



EL SABER DE MIS HIJOS
HARÁ MI GRANDEZA

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE INGENIERÍA

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y METALURGIA

ESTUDIOS DE BIOADSORCIÓN DE COBRE Y ZINC UTILIZANDO BIOMASA SECA DE UN CONSORCIO DE LEVADURAS AISLADAS DE EFLUENTES CONTAMINADOS

Tesis

Que para obtener el título de:

INGENIERO QUÍMICO

Presenta

Lourdes Ortega Campa

Hermosillo, Sonora

Junio 2015

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

INDICE

AGRADECIMIENTOS	ii
DEDICATORIA.....	iii
INDICE	iv
INDICE DE FIGURAS	vi
INDICE DE TABLAS	vii
RESUMEN	viii
I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1. Objetivo General	4
1.1.1. Objetivos específicos	4
II. ANTECEDENTES	5
2.1 Contaminación por Metales Pesados.....	5
2.2 Contaminación del Agua	5
2.2.1 Contaminación del Agua por Metales Pesados	6
2.3 Metales Pesados	7
2.4 Procesos Biológicos para la Recuperación de Metales Pesados	9
2.4.1 Bioadsorción	9
2.5 Técnicas de Bioadsorción	11
III. METODOLOGIA.....	14
3.1 Muestreo de Aguas Contaminadas	15
3.2 Aislamiento	17
3.3 Caracterización	18
3.3.2.1 Caracterización Fenotípica por Fermentación de Carbohidratos "reacción de Molish"	18
3.4 Obtención y Crecimiento de Biomasa	19
3.5 Tratamiento de Biomasa y Liofilización.....	20
3.6 Estudios de Bioadsorción del Cobre y Zinc.....	21
3.7 Determinación de la Concentración de Metales.....	22
3.8. Caracterización de la Biomasa Seca sin Tratar del Consorcio de Levaduras.....	23

IV. RESULTADOS	24
4.1. Análisis del Muestreo y Aislamiento	24
4.2. Caracterización Macroscópica y Microscópica	24
4.3. Obtención de Biomasa	32
4.4 Bioadsorción del Cobre y Zinc en Sistema por Lotes	33
4.5 Caracterización de Biomasa del Consorcio de Levaduras	37
V. CONCLUSIONES	41
VI. BIBLIOGRAFIA	42
ANEXOS	47
Anexo A.....	47
Tinción de Gram	47
Anexo B.....	49
Congelación de Cepas para Almacenamiento	49
Anexo C	50
Tablas de Resultados.....	50

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Bioacumulación y biadsorción de metales pesados.....	10
2. Diagrama de flujo de la metodología realizada.....	14
3. Estación 1 de muestreo, aguas residuales de la ciudad.....	15
4. Estación 2 de muestreo, desecho de agua de la mina.....	16
5. Estación 3 de muestreo, desecho de agua de la mina.....	16
6. Siembra de consorcio de levaduras.....	19
7. Liofilizador utilizado para secar biomasa.....	20
8. Preparación de muestras en matraces para la bioadsorción de Cu y Zn.....	22
9. Tinción de levaduras aisladas del muestreo río San Pedro (1).....	28
10. Tinción de levaduras aisladas del muestreo río San Pedro (2).....	29
11. Tinción de levaduras aisladas del muestreo río San Pedro (3).....	30
12. Desarrollo poblacional del consorcio de levaduras.....	32
13. Porcentaje de bioadsorción para el cobre con biomasa de levaduras seca sin tratar.....	34
14. Porcentaje de bioadsorción para el cobre con biomasa de Levaduras seca pre-tratada.....	34
15. Porcentaje de bioadsorción para el zinc con biomasa de levaduras seca sin tratar.....	36
16. Porcentaje de bioadsorción para el zinc con biomasa de levaduras, seca pre-tratada.....	36
17. a) Fotomicrografía y b) EDS representativas del sistema biomasa-sin metal del proceso de bioadsorción de biomasa de levaduras sin tratar.....	38
18. a) Fotomicrografía y b) EDS representativas del sistema biomasa-con metal del proceso de bioadsorción de biomasa de levaduras seca sin tratar después de la bioadsorción de cobre.....	39
19. a) Fotomicrografía y b) EDS representativas del sistema biomasa-con metal del proceso de bioadsorción de biomasa de levaduras seca sin tratar después de la bioadsorción de zinc.....	40

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
4.1. Cepas encontradas por estación.....	25
4.2. Características visuales de las cepas.....	26
4.3. Resultados obtenidos en la Tinción Gram para levaduras.....	27
4.4. Resultados a fermentación de carbohidratos.....	32
4.5. Resultados de bioadsorción de cobre y zinc con biomasa seca pre-tratada con NaOH y sin tratar a las 48 horas.....	36

RESUMEN

La contaminación del medio ambiente con metales tóxicos, surge como resultado de actividades humanas industriales. Existen procesos biotecnológicos para el tratamiento de residuos líquidos que contienen metales tóxicos, una de ellas es la biosorción. Algunos microorganismos, tienen la capacidad de concentrar metales a partir de soluciones acuosas diluidas y acumularlas dentro de sus estructuras microbianas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la bioadsorción de cobre y zinc utilizando consorcio de levaduras aisladas de efluentes contaminados. Para este estudio se realizó un muestreo al río San Pedro del cual se logró identificar diferentes bacterias y levaduras por medio de pruebas bioquímicas y fenotípicas. Se seleccionaron las levaduras para producir biomasa suficiente. Se obtuvo un liofilizado del consorcio de levaduras aisladas y con los estudios de MEB se mostró la integridad celular de las levaduras. Se realizó un pre-tratamiento de la biomasa con NaOH con la finalidad de obtener mejor resultado de bioadsorción. Se llevó a cabo la biosorción del cobre y zinc en sistema por lote con el consorcio de levaduras seca pre-tratada con NaOH y sin tratar, se analizó la concentración de los metales por espectrofotometría de absorción atómica. Se logró obtener una bioadsorción de 46.58% para el cobre y un 38.86% en el zinc, con biomasa sin tratar y con biomasa pre-tratada 42.9% de cobre y de 40.28% de zinc, ambos experimentos a un tiempo de 48 horas. La caracterización por MEB y EDS corroboró la presencia de los metales de cobre y zinc en la biomasa de levaduras después del tratamiento. No se observó una diferencia significativa en los procesos de bioadsorción utilizando biomasa seca pre-tratada y sin tratar con ambos metales. El proceso de bioadsorción de cobre y zinc con biomasa de levaduras seca sin tratar representa una alternativa de solución para la disminución de la concentración de Cu y Zn.

I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los agentes contaminantes, son un conjunto de factores o sustancias que están presentes en el medio ambiente y que causan efectos desfavorables para la salud o el medio ambiente, suelen distinguirse por: agentes biológicos, agentes físicos, y agentes químicos. De estos últimos como ejemplo se pueden mencionar, los hidrocarburos, los metales pesados y los plaguicidas; para que exista la contaminación por química se requiere que una sustancia se acumule en un sustrato dado en concentraciones que excedan el nivel basal y genere efectos adversos (Lucho *et al.*, 2005).

En las últimas cinco décadas, los metales pesados se han convertido en contaminantes ambientales de primera importancia, principalmente por el incremento y la diversificación de los procesos industriales (Lucho *et al.*, 2005).

En la actualidad la contaminación del medio ambiente con metales tóxicos, surge como resultado de actividades humanas principalmente industriales. Estos contaminantes son descargados en la atmósfera y en los ambientes acuáticos así como terrestres.

En sonora la industria minera es una actividad importante, pero también ha presentado un fuerte problema de contaminación (Monge *et al.*, 2008).

Entre las actividades industriales que generan mayor contaminación por metales pesados se encuentran las siguientes: Minería, metal-mecánica, galvanoplastia, fundición, química, petroquímica, producción de pigmentos y tintes, producción de baterías, impresión de textiles, electrónica, industrial de papel, fotografía, producción de hule, cerámica, plaguicidas y fertilizantes, cementera, tenería y acabado de pieles. Los contaminantes liberados al ambiente por estas actividades industriales eventualmente pueden llegar a los cuerpos de agua, por

escurrimiento a las fuentes superficiales y por infiltración a los acuíferos (Lucho *et al.*, 2009).

Los efectos que causan los metales en el funcionamiento de los ecosistemas son de importancia tanto económica como de salud pública. Aunque los metales pesados son esenciales en el crecimiento, se ha reportado que algunos también tienen efectos tóxicos. Los metales son difíciles de eliminar del medio, puesto que los propios organismos los incorporan a sus tejidos y estos a sus depredadores en los que se acaban manifestando (Chen *et al.*, 2009).

El cuerpo humano no puede procesar y eliminar los metales, como resultado suelen depositarse en varios órganos internos y grandes cantidades pueden causar reacciones adversas y serios daños al cuerpo. A diferencia de los contaminantes orgánicos, los metales pesados no son biodegradables y cuando se ingieren, se combinan con las biomoléculas del cuerpo como proteínas y enzimas para formar componentes biotóxicos estables, tienden a acumularse en los organismos vivos y muchos iones de metales pesados son conocidos por ser tóxicos o cancerígenos (Duruibe *et al.*, 2007).

Existen procesos biotecnológicos para el tratamiento de residuos líquidos que contienen metales tóxicos, una de ellas es la biosorción. Los microorganismos y sus productos pueden ser bioacumuladores muy eficientes de metales solubles y particulados, especialmente a partir de concentraciones externas diluidas, y con ello las tecnologías basadas en microorganismos ofrecen una alternativa o ayudan a las técnicas convencionales para la eliminación o recuperación de metales. Microorganismos tales como levaduras, hongos, algas, bacterias y cierta flora, tienen la capacidad de concentrar metales a partir de soluciones acuosas diluidas y acumularlas dentro de la estructura microbiana (Mejía, 2006).

Está comprobado que dichos microorganismos los cuales poseen la capacidad o propiedad de secuestrar a los metales se pueden usar para disminuir la concentración de los metales pesados desde partes por millón a partes por billón,

secuestrando efectivamente los iones metálicos disueltos, incluso en soluciones diluidas complejas, con una alta efectividad y rapidez, así que por todo lo antes mencionado los microorganismos son una alternativa para el tratamiento de volúmenes elevados de aguas de desecho con bajas concentraciones (Chen *et al.*, 2009).

La biosorción, es la captación de metales que lleva a cabo una biomasa completa, a través de mecanismos fisicoquímicos como la adsorción o el intercambio iónico llevándose a cabo principalmente en la pared celular (Mejía, 2006)

El proceso de biosorción involucra una fase sólida y una fase líquida que contiene las especies disueltas que van a ser sorbidas. Debido a la gran afinidad de la fase sólida, por las especies de la fase líquida, son atraídas hacia el sólido y enlazado. El proceso continúa hasta que se establece un equilibrio entre el sorbato disuelto y el sorbato enlazado al sólido (Duruibe *et al.*, 2007).

1.1. Objetivo General

Evaluar la bioadsorción de cobre y zinc utilizando biomasa seca de un consorcio de levaduras aisladas de efluentes contaminados.

1.1.1. Objetivos específicos

1. Aislar e identificar levaduras encontradas en las muestras de efluentes contaminados.
2. Obtener biomasa aerobia seca por liofilización del consorcio de levaduras.
3. Pre-tratar la biomasa con NaOH.
4. Evaluar la bioadsorción de metales pesados (Cu y Zn) en sistema en lote usando biomasa seca tratada con NaOH y sin tratar.
5. Caracterizar el sistema biomasa-metal del proceso de bioadsorción por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Espectroscopía por Dispersión de Energía de Rayos X (EDB).

II. ANTECEDENTES

2.1 Contaminación por Metales Pesados

En México, como consecuencia del desarrollo industrial, se registra una creciente y preocupante contaminación ambiental, mayormente debido a la poca educación ambiental en la actividad minera y por la explotación petrolera. A su vez, 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 cobre (Cu), zinc (Zn), plata (Ag) y plomo (Pb). 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 una gran cantidad de sitios contaminados a lo largo de todo el país (Monge *et al.*, 2008).

Estos metales pueden detectarse en el medio ambiente en su estado elemental lo que implica que no están sujetos a biodegradación o a formación de complejos salinos por lo que en estas circunstancias no pueden ser mineralizados (Monge *et al.*, 2009).

Es por eso que los metales pesados representan un problema actual el cual requiere atención para evitar los efectos nocivos en las comunidades que están en contacto con aguas contaminadas (Senol *et al.*, 2008).

2.2 Contaminación del Agua

La contaminación de cuerpos de agua, 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 si no también en las comunidades biológicas. Dichos cuerpos de agua se han contaminado mediante sustancias tóxicas como ácidos, solventes orgánicos, pinturas, metales y demás, derivados de actividades industriales, agrícolas, ganaderas, domésticas, dicha agua no es apta para el consumo (Heinke *et al.*, 1999).

2.2.1 Contaminación del Agua por Metales Pesados

La contaminación del agua puede definirse como la alteración desfavorable que sufre, al incorporarse 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 peligrosos es la contaminación provocada por las altas concentraciones de algunos metales pesados y su incremento en los efectos adversos causados por la persistencia de la biomagnificación (Topalian *et al.* 1999). Los metales son introducidos a los sistemas acuáticos de forma natural, como resultado de la lixiviación de los suelos y rocas, y erupciones volcánicas (Laws, 1993). 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 (Platt, 2011).

Los metales pesados generalmente no se eliminan de los ecosistemas acuáticos por procesos naturales debido a que no son biodegradables (Murray, 1996).

Las altas concentraciones de metales pesados en las aguas de corrientes fluviales asociados a sulfuros tales como el arsénico (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).

Cada metal tiene un mecanismo de acción y un lugar de acumulación preferido, pueden producir algunas alteraciones en los ecosistemas y la fauna. El problema de la contaminación del agua por metales pesados es que su efecto es silencioso,

no se ve, y cuando nos damos cuenta del daño que producen ya es tarde y sobre todo que son peligrosos para la salud, ya que los metales no se eliminan fácilmente ya que no son biodegradables ni metabolizados (Eróstegui, 2009).

Los metales tienen tres vías principales de entrada al medio acuático:

- La atmosférica, que sucede gracias a la sedimentación de partículas emitidas a la atmósfera ya sea por procesos naturales o antropogénicos.
- La terrestre, debiéndose a la sedimentación de la escorrentía superficial de terrenos contaminados así como otras causas naturales.
- Y la vía directa de entrada al medio acuático, que se debe a los vertidos de aguas residuales, industriales y urbanas a los cauces fluviales. (Manzanares *et al.* 2007).

2.3 Metales Pesados

El término de metal pesado se refiere a todo elemento químico metálico que tenga una densidad relativamente alta y que sea tóxico o venenosos en concentraciones pequeñas (Field, 2008). Son sustancias propias de la naturaleza, constituyen un grupo cercano a los 40 elementos de la tabla periódica que tienen una densidad mayor a 5 g/cm³ y pesos moleculares altos (Eróstegui, 2009).

2.3.1 Cobre (Cu)

El Cu es un metal de transición muy usado en la industria para muchos productos como: fungicidas, esmaltes y pigmentos, prótesis médico-quirúrgicas, dispositivos intrauterinos, entre otros. Es necesario para el mantenimiento de la fisiología normal en los humanos y se obtiene tanto del agua como en los alimentos.

La contaminación por este metal se produce principalmente en la cercanía de las minas donde se extrae y procesa, y en las refinerías durante su purificación. En áreas industrializadas el problema es mayoritariamente la exposición crónica a dosis bajas. Los casos de exposición aguda se producen sobre todo por la ingesta de líquidos contaminados con Cu, o por el consumo accidental. También se pueden encontrar grandes concentraciones de Cu en peces u otros animales marinos.

El cobre en exceso en el cuerpo puede causar, cirrosis infantil, enfermedades asociadas al cromosoma X, enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, entre otras (Arnal, 2010).

2.3.2 Zinc (Zn).

Es uno de los elementos más comunes en la corteza terrestre, se encuentra en el aire, el suelo y el agua, y en todos los alimentos. En pequeñas cantidades el zinc es un elemento nutritivo esencial necesario para los seres vivos.

Es un metal brillante color blanco-azulado, es explosivo; tiene muchos usos como el revestimiento del hierro y otros metales con el objeto de prevenir el enmohecimiento y la corrosión (galvanización); también se usa para formar aleaciones como el latón, compuestos de zinc entre otros usos.

La cantidad de zinc disuelta en el agua puede aumentar a medida que la acidez del agua aumenta. Los peces pueden incorporar en el cuerpo zinc del agua en la que nadan y de los alimentos que consumen.

La inhalación de zinc puede producir fiebre de vapores de metal. La ingestión de este metal puede afectar la salud produciendo calambres estomacales, náuseas vómitos, anemia, daño del páncreas y disminución del colesterol beneficioso en la sangre (Navarrete *et al.*, 2006)

2.4 Procesos Biológicos para la Recuperación de Metales Pesados

Existen diferentes métodos para eliminar metales tóxicos de efluentes acuáticos, entre ellos destacan: Filtración, electro-deposición, resinas de intercambio iónico, osmosis y micro-precipitación. Desafortunadamente dichos métodos no son efectivos cuando los metales en la solución se encuentran en bajas concentraciones, tornándose muy costosos y de bajo rendimiento (Senol *et al*, 2011).

Por otra parte se encuentran los biosorbentes que cuentan con la ventaja de ser menos costosos, y se encuentran disponibles la mayoría de ellos, de forma abundante en la naturaleza (Chen, 2009).

2.4.1 Bioadsorción

Se define como la capacidad de materiales biológicos de acumular metales pesados de aguas residuales a través de vías fisicoquímicas o metabólicas. (Volesky, 1990). Existe una gran variedad de bioadsorbentes, materiales tan diversos como el corcho, hueso de oliva, quitosan el raspo de uva, así como también los microorganismos (Cañizales, 2000) como algas, bacterias, hongos y levaduras, que han demostrado ser biosorbentes potenciales de metales (Volesky, 1990).

Entre las ventajas de utilizar la bioadsorción se encuentran: la recuperación selectiva de metales valiosos en bajas concentraciones y la posibilidad de definir si las concentraciones de metales que están presentes en los efluentes cumplen con las regulaciones que marca la norma para la calidad del agua. La bioadsorción es una tecnología económica que requiere poco capital y bajos costos de operación, los metales adsorbidos se pueden recuperar de forma eficiente y minimizan el desecho (Suarez *et al*. 2002).

costos de operación, los metales adsorbidos se pueden recuperar de forma eficiente y minimizan el desecho (Suarez *et al.* 2002).

El procesos de bioadsorción involucra una parte sólida (biosorbente en este caso el material biológico) y una fase líquida (disolvente) la que contiene la especie para ser absorbida (sorbato, iones de metal)(Reyes *et al.* 2006).

Hay dos mecanismos diferentes para la captación de metales pesados por parte de biomasa:

- Bioacumulación: que se basa en la absorción de los metales mediante mecanismos de acumulación al interior de las células de biomasa vivas. (Figura 1)
- Bioadsorción: que se basa en la adsorción de los iones en la superficie de la célula. El fenómeno puede ocurrir por intercambio iónico, precipitación, o atracción electrostática (Figura 1) (Reyes *et al.* 2006).

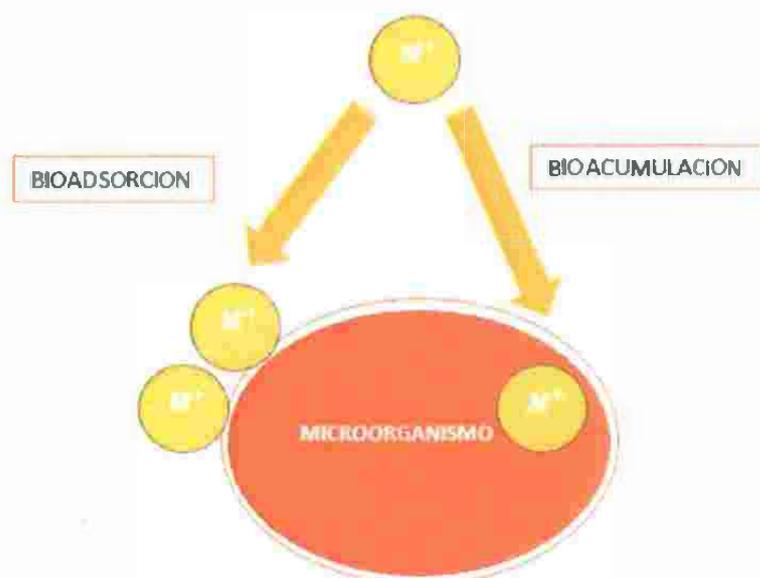


Figura 1. Bioacumulación y bioadsorción de metales pesados

2.5 Técnicas de Bioadsorción

Un proceso de bioadsorción se puede realizar a través de distintas maneras, generalmente tres tipos: discontinuos (lotes), continuos de flujo estacionario, y semi continuos de flujo no estacionario. Los reactores discontinuos son sencillos de operar y se usan cuando se trata de pequeñas cantidades de sustancias. Los continuos son útiles para fines industriales cuando se trata de grandes cantidades de sustancia y permiten un buen control de la calidad del producto. Los reactores semi continuos son sistemas más flexibles pero de más difícil análisis y operación que los anteriores; en ellos la velocidad de reacción puede controlarse con la dosis de los reactantes (Borzacconi, 2003).

2.5.1 Microorganismos como Biosorbentes

Los procesos por los cuales los organismos interactúan con los metales tóxicos son muy diversos, por ejemplo la biosorción, atrapamientos de partículas, precipitación, intercambio iónico y unión covalente, difusión y transporte, la precipitación extracelular y la captación a través de biopolímeros purificados y de otras moléculas especializadas derivadas de células microbianas (Gadd *et al.*, 1993).

2.5.1.1 Levaduras

Las levaduras se definen como hongos microscópicos unicelulares. Este grupo de microorganismos comprende alrededor de 60 géneros y unas 500 especies. Las levaduras son conocidos agentes de fermentación y se encuentran naturalmente en la superficie de plantas, en el suelo, y en el invierno en la capa superficial de la tierra. Tienen necesidades de nutrición y necesidades precisas del medio en el que viven o se desarrollan. Son muy sensibles a la temperatura, necesitan una alimentación apropiada rica en azúcares, elementos minerales y

sustancias nitrogenadas, tienen ciclos reproductivos cortos, pero así como se multiplican pueden morir por exceso o falta de las variables mencionadas (Reed *et al.*, 1982).

Sus características morfológicas se determinan mediante su observación microscópica. La forma de la levadura puede ser desde esférica a ovoide, en forma de limón, piriforme, cilíndrica, triangular, e incluso alargada. También se diferencian en cuanto a su tamaño, miden de 1-10 micras de ancho por 2-3 micras de longitud. Son partes observables de su estructura, la pared celular, el citoplasma, las vacuolas, los glóbulos de grasa, y los gránulos, los cuales pueden ser meta cromáticos de albumina o de almidón. La estructura celular es de tipo eucariótico, pero sin sistema fotosintético. La pared rígida, se caracteriza por la presencia, en su composición por dos polisacáridos: manano y glucano. El núcleo está rodeado de una membrana que persiste durante la división celular. El número de cromosomas es variable de unas a otras (Reed *et al.*, 1982).

La mayoría de las levaduras se reproducen por gemación multicelular o por gemación polar, que es mecanismo por el cual una porción del protoplasma sobresale de la pared de la célula y forma una protuberancia, la cual aumenta de tamaño y se desprende como una nueva célula de levadura (Frazier y Weathoff, *et al.*, 1998).

Las distintas especies de levaduras pueden ser muy diferentes en cuanto a su fisiología, la mayoría necesitan más humedad para crecer y desarrollarse. El intervalo de temperatura de crecimiento de las levaduras es en general parecido a los hongos, con su temperatura óptima en un intervalo de 25 a 30 °C y una máxima entorno a los 35 a 47 °C. Una reacción ácida del medio próxima a un pH de 4 a 4.5 estimula el crecimiento de la mayoría de las levaduras, mientras que en medios básicos, no crecen bien a no ser que se hayan adaptado a los mismos, crecen mejor en aerobiosis, aunque las especies de tipo fermentativo son capaces de crecer, aunque lentamente, en anaerobiosis (Muller *et al.*, 1981; Reed *et al.*, 1982; Magaña *et al.*, 2000).

En los cultivos con agar, es difícil diferenciar las colonias de levaduras de las colonias bacterianas, por lo que la observación microscópica es la única forma segura que existe para poderlas diferenciar. La mayoría de las colonias jóvenes de las levaduras son húmedas y algo mucosas, y es posible que tengan aspecto harinoso. La mayoría de las colonias son blanquecinas, algunas tienen color crema o rosado. Algunas colonias cambian un poco de aspecto cuando envejecen, otras se secan y se vuelven rugosas. Las levaduras son oxidativas y fermentativas. En la superficie de un líquido las levaduras oxidativas pueden crecer en forma de velo, de película o de espuma y por ello se denominan levaduras formadoras de película. Las levaduras fermentativas suelen crecer en toda la masa del líquido y producen dióxido de carbono (Frazier y Weathoff, 1998; Jay *et al.*, 1998; Linares y Solís *et al.*, 2001).

III. METODOLOGIA

En la Figura 2 se muestra el diagrama esquemático de la metodología llevada a cabo para este estudio.

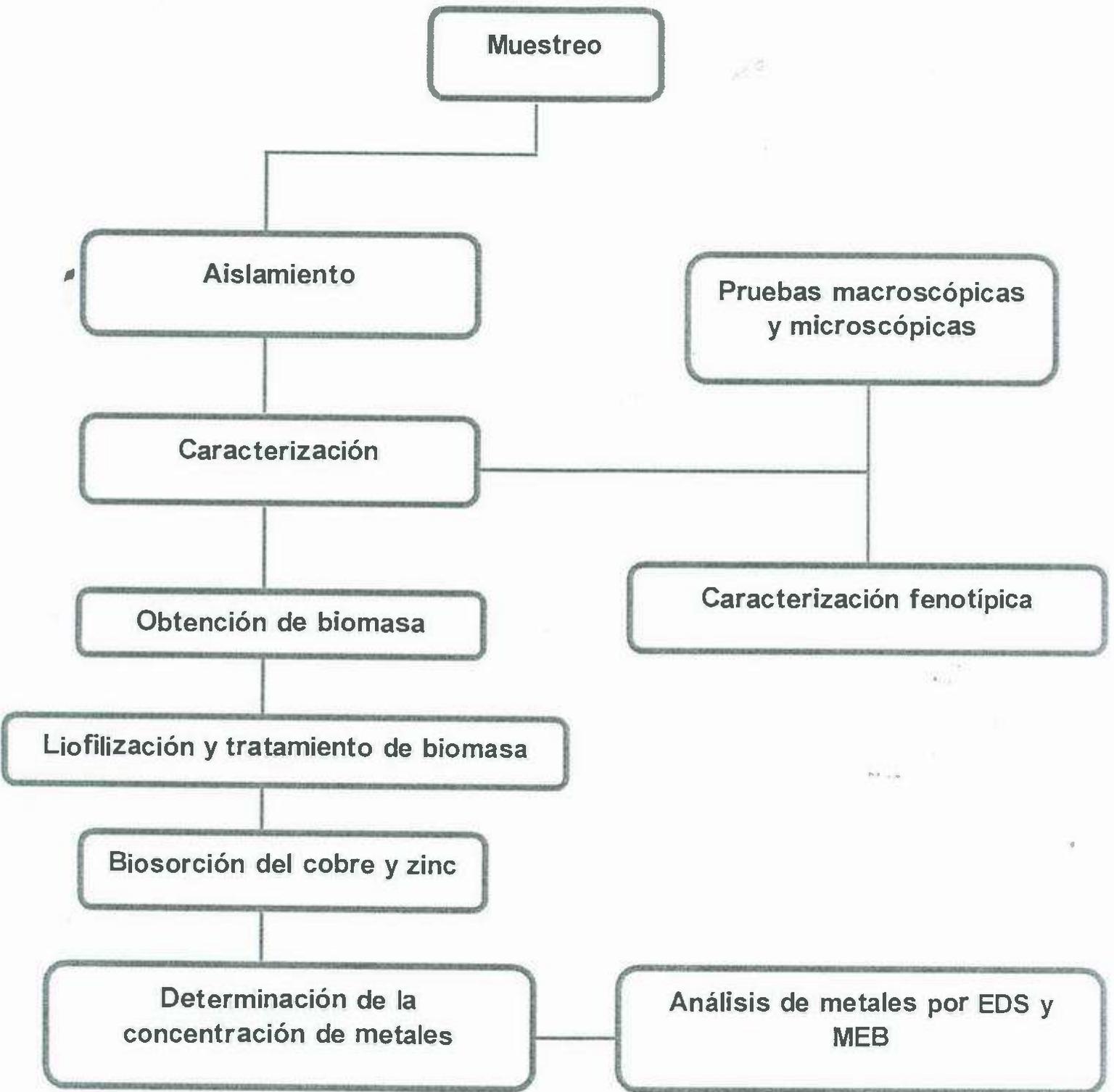


Figura 2. Diagrama de flujo de la metodología realizada.

3.1 Muestreo de Aguas Contaminadas

Se tomaron muestras de tres diferentes sitios de aguas procedentes de los desechos de la mina Buena Vista del Cobre en Cananea, Sonora, del río San Pedro.

Estación 1, latitud $30^{\circ}59'36''\text{N}$ y Longitud $110^{\circ}18'20''\text{O}$. (Figura 3) (Mezcla, donde se juntaban dos diferentes tipos de agua que provenían la primera de las aguas negras de la ciudad que lucían turbias y contaminadas, con olor desagradable y color oscuro y la segunda, agua contaminada con aspecto anaranjado y turbio que se desecha de la mina y ambas se descargan en el lugar).

Estación 2, latitud $30^{\circ}59'35''\text{N}$ y longitud $110^{\circ}18'24''\text{O}$. (Figura 4) (Represito donde deposita sus desechos de agua la mina que a simple vista se notaba muy contaminado y se apreciaba un color espeso y anaranjado).

Estación 3, latitud $30^{\circ}59'1''\text{N}$ y longitud $110^{\circ}19'39''\text{O}$. (Figura 5) (canal de agua que conducía a la estación 2, aguas de igual modo desechadas de la mina, pero más cercanas a ella, la contaminación se apreciaba a simple vista, de varios colores).



Figura 3. Estación 1 de muestreo, aguas residuales de la ciudad.



Figura 4. Estación 2 de muestreo, desechos de agua de la mina



Figura 5. Estación 3 de muestreo, desecho de agua la de mina

3.2 Aislamiento

Para determinar qué tipo de microorganismos existen o crecen en los diferentes lugares del muestreo se realizó el análisis a las muestras de agua las cuales se sembraron en diferentes medios:

Primero enriquecimiento en medios líquidos, caldo nutritivo y en TPY (extracto de levadura (10 g/L), peptona (20 g/L) y dextrosa (20 g/L)).

Se dejaron en la incubadora con agitación durante 24 horas, a 80 rpm y 34 °C.

Se resembró a partir de ellos a medios sólidos selectivos y medios generales (agar nutritivo, agar eosina azul de metileno y YPD (Dextrosa 20 g/L, Peptona 20 g/L, Agar Bacteriológico (20 g/L) y extracto de levadura (10 g/L)) por la técnica de placa vaciada.

Para el caso de los microorganismos del E2, se realizó un enriquecimiento en caldo nutritivo y TPY a diferentes concentraciones: 40 mL de caldo nutritivo y 10 mL de aguas de la E2 y 40 mL de TPY y 10 mL de aguas del E2.

Se dejaron en la incubadora 24 horas y a 80 rpm y 34 °C. Se resembraron en medios agar Nutritivo pH 4.5 y medio YPD pH 4.5.

Posteriormente se llevó a cabo una selección de las distintas colonias que presentaron crecimiento en los distintos medios de cultivo de acuerdo a sus características morfológicas, y se realizó el aislamiento de las colonias por el método de siembra por estrías, repitiendo la operación hasta obtener colonias puras.

3.3 Caracterización

La caracterización de las colonias se determinó por dos métodos: caracterización macroscópica y microscópica de las colonias, además de caracterización fenotípica por fermentación de carbohidratos (reacción de Molish).

3.3.1 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 se llevó a cabo por medio de Tinción de Gram (Anexo A) y observación al microscopio.

3.3.2.1 Caracterización fenotípica por fermentación de carbohidratos “reacción de Molish”

En los tubos se agregó 1 mL de caldo peptona inoculada con cada levadura aislada.

Para preparar la peptona: se disuelven 4 g de medio peptona en 400 mL de agua destilada y se esteriliza en autoclave.

Para preparar los carbohidratos: Se utilizaron los siguientes carbohidratos: Sacarosa, dextrosa, lactosa, xilosa, maltosa, rafinosa, fructosa y almidón al 20%. Se pesaron 1 g de cada uno y se disolvieron en 5 mL de agua destilada (para la glucosa, pesar el doble). Los carbohidratos se esterilizan por filtración con filtros de 0.22 µm de tamaño de poro. Se agregan al tubo estéril 0.5 mL de carbohidrato estéril y 3 gotas de anaftol y mezclar, por las paredes del tubo agregar ácido sulfúrico concentrado de 1-2 mL, observar la interface, la reacción es positiva si se forma un anillo de color purpura.

3.4 Obtención y Crecimiento de Biomasa

1.- Se realizó una resiembra o enriquecimiento creando un consorcio de las colonias desarrolladas en el medio solido característico YPD a caldo TPY. Se prepararon 30 mL de medio para cada matraz de 150 mL utilizados. Se realizó la inoculación, se incubo por 24 horas a 34° C (Figura 6).

2.- Se esterilizaron 2 matraces de 2 litros cada uno con un litro de caldo nutritivo TPY, así como las mangueras y conexiones para suministrar aire y para muestrear.

3.- Se realizó la inoculación de los matraces de 2 litros con el crecimiento de los matraces del paso 1, en la campana de flujo laminar ambiente estéril y se realizaron las conexiones necesarias. Se incubo con agitación a 30 °C y 100 rpm.

4. Para determinar el crecimiento de biomasa en base al tiempo se muestrearon 5 mL cada hora por 11 horas y se leyeron por espectrofotometría (Thermo Scientific Genesys 10S UV-Vis) a 600 nm, hasta que llego a su máximo desarrollo.

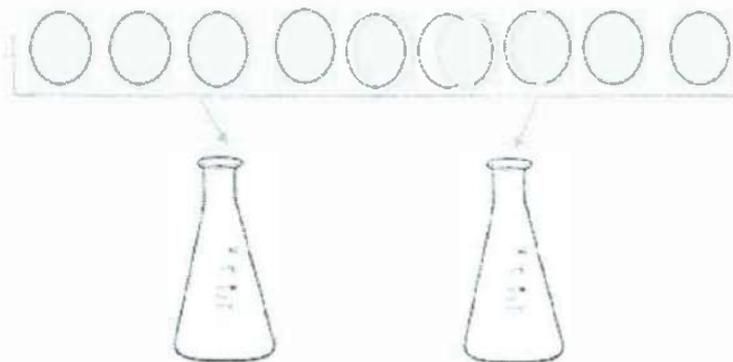


Figura 6. Siembra de consorcio de levaduras.

3.5 Liofilización y Tratamiento de Biomasa

Para la liofilización se centrifugó todo el medio con crecimiento de las levaduras, a 6500 RPM para obtener pellets microbianos, esos pellets se lavaron varias veces con agua deionizada para eliminar todos los restos de caldo nutritivo, hasta que el sobrenadante no mostró turbidez y sea transparente. Se suspendió el pellet en agua de deionizada y se procedió a congelar la muestra, ya congelada se lleva al liofilizador (Modelo Labconco Freezone 4.5 (vacío 0.5 mBar y -46°C en el colector) (Figura 7) donde permaneció 49 horas.



Figura 7. Liofilizador utilizado para secar biomasa.

Para el tratamiento de biomasa

- 1.- La biomasa en polvo se suspendió en 5 mL de hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 M y se agitó por 2 horas a 260 rpm.
- 2.- Se centrifugó por 20 minutos y se decantó el sobrenadante (lavado 0).
- 3.- Se lavó con agua de deionizada el pellet microbiano formado, se agitó y se centrifugó por 17 minutos.

3.6 Estudios de Bioadsorción del Cobre y Zinc

Para realizar la cinética de bioadsorción el procedimiento fue el siguiente:

1. Se determinaron los mililitros que se utilizaron de cada metal para las soluciones (100 mL), para el cobre fueron 2 mL (20 ppm) y para el zinc 5 mL (50 ppm).
2. Se agregaron los mililitros de cobre y zinc y se aforó el matraz con agua deionizada (Figura 8).
3. Se ajustó el pH (3-4) con HCl y/o NaOH, se vació la solución al matraz Erlenmeyer. Se hizo por duplicado para cada metal.
4. Se toma una muestra de 5 mL de cada matraz (muestra $t=0$, tiempo cero sin biomasa).
5. A los matraces Erlenmeyer con las soluciones, se les agrego 0.1 g de biomasa seca pre-tratada y sin tratar, se colocaron en la incubadora con agitación (Modelo C76 Water Bath Shaker), 100 rpm, a 30°C y se tomaron muestras durante 180 minutos, después se tomó una muestra a las 24 horas y una más a las 48 horas, para analizar la concentración por espectrofotometro de absorción atómica.

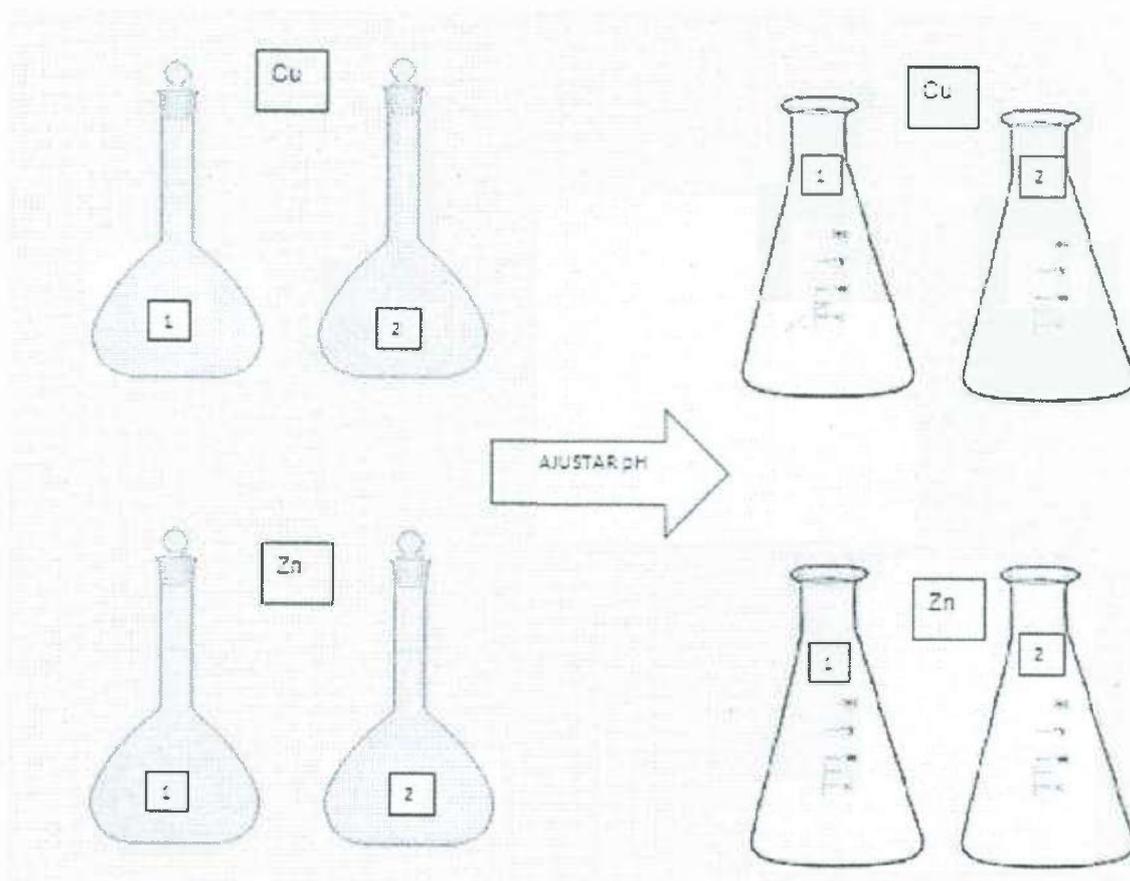


Figura 8. Preparación de muestras en matraces para la bioadsorción de Cu y Zn.

3.7 Determinación de la Concentración de Metales

Para poder realizar los análisis de concentración de metales en las muestras tomadas durante el proceso de bioadsorción fue necesario centrifugarlas y hacer diluciones. La preparación de estas diluciones se llevó a cabo de la siguiente manera: Para las diluciones de las muestras de Cu y Zn se tomó un matraz volumétrico de 50 mL para cada una de las muestras, se les colocó agua deionizada a cada matraz y posteriormente 1 mL de HCl concentrado; para las diluciones de las muestras de cobre se tomaron 2 mL de cada muestra y se colocó en su matraz correspondiente, para las diluciones de las muestras de zinc se tomó solamente 1 mL de cada una de las muestras y se colocaron de la misma

manera en cada matraz correspondiente. Una vez que se colocó en cada matraz la cantidad de muestra necesaria se aforo con agua de deionizada y se agitó manualmente.

El análisis de las muestras se realizó utilizando el equipo de absorción atómica Perkin Elmer modelo Analyst 400, y de esta manera se obtuvieron los valores de concentración de Cu y Zn en mg/L para cada muestra que fue tomada a cada uno de los tiempos correspondientes.

3.8. Caracterización de la Biomasa Seca sin Tratar del Consorcio de Levaduras.

La biomasa de levaduras sin tratar fue analizada antes y al término de los experimentos de bioadsorción de cobre y zinc. La biomasa fue recuperada de las soluciones en microtubos de eppendorf, se centrifugó en una centrifuga (Eppendorf modelo 5424) a 6500 rpm por 3 min, después la biomasa fue secada en un horno a una temperatura de 70°C, para eliminar el exceso de agua de la biomasa.

3.8.1. Análisis por Microscopia Electrónica de Barrido (MEB) y Espectroscopia por Dispersión de Energía de Rayos X (EDS).

Las observaciones de microscopia electrónica se realizaron tomando una muestra pequeña de la biomasa seca sin tratar y se recubrieron con oro antes de su observación en el Microscopio Electrónico de Barrido (PEMTRON SS 300 + EDS Broker) y Hitachi TM3030 Plus Tabletop microscope + EDS Broker.

IV. RESULTADOS

4.1. Análisis del Muestreo y Aislamiento

Las características de las aguas del muestreo de las Estaciones E1, E2 y E3 son como sigue:

La Estación 1, con una temperatura de 25°C, pH de 7.2 y una concentración de 1.57 mg/L de cobre y 1.72 mg/L de Zn.

La Estación 2, con una temperatura de 21°C, pH de 4.2 y una concentración de 7.5 mg/L de cobre y 48.5 mg/L de Zn.

Estación 3, con una temperatura de 21°C, pH de 3.5 y una concentración de 17.3 mg/L de cobre y 43.0 mg/L de Zn.

La NOM-001-ECOL-1996 establece una concentración máxima de descarga en aguas nacionales de 6 mg/L para el cobre y 20 mg/L para el zinc, por lo que las estaciones 2 y 3 rebasan los límites máximos permisibles.

Los microorganismos obtenidos fueron 18 los cuales por ser desconocidos se nombraron con letras y se enlistan por estación en la Tabla 4.1.

4.2. Caracterización Macroscópica y Microscópica

Los resultados de la caracterización macroscópica, que fue un análisis visual de las colonias obtenidas, se enlistan en la Tabla 4.2. Después para la caracterización microscópica las células se tiñeron mediante el método de tinción de Gram, y se observaron al microscopio obteniendo los resultados que se muestran en la Tabla 4.3 solo las levaduras, así como también se pueden observar en la Figura 9 (donde se logran apreciar las cepas F, O, I y J), Figura 10 (donde se logran apreciar las cepas K1, L, y M) y Figura 11 (donde se logran

R. 160286

apreciar las cepas Ñ y H). En ellas se observan las formas obtenidas de los microorganismos tomadas en el microscopio con el objetivo de 40X, todas son Gram positivas.

Tabla 4.1 Cepas encontradas por estación.

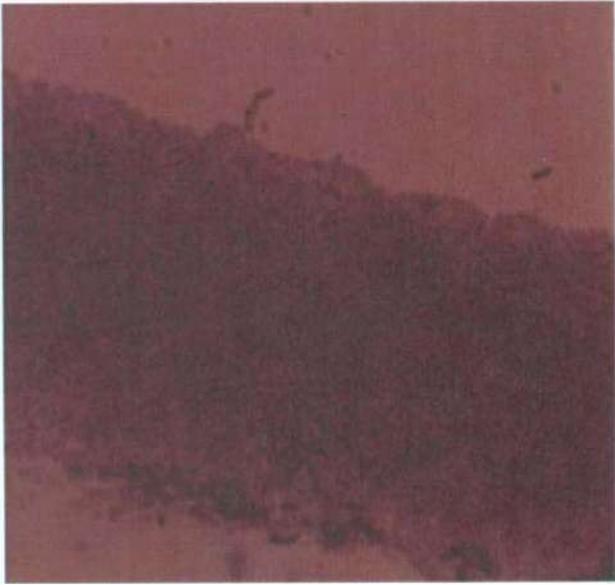
Lugar	Medio	Cepa
Estación 1	Agar Nutritivo	A
		B
		C1
		C2
		D
		E
	YPD	F
		I
		Ñ
		O
	EMB	G
P		
Q		
Estación 2	YPD (PH5)	L
		M
Estación 3	YPD	H
		J
		K1

Tabla 4.2. Características visuales de las cepas.

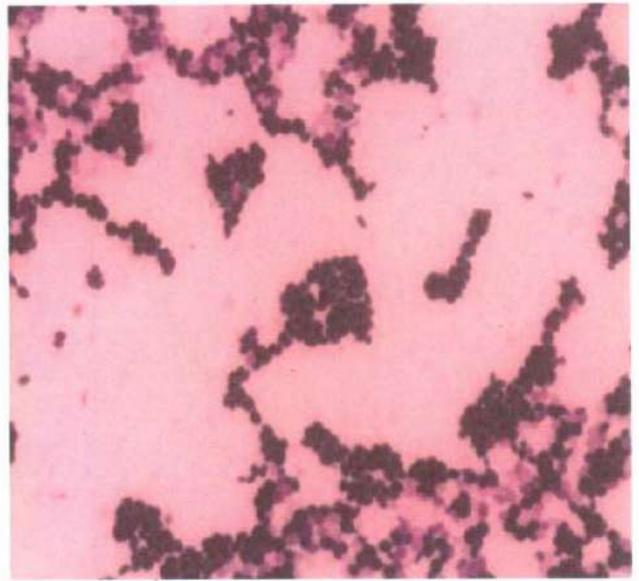
Cepa	Características Visuales.
A	Color blanco aperlado, con tamaño mediano y elevado
B	Color beige rugoso tamaño grande
C1	Color blanco, elevación tipo montaña con hundimiento en el centro
C2	Color amarillo, capa delgada un poco transparente
D	Color blanco brillante, poco grueso rugoso
E	Color beige-amarillo, capa gruesa, brillante, rugoso y cristalino
F	Color blanco-transparente, pequeño y brillante
I	Color blanco, pequeño, delgado y brillante
Ñ	Color blanco, de tamaño medio y capa delgada
O	Color blanco, pequeño, brillante y delgado
G	Color morado, delgado, muy brillante, lisito y de tamaño mediano
P	Morado con un brillo de reflejo verde tornasol
Q	Morado claro brillante, reflejo verde tornasol
L	Color beige, grueso, brillante, tamaño grande
M	Color beige, pequeño, brillante, grueso
H	Color blanco, no muy grueso, grande parecido a espuma
J	Color blanco, brillante, no muy grueso y lisito
K1	Blanco brillante grueso, elevación tipo montaña con hundimiento en el centro, mediano

Tabla 4.3. Resultados obtenidos en la tinción Gram para levaduras.

Cepa	resultados Gram	forma
F	+	Esféricas
I	+	Esféricas
Ñ	+	Levaduriformes
O	+	Esféricas
L	+	Óvalos alargados
M	+	Esféricas
H	+	Levaduriformes
J	+	Óvalos
K1	+	Óvalos alargados



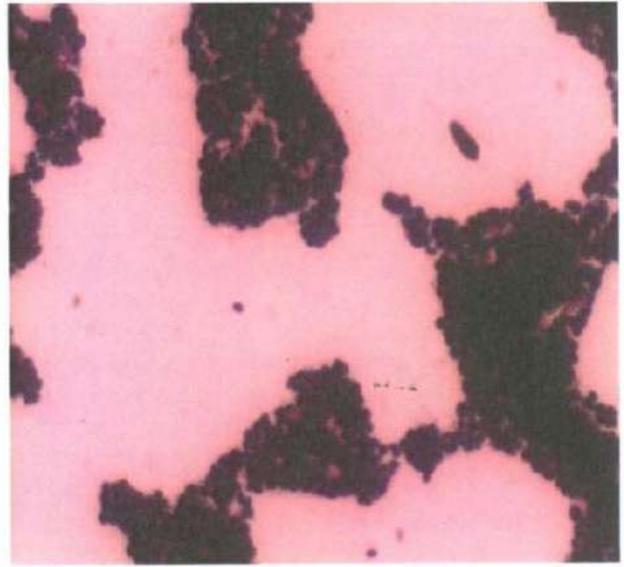
Ceba F



Ceba O

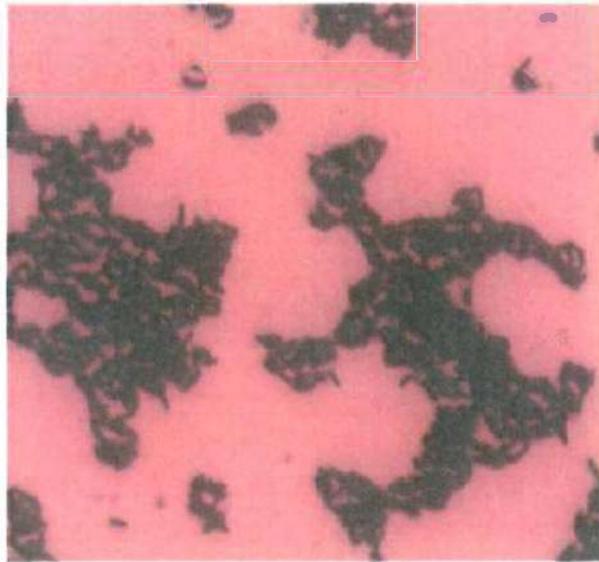


Ceba I

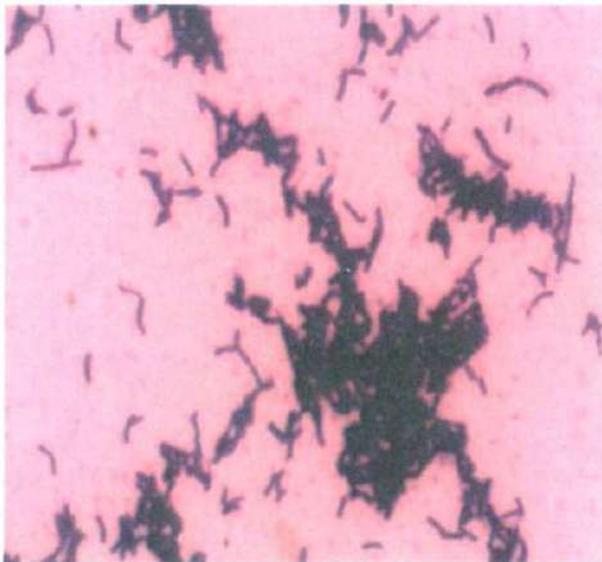


Ceba J

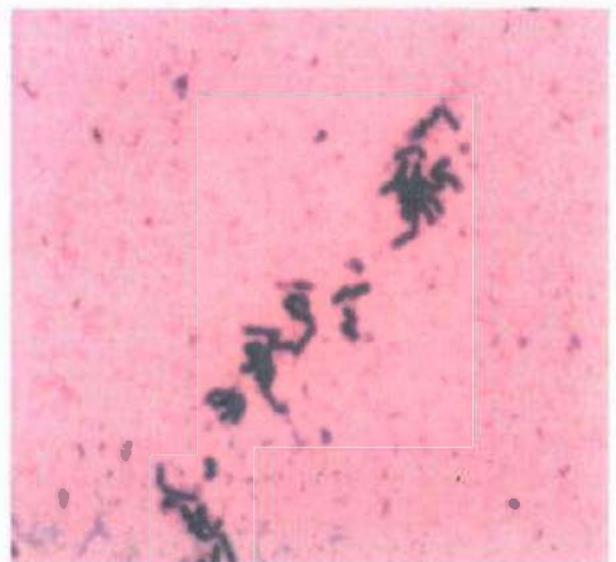
Figura 9. Tinción de levaduras aisladas del muestreo del río San Pedro (1)



Ceba K1

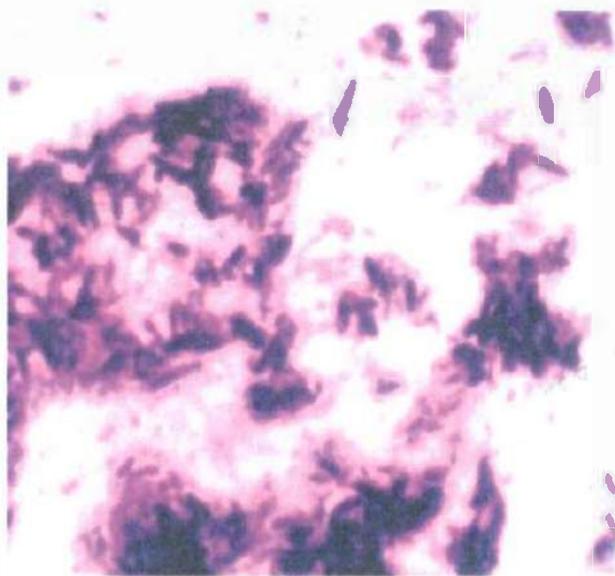


Ceba L

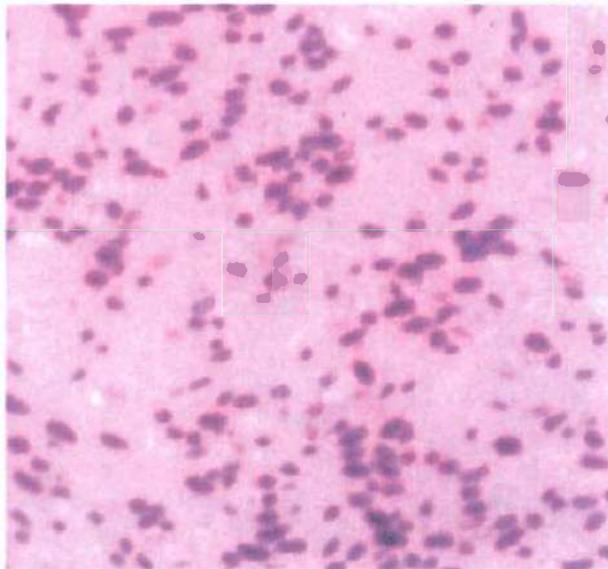


CebaM

Figura 10. Tinción de levaduras aisladas del muestreo del río San Pedro (2)



Ceba Ñ



Ceba H

Figura 11. Tinción de levaduras aisladas del muestreo del rio San Pedro (3)

Para la identificación de levaduras se realizó una caracterización fenotípica por fermentación de carbohidratos "reacción de Molish" con las cepas que únicamente se desarrollaron en el medio característico YPD. Los resultados se compararon con las tablas para identificación de levaduras para determinar la especie de cada una. Los resultados de la fermentación de carbohidratos se enlistan en la Tabla 4.4 donde el signo + significa que la cepa fermenta al carbohidrato y el signo – lo contrario.

Tabla 4.4. Resultados a fermentación de carbohidratos.

Carbohidrato	Cepa								
	L	F	J	H	I	K1	M	O	Ñ
Fructosa	-	+	-	-	-	+	+	-	+
Almidón	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Maltosa	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	-	+	+	+	+	-	+	+
Lactosa	+	-	+	-	-	+	+	+	-
Xilosa	-	-	+	+	-	-	-	+	+
Rafinosa	-	-	-	+	+	-	-	+	-

Las cepas por fermentación de carbohidratos fueron comparadas en tablas reportadas por Madigan *et al.*, 2004, e identificadas como:

Cepa L- *Trichosporon asahii*.

Cepa F- *Candida glabrata*.

Cepa J- *Candida pseudotropicalis*.

Cepa H- *Rhodotorula Rubra*.

Cepa I- *Saccharomyces cerevisiae*.

Cepa K1- *Trichosporon asahii*.

Cepa M- *Candida glabrata*.

Cepa O- *Cryptococcus terreus*.

Cepa Ñ- *Candida parapsilosis*.

4.3. Obtención de Biomasa

La obtención de biomasa fue con el consorcio de las levaduras, como se muestra en la Figura 12, donde se observa el desarrollo de la biomasa. El crecimiento de la biomasa fue desde la primera hora, después siguió el crecimiento que se mantuvo constante desde las 6 hasta las 11 horas, fue cuando alcanzó el máximo desarrollo, después del proceso de liofilización se obtuvo una producción de 3.4 g/L.

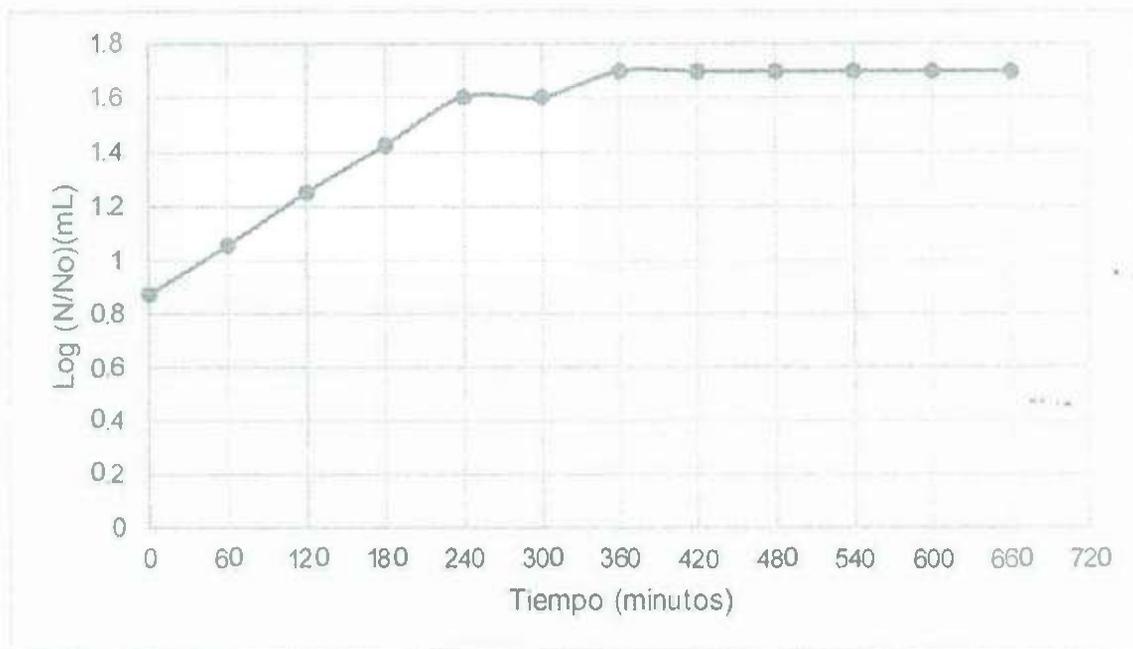


Figura 12. Desarrollo poblacional del consorcio de levaduras.

4.4 Bioadsorción del Cobre y Zinc en Sistema por Lotes

Los resultados para la bioadsorción de cobre (Cu) utilizando un consorcio de levaduras formado con las especies *Trichosporon asahii*, *Candida glabrata*, *Candida pseudotropicalis*, *Rhodotorula Rubra*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus terreus*, *Candida parapsilosis*, sin tratar, se pueden observar en la Figura 13, donde se logró obtener un 31.7 % de bioadsorción de cobre en los primeros 180 minutos, sin embargo se logró obtener un 41.34% de bioadsorción a los 1440 minutos (24 horas) y un 46.58 % de bioadsorción a los 2880 minutos (48 horas) (Ver Tabla 4.5), demostrando así que la bioadsorción es más rápida en los primeros minutos y el mayor porcentaje de bioadsorción se obtiene a los 48 horas.

El proceso de bioadsorción de Cu utilizando biomasa pre-tratada con hidróxido de sodio 0.1 M, se realizó con el propósito de mejorar la capacidad funcional de bioadsorción de la biomasa, la cinética de adsorción se puede observar en la Figura 14, que permite apreciar un resultado de un 32.13% de bioadsorción a los 180 minutos. Pero después también se logró obtener un 36.18% de bioadsorción después de 1440 minutos (24 horas) y un 42.9% de bioadsorción después de 2880 minutos transcurridos (48 horas) (Ver tabla 4.5), demostrando de igual modo que en la biomasa sin tratar la bioadsorción es más rápida en los primeros minutos y el mayor porcentaje de bioadsorción se da a las 48 horas. Shroff *et al.*, 2011, trabajaron con tratamiento ácido de biomasa seca, y reportan resultados de mayor a menor concentración en la bioadsorción de metales. En el caso del cobre, hay estudios que reportan que la adsorción de cobre con biomasa de levaduras tratada con NaOH y etanol, mejora las propiedades de bioadsorción (Zhang *et al.*, 2010).

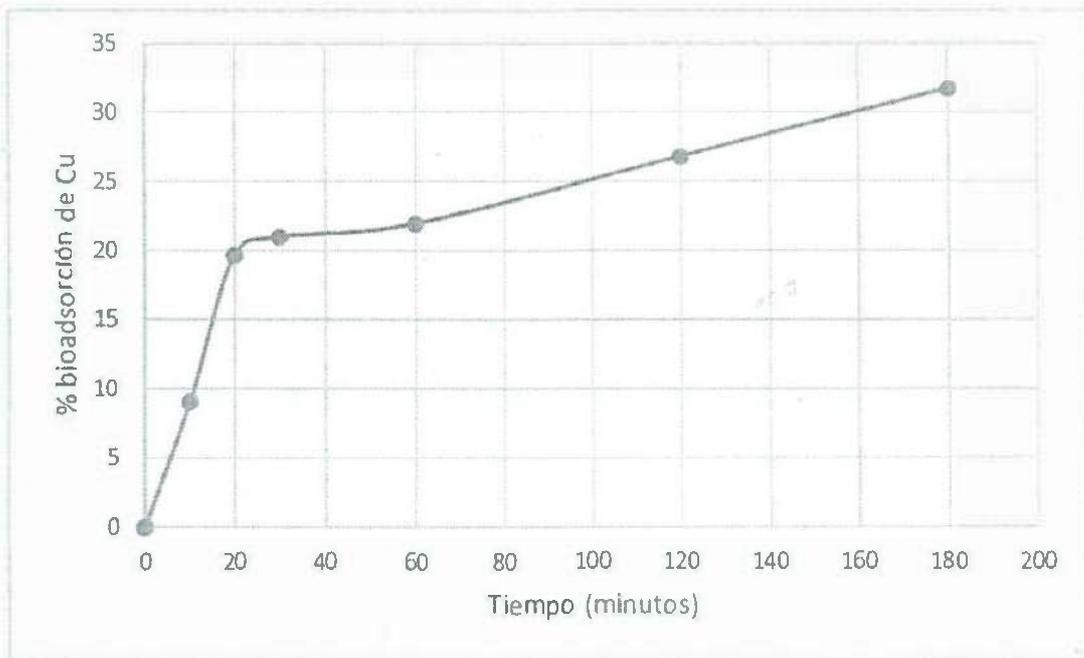


Figura 13. Porcentaje de bioadsorción para el cobre con biomasa de levaduras seca sin tratar.

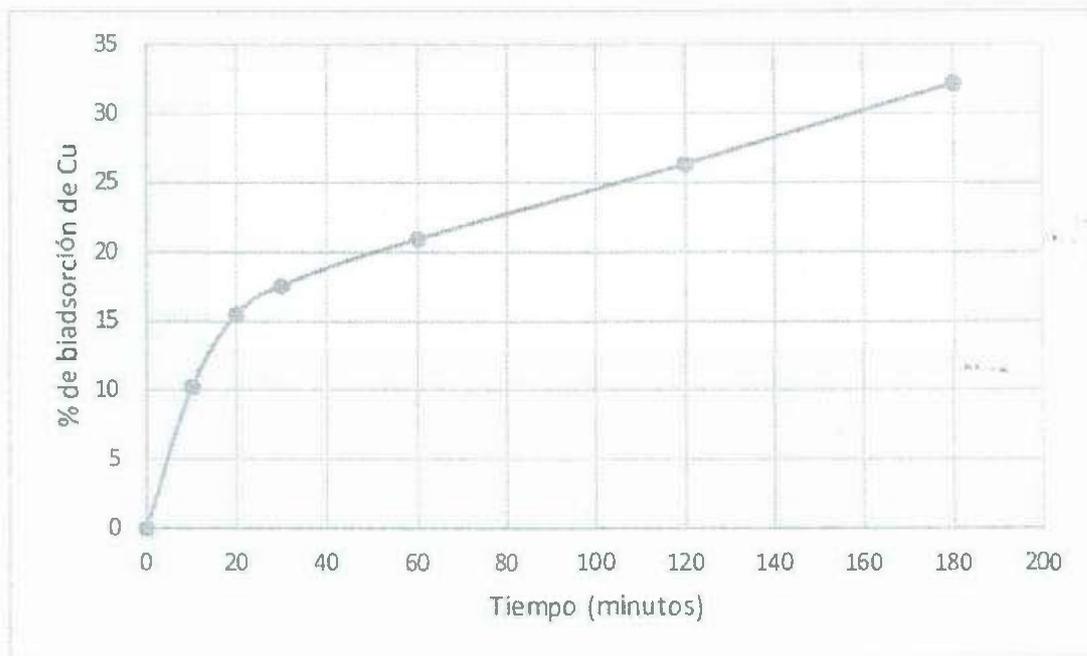


Figura 14. Porcentaje de bioadsorción para el cobre con biomasa de levaduras seca pre-tratada.

Con la biomasa seca formada del consorcio de levaduras se evaluó la bioadsorción de zinc (Figura 15), donde se logró obtener un 30.33% de bioadsorción en los primeros 180 minutos, un 35.3% de bioadsorción a los 1440 minutos (24 horas) y un 38.86% de bioadsorción a los 2880 minutos (48 horas) (Ver tabla 4.5). Cuando se utilizó la biomasa de levaduras seca pre-tratada (Figura 16) se logró obtener un 30.66% de bioadsorción en los primeros 180 minutos, un 34.68% de bioadsorción a los 1440 minutos (24 horas) y un 40.28% de bioadsorción a los 2880 minutos (48 horas) transcurridos (Ver Tabla 4.5), demostrándose de igual manera, en las dos situaciones que la bioadsorción es más rápida en los primeros 180 minutos y tiene un mayor porcentaje de bioadsorción en los 2880 minutos (48 horas). En la Tabla 4.5 se muestran los resultados de bioadsorción de cobre y zinc con biomasa seca pre-tratada con NaOH y sin tratar a los 2880 minutos (48 horas).

Esta biomasa presenta una preferencia de adsorción mayor del cobre que para el zinc tanto con biomasa pre-tratada y sin tratar. 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 (Platt, 2011).

Tabla 4.5 Resultados de bioadsorción de cobre y zinc con biomasa seca pre-tratada con NaOH y sin tratar a las 48 horas.

	Biomasa seca Pre-tratada (%)	Biomasa seca Sin tratar(%)
Cobre	42.9	46.58
Zinc	40.28	38.86

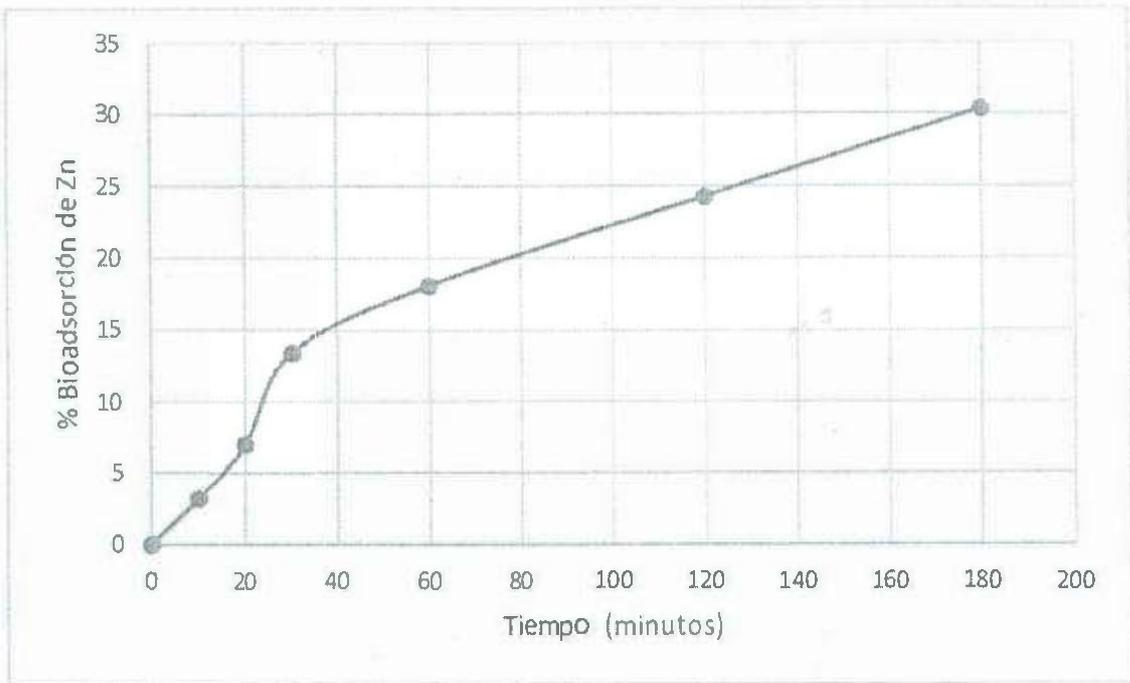


Figura 15. Porcentaje de bioadsorción para el zinc con biomasa de levaduras seca sin tratar.

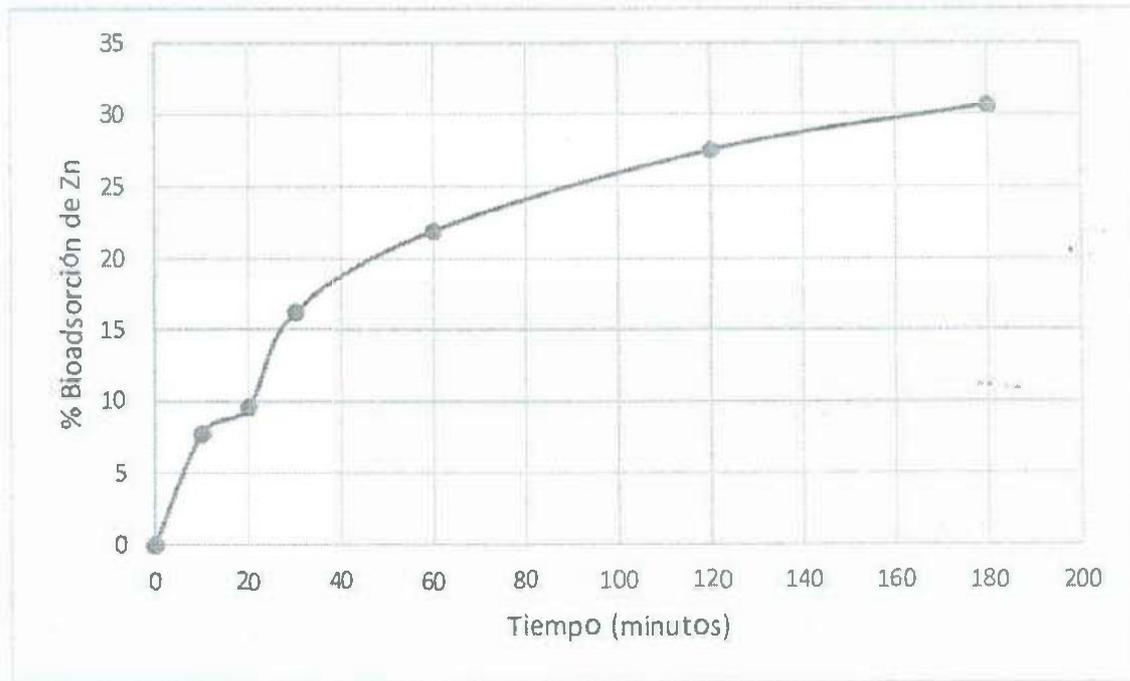


Figura 16. Porcentaje de bioadsorción para el zinc con biomasa de levaduras, seca pre-tratada.

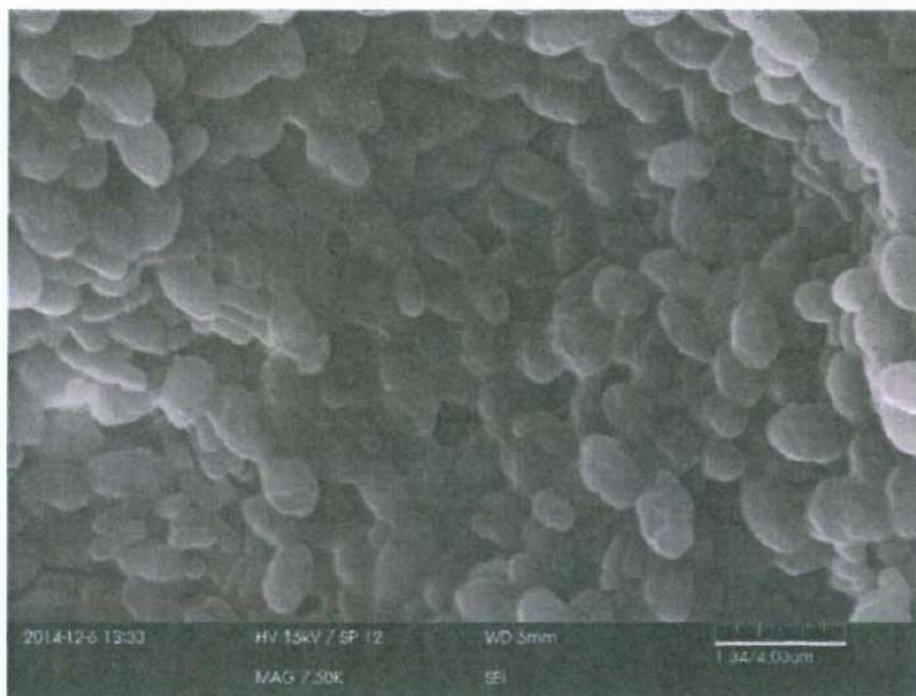
4.5 Caracterización de Biomasa seca del Consorcio de Levaduras sin Tratar.

En la Figuras 17a se muestra la fotomicrografía de la biomasa seca de levaduras sin tratar y sin metales, esta fotomicrografía fue realizada a la biomasa antes de los experimentos de bioadsorción en sistema por lotes y se observa la forma de las levaduras muy definidas. En la Figura 17b se muestra el EDS en donde se puede observar que existen otros elementos pero no cobre y zinc.

En la Figura 18a se muestra la fotomicrografía de la biomasa seca de levaduras sin tratar después del proceso de bioadsorción del cobre y se observa un aglomeramiento y la forma de las levaduras, y en la Figura 18b se muestra el EDS en donde se puede observar que existen otros elementos además del cobre.

En la Figura 19a se muestra la fotomicrografía de la biomasa seca de levaduras sin tratar después de la bioadsorción del zinc y se observa la forma de las levaduras pero no tan definidas como cuando no tiene el metal y en la Figura 20b se observa el EDS, donde se muestran que existen otros elementos además del zinc.

a)



b)

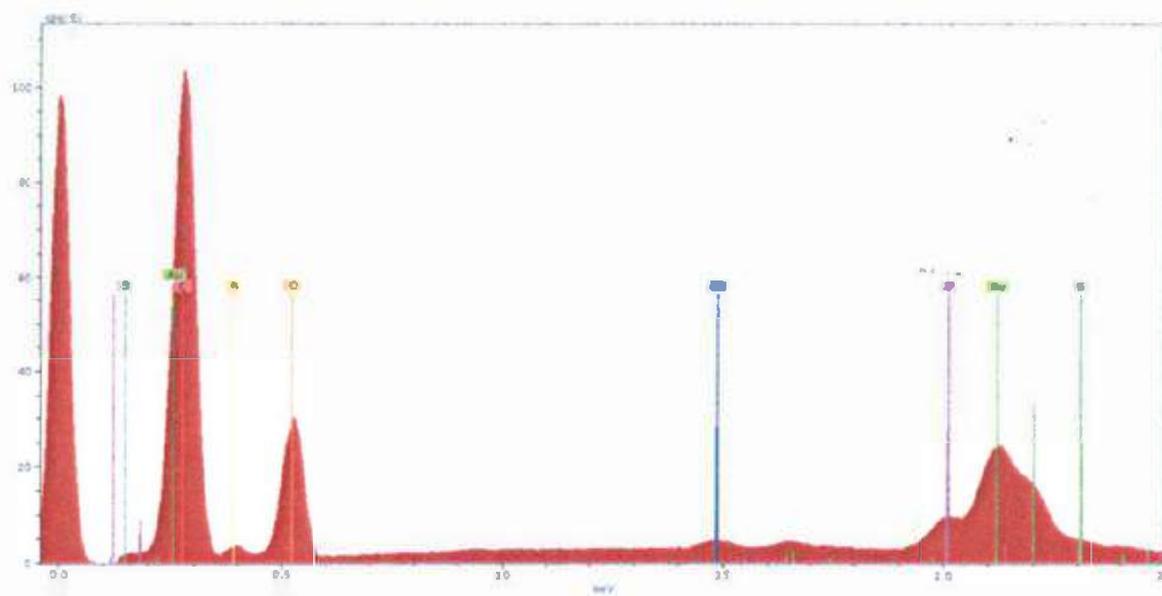
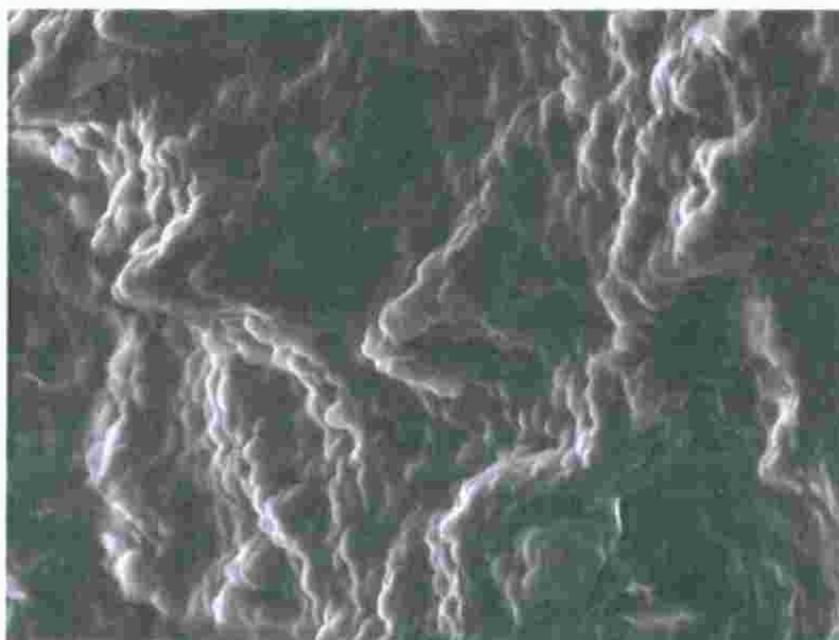


Figura 17. a) Foto micrografía y b) EDS representativas del sistema biomasa-sin metal del proceso de bioadsorción de biomasa seca de levaduras sin tratar.

a)



2015/03/31 HMU D8.8 x3.0k 30 μm

b)

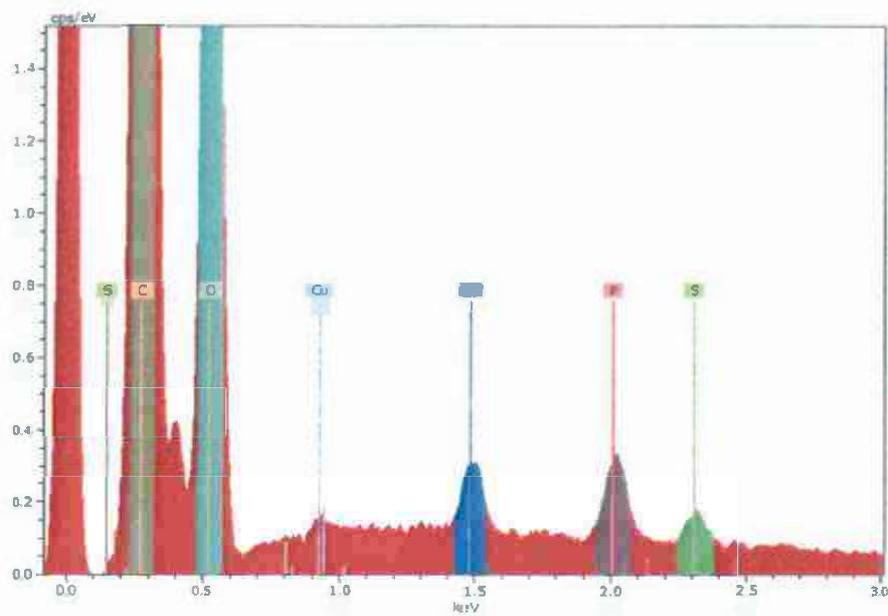


Figura 18. a) Fotomicrografía y b) EDS representativas del sistema biomasa-con metal del proceso de bioadsorción de biomasa de levaduras seca sin tratar después de la bioadsorción de cobre.

a)



2015/03/31 HMUD8.4 x3.0k 30 μm

b)

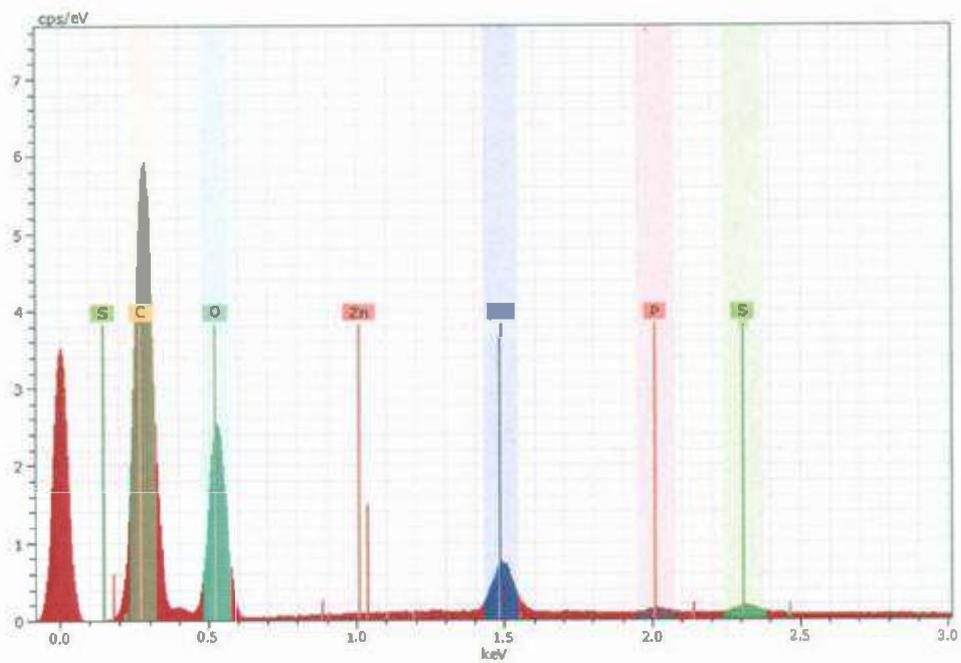


Figura 19. a) Fotomicrografía y b) EDS representativas del sistema biomasa-con metal del proceso de bioadsorción de biomasa de levaduras seca sin tratar después de la bioadsorción de zinc.

V. CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados obtenidos en el presente estudio del proceso de biosorción para la eliminación de cobre y zinc utilizando biomasa seca de levaduras aisladas de efluentes contaminados, se concluye lo siguiente:

Se lograron aislar e identificar las levaduras de los efluentes contaminados del Rio San Pedro.

Se obtuvo un liofilizado del consorcio de levaduras aisladas y con los estudios de MEB se mostró la integridad celular de las levaduras.

No se observó una diferencia significativa en los procesos de bioadsorción utilizando biomasa seca pre-tratada y sin tratar con ambos metales.

La caracterización por MEB y EDS corroboró la presencia de los metales de cobre y zinc en la biomasa de levaduras después del tratamiento.

El proceso de bioadsorción de cobre y zinc con biomasa seca de levaduras sin tratar representa una alternativa de solución para la disminución de la concentración de Cu y Zn.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Arnal Nathalie (2010). Intoxicación por cobre efectos sobre la composición lipídica y el sistema de defensa antioxidante. Tesis doctoral facultad de ciencias médicas UNLP. Pp 1-23.
- Borzacconi, L., & López I. (2003). *Cinética de ingeniería de reacciones*. Notas de curso. Facultad de Ingeniería. Uruguay.
- 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 Rosa Olivia (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. Revista latinoamericana de microbiología. Volumen 42, 131-143.
- Chen can, Jianlong Wang (2009). Biosorbents of heavy metals and their future. Journal of biotechnology advances. Volume 27, pp. 195-226
- Duruibe J.O., Ogwuegbu, M. O. C., Ekwurugwu, J. N. (2007). Contaminación de Metales Pesados y Efectos Biotóxicos Humanos. International Journal of Physical Sciences, Vol. 2 (5), pp. 112-118.
- Erostequi Revilla Carlos Pedro (2009). Contaminación por metales pesados. Revista científica ciencia médica. Volumen 12, 45-46.-
- Flores-Vázquez J. L. y M. Tapia, H. N., Maldonado G. H. (2001). Bioremediación de metales tóxicos en efluentes mineros aplicando biosorción. Revista del instituto de investigación de la facultad de geología, minas, metalurgia y ciencias geográficas. 4:7.
- Frazier, W.C., Weathoff, D.C. (1998). *Microbiología de los alimentos*. Pp. 41-77.
- Gadd, G. M. y C. White (1993). Microbial treatment of metal pollution – a working biotechnolog. Trends Biotechnol. 11:352-359.

- Gale, N. L., y B.G. Wixson (1979). Removal of heavy metals from industrial Effluents by algae. *Dev. Ind. Microbiol.* 20:259-273.
- Gómez Álvarez Agustín (2008). 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. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Mexicali.
- 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.* 5-12.
- Hinue, & Henry, J. G. (1999). *Ingeniería Ambiental.* 195, 196, 431.
- Jaramillo Gómez, Carlos Elías (2011). Caracterización de levaduras aisladas del río San Pedro para la remoción de cobre en sistema por lote. Tesis de Licenciatura. Universidad de Sonora.
- Jaramillo Juárez Fernando, Ana Rosa Rincón Sánchez, Roberto Rico Martínez (2011). *Toxicología ambiental.* 1-70
- James Versalovic, Karen C. Carroll, Guido Funke, James H. Jurgensen, Marie Louise Landry, David W. Wamock (1997). *Manual of Clinical Microbiology.*
- Lasat M.M. (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.
- Linares, M. J., Solís, C.F. (2001). Identificación de levaduras. *Revista Iberoamericana de Micología.* 11:11-18.

- Lucho C.A., Prieto F., Del Razo L.M., Rodríguez R. y Poggi H. (2005). Chemical fractionation of boron and heavy metals in soils irrigated with wastewater in central Mexico. *Agric. Ecosyst. Environ.* 108, 57–71.
- Madigan M.T., Martinko J. M., Parker J. (2004). *Brock. Biología de los microorganismos*. Décima edición. Pearson Prentice Hall. España.137-166.
- Magaña, Y. M. B. (2000). Caracterización de levaduras presentes en el jugo de agave en el proceso de elaboración del tequila. Tesis Licenciatura. Universidad de Sonora.
- 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. Pp. 17,18.
- Mejia Sandoval, Gregory (2006). Aproximacion teorica a la biosorcion de metals pesados pormedio de microorganismos. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, vol. 1, Pp. 77-99
- McFaddin Jean F. (2003). *Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica*. Pp.172.
- Mijares M., & Pía 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 Amaya O. (2009). Biosorción de cobre con bacterias aerobias inmovilizadas en zeolita. Tesis doctoral, Universidad Autónoma de Baja California.
- Monge, O., Valenzuela, J., Acedo, E., Certucha, M., & Armendáriz, J. (2008). Biosorción de cobre en sistema por lote y continuo con bacterias aerobias inmovilizadas en zeolita natural (clinoptilolita). *Rev. Int. Contam. Ambient* vol.24 no.3.
- Muller, G. (1981). *Microbiología de los alimentos vegetales*. 28-235

- Murray, K. (1996). Statistical comparisons of heavy metal concentrations in River sediments. *Environmental Geology*, 27, 54-58.
- Navarrete López Victoria Irma, Urquiza Moreno María Gpe, Lucario Emilia Soledad, Briones Méndez Roberto (2006). Análisis de metales en el medio ambiente. 156.
- Platt Sánchez, Luis Carlos (2011). Estudio de biosorción de metales pesados de un efluente de origen antropogénico utilizando *Escherichia coli*. Tesis de licenciatura. Universidad de Sonora.1-62.
- Reed, G. (1982). *Industrial Microbiology*. Fourth edition. 306-343.
- Reyes E. D., Cerino C. F. y Suarez H. M. A. (2006). Remoción de metales pesados con carbón activado como soporte de biomasa. *Ingenierías*. IX No. 31.59-64.
- Salomons, W. (1995). Environmental impact of metals derived from mining activities: processes, predictions, prevention. *Journal Geochemical Exploration*, 52, 5-23.
- Şenol Sert, Ceren Kütahyalı, Süleyman Inan, Zeynep Talip, Berkan Çetinkaya, Meral Eral (2008). Biosorption of lanthanum and cerium from aqueous solutions by *Platanus orientalis* leaf powder. *Hidrometallurgy*. Volume 90, 1, Pp. 13–18
- Shroff Kshama A, Vaidya Varsha K. (2011). Efecto de los pre-tratamientos en la biadsorción de iones de cromo con biomasa muerta de *Rhizopus arrhizus*. 294-298.
- Suarez P. Reyes R. (2002). LA incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia para el ambiente. 160-164.
- Terán Valdez D. P., Ortega Campa L., Monge Amaya O., Gasca Estefania L.A., Jordan Tena C., Almendariz Tapia F. J., Certucha Barragan M.T. (2014). Caracterización y aislamiento de *Escherichia coli* para el proceso de biosorción de Cu^{+2} y Zn^{+2} . XXXV Encuentro Nacional Academia

Mexicana de Investigación y Docencia en Ingeniería Química, "la Interdisciplinariedad en la Ingeniería Química A.C. (AMIDIQ)". México.

- 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.
- Volesky, B. (1987). Biosorbents for metal recovery. *TIBTECH*, 5:96–101.
- Volesky, B. (1990). Biosorption of heavy metals. *CRC Press, Boca Raton*. 1-5.
- Volke, & Velasco, T. (2004). Evaluación de tecnologías de remediación para suelos contaminados con metales. *INE*.
- Witek-Krowiak Anna. (2013). Application of beech sawdust for removal of heavy metals from water: biosorption and desorption studies. *Eur. J. Wood Prod.* 71:227–236.
- 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.

ANEXOS

Anexo A

Tinción de Gram

Objetivo: Diagnóstico clínico de microorganismos positivos y negativos, clasificados según su reacción a la tinción.

Fundamento: Un microorganismo positivo debe tener una pared celular sana si sufre daño de la pared se vuelve Gram negativo. Una teoría es que el colorante básico entra al microorganismo donde el yodo forma una laca insoluble al agua.

Al alcohol acetona, se utiliza para aclarar deshidrata las paredes positivos tratados con mordente forman una barrera que la laca no puede atravesar. Los lípidos de la pared de las células Gram negativas, son más abundantes que las Gram positivas, lo que permite que el escape del complejo de cristal violeta con yodo. Los microorganismos Gram positivos que son azul oscuro, más comunes son los siguientes: estafilococos, estreptococos, neumococos, difteroides, ántrax y su grupo, y hongos.

Procedimiento:

- 1.- Preparar y fijar el frotis. Las películas secadas al aire son fijadas por calor suave sobre la flama de un mechero y luego pasadas a través de ella teniendo el cuidado de evitar el calor excesivo ya que puede alterar la forma bacteriana.
- 2.- Teñir con violeta de genciana durante un minuto
- 3.- Lavar el frotis con la solución de yodo Gram.
- 4.- Utilizar como mordente yodo Gram durante un minuto.
- 5.- Lavar con solución alcohol-acetona hasta que ya no escurra líquido azul.
- 6.- Lavar con agua.

7.- Teñir con safranina durante un minuto.

8.- Lavar con agua en repetidas ocasiones.

9.- Secar y observar a microscopio.

Resultados: Los microorganismos Gram negativos toman una coloración roja y los microorganismos Gram positivos se tiñen de color azul.

Anexo B

Congelación de Cepas para Almacenamiento

Todos los microorganismos que están previamente inoculados en caldo se congelan para guardarse. Vertiendo 1 mL de caldo inoculado y 0.25 mL de glicerol al 85%. En tubos Eppendorf de 2 mL se mezclan perfectamente y se guardan en el congelador.

Anexo C

Tablas de Resultados

Producción de biomasa

Tiempo, min	%T	Log(células)(mL)
0	13.295	0.8763
60	8.75	1.0580
120	5.6	1.2518
180	3.75	1.4260
240	2.5	1.6021
300	2.5	1.6021
360	2	1.6990
420	2	1.6990
480	2	1.6990
540	2	1.6990
600	2	1.6990
660	2	1.6990

Bioadsorción de Cobre con biomasa pre-tratada y sin tratar

	Biomasa	
	Pre-tratada	Sin tratar
Tiempo, min	% Bioadsorción de Cu	
0	0	0
10	10.21	9.05
20	15.49	19.66
30	17.59	20.98
60	20.98	21.95
120	26.37	26.83
180	32.13	31.71
1440	36.19	41.34
2880	42.93	46.59

Bioadsorción de zinc con biomasa pre-tratada y sin tratar

	Biomasa	
	Pre-tratada	sin tratar
Tiempo, min	% de bioadsorción de Zn	
0	0.00	0.00
10	7.73	3.21
20	9.57	7.03
30	16.22	13.40
60	21.91	18.11
120	27.51	24.29
180	30.67	30.33
1440	34.69	35.31
2880	40.29	38.87