (1990). *Biosorption of heavy metals*. CRC Press, Boca Raton, Florida. Pp.1-5.
- Volesky, B. (2004). Sorption and Biosorption. BV Sorbex, Inc. Montreal, Canadá. p.5
- Volke S. T. L., Velasco T.J.A., De la Rosa P.D.A. y Solórzano O.G. (2004). Evaluación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales. INE. Dirección de Investigación en Residuos y Proyectos Regionales. Primer informe.
- Vullo D. L. (2003). Microorganismos y metales pesados: Una interacción en beneficio del medio ambiente. *Revista Química Viva*. Vol. 2, numero 3.
- Wankasi D., Horsfall M., Ibuteme A. (2006). Sorption kinetics of Pb^{2+} and Cu^{2+} ions from aqueous solution by Nipah palm (*Nypa fruticans* Wurmb) shoot biomass. *Electronic Journal of Biotechnology* ISSN:0717-3458. 9. No. 5. 587-592.
- Yan G. y Viraraghavan T. (2003). Heavy-metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*. *Water Research* (37). Pp. 4486-4496.
- Yuan-gang Z., Xiu-hua Z., Mao-sheng H., Yuan R., Peng Z., Lei Z., Yu-jie C., Yao Z. (2006). Biosorption effects of copper ions on *Candida utilis* under negative pressure cavitation. *Journal of Environmental Sciences*. Vol. 18. No. 6. pp. 1254-1259.

ANEXOS

Anexo 1

Tratamiento del Material Utilizado en Experimentos para Análisis de Metales Pesados

Todo el material Utilizado en las pruebas análisis de metales, que incluye cristalería y material de plástico se somete a un estricto control de limpieza para eliminar trazas de metales que pudieran interferir en los resultados de lecturas del cobre. A continuación se describe el procedimiento:

- Lavar el material con detergente
- Dejar el material en una solución de ácido nítrico 1:100, por un tiempo mínimo 2 horas.
- Posteriormente enjuagarlo con agua destilada y luego con agua desionizada.
- Dejarlo secar
- Guardarlo para su uso

Anexo 2

Preparación de las muestras para leerse en espectrofotómetro de Absorción Atómica

1. Se filtra la muestra a analizar para eliminar impurezas
2. Con pipetas volumétricas, se toma una muestra, puede ser de 1, 5, 10 o 20 mL dependiendo de la concentración inicial de cobre.
3. Se coloca en un matraz volumétrico de 100 mL, se le agrega 5 mL de ácido nítrico (5%) y se afora con agua desionizada (puede usarse matraces de 50 mL pero que la concentración del ácido sea la misma, 5%).
4. Se preparan estándares de 1, 2, 5, 10, 15 y 20 mgCu(II)/L con el estándar de 1000 ppm (mg/L) para la curva de calibración del espectrofotómetro.
5. Se lee en el espectrofotómetro la concentración de cobre y se multiplica por el factor de dilución con la siguiente ecuación.

$$\text{mgCu(II)/L} = \text{lectura} \times 10$$

(Si se toma una muestra de 10 mL, por 20 si se toman 5, etc)

Anexo 3

Estándares del Nefelómetro de McFarland

- Organice 10 tubos de ensaye o ampollitas de igual tamaño y buena calidad: Use tubos nuevos lavados y completamente secos.
- Prepare H_2SO_4 químicamente puro al 1%.
- Prepare una solución acuosa de cloruro de bario químicamente puro al 1%.
- Añadir a los tubos las cantidades designadas de las dos soluciones como se muestra en la Tabla 5 para hacer un total de 10 ml /tubo.
- Cierre los tubos o ampollitas. La suspensión de sulfato de bario corresponde a un precipitado aproximadamente homogéneo de la densidad de las células por mililitro, variable en el estándar, como se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Estándares del nefelómetro de McFarland

No. de Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Cloruro de bario (ml)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1
Ácido sulfúrico (ml)	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9
Densidad Aprox. de célula ($X10^8/mL$)	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

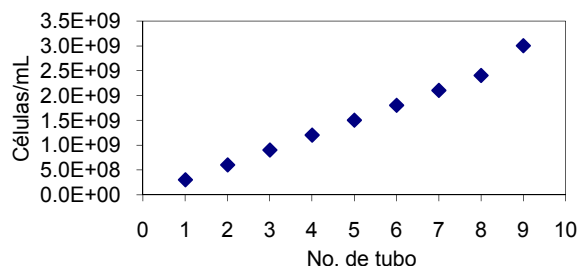
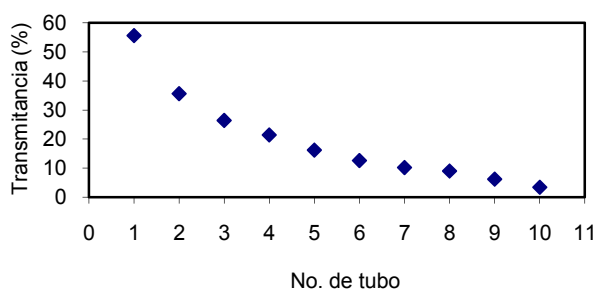


Figura 33. Curvas estándares de nefelómetro con transmitancia (%) y densidad celular

Anexo 4

Preparación de las muestras para análisis de digestión de sólidos

Se pesa 0.25 g de muestra en vasos de teflón, se le agrega 10 mL de HNO₃ (ácido nítrico), 10 mL de HF (ácido fluorhídrico) y 5 mL de HCl (ácido clorhídrico), posteriormente se calienta en plancha de arena a 120°C como máximo, hasta reducir el volumen a 2 mL aproximadamente. Después se agrega nuevamente 5 mL de HNO₃, 5 de HF y 2 mL de HCl, y se calienta nuevamente a la misma temperatura hasta reducir el volumen a 2 mL. Con 25 ml de H₃BO₃ (ácido bromhídrico) al 4% mas 2 mL de HCl, se afora a 100 mL con agua deionizada, para leer la concentración de cobre en equipo de absorción atómica. (Agemian y Chau, 1975). La ecuación 20, fue la utilizada para conocer la cantidad de cobre en µg/g.

Anexo 5

Resultados de Bioquímicas

Tabla 6. Identificación Bioquímica

Bacteria	Gram	CAT	MR	VP	UREA	MIO			CITRATO		TSI	GAS	LIA	NIT	GENERO
						MOV	MAN	INDOL	24	48					
1	P	P	N	P		N	N	N	P		P	P	P	P	<i>Bacillus mycoides</i>
2	P	P	N	N		P	N	P	P		P	P	P	P	<i>Bacillus cereus</i>
3	P	P	P	N		P	P	N		N	P		N	P	<i>Bacillus circulans</i>
4	P	P	P	N		P	P	N		N	P		N	P	<i>Bacillus circulans</i>
5	P	P	P	N		P	P	N		N	P		P	P	<i>Bacillus cereus</i>
6	P	P	P	P		P	P	N		N	P		P	P	<i>Bacillus cereus</i>
7	P	P	P	N		P	P	P		N	P	P	P	P	<i>Bacillus cereus</i>
8	P	P	P	N		P	P	N		N	P		P	N	<i>Bacillus cereus</i>
9	P	P	P	N		P	P	N		N	P		P	P	<i>Bacillus cereus</i>
10	P	P	P	N		P	P	P		N	P		P	P	<i>Bacillus cereus</i>
11	P	P	P	N		P	N	N		P	P		P	P	<i>Micrococcus roseus</i>
12	P	P	P	N		N	P	N		N	P		P	P	<i>Micrococcus varians</i>
13	P	P	P	N		N	P	N		P	P		P	P	<i>Micrococcus varians</i>
14	P	P	P	N		P	N	N		N	P		N	P	<i>Micrococcus roseus</i>
15	P	P	P	P		N	N	N		N	P		P	N	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
16	P	P	N	P		N	P	N		P	P		N	P	<i>Staphylococcus aureus</i>
17	P	P	P	N		N	P	N		N	P		N	P	<i>Micrococcus varians</i>
18	P	P	P	N		P	P	N		N	P		P	P	<i>Micrococcus roseus</i>
19	P	P	P	N		N	P	N		N	P		N	P	<i>Micrococcus varians</i>
20	P	P	N	P	P	P	P	N	N	N	P		P	P	<i>Staphylococcus aureus</i>
21	P	P	N	P	P	P	N	N	N	N	P		P	P	<i>Bacillus cereus</i>
22	P	N	N	P	P	N	N	N	P		P		P	P	<i>Clostridium perfringens</i>
23	P	P	N	P	P	P	P	N	N	P	P		N	P	<i>Staphylococcus aureus</i>
24	P	P	N	P	P	N	P	N	N	N	P		N	P	<i>Staphylococcus aureus</i>
25	N	P	P	N	P	N	P	N	N		N	N	N	P	<i>Moraxella phenylpyruvica</i>
6	N	P	P	N	P	P	P	N	N		N	N	N	P	<i>Yersinia enterocolitica</i>
27	N	P	N	P	P	N	P	N	N		P	N	N	P	<i>Enterobacteriaceae</i>
28	N	P	N	N	P	N	P	N	N		N	N	P	P	<i>Pseudomonas mallei</i>
29	N	P	N	N	P	N	P	N	N		P	N	P	P	<i>Pseudomonas mallei</i>
30	N	P	N	P	P	N	P	N	N		P	N	P	P	<i>Haemophilus suis</i> o <i>H. parahaemolyticus</i>
31	N	P	P	N	P	N	P	N	N		P	N	N	P	<i>Yersinia</i>
32	N	P	P	N	P	N	P	N	N		P	N	N	P	<i>Yersinia</i>
33	N	N	P	N	P	P	P	N	N		P	N	N	P	<i>Proteus mirabilis</i>
34	N	P	P	N	P	N	P	N	N		P	N	P	P	<i>Yersinia</i>
35	N	P	P	N	P	N	P	N	N	P	P	N	P	N	<i>Yersinia enterocolitica</i>
36	N	P	N	P	P	N	P	N	N		P	N	P	P	<i>Bacillus brucella</i>
37	N	P	P	N	P	N	P	N	N		P	N	P	P	<i>Yersinia</i>
38	N	P	N	P	P	P	P	N	N		P	N	P	P	<i>Haemophilus suis</i> o <i>H. parahaemolyticus</i>
39	N	P	P	N	P	P	P	P	N		P	P	P	P	<i>Proteus morgani</i>
40	N	P	P	N	P	N	P	N	N		P	N	P	P	<i>Yersinia</i>

41	N	P	P	P	P	P	P	N	N		P	N	P	P	<i>Haemophilus suis</i> o <i>H. parahaemolyticus</i>
42	N	P	P	N	P	N	P	N	N		P	N	P	P	<i>Yersinia</i>
43	N	P	N	P	P	P	P	N	P		P	P	P	N	<i>Klebsiella</i>
44	N	P	P	N	P	P	P	N	N		P	N	P	P	<i>Enterobacteriaceae</i>
45	N	P	N	P	P	P	N	N	N	P	P	N	N	P	<i>Enterobacter cloacae</i>
46	N	P	P	N	P	P	P	P	N		P	P	P	P	<i>Escherichia coli</i>
47	N	P	P	N	P	P	P	N	P		P	N	P	P	<i>Enterobacter cloacae</i>
48	N	P	P	N	P	P	P	N	P		P	N	P	N	<i>Enterobacter cloacae</i>
49	N	P	P	N	P	P	P	N	P		P	N	P	P	<i>Enterobacter cloacae</i>
50	N	N	P	N	P	P	P	N	N	P	P	N	P	P	<i>Serratia liquefaciens</i>
51	N	N	P	P	P	P	P	N	N		P	N	P	P	<i>Enterobacter hafniae</i>
52	N	P	N	N	P	P	P	N	N		P	N	P	P	<i>Pseudomonas maltophilia</i>
53	N	P	N	N	P	N	N	N	P		P	P	N	P	<i>Pseudomonas putida</i>
54	N	P	N	N	P	P	N	P	P		P	N	N	P	<i>Pseudomonas cepacia</i>
55	N	P	P	N	P	P	N	P	N	P	P	P	N	P	<i>Proteus rettgeri</i>
56	N	P	N	P	P	P	N	P	P		P	P	N	P	<i>Vibrio</i>
57	N	P	P	N	P	N	P	N	N		P	N	P	P	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>
58	N	P	N	N	P	P	P	P	P		P	P	N	P	<i>Pseudomonas cepacia</i>
59	N	P	N*	P	P	P	N	N	P		P		P	P	<i>Vibrio</i>
60	N	P	N	P	P	P	N	N	P		P		P	P	<i>Enterobacteriaceae</i>

(P) positivo, (N) negativo

CAT= Prueba de catalasa

MR= rojo de Metilo

VP= Voges-Proskauer

Urea= Prueba de Ureasa

Mov= Prueba de movilidad

Man= Prueba de Manitol

24= 24 horas

48= 48 horas

TSI= Agar hierro triplemente azucarado

GAS= Producción de gas

LIA= Caldo de lisina de carboxilasa

NIT= nitratos

Anexo 6

Curvas de crecimiento de *Bc* y *Ec*

Tabla 7. Datos experimentales para la curva de crecimiento de *Burkholderia cepacia*

Tiempo (min)	%T (1)	%T(2)	Ec. 1	Ec. 1	Promedio	desvest
0	96	94	0.0269	0.0177	0.0223	0.0045
30	92	90.6	0.0429	0.0362	0.0395	0.0033
60	85	84.6	0.0726	0.0705	0.0715	0.0010
90	82.3	80.6	0.0937	0.0846	0.0891	0.0045
120	69.5	65.4	0.1844	0.1580	0.1712	0.0131
150	48	40.6	0.3915	0.3187	0.3551	0.0363
180	21	19.6	0.7077	0.6777	0.6927	0.0149

Tabla 8. Datos experimentales para la curva de crecimiento de *Escherichia coli*

Tiempo (min)	%T (1)	%T(2)	Ec. 1	Ec. 1	Promedio	desvest
0	90.8	92.2	0.0419	0.03526908	0.03858454	0.00331546
30	88.4	89	0.0535	0.05060999	0.052055	0.001445
60	75.8	78.6	0.1203	0.10457745	0.11243873	0.00786127
90	56.2	60.2	0.2503	0.22040351	0.23535175	0.01494825
120	43.2	46	0.3645	0.33724217	0.35087108	0.01362892
150	30.4	33.4	0.5171	0.47625353	0.49667677	0.02042323
180	22.4	24.1	0.6498	0.61798296	0.63389148	0.01590852

%T= Lectura de porcentaje de transmitancia

Anexo 7

Biosorción de cobre en sistema por lotes

Tabla 9. Datos experimentales de biosorción de cobre con *Burkholderia cepacia*

Tiempo (min)	Concentración (mg/L)		Promedio	C/Co		Promedio	C/Co	Desvest
	50	48.8		1	1			
0	50	48.8	49.4	1	1	1	1	0
15	39.1	42	40.55	0.782	0.8607	0.8213	0.8209	0.0393
30	30.78	37.8	34.29	0.6156	0.7746	0.6951	0.8456	0.0795
45	22.48	30.4	26.44	0.4496	0.6230	0.5363	0.7711	0.0867
60	21.07	26.6	23.835	0.4214	0.5451	0.4832	0.9015	0.0618
75	13.92	12.6	13.26	0.2784	0.2582	0.2683	0.5563	0.0101

Tabla 10. Datos experimentales de biosorción de cobre con *Escherichia coli*

Tiempo (min)	Concentración (mg/L)		Promedio	C/Co		Promedio	C/Co	Desvest
	50	48.8		1	1			
0	50	48.8	49.4	1	1	1	1	0
15	35.60	42	38.8	0.712	0.8607	0.7863	0.7854	0.0743
30	28.62	34.2	31.41	0.5724	0.7008	0.6366	0.8095	0.0642
45	23.20	30.4	26.8	0.464	0.6230	0.5435	0.8532	0.0795
60	19.25	23.8	21.525	0.385	0.4877	0.4364	0.8032	0.0514
75	13.56	14.4	13.98	0.2712	0.2951	0.2831	0.6495	0.0119

Co= Concentración inicial de cobre, mg/L

C= Concentración remanente de cobre, mg/L

Tabla 11. Datos experimentales de las curvas de biosorción del Cu (II) de *Ec* y *Bc* soportadas en zeolitas

Tiempo (min)	Concentración (mg/L)		Promedio	C/Co		Promedio	C/Co	Desvest
0	50	48.8	49.4	1	1	1	1	0
15	35	42.6	38.8	0.7	0.87295	0.786475	0.785425	0.086475
30	28.62	34.56	31.59	0.5724	0.70819	0.640298	0.639473	0.067898
45	24	28.8	26.4	0.48	0.59016	0.535082	0.534413	0.055082
60	17.85	21.84	19.845	0.357	0.44754	0.40227	0.401720	0.045270
75	12.08	13.2	12.64	0.2416	0.27049	0.256046	0.255870	0.014445
<i>Bc</i> + Z								
0	50	48.8	49.4	1	1	1	1	0
15	34.7	42	38.35	0.694	0.86065	0.777328	0.776315	0.083327
30	25.65	33.3	29.475	0.513	0.68237	0.597689	0.596659	0.084688
45	22.72	27.2	24.96	0.4544	0.55737	0.505889	0.505263	0.051488
60	16.94	22.4	19.67	0.3388	0.45901	0.398908	0.398178	0.060108
75	12.3	13.44	12.87	0.246	0.27541	0.260705	0.260526	0.014704
Cu(II) + Z								
0	50	48.8	49.4	1	1	1	1	0
15	50.2	56	53.1	1.004	1.14754	1.07577	1.074898	0.071770
30	44.64	54	49.32	0.8928	1.10655	0.999679	0.998380	0.106878
45	46.4	50.08	48.24	0.928	1.02623	0.977115	0.976518	0.049114
60	42.7	40.46	41.58	0.854	0.82909	0.841549	0.841700	0.012450
75	41.16	40.8	40.98	0.8232	0.83606	0.829633	0.829554	0.0064328

Anexo 8

Biosorción de cobre en columna

Tabla 12. Datos experimentales de biosorción de Cu (II) en RAEFA-EZ a pH de 3-4 a 50 y 20 mgCu(II)/L, de las corridas experimentales E1, E2, E3

Tiempo (días)	mgCu(II)/L	Tiempo (días)	mgCu(II)/L	Tiempo (días)	mgCu(II)/L	Tiempo (días)	mgCu(II)/L
0		42	53.34	87	16.2	124	4.7
1		43	53	88	18.5	125	4.7
2	0.08	44	53.1	89	18.4	126	3.2
3		45	52	90	19.6	127	2.1
4	0.06	46		91	11.3	128	
5	0.06	48	45.1	92		129	1.3
6	0.07	50	53	93	8.3	130	2.3
7	0.06	51	47.7	94		131	
8	0.05	52	40.7	96		132	1.5
9	0.04	53	36.4	97	2.4	133	1.5
10	0.07	54	42.6	98	1.5		
11	0.06	55		98	1.2		
13		57	48.2	98	0.5		
14	0.11	62		98	0.5		
15	0	63	42.4	98	0.6		
16	2	63	44.1	99	0.6		
17	9.9	64	50.7	100	0.7		
18	14.8	65	54	101	0.8		
19	24.4	66		102	1.3		
20	33	67	16	103	6		
21	34	68	17.3	104	9.3		
22	31.5	69	11.9	105	12.1		
23	31	69		106	13.4		
24	33	70		107	16.8		
25		71		108	16.5		
26	49.2	72		109	18.3		
27	53.34	73		110	16.6		
28	53	73		111	14.7		
29	53.1	74	0	112	16.9		
30	52	75	1.7	113	13.5		
31		76	2	114	18.1		
32	45.1	77	7.8	115	11.9		
33	53	78	9.3	116			
34	47.7	79		117			
35	40.7	80	15.8	118			
36	36.4	81		119	13.7		
37	42.6	82	18.8	120	1.6		
38		84	18.1	121	9.4		
39		85	15	122	7		
41	53.34	86	15.5	123	7		

Tabla 13. Datos experimentales de biosorción de cobre a pH 4-5, a 20 mgCu(II)/L de las corridas experimentales E4 y E5

Tiempo (días)	Co (mg/L) E4	C (mg/L) E4	C/Co	Co (mg/L) E5	C (mg/L) E5	C/Co
1	18.5	2.6	0.1405	18.8	1	0.0532
2	19.1	4.8	0.2513	21.2	0.8	0.0377
3	18.7	3.6	0.1925	24.4	3	0.1230
4	15.6	2.1	0.1346	24.6	4.4	0.1789
5	23.7	3.1	0.1308	23.5	8.6	0.3660
6	32	4.5	0.1406	23	4.9	0.2130
7	43.4	2.3	0.0530	23	6	0.2609
8	30.3	2.2	0.0726	23	3	0.1304
9	30.5	1.9	0.0623	23	8	0.3478
10				20.7	11.3	0.5459
11				22	11	0.5000
12				24.2	13.2	0.5455
13				23.6	13.7	0.5805
14				23.6	23.3	0.9873
15				21	15.4	0.7333
16				21.1	19.3	0.9147
17				20.5	17.4	0.8488

Tabla 14. Biomasa producida en g/L.d. y pH en E4 y E5

Días	g/L Exp.4	pH salida Exp. 4	g/L Exp.5	pH salida Exp.5	pH entrada
1	0.620	4.5	0.275	4.5	4.52
2	0.381	4.56	0.165	4.3	4.84
3	0.845	2.92	0.257	4.4	4.54
4	1.016	3.2	0.349	4.1	4.59
5	0.386	3.5	0.427	3.26	4.18
6	0.937	2.8	0.331	2.8	4.02
7	0.560	2.97	0.211	2.68	3.98
8	1.04	2.9	0.220	2.67	4.09
9	1.029	2.97	0.404	2.87	4.02
10			0.855	3	4.02
11			0.439	2.35	4.06
12			0.885	2.23	4.09
13			0.781	2.64	4.07
14			0.983	2.77	3.99
15			1.052	2.93	4.16
16			0.528	2.75	4.21
17			0.625	2.87	4.48

Anexo 9

Concentración Inhibitoria (CI₅₀)

Estimaciones de las concentraciones de cobre que inhibe el 50% del crecimiento microbiano de la biomasa (CI₅₀) (análisis Probit)

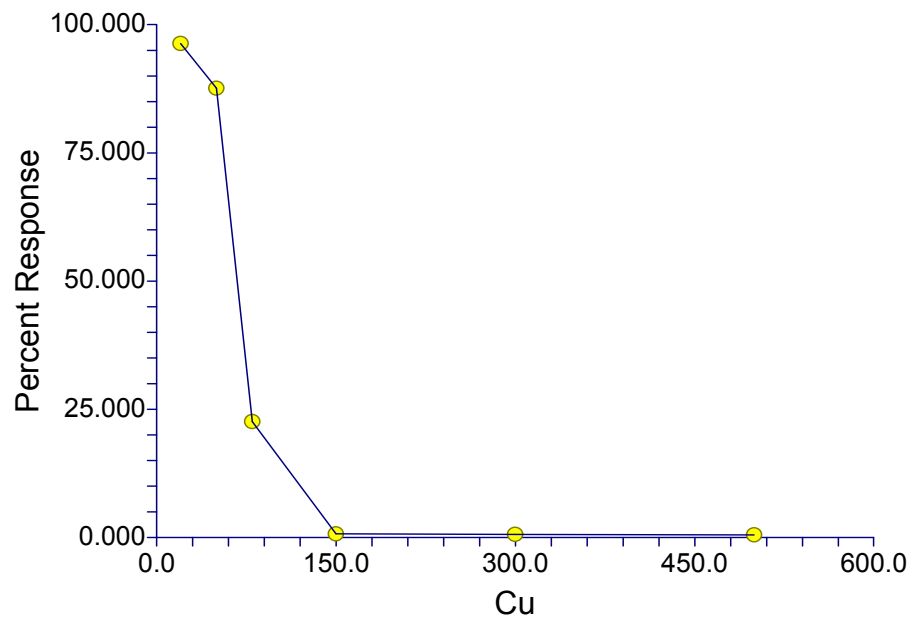
Probit Estimation Section

Parameter	Estimate	Std. Error
Alpha	13.68419	7.85168
Beta	-4.795775	4.248121
LD50	1.810799	0.1763913
Dose50	64.68434	26.27193

Dose Percentile Section

Percentile	Probit	Log(Dose)	Std. Error Log(Dose)	Dose	Std. Error Dose
1	2.6737	2.2959	0.4419	197.6432	201.0967
5	3.3551	2.1538	0.3300	142.4882	108.2859
10	3.7184	2.0780	0.2754	119.6807	75.9008
20	4.1584	1.9863	0.2188	96.8928	48.8123
25	4.3255	1.9514	0.2017	89.4214	41.5363
30	4.4756	1.9201	0.1894	83.2042	36.2889
40	4.7467	1.8636	0.1763	73.0510	29.6504
50	5.0000	1.8108	0.1764	64.6843	26.2719
60	5.2533	1.7580	0.1885	57.2759	24.8607
70	5.5244	1.7015	0.2124	50.2867	24.5936
75	5.6745	1.6702	0.2293	46.7904	24.7035
80	5.8416	1.6353	0.2504	43.1824	24.8956
90	6.2816	1.5436	0.3137	34.9602	25.2554
95	6.6449	1.4678	0.3713	29.3643	25.1084
99	7.3263	1.3257	0.4860	21.1698	23.6920

Dose - Response Plot



Anexo 10

Pruebas cinéticas de biosorción

Tabla 15. Datos experimentales de la cinética de biosorción

Co, mg/L		Promedio Co	Ce	Ce	Promedio, Ce
9.6	9.7	9.65	7.2	7.8	7.5
18.5	18.8	18.65	15.6	15.1	15.35
30.4	28.8	29.6	26.8	25.8	26.3
38.2	48.8	43.5	34.8	45.6	40.2
59	58	58.5	53	52	52.5
94	91.6	92.8	89	84.6	86.8
125	127	126	121	118	119.5
168	158	163	160	151.2	155.6

m _o		m _{eq}		q _{eq}		Promedio q _{eq} exp	Q Langmuir	Q Freundlich
0.9696	0.9797	0.7272	0.787	24.240	19.190	21.715	27.18195	29.077589
1.961	1.9176	1.5132	1.464	44.780	45.290	45.035	46.51859	44.027031
3.1312	2.9664	2.6264	2.399	50.480	56.700	53.590	64.80427	58.887791
4.011	5.124	3.287	4.332	72.400	79.200	75.800	82.44101	75.040002
6.254	6.148	5.353	5.252	90.100	89.600	89.850	96.83026	90.427668
10.34	10.076	9.345	8.883	99.500	119.300	109.400	119.1149	120.91167
14.375	14.605	13.31	12.98	106.500	162.500	134.500	132.8553	146.58627
20.16	18.96	18.4	17.38	176.000	157.200	166.600	143.3471	172.38256

1/ce		Promedio, 1/ce	Desvstd	1/q _{eq}		Promedio 1/q _{eq}	Desvstd
0.1389	0.1282	0.1335	0.007555	0.04125	0.05211	0.04668	0.007677
0.0641	0.0662	0.0652	0.001501	0.02233	0.02208	0.02221	0.000178
0.0373	0.0388	0.0380	0.001023	0.01981	0.01764	0.01872	0.001537
0.0289	0.0219	0.0254	0.004930	0.01381	0.01263	0.01322	0.000839
0.0189	0.0192	0.0190	0.000257	0.01110	0.01116	0.01113	0.000044
0.0112	0.0118	0.0115	0.000413	0.01005	0.00838	0.00922	0.001179
0.0083	0.0085	0.0084	0.000149	0.00939	0.00615	0.00777	0.002288
0.0063	0.0066	0.0064	0.000257	0.00568	0.00636	0.00602	0.000480

Ce= concentración en el equilibrio, mg/L; m_o= Masa inicial, mg; m_{eq}= masa en el equilibrio, mg;
q_{eq}=masa adsorbida entre gramos del adsorbente, mg/g

Anexo 11

Resultados de adsorción reportados por diversos autores

Tabla 16. Máxima capacidad de adsorción de Cu(II) (q_0) de biosorbentes reportados

Material	Capacidad de adsorción(q_0) mmol/g	Referencia
<i>Saccharomices cerevisae</i>	0.111	Lu y Wilkins ,1995
<i>P. lucens</i>	0.64	Schneider y Rubio,1999
<i>S. herzogii</i>	0.31	Schneider y Rubio,1999
<i>Aspergillus niger</i>	0.12	Muzzarelli <i>et al.</i> , 1980
<i>R. arrhizus</i> (Pretratada con Ca)	0.60	Muraleedharan et al, 1994
Cortezas (modificadas)	0.787	Gaballah et al. 1993
Perlas de Alginato de Calcio	1.27	Oliveira, 2003
<i>Candida tropicalis</i>	1.26	Mattuschks et al., 1993
<i>Candida utilis</i>	0.214	Yuan-gang et al., 2006
<i>B. sphaericus</i>	5.6 mol/g	Da costa y Pereira, 2001
Biomasa (<i>B. cereus</i> y <i>B. subtilis</i>)	5.9 mol/g	Da costa y Pereira, 2001
<i>Bacillus</i> sp	6.4 mol/g	Da costa y Pereira, 2001
Nipa palm	0.8324	Wankasi <i>et al.</i> , 2006
Nipa palm (modificada)	1.05	Wankasi <i>et al.</i> , 2006
Consortio bacteriano	3.08	Monge, 2008

Anexo 12

Fotografías relacionadas con la experimentación



Cananea, Sonora, México.



Estación de Muestreo 1 (E1)



Estación de muestreo 2 (E2)



Análisis y transporte de las muestras



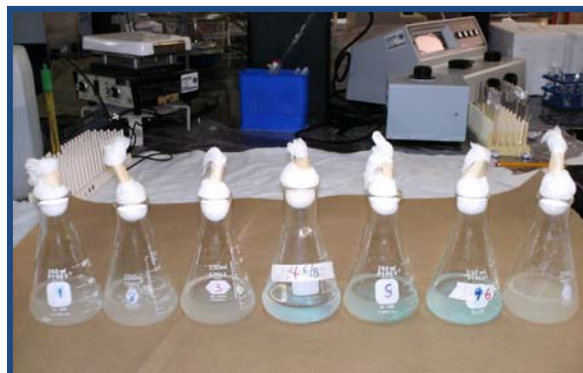
Laboratorio de Biorremediación del Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia de la Universidad de Sonora



Incubadora con agitación



Espectrofotómetro (Spectronic 20D⁺)



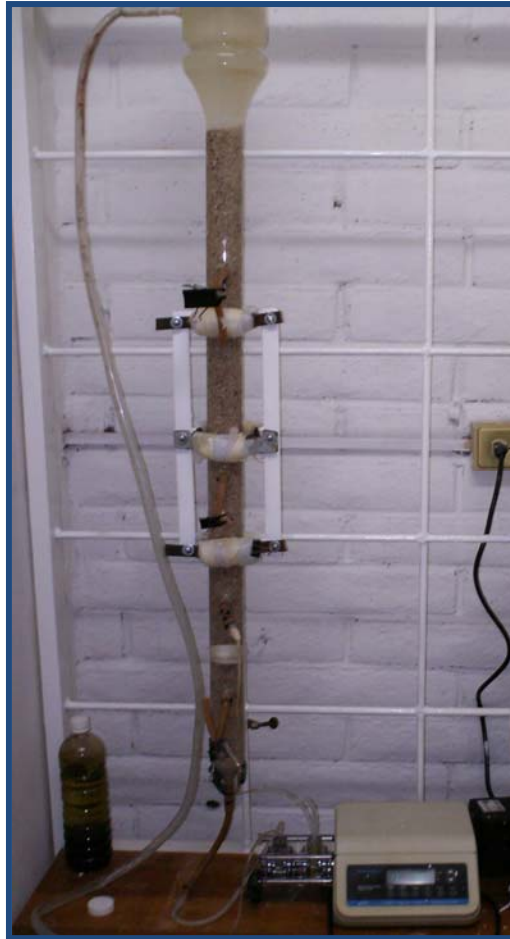
Cinética de toxicidad



Biomasa producida



Biomasa adherida a la zeolita



Reactor de Flujo Ascendente Empacado con Zeolita (RAEFA-EZ)

TRABAJOS PRESENTADOS Y PUBLICACIONES

Los resultados obtenidos durante el desarrollo del presente trabajo de tesis fueron presentados en dos Congresos Nacionales y uno internacional. Asimismo se escribieron 2 artículos de investigación de los cuales uno está publicado y el otro en proceso de publicación. Además, se tiene programado otro artículo para su publicación.

Congresos Nacionales

- Ponencia en el XVI CONGRESO INTERNACIONAL DE METALURGIA. 26 al 28 de Abril, 2006. Saltillo, Coahuila, México. “Biorremediación: una alternativa en beneficio del medio ambiente”. Monge, A. O., Certucha, B. M. T., Acedo, F. E., Valenzuela, G. J. L.
- Ponencia en el I SIMPOSIO DE INGENIERIA QUIMICA Y BIOTECNOLOGIA, en Aguascalientes, Ags. 17 - 21 De Septiembre, 2007. “Biosorción de cobre utilizando bacterias (*Burkholderia cepacia* y *Escherichia Coli*) aisladas del río San Pedro”. Onofre Monge A., Erika D. Nevarez Ll., Carmen R. Astorga V., Evelia Acedo F., M. Teresa Certucha B., F. Javier Almendariz T., J. Leobardo Valenzuela G.

Congreso Internacional

- Ponencia en el Taller de Salud Ambiental Global del Centro Binacional Estados Unidos-México”, del 12 al 14 de marzo, Tucson Arizona E.U.A., (2007). “Identificación de microorganismos presentes en efluentes mineros contaminados con metales pesados”. Monge A. O., Almendariz T. F. J., Acedo F. E., Certucha B. M. T., Valenzuela G. J. L.

Publicaciones (Artículos anexos)

- Biosorción de cobre en sistema por lote y continuo con bacterias aerobias inmovilizadas en zeolita natural (clinoptilolita). Monge-Amaya O., Valenzuela-García, J.L, Acedo-Félix, E., Certucha-Barragán, M.T., Almendariz-Tapia., F.J. (2008). Rev. Int. Contam. Ambient., 24(3): 107-115.
- COPPER BIOSORPTION IN AN AEROBIC BIOREACTOR. Onofre Monge-Amaya, Jesús L. Valenzuela-García, Evelia Acedo-Félix, María Teresa Certucha-Barragán, Michael Schorr-Wiener and F. Javier Almendariz-Tapia. *Chemical Speciation and Bioavailability* (2008), 20(4): 239-249.

