



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y METALURGIA

ESTUDIO DE BIOSORCIÓN DE METALES PESADOS DE UN EFLUENTE DE ORIGEN ANTROPOGÉNICO UTILIZANDO *ESCHERICHIA COLI*

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el Título de:

INGENIERO QUÍMICO

Presenta:

Luis Carlos Platt Sánchez

Hermosillo, Sonora

Junio, 2011

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

AGRADECIMIENTOS

- ❖ A la Universidad de Sonora, en especial al Departamento de Ingeniería Química y Metalurgia por darme la oportunidad de formarme profesionalmente.
- ❖ A la Dra. Onofre Monge Amaya, por darme la oportunidad de realizar este proyecto, por todo el apoyo incondicional y por su acertada instrucción.
- ❖ Al comité de tesis integrado por: Dr. Francisco Javier Almendariz, Dra. María Teresa Certucha y al Dr. Agustín Gómez Álvarez, por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y consejos.

DEDICATORIA

A mi Padres

Luis Carlos y Dora Alicia

y mis hermanos

Miguel, Karina, Ana Belén y Gabriel

Gracias por todo su cariño y aguante

INDICE

Página

LISTA DE FIGURAS	III
RESUMEN	4
I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	5
1.1 Objetivo General.....	8
1.1.1 Objetivos específicos	8
II. ANTECEDENTES	9
2.1 Contaminación del Agua.....	9
2.1.1 Contaminación del agua por metales pesados	9
2.2 Metales Pesados	11
2.2.1 Toxicidad de metales pesados.....	11
2.3 Vías de Entrada y Origen de los Metales Pesados en los Sistemas Acuáticos.	12
2.3.1 Origen natural	12
2.3.2 Origen antropogénico.....	13
2.4 Tecnologías para el Tratamiento de Aguas Contaminadas con Metales Pesados.....	13
2.5 Procedimientos Experimentales de Biosorción.....	17
2.5.1 Uso de microorganismos como biosorbentes.	18
2.5.2 Características de <i>Escherichia coli</i>	19
2.6 Modelos Teóricos para el Tratamiento de Datos Experimentales del Proceso de Biosorción.....	20
2.6.1 Isotermas de un solo sorbato.....	22
2.6.2 Modelos simples de sorción.....	22
2.7 Investigaciones Relacionadas	24

III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	27
3.1 Área de Estudio y Recolecta de las Muestras	29
3.2 Aislamiento y crecimiento de <i>Escherichia coli</i>	30
3.2.1 Aislamiento	30
3.2.2 Cinética de crecimiento	30
3.3 Pruebas de toxicidad para <i>Escherichia coli</i> , Concentración Inhibitoria Media (CI50)	31
3.4 Estudio de Biosorción de metales pesados en sistema por lotes	32
3.5 Cinética de Adsorción de Metales Pesados por Biosorción	32
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
4.1 Recolecta de las Muestras y Aislamiento de <i>Escherichia coli</i>	34
4.2 Cinética del crecimiento de <i>Escherichia coli</i>	35
4.3 Pruebas de toxicidad para <i>Escherichia coli</i> , concentración inhibitoria media CI50.	37
4.4 Estudio de Biosorción de metales pesados en sistema por lotes	42
4.5 Estudio Cinético de Adsorción de Metales Pesados por Biosorción de Metales Pesados	44
V. CONCLUSIONES	49
VI. RECOMENDACIONES	51
VII. BIBLIOGRAFÍA	52

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Bioacumulación de Metales Pesados	16
2. Bioadsorción de Metales Pesados	17
3. Procesos que Contribuyen a la Captación Microbiana y Destoxificación de Metales.	18
4. Diagrama de Flujo de Metodología Utilizada.....	28
5. Localización del Área de Estudio (Cananea, Sonora).....	29
6. Crecimiento Microbiano en un Cultivo Discontinuo.....	31
7. Curva de Crecimiento <i>Escherichia coli</i> Aislada de las Aguas Residuales.....	36
8. Efecto Inhibitorio de la Concentración de Cobre sobre la Velocidad de Crecimiento de <i>Escherichia coli</i> en 48 horas.....	38
9. Efecto Inhibitorio de la Concentración de Hierro sobre la Velocidad de Crecimiento de la <i>Escherichia coli</i> en 48 horas.	39
10. Efecto Inhibitorio de la Concentración de Zinc sobre la Velocidad de Crecimiento de <i>Escherichia coli</i> en 48 horas.....	40
11. Efecto Inhibitorio de la Concentración de Manganeso sobre la Velocidad de Crecimiento de <i>Escherichia coli</i> en 48 horas.....	41
12. Curvas de Biosorción de Metales Pesados Usando <i>Escherichia coli</i>	43
13. Isoterma de Langmuir para Cobre.	45
14. Isoterma de Langmuir para Hierro.	46
15. Isoterma de Langmuir para Manganeso.....	47
16. Isoterma de Langmuir para Zinc.	48

RESUMEN

Controlar y reducir la contaminación del agua es un problema muy importante para la sociedad. La tecnología de biosorción, basada en la habilidad de ciertos microorganismos de capturar especies metálicas de soluciones acuosas, ha recibido especial atención por su potencialidad para el tratamiento de aguas residuales. El objetivo de este proyecto es determinar la biosorción de metales pesados de un efluente de origen antropogénico, utilizando *Escherichia coli*. La recolecta de muestras se realizó en una descarga de un efluente minero, de una fuga de dicha descarga y donde se junta con las aguas residuales de la ciudad de Cananea, Sonora. Se analizó el efluente minero de forma química, y microbiológica. De los tres lugares seleccionados para recolectar muestra de agua solamente se pudo aislar *Escherichia coli* en la unión de la descarga del efluente minero con las aguas residuales de la ciudad. Una vez aislada la bacteria *Escherichia coli* se realizó la curva de crecimiento y las pruebas de toxicidad (CI_{50}). Con el efluente minero se realizó la biosorción de metales pesados en sistema por lote usando *Escherichia coli*. El estudio de la cinética de adsorción de metales pesados por biosorción se realizó con soluciones sintéticas de Cu, Fe, Mn y Zn, y los datos se ajustaron al modelo de Langmuir. Los resultados de las concentraciones de metales de la descarga del efluente minero fueron: Cu 10, Fe 350, Mn 35 y Zn 55 mg/L. La fase exponencial para *Escherichia coli* fue de los 50 a los 130 min. Los resultados de las CI_{50} para *Escherichia coli* son: Cu 28, Fe 70, Mn 210 y Zn 40 mg/L. La remoción de metales pesados en sistema por lote utilizando *Escherichia coli*, fueron muy favorables, para el Cu 7.4, Fe 123, Mn 20 y Zn 35 mg/L. Por medio del modelo de Langmuir, dieron valores máximos de adsorción q_0 : Cu 200, Fe 166, Mn 333.3 y Zn 83.3 mg/g. 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.

I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Según un informe de Naciones Unidas, “mueren más personas a consecuencia del agua contaminada que por todos los tipos de violencia, incluida la guerra”. El estudio señala que cada día se vierten a ríos y mares 2.000.000 de toneladas de residuos (provenientes de desechos agrícolas e industriales, alcantarillados, etc.), lo que propaga enfermedades y daña los ecosistemas. Además, cada veinte segundos muere un niño menor de cinco años por una enfermedad relacionada con el agua. Achim Steiner, director ejecutivo del Programa de Naciones Unidas para el Medio Ambiente, dice: “Si queremos sobrevivir, necesitamos ser colectivamente más inteligentes sobre la forma de gestionar nuestros residuos” (Watchtower, 2011)

Controlar y reducir la contaminación del agua es un problema muy importante para la sociedad. Los derrames de aguas de desecho en ecosistemas naturales acuáticos generan problemas de eutrofización y problemas tóxicos. El agua de desecho penetra en el suelo, contamina el agua subterránea y reduce su calidad para el consumo humano (Cohen, 2001). Dentro de los contaminantes de aguas se encuentran los metales pesados para los cuales se han establecido límites en las descargas de aguas residuales de metales pesados (Metcalf *et al.*, 1991).

El suelo y los efluentes acuosos contaminados con metales pesados son el resultado de numerosas actividades industriales, incluyendo la minería, fundición, joyería, producción de baterías de automóviles, emisión de vehículos, vertido de residuos industriales y las cenizas volátiles de los procesos de incineración. Esta contaminación al medio ambiente representa una amenaza grave para la salud a los seres humanos y animales, ya que estos metales pesados tienden a persistir en el medio ambiente por tiempo indefinido (Yilmaz, 2003).

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 y/o recuperados en su lugar de origen, utilizando sistemas de tratamiento apropiados (Cañizares, 2000).

En México 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, 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 *et al.*, 2004) y recientemente Gómez (2008) realizó 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). El proceso de biosorción puede ser definido como la captación de contaminantes (metales pesados en este caso) desde una solución acuosa por un material biológico a través de mecanismos fisicoquímicos o metabólicos. Como los metales pesados pueden llegar a tener efectos letales en la biomasa viva, esta tiene la capacidad de poner en funcionamiento ciertos mecanismos para contrarrestar los efectos tóxicos de los metales. Los dos mecanismos diferenciados para la captación de los metales pesados por parte de la biomasa son: Bioacumulación y Bioadsorción (Reyes *et al.*, 2006).

En la última década, el potencial para la biorremediación 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, 2000).

En este estudio se aisló la bacteria *Escherichia coli* de un efluente antropogénico para realizar pruebas de biosorción y así evaluar la capacidad de eliminación de diferentes metales pesados en este caso Cu, Fe, Mn y Zn en sistema por lotes. 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

Determinar la biosorción de metales pesados de efluentes de origen antropogénico, utilizando *Escherichia coli*.

1.1.1 Objetivos específicos

- Aislar *Escherichia coli* de las muestras de aguas residuales.
- Realizar pruebas de toxicidad de los metales pesados (Cu, Fe, Mn y Zn) para *Escherichia coli*.
- Evaluar la biosorción de metales pesados (Cu, Fe, Mn y Zn) del efluente antropogénico en sistema en lote usando *Escherichia coli* aislada de las aguas.
- Estudiar la cinética de adsorción por biosorción de metales pesados (Cu, Fe, Mn y Zn) usando *Escherichia coli*.

II. ANTECEDENTES

2.1 Contaminación del Agua

La contaminación de cuerpos de agua (ríos, lagos, océanos y agua subterránea) ocurre cuando los contaminantes son descargados directamente o indirectamente en cuerpos de agua sin un adecuado tratamiento que remueva los componentes dañinos. La contaminación del agua afecta plantas y organismos que viven en estos cuerpos de agua, y en la mayoría de los casos afecta dañando no solamente a las especies individuales y las poblaciones así como en las comunidades biológicas. El agua de dichos cuerpos se ha contaminado mediante sustancias tóxicas como ácidos, solventes orgánicos, pinturas, metales y demás, derivados de actividades industriales, agrícolas, ganaderas, domésticas, 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 (Heinke *et al.*, 1999).

2.1.1 Contaminación del agua por metales pesados

La calidad de las aguas puede ser alterada como consecuencia de las actividades antropogénicas o naturales que producen efectos adversos que cambian su valor para el hombre y la biota. En forma general, puede definirse la contaminación del agua como la alteración desfavorable que sufre, al incorporársele una serie de sustancias que cambian sus condiciones naturales de calidad, ocasionando grandes riesgos para la salud y el bienestar de la población (Branco-Murgel, 1984). Particularmente peligroso es la contaminación provocada por las altas concentraciones de algunos metales pesados y su incremento en los efectos adversos causados por la persistencia y el fenómeno de biomagnificación (Topalian *et al.*, 1999). De forma natural, los metales son introducidos a los sistemas acuáticos como resultado de la lixiviación de suelos

y rocas, y erupciones volcánicas (Laws, 1993). También pueden provenir de las actividades antropogénicas como son, agrícolas, domésticas, industriales y mineras (Mountouris *et al.*, 2002). La actividad minera-metalúrgica a través del procesamiento de minerales y fundición, podría causar la dispersión y depósito de grandes cantidades de metales hacia el medio ambiente, si existe alguna operación inadecuada.

Al contrario de muchos contaminantes orgánicos los metales pesados, generalmente, no se eliminan de los ecosistemas acuáticos por procesos naturales debido a que no son biodegradables (Förstner *et al.*, 1979, Murray, 1996). Por el contrario son muy contaminantes y sufren un ciclo global ecológico, donde las aguas naturales son el principal camino. Hoy en día los metales pesados tienen un gran significado como indicadores de la calidad ecológica de todo flujo de agua debido a su toxicidad y muy especialmente al comportamiento bioacumulativo (Purves, 1985).

Asimismo los metales pesados tienen tendencia a formar asociaciones con sustancias minerales (carbonatos, sulfatos, etc.) y en mayor grado con sustancias orgánicas, mediante fenómenos de intercambio iónico, adsorción, quelación, formación de combinaciones químicas, etc., por lo que se acumulan en el medio ambiente, principalmente en los sedimentos de ríos, lagos y mares (Förstner *et al.*, 1981).

Las altas concentraciones de metales pesados en las aguas de corrientes fluviales asociados a sulfuros tales como el arsenico (As), cadmio (Cd), cobre (Cu), plomo (Pb) y zinc (Zn) pueden atribuirse a la minería lo cual son causa del fuerte impacto en el medio ambiente (Salomons, 1995). En cambio, otros metales no-sulfurosos como el cromo (Cr), níquel (Ni) y mercurio (Hg) posiblemente indican una contaminación antropogénica de metales pesados que están estrechamente asociados con las descargas industriales (Nelson *et al.*, 1993).

2.2 Metales Pesados

Los metales pesados constituyen un grupo cercano a los 40 elementos de la tabla periódica que tienen una densidad mayor o igual a 5 g/cm^3 . El rasgo distintivo de la fisiología de los metales pesados, es que aun cuando muchos de ellos son esenciales para el crecimiento como el sodio (Na), potasio (K), magnesio (Mg), calcio (Ca), vanadio (V), manganeso (Mn), hierro (Fe), cobalto (Co), níquel (Ni), Cu, Zn y molibdeno (Mo), se ha reportado que también tienen efectos tóxicos sobre las células, principalmente como resultado de su capacidad para alterar o desnaturalizar las proteínas (Wood, 1974).

2.2.1 Toxicidad de metales pesados

Existen evidencias experimentales que han llegado a demostrar el grado de importancia biológica de los iones metálicos pesados con respecto a los sistemas vivos, de los que algunos son oligoelementos, sigue el mismo patrón que tiene su disponibilidad en la naturaleza (Wood, 1974). Además existe una aparente correlación entre la abundancia de los elementos en la corteza terrestre y las necesidades alimentarias de las células microbianas (Wood, 1989). Estos metales, en cantidades mínimas o traza, pueden ejercer efectos positivos o negativos sobre los seres vivos.

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 (Juvina, 2005).

2.3 Vías de Entrada y Origen de los Metales Pesados en los Sistemas Acuáticos.

Los metales tienen tres vías principales de entrada en el medio acuático:

- a) La vía atmosférica, se produce debido a la sedimentación de partículas emitidas a la atmósfera por procesos naturales o antropogénicos (principalmente combustión de combustibles fósiles y procesos de fundición de metales).
- b) La vía terrestre, producto de filtraciones de vertidos, de la escorrentía superficial de terrenos contaminados (minas, utilización de lodos como abono, lixiviación de residuos sólidos, precipitación atmosférica, etc.) y otras causas naturales.
- c) La vía directa, de entrada de metales es a consecuencia de los vertidos directos de aguas residuales industriales y urbanas a los cauces fluviales.

En los sistemas acuáticos continentales (ríos, lagos, embalses, etc.) los metales pesados son introducidos como resultado de la acción de procesos naturales y antropogénicos. (Manzanares *et al.*, 2007)

2.3.1 Origen natural

El contenido en elementos metálicos de un suelo libre de interferencias humanas, depende en primer grado de la composición de la roca madre

originaria y de los procesos erosivos sufridos por los materiales que conforman el mismo (Adriano, 1986).

La acción de los factores medioambientales sobre las rocas y los suelos derivados de ellos son los determinantes de las diferentes concentraciones basales (niveles de fondo) de metales pesados en los sistemas fluviales (aguas, sedimentos y biota) (Adriano, 1986).

2.3.2 Origen antropogénico

Se entiende por contaminación de origen antropogénico la procedente de la intervención humana en el ciclo biogeoquímico de los metales pesados. El uso de los metales pesados ha ido aumentando paralelamente al desarrollo industrial y tecnológico.

Actualmente es difícil encontrar una actividad industrial o un producto manufacturado en los que no intervenga algún metal pesado. Si bien, la tendencia aunque lenta, es sustituir progresivamente en la industria, algunos metales pesados potencialmente tóxicos por otros materiales más inocuos (Förstner, 1979).

2.4 Tecnologías para el Tratamiento de Aguas Contaminadas con Metales Pesados.

Los procesos 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 los cuales 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 más efectivo. Los procesos 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, 2000).

La descripción de algunos procesos se presenta a continuación.

Osmosis inversa: Se trata de un proceso en que los metales pesados están separados por una membrana semi-permeable a una presión mayor que la presión osmótica causada por los sólidos disueltos en las aguas residuales. La desventaja de este método es que es caro.

Electrodiálisis: En este proceso, los iones metálicos se separan mediante el uso de membranas semipermeables de iones selectivas. La aplicación de un potencial eléctrico entre los dos electrodos produce una migración de cationes y aniones hacia los electrodos respectivos. Debido a la separación alternativa de las membranas de cationes y aniones permeables, se forman células de concentrados y sales diluidas. La desventaja es la formación de hidróxidos de metal que obstruyen la membrana.

Ultrafiltración: Son membranas en donde la fuerza impulsora es la presión y se usan membranas porosas para la eliminación de metales pesados. La principal desventaja de este proceso es la generación de lodos.

Intercambio iónico: En este proceso, los iones metálicos de soluciones diluidas se intercambian con los iones en poder de las fuerzas electrostáticas de la resina de intercambio. Las desventajas son: alto costo y la eliminación parcial de ciertos iones.

Precipitación química: La precipitación de los metales se logra mediante la adición de coagulantes como alumbre, sales de calcio, hierro y otros polímeros orgánicos. La gran cantidad de lodos que contienen compuestos tóxicos que se producen durante el proceso es el principal inconveniente.

Fitorremediación: La fitorremediación es el uso de ciertas plantas para limpiar suelos, sedimentos y aguas contaminadas con metales. Las desventajas son que se necesita mucho tiempo para la eliminación de los metales y la regeneración de la planta de biosorción es aún más difícil.

Por lo tanto, las desventajas como la eliminación de metales incompleta, alta cantidad de reactivo, alto consumo de energía, la generación de lodos tóxicos y otros productos de desechos que requieren eliminación cuidadosa ha hecho imprescindible el uso de un tratamiento costo-efectivo que sea capaz de eliminar los metales pesados de efluentes acuosos (Ahalya *et al.*, 2003).

Actualmente, se están desarrollando nuevas tecnologías para la eliminación de metales pesados, las cuales se pretende tengan bajos costos de operación y que sean fáciles de implementar (Reyes *et al.*, 2006). La búsqueda de nuevas tecnologías que permiten la eliminación de metales tóxicos de las aguas residuales ha dirigido la atención a la biosorción, basada en la capacidad de unión de metales de diversos materiales biológicos.

Biosorción: se define como la capacidad de materiales biológicos de acumular metales pesados de aguas residuales a través de vías fisicoquímicas o metabólicas. Las algas, bacterias, hongos y levaduras han demostrado ser biosorbentes potenciales de metales. Las principales ventajas de biosorción sobre los métodos de tratamiento convencionales incluyen: bajo costo, alto rendimiento, reducción de productos químicos y lodos biológicos, no se requiere nutrientes adicionales, regeneración de biosorbente, y la posibilidad de recuperación de metales (Volesky, 1990).

El proceso de biosorción involucra una fase sólida (biosorbente que es el material biológico) y una fase líquida (disolvente que es normalmente agua) que contiene una especie para ser absorbida (sorbato, los iones de metal). Debido a la mayor afinidad del sorbente por el sorbato de las especies, este último se siente atraído y atado allí por diferentes mecanismos. El proceso continúa hasta

que se establece el equilibrio entre la cantidad de especies de sorbato de sólidos. El grado de afinidad del absorbente para el sorbato determina su distribución entre las fases sólida y líquida. (Reyes *et al.*, 2006)

Los dos mecanismos diferenciados para la captación de los metales pesados por parte de la biomasa son (Reyes *et al.*, 2006):

- Bioacumulación: Basada en la absorción de las especies metálicas mediante los mecanismos de acumulación al interior de las células de biomasa vivas. (Figura 1).
- Bioadsorción: Basada en la adsorción de los iones en la superficie de la célula. El fenómeno puede ocurrir por intercambio iónico, precipitación, complejación o atracción electrostática (Figura 2).

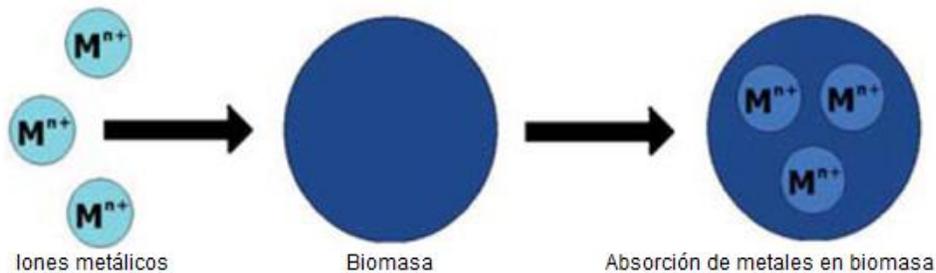


Figura 1. Bioacumulación de Metales Pesados

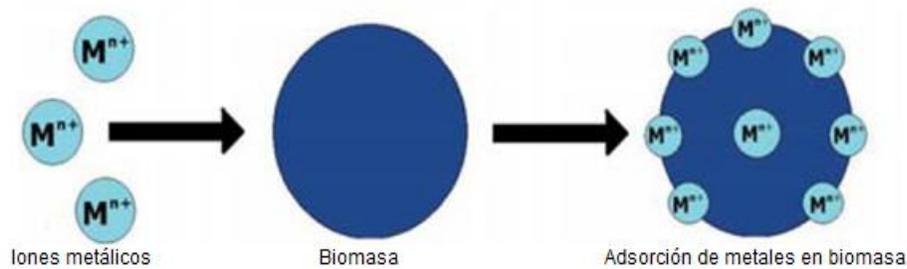


Figura 2. Bioadsorción de Metales Pesados

2.5 Procedimientos Experimentales de Biosorción

Los procesos de biosorción se pueden realizar a través de varias formas, pueden ser de tres tipos generales: discontinuos (lotes), continuos de flujo estacionario, y semicontinuos de flujo no estacionario. Aunque la mayoría de las aplicaciones industriales prefieren un modo continuo de operación, los experimentos por lotes tienen que ser utilizados para evaluar la información fundamental, como la eficiencia del biosorbente, condiciones óptimas experimentales, y la posibilidad de regeneración de la biomasa.

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, 2003).

2.5.1 Uso de microorganismos como biosorbentes.

Los avances tecnológicos para el abatimiento de la contaminación por metales tóxicos consisten en el uso selectivo y en el mejoramiento de procesos naturales para el tratamiento de residuos particulares. Los procesos por los cuales los organismos interactúan con los metales tóxicos son muy diversos (Figura. 3). Sin embargo, existen en la práctica tres categorías generales de procesos biotecnológicos para el tratamiento de residuos líquidos que contienen metales tóxicos: la biosorción; 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 fundición y de minería (Gadd *et al.*, 1993)

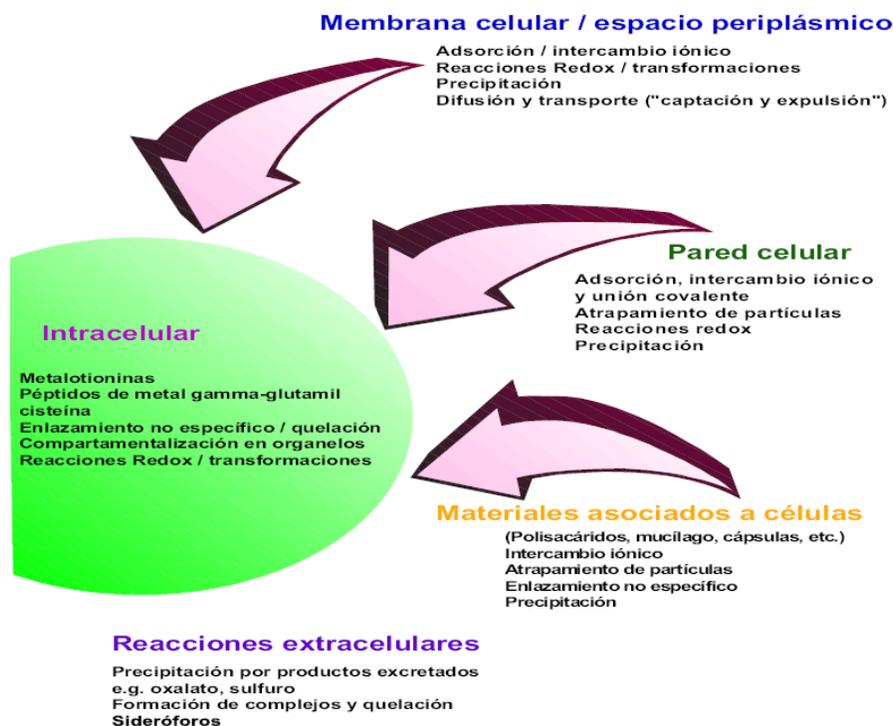


Figura 3. Procesos que Contribuyen a la Captación Microbiana y Destoxificación de Metales (Gadd *et al.*, 1993).

Con el fin de sobrevivir en la naturaleza, las bacterias necesitan desarrollar diferentes mecanismos para resistir las concentraciones de los metales pesados. Las bacterias poseen la capacidad para transformar algunos metales en formas menos tóxicas (Cervantes, 2006). 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 *et al.*, 2002).

2.5.2 Características de *Escherichia coli*

La *Escherichia coli* es un habitante común de la parte baja del tracto intestinal del hombre y de animales de sangre caliente. Es un organismo facultativamente anaerobio. Cuenta con dos tipos de sistemas metabólicos respiratorio y fermentativo. Estas cepas tienen una función muy útil en el cuerpo suprimiendo el crecimiento de bacterias dañinas y sintetizando apreciables cantidades de vitaminas. Es un bacilo gram negativo en forma de varilla que no forma esporas. Fermenta azúcares como simples como glucosa para formar ácido láctico, acético y fórmico (Bergey, 1994)

Esta bacteria cuando crece en medio líquido produce un enturbiamiento difuso; pero si se desarrolla en condiciones subóptimas, puede formar largas cadenas filamentosas y originar un crecimiento granular. Muchas cepas poseen flagelos y son móviles. En agar las colonias de cepas lisas (S) son brillantes convexas e incoloras pero cuando tales cepas se resiembran repetidamente en medios

artificiales se vuelven rugosas (R) y determinan la formación de colonias mates y granujentas. Las variantes capsuladas producen colonias mucoides, en especial cuando se incuban a bajas temperaturas y crecen en un medio pobre en nitrógeno y fósforo, pero rico en carbohidratos. Algunas cepas son hemolíticas, y en medios sólidos despiden un olor fétido característico (Davis *et al.*, 1975).

La condición óptima de crecimiento de la *Escherichia coli* es de 37°C. El pH óptimo para su crecimiento es de 6.0 a 8.0. Sin embargo, su crecimiento se puede dar desde un pH de 4.3 hasta 9 o 10 (Basel *et al.*, 1983). Dado a los buenos resultados de crecimiento en medio ácido Monge *et al.* (2008) reporta como un buen biosorbente de metales pesados. Se han realizado diferentes investigaciones sobre tolerancia de metales pesados en *Escherichia coli*, por ejemplo, Mergeay *et al.* (1985) reportan la concentración inhibitoria media de varios iones metálicos diferentes para *Escherichia coli* el metal más tóxico fue el mercurio, mientras que el menor de los metales tóxicos fue el manganeso.

2.6 Modelos Teóricos para el Tratamiento de Datos Experimentales del Proceso de Biosorción

La calidad del material absorbente se juzga de acuerdo a cuánto puede atraer y retener el sorbato. Para este fin se acostumbra determinar la adsorción del metal (q) por el biosorbente como la cantidad de sorbato enlazado por la unidad de fase sólida (peso, volumen, etc.).

El cálculo de la absorción del metal (mg/g) se basa en un balance de materia por el material de biosorción: el sorbato que desaparece de la solución debe de estar en el sólido. Correspondientemente la cantidad de metal unido al sorbente que desaparece de la solución puede ser calculado por un balance de masa para el sorbente en el sistema.

$$V(L) C_i \left(\frac{mg}{L} \right) = \text{Total del sorbato en el sistema (mg)}$$

$$V(L) C_f \left(\frac{mg}{L} \right) = \text{Total del sorbato dejado en solución (mg)}$$

La captación será la diferencia:

$$q = \frac{V(C_i - C_f)}{S} \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde,

- V es el volumen de la solución que contienen los metales en contacto (lote) con el sorbente (L).
- C_i y C_f son las concentraciones inicial y de equilibrio (residual), respectivamente (mg/L). Estas son determinadas analíticamente (mg/L).
- S es la cantidad de biosorbente en base seca (g).

La captación del sorbente puede expresarse en diferentes unidades dependiendo del propósito:

- 1) Para propósito de evaluación de procesos prácticos e ingenieriles en los que se incluyen balances de masa se acostumbra utilizar peso por peso (seco) (por ejemplo, mg de metales absorbidos por gramo de material seco) absorbente.
- 2) Cuando se utiliza un reactor (columna de lecho empacado) la captación puede ser expresada en base por volumen (por ejemplo, mg/L). Sin embargo, la porosidad de volumen puede presentar una complicación en

comparaciones cuantitativas de los resultados de rendimientos de biosorción.

- 3) Cuando se trabaja con la estequiometría del proceso y cuando se estudian los grupos funcionales y los mecanismos de unión de los metales es muy útil expresar q en moles o carga equivalente, por unidad de peso o volumen del sorbente (ejemplo, mmol/g o meq/g).

Estas unidades son interconvertibles con relativa facilidad. El único problema que puede surgir es la conversión de peso-volumen. Para interpretaciones científicas se usa de preferencia base seca de sorbente seco (Volesky, 2004).

2.6.1 Isotermas de un solo sorbato.

Dado que los procesos de absorción tienden a ser exotérmicos el rendimiento de absorción puede variar con la temperatura, debido a eso la temperatura debe ser constante durante el proceso de absorción. Las isotermas de sorción se grafican por la captación de sorción (q) y la concentración final de equilibrio del sorbato residual que queda en la solución (C_f).

La biosorción no es necesariamente exotérmicamente fuerte como otras reacciones de adsorción física. El rango de temperatura para aplicaciones de biosorción es considerado relativamente estrecho, aproximadamente entre 10-70°C, disminuyendo por tanto la cuestión de sensibilidad a la temperatura en gran medida (Volesky, 2004).

2.6.2 Modelos simples de sorción.

Los fenómenos de biosorción se caracterizan por la retención del metal mediante una interacción fisicoquímica del metal con ligandos, pertenecientes a

la superficie celular. 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).

La isoterma de Langmuir es de una forma hiperbólica:

$$q = \frac{q_o C_e}{k_d + C_e} \quad (\text{Ecuación 2})$$

Linealizando la ecuación 2

$$\frac{1}{q} = \frac{k_d}{q_o} \frac{1}{C_e} + \frac{1}{q_o}$$

Dónde:

- C_e es la concentración en el equilibrio (mg/L).
- q es la cantidad intercambiada (mg/g).
- q_o es la máxima absorción del sorbato en las condiciones dadas (mg/g).
- K_d es la constante de la isoterma de Langmuir.

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).

La isoterma de Freundlich es una relación exponencial:

$$q = KC_f \left(\frac{1}{n}\right) \quad (\text{Ecuación 3})$$

Donde:

k y n son constantes de Freundlich.

La relación de Freundlich es una ecuación empírica. No indica una capacidad de absorción limitada del absorbente y por lo tanto sólo puede aplicarse razonablemente a rangos de concentración bajos a intermedios. Sin embargo, es más fácil de manejar matemáticamente con cálculos más complejos (por ejemplo, en la modelización del comportamiento dinámico de columnas) donde aparece frecuentemente. El modelo de Freundlich puede ser fácilmente linealizado graficando en un formato log-log.

El modelo de Langmuir ha sido más utilizado, ya que contiene los dos parámetros más útiles (q_{max} y b) que son fácilmente comprensibles, ya que reflejan las dos características más importantes del sistema de absorción (Holan *et al.*, 1993; 1994).

2.7 Investigaciones Relacionadas

Mediante diversas investigaciones a principios de 1980 se descubrió la capacidad de los microorganismos de acumular elementos metálicos. A partir de este problema se han realizado investigaciones desde el punto de vista toxicológico, estos preocupados por la acumulación en el metabolismo activo de las células vivas, los efectos de metal en las actividades metabólicas de las células microbianas y las consecuencias de la acumulación en los alimentos de la cadena alimenticia (Volesky, 1987). Sin embargo, investigaciones posteriores han revelado que la biomasa inactiva puede atraer iones metálicos a través de

diversos mecanismos físico-químicos. Con este nuevo hallazgo, las investigaciones sobre biosorción son una alternativa para la eliminación de metales y colorantes. Los investigadores han podido entender y explicar como la biosorción no sólo depende de la composición química o la biomasa, sino también de factores físico-químicos externos y de la solución. Algunos investigadores han sido capaces de explicar los mecanismos responsables de biosorción, lo que puede ser uno o combinación de intercambio iónico, complejación, adsorción, interacción electrostática de quelación y microprecipitación (Veglio *et al.*, 1997).

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 del género *Pseudomonas* de ambientes mineros que presenta resistencia a metales pesados 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). Se ha estudiado la biosorción de Cu de bacterias aisladas de sitios contaminados (*Escherichia coli* y *Burkholderia cepacia*) (Monge *et al.*, 2008)

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). Se han aislado 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 (Leung *et al.*,2000).

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 *et al.*, 2003).

Es importante mencionar que en biosorciones utilizando biomasa bacteriana los datos experimentales no se pueden comparar directamente debido a las diferencias en las condiciones experimentales (pH, temperatura, tiempo de equilibrio y dosificación de biomasa). Sin embargo, los resultados proporcionan información básica para poder evaluar la utilización de biomasa bacteriana para la captación de iones metálicos (Volesky, 2004).

III. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La metodología empleada se muestra en el diagrama de flujo de la Figura 4 y se presenta en las siguientes secciones:

1. Área de Estudio y Recolecta de las Muestras (sección 3.1).
2. Aislamiento y crecimiento de *Escherichia coli* (sección 3.2).
3. Pruebas de toxicidad para *Escherichia coli*, concentración inhibitoria media CI_{50} (sección 3.3).
4. Pruebas de biosorción de metales pesados (Cu, Fe, Mn y Zn) del efluente antropogénico en sistema en lote usando *Escherichia coli* aislada de las aguas (sección 3.4).
5. Estudio cinético de adsorción de metales pesados por biosorción (Cu, Fe, Mn y Zn) usando *Escherichia coli* (sección 3.5).

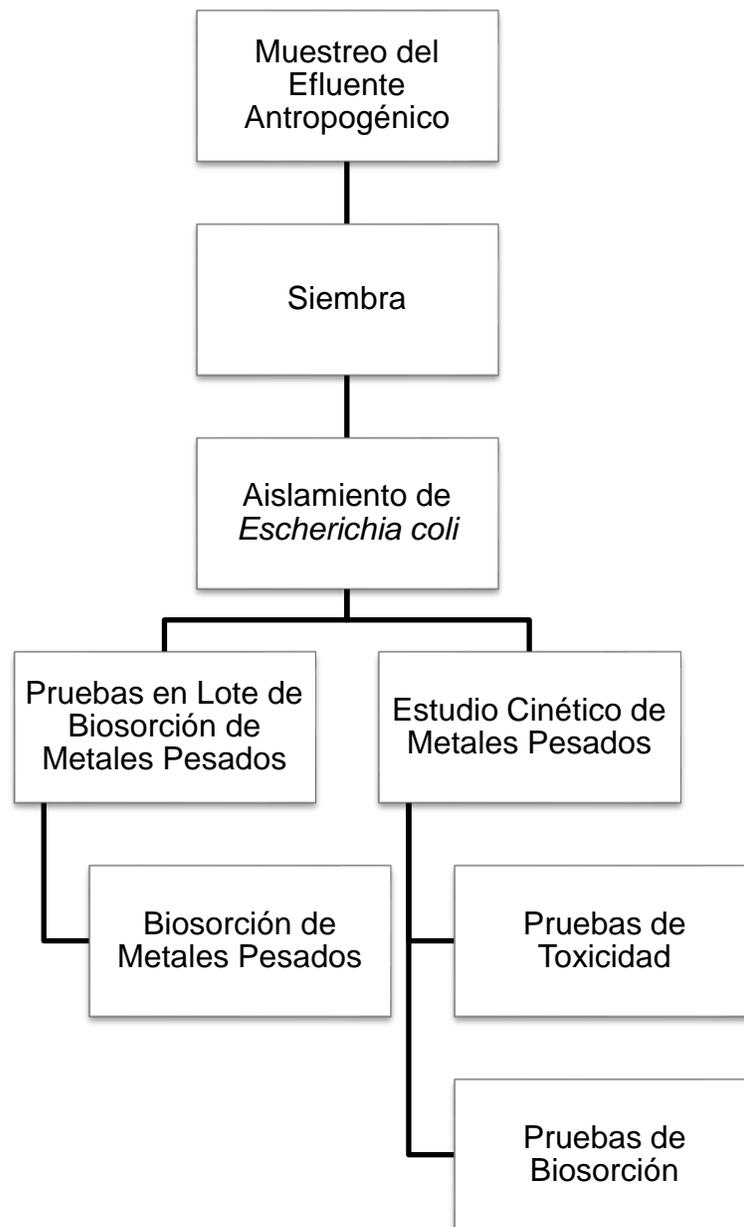


Figura 4. Diagrama de Flujo de la Metodología Utilizada.

3.1 Área de Estudio y Recolección de las Muestras

El muestreo se realizó en la ciudad de Cananea, está se encuentra ubicada al norte del estado de Sonora, México a 1660 metros sobre el nivel del mar (MSNM). . La recolección de muestras se realizó en tres lugares diferentes de la ciudad: descarga de un efluente minero, fuga de dicha descarga y donde se junta esta con las aguas residuales de la ciudad

Las muestras de aguas fueron recolectadas de tres sitios seleccionados, y se les realizaron lecturas de pH y temperatura *in situ*, posteriormente fueron almacenadas en recipientes de plástico para su transporte al laboratorio de Biorremediación de la Universidad de Sonora.



Figura 5. Localización del Área de Estudio (Cananea, Sonora).

3.2 Aislamiento y crecimiento de *Escherichia coli*

3.2.1 Aislamiento

De los tres lugares seleccionados para recolectar muestra de agua solamente se pudo aislar la *Escherichia coli* en la unión de las aguas las aguas del complejo con las aguas residuales. Se realizó un enriquecimiento en medio nutritivo para su crecimiento y desarrollo. Con 10 mL de muestra crecida a 24 horas se incubó a 37°C por 24 horas y se resembró en medio de cultivo específico: agar EMB (Eosina azul de metileno) para *Escherichia coli* hasta su completa purificación. Este medio es utilizado para el aislamiento selectivo de bacilos Gram negativos de rápido desarrollo y escasas exigencias nutricionales. (Levine EMB agar)

3.2.2 Cinética de crecimiento

El crecimiento y reproducción de las bacterias ocurre a medida que nutrientes son procesados e incorporados como nuevo material de célula. El proceso reproductivo de la célula, fisión binaria, es una característica del crecimiento bacterial. Las poblaciones bacterianas pueden alcanzar altas densidades muy rápidamente. Las células individuales se duplican a una tasa característica para cada organismo. Este intervalo de tiempo se conoce como el tiempo de generación. El tiempo de generación a 20°C alcanza a 20 minutos para *Escherichia coli*, hasta algunas horas para otras especies (11 horas para la *Nitrosomona europea*) (Arce, 2002)

Las curvas de crecimiento microbiano, de forma general, poseen cuatro fases en el tiempo (Figura 6) (Fontúrbel *et al.*, 2004; Henry *et al.*, 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)

En el estudio de la cinética de crecimiento de *Escherichia coli* se utilizó 10 mL de un cultivo de 24 h y se inocularon en 40 mL de caldo nutritivo. Las condiciones fueron: 37°C y 100 rpm de agitación. Se tomó una alícuota de 5 mL cada 60 minutos para ser analizado el porcentaje de transmitancia (%T) en un espectrofotómetro visible (Spectronic 20D+ a 600 nm).

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).

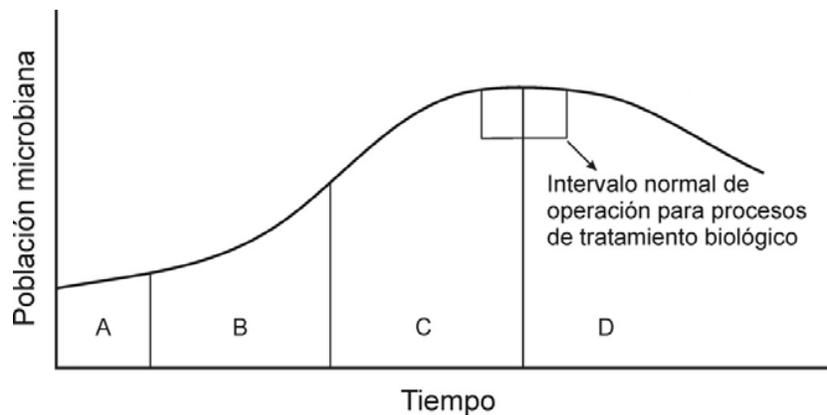


Figura 6. Crecimiento Microbiano en un Cultivo Discontinuo. Fuente: Fontúrbel e Ibañez (2004).

3.3 Pruebas de toxicidad para *Escherichia coli*, Concentración Inhibitoria Media (CI₅₀)

Para conocer el efecto tóxico de los metales pesados en la *Escherichia coli* se realizaron las pruebas de toxicidad. Para ello se determinó la concentración inhibitoria media (CI₅₀) que es la concentración de metales pesados (Cu, Fe, Mn y Zn) a la cual inhibe el 50% del crecimiento de la biomasa. En matraces Erlenmeyer de 250 mL, se agregaron 10 mL de biomasa, 90 mL de medio mineral con solución sintética de cada metal Cu, Fe, Mn y Zn a diferentes concentraciones (0, 20, 50, 80, 150, 300 y 500 mg/L), a un pH de 3-4, los

matraces fueron colocados en incubadora con agitación (C76 New Brunswick Scientific) a 100 rpm y 37° C, esto se realizó por duplicado. La lectura de densidad poblacional se realizó en un espectrofotómetro cada 8 horas a 600 nm por 48 horas. (Almendáriz, 2005).

3.4 Estudio de Biosorción de metales pesados en sistema por lotes

Las pruebas de biosorción de metales pesados en sistema por lotes se llevaron a cabo con *Escherichia coli*, en matraces Erlenmeyer de 125 mL, se agregaron 20 mL del efluente antropogénico y adicionando 5 mL de cultivo de 24 h de *Escherichia coli*. Las pruebas se realizaron por duplicado, se usaron dos matraces para cada tiempo de muestreo. Las condiciones que se establecieron fueron: pH entre 3 y 4, 37°C y 100 rpm de agitación. Se tomaron 5 mL de muestra en 0, 30, 60, 120, 180, 240 minutos, se centrifugó cada muestra a 6000 rpm separando la biomasa del agua. Se determinó la concentración de metales (Cu, Fe, Mn y Zn) del sobrenadante usando la técnica de espectrofotometría de absorción atómica utilizando un equipo Marca Perkin Elmer modelo AAnalyst 400.

La eficiencia de biosorción (E) se determinó usando la ecuación:

$$E = \left(\frac{C_o - C_f}{C_o} \right) \times 100 \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde:

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

3.5 Cinética de Adsorción de Metales Pesados por Biosorción

Para determinar la cinética de adsorción por biosorción de metales pesados se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 mL se le agregó 90 mL el Medio Mineral ácido a diferentes concentraciones de metales pesados con solución sintética

de cada metal Cu, Fe, Mn y Zn a diferentes concentraciones (0, 20, 50, 80, 150, 300 y 500 mg/L), colocándolos en incubadora con agitación a 100 rpm y 37° C. Se tomaron muestras de 5 mL de la solución en tiempo 0, 1, 4, 24 horas, las cuales fueron centrifugadas a 6000 rpm para separar la biomasa y analizar el sobrenadante. Por último se determinó la concentración de metales pesados utilizando la técnica de espectrofotometría de absorción atómica.

La cantidad de metales pesados (Cu, Fe, Mn y Zn) en la biomasa (q_{eq}) se calculó con la siguiente ecuación:

$$q_{eq} = \frac{m_o - m_{eq}}{V_{ads}} \quad (\text{Ecuación 6})$$

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 utilizado (L).

Los datos se ajustaron al modelo de Langmuir, para calcular la concentración de Cu, Fe, Mn y Zn máxima adsorbida por la biomasa.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se presentan los resultados obtenidos utilizando *Escherichia coli* aislada de un ambiente contaminado con metales pesados hasta obtener resultados de biosorción de metales pesados:

1. Recolecta de las muestras y Aislamiento de *Escherichia coli* (sección 4.1).
2. Cinética de crecimiento de *Escherichia coli* (sección 4.2).
3. Pruebas de toxicidad para *Escherichia coli*, concentración inhibitoria media CI_{50} (sección 4.2).
4. Estudio en sistema por lotes de biosorción con *Escherichia coli* (sección 4.4).
5. Estudio cinético de adsorción de metales pesados por biosorción de metales pesados (sección 4.5).

4.1 Recolecta de las Muestras y Aislamiento de *Escherichia coli*

El efluente de la descarga del complejo minero muestreado tuvo las siguientes características: 1) se encontraron altas cantidades de metales en solución Cu 10, Fe 350, Mn 35 y Zn 55 mg/L; 2) el pH de las aguas del efluente fue ácido (entre 4 y 5); esto es debido a que es la descarga directa del complejo minero. Las concentraciones de metales de este tipo de efluentes son generalmente más altas durante los meses de sequía e invierno cuando el flujo del agua es bajo, debido a que disminuye el volumen de agua y por lo tanto decrece el efecto de dilución. Aunado a esto, las concentraciones de sedimento suspendido decrecen lo cual ocasiona que disminuya el proceso de retención o secuestro de metales pesados (Gómez-Álvarez, 2008). Contrariamente, el incremento del flujo de agua durante los meses más cálidos ocasiona la dilución

de la concentración de metales pesados debido a los grandes volúmenes de agua; asimismo, decrece la concentración de metales disueltos debido a que aumenta el proceso de secuestro y/o retención, en virtud de que aumenta la concentración del sedimento suspendido (Garbarino *et al.*, 1995).

De los tres lugares seleccionados para recolectar muestra de agua solamente se pudo aislar la *Escherichia coli* en la unión de la descarga del complejo con las aguas residuales de la ciudad. Se realizaron varias purificaciones dado a la presencia de otros microorganismos. Esta bacteria se le identificó por la siembra que se realizó en agar EMB presentando desarrollo de colonias de color verde brillante en tiras pequeñas. Ya seleccionada, se utilizó para realizar experimentos de biosorción en sistema por lotes, debido a que se puede desarrollar a pH ácidos y esta reportada en la literatura como buen bioadsorbente de metales pesados (Lasat 2002, Leung *et al.*, 2000, Mijares, 2003).

4.2 Cinética del crecimiento de *Escherichia coli*

La cinética del crecimiento de *Escherichia coli* se muestra en la figura 7, se observa que en los primeros 50 minutos la bacteria se encuentra en la fase de adaptación preparándose para comenzar un rápido crecimiento, y una elevada tasa de biosíntesis de las proteínas necesarias para ello. A partir de los 50 hasta los 130 minutos se presenta la fase exponencial en donde, los nutrientes son metabolizados a la máxima velocidad posible. Asimismo, se observa en la cinética de crecimiento la fase estacionaria a partir de los 150 minutos en donde está se produce como consecuencia del agotamiento de los nutrientes en el medio. El proceso de biosorción se realiza cuando la bacteria está en esta fase exponencial, para garantizar que está en pleno crecimiento. Estos resultados concuerdan con Monge *et al.* 2009, en donde reporta la fase exponencial de 30 a 150 minutos. Se reportan en otros estudios para *Escherichia coli* la fase exponencial de 4 a 9 horas (Hincapié, 2007).

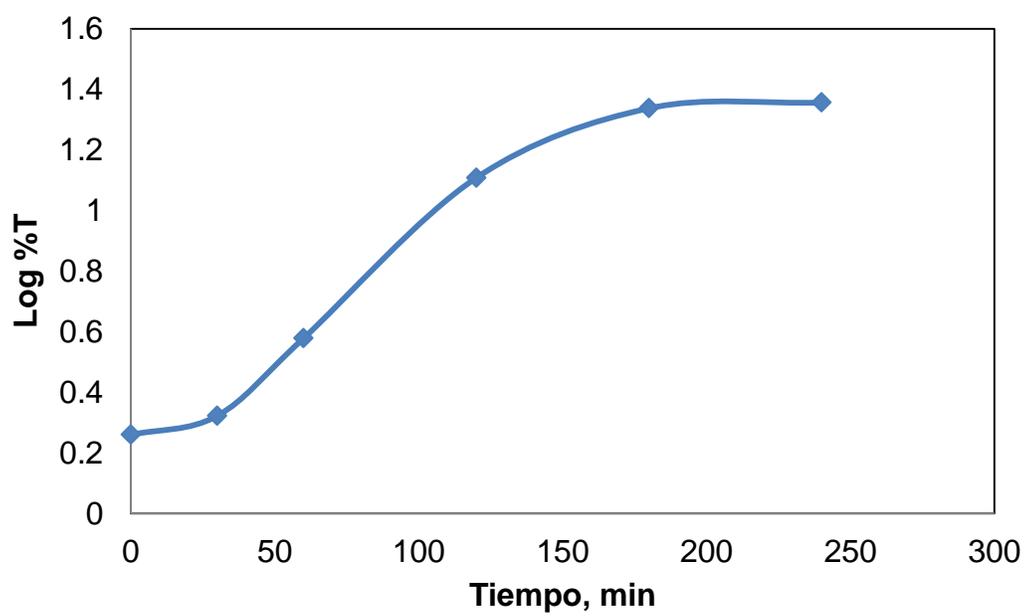


Figura 7. Curva de Crecimiento *Escherichia coli* Aislada de las Aguas Residuales

4.3 Pruebas de toxicidad para *Escherichia coli*, concentración inhibitoria media CI₅₀.

Los principales blancos de toxicidad de los metales pesados son proteínas, muchas de ellas con actividad enzimática, afectando a diversos procesos bioquímicos y la integridad de las membranas celulares y de los organelos. Los efectos tóxicos de los metales se ejercen, salvo pocas excepciones, por interacciones entre el ión metálico libre y su blanco. La relación de toxicidad para algunos metales se ha correlacionado de manera directa con la fuerza para unirse a grupos SH en condiciones in vitro (Ivanov *et al.*, 2003).

En el presente estudio, se muestran los efectos de los iones metálicos (Cu, Fe, Mn y Zn) en la inhibición del crecimiento poblacional de *Escherichia coli*. Al graficar la velocidad de crecimiento de *Escherichia coli* contra la concentración de cada metal, se encontró que se inhibe el crecimiento poblacional al 50% (concentración inhibitoria media, CI₅₀) a las siguientes concentraciones. Cu 28, Fe 70, Zn 40 y Mn 210 mg/L (figuras 7, 8, 9, 10). Estos resultados indican que no se recomienda llevar a cabo pruebas de biosorción a concentraciones del metal superiores a la CI₅₀.

Algunas investigaciones muestran valores parecidos. Se han reportado para *Escherichia coli* una CI₅₀ para Cu de 65 mg/L. (Monge *et al.*, 2008); también se ha reportado para Zn una CI₅₀ de *Escherichia coli* de 43 mg/L (Isarankura-Na-Ayudhya *et al.*, 2009); Alm (2003) reporta una concentración inhibitoria mínima de *Escherichia coli* (MIC) esta es la concentración mínima para inhibir el crecimiento, para Mn 20 mM, Zn 1, Cu 1 mM. Para otros tipos de biosorbentes Castillo (2004) reportó CI₅₀ 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.

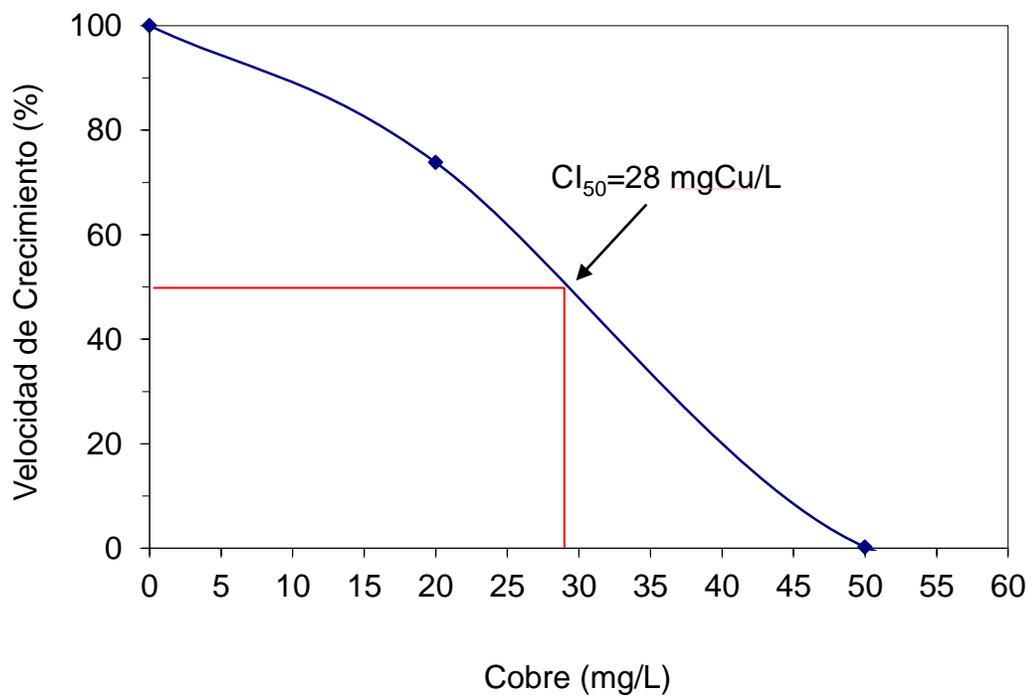


Figura 8. Efecto Inhibitorio de la Concentración de Cobre sobre la Velocidad de Crecimiento de *Escherichia coli* en 48 horas.

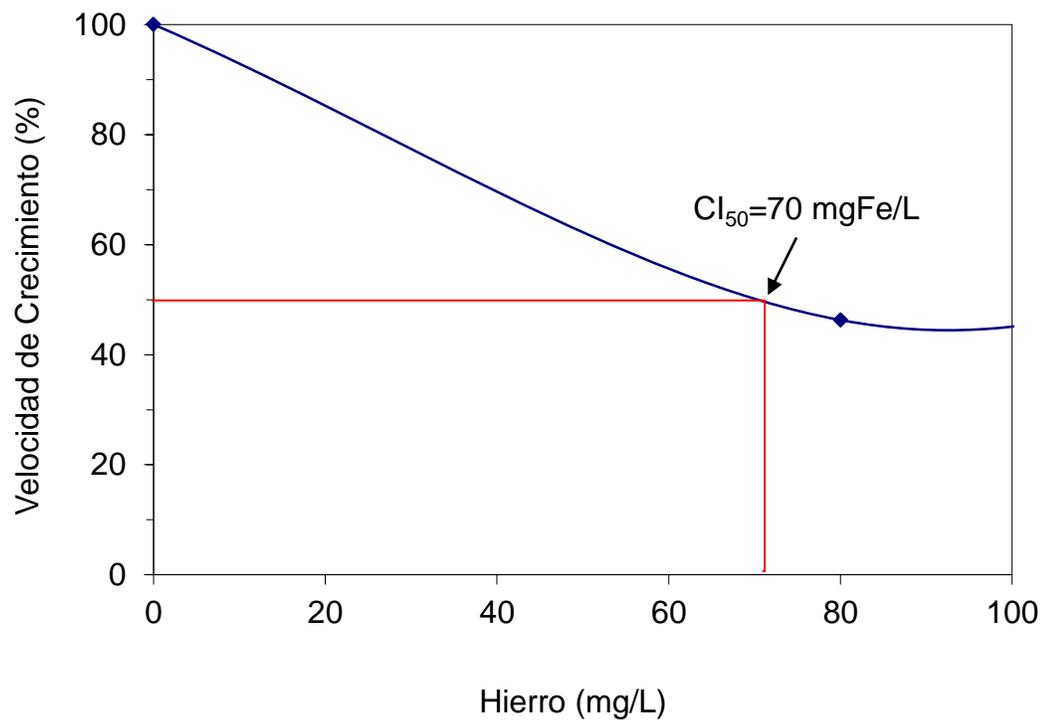


Figura 9. Efecto Inhibitorio de la Concentración de Hierro sobre la Velocidad de Crecimiento de la *Escherichia coli* en 48 horas.

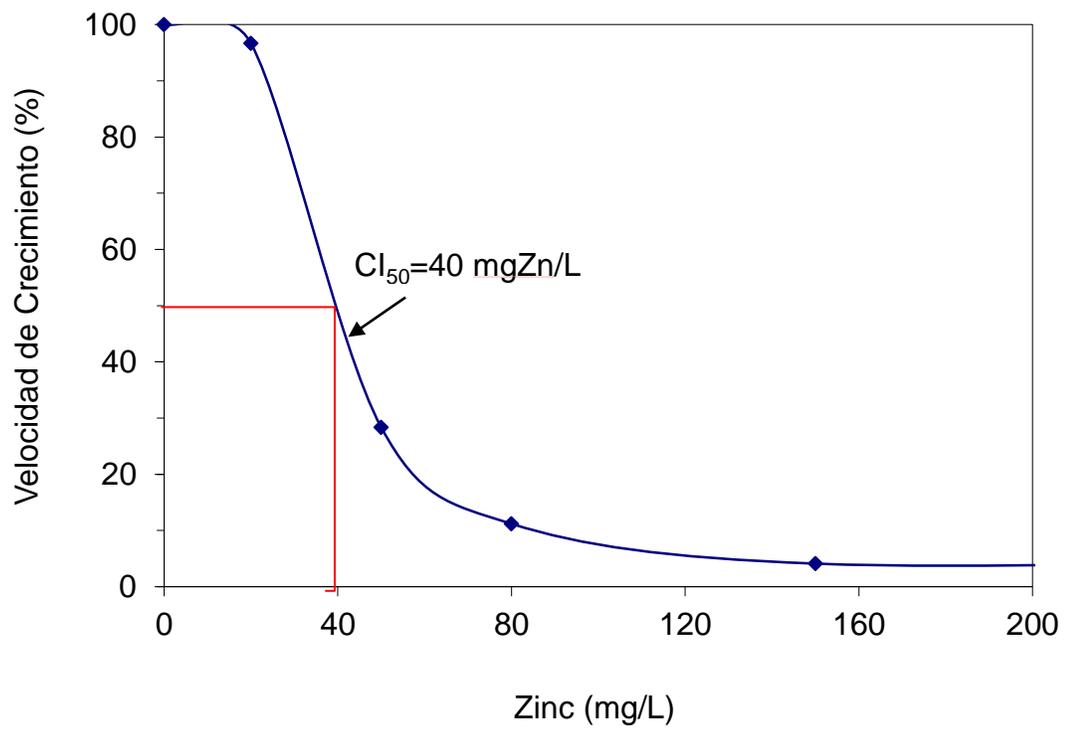


Figura 10. Efecto Inhibitorio de la Concentración de Zinc sobre la Velocidad de Crecimiento de *Escherichia coli* en 48 horas

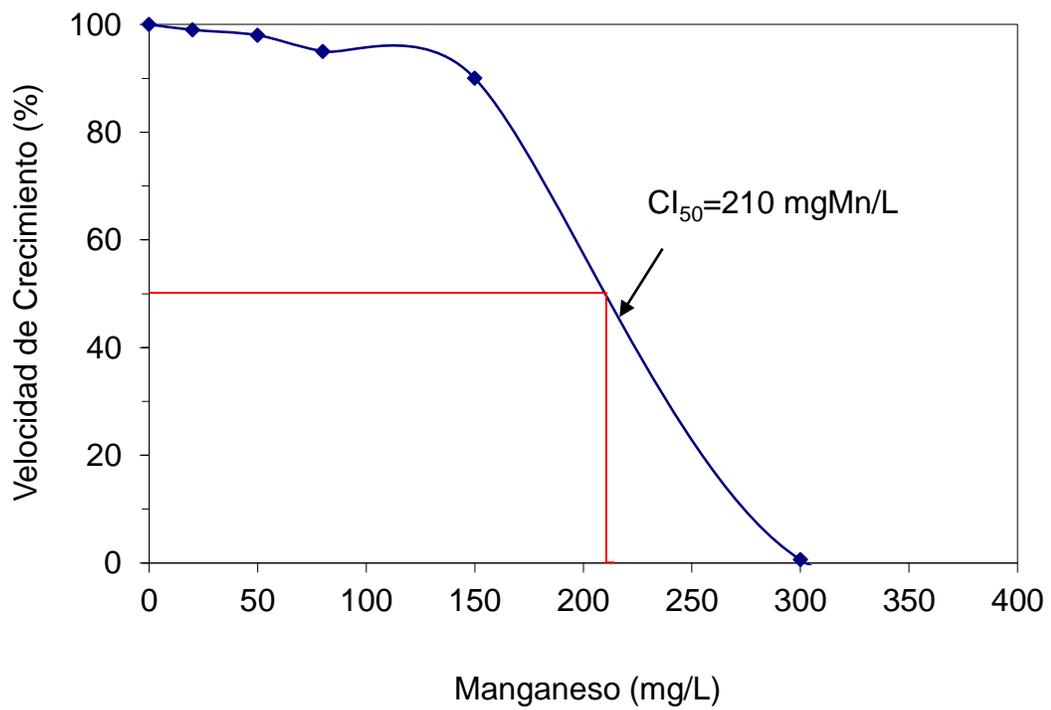


Figura 11. Efecto Inhibitorio de la Concentración de Manganeso sobre la Velocidad de Crecimiento de *Escherichia coli* en 48 horas

4.4 Estudio de Biosorción de metales pesados en sistema por lotes

Las pruebas de biosorción de metales pesados en sistema por lotes presentaron reducciones en las concentraciones de los metales expuestos. Los resultados de la biosorción de metales pesados, utilizando un efluente de una descarga minera con concentraciones iniciales de: Cu 10, Fe, Mn 35 y Zn 55 mg/L, se muestran en la figura 12. Al analizar el sobrenadante se obtuvieron las siguientes concentraciones de remoción después del proceso de biosorción Cu 7.4, Fe 123, Mn 20 y Zn 35 mg/L.

Estos resultados mostraron que se da la biosorción a las condiciones de pH ácido, concentraciones iniciales de metales pesados, tiempo de contacto y carga del biosorbente. Estas captaciones varían de acuerdo a la fase de las células usadas, siendo las mejores biosorciones en la etapa exponencial del crecimiento de *Escherichia coli*.

El porcentaje de remoción de metales pesados en soluciones acuosas depende de la cantidad del metal que biosorbe la biomasa y esta cantidad a su vez, es función de la capacidad de intercambio de la biomasa-metal. En estos experimentos, se calculó la eficiencia de remoción por medio de la ecuación 5 y así las remociones máximas fueron de Cu 24, Fe 65, Mn 43 y Zn 36%.

Otros estudios reportan los florecimientos de algas y bacterias fortalecidos por la adición de aguas residuales, disminuye los metales Cu, Cd, Zn, Hg y Fe de los efluentes mineros. El sistema de meandro usado en la mina de plomo (Pb) Homestake (EUA), hace pasar sus efluentes con Pb, Cu, Zn, Mn, Fe, Ni y Cd a través de canales que contienen algas, cianobacterias y plantas superiores. Los metales son removidos de la columna de agua con una eficiencia >99% (Gale, 1979).

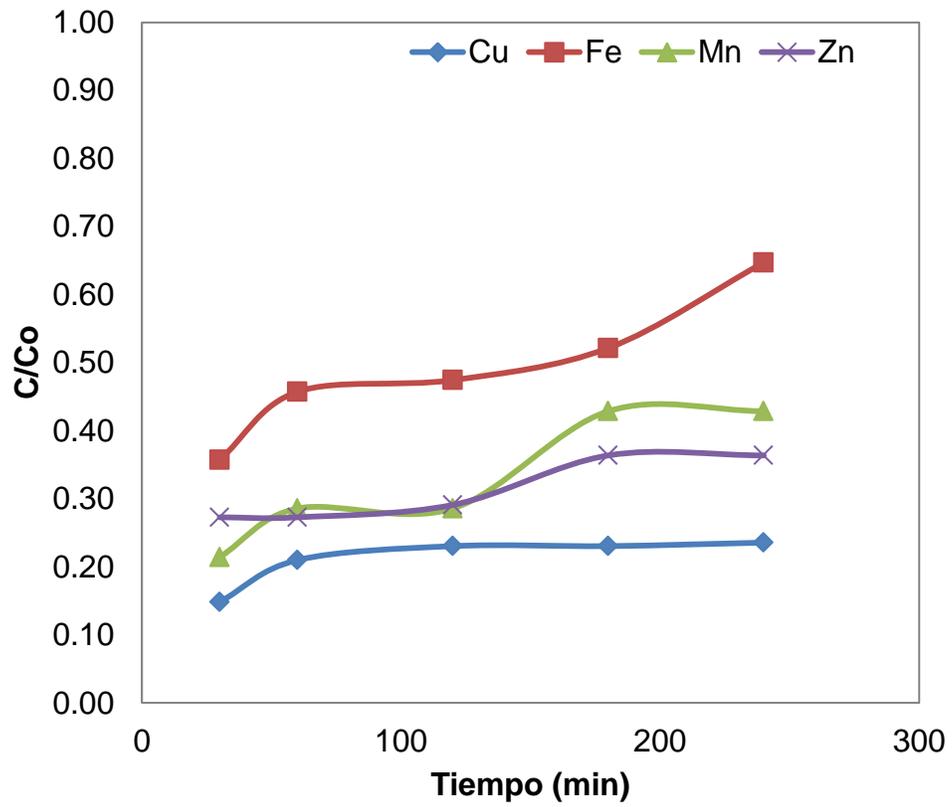


Figura 12. Curvas de Biosorción de Metales Pesados Usando *Escherichia coli*.

4.5 Estudio Cinético de Adsorción de Metales Pesados por Biosorción de Metales Pesados

El equilibrio existente entre la concentración de los iones de los metales en solución y la masa que se intercambia de esos iones a la biomasa, se puede representar por la isoterma de adsorción. Los datos experimentales de las isotermas de intercambio del Cu, Fe, Mn y Zn usando soluciones sintéticas sobre la biomasa se muestran en las figuras 13, 14, 15 y 16.

En las figuras 13, 14, 15 y 16 se representa las ordenadas al origen ($1/q_0$) para cada metal en este estudio. Con las ordenadas en el origen se determina la cantidad de captación máxima. Se obtuvieron resultados para Cu 200, Fe 166, Mn 333.3 y Zn 83.3 mg/g. Se puede observar que en todas las isotermas de biosorción, la capacidad de biosorción se incrementa con el aumento de la concentración en equilibrio del metal en la primera porción de la isoterma. Después la capacidad de biosorción alcanza o se aproxima al valor de saturación.

Los parámetros del modelo de Langmuir nos muestran las capacidades máximas de biosorción siendo en orden decreciente: Mn > Cu > Fe > Zn. Esto indica que el Mn fue el metal más efectivo para removerlo con *Escherichia coli*. Un valor grande de q_0 indica una fuerte unión entre el metal y la biomasa, midiendo la estabilidad del complejo formado entre el ion metálico y la pared celular de la bacteria en condiciones experimentales específicas

Algunas Investigaciones muestran cantidades similares de captación para biosorbentes usando bacterias. Para Cu Monge *et al.* 2008, reportó una $q_0 = 196$ mg/g para *Escherichia coli*; para Fe Selatnia *et al.* 2004, reportó una $q_0 = 122$ mg/L utilizando *Streptomyces rimosus*; y Celaya *et al.* 2000 reportó para Zn $q_0 = 82.6$ mg/L.

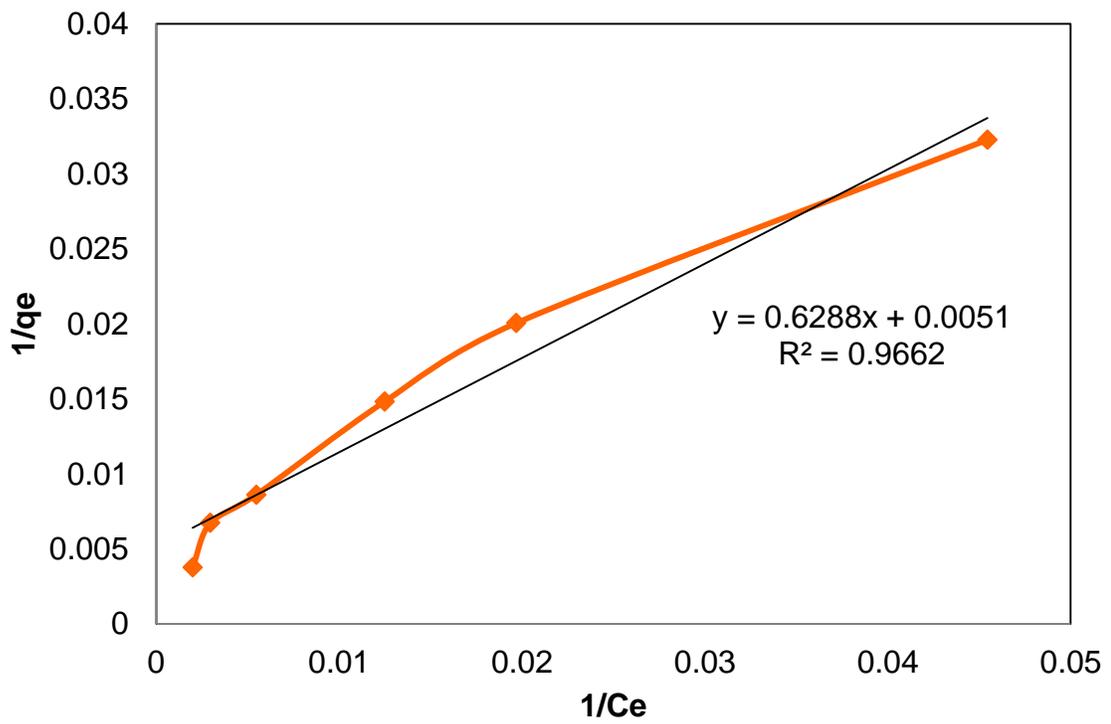


Figura 13. Isoterma de Langmuir para Cobre.

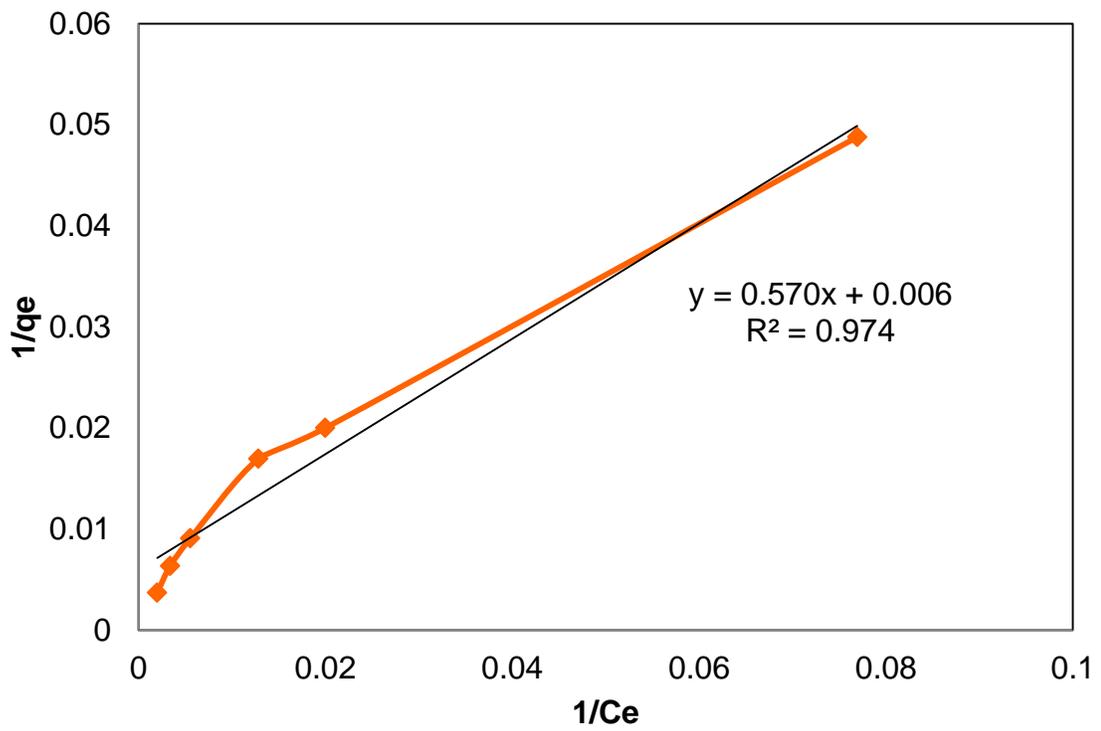


Figura 14. Isotherma de Langmuir para Hierro.

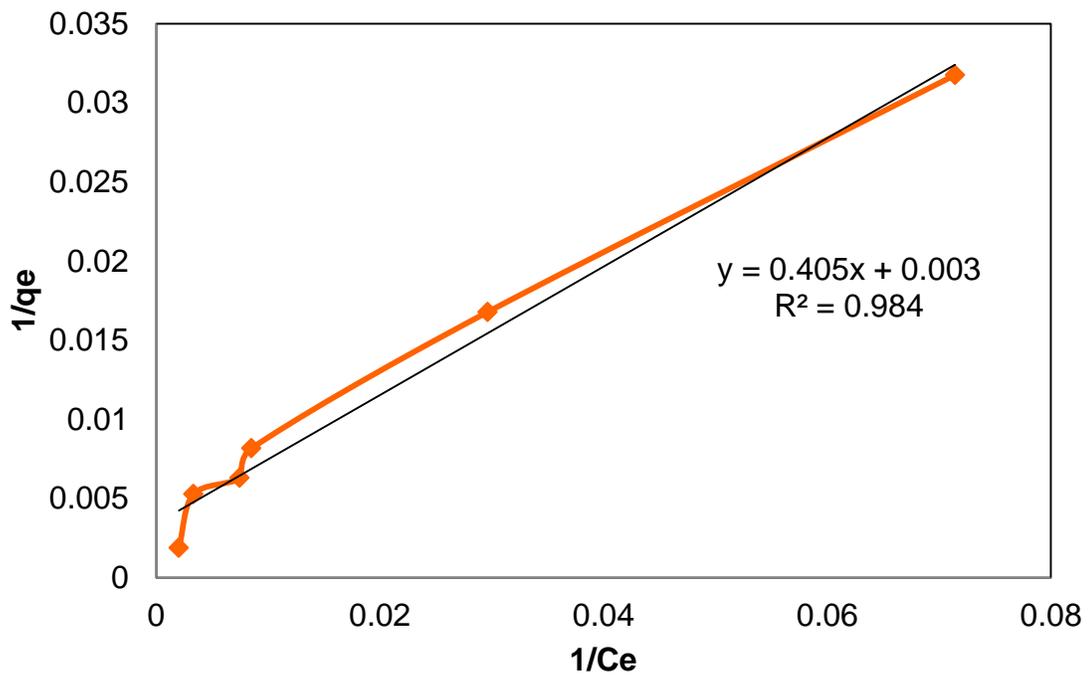


Figura 15. Isoterma de Langmuir para Manganese.

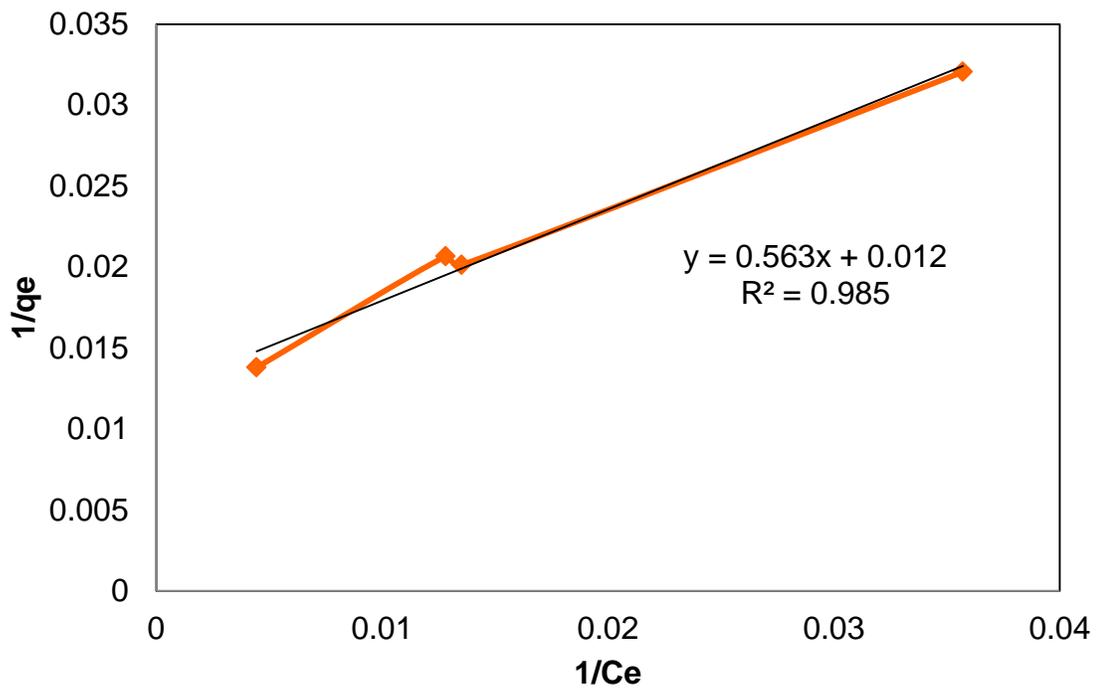


Figura 16. Isotherma de Langmuir para Zinc.

V. CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados obtenidos en el presente estudio del proceso de biosorción para la eliminación de metales pesados (Cu, Fe, Mn y Zn) con *Escherichia coli* se concluye lo siguiente:

Del muestreo realizado en el sitio de descarga del efluente minero el agua resultó con valores de pH ácidos, esto debido a la descarga directa, mientras que en la segundo lugar del muestreo se encontraron valores de pH neutros, debido a que es una mezcla de las aguas negras de la ciudad de Cananea y de la descarga del primer punto de muestreo, por lo tanto al mezclarse se neutralizan.

Se encontraron diferentes microorganismos en las aguas logrando aislar *Escherichia coli* en la unión de las aguas negras de la ciudad con el efluente industrial. La *Escherichia coli* fue usada para realizar las pruebas de biosorción en sistema por lotes. Esta cepa demostró su capacidad de crecimiento en condiciones de pH ácido y medio mineral, por lo que se utilizaron para determinar su capacidad en la remoción de metales de efluentes ácidos.

Al realizar las pruebas de toxicidad se puede llegar a la conclusión de que los procesos de biosorción para esta bacteria en la remediación de aguas con metales pesados como Cu, Fe, Mn y Zn se debe llevar a concentraciones menores de los límites de Cl_{50} siguientes: Cu 28, Fe 70, Zn 40 y Mn 210 mg/L y pH ácido para evitar que los metales precipiten, además esto no inhibió el crecimiento de la bacteria.

En los experimentos por lotes, la bacteria *Escherichia coli*, mostró la capacidad de biosorber a los metales seleccionados (Cu, Fe, Mn y Zn), ya que se obtuvieron remociones de Cu 24, Fe 65, Mn 43 y Zn 36%.

El estudio de la cinética de biosorción de los iones de metales seleccionados reflejó la efectividad de la *Escherichia coli* para biosorber metales pesados ya que las capacidades máximas de biosorción fueron de Cu 200, Fe 166, Mn 333.3 y Zn 83.3 mg/g. Los parámetros del modelo de Langmuir mostraron que las capacidades máximas de biosorción siendo en orden decreciente son: Mn > Cu > Fe > Zn. Esto indica que el Mn fue el metal más efectivo para removerlo con *Escherichia coli*.

En este trabajo se logró demostrar que el uso de *Escherichia coli* es eficiente y potencialmente aplicable a procesos reales de biosorción.

VI. RECOMENDACIONES

A través de estos estudios se puede llegar a las siguientes recomendaciones:

- Optimizar las condiciones de biosorción, incluyendo la optimización del pH, temperatura, fuerza iónica y efectos sinérgicos de los iones de diferentes metales.
- Usar bacterias genéticamente modificadas para soportar altas concentraciones de metales para obtener mejores resultados.
- Escalamiento a reactor. Considerar 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.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, I., Moctezuma-Zárata, M., Cárdenas, J. F., & Gutiérrez, C. (2007). Bioadsorción de cadmio (II) en solución acuosa por biomásas fúngicas. *Inf. Tec.* , 18, 9-14.
- Adriano, D. (1986). Trace elements in the terrestrial environment. *Springer Verlag* , 533.
- Ahalya, T., Ramachandra, & Kanamad, R. (2003). Biosorption of Heavy Metals. *Res.J.Chem.Envirón* , Vol.7(4).
- Alm, E. (2003). Implications of Microbial Heavy Metal Tolerance in the Environment. *Reviews in Undergraduate Research* , Vol. 2, 1-6 .
- Almendariz F. J. (2005). Tratamiento de sosas gastadas en un reactor de lecho expandido de lodo granular anaerobio. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma Metropolitana. México, D.F.
- Arce, O. O. (2002). Cinética del crecimiento microbiano. *Manual de prácticas*.
- Atlas, M., & Bartha. (2002). Ecología microbiana y microbiología ambiental. *Ed. Pearson educación* , 3-24.
- Basel, R., Richter, E., & Banwart, G. (1983). Monitoring microbial numbers in food by density centrifugation. *Appl. Environ. Microbiol* , 45, 1156-1159.
- Basso, M. C., Cerrella, E., & Cukierman, A. (2002). Empleo de algas marinas para la biosorción de metales pesados de aguas contaminadas. *Avances en Energías Renovables y Medio Ambiente* , 6, 1. 69-74.
- Bergey, D. H. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.

- Borzacconi, L., & López I. (2003). *Cinética de ingeniería de reacciones*.
Obtenido de <http://www.fing.edu.uy/iq/reactores/cursos/reactores1.pdf>
- Branco-Murgel, M.S. (1984). Limnología sanitaria. Estudio de la polución de aguas continentales. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Washington, D. C. 120 p.
- Cañizares- Villanueva, R. O. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología* , 42:131-143.
- Celaya, R., Noriega, J. A., Yeomans, J., Ortega, L. J., & Ruiz, A. (2000). Biosorption of Zn by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Bioprocess Eng* , 22:539–42.
- Cervantes. (2006). Las bacterias y los metales ¿relaciones peligrosas? *Carisma de la Ciencia* , 3:5-8.
- Cohen, Y. (2001). Biofiltration-The Treatment of Fluids by Microorganisms Immobilized into the Filter Beddig Material: A Review. *Bioresource Technology* , 77. 257-74.
- Davis, B., R., D., Eisen, H., & H., G. (1975). *Tratado de Microbiología*. Barcelona, Madrid: Salvat Editores, S. A.
- 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.
- Förstner, U., & Wittmann, G. (1979). Metal Pollution in the Aquatic Environment. *Springer-Verlag* , 486.

- Förster, U., & WITTMANN, G. (1981). Heavy metal pollution in the aquatic environment. *Spring-Verlag* , 486.
- Gadd, G. M. y C. White. (1993). Microbial treatment of metal pollution – a working biotechnology?. *Trends Biotechnol.* 11:352-359.
- Gale, N. L., y B.G. Wixson. (1979). Removal of heavymetals from industrial effluents by algae. *Dev. Ind. Mi-crobiol.* 20:259-273.
- Garbarino, J.R., Hayes, H.C., Roth, D.A., Antweiler, R.C., Brinton, T.I. and Taylor, H.E. (1995). Heavy metals in the Mississippi River. In: R.H., Meade, Ed.), *Contaminants in the Mississippi River, 1987-92.* U.S. Geological Survey Circular 1133. Reston, Virginia.
- Gómez, 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, A. (2008). Tesis doctoral. *Estudio de caracterización y biodisponibilidad de metales pesados (agua y sedimento) del Río San Pedro, localizado en una región semi-árida del noroeste de México* . Editorial Universidad Autónoma de Baja California. Instituto de Ingeniería.
- Heinke, & Henry, J. G. (1999). En *Ingeniería Ambiental* (págs. 195, 196, 431). México: Ed Prentice Hall. México.
- Hincapié, G., Marín, J., Rios, L., & Rastrepo, G. (2007). Evaluación de la degradación de E.coli empleando un fotorreactor de discos rotatorios. *Ingeniería e Investigación* , Vol. 27, No.3.

- Holan, Z., Volesky, B., & Prasetyo. (1993). Biosorption of Cd by biomass of marine algae. *Biotechnol. Bioeng* , 41, 819-25.
- Holan, Z., & Volesky, B. (1994). Biosorption of Pb and Ni by biomass of marine algae. *Biotechnol. Bioeng* , 43, 1001-9.
- Ilhan, S., Nurbas, M. N., Kilicarslan, S., & Ozdag, H. (2004). Removal of chromium, lead and copper ions from industrial waste waters by *Staphylococcus saprophyticus*. *Turkish Electronic Journal of Biotechnology* , 2, 50-57.
- Isarankura-Na-Ayudhya P, Isarankura-Na-Ayudhya C, Treeratanapaiboon L, Kasikun K, Prachayasittikul V (2009). Proteomic profiling of *Escherichia coli* in response to heavy metal stress. *Eur. J. Sci. Res.*, 25(4): 679 – 688.
- Ivanov VB, Bystrova EI, Seregin IV (2003) Comparative impacts of heavy metals on root growth as related to their specificity and selectivity. *Russian J Plant Physiol* 50:398-406.
- Juviña, & Torres, A. (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* .
- Lasat. (2002). Phytoextraction of toxic metals: A review of biological mechanisms. *J. Environ. Qual.* , 31,109-120.
- Laws, A.E. (1993). *Aquatic Pollution. An Introductory Text*. John Wiley & Sons Inc., New York, U.S.A. 611 p.

- Leung, W., Wong, M. F., Chua, H., W., L., Yu, P., & Leung, C. (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.
- Levine *EMB agar*. (2011). Obtenido de Britania Laboratorio: <http://www.britanialab.com.ar/esp/productos/b02/levinembagar.htm>
- Madigan M.T., Martinko J. M., Parker J. (2004). *Brock. Biología de los microorganismos*. Décima edición. Pearson Prentice Hall. España. Pp. 137-166.
- Manzanares, M., & Lozano, P. (2007). Desarrollo y optimización de un sistema automático de monitorización del proceso de biosorción del ion cobre (II) en raspo de uva. 17,18.
- Meargeay, M., Nies, D., Schlegel, HD., Gerits, J., Charles, P., and van Gijsegem, F. (1985). *Alcaligenes eutrophus* CH34 is a facultative chemolithotroph with plasmid-borne resistance to heavy metals. *J Bacteriol* 162: 328-334.
- Metcalf, & Eddy. (1991). *Wastewater Engineering; Treatment, Disposal, and Reuse, 3rd. ed.* New York: McGraw-Hill.
- Mijares M., & Pia A. 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, O. (2009). *Biosorción de cobre con bacterias*. Tesis doctoral. Mexicali, B.C: Universidad Autonoma de Baja California.
- Monge, O., Valenzuela, J., Acedo, E., Certucha, M., & Almendáriz, J. (2008). Biosorción de cobre en sistema por lote y continuo con bacterias

aerobias inmovilizadas en zeolita natural (clinoptilolita) . *Rev. Int. Contam. Ambient* .

Mountouris, A., Voutsas, E. and Tassios, D. (2002). Bioconcentration of heavy metals in aquatic environments: the importance of bioavailability. *Marine Pollution Bulletin*, 44 (2002) 1136-1141.

Murray, K. (1996). Statistical comparisons of heavy metal concentrations in River sediments. *Environmental Geology* , 27, 54-58.

Nelson, C., & LAMOTHE, P. (1993). Heavy metals anomalies in the Tinto and Odiel river and estuary system, Spain. *Estuaries* , 16, 496-511.

Pelczar, J. M., Reid R. D., Chan E. C. S. (1993). *Microbiología*. Mc Graw-Hill. México. 18-119. Madigan M.T., Martinko J. M., Parker J. (2004). *Brock. Biología de los microorganismos*. Décima edición. Pearson Prentice Hall. España. Pp. 137-166.

Purves, D. (. (1985). Trace element contamination of the environment. *Elsevier, Amsterdam* , 260.

Reyes, E., Cerino, E., & Suárez, H. M. (2006). Remoción de metales pesados con carbón activado como soporte de biomasa. *Ingenierías. IX* , 31.59-64.

Rivas, B., Gutiérrez, S., & Merino, F. (2004). Biorremoción de metales pesados en solución por *Pseudomonas fluorescens* M1A-4S aisladas de ambientes mineros. *Segunda Semana de Ciencia y Tecnología II-SCT-2004* .

Salomons, W. (1995). Environmental impact of metals derived from mining activities: processes, predictions, prevention. *Journal Geochemical Exploration* , 52, 5-23.

- Selatnia, A., Bakhti, M., Madani, A., Kertous, L., & Mansouri, Y. (2004). Biosorption of Cd^{2+} from aqueous solution by a NaOH-treated bacterial dead *Streptomyces rimosus* biomass. *Hydrometallurgy* , 75:11–24.
- Smith, J. M. (1995). En *Ingeniería de la Cinética Química. Novena Edición*, ed. (págs. 47-48). México: McGraw-Hill.
- Topalián M.L., Castañé P.M., Rovedatti M.G. and Salibián A. (1999). Principal component análisis of dissolved heavy metals in water of the Reconquista River (Buenos Aires, Argentina). *Bulletin Environmental Contamination Toxicology* 63:484-490.
- Veglio, F., & Beolchini, F. (1997). Removal of metals by biosorption: a review. *Hydrometallurgy* , 44:301–16.
- Volesky, B. (1987). Biosorbents for metal recovery. *TIBTECH* , 5:96–101.
- Volesky, B. (1990). Biosorption of heavy metals. *CRC Press, Boca Raton* , Pp.1-5.
- Volesky, S. (2004). Equilibrium (bio-)Sorption. En *SORPTION AND BIOSORPTION* (pág. Chapter 6). Montreal, Canada.
- Volke, & Velasco, T. (2004). *Evaluación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales*. INE.
- Vullo D. L. (2003). Microorganismos y metales pesados: Una interacción en beneficio del medio ambiente. *Revista Química Viva*. Vol. 2, num. 3.
- Watchtower Bible and tract Society of New York, Inc. (2011). Peligros del agua contaminada. *Despertad Junio 2011* , 29.
- Wood, J. (1974). Biological cycles for toxic elements in the environment. *Science* 183 , 1049-1052.

Wood, J. (1989). Transport, bioaccumulation and toxicity of elements in microorganisms under environmental stress. In Proc Int Conf Heavy Metals in the Environment, Geneve. *P. Vernet (ed) CEP Consultants Ltd, Edingurgh, UK*, 1-12.

Yilmaz, E. I. (2003). Metal tolerance and biosorption capacity of *Bacillus circulans* strain EB1. *Research in Microbiology*, 154: 409-415.