



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

"AISLAMIENTO DE UNA BACTERIA SAPROFITA RESISTENTE AL COBRE IONICO SOPORTADA EN UNA COLUMNA DE ADSORCION Y SU POSIBLE APLICACION EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES INDUSTRIALES."

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
VICTOR PEREZ MEDINA MARTINEZ

ASESOR: M.V.Z. GERARDO CRUZ JIMENEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Aislamiento de una bacteria saprófita resistente al cobre iónico soportada

en una columna de adsorción y su posible aplicación en el tratamiento de
aguas residuales industriales.

que presenta el pasante Víctor Pérez Medina Martínez

con número de cuenta: 9108124-1 para obtener el TÍTULO de:

Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

A T E N T A M E N T E

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo de Méx., a 06 de abril de 2001

PRESIDENTE

M.V.Z. Gerardo Cruz Jiménez

VOCAL

I.Q. Margarita Alonso Espinosa

SECRETARIO

Q.F.B. Virginia Benítez Solís

PRIMER SUPLENTE

Q.B.P. Amparo Lodoño Crozco

SEGUNDO SUPLENTE

Q.F.B. Leticia Badillo Solís

[Handwritten signatures and initials over the list of names]

A mis dos pilares: mis padres.

Porque el concepto de fortaleza y de tenacidad se los debo a ustedes, porque era más fácil esconderme y no lo hicieron. Gracias por la confianza, las lágrimas, los regaños pero sobre todo el amor. ¿Vida cómo pagarte?

CONTENIDO.

1. Resumen.....	1
2. Justificación.....	2
3. Introducción.....	3
4. Antecedentes.....	10
5. Generalidades.....	13
6. Objetivos	18
<u>Método</u>	
7. Metodología experimental (diagrama de flujo)	19
8. Materiales y Equipo.....	20
9. Procedimiento experimental.....	20
10. Determinación del cobre libre en solución.....	20
11. Valoración de soluciones de cobre y diseño de la columna de adsorción.....	28
12. Resultados.....	30
13. Análisis de Resultados.....	35
14. Conclusiones.....	41
15. Anexo No.1 Equipo.....	42
16. Anexo No.2 Materiales.....	43
17. Anexo No.3 Medios de Cultivo.....	44
18. Anexo No.4 Reactivos.....	46
19. Anexo No.5 Volumetría.....	49
20. Anexo No.6 Soluciones.....	51
21. Anexo No.7 ANADEVA.....	52
22. Bibliografía.....	55

ÍNDICE DE TABLAS.

1. Tabla 1- Origen y composición de desechos peligrosos.....	4
2. Tabla 2- Clasificación de microorganismos por necesidades de carbono, y energía	
3. Tabla 3- Clasificación de microorganismos por sus vías de obtención de energía.....	14
4. Tabla 4- Materiales usados en la adsorción, enlace y atrapamiento de microorganismos.....	15
5. Tabla 5- Porcentajes de remoción de metales pesados de diferentes procesos de tratamiento de agua.....	16
6. Tabla 6- Constantes de solubilidad de especies químicas de cobre.....	20
7. Tabla 7- Tabla de selección bacterial por eliminación.	22
8. Tabla 8 - Valores de lectura de cinética de crecimiento.. ..	24
9. Tabla 9- Valoración de los medios de Thiobacillus	25
10. Tabla 10- Valoración de los medios de bacteria comparativa.	26
11. Tabla 11 - t de student para valores de <i>E. Coli</i>	26
12. Tabla 12 - Valoraciones de cobre 2+ a diferentes concentraciones... ..	52
13. Tabla 13 - ANADEV A	53
14. Tabla 14 - Valores de cálculo para la suma de cuadrados.....	53
15. Tabla 15 - Valores de t student para cálculo de exactitud en valores volumétricos.....	54

ÍNDICE DE FIGURAS.

1. Figura 1 - Colocación de matraces	23
2. Figura 2 - Diagrama de flujo de valoración de muestras.....	27
3. Figura 3 - Camisa de centrifuga.. ..	27
4. Figura 4 - Preparación de la columna.....	29
5. Figura 5 – Propuesta de planta de tratamiento normal..	33
6. Figura 6 – Propuesta planta de tratamiento para cobre.	34

ÍNDICE DE GRÁFICOS.

1. Gráfico 1 - Cinética de crecimiento del Thiobacillus. .	24
2. Gráfico 2 - Volúmenes de valorante a diferentes concentraciones de cobre	31
3. Foto 1.-	35

RESUMEN.

La conciencia ecológica y el desarrollo sustentable es el fundamento del presente trabajo.

Se aisló una bacteria que concuerda con las cualidades bioquímicas del *Thiobacillus ferroxidans* reportado en la bibliografía, la cual tiene especial resistencia a altas concentraciones de cobre $2+$. De su adaptación, identificación, crecimiento y uso, trata el presente trabajo

Además se determinó la sensibilidad, (2 mM) selectividad, (ningún componente del medio forma triyoduro con la bacteria) y desviación que presenta el método analítico para la cuantificación del cobre $2+$ (menos de 3% de CV) en el medio de cultivo y así como la interferencia provocada por la biomasa generada en el sistema

El microorganismo aislado por demostrar capacidad especial, se separó del medio y se cultivo para generar biomasa en condiciones aceptables, para mas tarde ser adsorbido sobre esponja comercial formando una biopelícula, no teniendo interacción especial la esponja con el microorganismo ni viceversa, únicamente, funcionando como soporte. Cabe notar que el material no muestra degradación a las condiciones experimentales.

JUSTIFICACIÓN.

Los desechos de cobre generados en las Industrias se controlan mediante la adición de sosa cáustica ó potasa para el aumento del valor de pH y la subsecuente precipitación del metal, pero estas finas partículas son arrastradas por el flujo si no se cuenta con filtros adecuados para ello y mas tarde en el momento de alcanzar ciertas áreas (lagunas) donde el agua es calentada por los rayos solares y se produce el incremento de la temperatura y la acidez, el equilibrio químico se ve afectado y produce el ión tóxico, capaz de inhibir las enzimas de muchos seres vivos y producir contaminación incluso de las plantas que más tarde consumiremos

Por otro lado en la minas, en donde se trata a los jales y a la misma beta del metal mediante ácido, para la purificación del cobre, una gran cantidad de este metal se pierde, junto con el hierro, tungsteno, níquel e incluso uranio, el desecho llega a ríos y fuentes de agua que son consumidas por aves de corral, ganado vacuno y ovinos. La alta concentración, de cobre y hierro se puede observar en ríos con color café oscuro, amarillos y hasta naranjas.

El uso de estas bacterias en el paso anterior al desecho no sólo protege al ecosistema sino también a la biorecuperación del compuesto soluble y que es muy difícil de obtener por otros medios.

INTRODUCCIÓN.

El cobre es un metal que en su estado de oxidación cero causa pocos o nulos efectos toxicológicos, pero que en su estado de oxidación +1 ó +2 produce hemocromatosis, como es el caso de los vapores del óxido de cobre, gastroenteritis hemorrágica, lesión hepática y renal como en el caso del sulfato de cobre que además es un irritante notable de las mucosas y de la piel. ⁽⁸⁾

Los principales casos de intoxicación se han dado por la absorción de sus sales por contenedores de agua contaminados, provocando náuseas, dolor de cabeza, vómito, shock hemolítico, producido por fragilidad eritrocítica. Pneumonitis por respirar polvos de cobre, hematuria y proteinuria además se han reportado casos de muerte por la ingestión de 10 g de sulfato de cobre. ⁽⁸⁾

Por otro lado el cobre es ampliamente usado en diferentes procesos industriales como en la preparación de compuestos azoicos, refinamiento del petróleo, aleaciones, adhesivos para madera impermeables, además de mordentes fotográficos para intensificar los negativos, como conductor eléctrico, para aleaciones, trabajos artísticos, como funguicidas, mordente en teñido textil, como electrolito en las baterías automotrices, etc. ⁽⁵⁾

La tecnología para el tratamiento de aguas residuales de tipo peligroso, mediante microorganismos, suma cierto número de ventajas y desventajas en el tratamiento terciario de éstas, el estudio de estos parámetros ha sido ampliamente reportado ^(10,11,17) y con el tiempo han aportado una gran cantidad de beneficios sociales, pues hay trabajos adelantados en este tipo de desarrollos biológicos ^(19,20,21). Las personas beneficiadas son todas aquellas que consumen alimentos cosechados con aguas tratadas, pues estos metales son absorbidos por las plantas y después consumidos por el hombre.

En el agua contaminada se observan diferentes tipos de residuos peligrosos, los cuales se entienden en su concepto por:

“Desecho peligroso es cualquier sustancia o mezcla de sustancias que manejada inadecuadamente puede dañar la salud humana ó el medio ambiente”

De la parte constituyente de estas mezclas, se entiende como:

“Residuo es un material generado en un proceso y cuya naturaleza y características impiden que sea utilizado nuevamente en el mismo proceso”

El origen y la composición de estas sustancias y mezclas de sustancias peligrosas, así como su presencia en las aguas municipales son de diversa índole, y se puede observar en la siguiente tabla una clasificación de las mismas⁽¹⁰⁾:

Origen(industria):	Componentes del desecho
Químicos	Arenas, fenoles, disulfuro de carbono, tetracloruro de carbono
Manufactura de plásticos	Anilinas, tricloroetileno, Tetracloruro de carbono
Agricultura	Pesticidas(As, fenoles, Pb, As, Hg, Cd)
Papelería	Lignosulfonatos, cloroligninas, formaldehído mercaptanos
Explosivos	Cu, ácido picrico, fenoles Nitroguanidina, RDX
Nuclear	Radionúclidos (U, Sr, Co, Ce, Y, Ru, Pu, Cs, Ra)
Curtido y piel	Fenoles, Cr, Fe
Terminado de metales	Cu, Ni , Zn, Cr, Fe

TABLA 1. –Origen y composición de los desechos peligrosos.

Desde las décadas de los 70's y 80's se manifestó la necesidad del desarrollo de tecnologías para la preservación del medio ambiente y de la salud así como de programas de manejo de residuos.

En el tratamiento de estas sustancias se utilizan diferentes métodos como los que se mencionan a continuación⁽²⁰⁾:

FÍSICOS:

- Adsorción
- Destilación
- Electrodialisis
- Encapsulación
- Flotación
- Ultrafiltración

QUÍMICOS:

- Hidrólisis
- Intercambio iónico
- Neutralización
- Oxido-reducción
- Precipitación
- Solidificación
- Extracción por solventes

TÉRMICOS:

- Evaporación
- Incineración

Estos procesos anteriormente mencionados son por lo regular mucho más caros, difíciles de llevar a cabo, con personal altamente capacitado, en condiciones adversas y que suelen generar otro tipo de compuestos no deseados, por ello los procesos microbiológicos son de elección primaria.

Los procesos microbiológicos tienden a desarrollarse en condiciones suaves, con temperatura ambiental y pH cercano a la neutralidad. Comúnmente son compatibles con el medio ambiente y generan materias no tóxicas ó tóxicas en menor grado, de manera que puedan ser usados para el tratamiento de las aguas residuales y transformarlas en útiles para diferentes

usos, como industrial, de riego, para uso sanitario, sistemas de enfriamiento, etc ⁽²⁰⁾

Los microorganismos tienden a reproducirse por medio de sistemas de replicación que son autorenovables. Todas estas características juntas hacen del proceso microbiológico un proceso con muchas ventajas, pues es relativamente barato, y aún más importante, es que, ya está demostrado y probado que efectúan su trabajo constantemente en el tratamiento de las aguas de la naturaleza y en las plantas de tratamiento municipales.

Sin embargo, no en todos los casos suelen ser ideales las condiciones para los organismos existentes en los reactores biológicos, en muchas minas se agrega ácido para obtener los metales en solución y después precipitarlos, aún así en una cantidad apreciable del metal sigue el efluente y no se recupera, generando una contaminación inaceptable. El pH de esta agua suele ser de 1 a 3, y ciertamente pocos microorganismos sobreviven a estas condiciones y reactores biológicos, donde los protozoarios y rotíferos que son los principales organismos encargados de la "limpieza" no sobreviven a estas condiciones

Además, en el tratamiento de metales en algunas grandes industrias todavía no se reglamenta la neutralización de sus aguas o aunque esté reglamentada existen liberaciones de aguas contaminadas furtivas a lo largo de los canales de aguas residuales, con lo cual los contaminantes van directamente al mar, ríos y lagunas. Los microorganismos aislados en esta tesis y otros trabajos realizados en todo el mundo representan una opción barata y eficiente para el tratamiento de las aguas contaminadas con estos residuos.

También en las minas de cobre existe una gran cantidad de piritita, azufre y sales ácidas que en contacto con el agua, generan ácido sulfúrico, y condiciones ácidas, que es otra fuente de contaminación, con todos los metales disueltos en el agua.

Las vías por las cuales los microorganismos entran en el ciclo del carbono y otros elementos, han sido reconocidas y están siendo estudiadas. Las diversas vías metabólicas de los microorganismos y en particular su habilidad para interactuar con los complejos orgánicos e inorgánicos, en la actualidad están siendo usadas en el tratamiento de materiales peligrosos. ⁽¹³⁾

Como sea, estas tecnologías en algunos casos son deficientes y costosas, por ejemplo: la extracción con disolventes por sí misma genera desechos inaceptables. Otros métodos como la incineración, requieren una gran cantidad de energía, lo cual es un inconveniente, pues en la gran ciudad en que vivimos se genera una enorme cantidad de basura que requiere incineración, la cual a su vez genera otro tipo de contaminación.

Por otro lado las tecnologías biológicas son específicas, debido a que se basan en la actividad de los microorganismos, por lo cual, se ha incrementado su uso debido a las ventajas que presentan. ⁽¹⁷⁾

Los microorganismos tienden a ser selectivos contra un compuesto en una mezcla de desechos. Desde la antigüedad los organismos han vivido en medios adversos en los cuales han tenido que sobrevivir a pesar de las condiciones anarobias, de alta temperatura, pH muy ácido ó básico, presencia de metales pesados. Muchas de estas especies existen en el medio ambiente común, adaptadas a las condiciones ideales propias de cada una de ellas. No existen técnicas generales que puedan de aislar especies tales como “*Metallogénicas*”, “*Sulfurosas Sin Color*” ó resistentes a metales pesados, así, las técnicas para cada una de ellas suelen ser únicas. Además de que sus requerimientos nutricionales no han sido cuantitativamente establecidos y la composición básica de los medios de cultivo suele variar enormemente ⁽²⁸⁾. Existen especies que pueden biodegradar compuestos tóxicos como monóxido de carbono, compuestos halogenados como cloroformo, cloruro de metileno y cloroetileno, de pesticidas como pentaclorofenol, dieldrin y algunos productos de tipo industrial como las cloroligninas y cloroanilinas, además de metales pesados que interfieren en el desarrollo de la vida del hombre, los animales y las plantas. Es muy importante establecer que no pueden “destruir” los metales pesados, pues bioquímicamente esto es imposible, pero los pueden transformar en productos químicos menos tóxicos. Un ejemplo de esto es el caso del cromo, que diferentes especies de *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, y *Achromobacter*, tienen la capacidad de catalizar. Catalizan la reducción de Cr^{+6} a $\text{Cr}^{+3(32)}$, este último es mucho menos tóxico y además sus sales precipitan con lo que resulta en la destoxificación y la inmovilización *in situ* de estas sales.

Los procesos biológicos por los cuales se remueven los metales pesados de las aguas son.

- Adsorción. Los microorganismos enlazan a los metales pesados como resultado de las cargas negativas de la superficie microbiana.
En el proceso las bacterias gram positivas son excepcionalmente efectivas. Así también, se ha encontrado que se acopía a las isotermas de Langmuir y Freundlich.
- Complejación. Los microorganismos pueden producir ácidos orgánicos con la formación de compuestos organometálicos. Estos también pueden ser enlazados por los grupos carboxilo que se encuentran presentes en los polisacáridos microbiales y otros polímeros. Este fenómeno es de gran importancia para las plantas de tratamiento de aguas
- Precipitación. Algunas bacterias promueven la precipitación de los metales produciendo amoníaco, bases orgánicas, ácido sulfhídrico, los cuales precipitan a los metales en forma de hidróxidos ó sulfuros. Las bacterias reductoras del azufre transforman al sulfato en ácido sulfhídrico, lo cual promueve la precipitación extracelular de los metales en solución.
- Volatilización. Algunos metales son transformados hacia especies volátiles a consecuencia de la acción microbiana, por ejemplo ciertas bacterias tienen la capacidad de transformar el Hg^{2+} a Hg^0 que es una especie química volátil.
- Acumulación intracelular de los metales. Las especies microbianas pueden absorber sustancias mediante sistemas de transporte específicos.

Entre las especies más estudiadas con esta cualidad se pueden nombrar la *Citrobacter sp*, *Thiobacillus ferroxidans*, *Enterobacter cloacae*, *Achromobacter sp* y *Klebsiella pneumoniae*.

El genero *Citrobacter* tiene la capacidad de precipitar plomo, cadmio, uranio y lantano mediante una fosfatasa quelante con el uso de HPO_4^{--} , estos estudios se han realizado en Inglaterra. ⁽¹⁹⁾

Las bases bioquímicas del tratamiento de los desechos peligrosos se fundamenta en estos tres mecanismos:

- BIODEGRADACIÓN,
- BIOADSORCIÓN y
- BIOTRANSFORMACIÓN⁽¹⁷⁾

Las principales fuentes de metales pesados que llegan a las plantas de tratamiento de aguas son descargas industriales y agua de lluvia urbana llevada a las aguas municipales. Procesos biológicos de tratamiento como lo son los lodos activados, filtros de goteo y lagunas de oxidación remueven aproximadamente el 24% por ejemplo del cadmio y 82% de otros como el cromo y cobre. Metales tóxicos tienen efectos adversos en el tratamiento biológico de las aguas residuales y en cuanto menos tengan mejor será la limpieza, debido a que tienen efectos inhibitorios tanto para los procesos anaerobios y los aerobios en el tratamiento de aguas residuales.⁽¹⁶⁾

ANTECEDENTES.

La temperatura ambiental, el pH neutro, la presión de oxígeno atmosférica y abundantes nutrientes en los ecosistemas, habitats y nichos, son consideradas como características normales para los microorganismos y especies biológicas pluricelulares. Y cualquier condición fuera de éstas se consideran como extremas.

Como regla general, la diversidad de especies decrece con el incremento de la adversidad del medio ambiente. En general los microorganismos que están adaptados a condiciones extremas están obligados a crecer bajo esas condiciones y no pueden crecer bajo situaciones ecológicas diferentes.

En los ecosistemas ácidos, los cuales se pueden considerar como los lagos y tierras volcánicas de reciente erupción tienen valores de pH drásticamente bajos. Un ecosistema acuático con esta característica está representado por el drenaje de minas de carbón y basureros mineros de carbón, que es producida por la oxidación de minerales piríticos, hierro reducido y compuestos sulfurosos asociados con el carbón.

El ácido sulfúrico producido por el Thiobacilo produce el decremento del valor de pH entre 2 y 0. Bacterias oxidantes del azufre y hierro se hallan presentes en el agua de las minas que por lo regular son arroyuelos

La bacteria *Thiobacillus ferrooxidans* puede tolerar un pH=1 y iones de cobre, cobalto, zinc, níquel y hierro a altas concentraciones.⁽¹⁰⁾

Los ácidos orgánicos son excretados en cultivos de laboratorio y su significado ecológico no ha sido determinado aún. En las aguas de este tipo, la mayoría de las bacterias son Gram positivas, aeróbicas y anaeróbicas, las bacterias heterotróficas mueren rápidamente, mientras que las levaduras y mohos predominan.⁽¹⁰⁾

El cobre residual después de trabajos sobre metales en caliente, produce aguas residuales con altas concentraciones de contaminantes que interfieren en el tratamiento. La cantidad necesaria de cobre para producir estas modificaciones en el tratamiento biológico puede ser de 1 mg/ml o menos.⁽¹⁶⁾

Comúnmente para la remoción de iones metálicos se usan aniones agregados a las aguas de desecho para incrementar la coagulación, estos son por lo común de hierro y aluminio. La efectividad de estas entidades químicas negativas se incrementa con el número de sus cargas, por esta razón los iones sulfatos son mejores que los iones cloruro en la precipitación de metales, cuando se da este tipo de tratamiento a las aguas residuales se le conoce como un tratamiento de tipo terciario. Siendo tratamiento de tipo primario cuando se remueven contaminantes por medios físicos (cribas, filtros de arena, lagunas y tanques de sedimentación) y secundario cuando se refiere a tratamiento para la remoción de contaminantes que por medio del tratamiento primario no se pueden eliminar. Dentro de este género se pueden incluir los bioreactores, de tipo aerobio y anaerobio.⁽¹⁶⁾

Estos iones necesitan ser distribuidos en las aguas que van a ser tratadas, así un rápido mezclado se debe de generar para tanques pequeños en que la interacción de estas entidades se puede ver disminuida debido a al corto tiempo de estancia en los reactores.

Una vez comenzado el crecimiento del flóculo se debe de estimular el crecimiento de los mismos, manteniéndolos en contacto el mayor tiempo posible y controlando la agitación del tanque para evitar su disgregación.

El rango de pH insolubilidad para el ión férrico se da por arriba de 9, de 5 para el ión ferroso, 4 para el cúprico y de 5 a 7 para el aluminio. En la práctica, el pH tan bajo como 4 también se toma en cuenta para la precipitación.

Los mejores precipitados se forman en puntos de baja solubilidad de los óxidos hídricos del hierro, el aluminio y el cobre

Al combinar el limo con las aguas residuales se generan una serie de reacciones con el dióxido de carbono y el bicarbonato disueltos, después de las cuales se genera carbonato de calcio que funciona como un neutralizante, incrementando el pH y favoreciendo la precipitación.

Las principales especies precipitantes químicas que se agregan a las aguas residuales para la formación de flóculos y la remoción de diferentes contaminantes son:

- 1)Cloruro férrico hexahidratado,
- 2)Sulfato férrico dihidratado,
- 3)Sulfato ferroso heptahidratado,
- 4)Oxido cálcico,
- 5)Hidróxido de calcio,
- 6)Sulfato de aluminio monohidratado ⁽¹¹⁾

La remoción del ochenta por ciento de sólidos suspendidos a condiciones óptimas, se da a concentraciones de 30mg/L de cloruro férrico, si se aumenta al doble la concentración de cloruro férrico, la remoción de sólidos suspendidos se eleva al noventa por ciento.⁽¹¹⁾

Por otro lado la recuperación del cobre es más negocio que la remoción de otros materiales como el sulfato de hierro por ejemplo.

Los métodos químicos existentes para la recuperación del cobre son:

- (1)Evaporación.
- (2)El pasaje por un licor de hierro espeso en el cual el hierro se disuelve y el cobre precipita en igual cantidad.
- (3)Electrólisis del jarabe de desecho para la recuperación del cobre y regeneración del ácido usado para la minería.
- (4)cristalización del sulfato de cobre después de la neutralización.
- (5)neutralización por limo antes de sedimentación.⁽¹⁴⁾

Como se puede observar, los pH's que se encuentran por debajo de 4, no generan una precipitación aceptable

GENERALIDADES.

Por sus necesidades de carbono, energía y donación y aceptación de electrones por su sistema metabólico los microorganismos se dividen en:

	Fuente de Carbono	Fuente de Energía	Donador de Electrones
Fotolitotróficos	CO ₂	Luz Solar	H ₂ O, H ₂ S, S y Compuestos Inorgánicos.
Fotoorganotróficos	CO ₂ Compuestos orgánicos	Luz Solar	Compuestos orgánicos
Quimiolitotróficos	CO ₂	Redox	H ₂ S, S y H ₂ SO ₄
Quimioorganotróficos	Compuestos Orgánicos	Redox	Compuestos Orgánicos. ⁽³⁾

TABLA 2. --Clasificación de microorganismos por necesidades de carbono y energía.

Esta clasificación es bastante convincente, sin embargo es necesario dar una clasificación más detallada para penetrar en el tema, así también los microorganismos se dividen en tres grupos iniciales primarios como se describe en la tabla 3 (página siguiente)

Otros microorganismos son los **acidófilos** que son un grupo bacterial, facultativo autótrofo, no subdividido todavía, y no deben de confundirse con el género *Acidophilum* que son encontrados en cerrada asociación con el género *Thiobacillus* pero que no tienen las mismas características biológicas.

Algunos de los **thiobacilos** serán nombrados a continuación:

Thiobacillus ferroxidans: autótrofo obligado y facultativo, oxida el hierro 2+ y también compuestos sulfurosos reducidos, como el tiosulfato, tetracionato, tritionato y sulfuros, esta bacteria no puede crecer en aguas con una concentración de cloruro de sodio por arriba del 1%.

Thiobacillus thioxidans: produce grandes cantidades de ácido sulfúrico y además puede crecer a pH de 0.5.

Thiobacillus albertis: crece hasta un pH de 2, y usa NH₄⁺ como fuente de nitrógeno

Thiobacillus prosperus: puede crecer a concentraciones de cloruro de sodio por arriba del 6%.

I.-Litótrofos aerobios (quimiolitioautótrofos)	
Bacterias de hidrógeno	$H_2 + 1/2 O_2 \rightarrow H_2O$
Bacterias de azufre	$H_2S + 1/2 O_2 \rightarrow H_2O + S$
Bacterias de hierro	$2Fe^{2+} + O_2 + H_2 \rightarrow 2Fe^{3+} + 2OH^-$
Bacterias nitrificantes	$NH_3 + 1/2 O_2 \rightarrow HNO_2 + H_2O$
	$NHO_2 + 1/2 O_2 \rightarrow HNO_3$
II.-Anaerobios:	
Bacterias denitrificantes	$H_2 + NO_3^- \rightarrow N_2O, N_2 \text{ ó } NH_3$
Género desulfovibrio (quimiolitioautótrofos)	$H_2 + SO_4^{2-} \rightarrow H_2O + S \text{ ó } H_2S$
Bacterias metanogénicas	$4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$
Bacteria Clostridium Aceticum	$4H_2 + CO_2 \rightarrow CH_4 + 2H_2O$
III.-Fotosintetizadores:	
Bacterias púrpuras de azufre	$4CO_2 + 2H_2S + 4H_2O \xrightarrow{\text{luz}} 4(CHO)_n + 2H_2SO_4$
Bacterias no púrpuras de azufre	$CO_2 + 2H_2(A) \xrightarrow{\text{luz}} (CH_2O)_n + H_2O + 2(A^-)$
Algas y plantas superiores	$CO_2 + 2H_2O \xrightarrow{\text{luz}} (CH_2O)_n + 1/2 O_2^{(4)}$

TABLA 3. -Clasificación de microorganismos por sus vías de obtención de energía

Thiobacillus acidophilus: puede crecer mixotrópicamente, por ejemplo en glucosa y tetrationato. ⁽¹⁷⁾

Una parte del tratamiento de aguas está basado en la inmovilización de microorganismos. Agregados celulares en sistemas de lodos activados que atacan las rocas ó superficies plásticas, son lo que comúnmente le llaman biopelícula, ó "biofilm" en inglés; a los filtros de goteo los podemos nombrar como un buen ejemplo de ello ⁽²⁰⁾

Los soportes más comunes para bacterias son materiales poliméricos como el alginato, carragenato y poliácridamida. Estos son usados por sus características estructurales de área superficial y por que los microorganismos no pueden degradarlos, además es importante que estos polímeros no liberen

sustancias ó que afecten el crecimiento y características bioquímicas de la biopelícula.

Sin embargo el alginato y carragenato son los polímeros de elección en la inmovilización celular, debido a las características toxicas que sobre la biopelícula presenta la poliacrilamida.

En la siguiente tabla observamos los diferentes materiales usados en la adsorción, atrapamiento y enlace covalente, para su uso en el tratamiento de aguas residuales.

Adsorción:	Enlace covalente:	Atrapamiento:
Arena	Hidroxietil acrilato	Alginato
Aserrín		Acarreador epóxido
Celita		Agarosa
Ladrillo poroso		Carragenato
Sílica porosa		Celulosa y acetato de celulosa
Esponja		Chitosán
		Gelatina
		Poliacrilamida
		Poliacrilamida-hidrazina
		Uretano
		Resinas fotoenlazables ⁽⁴⁾

TABLA 4. –Materiales usados en la adsorción, enlace y atrapamiento de microorganismos.

Otro punto importante para aclarar es la actividad metabólica e interacción para la supervivencia de los microorganismos sobre los metales pesados que resulta en la solvatación, precipitación, quelación, biometilación ó volatilización de metales pesados ⁽³²⁾ y se describirá cada uno de los procesos a continuación:

- Producción de ácidos fuertes, como el ácido sulfúrico por las especies de Thiobacilos, que son bacterias quimioautotróficas
- Producción de ácidos orgánicos, como el ácido cítrico el cual quela los metales pesados.
- Producción de ácido sulfhídrico, por bacterias sulfuro reductoras y que precipitan a los metales pesados para la formación de sulfuros, los cuales tienen las constantes más bajas de solubilidad.

- Producción de amoníaco ó bases orgánicas que forman hidróxidos insolubles que precipitan.
- Producción de polímeros extracelulares que tienen la habilidad de quelar metales pesados.
- La capacidad de ciertas bacterias para adsorber hierro y manganeso en su superficie en forma de hidróxidos u otra forma de sal insoluble
- Biotransformación por algunas bacterias que tienen la capacidad de “biometilar” y volatilizar metales pesados (mercurio) ^(4, 32)

Existen datos con respecto de los metales adsorbidos por los lodos biológicos y se muestran a continuación

Metal	Clarificación primaria	Filtros de goteo	de Lodos activados	Laguna de aereación.	Laguna facultativa.
Cromo	7	52	82	71	79
Cobre	19	60	82	74	79
Níquel	4	30	43	35	43
Plomo	30	48	65	58	50
Cadmio	12	28	24	-	32

TABLA 5 Porcentajes de remoción de metales pesados de diferentes procesos de tratamiento de agua. ⁽⁴⁾

Las anteriores vías metabólicas son ejemplos por los cuales los microorganismos interactúan con estos desechos peligrosos y dan una idea de cómo se pueden usar y explotar estas cualidades para el beneficio humano y social.

Por otro lado se deben de analizar las ventajas y desventajas de la inmovilización celular nombradas en seguida:

Ventajas

- 1 Operación continua del reactor sin el riesgo de limpieza celular del soporte.
- 2 Alta densidad celular.
- 3 Fácil separación de células de la mezcla de reacción
- 4 Posibilidad de reuso celular.
- 5 Capacidad microbiana dependiendo de la especie y cepa, una especificidad para cierto contaminante.
- 6 Productividad incrementada proporcionalmente con la concentración celular y un volumen dado.

7. Alta estabilidad enzimática ó de los microorganismos utilizados.
8. Decremento en el volumen de los bioreactores
9. Tolerancia de los microorganismos a altas concentraciones de tóxicos.
10. Además una que agregaré, adaptación a las condiciones nuevas de trabajo, a través de un cambio moderado y continuo

Pero como sea la inmovilización celular tiene sus limitantes.

Desventajas:

1. Problemas de difusión por la alta densidad celular y la baja solubilidad del oxígeno en el agua.
2. Cambios en la fisiología celular, lo que puede afectar la productividad (ó mejorar).
3. Cambios en la población celular, que puede ser un problema en el agua residual que contiene poblaciones mixtas de microorganismos.
4. Costo de inmovilización ⁽²⁰⁾
5. Agregaré una más para complementar, sobresaturación y liberación de agregados celulares al medio, acuoso, de cultivo y residual.

Con fundamento en los conceptos ya vertidos y analizados en este trabajo se plantean los siguientes objetivos:

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

MATERIALES Y EQUIPO.

Diagrama de flujo.

▣ Muestreo de agua de minas.

Usando un matraz de Erhlenmeyer de 250 ml (medio de *thiobacillus*)

Condiciones de campo pH = 5, temperatura del agua 25.3°C. (16:00 h aprox)



▣ Aislamiento y purificación de la bacteria, mediante medio para thiobacilos (líquido y sólido, con concentración de agar 0.4 % del último y de los medios líquidos a pH 4, 3.5, 3, 2.5, 2, siendo la cadencia secuencial, ajuste con ácido sulfúrico 2N, ver anexo 3) en matraces de 250 ml y en cajas Petri de 20 ml.

Crecimiento secuencial en medios con diferentes concentraciones de cobre.

0.5 mM, 1mM, 1.5mM, 2.5mM, 3mM, 3.5mM y 4mM temperatura controlada en todos los crecimientos con agitación y en una incubadora a 30 ° C +/- 1 ° C.



▣ Identificación de la bacteria. (ver tabla 7)

Crecimiento en diferentes medios para *Thiobacillus sp.* y observando finalmente crecimiento en el medio para *Thiobacillus ferrooxidans.*⁽²⁷⁾



▣ Crecimiento bacterial, corrimiento de su cinética de crecimiento (elaboración de una curva de crecimiento, en matraces de Erhlenmeyer de 125 ml ver gráfico No 1. con 100 ml de un medio mínimo de sales⁽¹⁹⁾) midiéndose desviación óptica en un colorímetro Klett y producción de su biomasa en un medio líquido (medio mínimo de sales, ver anexo 3) en un matras de 500ml con esponja comercial y agitación a 30 ° C +/- 1 ° C.



▣ Generación de su resistencia al cobre mediante el aislamiento de mutantes resistentes. (selección de cepas resistentes) valorando las soluciones de cobre (ver anexo 5) usando la volumetría indicada en la bibliografía competente.⁽³⁴⁾



▣ Prueba de su capacidad de adsorción de cobre en una columna (ver figura 4)

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

Dentro de los principios para analizar el tema es necesario que exista en el laboratorio una solución probada para realizar la investigación pertinente

El medio mínimo de sales ⁽¹⁹⁾ es una solución que contiene los componentes mínimos para el desarrollo de microorganismos autótrofos además de que no afecta en un promedio mayor del 3% en el análisis volumétrico del cobre 2+, que es el compuesto a medir en solución.

Conociendo los componentes del medio de cultivo, sabemos cuales son las especies que se pueden formar y precipitar en el medio acuoso, las que fueron encontradas reportadas en la bibliografía. Existen especies precipitables de cobre a pH neutral, principalmente debido a el alto grado de polarización del cobre y como ya se mencionó el segundo factor decisivo es el pH.

DETERMINACIÓN DEL COBRE LIBRE EN SOLUCIÓN.

Así, existen 4 formas insolubles de cobre dependientes de los componentes del medio de cultivo, las cuales son, con sus correspondientes constantes de equilibrio:

Especie química	-log Keq
$\text{CuO}_{(s)}$	-19.51(25°C)
$\text{Cu}(\text{OH})_{2(s)}$	-18.48(25°C)
$\text{CuOH}^{1.5} \text{SO}_4^{0.25}_{(s)}$	-16.86
$\text{CuOH}^{1.5} \text{Cl}^{0.5}_{(s)}$	-17.16 ⁽³¹⁾

TABLA 6 Constantes de solubilidad de especies químicas de cobre.

(Especies químicas insolubles de cobre a las condiciones experimentales)

Por lo que la fracción soluble de cobre 2+ se calcula por medio de esta ecuación:

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL .

Dentro de los principios para analizar el tema es necesario que exista en el laboratorio una solución probada para realizar la investigación pertinente

El medio mínimo de sales ⁽¹⁹⁾ es una solución que contiene los componentes mínimos para el desarrollo de microorganismos autótrofos además de que no afecta en un promedio mayor del 3% en el análisis volumétrico del cobre 2+, que es el compuesto a medir en solución.

Conociendo los componentes del medio de cultivo, sabemos cuales son las especies que se pueden formar y precipitar en el medio acuoso, las que fueron encontradas reportadas en la bibliografía. Existen especies precipitables de cobre a pH neutral, principalmente debido a el alto grado de polarización del cobre y como ya se mencionó el segundo factor decisivo es el pH.

DETERMINACIÓN DEL COBRE LIBRE EN SOLUCIÓN.

Así, existen 4 formas insolubles de cobre dependientes de los componentes del medio de cultivo, las cuales son, con sus correspondientes constantes de equilibrio:

Especie química	-log K_{eq}
$\text{CuO}_{(s)}$	-19.51(25°C)
$\text{Cu}(\text{OH})_{2(s)}$	-18.48(25°C)
$\text{CuOH}^{1/5} \text{SO}_4^{0/25} (s)$	-16.86
$\text{CuOH}^{1/5} \text{Cl}^{0/5} (s)$	-17.16 ⁽³¹⁾

TABLA 6 Constantes de solubilidad de especies químicas de cobre.

(Especies químicas insolubles de cobre a las condiciones experimentales)

Por lo que la fracción soluble de cobre 2+ se calcula por medio de esta ecuación:

Fracción soluble de cobre 2+ =

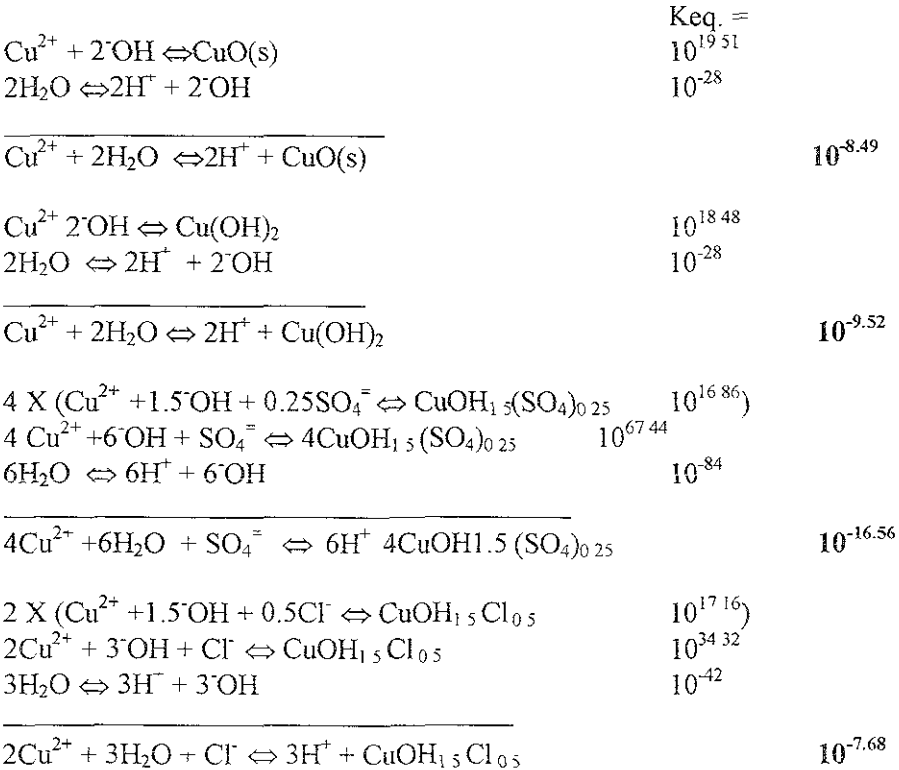
$$\frac{[\text{Cu}^{2+}]}{[\text{Cu}^{2+}] + [\text{CuO}][\text{Cu}^{2+}]/[\text{OH}^-]^2[\text{Cu}^{2+}] + [\text{Cu}(\text{OH})_2][\text{Cu}^{2+}]/[\text{Cu}^{2+}][\text{OH}^-]^2 + [\text{CuOH}_{1.5}(\text{SO}_4)_{0.25}][\text{Cu}^{2+}]/[\text{Cu}^{2+}][\text{OH}^-]^2[\text{SO}_4^{2-}] + [\text{CuOH}_{1.5}\text{Cl}_{0.5}][\text{Cu}^{2+}]/[\text{Cu}^{2+}][\text{OH}^-]^2[\text{Cl}^-]^{0.5}}$$

Reduciendo términos.

Fracción soluble de cobre 2+ = 1

$$1 + \frac{[\text{CuO}][\text{Cu}^{2+}]/[\text{OH}^-]^2[\text{Cu}^{2+}] + [\text{Cu}(\text{OH})_2][\text{Cu}^{2+}]/[\text{OH}^-]^2 + [\text{CuOH}_{1.5}(\text{SO}_4)_{0.25}][\text{Cu}^{2+}]/[\text{OH}^-]^2[\text{SO}_4^{2-}] + [\text{CuOH}_{1.5}\text{Cl}_{0.5}][\text{Cu}^{2+}]/[\text{OH}^-]^2[\text{Cl}^-]^{0.5}}$$

Ahora se tiene que calcular la concentración de cada una de las especies en función del pH, por lo que usando la ley de Hess obtendremos:



Fracción soluble de cobre 2+ =

1

$$\frac{1}{1 + 10^{-8.49}/[H^+]^2 + 10^{-9.52}/[H^+]^2 + 10^{-16.56} [SO_4^{=}] / [H^+]^6 + 10^{-7.68} [Cl^-] / [H^+]^3}$$

Ahora se calcula la concentración de las especies para determinar la fracción soluble de cobre en el medio líquido.

La $[H^+] = 10^{-2}$

La $[Cl^-]$ es dependiente de $KCl = 0.62g/L$, de ahí:

La $[Cl^-] = 10^{-2.11}$

La $[SO_4^{=}]$ es dependiente de $Mg SO_4 \cdot 7H_2O = 0.06g/L$

$NH_4 SO_4 = 0.96g/L$

$Fe SO_4 \cdot 7H_2O = 0.03g/L$ y siendo el pH de 2

Y ese pH se ajusta con $H_2 SO_4$, la concentración de ácido sulfúrico es $= 10^{-2}$

Entonces sumando $[SO_4^{=}] = 10^{-1.45}$

Sustituyendo en la fórmula y resolviendo tenemos:

Fracción soluble de cobre 2+ = 0.999

Por otro lado la identificación presuntiva del microorganismo se realizó usando los siguientes medios y por reducción se deduce el tipo de microorganismo:

Medio de crecimiento	Crecimiento del microorganismo en prueba.
MMS*(concentración de NaCl 1.2%, pH = 2)	Negativo
MMS*(crecimiento a pH= 0.5)	Negativo
MMS*(Crecimiento en ausencia de NH_4 y a pH=2)	Positivo
MMS*(Crecimiento en medio con presencia de glucosa, lactosa, tetrionato de sodio y ausencia de Hierro y cobre 2+)	Negativo

*MMS = medio mínimo de sales.

Tabla 7 Selección bacterial por eliminación.

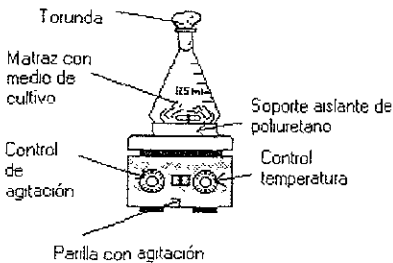
Después de haber determinado la exactitud y repetibilidad del método analítico, del cual se encuentra el desarrollo en el Anexo No 7, para la cuantificación del cobre 2+, así como su sensibilidad, pasaremos a dar un pequeño resumen del estudio de campo realizado.

El microorganismo que se describe en esta tesis fue aislado de una mina de cobre en Michoacán (Huetamo) y se aisló en un medio para thiobacilos .

Tres de estos matraces se llevaron al lugar del muestreo.

A través de una serie de sembrados en medios mínimos de sales en el laboratorio se ajustó el pH inicialmente a 3.5 usando ácido sulfúrico 2N reduciéndose paulatinamente hasta un pH = 2.

La temperatura de cultivo fue de 30° C, con una agitación mínima usando un agitador magnético de 1.5cm X 0.8cm. Y aislando el calor generado por la parilla usando un pequeño soporte de poliuretano.

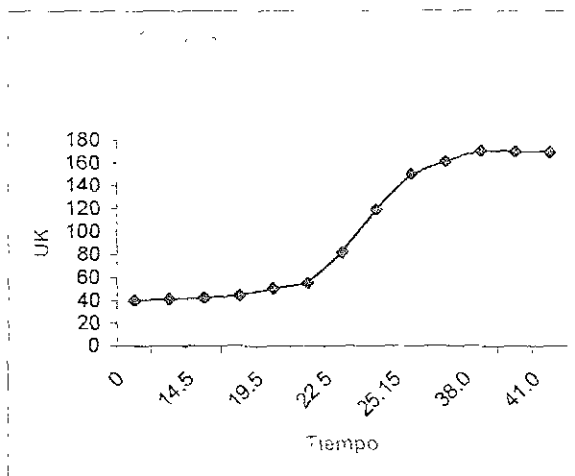


**FIGURA 1. –Colocación de matraces para crecimiento de los cultivos.
Cinética de crecimiento.**

Se determinó su cinética de crecimiento tomando muestras de 6.5ml y leyendo turbidez ó desviación óptica en un fotocolorímetro, con el filtro rojo, mediante una pipeta graduada estéril de 10ml en condiciones asépticas cada toma.

La cinética se practicó en un medio mínimo de sales⁽¹⁹⁾ ajustando el pH con H₂SO₄ 2N y manteniendo el cultivo a 30°C, con agitación en 5 durante 40h mediante el uso de un agitador magnético (1.5cm X 0.8cm), la parrilla se colocó en la quinta unidad.

GRAFICO 1. —Cinética de crecimiento.



Obteniéndose los siguientes resultados en unidades Klett.

Tiempo	U.K.	Tiempo	U.K.
Blanco	39	0 horas	40
12.0 horas	41	14.5 horas	42
18.1 horas	45	19.5 horas	50
21.3 horas	55	22.5 horas	82
24.0 horas	119	25.1 horas	150
37.0 horas	161	38.0 horas	171
39.5 horas	170	41.0 horas	169

TABLA 8. —Valores de las lecturas de la cinética de crecimiento. (UK)*

*UK-Unidades Klett

Se llegó a su fase estacionaria a las 41 horas con una lectura de 169UK y su $\mu_{\text{máx.}} = 0.20916\text{h}^{-1}$ con un coeficiente de correlación de 0.9755 y una ordenada al origen de -0.281065 .

La $\mu_{\text{máx.}}$ = significa que en la fase exponencial de crecimiento, la desviación óptica producida por las bacterias se duplicaba cada 0.20 horas.

De los puntos obtenidos de las 19.15 a las 25.15 horas, escritos arriba se repitió el experimento, agregándose $\cong 10\text{mg}$ (2ml de la solución estándar de cobre), $\cong 20\text{mg}$ (4ml), $\cong 30\text{mg}$ (6ml) y $\cong 40\text{mg}$ (8ml) de CuSO_4 en la fase

logarítmica de crecimiento, aumentando sucesivamente las cantidades cada vez, en cada una de las concentraciones de cobre se dejó agitar por tres días

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Experimento 1.- Adsorción ó complejación de cobre mediante el Thiobacillus:

La valoración del cobre se realizó en el experimento de la siguiente manera:

- De un cultivo puro (medio mínimo de sales sólido pH = 2) del Thiobacilo mutante resistente al Cu^{2+} se sembró mediante inóculo pesado en un medio mínimo de sales pH = 2 (110ml totales, ajustando con ácido sulfúrico 2N) descrito anteriormente. (6 veces en total)
- Pasada la fase exponencial de crecimiento (30h)se agregaron 48.39mg de CuSO_4 (10ml) y se agitó por 5h más a 30°C , medida 5 de agitación, corriéndose un blanco sin bacteria y el matraz con el *Thiobacilo* mutante resistente a Cu^{2+} .
- Se valoró cada uno de los matraces con tiosulfato de sodio SV
- Para poder valorar el matraz con la bacteria se centrifugó al nivel 5 por 30minutos, obteniéndose el sobrenadante azulado. Este fue el que se valoró.

Los resultados fueron los siguientes:

Para el matraz con la bacteria se tomaron alícuotas de 20ml, por vez

El resultado promedio fue obtenido de la siguiente manera.

$$\bar{X} = (17.15\text{ml}) ([0.0137263]) = (0.2354\text{mmoles}) (159.58\text{mg/mmoles})= 37.67\text{mg en los 120ml}$$

	Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3	Matraz 4	Matraz 5	Matraz 6
Valoración l	17.2ml	17.1ml	17.2ml	17.3ml	17.0ml	17.1ml

TABLA 9. -Valoracion de los medios de thiobacillus.

Experimento 2.- Placebo cargado:

Se realizó el crecimiento de una bacteria *Escherichia coli* en el medio mínimo de sales (110ml) a pH = 7, a 30 ° C agitación en 5 con un agitador magnético de 0.8 x 1.5cm y pasada la fase logarítmica de crecimiento (22 h) se aciduló a pH =2 usando ácido sulfúrico 2 N y además 10ml de la solución stock de cobre. Se dejó agitar por 5 h más y se valoró mediante tiosulfato de sodio estándar obteniéndose los siguientes valores:

El resultado promedio fue obtenido de la siguiente manera:

$$X = (21.97\text{ml}) \left(\frac{1}{0.0137263} \right) = (0.301566\text{mmoles}) \left(\frac{159.58\text{mg}}{\text{moles}} \right) = 48.12\text{mg en los } 120\text{ml.}$$

Matraz 1	Matraz 2	Matraz 3	Matraz 4	Matraz 5	Matraz 6
21.9ml	22.0ml	22.1ml	21.8ml	22.2ml	22.0ml

TABLA 10. -Valoración para medios de bacteria *E. coli*.

Media = 21.97ml

Desviación estándar = +/- 0.1385

CV = 0.6303.

μ = media poblacional

σ = desviación estándar de valores.

X = media del estándar.

$t_{\text{student}} = \frac{(X - \mu)}{(\sigma / \sqrt{n})}$

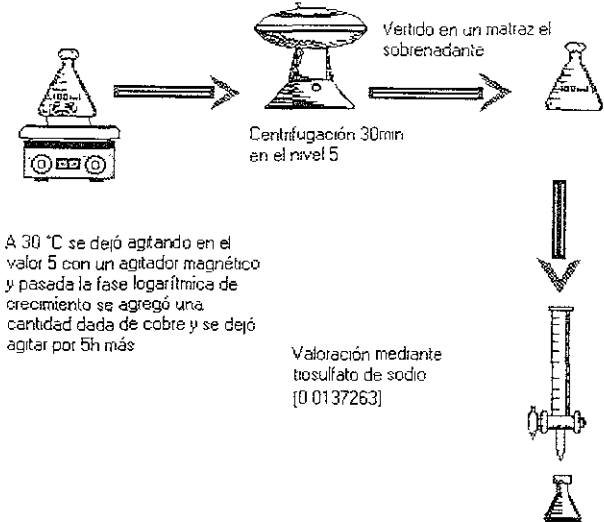
$t_{\text{student}} = \frac{\{(22.08\text{ml} - 21.97\text{ml})\}}{\{(0.1385) / (2.236)\}}$

= 1.78

g.l. = número de ensayos - 1 = 5

TABLA 11. -Cálculo de t de student. para valores de *E. coli*.
(placebo cargado)

Media total = 17.15ml
 Desviación Estándar Total = ± 0.09574
 CV = 0.5582



A 30 °C se dejó agitando en el valor 5 con un agitador magnético y pasada la fase logarítmica de crecimiento se agregó una cantidad dada de cobre y se dejó agitar por 5h más

FIGURA 2 Diagrama de flujo de valoración de muestras.
 En este diagrama de flujo se muestra la manera en que se valoraron las muestras del medio de cultivo con cobre ²⁺

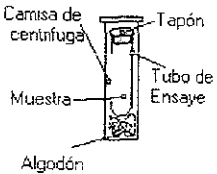


FIGURA 3 Camisa centrifuga.
 Aquí se muestra la manera de preparar una camisa de centrifuga para la separación bacterial

VALORACIÓN DE SOLUCIONES DE COBRE DISEÑO DE COLUMNA DE ADSORCIÓN.

Experimento 3.- A partir de una caja petri se sembró en un medio mínimo de sales(400ml)(pH= 2), en un matraz de 500ml el Thiobacilo mutante resistente a cobre, y se colocó dentro una esponja de composición no definida

Se empacó la columna con la esponja y pasando una corriente de medio mínimo de sales con una concentración de Cu^{2+} de 2.5mM, (pH = 2) tomándose muestras muy diluidas que no se pudieron medir hasta que el medio se agotó. Fue sifoneado mediante un equipo Venoset estéril.

Después de varios días (7 en total) de constante flujo de un medio mínimo de sales estéril con sulfato de cobre, (8 L totales) se comenzó a observar el cobre precipitado en la columna, 18 meses más se necesitarán para la adaptación y completa adsorción del cobre por las bacterias.⁽¹⁹⁾

Se lavó la columna con NaOH, neutralizo y acidifico con ácido acético 6N, y valorándose con tiosulfato de sodio [0.137263]N obteniéndose:
[0.137263] x 7.5ml= 1.02mmoles x 159.68mg/moles = 164.38mg de sulfato de cobre.

Lo cual corresponde al 5.14% de 3.193g de sulfato de cobre en 8l. de medio mínimo de sales

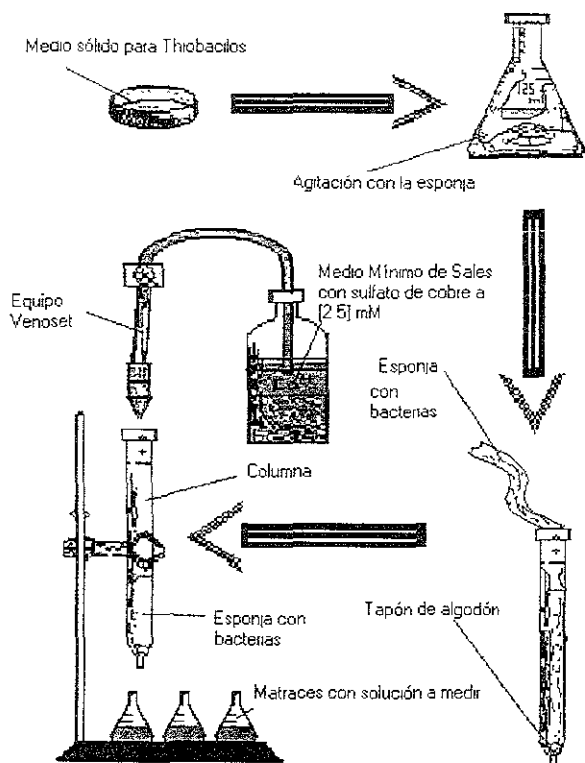


FIGURA 4 Preparación de la columna.

Este diagrama nos muestra como se contruyó la columna de adsorción.

RESULTADOS

Se identificó una bacteria en forma de bastoncillo, Gram negativa, con crecimiento a pH = 2, y a altas concentraciones de cobre 2+, no pudiendo crecer a pH neutral, de características autótrofas y aerobias. La cual corresponde de acuerdo a la bibliografía al *Thiobacillus ferroxidans*⁽²⁾

Medio de crecimiento	Crecimiento del microorganismo en prueba.
MMS*(concentración de NaCl 1.2%, pH = 2)	Negativo
MMS*(crecimiento a pH= 0.5)	Negativo
MMS*(Crecimiento en ausencia de NH ₄ y a pH=2)	Positivo
MMS*(Crecimiento en medio con presencia de glucosa, lactosa, tetratoato de sodio y ausencia de Hierro y cobre 2+)	Negativo

*MMS = medio mínimo de sales

Tabla 7

Thiobacillus.

$X = 17.15\text{ml} \times [0.0137263] = 0.2354\text{mmoles} \times 159.58\text{mg/mmoles} = 37.67\text{mg}$
en los 120ml.

$\sigma = 0.09574$

$\sigma(x_k) = 0.10488$

$\sigma(\bar{x}) = 0.04281$

$U = 0.08563 \quad Y = 17.15 \pm 0.085\text{ml}$

$CV = 0.5582$

E. coli.

$X = (21.97\text{ml}) ([0.0137263]) = (0.301566\text{mmoles}) (159.58\text{mg/moles}) = 48.12\text{mg}$
en los 120ml

$X = 21.97\text{ml}$

$\sigma = 0.1290$

$\sigma(x_k) = 0.1414$

$\sigma(\bar{x}) = 0.0577$

$U = 0.1154$

$Y = 21.97 \pm 0.1154\text{ml}$

Gráfico de Repetibilidad de Valoración de Cobre 2+ a
Diferentes Concentraciones

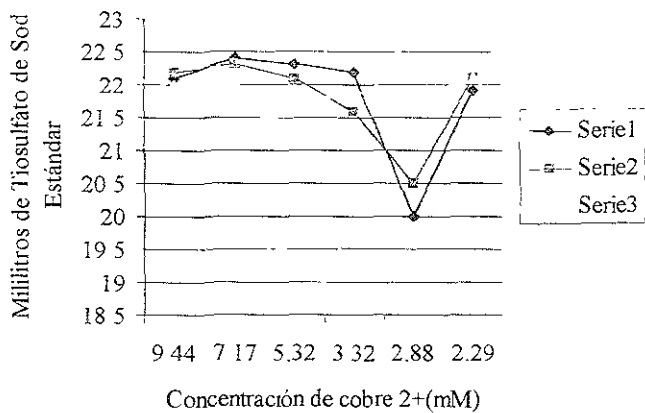


GRAFICO 2. -Volúmenes de valorante a diferentes concentraciones de cobre.

$$CV = 0.6303.$$

Placebo (stock de cobre).

$$X = (22.08\text{ml}) ([0.0137263]) = (0.303076\text{mmoles}) (159.58\text{mg/moles}) = 48.39\text{mg/10ml.}$$

$$\sigma = \pm 0.06871$$

$$CV = 0.311$$

La adsorción ó complejación de cobre 2+ por el Thiobacilo se mide tomando como 100% el valor de cobre 2+ del stock (10ml) 48.39mg, siendo la cantidad no cuantificada de los matraces en donde estaba la bacteria a prueba **22.16%(77.84% ó 37.67mg de CuSO₄ medidos)** realizando la corrección por la cantidad no cuantificada de cobre 2+ en los matraces de *E. Coli* (**0.56% ó 1.15mg**) es de **21.6% no medidos ó 36.51mg de CuSO₄ cuantificados en los medios de cultivo con el Thiobacilo.**

De la columna de adsorción se obtuvo tras el siguiente tratamiento el siguiente porcentaje de cobre:

Se lavó la columna con NaOH, neutralizo y acidifico con ácido acético 6N, y valorándose con tiosulfato de sodio [0.137263]N obteniéndose:

$$[0.137263] \times 7.5\text{ml} = 1.02\text{mmoles} \times 159.68\text{mg/moles} = 164.38\text{mg de sulfato de cobre.}$$

Lo cual corresponde al **5.14%** de 3.193g de sulfato de cobre en 8L de medio mínimo de sales.

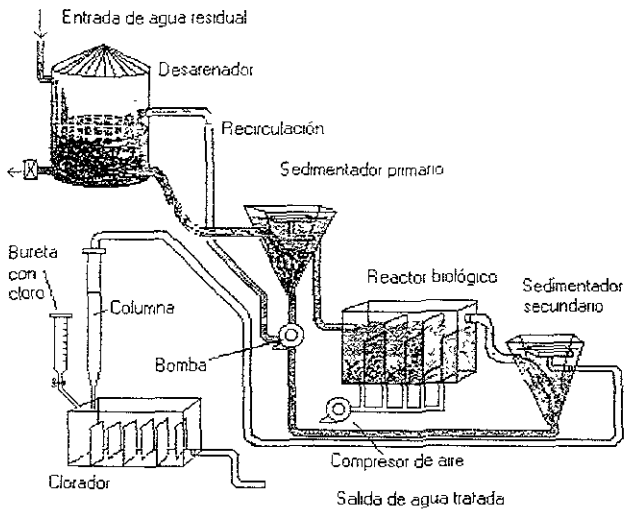


FIGURA 5 Propuesta de planta de tratamiento de aguas normal.
La pasada figura nos muestra una manera en que puede ser diseñada una planta de tratamiento de aguas usando una columna de adsorción.

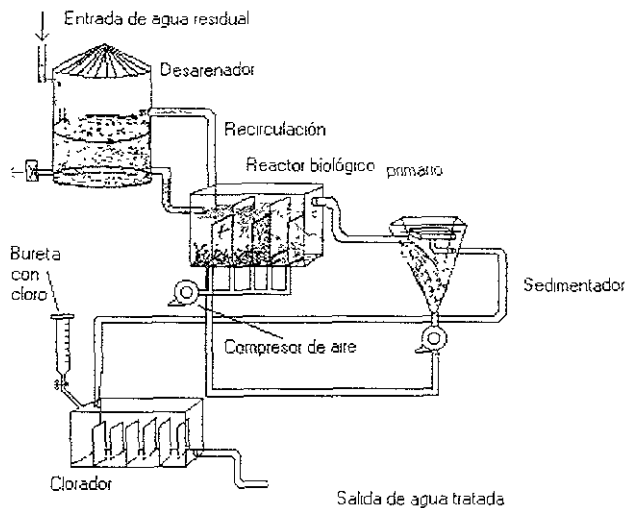


FIGURA 6 Propuesta de planta de tratamiento para aguas residuales con cobre.

La pasada figura ejemplifica una manera en que puede ser diseñada una planta de tratamiento de aguas residuales con cobre usando un reactor y una columna de adsorción con la bacteria aislada

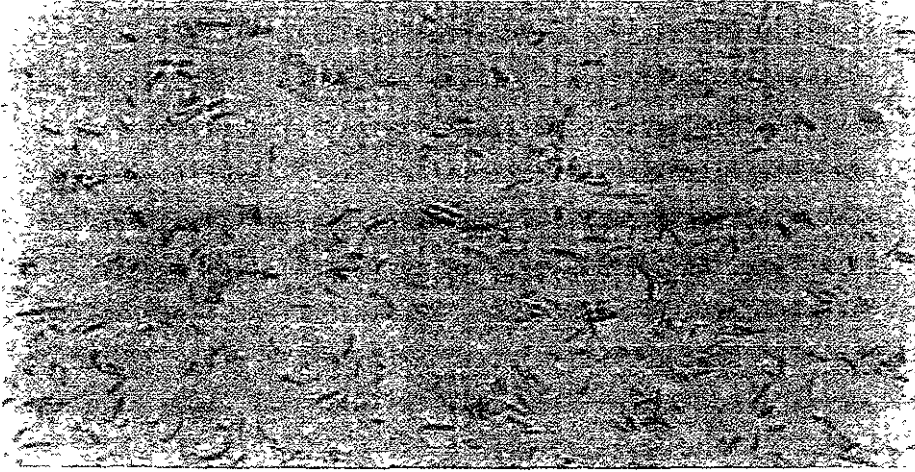


Foto 1 .-Thiobacillus ferrooxidans

Prueba estadística realizada

Criterios de rechazo para valoraciones de cobre 2+. (Ver gráfico 2)

Prueba de Dixon para el valor más alto.

$$T_{\text{calc}} = (x_n - x_{n-1}) / (x_n - x_1)$$

$$T_{\text{calc}} = (22.4 - 22.3) / (22.4 - 20.0) = 0.041.$$

Por tablas T_{22} (18 observaciones) con un 5 % de rechazo = 0.475

Criterio de rechazo $T_{\text{calc}} \leq T_{22}$

$0.041 \leq 0.475$, por lo tanto valor más alto se acepta.

Criterio de rechazo para el valor más bajo.

$$T_{\text{calc}} = (x_2 - x_1) / (x_n - x_1)$$

$$T_{\text{calc}} = (20.5 - 20.0) / (22.4 - 20.0) = 0.2083.$$

Por tablas T_{22} (18 observaciones) con un 5 % de rechazo = 0.475

Criterio de rechazo $T_{\text{calc}} \leq T_{22}$

$0.2083 \leq 0.475$, por lo tanto valor más bajo se acepta..

ANÁLISIS DE RESULTADOS.

La Tabla 6 nos muestra las especies insolubles que se pueden formar en solución con los componentes del medio mínimo de sales (anexo 3) que fue en el cual se realizaron todas las pruebas de crecimiento y análisis de las aguas de desecho (medio mínimo de sales + cobre 2+) Enseguida se muestra el porcentaje de solubilidad a las condiciones en que se trabajó, concentraciones de especies, pH y temperatura de las constantes de solubilidad.

La razón por la cual se usó el medio mínimo de sales y no otro medio es debido a las cualidades de análisis en el cual no presentan interferencia los componentes del medio y lo podemos valorar en la Tabla 12 en donde todos los valores giran con respecto de una media y un CV de 2.8 el cual es aceptable para este tipo de medición(volumetría)

Además se puede evaluar un dato más, a diferentes concentraciones, el punto final puede ser no muy claro, pero de acuerdo a los datos de la Tabla 13 la F Experimental no es tan grande como la F de Tablas y por no ser mayor de uno, entonces la H_0 no se rechaza. La cual dice de esta manera. "Dentro del intervalo de valoración la evaluación visible del punto final no es afectada por las diferentes diluciones del cobre 2+ en el medio mínimo de sales".

La evaluación de la misma cantidad de sulfato de cobre (48.39 mg) a diferentes concentraciones se observa en el Gráfico 2 donde se observan las desviaciones del valor real (22.08ml de tiosulfato de sodio [0.0137263]N) y están expresados los valores de la Tabla 6.

La t de student nos indica que el promedio de valoración del cobre 2+ a diferentes concentraciones (Tabla 12) no se aleja de los valores de evaluación del stock de cobre en una cantidad apreciable como grupo de datos. Siendo el método exacto en cuanto a su desviación producida por la observación del punto final sin interferencia debido a un microorganismo

Los criterios de rechazo de Dixon evalúan la posibilidad de rechazo (5%) de los valores más bajos y más altos de una serie de datos, de acuerdo a

los valores de Dixon el gráfico 2, tanto el valor más bajo como el más alto son aceptados, lo cual dice que los datos tienen una confiabilidad de más del 95%

De acuerdo al gráfico 1 la fase logarítmica de crecimiento desde el inicio de la ascensión exponencial hasta el decremento de su velocidad en gran medida del Thiobacilo se halla entre las 20 y 30 h aproximadamente. Evaluándose después de esta fase el cobre por que la adsorción de acuerdo a valores anteriores está en función de la masa bacteriana y por lo tanto de la turbidez⁽¹⁾

El principal problema se observa en el punto final cuando las soluciones son de concentración 2.2mM (139.7mg de cobre 2+ / litro) y menor de sulfato de cobre es que no se observa con claridad el punto final y cuando se cree que ha terminado la valoración se genera más color por el almidón a los 10 seg. Esto se debe al proceso de difusión del medio acuoso que a concentraciones bajas el complejo cobre-almidón tarda en formarse.

Se pudo corroborar en cinco ocasiones que el yoduro de sodio es igualmente efectivo que el yoduro de potasio en las valoraciones de cobre, no observándose desviaciones estadísticamente significativas.

También se observó que no se produjo liberación de triyoduro por reacción con alguno de los componentes del medio, con lo que se corrobora la titulación específica del cobre.

Conforme disminuyen las concentraciones es más difícil observar el punto final, siendo hasta una concentración de **2.29mM** aceptable, no pasando de una desviación estándar hasta este límite.

Es importante observar que, por ser un equilibrio, a concentraciones bajas es necesario agregar un exceso de yoduro, de manera que para la concentración mínima de cobre "leible", se agregó 1.8g de yoduro de potasio. (en 48.39 mg en 110 ml + el volumen del valorante) 132.1ml totales y 0.6ml de almidón TS.

En la tabla 10 se utiliza la *E. coli* como factor de comparación entre la bacteria probada y una común. Con lo cual se puede realizar una comparación de adsorción ó absorción Y la corrección correspondiente.

La cantidad de cobre adsorbido en la pared microbiana ó precipitado mediante algún proceso biológico como la segregación de melationinas (proteínas segregadas con alto porcentaje de aminoácidos con grupos sulfhidrilo) fue determinado, aunque no el proceso por el cual se dió, pero la reducción de la concentración de cobre del medio es de gran importancia para la lucha contra la contaminación acuática. Siendo el ión Cu^{1+} amarillo, no se observó cambio de color a verde en el medio, por lo cual se descarta la presencia de este ión.

La esponja usada se desmorona al usar sosa cáustica para recuperar el metal de la columna, pero ofrece una buena resistencia al paso del medio con cobre sin aparente destrucción por la acidez del medio ó por el microorganismo.

La invasión de especies fungales a la biopelícula sería uno de los principales problemas que afectarían la remoción del cobre en el agua contaminada, sin embargo la presencia de estas especies no es común en aguas contaminadas con este metal.

La cantidad de cobre que se libera en el campo I es pequeña de acuerdo análisis realizados en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares⁽⁶⁾ usando un equipo de absorción atómica o comúnmente conocido como flamometría y de estos resultados se deduce que es no significativa para su recuperación, sin embargo la cantidad liberada por industrias y minas que lavan las vetas usando ácido para obtener hierro, cobre, cadmio, etc. Así sus aguas llevan una gran cantidad de metales y las vuelven potencialmente tóxicas

Los altos impuestos y las pocas soluciones al problema así como errores en la liberación de desechos provoca que ciertas empresas liberen sus residuos a las aguas municipales.

Los soportes para bacterias deben de presentar ciertas características físicas y químicas fundamentales, como lo es un área superficial grande, poco peso, bajo grado de biodegradación, resistencia a la tracción física acuosa, además de bajo costo, buenas características de flujo y baja toxicidad para la especie bacterial adsorbida ó que ha formado su colonia en la superficie del material a forma de biopelícula.

Las ventajas observadas de el tratamiento biológico con respecto de los tratamientos de aguas residuales de otros tipos ya han sido nombrados anteriormente y se observa principalmente en la economía que estos presentan con respecto de tratamientos físicos y químicos.

El uso de la tecnología microbiana estudiada nos da por resultado la posible recuperación del metal de minas, las cuales han sido tratadas mediante el uso del ácido, grandes precipitados de hierro y otros metales se observan siendo arrastrados por el cauce de la corriente de esta agua residuales, perdiendo grandes cantidades del metal y contaminando mantos acuíferos, el mar y áreas terrestres colindantes al agua.

Debido a este tipo de tratamientos muchos lagos en Europa han muerto, pues a $\text{pH} = 5$, los peces no pueden sobrevivir, así como otras formas de vida acuática.

Los metales llevados por esta corrientes matan y contaminan todos los ecosistemas circundantes, pues incluso las especies terrestres no pueden usar esta fuente de agua y se vuelven también inútiles para el hombre.

La recuperación del metal para evitar la pérdida y dispersión del contaminante metal es de gran importancia ecológica.

La bacteria adsorbe cobre pero también tiene resistencia a otros metales por lo que posiblemente se puede adaptar para adsorber otros metales pesados divalentes.

Se han hecho estudios de la simbiosis entre dos especies bacterianas y se observa una adsorción del metal mucho mayor que con una sola, por lo que el uso de este microorganismo junto con otros será de mayor ayuda y objeto de estudio próximo.

Muchos ríos en México están contaminados pues las aguas industriales y municipales son arrojadas directamente sin ningún tratamiento, pero tarde o temprano se tendrán que tratar, pues la población va en aumento y las necesidades de agua potable crecen día a día además de que este tipo de contaminación es potencialmente infecciosa.

Los soportes para bacterias deben de presentar ciertas características físicas y químicas fundamentales, como lo es un área superficial grande, poco

peso, bajo grado de biodegradación, resistencia a la tracción física acuosa, además de bajo costo, buenas características de flujo y baja toxicidad para la especie bacteriana adsorbida ó que ha formado su colonia en la superficie del material a forma de biopelícula. Debe de desarrollarse un soporte que no sea tóxico para las bacterias y sufra destrucción por el flujo acuoso, además de ser barato, pues la poliacrilamida carece de estas características. Pero este tipo de soportes tienen que tener carga eléctrica positiva para poder retener a los microorganismos.

Para el caso en especial del que trata este trabajo, debido a las características del agua residual que se trabaja (agua residual a pH cercano a 2 y altas concentraciones de metales) los organismos comunes de una planta de tratamiento ordinaria no logran sobrevivir y generar su efecto biodegradativo.

Subsiguientes estudios de la resistencia de las bacterias a los metales pesados como mercurio, plomo, cadmio ó cromo deberán ser realizados con las bacterias aisladas, para su uso en el tratamiento de las aguas residuales. Los estudios que pueden seguir a esto son muy amplios y de mucho futuro para la salud de la población que cada vez carece más de agua de calidad

El uso de una columna es factible, pero para la absorción de metales pesados que a pH neutral se hallen en forma ionizada y no una forma precipitada, así el cadmio, cromo y otros metales son factibles de adsorberse en una columna a las condiciones de flujo adecuadas de acuerdo al tipo de planta de tratamiento.

Se prepararon los compuestos necesarios para la síntesis de los medios de cultivo.

Tras un análisis de las condiciones de crecimiento y características físicas se aisló una bacteria del género llamado Thiobacillus.

Al pH presente en las aguas del campo I que es un promedio de 7, a ese pH las especies de cobre precipitan, por lo que se pueden separar por filtración, pasando las pruebas de la Norma Oficial Mexicana, como se practica en la industria Coproquím, en la cual se sintetizan antifúngicos a base de cobre para uso agrícola.

Sin embargo en las condiciones de ciertas industrias es aplicable el uso de bacterias con estas cualidades.

La introducción de una columna de adsorción al sistema de PROTOTIPO 2000 es posible, pero deben de ser calculadas las dimensiones adecuadas al flujo que presente este y probadas en el prototipo con aguas contaminadas con cobre a pH neutral (funcionando como filtro) y a pH ácido (funcionando como sistema de adsorción)

Parece mejor realizar un reactor biológico el cual no tiene problemas de flujo, por el crecimiento bacterial. En el reactor, el flujo es mayor, las condiciones aerobias mejoran la adsorción y el crecimiento bacterial y por tanto la biomasa. Mediante el uso de un polímero precipitar las bacterias en forma de flóculo, y separando en mayor medida el metal, pudiendo ser un proceso más continuo y no por lote como lo puede ser la columna.

La columna de adsorción necesita más tiempo para activarse al máximo y llegar a quelar a la mayoría del cobre, hasta ahora sólo adsorbe un porcentaje del 5.2% y la columna según Lynn E. Macaskei es necesario que se halle 18 meses seguidos, para un 98 % de adsorción de los metales.

CONCLUSIONES

1.- Se logró aislar una bacteria resistente al cobre iónico a pH = 2, la cual es de vida libre y crece en condiciones similares en su habitat.

2.- Se identifico el microorganismo mediante su cultivo en diferentes medios para microorganismos **acidófilos** teniendo crecimiento positivo en el medio del *Thiobacillus ferroxidans*.

3.- Las condiciones de crecimiento fueron a pH ácido donde el cobre es soluble y el microorganismo aislado ejerce su efecto de adsorción, además de tener condiciones mínimas de nutrición para su desarrollo en un medio mínimo de sales.

4.- Su introducción el Prototipo XXI-2000, sería mediante el uso de una columna de vidrio con material de empaque resistente al flujo que presente la planta piloto en el momento de su arranque, la esponja artificial comercial de acuerdo al desarrollo experimental no inhibe el crecimiento bacterial y permite el paso regular del agua contaminada. Esta agua contaminada deberá presentar como se mencionó anteriormente un pH bajo, entre 1 y 4.

ANEXO No 1.
EQUIPO.

- Balanza analítica, OHAUS Modelo API 105 con capacidad de 110g x 0.1mg.
- Microscopio, Rossbach Kyowa México de tres objetivos(10x, 40x,100x).
- Autoclave, Industrias Steele de México Modelo 21 L.
- pH Meter, M120 Corning de México tipo EN 1604 PP-3.
- Incubadora, Modelo HDP-334 MAPSA, Proveedor Científico.
- Colorímetro fotoeléctrico, Klett-Summerson Modelo 800-3 USA.
- Parrilla para laboratorio, Corning Modelo PC 351.
- Horno, THERMOLYNE, tipo 1500 IOWA con capacidad de 1200°C
- Bomba de vacío, Koblenz, Modelo FB-1500 con una potencia de 0.187 KW.

ANEXO No 2.
MATERIALES.

- Matraz Kitazato de 500ml.
- Botellas Wheaton
- Vasos de precipitados de 50ml, 100ml
- Probeta graduada de 100ml.
- Cubrebocas, cofia y lentes de seguridad
- Matraces Erlenmeyer de 125ml y 500ml
- Espátula analítica.
- Mecheros Bunsen y Fisher.
- Tubos con tapón de rosca de 10ml de capacidad.
- Tubos con tapón de rosca de 25 ml de capacidad.
- Termómetro.
- Asas bacteriológicas
- Probeta graduada de 10ml.
- Gasa, algodón, hisopos estériles
- Papel filtro Whatman #1, #40, papel filtro de fibra de vidrio y con poro de 0.4 micrometros
- Pipetas volumétricas de 10ml.
- Agitador magnético de 1.5cm x 0.8cm.

ANEXO No 3.
MEDIOS DE CULTIVO.

- Agar Nutritivo, Merck, (450g).
- Agar purificado y exento de inhibidores, Merck, 450g
- **Medio para especies thiobacilos.**

⇒ Sulfato de magnesio heptahidratado.....	0.5g
⇒ Sulfato de amonio.....	0 15g
⇒ Cloruro de potasio.....	0 05g
⇒ Fosfato diácido de potasio.....	0.05g
⇒ Nitrato de calcio.....	0 01g
⇒ Sulfato ferroso heptahidratado(solución)...	10ml

Composición de la solución de sulfato ferroso por 10ml:

Sulfato ferroso heptahidratado.. 1g

Preparación de la solución de sulfato ferroso.

Disuelva el sulfato ferroso heptahidratado en un matraz aforado con agua destilada y desionizada llevando a un volumen de 10ml.

Esterilice por medio de filtración. (millipore).

Preparación del medio.

Adhiera todos los componentes excepto la solución sulfato ferroso heptahidratado y los disolví en una cantidad conveniente de agua(la mitad) y llevé a 990ml. Caliente suavemente hasta completa disolución y ajuste el pH a 3.5. Colocar en autoclave 15min, 15psi-121 ° C. Deje enfriar a 45-50 ° C. Y agregue asépticamente los 10ml de la solución de sulfato ferroso Asépticamente distribuya en matraces ó tubos. Para desarrollar el medio

sólido es necesario lavar con agua purificada el agar y debe de estar a una concentración al 0.3% y 0.4%.⁽²⁶⁾

• **Medio líquido mínimo de sales**⁽¹⁷⁾ el cual tiene la siguiente composición por litro:

- ⇒ Sulfato de amonio... .. 0.96g
- ⇒ Sulfato de magnesio... ..0.60g
- ⇒ Sulfato ferroso..... 0.03g
- ⇒ Fosfato diácido de potasio... 0.297g
- ⇒ Cloruro de potasio.. 0.62g
- ⇒ Glicerol 0.64g
- ⇒ Azufre... .. 0.20g

Ajuste el pH inicialmente a 3.5 usando ácido sulfúrico 2N reduciéndolo paulatinamente hasta un pH = 2, a través de una serie de cultivos bacterianos consecutivos en medio líquido.

Se pesan los componentes, y se colocan en el autoclave por 15min.121° C y 15psi de presión, dejándose enfriar **lentamente** y a 50° C aproximadamente y guardándose para su posterior uso

ANEXO No 4.
REACTIVOS.

- Reactivo de Ehrlich, Sigma (250ml).
- Aceite de inmersión.
- Peptona de caseína, BIOXON, 500g.
- Maltosa, Difco, (500g)
- Acido Acético Glacial, ácido clorhídrico, ácido sulfúrico
- $Mg(SO_4)$, NaCl, $(NH_4)_2SO_4$, $K_2H(PO_4)$, $CuSO_4 \cdot 5 H_2O$, $Na_2H(PO_4)$, $Ca(NO_3)_2$ Glicerol, Cristal Violeta, Safranina, α -naftol, Acetona, Alcohol Etilico y Azufre
- **Reactivo de Gram.**

La mezcla de alcohol:acetona 1:1, se prepara en el momento y la solución de cristal violeta se prepara un día antes mezclando:

Solución A :

Cristal violeta 2g
Alcohol al 95% 20ml

Solución B :

Oxalato amónico 0.8g
Agua destilada 80ml

Se mezclan las dos soluciones, y se dejan reposar 24 h, filtrándose al final.⁽¹⁾

• **Preparación de la Solución Paliativa para el Ajuste del pHMetro.**

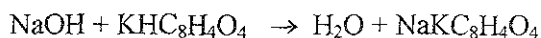
Solución 0.2M de NaOH.

Se pesaron 6.5064g de NaOH y se llevaron a 200 ml con agua hervida y destilada para evitar la presencia de CO₂

En papeles de aluminio se pesaron por separado 1.0139g, 1.0249g y 0.9993 g de biftalato de potasio.

Se valoró el biftalato de potasio en 15ml de agua sin CO₂ y con 2 gotas de fenolftaleína TS con los siguientes volúmenes en orden consecutivo: 6.3ml, 6.4ml y 6.2ml.

La reacción es la siguiente:



Con la correspondiente estequiometría se calculó la concentración promedio:[0.78802],[0.784126] y [0.78920].

Media = [0.784519]M.

Se tomaron 25 ml mediante una pipeta volumétrica y se llevaron a 100ml para la concentración indicada por la USP siendo de **[0.196129]M.**

Solución 0.2M de KH₂PO₄.

³Se pesaron 2.722g de KH₂PO₄ y se llevaron a 100ml

Preparación de la Solución Paliativa.

Se tomaron 50ml de la solución de KH₂PO₄ agregándose a un matraz aforado de 200ml, adicionándose después 29.67ml de la solución [0.196129] de NaOH, llevándola a 200ml con agua destilada para una **solución pH = 7.**

Por medio de esta ecuación se realizaron los cálculos

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log\left(\frac{[\text{B}^-]}{[\text{A}^+]}\right)$$

$$\text{pH} = 7.2 + \log\left(\frac{[\text{OH}^-]}{[\text{H}_2\text{PO}_4^-]}\right).$$

Preparación del $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Se pesan 100g de limadura de Fe^0 , agregándose en un matraz de 500ml, 50ml de H_2SO_4 fumante. Se tapa bien, dejándose reposar por 3 semanas. Se filtra la solución usando papel filtro de fibra de vidrio, colocándose el precipitado en un recipiente adecuado, con éter para evitar la oxidación del hierro y fuera del alcance de la luz.

Almidón TS.

Se pesan 10g de almidón soluble y se mezclan con 10mg de Rojo de Mercurio II y la suficiente cantidad de agua para formar una pasta fina.

Al mismo tiempo se hierven 100ml de agua, por 5 minutos para eliminar el CO_2 y a la pasta se agrega el agua, hirviéndose por dos minutos más, se deja enfriar y se usa la solución clara para las valoraciones.⁽³¹⁾

Nota: Después de tres meses ya no se puede usar ó que pierda la claridad la solución. Lo que suceda primero

ANEXO No 5. VOLUMETRÍA.

El método de volumetría para medir el cobre en solución se desarrollo en la estandarización del stock de cobre.

Los colores de las titulaciones fueron como sigue:
Azul claro(alicuota) → amarillo ocre(al agregar el yoduro de potasio)
→amarillo verdoso casi transparente(al ir titulando)→ morado al agregar el almidón cerca del punto final y blanco al terminar la titulación

El cobre se valoró mediante una volumetría y se tuvieron que preparar las siguientes soluciones.

Estandarización de la solución de tiosulfato de sodio.

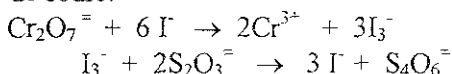
Se pesó 13.2g. de tiosulfato de sodio y se llevó a 100ml, la solución se estandarizó mediante dicromato de potasio de la siguiente manera:

$K_2Cr_2O_7$, 99.9% pureza, P.M =294.18g/mol, se pesaron:

1. 0.2155g,
2. 0.2178g y
3. 0.2121g.

Para la primera se gastaron 32.5ml de $Na_2S_2O_3$
32.2ml para la segunda y
31.2ml para la tercera.

De acuerdo a la siguiente reacción se obtuvo la concentración de la solución de tiosulfato de sodio:



$0.2155g K_2Cr_2O_7/294.18g/mol = 0.00073254moles$

$0.2178g K_2Cr_2O_7/294.18g/mol = 0.00074036moles$

$0.2121g K_2Cr_2O_7/294.18g/mol = 0.00072098moles$

Mediante las correcciones por pureza y por estequiometría se calcularon las siguientes concentraciones:

[0.135100], [0.1381788] y [0.1385121], en orden consecutivo, determinándose una concentración promedio de tiosulfato de sodio VS* de.

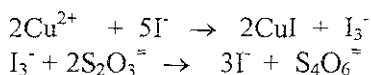
[0.137263], con una desviación estándar +/- [0.001535]

De la pasada solución se tomó 10ml mediante una pipeta volumétrica y se llevó a 100ml en un matraz aforado. Teniendo una concentración final de [0.0137263] y con esta solución se valoró las soluciones en que se hallaba la bacteria y un blanco que no tiene al microorganismo. ^(13,31)

ANEXO No 6.
SOLUCIONES.

Estandarización de la solución de sulfato de cobre.

El cobre se valoró mediante las siguientes reacciones:



Se colocaron 10g aproximadamente de sulfato de cobre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ pm = 249.5 g/mol) en una mufla y se calentaron a 250 ° C, al enfriarse del polvo se pesó 1.25g y se disolvió en 250ml de solución acuosa acidulándola a pH 2 mediante ácido sulfúrico 2N. Obteniéndose una solución presuntiva de 50mg / 10ml.

Se tomó 10ml de la solución anterior con una pipeta volumétrica y se tituló seis veces con el tiosulfato de sodio estándar [0.0137263]N, (el mismo estándar diluido 10 veces) alícuotas de 10ml de la solución stock de cobre. Se agregó 800mg de yoduro de potasio a cada titulación y cerca del punto final 0.6ml de almidón TS a cada una.

Los volúmenes de valoración de tiosulfato de sodio estándar fueron:
22.1, 22.1, 22.2, 22.1, 22.0 y 22.0ml.

Media = 22.08ml

Desviación estándar = +/- 0.06871ml.

CV = 0.311

La concentración de la solución de sulfato de cobre estándar fue de **48.39 mg/10ml.**

ANEXO No 7

ANADEVA

Diagrama de flujo de valoraciones de cobre. Reproducibilidad y cálculo de la F de Fisher.

1. 10ml de la solución stock de cobre + 100ml de medio pH = 2 (2.29mM)
2. 1.8g de KI.
3. Valoración con tiosulfato de sodio [0.0137263]N.
4. Cerca del punto final se agrega 0.6ml de almidón TS
5. Todo, seis veces desde 1

Se hicieron las mediciones de los volúmenes de tiosulfato de sodio y después de seis titulaciones el volumen promedio fue de 22.1ml (48 40mg/10ml promedio)

Siendo el real de 22.08ml, como se ve el valor no se aleja de la realidad, más de un 3%, siendo este error no significativo. (48.39mg/10ml el real).

Para demostrar la repetibilidad del método a diferentes concentraciones se realizaron las siguientes valoraciones.

mM	Serie1	Serie2	Serie3	Medias	Yi
9.44	22.1	22.2	22.0	22.10	66.3
7.17	22.4	22.3	22.0	22.23	66.7
5.32	22.3	22.1	21.8	21.06	66.2
3.32	22.2	21.6	21.8	21.97	65.6
2.88	20.0	20.5	22.3	20.93	62.8
2.29	21.9	22.1	22.1	22.03	66.1
			Desviación Estándar =0.61264	Media Total 21.87	$Y_i = 393.7$ $= Y^2 = 154999.69$ C.V. = 2.8

TABLA 12. -Valoraciones de cobre 2+ a diferentes concentraciones.

Factor de Variación	de Grados de Libertad (cantidad=6) (replicas=3)	Suma de Cuadrados	Cuadrados Medios	$F_{0.95}=3.11$
Dilución (concentraciones)	$a-1 = gl_D$ $6-1 = 5$	$SC_D = Y_i^2./r - Y^2../ar = 3.38277$	$SC_D/gl_D=0.67655$	0.67655
Error	$ar - a = gl_E$ $[(6)(3)]-6 = 12$	$SC_E = Y_{ij}^2/- Y_i^2./r = 3.37400$	$SC_E/gl_E=0.28166$	0.28166
Total	$ar-1 = Total$ $[(6)(3)]-1 = 17$	$SC_D+SC_E = 6.75$		

TABLA 13. – ANADEVVA.

$Y_i^2./r$	8617.85
$Y^2_{i.}$	25843.43
$Y^2_{..}$	154999.69
$Y^2../ar$	8611.09
Y_{ij}^2	8617.85

TABLA 14. – Valores de cálculo para la suma de cuadrados.

H_0 = El efecto de dilución no tiene efecto sobre el punto final de los volúmenes de valoración de cobre 2+ en el intervalo de medición usando la solución estandarizada de tiosulfato de sodio[0.0137263]N

H_a = La dilución sí tiene efecto sobre el punto final de los volúmenes de valoración de cobre 2+ en el intervalo de medición con la solución estandarizada de tiosulfato de sodio[0.0137263]N

Cálculo de exactitud.

μ = media poblacional.

σ = desviación estándar de valores

\bar{X} = media del estándar.

$$t_{\text{student}} = (\bar{X} - \mu) / (\sigma / \sqrt{n})$$

$$t_{\text{student}} = [(22.08 \text{ ml} - 21.87 \text{ ml})] / [(0.6126) / (2.5258)] = 0.8558$$

g.l. = número de ensayos - 1 = 17

H_0 = La cantidad de cobre agregada al medio mínimo de sales a las diferentes concentraciones sí se midió.

H_a = La cantidad de cobre agregada al medio mínimo de sales a diferentes concentraciones no se pudo medir.

TABLA 15. - Cálculo de la "t" de student. para calculo de exactitud de valoraciones.

Cálculo del grado de incertidumbre de las mediciones de cobre 2+ a diferentes diluciones (ver gráfico 2).

\bar{X} = gran media

σ = desviación estándar

$\sigma(x_k)$ = desviación estándar poblacional

$\sigma(x)$ = incertidumbre tipo A

$$Y = \bar{X} \pm \sigma(\bar{x})$$

$$X = 21.872 \text{ ml} \quad \bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n x_k$$

$$\sigma = 0.61260 \quad \sigma = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{k=1}^n (x_k - \bar{X})^2}$$

$$\sigma(\bar{x}) = 0.1444 \quad \sigma(\bar{x}) = \frac{\sigma(x_k)}{\sqrt{n}} \quad (24)$$

$$Y = 21.87 \pm 0.1444 \text{ ml}$$

BIBLIOGRAFÍA

(1)ÁLVAREZ MANRIQUE Clara Inés, Susana Mendoza Elvira, Manual básico de bacteriología, México. Editorial UNAM 1994,p.p.82,114,115,116,122,

(2) BALLOWS Albert, H.G Trüper., The Prokaryotes
2da Edición, Springer-Verlag, 1992,p.p.1283-1299,2744-2751.

(3)BERNARD D Davis Tratado de Microbiología, 3ra Edición, Salvat Barcelona, España, 1985, p.23, 33 y 35

(4)BITTON Gabriel, Wastewater Microbiology, Wiley-Liss, USA, 1994, p 68-72, 296,297, 301, 302 y 303.

(5) BUDAVARI Susan, O' NEIL Maryadale.
The Merck Index, 12th edition, Merck Research Laboratories, Whitehouse Station, N.J. USA, 1996.

(6)CAMARGO Adriana, Análisis Elemental y fisicoquímica del agua Residual de la UNAM Campus Cuautitlán Campo I previo a su tratamiento en una planta piloto. 1999

(7) CANDEHEAD A.F. Grant y W. H. Vinin. "Canadian Chemistry Met."
Synthesis of manganese acetate and their solubility 1924 Núm. 8,
p p.64-65.

(8)DREISBACH R. Toxicología Clínica, El Manual Moderno, 5ta Edición, México D.F. 1984 p.386, 387.

(9)Environmental Science and Technology, Vol. 34, Núm. II, June 12, 2000 p.256.

(10)FAISON D, Brendlyn, Enciclopedia of Microbiology, "Hazardous Waste Treatment, Microbial Technologies" Vol. II, Oak Ridge National Laboratory, USA, 1992,p 335-349.

(11)GADD M Geoffrey, Enciclopedia of Microbiology, “*Heavy Metal Pollulants :Enviromental and Biothechnological Aspects*” Vol II, University of Dundee, USA, 1992,p.351-360.

(12)GENEVIEVE Gray Young, Microbiología de Witton’s, 3^{ra} Edición , Mac Graw Hill, México, 1972, p.723.

(13)GURNHAM Fred C. Industrial Waste Water Control, Academic Press 1971, p.262, 263, 264.

(14) HAMBLING Susan G, Macaskei Lynne E. and Alastair C.R. Dean. “Journal of General Microbiology” Phosphatase Syntesis in a *Citrobacter* sp. Growing in Continuous Culture U.K. 1987, Núm.5 p.p.2743-2749.

(15)HARRIS C. Daniel, Análisis Químico Cuantitativo, Grupo Editorial Iberoamérica, México, 1992, p.120 – 127.

(16)IMHOFF Karl, Sewage Treatment, 2nd Edition John Wiley & Sons New York 1956 p. 79, 80, 274

(17) LEDERBERG, Joshus, Enciclopedia of Microbiology Academic Press Inc. 1992 USA, p.p.335-349,361-369.

(18) KRIEG R. Noel y G. Holt John, Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology Williams &Wilkins, Vol. I, 1984, USA,p p.410, 417-426,460,461,478-486,502.

(19) MACASKEI L.E., Blackmore J.D: and Empson R.M. “FEMS Microbiology Letters” Phosphatase overproduction and enhaced uranium accumulation by stable mutant of a *Citrobacter* sp. Isolated by a novel method. U.K. 1988, Núm.55 p.p.157-162.

(20)MACASKEI E. Lynne Journal of Chemical Technology and Biotechnology An Immobilized Cell Bioprocess for the Removal of Heavy Metals from Aqueous Flows. U.K. 1990, Núm 49 p.p. 357-379..

(21)MACASKEI. L.E., Wates J.M. and Dean A.C.R.. “Biotechnology and Bioengineering”, Cadmium Accumulation by a *Citrobacter* sp. Immobilized on Gel and Solid Supports: Applicability to the treatment of Liquid Wastes Contaning Heavy Metal Cations U K. 1987, Vol.30 p.p.66-73

- (22)MAC FADIN Jean F, Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias. Editorial Médica Panamericana.México,1990.
- (23)MALENSTRONY Joel, Biochemistry of Bacterial Growth, 2nd Edition Blackwell Scientific Publications, London, Great Britain, 1973, p.524.
- (24)NAMAS NIS 3003, Edition 8th Teddinton Middlesex England, 1995, p.1-15.
- (25)PELCZAR, Elementos de Microbiología. Mc Graw Hill, México, 1984, p 106 y 107.
- (26)REED Gerald, Prescott & Dun's Industrial Microbiology, 4th Edition AVI Publishing Company Inc USA, 1982, p.717
- (27)RONALD M. Atlas, Richard Bartha, Microbial Ecology Fundamentals and Applications, 2nd Edition Benjamin and Cummings Publishing Company, USA, 1987, p.344
- (28)RONALD, M. Handbook of Microbiological Media Atlas. CRC 1993 USA p.p.51, 87,88,467,559,572,573.
- (29)RINGBOM, Formación de Complejos en Química Analítica, Madrid, España Alhambra 1979, p.p.343, 399
- (30)SKOOG A. Douglas, Química Analítica, 6^{ta} Edición Mc Graw Hill México, 1995,p 584-593.
- (31)SMITH Robert M., Critical Stability Constants, Plenum Press, Vol. 4 Inorganic Complexes, USA, 1994, p.6, 55, 57, 61, 76, 79, 83, 86 y 105.
- (32)TAPAN K Misra, Enciclopedia of Microbiology, "Heavy Metals Bacterial Resistances" Vol II, University of Dundee, USA, 1992, p.361-369
- (33)THINES M.D. Clinical Toxicology, Lea & Febiger USA Philadelphia, 1972, p.175.
- (34)USPXXI, Sixteenth Edition USP Pharmacopeial Convention Easton PA USA, 1984, p. 255, 1420, 1430, 1432, 1433.