



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO



# EFFECTO DE FACTORES AMBIENTALES (pH, TEMPERATURA Y SALINIDAD) EN LA BIOSORCIÓN DE METALES POR LA BACTERIA *Bacillus jeotgali* CEPA U3

## T E S I S

que para obtener el grado académico de:  
MAESTRO EN CIENCIAS DEL MAR  
(QUÍMICA ACUÁTICA)

Presenta  
VICTOR ALFONSO RODRÍGUEZ TIRADO

Director de Tesis:

Dr. Carlos René Green Ruíz

Comité Tutorial y Jurado:

Dr. Federico Páez Osuna  
Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala  
Dr. Mario Villalobos Peñalosa  
Dr. Jesús Gracia Fadrique

Mazatlán, Sinaloa, Junio de 2006



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.

A mi amigo Jesús, por haberme acompañado durante todo este tiempo, a pesar de las adversidades estuviste siempre conmigo. Gracias Señor.

A mis padres y hermanos, por darme su amor de familia y confiar en mí.  
Los amo.

Para Aidee y Ana Velia, fuentes de inspiración para mi corazón. Gracias por su apoyo y su confianza. Las amo mis pequeñas.

Victor Alfonso Rodríguez Tirado

## 9. AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Carlos René Green Ruiz, director de este trabajo, las facilidades y el apoyo prestado para la realización del mismo; sobre todo por su amistad y calor humano. También a los Drs. Bruno Gómez Gil Sala Rodríguez, Federico Páez Osuna, Mario Villalobos Peñalosa y Jesús Gracia Fadrique, por sus acertados comentarios y aportaciones a esta investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante mis estudios de posgrado, así como a la Universidad Nacional Autónoma de México por la beca otorgada para el desarrollo de los mismos y a la Dirección General de Educación Superior Tecnológica de la SEP por su apoyo parcial a través del proyecto "Diagnóstico y alternativa de la mitigación de la contaminación por Cd, Cr, Hg y Pb, en dos sitios con actividad minera en el sur del Estado de Sinaloa" Clave 911-05-P. Asimismo, a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico por su apoyo a través del proyecto "Estudio comparativo de adsorción de metales por caolín enriquecido con ácidos húmicos y bacterias *Bacillus jeotgali* cepa U3 como alternativas para la remediación de aguas contaminadas", Clave IN111406-3.

Mis agradecimientos también al Quím. Humberto Bojórquez Leyva por su valiosa ayuda en el manejo del equipo de laboratorio; al Lic. Pedro Allende Rosales y Ma. Clara Ramírez Jáuregui por su ayuda en la búsqueda bibliográfica; a los encargados del centro de cómputo del ICMYL, unidad Mazatlán, Mat. Germán Ramírez Reséndiz y Lic. Carlos Suárez Gutiérrez. Asimismo doy las gracias a la Lic. Margarita Cordero Ruiz, auxiliar del posgrado, por su gran amabilidad y ayuda en los trámites; al Dr. José Salgado Barragán, por su apoyo en el muestreo de sedimentos y bacterias; al Dr. Alberto Abreu Grobois por las facilidades brindadas para el uso de equipo del laboratorio de genética, y a la M. C. María de los Ángeles Herrera por su apoyo en el uso de los equipos de este laboratorio. Agradezco también a la M. C. Roxana Atondo Mexia y a la QFB. Carmen Bolán M., técnicas del laboratorio de bacteriología del CIAD Mazatlán, por su gran

amabilidad y ayuda en la preservación e identificación genética de la bacteria. Al personal de la Unidad Académica Mazatlán, del Instituto de Ciencias del Mar, por el cordial apoyo que brindan a los estudiantes. Y por supuesto a mis compañeros de generación, por todos los momentos de grata compañía y amistad brindados. Gracias a todos.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	1
1. INTRODUCCIÓN .....	2
2. ANTECEDENTES .....	5
2.1 <i>Biosorción</i> .....	5
2.2 <i>Biosorción de metales por microorganismos</i> .....	6
2.3 <i>Biosorción de metales por bacterias del género Bacillus</i> .....	10
2.4 <i>Equilibrio y cinética en el proceso de biosorción</i> .....	13
2.5 <i>Biosorción en sistemas multimetálicos</i> .....	15
3. OBJETIVOS .....	18
3.1 General.....	18
3.2 Particulares .....	18
4. HIPÓTESIS .....	19
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	20
5.1 <i>Aislamiento de las bacterias</i> .....	20
5.2 <i>Enumeración y purificación de las bacterias</i> .....	20
5.3 <i>Selección de la bacteria de estudio</i> .....	21
5.4 <i>Identificación genética de la bacteria</i> .....	21
5.5 <i>Preservación y crecimiento de la bacteria</i> .....	22
5.6 <i>Determinación de los efectos del pH y salinidad en la cinética de biosorción: obtención de valores óptimos</i> .....	23
5.7 <i>Modelos cinéticos de biosorción</i> .....	24
5.8 <i>Modelos de equilibrio para la biosorción individual de Cd, Pb, Cu y Zn</i> .....	25
5.9 <i>Efectos sobre el equilibrio en un sistema multimetálico</i> .....	26
5.10 <i>Análisis de errores</i> .....	27
6. RESULTADOS .....	29
6.1 <i>Identificación genética de la bacteria</i> .....	29
6.2 <i>Efecto del pH en la biosorción de los metales</i> .....	29
6.2.1 <i>Cd</i> .....	29
6.2.2 <i>Cu</i> .....	33
6.2.3 <i>Pb</i> .....	35
6.2.4 <i>Zn</i> .....	36
6.3 <i>Efecto de la salinidad en la biosorción de los metales</i> .....	38
6.3.1 <i>Cd</i> .....	38

6.3.2 Cu.....	40
6.3.3 Pb.....	42
6.3.4 Zn.....	43
6.4 Efecto de la temperatura en la biosorción de los metales: Isotermas de equilibrio.....	45
6.4.1 Cd.....	46
6.4.2 Cu.....	48
6.4.3 Pb.....	49
6.4.4 Zn.....	51
6.5 Efectos sobre el equilibrio en un sistema multimetálico.....	52
7. DISCUSIÓN.....	56
7.1 Efecto del pH en la biosorción de metales.....	56
7.2 Efecto de la salinidad en la biosorción de los metales.....	57
7.3 Efecto de la temperatura en la biosorción de los metales.....	60
8. CONCLUSIONES.....	63
9. AGRADECIMIENTOS.....	65
10. LITERATURA CITADA.....	67
ANEXO 1.....	78
ANEXO 2.....	79
ANEXO 3.....	84
ANEXO 4.....	87

## ÍNDICE DE FIGURAS

2.1	Mecanismos de biosorción: (a) de acuerdo a la dependencia del metabolismo celular; (b) de acuerdo al lugar donde se efectúa la remoción del metal .....	7
5.1	Método de la adición subsecuente (SAM) .....	26
6.1	Árbol filogenético de la bacteria de estudio (CAIM 726) .....	30
6.2	Biosorción de Cd a diferentes valores de pH .....	31
6.3	Biosorción de Cd a diferentes valores de pH aplicando la forma lineal del modelo de pseudo-segundo orden.....	31
6.4	Porcentaje de remoción de Cd a diferentes valores de pH .....	32
6.5	Biosorción de Cu a diferentes valores de pH .....	33
6.6	Porcentaje de remoción de Cu a diferentes valores de pH .....	34
6.7	Biosorción de Pb a diferentes valores de pH .....	35
6.8	Porcentaje de remoción de Pb a diferentes valores de pH .....	36
6.9	Biosorción de Zn a diferentes valores de pH.....	37
6.10	Porcentaje de remoción de Zn a diferentes valores de pH .....	38
6.11	Biosorción de Cd a diferentes valores de salinidad.....	39
6.12	Porcentaje de remoción de Cd a diferentes salinidades .....	39
6.13	Biosorción de Cu a diferentes salinidades .....	40
6.14	Porcentaje de remoción de Cu a diferentes salinidades .....	41
6.15	Comparación de dos modelos cinéticos de biosorción .....	42
6.16	Biosorción de Pb a diferentes salinidades.....	43
6.17	Porcentaje de remoción de Pb a diferentes salinidades .....	44
6.18	Biosorción de Zn a diferentes salinidades.....	45
6.19	Porcentaje de remoción de Zn a diferentes salinidades.....	45



6.20	Efecto de la temperatura en la biosorción de Cd por las bacterias .....	46
6.21	Capacidades de biosorción máxima con respecto a la temperatura, tanto por el método SAM como el normal .....	47
6.22	Efecto de la temperatura en la biosorción de Cu por las bacterias .....	48
6.23	Capacidades de biosorción máxima para el Cu con respecto a la temperatura .....	49
6.24	Efecto de la temperatura en la biosorción de Pb por las bacterias .....	50
6.25	Capacidades de biosorción máxima para el Pb con respecto a la temperatura .....	51
6.26	Efecto de la temperatura en la biosorción de Zn por las bacterias .....	52
6.27	Efecto de un sistema multimetálico en la biosorción de Pb y Cu por las bacterias.....	53
6.28	Efecto de un sistema multimetálico en la biosorción de Cd, Cu, Pb y Zn por las bacterias. ....	54
6.29	Efecto de un sistema multimetálico en la biosorción de Cd, Cu, Pb y Zn por las bacterias. Biomasa 0.5 g L <sup>-1</sup> , pH 7, salinidad 0, 30°C .....	55
7.1	Efecto de la salinidad en la remoción de Cd, Cu, Pb y Zn por las bacterias.....	59
7.2	Distribución de complejos inorgánicos de Cd, Cu y Zn en agua dulce (de río) y agua de mar a 25°C y una presión de CO <sub>2</sub> de 3.6x10 <sup>-4</sup> atm.....	59

## ÍNDICE DE TABLAS

1.1	Fuentes antropogénicas a nivel mundial de Cd, Cu, Pb y Zn (ton año <sup>-1</sup> ) .....	3
1.2	Ventajas y desventajas de las tecnologías convencionales para la remoción de metales .....	4
1.3	Niveles de contaminación por metales de origen doméstico e industrial (mg L <sup>-1</sup> ) .....	4
5.1	Valores de pH, salinidad y C <sub>0</sub> utilizados para el estudio del efecto del pH en la cinética de biosorción .....	23
5.2	Valores de salinidad y C <sub>0</sub> utilizados para el estudio del efecto de la salinidad en la cinética de biosorción .....	24
5.3	Modelos cinéticos utilizados para evaluar el efecto del pH y la salinidad en el proceso de biosorción .....	25
5.4	Isotermas de biosorción evaluadas .....	26
5.5	Clasificación del efecto de la presencia de otros metales en la capacidad de biosorción.....	27
5.6	Funciones de errores utilizadas para evaluar el ajuste de los modelos a los datos experimentales .....	28
6.1	Valores de $k_2$ y $q_e$ para la biosorción de Cd a diferentes valores de pH obtenidos por regresión lineal y análisis de errores .....	30
6.2	Valores de $k_2$ y $q_e$ para la biosorción de Cu a diferentes valores de pH obtenidos mediante el análisis de las funciones de error.....	34
6.3	Valores de $k_2$ y $q_e$ para la biosorción de Pb a diferentes valores de pH obtenidos mediante el análisis de las funciones de error.....	36
6.4	Valores de $k_2$ y $q_e$ para la biosorción de Zn a diferentes valores de pH, obtenidos mediante el análisis de las funciones de error.....	37
6.5	Valores de $k_2$ y $q_e$ para la biosorción de Cu a diferentes salinidades obtenidos mediante el análisis de las funciones de error.....	41
6.6	Valores de $k_2$ y $q_e$ para la biosorción de Pb a diferentes salinidades obtenidos mediante el análisis de las funciones de error.....	43
6.7	Valores de $k_2$ y $q_e$ para la biosorción de Zn a diferentes salinidades obtenidos	

	mediante el análisis de las funciones de error.....	44
6.8	Constantes de Langmuir obtenidas mediante el análisis de las funciones de error para la biosorción de Cd a diferentes temperaturas.....	47
6.9	Constantes de Langmuir obtenidas mediante el análisis de las funciones de error para la biosorción de Cu a diferentes temperaturas.....	49
6.10	Constantes de Langmuir obtenidas mediante el análisis de las funciones de error para la biosorción de Pb a diferentes temperaturas.....	50
6.11	Constantes de Freundlich obtenidas mediante el análisis de las funciones de error para la biosorción de Zn a diferentes temperaturas.....	52
7.1	Disponibilidad de Cu(II) a diferentes valores de pH obtenidos mediante el software CHEAQS®.....	56
7.2	Biosorción de Cd, Cu, Pb y Zn, por diferentes tipos de bacterias.....	61
A2-1	Constantes del modelo de pseudosegundo orden ( $k_2$ y $q_e$ ) para la biosorción de Cd a diferentes valores de pH.....	80
A2-2	Constantes del modelo de pseudosegundo orden ( $k_2$ y $q_e$ ) para la biosorción de Cu a diferentes valores de pH.....	81
A2-3	Constantes del modelo de pseudosegundo orden ( $k_2$ y $q_e$ ) para la biosorción de Pb a diferentes valores de pH.....	82
A2-4	Constantes del modelo de pseudosegundo orden ( $k_2$ y $q_e$ ) para la biosorción de Zn a diferentes valores de pH.....	83
A3-1	Constantes del modelo de pseudosegundo orden ( $k_2$ y $q_e$ ) para la biosorción de Cd a diferentes salinidades.....	84
A3-2	Constantes del modelo de pseudosegundo orden ( $k_2$ y $q_e$ ) para la biosorción de Cu a diferentes salinidades.....	84
A3-3	Constantes del modelo de pseudosegundo orden ( $k_2$ y $q_e$ ) para la biosorción de Pb a diferentes salinidades.....	85
A3-4	Constantes del modelo de pseudosegundo orden ( $k_2$ y $q_e$ ) para la biosorción de Zn a diferentes salinidades.....	86
A4-1	Constantes de la isoterma de Langmuir ( $k_L$ y $q_{max}$ ) para la biosorción de Cd a diferentes temperaturas.....	87

A4-2	Constantes de la isoterma de Langmuir ( $k_L$ y $q_{max}$ ) para la biosorción de Cu a Diferentes temperaturas .....	88
A4-3	Constantes de la isoterma de Langmuir ( $k_L$ y $q_{max}$ ) para la biosorción de Pb a Diferentes temperaturas .....	89
A4-4	Constantes de la isoterma de Freundlich ( $k_F$ y $n$ ) para la biosorción de Zn a diferentes temperaturas.....	90

## RESUMEN

Se realizaron bioensayos para estudiar el efecto del pH y la salinidad en la cinética de biosorción (adsorción/absorción) de Cd, Cu, Pb y Zn por la bacteria *Bacillus jeotgali* cepa U3, y obtener sus valores óptimos. También se estudió el efecto de la temperatura y la presencia de otros metales en la biosorción de estos elementos. El pH óptimo para la biosorción de Cd fue de 7 (25°C, salinidad 0; biomasa 0.5 g L<sup>-1</sup>; concentración inicial (C<sub>0</sub>)= 34.7±5.4 mg L<sup>-1</sup>), con una remoción del 50% de este metal en solución en una hora. Para el Cu, el pH óptimo fue de 6 (salinidad 0, temperatura de 25°C, biomasa 0.28 g L<sup>-1</sup> y C<sub>0</sub> = 40.6 ± 3.7 mg L<sup>-1</sup>), con un 48% de remoción en 1.5 horas. En cuanto al Pb, se encontró un pH óptimo de 4 (25°C, salinidad de 30, biomasa 0.5 g L<sup>-1</sup> y C<sub>0</sub> = 41.5 ± 2.0 mg g<sup>-1</sup>), con una remoción del 98% del metal en 20 minutos. El Zn tuvo un pH óptimo de biosorción de 7 (25°C, biomasa 0.5 g L<sup>-1</sup>, salinidad 0, y C<sub>0</sub> = 75.5 ± 3.7 mg g<sup>-1</sup>), y una remoción del 32%; equilibrio alcanzado en 50 horas. La salinidad óptima para la biosorción de los cuatro metales por las bacterias fue de cero. De manera general, se presenta una disminución de la biosorción al aumentar la salinidad. Para la temperatura, la isoterma que mejor describió la biosorción de Cd, Cu y Pb, fue la de Langmuir, y la de Freundlich para el Zn. Las temperaturas óptimas utilizando el método SAM fueron de 25 y 30°C para el Cu y Zn, mientras que para el Cd y Pb fue de 35°C; respectivamente. La presencia de otros metales tuvo un efecto considerable en la biosorción, ya que a los parámetros óptimos para el Pb, se observó que el Cd y Zn no compiten por los sitios de biosorción. A pH de 6 y 7, valores óptimos para los otros metales, se observó que el Pb fue el metal que más fue biosorbido por las bacterias.

## 1. INTRODUCCIÓN

El incremento de las actividades industriales ha intensificado la contaminación ambiental y el deterioro de algunos ecosistemas, con la acumulación de contaminantes como metales pesados, compuestos sintéticos, efluentes de desechos nucleares, etc. (Lloyd y Lovley, 2001). Los metales pesados son un foco de atención a nivel mundial (Tabla 1.1), ya que una de las características más importantes que los distinguen de otros contaminantes tóxicos es que no son biodegradables (Sahoo *et al.*, 1992; Ledin, 2000). Aún cuando estos elementos se encuentran presentes en cantidades bajas, sus ciclos biogeoquímicos y persistencia en cuerpos de agua; implica que a través de procesos naturales como la biomagnificación, su concentración puede llegar a ser tan elevada que los hace ser tóxicos (Cañizares-Villanueva, 2000), causando severos daños al ambiente, animales y humanos después de la exposición (Volesky y Holan, 1995; Costley y Wallis, 2001; Gupta *et al.*, 2001). Debido a esto, la remoción de los excesos y recuperación de los iones de metales pesados de aguas de desecho y del ambiente es esencial, a causa de su toxicidad extrema en la vida acuática y humana (Kapoor *et al.*, 1999; Nourbakhsh *et al.*, 2002), además de su importancia con respecto a consideraciones económicas debido a la recuperación de metales preciosos (Ruíz-Manríquez, 2000).

Se han aplicado diferentes métodos para la remoción de metales, entre los que se encuentran la precipitación química, adsorción por carbón activado o resinas, intercambio iónico y electrólisis; técnicas caras e ineficientes (Tabla 1.2) (Sahoo *et al.*, 1992; Eccles, 1999; Kefala *et al.*, 1999; Costley y Wallis, 2001; Gupta *et al.*, 2001). Esta ineficiencia es debida al intervalo de concentración de metales para el cual pueden ser aplicadas; la mayoría son eficientes para una concentración de metales mayor a  $10 \text{ mg L}^{-1}$ . En la Tabla 1.3 se pueden observar los niveles de Pb, Cd, Cu y Zn tanto en residuos domésticos como industriales, los cuales están por debajo del intervalo de aplicación de algunas técnicas anteriormente mencionadas.

**Tabla 1.1.** Estimación de los flujos (ton año<sup>-1</sup>) de metales liberados de las actividades antropogénicas a nivel mundial.

	<b>Cd</b>	<b>Cu</b>	<b>Pb</b>	<b>Zn</b>
<b>Potencia y energía</b>				
Carbón	8,529	5,185	8,158	11,100
Petróleo	143	1,959	250,449	2,159
Madera	120	900	2,100	Despreciable
Electricidad	125	720	720	18,000
<b>Manufactura</b>	<b>2,450</b>	<b>33,740</b>	<b>9,300</b>	<b>85,015</b>
<b>Metales</b>				
Ferrosos	7,371	16,588	54,725	97,287
No ferrosos	156	1,601	9,732	34,325
<b>Agricultura</b>	<b>3,666</b>	<b>411</b>	<b>192</b>	<b>824,935</b>
<b>Residuos</b>				
Sólidos	1,147	29,790	42,100	65,100
Aguas residuales	24,319	40,905	16,470	103,715
<b>Total</b>	<b>48,026</b>	<b>131,799</b>	<b>393,946</b>	<b>1,241,636</b>

*Fuente:* Adaptada de Nriagu y Pacyna (1988).

El uso potencial de microorganismos en el tratamiento de aguas residuales contaminadas por metales pesados, y la recuperación de éstos en los residuos mineros o efluentes metalúrgicos es de gran importancia. Muchos microorganismos tales como algas, hongos, levaduras y bacterias son capaces de concentrar metales pesados de su ambiente acuático (Kaçar *et al.*, 2002; Nourbakhsh *et al.*, 2002). Aunque el descubrimiento de esta característica en los microorganismos y otros materiales biológicos no es reciente; fue hasta la década de los 90's (o incluso 70's; Tsezos, 2001) en que se desarrolló una nueva área científica que puede ayudar a la recuperación de metales: la biosorción, que se refiere la adsorción/absorción de metales por biomasa. Los primeros estudios describieron la gran variedad de materiales biológicos que podrían ser usados en la remoción, a muy bajo costo e incluso tratando pequeñas cantidades de metales tóxicos en efluentes industriales (Vieira y Volesky, 2000).

**Tabla 1.2.** Ventajas y desventajas de las tecnologías convencionales para la remoción de metales.

Método	Desventajas	Ventajas	Nivel de aplicación (mg L <sup>-1</sup> )
Precipitación química y filtración	Aplicable a altas concentraciones NO efectivo Se obtienen "lodos"	Simple Barato	>10
Oxidación química o reducción	Se requieren sustancias químicas (no siempre) Sistemas biológicos (bajas tasas) Sensible al clima	Mineralización	nd
Tratamiento electroquímico	Para altas concentraciones Demasiado costoso	Recuperación de metales	>10
Osmosis inversa	Se requieren presiones altas Escalamiento de membranas Demasiado costoso	Efluente puro (para reciclado)	>10
Intercambio iónico	Sensible a la presencia de partículas Resinas costosas	Efectivo Efluente puro (para reciclado)	<100
Adsorción	No muy efectivo para algunos metales	Sorbentes convencionales (carbón)	<10
Evaporación	Energía intensiva Demasiado costoso Se obtienen "lodos"	Efluente puro	nd

*Fuente:* Resumida de Eccles (1999); Volesky (2001a) y Zouboulis *et al.* (2004). nd = no datos.

**Tabla 1.3.** Niveles de concentración de metales de origen doméstico e industrial (mg L<sup>-1</sup>).

Metal	Estándar para agua potable	Residuo doméstico	Residuos Industriales			
			Alimentarios	Carnes	Galvanizados	Textiles
Cd	0.005	0.01	0.006	0.01	1	0.03
Pb	0.05	0.1	0	0	0	0
Cu	1	0.17	0.29	0.09	6	0.03
Zn	5	0.29	1.08	0.43	9	0.47

*Fuente:* Scragg (1999).



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Biosorción

El origen literal de la palabra “sorción” y sus derivados tales como ad-, ab-, fisi-, quimi- y también biosorción, es el verbo latino “sorbere”, que significa “tragar”. El primero en utilizar el término biosorción fue Ruchhoft (1949), cuando estudiaba la remoción de  $^{239}\text{Pu}$  en solución por lodos activados. Pümpel y Schinner (1997) refirieron que el término biosorción, se utiliza para la captación fisicoquímica de metales que es independiente del metabolismo; mientras que bioacumulación se aplica a los procesos activos para la inmovilización del metal, incluyendo mecanismos enzimáticos, que conducen a la bioprecipitación o biocristalización del metal. En este mismo sentido, otros autores añaden a la definición que la biomasa utilizada para la biosorción de metales puede estar viva, muerta o ser metabólicamente no viable (Kratochvil y Volesky, 1998; Vecchio *et al.*, 1998; Barkay y Schaefer, 2001).

A diferencia de los autores antes mencionados, Veglio' y Belchioni (1997), afirmaron que la biosorción puede ser de dos tipos: (a) dependiente del metabolismo y/o (b) independiente del metabolismo (Figura 2.1); además, la clasificaron de acuerdo al lugar donde se encuentra el metal cuando es removido de la solución: (1) acumulación extracelular/precipitación; (2) adsorción en la superficie celular/precipitación y (3) acumulación intracelular.

Son varios los mecanismos propuestos también para la interacción de biomasa (en este caso microorganismos) con los metales en solución. Brierley *et al.*, (1989) aseveró que hay cinco mecanismos predominantes: (a) volatilización; (b) precipitación extracelular; (c) acomplejamiento extracelular acompañado por una acumulación; (d) unión o enlace a la superficie celular y (e) acumulación intracelular. Por su parte, Volesky (2000), señala que la sorción de metales por diferentes partes de la célula puede ocurrir vía: (i) formación de complejos; (ii) coordinación; (iii) quelación de metales; (iv) intercambio iónico; (v) adsorción y (vi)

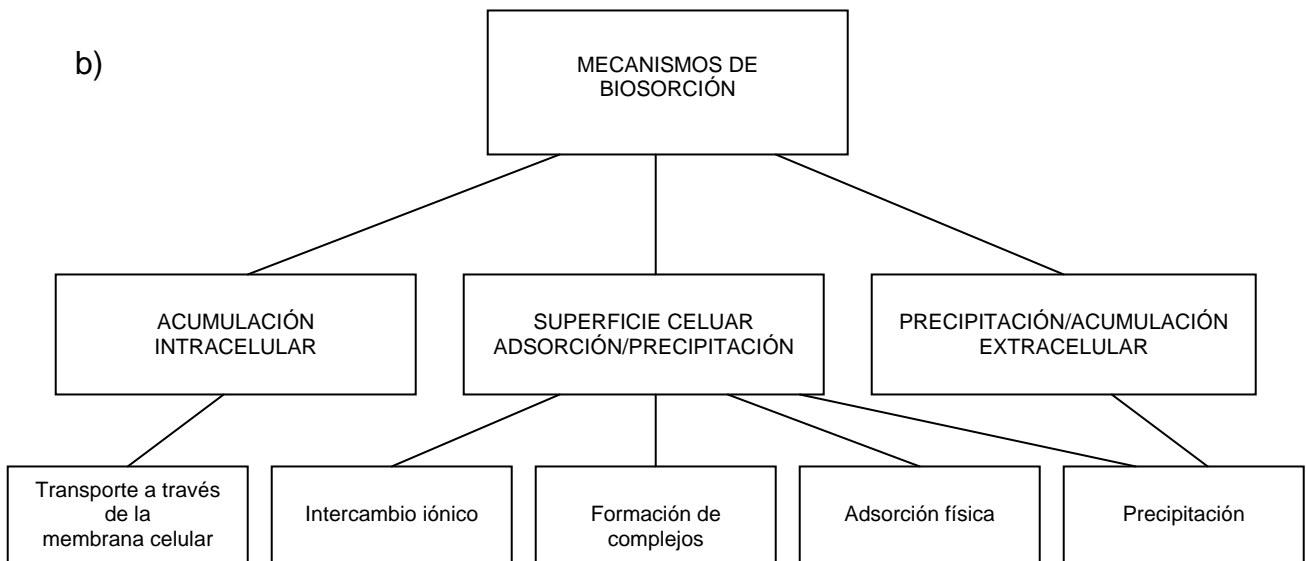
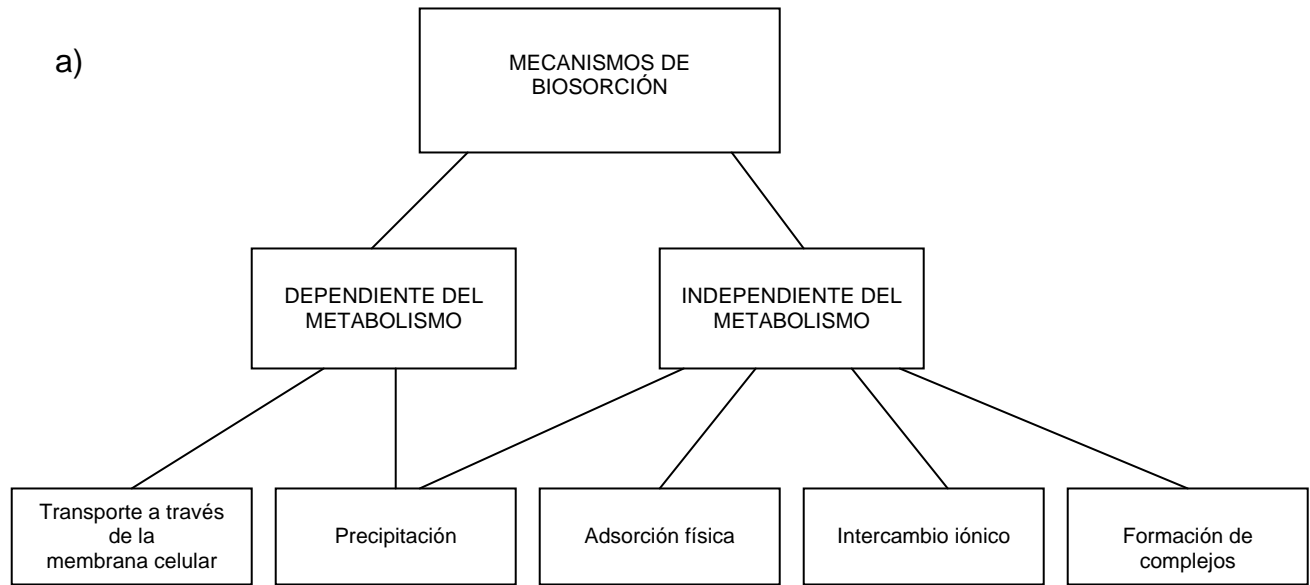
microprecipitación inorgánica; o incluso una combinación de los mecanismos anteriores. Según Al-Saraj *et al.* (1999), se han reconocido dos mecanismos principales para la concentración de iones metálicos en los microorganismos. El primero involucra el enlace superficial, el cual tiene lugar en la superficie de la membrana celular, mientras que en el segundo, los iones metálicos pueden entrar a la célula a través de la membrana celular y participar en rutas bioquímicas diversas. Finalmente, y de acuerdo a Scragg (1999), la respuesta de las células microbianas a altas concentraciones de metales (que en algunos casos pueden conferir cierto grado de tolerancia al metal) puede ser una o más de las siguientes:

- Exclusión del metal de la célula.
- Excreción dependiente de la energía de los metales absorbidos en la célula.
- Sorción intracelular mediante proteínas específicas, algunas de las cuales son conocidas como metalotioneínas.
- Sorción extracelular, bien en la pared celular o en polisacáridos extracelulares.
- Modificación química del metal (oxidación, reducción).

Durante la presente investigación se utilizará el término biosorción para referirse a la interacción fisicoquímica de adsorción, absorción o difusión entre el metal y la pared celular de la bacteria.

## *2.2 Biosorción de metales por microorganismos*

La biosorción de metales pesados ha sido comprobada en varios tipos de microorganismos, entre los que se encuentran hongos (Bai y Abraham 2002; Dilek *et al.*, 2002), levaduras (Al-Saraj *et al.*, 1999), algas (Aksu y Açıkel, 2000; Pérez-Rama *et al.*, 2002) y bacterias (Bruins *et al.*, 2000). En la literatura, se pueden encontrar muchos estudios de biosorción utilizando microorganismos con



**Figura 2.1.-** Mecanismos de biosorción (Veglio' y Belchini, 1997): (a) de acuerdo a la dependencia del metabolismo celular; (b) de acuerdo al lugar donde se efectúa la remoción del metal.

diferentes condiciones de pH, temperatura, fuerza iónica y diferentes concentraciones de biomasa y metales.

Además, se ha utilizado biomasa viva, muerta y/o metabólicamente no viable; la que puede ser tratada químicamente para modificar su pared celular, e incluso puede ser inmovilizada en diferentes materiales. Otro factor de interés, es que la biosorción puede llevarse en un proceso de contacto por lotes o continuo. Todo esto hace difícil que se puedan comparar cuantitativamente los diferentes diseños de biosorción, ya que no hay un patrón a seguir entre los métodos, causando con esto confusión (Vieira y Volesky, 2000).

Con respecto a la utilización de algas como biosorbentes para la remoción de metales, Valdman y Leite (2000), utilizaron biomasa de *Sargassum* sp. inmovilizada en polietilimina. Los metales removidos fueron Cd, Cu y Zn, los cuales tuvieron la serie de biosorción Cd>Zn>Cu, con valores máximos de biosorción de 157.8, 118.5 y 77.4 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente.

Entre los muchos estudios en el que se han utilizado algas, uno de los más recientes es el de Sheng *et al.*, (2004), quienes evaluaron la biosorción de Cu, Pb, Cd, Zn y Ni por las algas *Sargassum* sp., *Padina* sp., *Ulva* sp. y *Gracillaria* sp., encontrando que las capacidades de biosorción fueron afectadas grandemente por el pH. Observaron que entre más aumentaba el pH, se incrementaba la capacidad de biosorción. Los valores de pH óptimos para el proceso fueron de 5.0 para Pb y Cu, y de 5.5 para Cd, Zn y Ni. La afinidad para los metales para *Padina* sp. fue Pb>Cu>Cd>Zn>Ni, mientras que para *Sargassum* sp. fue Pb>Zn>Cd>Cu>Ni. Los análisis de XPS y FTIR realizados por los autores confirmaron que en el caso de *Padina* sp. y *Sargassum* sp. los grupos carboxilo, éter, hidróxido, y amino, son los responsables de la biosorción de los iones metálicos.

La utilización de hongos como biosorbentes de metales ha sido muy estudiada. Sağ (2001) presenta un excelente resumen donde expone los resultados de

muchas investigaciones, lo cual da una idea clara del estado actual de esta tecnología.

Por su parte, Iqbal y Edyvean (2004), evaluaron la biosorción de Pb, Cu y Zn por el hongo *Phanerochaete chrysosporium*. Este microorganismo fue inmovilizado en un material de soporte tipo esponja (FBILS, por sus siglas en inglés). La capacidad máxima para la biosorción de iones metálicos fue de 135.5, 102.8 y 50.9 mg g<sup>-1</sup> para Pb(II), Cu(II) y Zn(II), respectivamente. El pH óptimo para la biosorción de los tres metales fue de 6; la temperatura en un intervalo de 10 a 50°C no tuvo efecto alguno sobre la capacidad de biosorción.

Entre las investigaciones que se han realizado con bacterias, tenemos la efectuada por Phillip *et al.* (1995), quienes utilizaron *Pseudomonas aeruginosa* para estudiar la biosorción y desorción de Cu(II), obteniendo una capacidad de biosorción de 50 mg g<sup>-1</sup> de bacteria. La presencia de ácidos minerales (0.1N HCl) permitieron una desorción destructiva del 95% del metal adsorbido, mientras que con un buffer citrato (pH 4) hubo una desorción del 80% de los metales de manera no destructiva para la célula.

Asimismo, Singh *et al.* (1998) evaluaron la biosorción de Fe(III) y Cu(II) por *Microcystis*, los datos obtenidos indican tasas de biosorción de 27.04 µg Fe(III) mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> y 3.31 µg Cu(II) mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>; mientras que al analizar el comportamiento de los metales en combinación se determinó una mayor preferencia para adsorber Fe(III) que Cu(II).

Seki *et al.*, (1998), utilizaron biomasa muerta de *Rhodobacter sphaeroides* (bacteria púrpura no sulfurosa) y *Alcaligenes eutrophus* H16 (bacteria del hidrógeno) para evaluar la biosorción de Cd y Pb. Los resultados demostraron que la biosorción de los iones divalentes de estos metales se lleva a cabo en las células de estas bacterias, debido al enlace monodentado de dos tipos diferentes de ácidos: carboxílicos y tipo fosfato. El número de sitios de enlace de *A. eutrophus* fue 2.4 veces mayor que los de *R. sphaeroides*.

Kefala *et al.* (1999) investigaron la biosorción de Cd por biomasa viva y muerta de *Actinomyces* cepa AK61 y JL322, determinando que los parámetros de influencia en el proceso fueron: (1) el tiempo de contacto con la solución, (2) el pH, (4) la temperatura, (5) las concentraciones del metal y (6) la biomasa, obteniendo una biosorción de más del 95% a las condiciones óptimas encontradas.

En estudios más recientes con bacterias, Pagnanelli *et al.*, (2003) usaron *Sphaerotilus natans* para biosorber Pb, Cu, Zn y Cd. Estos autores encontraron que en un intervalo de pH de 3 a 5, el pH óptimo para los cuatro metales es de 5, mientras que la serie de afinidad de biosorción es Pb>Cu>Zn>Cd, lo cual es un reflejo de las propiedades hidrolíticas de los metales en el proceso de biosorción.

### 2.3 Biosorción de metales por bacterias del género *Bacillus*

Beveridge y Murray (1980) estudiaron la localización de los sitios activos de la pared celular de *Bacillus subtilis* para la depositación de metales, modificando de manera individual los grupos amino y carboxilo para neutralizar su carga electroquímica. La modificación de los grupos amino, no redujo la sorción del metal comparado con células nativas no modificadas. La extracción de ácido teicoico (por el tratamiento álcali), redujo estequiométricamente la biosorción. En contraste, la alteración de los grupos carboxilo limitó severamente la depositación de la mayoría de los metales estudiados (Na, K, Mg, Ca, Mn, Fe(III), Cu, Au(III), Ni, Pd, Sc, In, La, Pr, Sm y Ce). En un trabajo previo (Beveridge y Murray, 1979), estos mismos autores, demostraron que los grupos carboxilos del peptidoglúcano, son los responsables de la depositación de los metales.

Utilizando también *Bacillus subtilis*, Doyle *et al.*, (1980) encontraron que la modificación química selectiva de los grupos libres amino y carboxilo conlleva a que los sitios disponibles para los cationes aumente cuando los grupos aminos son reemplazados por grupos neutros o cargados negativamente. También demostraron que la introducción de cargas positivas en la pared celular resultó en una marcada disminución en el número de sitios de sorción para los metales y

generalmente disminuían también los valores de las constantes aparentes de asociación. Estos autores aseveran que tanto el ácido teicoico como el peptidoglucano contribuyen con sitios para la sorción de metales. Además la competencia entre varios metales por los sitios de sorción sugiere que los cationes se acomplejan con sitios idénticos en la pared celular. Esta investigación contribuyó también a demostrar que cuando la concentración del ión hidrógeno aumenta, la afinidad de la pared bacteriana por los metales disminuye, pero el número de los sitios para la sorción de metales permanece constante, lo cual sugiere que los cationes y protones compiten por los mismos sitios de sorción.

En estudios más actuales, Lee y Tebo (1998), estudiaron la capacidad de biosorción de Cu(II) por esporas de *Bacillus* sp. cepa SG-1, encontrando que las esporas tuvieron una gran afinidad por este elemento, y que más del 60% de Cu(II) era biosorbido de la solución dentro del primer minuto a un pH de 7.2.

En otro trabajo realizado por El-Helow *et al.*, (2000), se investigó la biosorción de Cd por la bacteria marina *Bacillus thuringiensis* (cepa DM55). Los componentes del medio de cultivo que más influyeron en la remoción del metal fueron los fosfatos de potasio y la peptona. Las condiciones óptimas del medio de cultivo (peptona, 3 g L<sup>-1</sup>; extracto de levadura, 3 g L<sup>-1</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.76 g L<sup>-1</sup>; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.51 g L<sup>-1</sup>; NaCl, 2.5 g L<sup>-1</sup> y MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2 g L<sup>-1</sup>) permitieron una remoción del metal de un 79% durante las primeras 24 horas, con una capacidad de biosorción específica de 21.57 mg g<sup>-1</sup> de biomasa.

Fein *et al.* (2001) desarrollaron un modelo para la predicción de biosorción de metales por *Bacillus subtilis*. Ellos utilizaron un enfoque lineal de energía libre para comparar las constantes de estabilidad de los complejos de superficie metal-carboxil, con las constantes de estabilidad acuosas metal-ácido orgánico. Los ácidos orgánicos considerados fueron el acético, oxálico, cítrico y ácido 4,5-dihidroxi-1,3-bencenosulfónico, los metales fueron Co, Ni, Nd, Sr y Zn. El comportamiento de biosorción para cada uno de los metales estudiados (exceptuando el Zn) fue bien descrito considerando únicamente el enlace metal-

acetato en la superficie bacteriana, con un coeficiente de correlación lineal de 0.97.

Daughney *et al.* (2001) investigaron el efecto de la fase de crecimiento, exponencial, estacionaria y de esporulación de *Bacillus subtilis* en la concentración de los sitios de adsorción en la superficie de la pared celular, además de las constantes de deprotonización y de enlace del metal por titulación ácido-base y la adsorción por lotes con Cd y Fe(II), encontrando que las células en fase exponencial adsorbieron aproximadamente del 5 al 10% más metal (por unidad de peso) que las células en fase estacionaria y aproximadamente del 15 al 30% más que las esporas.

Martinez y Ferris (2001) utilizaron un ión selectivo para monitorear la biosorción de Cd(II) en dos bacterias, *Bacillus subtilis* (Gram +) y *Escherichia coli* (Gram -), como una función del aumento de pH. Estos investigadores encontraron tres sitios discretos para la biosorción de metales en ambas bacterias, con una constante de equilibrio ( $pK_s$ ) de  $-0.8 \pm 0.20$ ,  $0.63 \pm 0.09$ , y  $2.35 \pm 0.10$ ; y  $-0.60 \pm 0.10$ ,  $0.25 \pm 0.19$  y  $1.93 \pm 0.17$ , respectivamente.

Da Costa y Duta (2001) experimentaron la biosorción de Cd, Zn, Cu y Pb con *Bacillus sp.*, *B. sphaericus*, y *B. cereus*. Para el caso del Cu, la máxima capacidad de biosorción fue de  $5.6 \text{ mol g}^{-1}$  para *B. sphaericus*,  $5.9 \text{ mol g}^{-1}$  para *B. cereus* y *B. subtilis*, y  $6.4 \text{ mol g}^{-1}$  para *Bacillus sp.* Los valores máximos para Zn fueron de 4.3, 4.6, 4.8 y  $5.0 \text{ mol g}^{-1}$  para *B. sphaericus*, *B. cereus*, *Bacillus sp.* y *B. subtilis*, respectivamente. En el caso del Cd, los valores fueron de 8.0, 9.5, 10.8 y  $11.8 \text{ mol g}^{-1}$  para *B. cereus*, *B. subtilis*, *Bacillus sp.* y *B. sphaericus*, respectivamente. Finalmente para Pb, los valores fueron de 0.7, 1.1, 1.4 y  $1.8 \text{ mol g}^{-1}$  para *B. sphaericus*, *B. cereus*, *Bacillus sp.* y *B. subtilis*, respectivamente. Estos autores proponen a *B. subtilis* y *B. cereus* como las cepas que presentaron mejores resultados de biosorción.



Nourbakhsh *et al.* (2002), determinaron las condiciones óptimas de biosorción de Cr(VI), Pb(II) y Cu(II) por *Bacillus* sp. (cepa OGUB 001), a 27°C y pH de 2 a 7, obteniendo que los valores de pH óptimo para la mayor biosorción de metales fueron 2, 4.5 y 4, respectivamente. En la biosorción parcialmente competitiva, (a pH 4), el 71.8% de la capacidad fue utilizada por el plomo, mientras que el 16.3% y 11.9% fue usada por los iones cobre y cromo, respectivamente.

La bacteria *Bacillus circulans* cepa EB1, fue utilizada por Yilmaz (2003) como biosorbente de Co, Cd, Ni, Cu y Zn; y evaluó el efecto que estos metales tienen sobre el crecimiento de esta bacteria. Este autor encontró que el orden de toxicidad de estos metales para la bacteria fue Cd=Co>Cu>Ni>Zn>Mn, en medio sólido. La remoción de metales durante el crecimiento en medio líquido fue del 90% de Mn, 68% de Zn, 65% de Cu, 45% de Ni y 40% de Co, con una capacidad de biosorción específica de 25, 22, 20, 13 y 12 mg L<sup>-1</sup>. Debido a su capacidad para crecer aún en presencia de altas concentraciones de los metales, el autor propone a *B. circulans* como potencialmente aplicable para la biorremediación *in situ* de sistemas acuosos contaminados por metales.

Pollman *et al.*, (2005), proponen a *Bacillus sphaericus* JG-A12, aislada de una pila de desecho en una mina de uranio en Alemania, como un buen biosorbente, ya que es capaz de remover metales en solución como U, Cu, Pb, Al, Cd, Pd(II), Pt(II) y Au(II). Incluso, ellos encontraron que las nanoestructuras paracristalinas ordenadas de las proteinasas de la capa S que envuelven a la bacteria, tienen una gran capacidad para recuperar metales preciosos de desechos mineros, así como para la producción de nanoconglomerados de estos elementos.

#### 2.4 Equilibrio y cinética en el proceso de biosorción

Los estudios de equilibrio y cinética del proceso de biosorción de metales son de gran importancia, ya que permiten establecer el o los mecanismos por los cuales los iones metálicos interactúan con el material sorbente (Kratohvil y Volesky, 1998). Los datos de equilibrio proveen información fisicoquímica fundamental para

evaluar la aplicabilidad del proceso de biosorción como una operación unitaria y para el diseño adecuado de un sistema de biosorción. Los datos de equilibrio usualmente se describen por la ecuación de una isoterma, cuyos parámetros expresan las propiedades de afinidad del sorbente, a una temperatura y pH fijos (Ho *et al.*, 2002). Los datos cinéticos proporcionan información acerca de las tasas de remoción del metal, además de ayudar en la identificación del tipo de biosorción, la capacidad del biosorbente, así como el tiempo que transcurre para que el sorbente y el adsorbato (metal) en solución lleguen al equilibrio. Otro aspecto importante es que los estudios cinéticos son esenciales para el escalamiento del proceso de biosorción a nivel industrial (Volesky, 2001a; Cerofolini, 2002; Horsfall *et al.*, 2005).

La bacteria *Arthrobacter* sp. fue utilizada por Veglió *et al.*, (1997) para estimar el proceso de equilibrio para la biosorción de Cu, Pb, Mn y Ni. Dichos autores encontraron que la isoterma que mejor describe la biosorción es la de Langmuir, con capacidades máximas de 406, 148, 130 y 13 mg g<sup>-1</sup> para Mn, Cu, Pb y Ni, respectivamente. Además señalan que en el caso de esta bacteria, la densidad de biomasa tiene un efecto significativo sobre la capacidad máxima de biosorción de estos metales.

Puranik *et al.*, (1999), utilizaron *Citrobacter* sp. cepa MCM B-181 y dos hongos, *Streptoverticillium cinnamoneum* y *Penicillium chrysogenum* para remover Pb y Zn en solución. En todos los casos la concentración de metal disminuyó durante los primeros 10 minutos y se mantenía constante después de pasados 30 minutos aproximadamente, además, la concentración inicial de los metales no mostró efecto sobre el tiempo. Una comparación con los tres microorganismos muestra la siguiente serie de biosorción, *S. cinnamoneum* > *Citrobacter* sp. > *P. chrysogenum*. En cuanto a la eficiencia del proceso cinético, comparando el coeficiente de transferencia de masa ( $K_m a$ ) la serie es, *Citrobacter* sp. > *S. cinnamoneum* > *P. chrysogenum*.

La cinética de biosorción de Cd por dos bacterias, *Rhodobacter sphaeroides* S (un microorganismo fotosintético) y *Rhodovulum* sp. PS88 (una bacteria fotosintética marina), bacterias que demostraron ser capaces de biosorber el Cd en presencia de 30 g L<sup>-1</sup> de cloruro de sodio e iones divalentes (Mg(II) y Ca(II)) en el medio de cultivo fue estudiada por Watanabe *et al.*, (2003). La cepa PS88 mostró una mejor sorción y una alta tasa específica de biosorción de Cd del medio de cultivo en condiciones aerobias-sin luz (heterotróficas) y anaeróbicas-con luz (fotoheterotróficas). La biosorción de Cd por ambas bacterias es dependiente de la concentración inicial del mismo y puede ser modelada con la isoterma de Freundlich. *Rhodovulum* sp. mostró una mayor capacidad de biosorción de Cd que *Rhodobacter*. En cuanto a la cinética, los autores encontraron que un tiempo aproximado de entre 5 y 10 minutos, fueron suficientes para alcanzar el equilibrio para ambas bacterias.

Beolchini *et al.*, (2003), estudiaron la biosorción de Cu por *Sphaerotilus natans* inmovilizada en matrices de polisulfona. Investigaron el proceso de equilibrio para determinar el efecto del pH y la concentración de la biomasa en la biosorción. Los datos experimentales obtenidos, fueron modelados satisfactoriamente con la ecuación de Langmuir. La capacidad máxima de biosorción fue de 5.4 mg g<sup>-1</sup> a pH de 5.5 y 0.18 g de biomasa liofilizada por gramo de la matriz. Los autores también estudiaron la cinética de biosorción, desarrollando un modelo cinético propio. El tiempo para llegar al equilibrio que obtuvieron es de aproximadamente 60 minutos.

### 2.5 Biosorción en sistemas multimetálicos

Hasta la fecha, muchos de los estudios de biosorción de metales con microorganismos han estado restringidos a soluciones simples, y sólo en un número limitado de casos se ha reportado el efecto de otros cationes y aniones en el proceso de biosorción (Tobin *et al.*, 1998). Los iones metálicos presentes en una solución multimetálica usualmente interactúan entre sí y modifican los efectos de la biosorción, los cuales pueden ser sinérgicos, antagónicos o no interactivos. Dado que los desechos de aguas contaminadas con metales generalmente

contienen más de un tipo de ión metálico, estos pueden interferir en la remoción o recuperación del metal de interés (Puranik y Paknikar, 1999).

Shuttleworth y Unz (1993) determinaron la habilidad de la bacteria filamentosa *Thiothrix* sp. cepa A1 para biosorber Ni y Zn tanto de manera individual, como en mezcla. Los autores encontraron que la mayor parte de ambos metales eran removidos de la solución en menos de 10 minutos. En cuanto al equilibrio, la isoterma de Freundlich fue la que mejor se ajustó a los datos experimentales de la biosorción de Cu, mientras que para el Zn y el Ni la isoterma más apropiada fue la bifásica de Freundlich. La biosorción para el Ni y Zn fue directamente proporcional a la edad del cultivo. También demostraron que tanto el Ca como Mg compiten con el Zn por los sitios de sorción, mientras que el K sólo tuvo un pequeño efecto. En el caso de la competencia entre el Ni y el Zn, encontraron que ambos metales compiten por los mismos sitios de biosorción.

Loaëc *et al.* (1997) trabajaron con los polímeros aislados de la bacteria *Alteromonas macleodii* subsp. *fijiensis*, con el fin de obtener la capacidad de biosorción de Pb, Cd y Zn, tanto en forma individual como en mezclas binarias de estos metales. Utilizaron la isoterma de Langmuir para dos solutos como modelo de ajuste a los datos experimentales. Estos investigadores observaron que las isotermas mostraban una competencia entre el Zn y el Cd, mientras que el Pb fue removido de la solución preferentemente en el sistema bimetálico.

Daughney y Fein (1998), cuantificaron el efecto de la fuerza iónica en la biosorción de  $H^+$ ,  $Cd^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$  y  $Cu^{+2}$  en *Bacillus subtilis* y *B. lincheformis*. Estos investigadores evaluaron la habilidad de los modelos de capacitancia constante y el de Stern de doble capa para describir el efecto de la fuerza iónica en la biosorción. De los modelos antes mencionados, el de capacitancia constante es el que mejor resultado dió a los autores. Además encontraron que los parámetros de este modelo no varían con respecto a la fase de crecimiento de las bacterias. Para el caso de *B. lincheformis* encontraron que a un determinado valor de pH, la biosorción disminuía al hacerlo la fuerza iónica, mientras que *B. subtilis* mostró una tendencia contraria.

Hammaini *et al.* (2002), investigaron el efecto del Pb en la biosorción de Cu, Cd y Zn por lodo activado. Estos autores utilizaron isotermas superficiales de biosorción tridimensionales en reemplazo a las isotermas sencillas, encontrando que las isotermas presentaban una competencia entre los metales a ser removidos de la solución, pero en general el Pb mostró preferencia al estar en presencia de alguno de los metales antes mencionados.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 General

Determinar el efecto de variables ambientales (pH, temperatura y salinidad) sobre la biosorción de Cu, Pb, Zn y Cd, por la bacteria *Bacillus jeotgali* cepa U3.

#### 3.2 Particulares

- Determinar la cinética de biosorción de metales por las bacterias a diferentes valores de pH y salinidad.
- Determinar las condiciones de pH, salinidad y temperatura óptimas para la biosorción de metales por las bacterias.
- Determinar las capacidades de biosorción de Cu, Zn, Pb y Cd por las bacterias, así como el modelo de biosorción que mejor explique el proceso.
- Determinar los efectos de otros metales en las capacidades de biosorción de Cu, Zn, Pb y Cd.

#### 4. HIPÓTESIS

- La cinética y las capacidades de biosorción de los metales por las bacterias son influenciadas por diferentes parámetros ambientales (temperatura, pH y salinidad). De manera tal, que los valores óptimos de pH para los metales se encontrarán cerca del pH de precipitación de éstos, mientras que la salinidad óptima será la de cero.
- Las capacidades de biosorción por las bacterias en una solución multi-metálica serán menores a aquellas correspondientes a los mismos elementos, cuando son tratados individualmente.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

Como parte de una investigación previa, enfocada en la oxidación de Mn(II) por bacterias autóctonas, se aislaron varias cepas bacterianas del sedimento colectado de la laguna costera de Urías, Sinaloa, México, y se seleccionó una cepa modelo. En este estudio se empleó la misma cepa, por lo que, en los apartados 5.1 al 5.5 se describe el aislamiento, selección e identificación de dicha bacteria.

### 5.1 Aislamiento de las bacterias

Mediante el uso de una draga tipo Van Veen y una botella horizontal Niskin, se colectaron sedimentos superficiales y agua suprayacente, respectivamente, en tres localidades del Estero de Urías. La primera de ellas ubicada en la cabeza estuarina, la cual se caracteriza por tener un bajo impacto antropogénico (Ruelas-Inzunza y Páez-Osuna, 1998), la segunda localizada en la parte central del estero, donde Osuna-López *et al.*, (1989) y Soto-Jiménez y Páez-Osuna (2001) observaron las más altas concentraciones de Cd y Cu en sedimentos, las cuales se asocian con la recepción de efluentes de las procesadoras de alimentos marinos, harinera de pescado, rastro municipal y flotas pesqueras. La tercera localidad es el Estero del Infiernillo, el cual recibe efluentes domésticos sin ningún tratamiento. Una vez que la draga se abrió, se tomaron tres núcleos del centro con una jeringa de 60 ml de capacidad, procurando realizar este proceso lo más rápido posible para evitar la contaminación bacteriana de las muestras. Los núcleos de las jeringas se mantuvieron en frío hasta su utilización.

### 5.2 Enumeración y purificación de las bacterias

Los dos centímetros superficiales de cada uno de los tres núcleos obtenidos en cada localidad fueron mezclados, homogenizados y utilizados para inocular una serie de diluciones en medio líquido. Se prepararon 100 ml de medio K, añadiendo 0.05 g de extracto de levadura, 0.2 g de peptona y 25 ml de agua destilada a 75 ml



de agua marina, previamente filtrada (0.2  $\mu\text{m}$ ). Esta mezcla fue esterilizada en una autoclave, para posteriormente agregársele de forma aséptica 2 ml de solución de Hepes 1 M (pH = 7.5) y 0.01 ml de  $\text{MnCl}_2$  1 M. Se colocaron alícuotas de 9 ml de este medio en tubos de ensayo y a uno de ellos se le añadió asépticamente 1 g de sedimento y se homogenizó; con esto se realizaron una serie de 4 diluciones (base 10). Posteriormente, 1 o 0.1 ml del cultivo líquido fue colocado y expandido sobre la superficie de cajas de Petri con medio K y 1.5 % de agar (Ghiorse, 1984). Dado que las bacterias que oxidan Mn(II) (a las cuales pertenece la bacteria de este estudio), forman colonias de color café en aproximadamente 1-2 semanas. El conteo total de bacterias, así como de bacterias que oxidan Mn(II) se realizó dos semanas después. Aquellas colonias representativas de bacterias que oxidan Mn(II) fueron cuidadosamente colectadas y transferidas a medio fresco para obtener cultivos puros (Madigan *et al.*, 1997).

### *5.3 Selección de la bacteria de estudio*

A las cinco cepas bacterianas que se seleccionaron por su capacidad de oxidar Mn(II) en medio sólido, se les realizó una segunda prueba en agua de mar (75% v/v  $\text{H}_2\text{O}$ ) con 100  $\mu\text{M}$  de Mn(II), a temperatura ambiente (25°C) y 150 rpm. Durante 98 horas se tomaron muestras del medio, las cuales fueron filtradas con filtros millipore de 0.2 micras de 25 mm de radio, la cantidad de metal oxidado por dicha biomasa fue determinado indirectamente midiendo la concentración de Mn(II) en el sobrenadante por el método colorimétrico (Brewer y Spencer, 1971). La bacteria que más removió Mn(II) de la solución fue seleccionada e identificada, misma que se empleó en la presente investigación.

### *5.4 Identificación genética de la bacteria*

La identificación preliminar de la bacteria se realizó en el Instituto Oceanográfico Scripps/UCSD, empleándose técnicas moleculares (Francis *et al.*, 2001). El DNA fue aislado utilizando un equipo Qlamp Tissue (Qiagen Inc., Chatsworth, CA). Después de extraer y purificar el DNA, se le realizó una PCR usando cebadores

estándar, para amplificar el gen del 16S RNA ribosomal, una vez hecho esto fueron clonados y secuenciados. La comparación entre las secuencias de la bacteria se hizo usando el programa BLAST de NCBI (1997). La identificación definitiva se realizó en el Centro de Investigación en Acuicultura y Desarrollo (CIAD), unidad Mazatlán, en el laboratorio de Bacteriología. En esta identificación, el aislamiento del ADN se realizó con el kit de Promega Wizard® Genomic DNA purification Kit (Madison, Wisconsin, USA); posteriormente fue purificado usando el kit de Qiagen (QIAquick Gel Extraction kit, Qiagen Inc, USA). Para la clonación, se realizó una ligación utilizando el vector pGEM-T (Easy Vector System I, Promega USA), el buffer para la ligasa y T4 ADN ligasa (Promega); después se hizo la transformación utilizando bacterias *E. coli* (DH5 $\alpha$ , GIBCO, California, USA.), se utilizó ampicilina para detectar aquellas que habían sido clonadas, a continuación el ADN fue secuenciado.

### *5.5 Preservación y crecimiento de la bacteria*

Para optimizar el desarrollo de biomasa se llevaron a cabo curvas de crecimiento a tres diferentes concentraciones de medio K, la concentración normal (C1) de los componentes del medio K es de 0.5 g de extracto de levadura y 2.0 g de peptona (por litro de medio), las siguientes concentraciones consistieron en aumentar al doble (C2) y triple (C3) la cantidad de extracto de levadura y peptona. Se prepararon 150 ml de medio en matraces erlenmeyer de 250 ml los cuales, una vez esterilizados fueron inoculados y mantenidos en agitación a 150 rpm, se tomaron muestras de 3 ml cada 2 horas y fueron medidas en un espectrofotómetro a 600 nm, para posteriormente realizar las curvas de crecimiento. Las bacterias fueron criopreservadas a -70°C en un ultracongelador en caldo de soya tripticaseína, glicerol, y NaCl, con cuentas de vidrio como lo recomienda Gherna (1994).

### 5.6 Determinación de los efectos del pH y salinidad en la cinética de biosorción: obtención de valores óptimos

Se realizaron bioensayos para evaluar el efecto del pH y la salinidad en la cinética de biosorción de metales para determinar los valores óptimos de este proceso. En todos los experimentos se utilizó agua Milli-Q, los reactivos utilizados eran grado analítico. Todo el material fue lavado en baños de ácido HCl y HNO<sub>3</sub> como lo recomiendan Moody y Lindstrom (1977).

Una vez que se encontraban en la fase estacionaria de crecimiento, las bacterias fueron centrifugadas del medio de cultivo a 9000 rpm y 4°C, durante 5 minutos, lavadas con agua Milli-Q y vueltas a centrifugar como se describió anteriormente, se repitió este proceso tres veces para eliminar las impurezas del medio de cultivo. Para conocer la cantidad de bacterias que eran utilizadas en los bioensayos, se realizó una curva estándar de densidad óptica vs. biomasa; todos los bioensayos se realizaron con una densidad de biomasa de 0.5 g L<sup>-1</sup>.

En la Tabla 5.1 se muestran los intervalos de pH que fueron utilizados para cada metal (con intervalos de una unidad), así como la salinidad y la concentración inicial del metal (C<sub>0</sub>), todos los bioensayos, tanto para el pH como para la salinidad, se realizaron a 25°C. Los valores de pH presentados en la Tabla 5.1 son los que comúnmente se presentan en las aguas de desechos industriales (Nourbahsh *et al.*, 2002).

**Tabla 5.1.** Valores de pH, salinidad y C<sub>0</sub> utilizados para el estudio del efecto del pH en la cinética de biosorción.

<b>Metal</b>	<b>pH</b>	<b>Salinidad</b>	<b>C<sub>0</sub> (mg L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Cd</b>	3-7	0	~ 40
<b>Cu</b>	2-6	0	~ 40
<b>Pb</b>	3-6	30	~ 40
<b>Zn</b>	4-6	0	~ 80

Una vez obtenidos los valores de pH óptimos para cada metal, éstos fueron utilizados para determinar los efectos de la salinidad en la cinética de biosorción, así como la salinidad óptima. En la Tabla 5.2 se muestran los intervalos de salinidad utilizados (en intervalos de 10), así como la concentración inicial del metal. El agua de mar utilizada en los experimentos fue filtrada con un sistema de carbón activado y tratada con luz ultravioleta; el agua fue almacenada en garrafones ámbar en un lugar oscuro.

Tanto en los bioensayos de pH, como de salinidad, se tomaron muestras en intervalos de tiempo de media o una hora, durante un promedio de seis horas, para que el sistema alcanzara el equilibrio. Las muestras se acidificaron de acuerdo con Neelson *et al.* (1996) y fueron centrifugadas a 7000 rpm, durante 5 minutos y el sobrenadante fue analizado mediante espectrofotometría de absorción atómica con un espectrofotómetro Varian SpectraAA 220.

### 5.7 Modelos cinéticos de biosorción

Se evaluaron seis modelos cinéticos para estudiar el efecto del pH y la salinidad sobre la cinética de biosorción. En la Tabla 5.3 se muestran las ecuaciones (en su forma lineal) de los modelos utilizados (Ho *et al.*, 2000; El-Bishtawi y Al-Haj, 2001; Sismanoglu y Pura, 2001; Chiron *et al.*, 2003). Con los datos obtenidos en los bioensayos se hizo una evaluación preliminar con los seis modelos cinéticos, aquel modelo que se ajustó mejor a los datos experimentales fue posteriormente sometido a un análisis de errores como se describe en la sección 5.10, esto con el fin de ajustar lo mejor posible las constantes del modelo cinético.

**Tabla 5.2.** Valores de salinidad y  $C_0$  utilizados para el estudio del efecto de la salinidad en la cinética de biosorción.

<b>Metal</b>	<b>Salinidad</b>	<b><math>C_0</math> (mg L<sup>-1</sup>)</b>
<b>Cd</b>	0-40	~ 30
<b>Cu</b>	0-30	~ 50
<b>Pb</b>	0-40	~ 80
<b>Zn</b>	0-40	~ 40

**Tabla 5.3.** Modelos cinéticos utilizados para evaluar el efecto del pH y la salinidad en el proceso de biosorción.

Modelo	Ecuación
Primer orden	$\ln(q_t) = \ln(q_0) + k'_1 t$
Segundo orden	$\frac{1}{q_t} = \frac{1}{q_0} + k'_2 t$
Tercer orden	$\frac{1}{q_t^2} = \frac{1}{q_0^2} + k_3 t$
Pseudo-primer orden	$\ln\left(\frac{q_e - q_t}{q_e}\right) = -k_1 t$
Pseudo-segundo orden	$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{k_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} t$
Difusión parabólica	$q_t = k_d t^{1/2}$

$q_t$  = cantidad de soluto biosorbido ( $\text{mg g}^{-1}$ ) en el tiempo  $t$ ;  $q_0$  = cantidad de soluto biosorbido al tiempo  $t = 0$  ( $\text{mg g}^{-1}$ );  $q_e$  = cantidad de soluto biosorbido en el equilibrio ( $\text{mg g}^{-1}$ );  $t$  = tiempo;  $k'_1$  = constante de reacción de primer orden ( $\text{h}^{-1}$ );  $k'_2$  = constante de reacción de segundo orden ( $\text{g mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ );  $k_3$  = constante cinética de tercer orden ( $\text{g}^2 \text{mg}^{-2} \text{h}^{-1}$ );  $k_1$  = constante de reacción de pseudo-primer orden ( $\text{h}^{-1}$ );  $k_2$  = constante de reacción de pseudos-segundo orden ( $\text{g mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ );  $k_d$  = coeficiente de difusión ( $\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-0.5}$ ).

### 5.8 Modelos de equilibrio para la biosorción individual de Cd, Pb, Cu y Zn

Para encontrar aquellos modelos que mejor describen el efecto causado por la temperatura y la concentración de los metales en el proceso de biosorción, se evaluaron dos isotermas de adsorción (Tabla 5.4). Las temperaturas utilizadas en estos experimentos fueron de 25, 30 y 35°C. Además, se utilizó el método de las adiciones subsecuentes (SAM, Figura 5.1) propuesto por Pagnanelli *et al.*, (2000), el cual consiste en realizar adiciones subsecuentes del metal a la solución en los bioensayos una vez alcanzado el equilibrio de adsorción. La evaluación de la adsorción específica del metal  $q$  ( $\text{mg g}^{-1}$  de células) será obtenida utilizando el siguiente balance de masa para el ion metálico en el sistema.

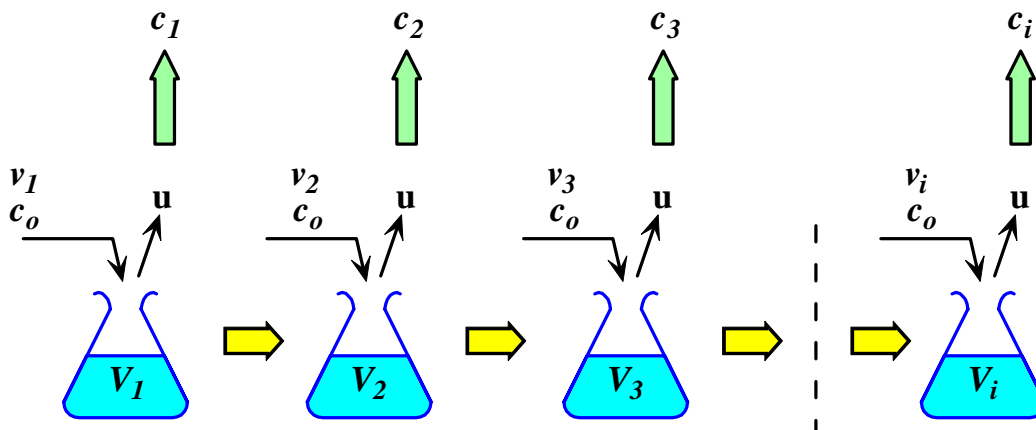
$$q_i = \frac{v_i C_o + q_{i-1} [X]_{i-1} (V_{i-1} - u) + (V_{i-1} - u) C_{i-1} - C_i V_i}{[X]_i V_i}$$

Donde los subíndices “ $i$ ” e “ $i-1$ ” se refieren a la adición del metal.

**Tabla 5.4.** Isotermas de biosorción evaluadas.

Isoterma	Ecuación
Langmuir (L)	$q_e = \frac{K_L q_{max} C_e}{1 + K_L C_e}$
Freundlich (F)	$q_e = K_F C_e^{1/n}$

$q_e$  = cantidad de metal biosorbido por las bacterias en el equilibrio ( $\text{mg g}^{-1}$ );  $C_e$  = concentración de metal residual en el equilibrio ( $\text{mg L}^{-1}$ );  $K_L$  = constante de Langmuir ( $\text{L mg}^{-1}$ );  $q_{max}$  = capacidad máxima de biosorción de metal por las bacterias;  $K_F$  = constante de Freundlich ( $\text{L g}^{-1}$ ),  $n$  = constante de afinidad de Freundlich.



**Figura 5.1.** Método de la adición sucesiva (SAM).

### 5.9 Efectos sobre el equilibrio en un sistema multimetálico

Para evaluar el efecto de la presencia de otros metales en el equilibrio de la biosorción, se realizaron bioensayos con soluciones enriquecidas simultáneamente con los cuatro metales. Los valores de pH utilizados fueron de 4 y 6 para Pb y Cu, y 7 para Cd y Zn. La salinidad empleada en los experimentos fue de cero. Una vez obtenidos los nuevos valores para la capacidad de biosorción de mezcla ( $q_{mix}$ ) se pueden realizar las siguientes relaciones con los valores individuales de cada metal ( $q_{ind}$ ), y evaluar si existen efectos sinérgicos o antagónicos (Mohan y Chander, 2001; Banat *et al.*, 2002).

**Tabla 5.5.** Clasificación del efecto de la presencia de otros metales en la capacidad de biosorción.

<b>Capacidad de biosorción</b>	
$\frac{q_{mix}}{q_{ind}} > 1$	La capacidad de biosorción es promovida por la presencia de otros iones metálicos (sinergismo).
$\frac{q_{mix}}{q_{ind}} = 1$	No existe relación entre los iones metálicos (no interactivo).
$\frac{q_{mix}}{q_{ind}} < 1$	La capacidad de biosorción es inhibida por la presencia de otros iones metálicos (antagonismo).

$q_{ind}$  = capacidad de biosorción del metal de forma individual en el equilibrio ( $\text{mg g}^{-1}$ ),  $q_{mix}$  = capacidad de biosorción (en el equilibrio) del metal en presencia de otros metales ( $\text{mg g}^{-1}$ ).

### 5.10 Análisis de errores y estadístico

Para evaluar el ajuste del modelo teórico (ya sea cinético o una isoterma) a los datos experimentales obtenidos en los sistemas de biosorción monometálicos, se requiere un procedimiento de minimización mediante una función de error (Cheung *et al.*, 2001). En este estudio se evaluaron cinco funciones de error (Tabla 5.6), propuestas por Ng *et al.*, (2003) y se utilizó el método propuesto por Ho *et al.*, (2002), el cual consiste en calcular la “suma de los errores normalizados”.

Para comparar los efectos del pH, salinidad y temperatura en la biosorción de los metales, se evaluaron las diferencias significativas entre las capacidades de biosorción en el equilibrio mediante la prueba de Tukey HSD (Statistica 5.5, StatSoft, Inc., 1994-2000).

**Tabla 5.6.** Funciones de errores utilizadas para evaluar el ajuste de los modelos a los datos experimentales.

Error	Ecuación
Suma del cuadrado de los errores (ERRSQ)	$\sum_{i=1}^p (q_{e,med} - q_{e,calc})_i^2$
Función de error fraccional compuesto (HYBRD)	$\sum_{i=1}^p \left[ \frac{(q_{e,med} - q_{e,calc})^2}{q_{e,med}} \right]_i$
Porcentaje de desviación estándar de Marquardt (MPSD)	$\sum_{i=1}^p \left( \frac{q_{e,med} - q_{e,calc}}{q_{e,med}} \right)_i^2$
Error relativo promedio (ARE)	$\sum_{i=1}^p \left  \frac{q_{e,med} - q_{e,calc}}{q_{e,med}} \right _i$
Suma de los errores absolutos (EABS)	$\sum_{i=1}^p  q_{e,med} - q_{e,calc} _i$

$q_{e,med}$  = cantidad experimental de metal biosorbido por las bacterias en el equilibrio ( $\text{mg g}^{-1}$ );  $q_{e,calc}$  = cantidad teórica de metal biosorbido por las bacterias obtenida con los modelos cinéticos o de isoterma ( $\text{mg g}^{-1}$ ).



## 6. RESULTADOS

### 6.1 Identificación genética de la bacteria

La identificación molecular por secuenciación del gen 16S rRNA de la bacteria seleccionada reveló que este microorganismo pertenece al género *Bacillus*, y se encuentra genéticamente muy relacionada con *Bacillus jeotgali* YKJ-11 (Figura 6.1).

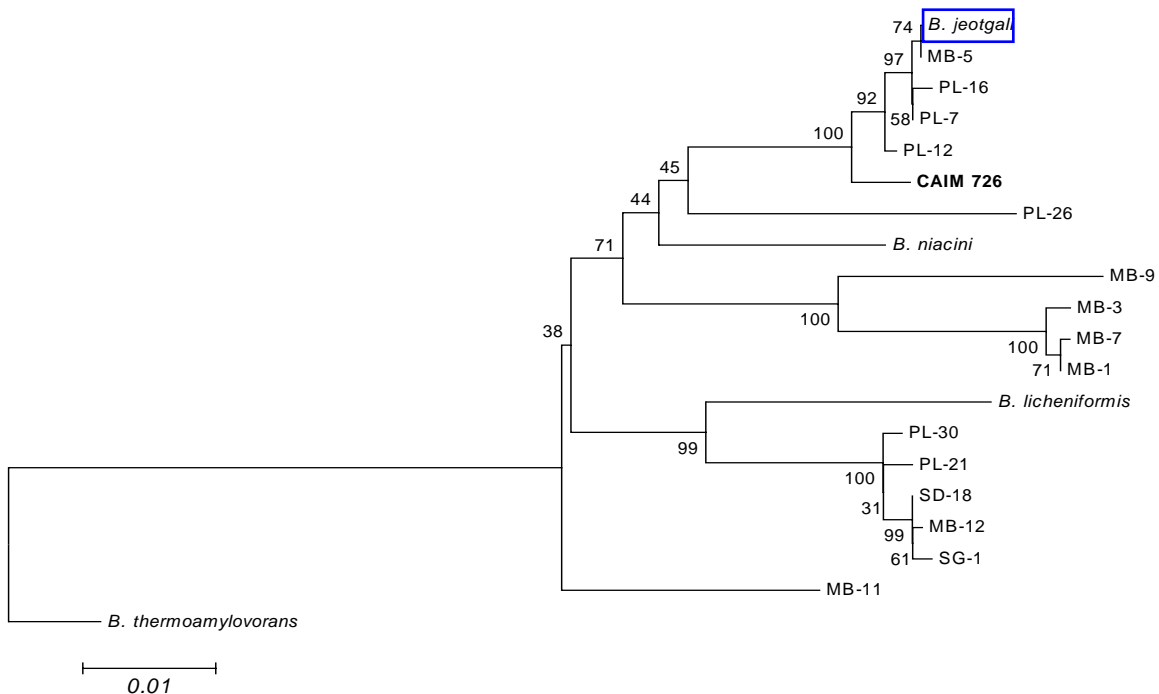
*Bacillus jeotgali* fue aislada del “jeotgal”, un alimento marino fermentado típico de Korea (Jung-Hoon *et al.*, 2001). Por lo que la bacteria seleccionada para esta investigación fue llamada *Bacillus jeotgali* cepa U3, por la relación genética que existe con *Bacillus jeotgali* (Anexo1).

Estas dos bacterias, presentan una coloración salmón como lo reportan los autores antes mencionados para la cepa YKJ-11 identificada por ellos. La cepa U3 fue depositada en la Colección de Microorganismos de Importancia Acuática (CAIM) del Centro de Investigación en Acuicultura y Desarrollo Unidad Mazatlán (CIAD), con el número CAIM 726.

### 6.2 Efecto del pH en la biosorción de los metales

#### 6.2.1 Cd

La determinación del pH óptimo para la biosorción de Cd, se efectuó a una salinidad de 0, a 25°C, con una biomasa de 0.5 g L<sup>-1</sup> y una concentración inicial del metal (C<sub>0</sub>) de 34.7±5.4 mg L<sup>-1</sup>. Las máximas capacidades de biosorción se observaron en los experimentos realizados a pH 5 y 7, (34.5 y 34.0 mg Cd g<sup>-1</sup>, respectivamente) (Tabla 6.1; Figura 6.2). Para obtener el modelo cinético que mejor se ajustara a los datos experimentales, fueron evaluadas las formas lineales de los seis modelos para cada pH.

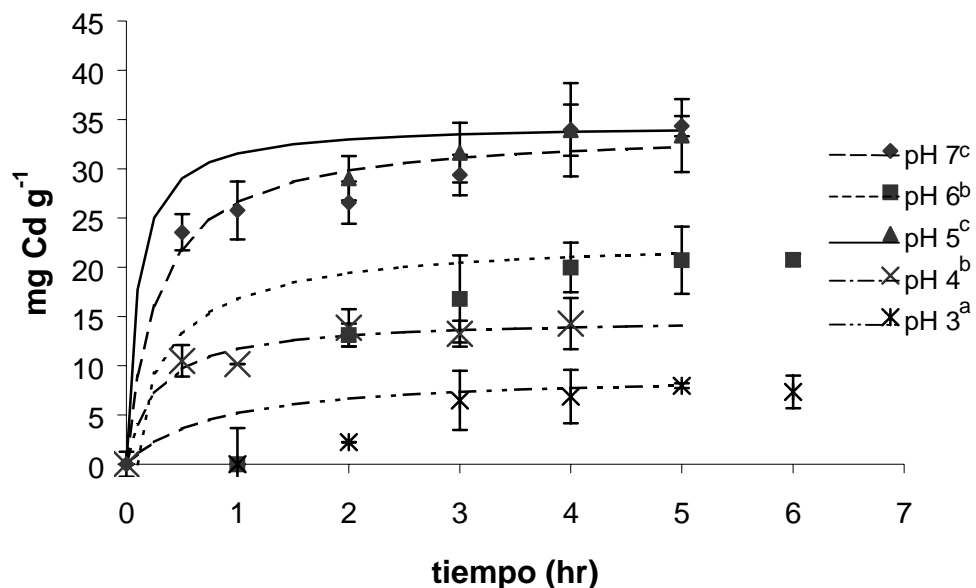


**Figura 6.1.** Árbol filogenético del gen 16S rRNA de la bacteria de estudio (CAIM 726), comparada con otras cepas del género *Bacillus*.

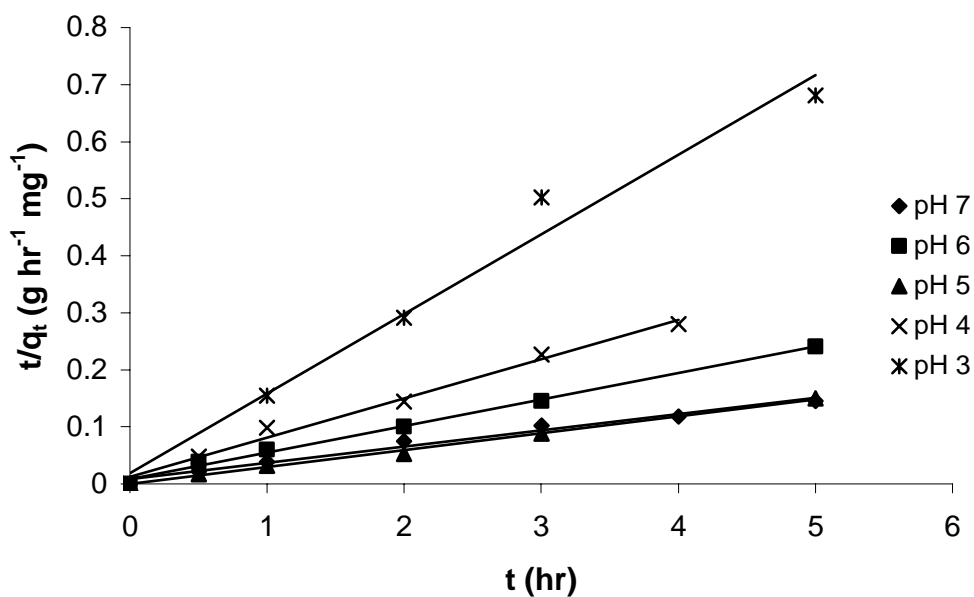
El modelo cinético de pseudo-segundo orden, fue el que mejor se ajustó a los datos experimentales, debido a que fue el único que describió una línea recta. En la Figura 6.2 se observa como los datos experimentales se aproximan a una recta cuando se grafica  $t q_t^{-1}$  contra  $t$  (donde  $t$  es tiempo en horas y  $q_t$  es la cantidad de metal biosorbido en  $\text{mg g}^{-1}$  de biomasa en el tiempo  $t$ ). Con la pendiente y la intersección al origen se obtienen los valores de  $k_2$  ( $\text{g mg}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) y  $q_e$  ( $\text{mg g}^{-1}$ ).

**Tabla 6.1.** Valores de  $k_2$  y  $q_e$  para la biosorción de Cd a diferentes valores de pH obtenidos por regresión lineal y análisis de errores.

pH	Regresión		Análisis de errores	
	$k_2$ ( $\text{g mg}^{-1}\text{h}^{-1}$ )	$q_e$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )	$k_2$ ( $\text{g mg}^{-1}\text{h}^{-1}$ )	$q_e$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )
3	1.03	7.17	0.14	9.24
4	0.38	14.56	0.25	14.82
5	29.21	33.78	0.30	34.55
6	0.26	21.51	0.12	22.97
7	0.10	35.09	0.11	34.01



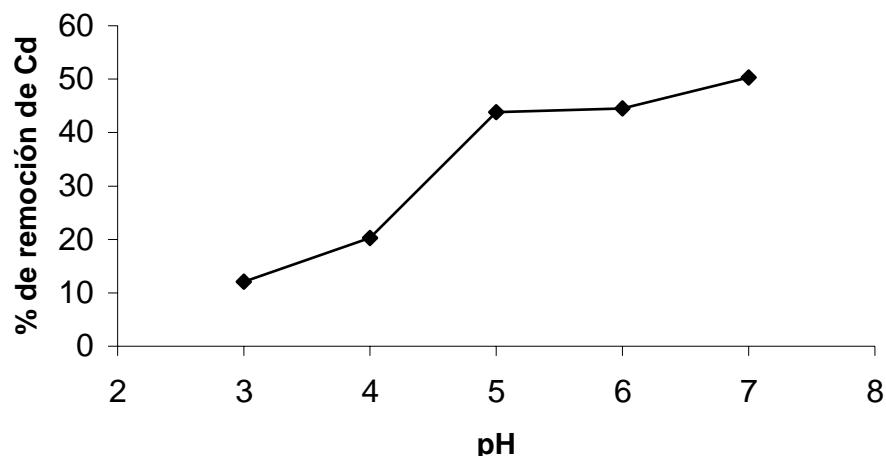
**Figura 6.2.** Biosorción de Cd a diferentes valores de pH. 25°C, salinidad 0; biomasa 0.5 g L<sup>-1</sup>; C<sub>0</sub> = 34.7±5.4 mg L<sup>-1</sup>. Las líneas describen el modelo de pseudosegundo orden (letras diferentes indican diferencia significativa, prueba de tukey HSD, n=3, p<0.05).



**Figura 6.3.** Biosorción de Cd a diferentes valores de pH aplicando la forma lineal del modelo de pseudo-segundo orden.

Aunque a partir de la forma lineal del modelo, se pueden obtener las constantes mencionadas; autores como Cheung *et al.*, (2001), Ng *et al.*, (2003) y Ho *et al.*, (2002) recomiendan no hacerlo, ya que la transformación de una isoterma no lineal a una forma lineal altera su estructura de error y puede incluso violar la varianza de error y la normalidad del método de los mínimos cuadrados.

En la Tabla 6.1 se muestran los valores para  $k_2$  y  $q_e$  obtenidos con el modelo de pseudo-segundo orden, tanto por regresión lineal como por el análisis de errores. En esta Tabla, los valores de  $q_e$  son similares, pero no así los valores de  $k_2$ . Para pH de 5, el valor de  $k_2$  obtenido por el análisis de errores es de 0.30, mientras que para la regresión lineal es de 29.21. Por lo anterior se ha preferido realizar el análisis de errores en cada uno de los experimentos, y con esto garantizar que el modelo cinético describa lo mejor posible los datos experimentales. En la Tabla A2-1 (Anexo 2), se muestran las funciones de error que mejor se ajustaron a cada uno de los valores de pH, así como los valores de  $k_2$  y  $q_e$ , obtenidos con cada una de estas funciones. Para obtener el pH óptimo de biosorción, se calculó el porcentaje neto de Cd removido de la solución a partir de la concentración de metal en la solución una vez que se alcanza el equilibrio,  $C_e$  (que se obtiene de  $q_e$  del modelo cinético) y la concentración inicial de metal en solución. En la Figura 6.4 se puede observar el porcentaje de remoción de Cd a los diferentes valores de pH. Aunque para pH 5 y 7 no se encontró una diferencia significativa, se optó por éste último como el valor del pH óptimo.



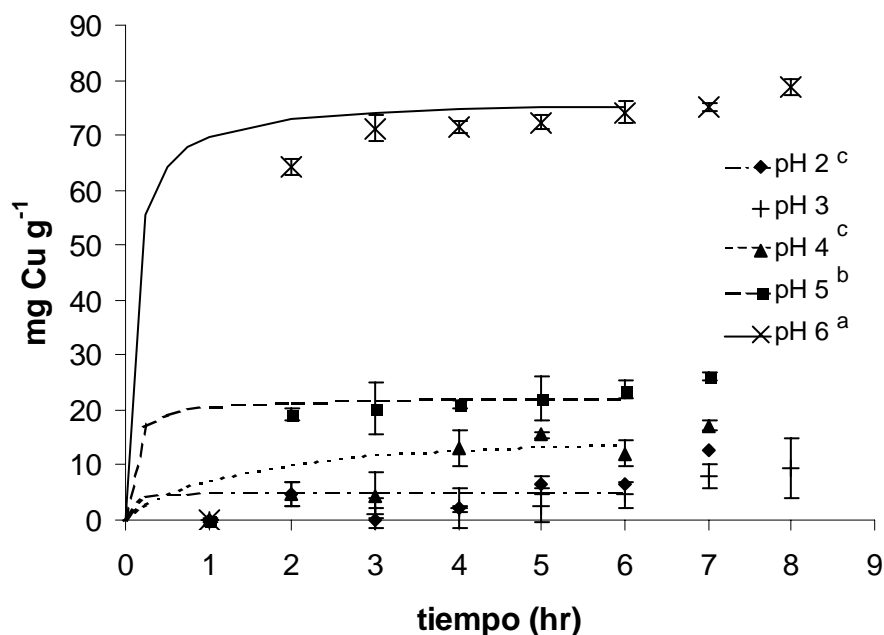
**Figura 6.4.** Porcentaje de remoción de Cd a diferentes valores de pH. 25°C, salinidad 0; biomasa 0.5 g L<sup>-1</sup>; C<sub>0</sub> = 34.7±5.4 mg L<sup>-1</sup>.

### 6.2.2 Cu

El estudio para la obtención del pH óptimo de biosorción del Cu se realizó a una salinidad de 0, temperatura de 25°C, una biomasa de 0.28 g L<sup>-1</sup> y C<sub>0</sub> = 40.6 ± 3.7 mg L<sup>-1</sup>. En la Figura 6.5, se observa que el desarrollo de la biosorción de Cu con respecto al tiempo. Las líneas en esta gráfica son las obtenidas por el modelo de pseudo-segundo orden, que al igual que para el Cd, fue el que mejor describió los datos experimentales.

Para determinar el pH óptimo de biosorción para el Cu, se obtuvo el porcentaje de remoción para cada uno de los valores de pH (Figura 6.6). El pH 6, fue el que mayor porcentaje tuvo, con un 81.07%. En esta figura no se muestra el porcentaje para pH 3, debido a que los datos obtenidos a este pH no se ajustaron al ningún modelo cinético.

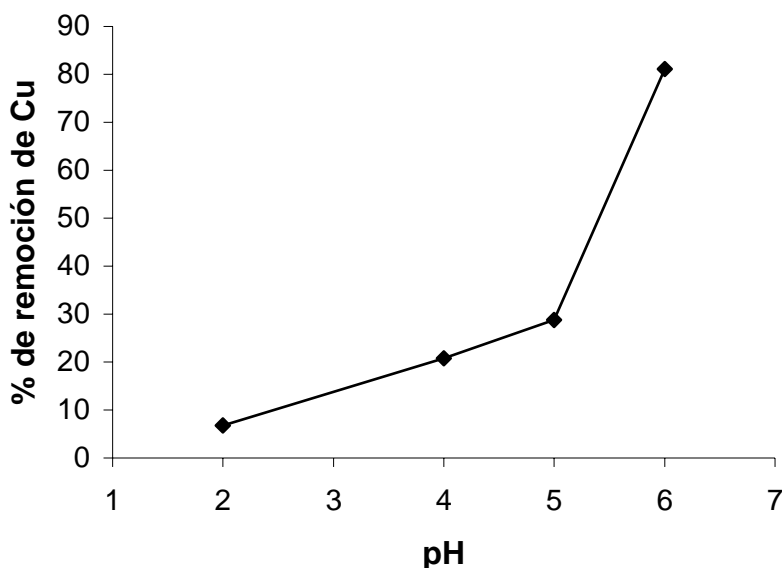
En la Tabla 6.2 se muestran los valores de  $k_2$  y  $q_e$  obtenidos con el modelo de pseudo-segundo orden, y en la Tabla A2-2 (Anexo 2), se muestran los valores de



**Figura 6.5.** Biosorción de Cu a diferentes valores de pH. Salinidad 0, temperatura de 25°C, biomasa de 0.28 g L<sup>-1</sup> y C<sub>0</sub> = 40.6 ± 3.7 mg L<sup>-1</sup>. Las líneas describen el modelo de pseudosegundo orden (letras diferentes indican diferencia significativa, prueba de tukey HSD, n=3, p<0.05).

las constantes para los otros valores de pH, así como las funciones de error que mejor ajustaron los datos teóricos a los experimentales.

El valor de la constante cinética,  $k_2$ , para el pH óptimo fue de 0.14, el cual fue obtenido con la función de error MPSD. De acuerdo con el modelo cinético, en los primeros 15 minutos de iniciado el proceso de biosorción, se había removido el 72.5% del Cu (II), con respecto al total removido en el equilibrio (aproximadamente 6 horas), mientras que a la hora se había removido el 91.3%. Teniendo con esto una biosorción rápida por parte de las bacterias al estar en contacto con el metal en solución.



**Figura 6.6.** Porcentaje de remoción de Cu a diferentes valores de pH. Salinidad 0, temperatura de 25°C, biomasa de 0.28 g L<sup>-1</sup> y C<sub>0</sub> = 40.6 ± 3.7 mg L<sup>-1</sup>

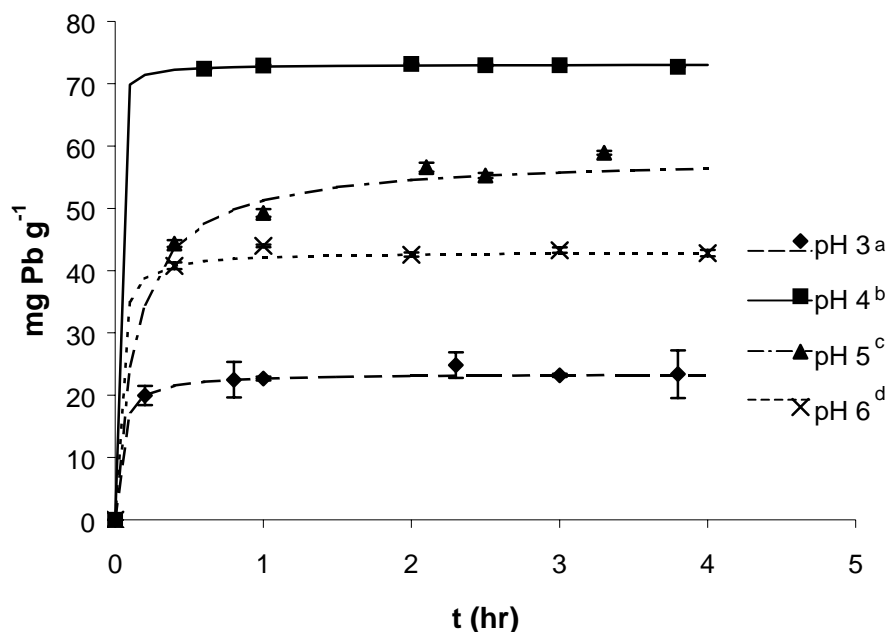
**Tabla 6.2.** Valores de  $k_2$  y  $q_e$  para la biosorción de Cu a diferentes valores de pH obtenidos mediante el análisis de las funciones de error.

pH	$k_2$ (g mg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	$q_e$ (mg g <sup>-1</sup> )
2	0.04	6.50
4	0.05	16.91
5	0.55	22.46
6	0.14	76.40

### 6.2.3 Pb

Para evaluar el efecto del pH en la biosorción del Pb, los bioensayos se realizaron a una temperatura de 25°C, salinidad de 30, biomasa de 0.5 g L<sup>-1</sup> y C<sub>0</sub> = 41.5 ± 2.0 mg L<sup>-1</sup>. A diferencia de los otros metales, para el Pb se utilizó una salinidad de 30 en la determinación del pH óptimo y no de cero. Esto debido a que este metal fue el primero en evaluarse, y al ser las bacterias de origen marino, se optó por llevar a cabo los bioensayos a esta salinidad. En la Figura 6.7, se muestra la biosorción de Pb a los diferentes valores de pH utilizados. Las líneas en esta figura, al igual que en los otros metales, describen el modelo de pseudosegundo orden que es el que mejor se ajusta a los datos experimentales. En la Tabla 6.3, se muestran las constantes k<sub>2</sub> y q<sub>e</sub> obtenidas por este modelo.

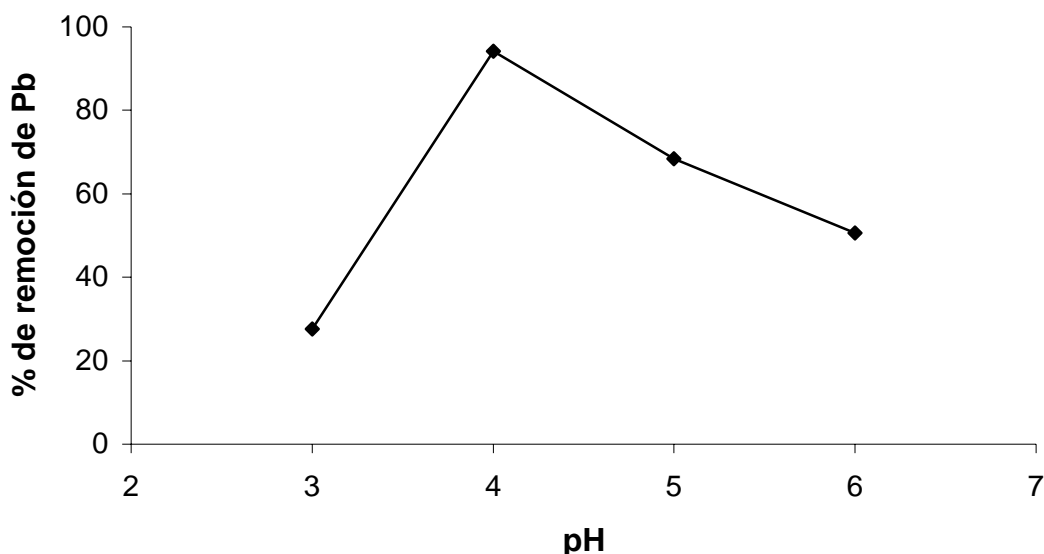
La mayor remoción de Pb, se obtuvo a pH 4, con un 94.2% de remoción de Pb de la solución (Figura 6.8). Las constantes cinéticas obtenidas por el modelo para este pH fueron de 2.9 y 73.1 para k<sub>2</sub> y q<sub>e</sub>, respectivamente. La función de error con la cual se obtuvieron estos valores fue la HYBRD. En la Tabla A2-3 del anexo 2, se muestran los valores de las constantes para los otros pH, así como las funciones con las que fueron obtenidas.



**Tabla 6.7.** Valores de  $k_2$  y  $q_e$  para la biosorción de Pb a diferentes valores de pH obtenidos mediante el análisis de las funciones de error (letras diferentes indican diferencia significativa, prueba de tukey HSD, n=3, p<0.05).

**Tabla 6.3.** Valores de  $k_2$  y  $q_e$  para la biosorción de Pb a diferentes valores de pH obtenidos mediante el análisis de las funciones de error (letras diferentes indican diferencia significativa, prueba de tukey HSD,  $n=3$ ,  $p<0.005$ ).

pH	$k_2$ ( $\text{g mg}^{-1} \text{h}^{-1}$ )	$q_e$ ( $\text{mg g}^{-1}$ )
3	1.21	23.5
4	2.91	73.1
5	0.13	58.3
6	1.04	43.0



**Figura 6.8.** Porcentaje de remoción de Pb a diferentes valores de pH. 25°C, salinidad de 30, biomasa de  $0.5 \text{ g L}^{-1}$  y  $C_0 = 41.5 \pm 2.0 \text{ mg L}^{-1}$ .

De acuerdo con los datos cinéticos, a los cinco minutos de contacto entre las bacterias y la solución con Pb, se había removido el 96% del Pb total removido en el equilibrio, un 99% a los 20 minutos, para que el sistema llegara al equilibrio en una hora.

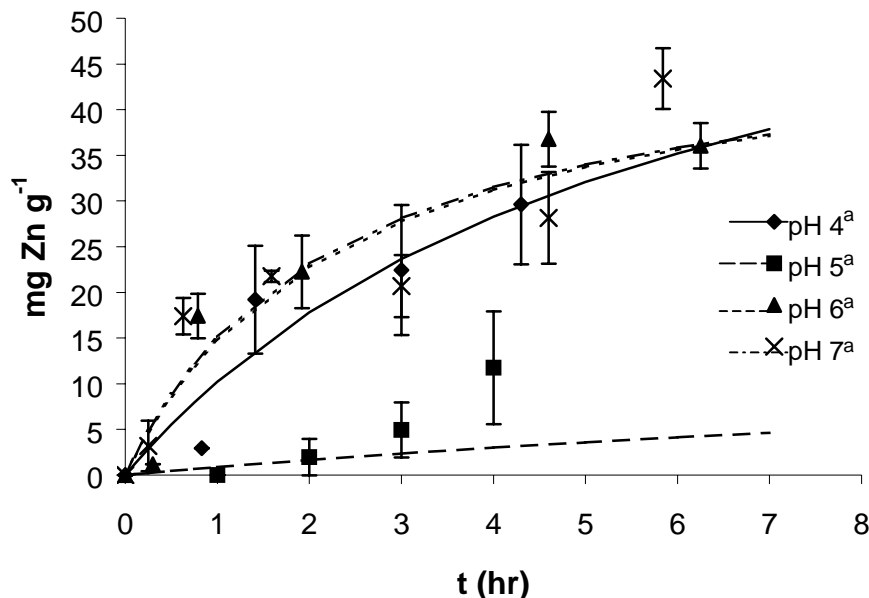
#### 6.2.4 Zn

La determinación del pH óptimo en la biosorción del Zn por las bacterias fue realizado a 25°C, una biomasa de  $0.5 \text{ g L}^{-1}$ , salinidad 0, y  $C_0 = 75.5 \pm 3.7 \text{ mg g}^{-1}$ . En la Figura 6.9, se muestra el desarrollo de biosorción con respecto al tiempo. Las líneas fueron obtenidas con el modelo de pseudosegundo orden. En la Tabla 6.4 se muestran los valores de las constantes para este modelo a los diferentes valores de pH. De acuerdo al análisis estadístico HSD de tukey, no hubo



diferencias significativas entre los valores obtenidos, por lo tanto el pH no influye en la biosorción de Zn por las bacterias. Aún así, realizando un análisis del porcentaje de Zn removido de la solución se optó por elegir el pH 7 óptimo para este proceso (Figura 6.10).

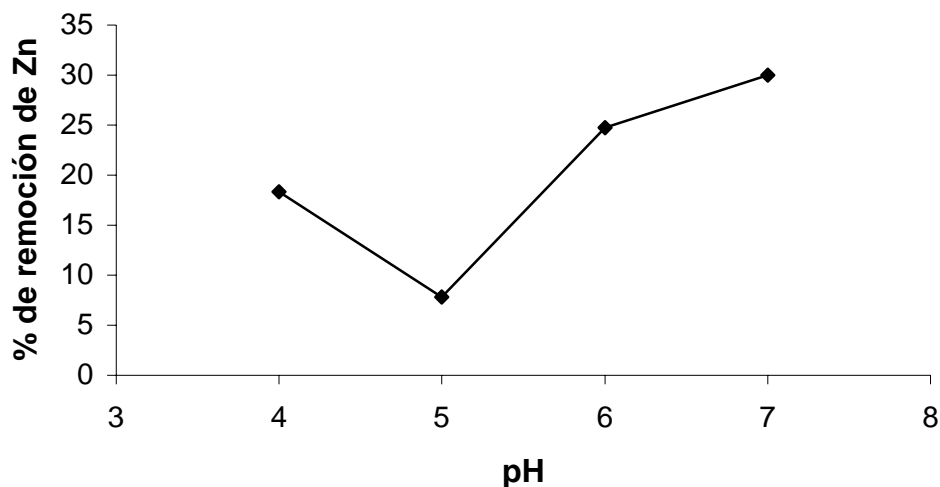
Acorde con los datos obtenidos de la cinética para pH 7, la biosorción de Zn fue más lenta que para los otros metales. A los 15 minutos de estar en contacto las bacterias con la solución de Zn, se había removido el 10% de metal con respecto al total removido en el equilibrio. Mientras que a la hora, sólo se había removido el 30.5%, y transcurridas 7 horas, el 75.5%; completándose el equilibrio después de 50 horas.



**Figura 6.9.** Biosorción de Zn a diferentes valores de pH. 25°C, biomasa de 0.5 g L<sup>-1</sup>, salinidad 0, y C<sub>0</sub> = 75.5 ± 3.7 mg L<sup>-1</sup>. Las líneas describen el modelo de pseudosegundo orden (<sup>a</sup> no se presentaron diferencias significativa, prueba de tukey HSD, n=3, p<0.05).

**Tabla 6.4.** Valores de k<sub>2</sub> y q<sub>e</sub> para la biosorción de Zn a diferentes valores de pH, obtenidos mediante el análisis de las funciones de error.

pH	k <sub>2</sub> (g mg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	q <sub>e</sub> (mg Zn g <sup>-1</sup> )
4	0.003	68.8
5	0.003	16.5
6	0.008	49.8
7	0.009	49.4

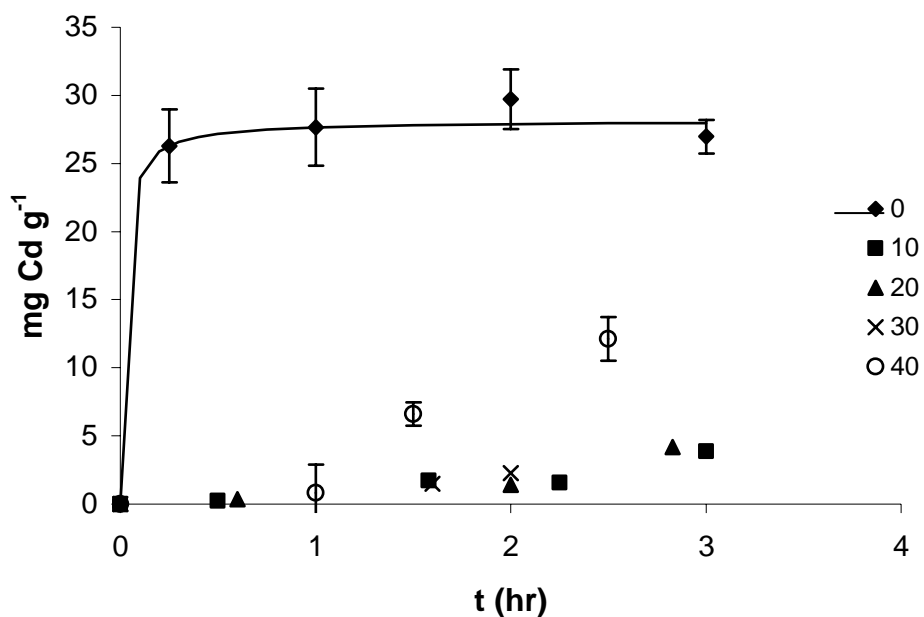


**Figura 6.10.** Porcentaje de remoción de Zn a diferentes valores de pH 25°C, biomasa de 0.5 g L<sup>-1</sup>, salinidad 0, y C<sub>0</sub> = 75.5 ± 3.7 mg L<sup>-1</sup>.

### 6.3 Efecto de la salinidad en la biosorción de los metales

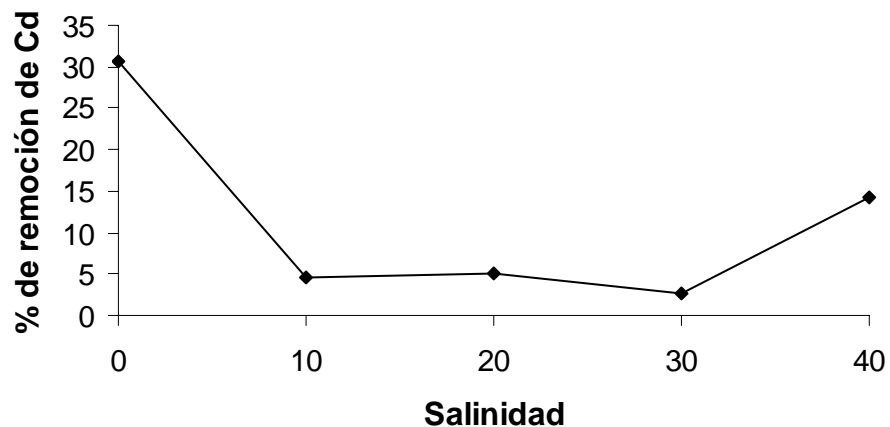
#### 6.3.1 Cd

Una vez obtenido el pH óptimo para la biosorción de Cd, se realizaron los bioensayos para la determinación de la salinidad óptima. Los experimentos se llevaron a cabo con una temperatura de 25°C, una biomasa de 0.5 g L<sup>-1</sup>, pH 7, y C<sub>0</sub> = 42.4 ± 1.0 mg L<sup>-1</sup>. En la figura 6.11, se muestra el efecto de la salinidad en la capacidad de biosorción de las bacterias con respecto al tiempo. A diferencia de otros experimentos, en los que todos los valores se ajustaban a un modelo cinético, no fue así para este caso. Sólo los datos experimentales a salinidad cero, pudieron ajustarse al modelo cinético de pseudosegundo orden. Esto debido a la poca biosorción a otras salinidades, mostrándose con esto el gran efecto de la competencia de otros iones con el Cd. Los valores de k<sub>2</sub> y q<sub>e</sub> obtenidos mediante el modelo, fueron de 2.03 y 28.1, respectivamente. La función de error que mejor se ajustó a los datos experimentales y con la cual fueron obtenidos estos valores, fue la función EABS. En la Tabla A3-1, (Anexo 3), se muestran los valores de k<sub>2</sub> y q<sub>e</sub>, obtenidos también con las otras funciones de error.



**Figura 6.11.** Biosorción de Cd a diferentes valores de salinidad. 25°C, biomasa 0.5 g L<sup>-1</sup>, pH 7, y C<sub>0</sub> = 42.4 ± 1.0 mg L<sup>-1</sup>. La línea describe el modelo de pseudosegundo orden.

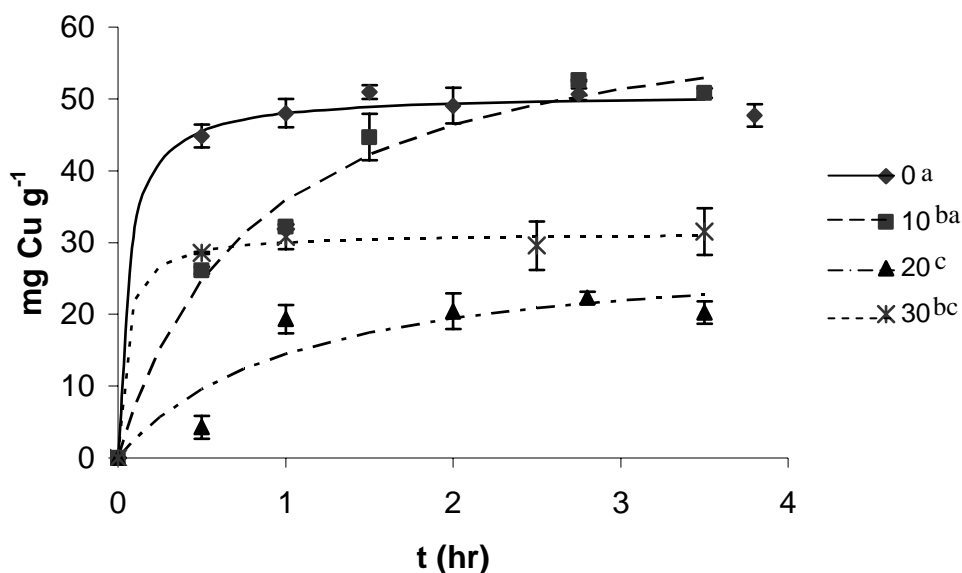
En base al modelo cinético, a los 6 minutos de contacto entre las bacterias y la solución de Cd, se había removido el 86.9% del Cd total removido en el equilibrio. Después de 15 minutos, se había removido el 95.5%; y a los 45 minutos, prácticamente se había alcanzado el equilibrio, con una remoción del 99.8%. En la Figura 6.12, se muestra el porcentaje total de Cd removido a las diferentes salinidades, los valores fueron obtenidos transcurridas 2.5 horas de contacto de las bacterias con la solución del metal.



**Figura 6.12.** Porcentaje de remoción de Cd a diferentes salinidades. 25°C, biomasa 0.5 g L<sup>-1</sup>, pH 7, y C<sub>0</sub> = 42.4 ± 1.0 mg g<sup>-1</sup>.

### 6.3.2 Cu

El efecto de la salinidad en la biosorción de Cu, fue estudiado a 25°C, con biomasa de 0.5 g L<sup>-1</sup>, pH 6, y una C<sub>0</sub> = 46.4 ± 6.0 mg L<sup>-1</sup>. Los datos de la capacidad de biosorción con respecto al tiempo a diferentes salinidades se muestra en la Figura 6.13. De acuerdo con el modelo cinético de pseudosegundo orden, la mayor capacidad de biosorción, se obtuvo a la salinidad de 10, con un valor de q<sub>e</sub> de 65.2 mg g<sup>-1</sup>, y una constante k<sub>2</sub> de 0.02. En la Tabla 6.5, se muestran las constantes cinéticas para las demás salinidades; y en la Tabla A3-2 (anexo 3), se muestran los valores de estas mismas constantes, calculadas con las diferentes funciones de error. Aunque en la Figura 6.13 se observe que el mayor porcentaje de remoción de Cu se presentó a una salinidad de 10 (transcurridas 3.5 horas), los datos de cinética y la Figura 6.13, muestran que para tiempos menores de 2 horas, la salinidad óptima es de cero. A los seis minutos de iniciado el proceso de biosorción, para la salinidad de cero, se ha alcanzado el 63.2% del equilibrio, mientras que para la salinidad de diez, solo el 10.9%.

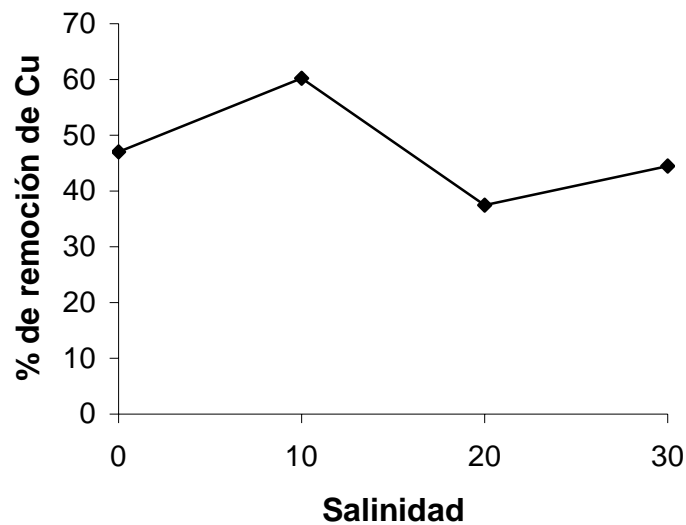


**Figura 6.13.** Biosorción de Cu a diferentes salinidades. 25°C, con biomasa de 0.5 g L<sup>-1</sup>, pH 6, y una C<sub>0</sub> = 46.4 ± 6.0 mg L<sup>-1</sup>. Las líneas describen el modelo de pseudosegundo orden (letras diferentes indican diferencia significativa, prueba de tukey HSD, n=3, p<0.05).

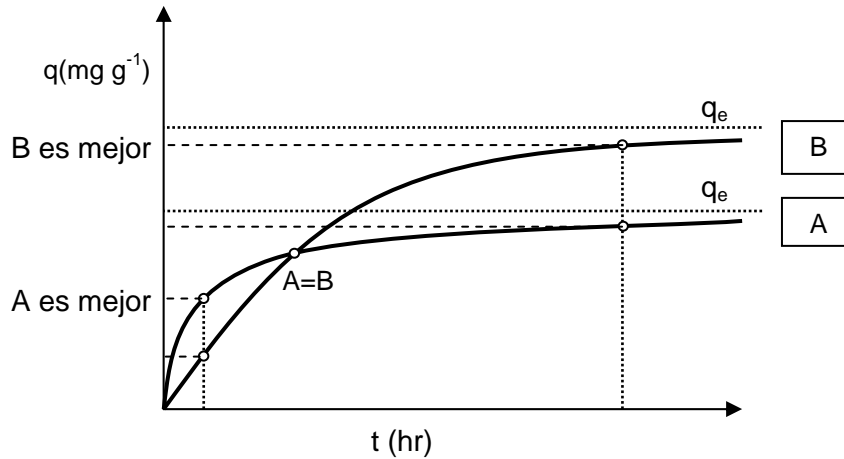
**Tabla 6.5.** Valores de  $k_2$  y  $q_e$  para la biosorción de Cu a diferentes salinidades obtenidos mediante el análisis de las funciones de error.

Salinidad	$k_2$ (g mg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	$q_e$ (mg g <sup>-1</sup> )
0	0.34	50.7
10	0.02	65.2
20	0.03	29.4
30	0.76	31.2

Después de una hora de haberse iniciado la biosorción, los porcentajes fueron del 94.5% para la salinidad cero y 55.0% para la salinidad de 10. Kratochvil y Volesky, (1998) explican que cuando se presentan estos casos, en donde con el modelo teórico utilizado se obtenga un valor de  $q_e$  (o  $q_{max}$ , para las isothermas), favorable para un factor; como en el caso de B de la Figura 6.15. Se debe tomar en cuenta la variable decisiva del proceso, en este caso el tiempo. Obsérvese en la Figura, como para un menor tiempo de biosorción, el factor A es mejor, y para un tiempo mayor, lo es el factor B. Cuando se piensa en un proceso a gran escala, las dimensiones del equipo a utilizar, están directamente relacionadas con el tiempo de retención de la solución que contiene el metal. Tomando esto en cuenta, se optó por elegir a la salinidad de cero, como la óptima para la biosorción de Cu por las bacterias.



**Figura 6.14.** Porcentaje de remoción de Cu a diferentes salinidades. 25°C, con biomasa de 0.5 g L<sup>-1</sup>, pH 6, y una  $C_0 = 46.4 \pm 6.0$  mg L<sup>-1</sup>.

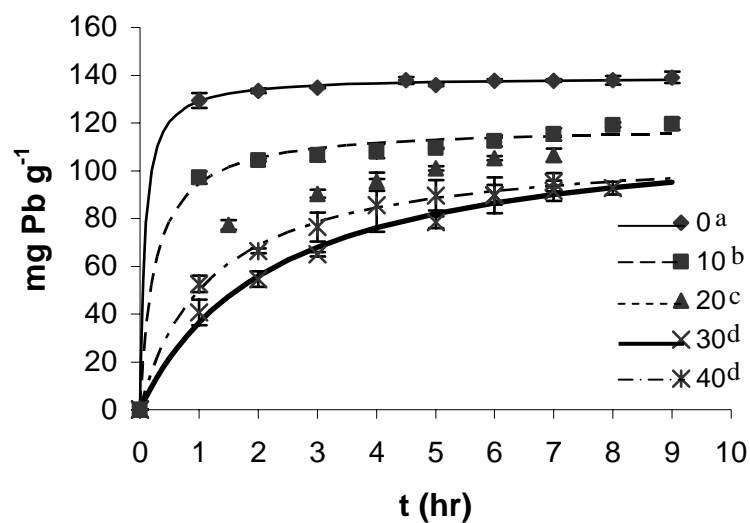


**Figura 6.15.** Comparación de dos modelos cinéticos de biosorción. Cuando se comparan dos modelos de biosorción, en términos de  $q$ , deben hacerse a las mismas condiciones de equilibrio.

### 6.3.3 Pb

Para evaluar el efecto de la salinidad en la biosorción de Pb por las bacterias, se realizaron bioensayos a  $25^{\circ}\text{C}$ , con biomasa una de  $0.5 \text{ g L}^{-1}$ , pH 4, y una  $C_0 = 83.0 \pm 2.2 \text{ mg L}^{-1}$ . De acuerdo con los datos obtenidos, este metal presentó una muy buena biosorción por parte de la bacteria. Ya que a la salinidad de cero se obtuvieron capacidades de biosorción de hasta  $139.2 \text{ mg g}^{-1}$ . En la Figura 6.16, se observa el desarrollo de la capacidad de biosorción con respecto al tiempo a diferentes salinidades. La Tabla 6.6 muestra, los valores de las constantes  $k_2$  y  $q_e$ , del modelo de pseudosegundo orden, que al igual que en el bioensayo de pH óptimo para el Pb, fue el que mejor se ajustó a este proceso de biosorción.

Al analizar los valores de las constantes  $k_2$  en la Tabla 6.6, se observa que a salinidad de cero, se presenta la biosorción más rápida, seguida de la salinidad de 10. En base a los datos cinéticos, a los seis minutos con una salinidad de cero, se había removido el 56.1% de Pb de los  $139.2 \text{ mg g}^{-1}$  alcanzados en el equilibrio. Mientras que a los 15 minutos, el porcentaje fue de 76.1, y transcurrida una hora fue de 92.7%. En la Figura 6.17, se muestran los porcentajes totales de remoción de Pb a las diferentes salinidades estudiadas.



**Figura 6.16.** Biosorción de Pb a diferentes salinidades. 25°C, biomasa 0.5 g L<sup>-1</sup>, pH 4, y una C<sub>0</sub> = 83.0 ± 2.2 mg L<sup>-1</sup>. Las líneas describen el modelo de pseudosegundo orden (letras diferentes indican diferencia significativa, prueba de tukey HSD, n=3, p<0.05).

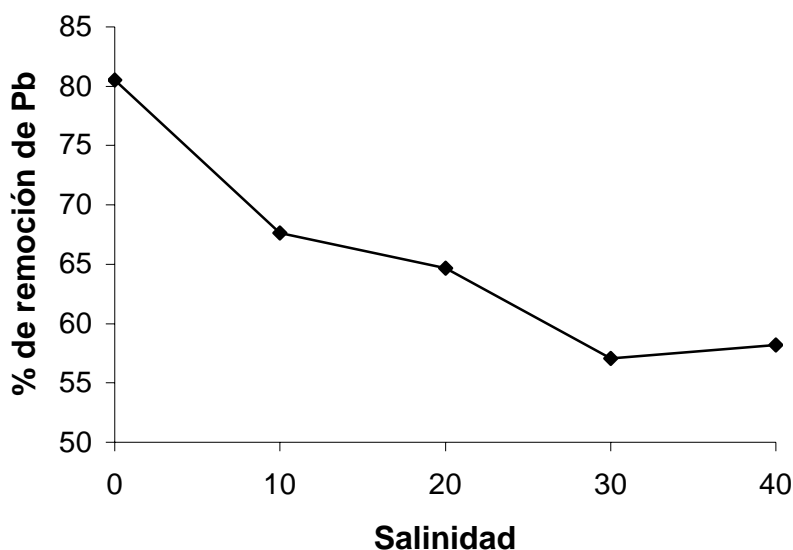
**Tabla 6.6.** Valores de k<sub>2</sub> y q<sub>e</sub> para la biosorción de Pb a diferentes salinidades obtenidos mediante el análisis de las funciones de error.

Salinidad	k <sub>2</sub> (g mg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	q <sub>e</sub> (mg g <sup>-1</sup> )
0	0.09	139.2
10	0.03	118.6
20	0.01	118.1
30	0.004	119.2
40	0.01	109.4

El orden de remoción fue decreciente. A salinidad cero, se removi6 un 80.5% del Pb en soluci6n, mientras que para la salinidad de 40 fue de 58.1%.

### 6.3.4 Zn

Los bioensayos para determinar la salinidad 6ptima para la biosorción de Zn, fueron realizados a una temperatura de 25°C, pH 7, biomasa de 0.5 g L<sup>-1</sup> y C<sub>0</sub> = 30.0 ± 1.5 mg L<sup>-1</sup>. Al igual que como ocurri6 en la determinaci6n del pH 6ptimo, el modelo de pseudosegundo orden fue el que mejor se ajust6 a los datos experimentales.



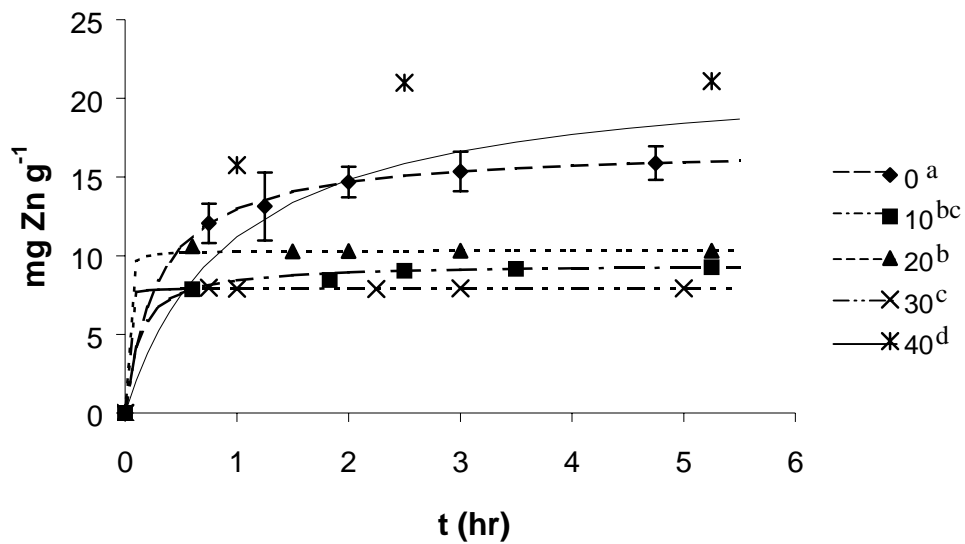
**Figura 6.17.** Porcentaje de remoción de Pb a diferentes salinidades. 25°C, biomasa 0.5 g L<sup>-1</sup>, pH 4, y una C<sub>0</sub> = 83.0 ± 2.2 mg L<sup>-1</sup>.

En la Figura 6.18, se muestra el desarrollo de la biosorción de Zn, con respecto al tiempo, y en la Tabla 6.7, los valores de las constantes  $k_2$  y  $q_e$ , obtenidas mediante el modelo. De acuerdo a las constantes antes mencionadas, las mayores velocidades de biosorción se obtienen a salinidades de 30 y 20, mientras que la biosorción más lenta fue a una salinidad de 40. Al hacer un análisis del total de Zn removido de la solución por las bacterias (Figura 6.19); se observó que a salinidad cero, se logró remover la mayor cantidad de Zn, con un 27.9%, mientras que para la salinidad de 40 fue del 16.2%. Debido a esto, la salinidad óptima para el Zn fue la de cero.

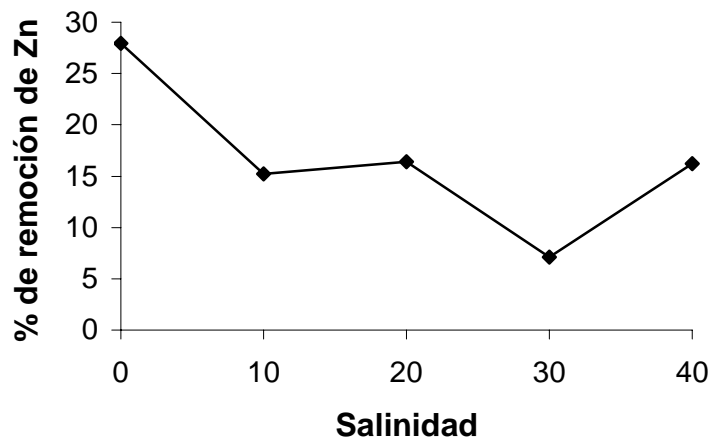
**Tabla 6.7.** Valores de  $k_2$  y  $q_e$  para la biosorción de Zn a diferentes salinidades obtenidos mediante el análisis de las funciones de error.

Salinidad	$k_2$ (g mg <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	$q_e$ (mg g <sup>-1</sup> )
0	0.20	16.89
10	0.85	9.48
20	13.56	10.33
30	40.26	7.92
40	0.05	21.95





**Figura 6.18.** Biosorción de Zn a diferentes salinidades. 25°C, pH 7, biomasa de 0.5 g L<sup>-1</sup> y C<sub>0</sub> = 30.0 ± 1.5 mg g<sup>-1</sup>. Las líneas describen el modelo de pseudosegundo orden (letras diferentes indican diferencia significativa, prueba de tukey HSD, n=3, p<0.05).



**Figura 6.19.** Porcentaje de remoción de Zn a diferentes salinidades. 25°C, pH 7, biomasa de 0.5 g L<sup>-1</sup> y C<sub>0</sub> = 30.0 ± 1.5 mg g<sup>-1</sup>.

#### 6.4 Efecto de la temperatura en la biosorción de los metales: Isotermas de equilibrio

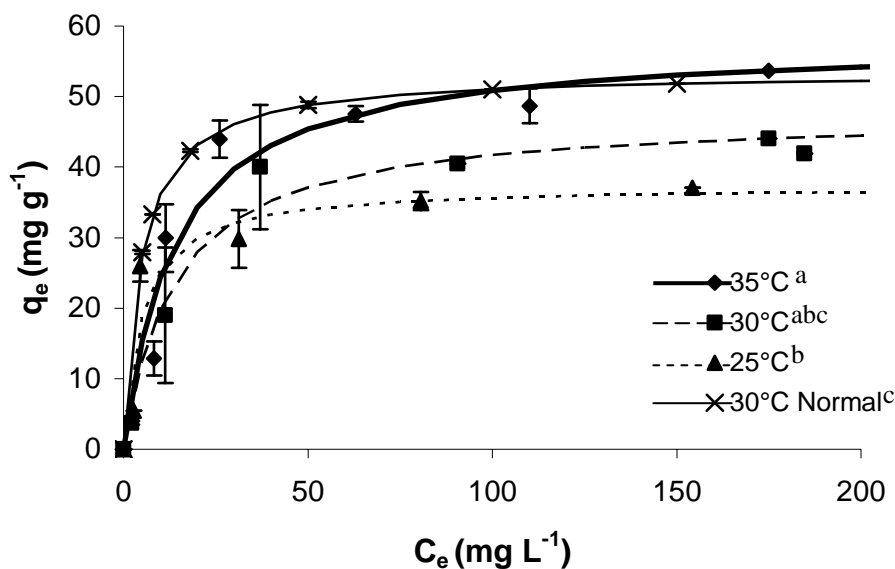
Para evaluar el efecto de la temperatura en la biosorción, se utilizó el método de las adiciones sucesivas (SAM). Durante el estudio de la cinética de biosorción, se pudo observar que los datos de las capacidades máximas de biosorción, fueron mayores que los obtenidos con el método SAM. Por lo anterior se realizó una

comparación entre los dos métodos a temperatura de 30°C, que es la promedio entre las tres utilizadas.

#### 6.4.1 Cd

Para evaluar el efecto de la temperatura en la biosorción de Cd, se realizaron bioensayos a temperaturas de 25, 30 y 35°C. Se utilizó una densidad de biomasa de 0.5 g L<sup>-1</sup>, un pH 7 y una salinidad de cero, que fueron los valores óptimos encontrados para la biosorción del Cd. La isoterma de Langmuir fue la que mejor se ajustó a los datos experimentales.

De acuerdo con los datos de equilibrio obtenidos con la isoterma de Langmuir, la capacidad de biosorción aumenta al hacerlo también la temperatura. En la figura 6.20 se muestran las isotermas para cada una de las temperaturas (incluyendo a 30°C obtenida con el método normal); y en la figura 6.20, la capacidad máxima de biosorción ( $q_{max}$ ) con respecto a la temperatura. Las líneas de la figura 6.25 son las curvas teóricas obtenidas con el modelo de Langmuir y las funciones de error.

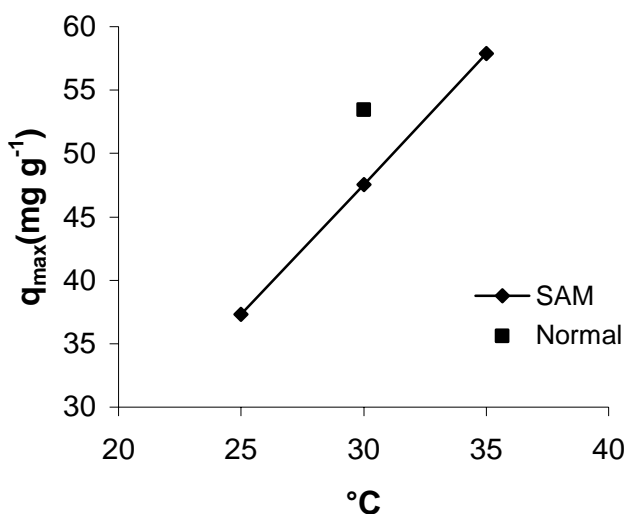


**Figura 6.20.** Efecto de la temperatura en la biosorción de Cd por las bacterias. Biomasa de 0.5 g L<sup>-1</sup>, pH 7, salinidad 0. Las líneas describen el modelo de la isoterma de Langmuir (♦35°C, ■30°C y ▲25°C, temperaturas por el método SAM, letras diferentes indican diferencia significativa, prueba de tukey HSD, n=3, p<0.05).

Las constantes de la Tabla 6.8, muestran que a temperaturas de 30 y 35°C (método SAM), la bacteria muestra la misma afinidad por el Cd, con un valor de  $K_L$  de 0.07. Mientras que a 20°C, la afinidad por el metal fue mayor con un valor de 0.2. Es importante resaltar que en el bioensayo realizado a 30°C con el método normal, la capacidad máxima de biosorción no presentó diferencia significativa con la temperatura a 30°C obtenida con el método SAM. En la Figura 6.21, se puede observar que la biosorción de Cd por las bacterias en el intervalo de 25°C a 35°C es directamente proporcional a la temperatura. Incluso existe una relación lineal entre la temperatura y  $q_{max}$ , mostrando esto que el proceso de biosorción de Cd es dependiente de la energía del sistema (endotérmico). En la Tabla A4-1 (anexo 4), se muestran los valores de las constantes de Langmuir obtenidas con cada una de las funciones de error.

**Tabla 6.8.** Constantes de Langmuir obtenidas mediante el análisis de las funciones de error para la biosorción de Cd a diferentes temperaturas.

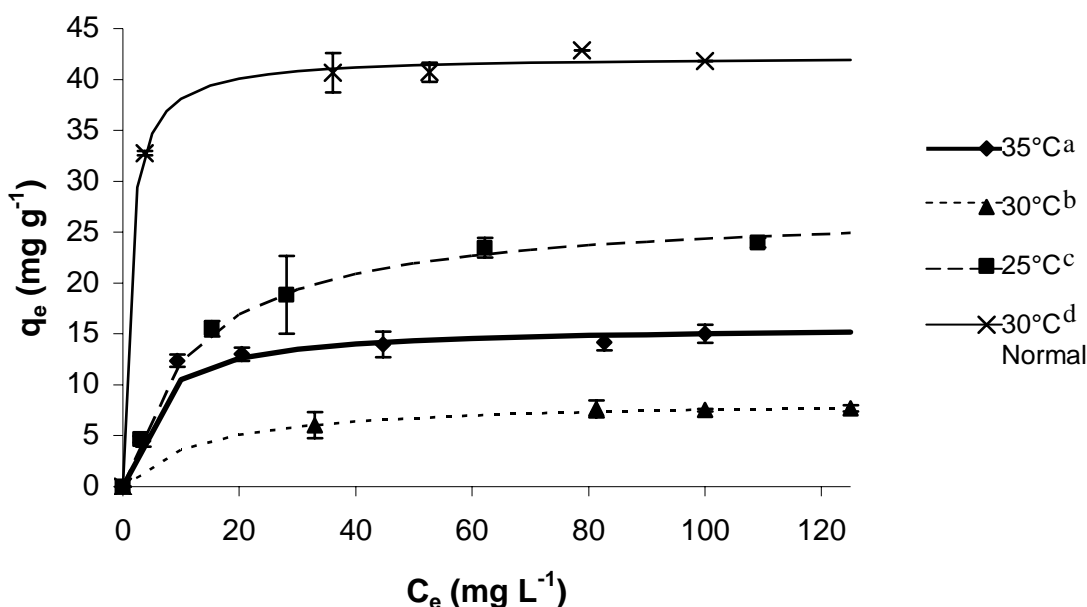
°C	$K_L$ (L mg <sup>-1</sup> )	$q_{max}$ (mg Cd g <sup>-1</sup> )
25	0.20	37.3
30	0.07	47.5
35	0.07	57.9
30 (Normal)	0.21	53.5



**Figura 6.21.** Capacidades de biosorción máxima de Cd con respecto a la temperatura, tanto por el método SAM como el normal. Biomasa de 0.5 g L<sup>-1</sup>, pH 7, salinidad 0.

### 6.4.2 Cu

Los bioensayos para evaluar el efecto de la temperatura en la biosorción de Cu, fueron llevados a cabo con una densidad de biomasa de  $0.5 \text{ g L}^{-1}$ , pH 6 y salinidad 0. El modelo de equilibrio que mejor describió la relación del equilibrio del metal en solución con respecto al metal en el biosorbente fue el de Langmuir (Figura 6.22). Para el método SAM, la temperatura en la que se obtuvo la mayor  $q_{\text{max}}$  fue a  $25^\circ\text{C}$ . En la Tabla 6.9, se muestran los valores para las constantes de cada una de las temperaturas, en la Tabla A4-2 (anexo 4), se muestran los valores de las constantes para todas las temperaturas evaluadas con todas las funciones de error.



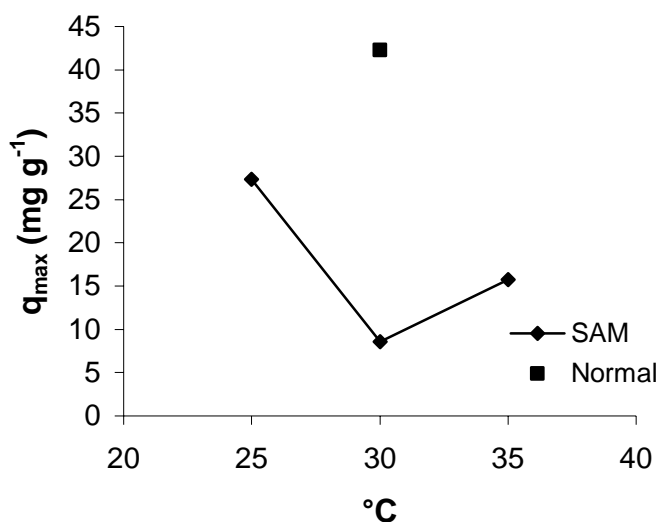
**Figura 6.22.** Efecto de la temperatura en la biosorción de Cu por las bacterias. Biomasa de  $0.5 \text{ g L}^{-1}$ , pH = 6, salinidad 0. Las líneas describen el modelo de la isoterma de Langmuir ( $\blacktriangledown$  $35^\circ\text{C}$ ,  $\blacktriangle$  $30^\circ\text{C}$  y  $\blacksquare$  $25^\circ\text{C}$ , temperaturas por el método SAM, letras diferentes indican diferencia significativa, prueba de tukey HSD,  $n=3$ ,  $p<0.05$ ).

A  $35^\circ\text{C}$ , se encontró una mayor afinidad para el Cu por parte de las bacterias, con un valor de  $K_L$  de 0.20. Por el contrario, para el bioensayo realizado a  $30^\circ\text{C}$  con el método normal, se observó la mayor capacidad de biosorción y de afinidad por el metal. El método SAM da como resultado una menor biosorción de los metales. La

Figura 6.23 muestra que la biosorción de Cu por las bacterias no depende de la temperatura, ya que no existe una relación clara entre las  $q_{\max}$  y el intervalo de temperaturas estudiadas.

**Tabla 6.9.** Constantes de Langmuir obtenidas mediante el análisis de las funciones de error para la biosorción de Cu a diferentes temperaturas.

°C	$K_L$ (l mg <sup>-1</sup> )	$q_{\max}$ (mg Cu g <sup>-1</sup> )
25	0.08	27.3
30	0.07	8.5
35	0.20	15.8
30 (Normal)	0.91	42.3

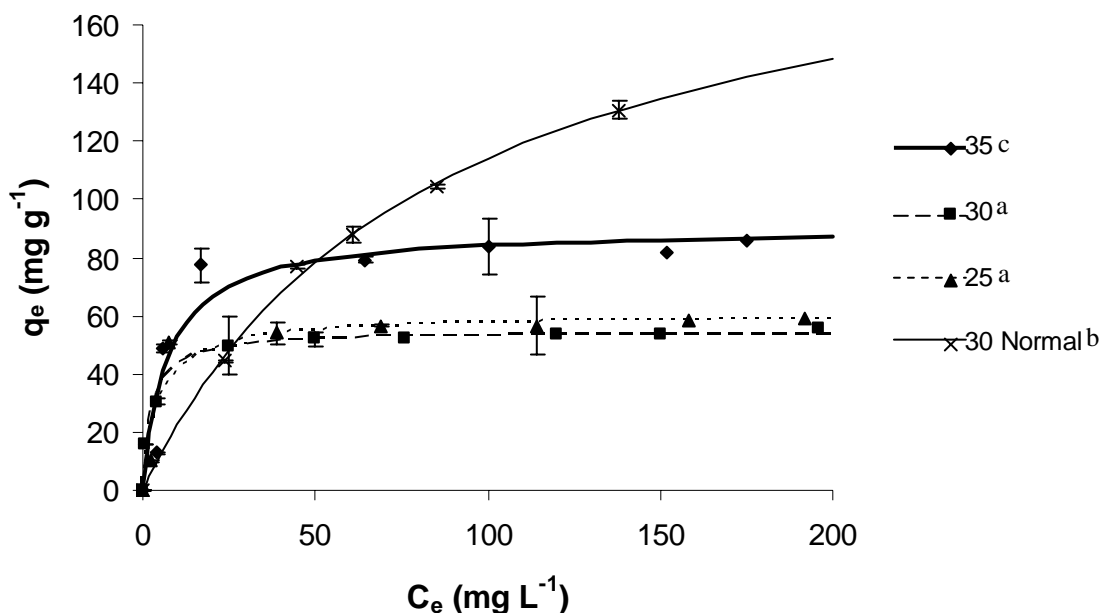


**Figura 6.23.** Capacidades de biosorción máxima para el Cu con respecto a la temperatura. Biomasa de 0.5 g L<sup>-1</sup>, pH = 6, salinidad 0.

#### 6.4.3 Pb

Para la determinación de la temperatura óptima en la biosorción de Pb, los bioensayos se realizaron a una biomasa de 0.5 g L<sup>-1</sup>, pH 4 y salinidad 0. La temperatura óptima para la biosorción obtenida con el método SAM, fue la de 35°C. En la Figura 6.24, se muestran los datos de equilibrio obtenidos en los bioensayos, así como las líneas teóricas descritas por la isoterma de Langmuir que fue la que mejor se ajustó al proceso.

Mediante el análisis de las funciones de error (Tabla A4-3 del anexo 4), se pudieron obtener los valores de las constantes de las isoterms (Tabla 6.10). La temperatura a la cual se presentó la mayor capacidad de biosorción fue a 35°C. Al igual que en el caso del Cd y Cu, la temperatura de 30°C con el método normal, fue 2.8 veces más grande que con el método SAM.

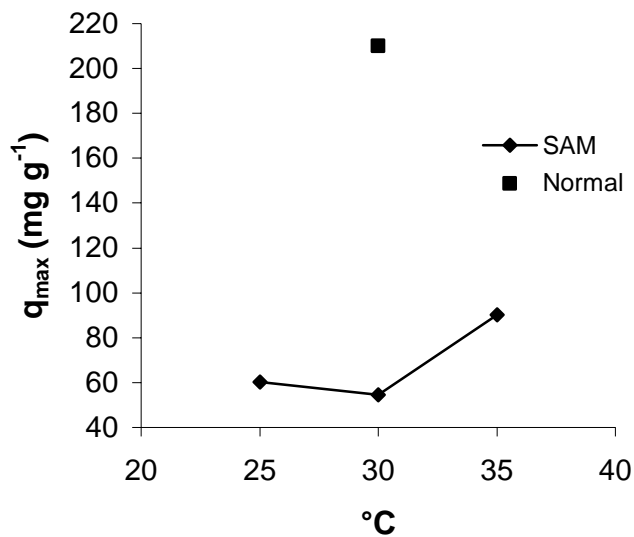


**Figura 6.24.** Efecto de la temperatura en la biosorción de Pb por las bacterias. Biomasa de 0.5 g L<sup>-1</sup>, pH 4, salinidad 0. Las líneas describen el modelo de la isoterma de Langmuir (letras diferentes indican diferencia significativa, prueba de tukey HSD, n=3, p<0.05).

**Tabla 6.10.** Constantes de Langmuir obtenidas mediante el análisis de las funciones de error para la biosorción de Pb a diferentes temperaturas.

°C	$K_L$ (L mg <sup>-1</sup> )	$q_{max}$ (mg Pb g <sup>-1</sup> )
25	0.22	60.29
30	0.40	54.48
35	0.14	90.13
30 (Normal)	0.01	210.13

Aunque la mayor biosorción se presenta a esta temperatura, la afinidad por el Pb, es muy baja ( $K_L = 0.01$ ) comparada con las temperaturas del método SAM. En la Figura 6.25 se muestra la capacidad de biosorción máxima para el intervalo de temperaturas utilizadas.

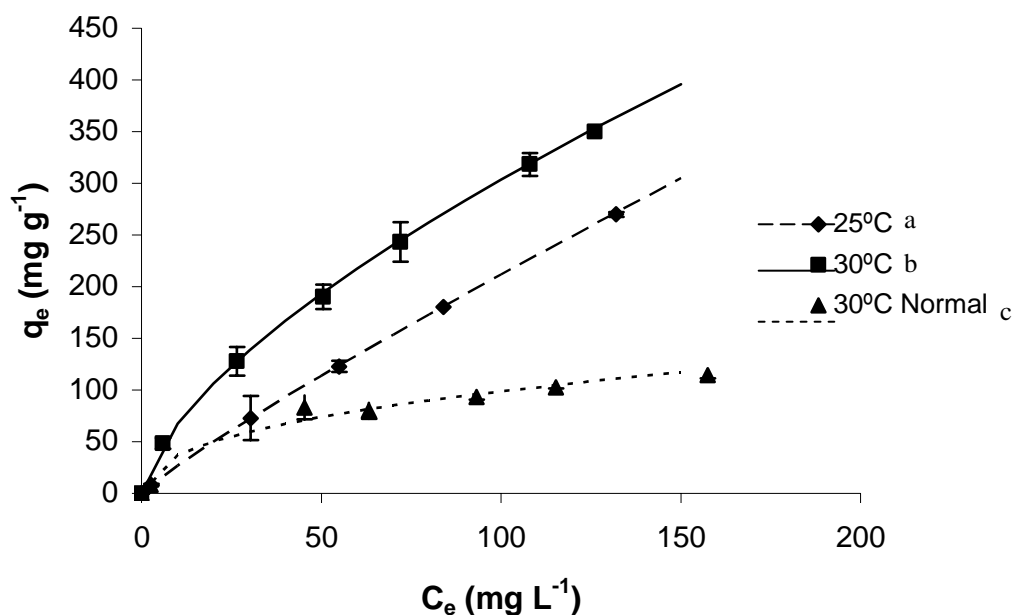


**Figura 6.25.** Capacidades de biosorción máxima para el Pb con respecto a la temperatura. Biomasa de  $0.5 \text{ g L}^{-1}$ , pH 4, salinidad 0.

#### 6.4.4 Zn

El efecto de la temperatura en la biosorción de Zn fue diferente con respecto a los otros metales, ya que el modelo de equilibrio que mejor se ajustó a los datos experimentales fue el de Freundlich. En la Figura 6.26, se muestran los datos experimentales y las isotermas de equilibrio descritas por este modelo. En esta Figura se observa que la mayor biosorción se tuvo a la temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$ . A diferencia también de los otros metales, a la misma temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$  pero con el método normal, se presentó la menor biosorción.

La Tabla 6.11 muestra las constantes de la isoterma de Freundlich obtenidas mediante el análisis de errores para cada una de las temperaturas. Para este caso, la isoterma de Freundlich fue la que mejor se ajustó a los datos debido a que la mayor  $q_{max}$  se alcanza a valores de  $C_e$  muy altos, para los cuales la isoterma de Langmuir no se ajusta (Aksu y Açıkel, 1999).



**Figura 6.26.** Efecto de la temperatura en la biosorción de Zn por las bacterias. Biomasa de  $0.5 \text{ g L}^{-1}$ , pH 7, salinidad 0. Las líneas describen el modelo de la isoterma de Freundlich (letras diferentes indican diferencia significativa, prueba de tukey HSD,  $n=3$ ,  $p<0.05$ ).

**Tabla 6.11.** Constantes de Freundlich obtenidas mediante el análisis de las funciones de error para la biosorción de Zn a diferentes temperaturas.

°C	$K_F (\text{L g}^{-1})$	n
25	3.39	1.11
30	15.04	1.53
30 Normal	14.01	2.36

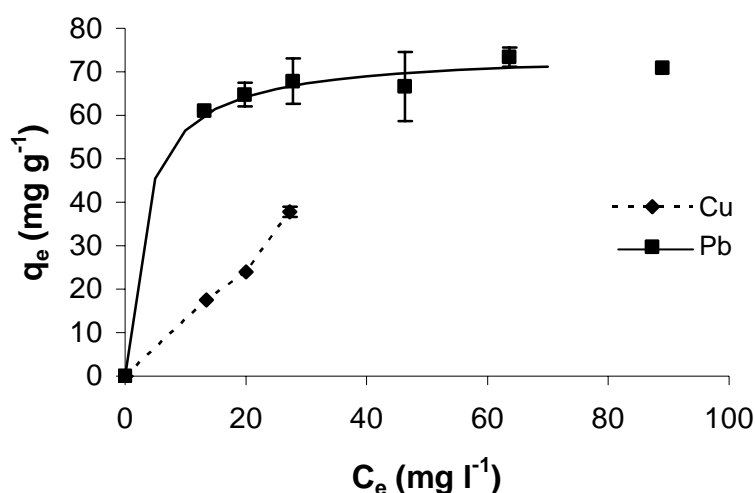
### 6.5 Efectos sobre el equilibrio de biosorción en un sistema multimetálico

La presencia de otros iones metálicos en la biosorción de los metales tuvo una influencia significativa, sobre todo para el Cd y Zn. Se realizaron tres bioensayos por lotes o normal (debido a las diferencias encontradas con el método SAM), tratando de mantener la concentración inicial de los metales a la misma molaridad, para con esto asegurar una competencia igual por los sitios de sorción en la bacteria.



Para evaluar el efecto del Cd, Cu y Zn en la biosorción de Pb, el bioensayo se realizó a un pH inicial de 4, salinidad 0 y 30°C, con una concentración de biomasa de 0.5 g L<sup>-1</sup>. En este experimento se observó que el Cd y Zn no compitieron con el Cu y Pb, ya que su concentración en solución, permaneció constante durante el bioensayo. La Figura 6.27, muestra los datos experimentales de equilibrio para la biosorción de Cu y Pb. La isoterma de Langmuir fue la que mejor explicó la biosorción de Pb. Para el caso del Cu, se observa en esta misma figura una tendencia lineal entre la concentración de equilibrio en la solución y el metal biosorbido por la bacteria.

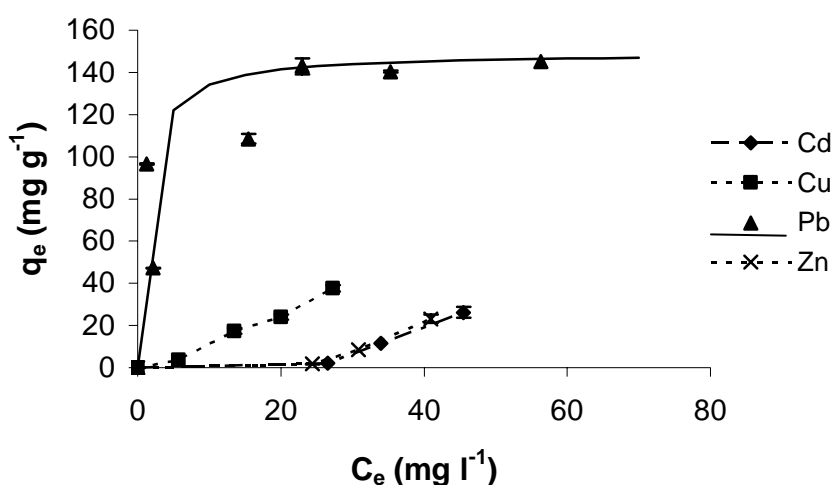
El análisis de las funciones de error dio como resultado un valor de  $K_L$  de 0.31 L mg<sup>-1</sup> y  $q_{max}$  de 74.4 mg Pb g<sup>-1</sup>. Este valor de  $q_{max}$  es menor comparado con el de 210.1 mg g<sup>-1</sup> obtenido en la biosorción individual de Pb, indicando esto, que la presencia de los otros tres metales reduce la capacidad de biosorción de Pb, siendo la relación  $q_{mix}/q_{ind}$  de 0.35.



**Figura 6.27.** Efecto de un sistema multimetalico en la biosorción de Pb y Cu por las bacterias. Biomasa 0.5 g L<sup>-1</sup>, pH 4, salinidad 0, 30°C. La línea sólida describe el modelo de la isoterma de Langmuir.

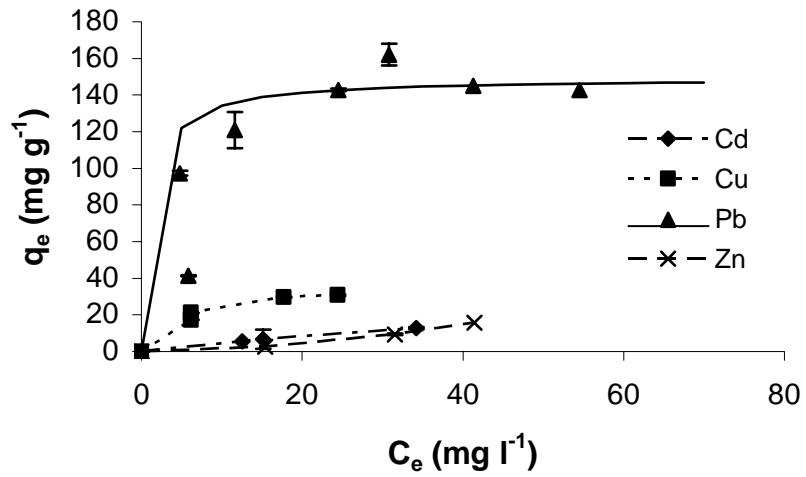
En el bioensayo con los parámetros óptimos encontrados para el Cu (pH 6, salinidad 0), se observó la misma tendencia que en el experimento anterior; el Cd, Cu y Zn tuvieron una disminución en los valores de  $q_{max}$ ; mientras que para el Pb

hubo un aumento. En la Figura 6.28 se muestran los datos experimentales obtenidos para este bioensayo, así como el modelo de Langmuir (línea sólida), que fue el que mejor se ajustó a los datos de Pb. En esta Figura se puede observar que existe una competencia entre los iones metálicos por los sitios de sorción, pero aún así el Pb es el que presenta mayor biosorción por las bacterias. Para este metal, los valores de las constantes de la isoterma de Langmuir fueron de  $0.23 \text{ l mg}^{-1}$  y  $139.4 \text{ mg g}^{-1}$  para  $K_L$  y  $q_{max}$ , respectivamente.



**Figura 6.28.** Efecto de un sistema multimetálico en la biosorción de Cd, Cu, Pb y Zn por las bacterias. Biomasa  $0.5 \text{ g L}^{-1}$ , pH 6, salinidad 0,  $30^\circ\text{C}$ . La línea sólida describe el modelo de la isoterma de Langmuir.

Debido a que el Cd y Zn, tuvieron los mismos parámetros óptimos en los experimentos de biosorción individuales (pH 7, salinidad 0). El efecto de la biosorción simultánea de los cuatro metales se realizó a esos mismos parámetros y a  $30^\circ\text{C}$ . La Figura 6.29 muestra los datos obtenidos en los experimentos a estas condiciones, así como la isoterma de Langmuir, que como en los casos anteriores fue la que se ajustó a los datos experimentales de Pb únicamente. A estas condiciones, se observa una competencia de los cuatro metales por los sitios de biosorción, siendo el Pb el que más es biosorbido por la bacteria (con una capacidad de biosorción de  $149.5 \text{ mg g}^{-1}$  y  $K_L$  de  $0.89 \text{ l mg}^{-1}$ ), seguido del Cu; y finalmente el Cd y Zn presentan un comportamiento similar.



**Figura 6.29.** Efecto de un sistema multimetálico en la biosorción de Cd, Cu, Pb y Zn por las bacterias. Biomasa  $0.5 \text{ g L}^{-1}$ , pH 7, salinidad 0,  $30^\circ\text{C}$ . La línea sólida describe el modelo de la isoterma de Langmuir.

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 Efecto del pH en la biosorción de metales

En los bioensayos realizados para evaluar el efecto del pH en la biosorción, se observó que la capacidad de remoción del metal por las bacterias aumenta con el pH. López *et al.*, (2000) trabajando con *Pseudomonas fluorescens* 4F39, encontraron el mismo comportamiento para estos metales. De acuerdo al efecto del pH en la biosorción, estos autores clasificaron los metales que utilizaron en dos grupos: (i) aquellos cuya biosorción aumenta al hacerlo también el pH y la máxima biosorción ocurre antes de la precipitación inducida por el pH incluyendo al Ni, Cu, Pb, Cd y Co; y (ii) aquellos cuya máxima biosorción no está asociada con el pH de precipitación, como para el caso del Cr, As, U y Hg. El pH óptimo encontrado por estos investigadores fue de 7 para Cd y Cu, y de 5 para Pb. Por su parte Nourbakhsh *et al.*, (2002) encontraron que para *Bacillus sp.* cepa OGUB 001, el pH óptimo de biosorción para Pb fue de 4.5, valor muy similar al de 4 obtenido en este estudio, y que coincide con la agrupación descrita, ya que el Pb empieza a precipitar por arriba de pH 5 (Volesky y Holan, 1995). Para el caso del Cu, hubo un aumento significativo en la biosorción de pH 5 a pH 6 (Figura 6.7), esto probablemente a la formación de óxidos y/o hidróxidos de este metal. En la tabla 7.1, se muestra la disponibilidad de Cu(II) desde pH 2 a pH 7 según cálculos realizados empleando el modelo termodinámico del software CHEAQS<sup>®</sup>.

**Tabla 7.1.** Disponibilidad de Cu(II) a diferentes valores de pH obtenidos mediante el software CHEAQS<sup>®</sup>.

pH	% Cu(II)
2	100
3	100
4	99.97
5	99.66
6	93.35
7	25.47

Durante los experimentos, se monitoreó el comportamiento del pH (datos no mostrados) y se observó de manera general para todas las soluciones de metales, que el pH tendía a la neutralidad conforme incrementaba el tiempo de contacto de la solución de metales con las bacterias. Esto pudo haber ocasionado para el caso del Cu, que para el pH inicial de 6 se formaran óxidos y/o hidróxidos de este metal conforme el pH aumentaba.

La acumulación de metales en la superficie de las células bacterianas es una consecuencia de la carga negativa de la pared celular (Langley y Beveridge, 1999), así como influencias fisicoquímicas del ambiente, tales como pH, y la hidrólisis de los metales. La pared celular contiene aminas, amidas y grupos carboxilo que son protonados o deprotonados dependiendo del pH del medio acuoso (Guibal *et al.*, 1992). Un incremento en el pH resulta en un aumento en la carga negativa de la superficie de las células hasta que los grupos funcionales son deprotonados, lo que favorece la atracción electroquímica de los cationes. El aumento en la biosorción de los metales con el incremento del pH puede ser el resultado de una competencia más eficiente de los cationes y los protones por los sitios de biosorción en la bacteria (Crist *et al.*, 1994; Schiewer y Volesky, 1996; López *et al.*, 2000).

Durante los bioensayos se observó que el pH inicial cambiaba con el desarrollo del experimento. Cuando los valores de pH inicial eran ácidos, éstos tendían a pH neutro. Esto ya había sido observado por Marques *et al.* (1999) quienes trabajaron con levaduras y recomiendan no mantener el pH constante durante los ensayos ya que se ve afectado el equilibrio y la capacidad de biosorción. Tsezos y Volesky (1981), también observaron este fenómeno y explican este aumento de pH como un proceso de hidrólisis inversa del ion metálico que libera grupos OH<sup>-</sup>.

## *7.2 Efecto de la salinidad en la biosorción de los metales*

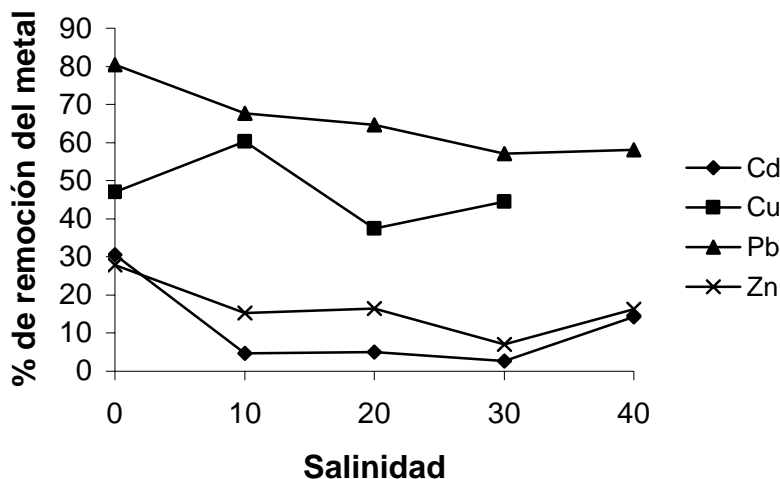
En los bioensayos para determinar el efecto de la salinidad en la biosorción, se observó que las capacidades de remoción para el Cd, Pb y Zn disminuyeron al

umentar la salinidad. La excepción fue para el Cu, ya que a salinidad 10 la remoción fue mayor que a salinidad 0. En la Figura 7.1 se muestra el efecto de la salinidad en la remoción de los cuatro metales estudiados.

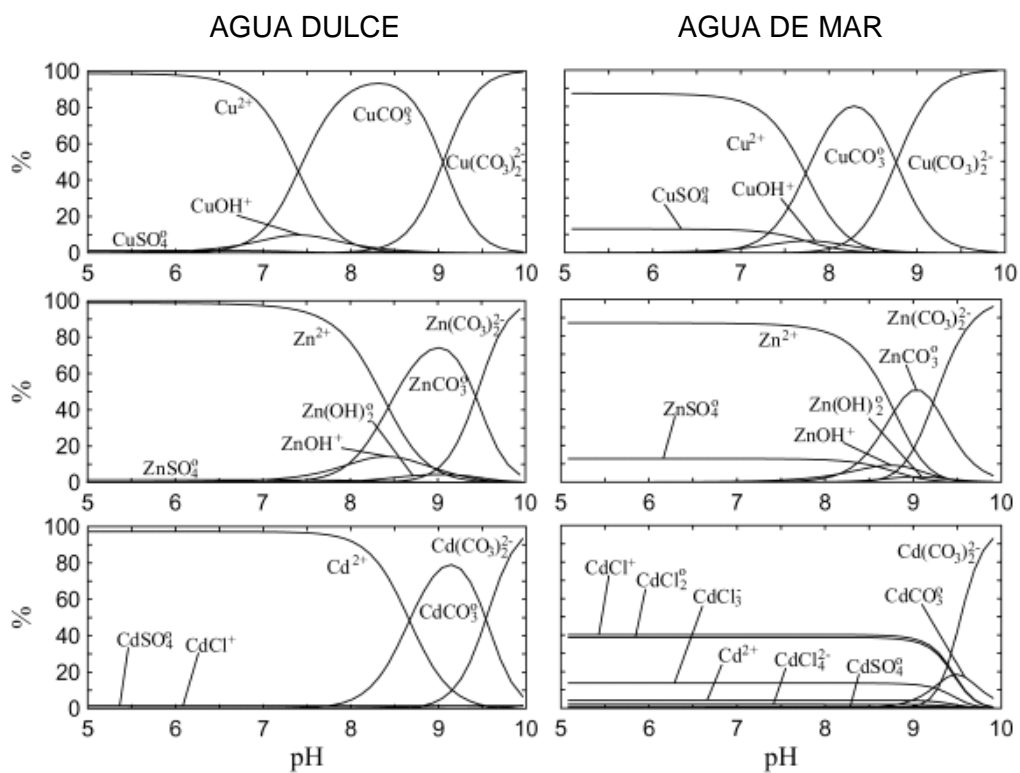
Esta disminución en la remoción de los metales, se puede deber, en parte, al efecto de otros iones que se encuentran en solución; ya que hay una competencia por los sitios de biosorción en la bacteria. Schiewer y Volesky (1997), afirman que aunque no se considera que el Na (componente mayoritario del agua de mar) pueda formar enlaces coordinados fuertes, si puede ser atraído electrostáticamente hacia la biomasa cargada negativamente. De modo que puede afectar la concentración intrapartícula y, en consecuencia, afectar la biosorción de otros iones. Estos mismos autores afirman que el Ca puede formar enlaces coordinados específicos, y por lo tanto tener una mayor influencia en la biosorción de los metales pesados. Ephraim *et al.*, (1986) y Westall *et al.*, (1995), revelaron que la presencia de metales ligeros podrían afectar la sorción de metales pesados en ácidos húmicos y fúlvicos. De manera similar, estos iones pueden afectar la biosorción de metales pesados por biomasa microbiana (Tsezos *et al.*, 1986; Leusch *et al.*, 1996; Volesky 2001b). El estudio del efecto de otros iones en la biosorción de metales pesados por microorganismos, es un tópico que en los últimos años ha recibido atención, pero aún así, no existen muchas publicaciones al respecto (Schiewer y Volesky, 1995).

Otro aspecto de importancia a considerar, es el referido por Darimont y Frenay (1990) con respecto a los complejos que se pueden formar entre los metales pesados y los cloruros (del agua de mar o soluciones de sales que contengan cloro). Estos autores aseveran que la concentración de cloruros tiene una gran influencia en los coeficientes de actividad de la mayoría de los iones metálicos; pudiendo reducir con esto la capacidad de biosorción. Por otra parte, la especiación química de los metales pesados es también importante, ya que esta no es igual cuando los metales se encuentran en agua dulce que en agua de mar (Pivovarov, 2003). En la Figura 7.2 se muestra las diferentes especies químicas de Cd, Cu y Zn, tanto en agua dulce como de mar, y se puede observar que el Cd es

el que más se ve influenciado por la salinidad del agua de mar, ya que aproximadamente el 5% se encuentra como  $\text{Cd}^{2+}$ .



**Figura 7.1.** Efecto de la salinidad en la remoción de Cd, Cu, Pb y Zn por las bacterias.



**Figura 7.2.** Distribución de complejos inorgánicos de Cd, Cu y Zn en agua dulce (de río) y agua de mar a 25°C y una presión de  $\text{CO}_2$  de  $3.6 \times 10^{-4}$  atm. Fuente: Pivovarov (2003)

### 7.3 Efecto de la temperatura en la biosorción de los metales

En la literatura existen muchos trabajos de biosorción de metales con bacterias. Desafortunadamente, no se puede hacer una comparación directa con ellos, ya que los parámetros iniciales no son los mismos. En algunos trabajos, el pH es mantenido constante durante la biosorción, mientras que en otros sólo se ajusta el pH inicial. Por otro lado las concentraciones iniciales de los metales no son las mismas. En la Tabla 7.2, se muestra el resultado de varios trabajos de biosorción con bacterias recolectados de la literatura.

A excepción del Zn, para los otros tres metales, hubo una mayor biosorción a 30°C con el método normal que con el método SAM. Pagnanelli *et al.*, (2000), quienes propusieron el método SAM, aseveran que no hay diferencia alguna entre los datos experimentales cuando se trabaja con un método o con otro. A pesar de que las bacterias utilizadas por estos autores fue *Arthrobacter sp.* y en este estudio fue *B. jeotgali* cepa U3, la diferencia no se debe en su totalidad a que son diferentes microorganismos. En la descripción de los métodos utilizados por los autores, mencionan que las células de *Arthrobacter sp.* fueron liofilizadas; mientras que las utilizadas en este estudio fueron utilizadas casi directamente del medio de cultivo. Siendo centrifugadas y lavadas con agua Milli-Q repetidas veces; por lo cual, éstas estaban vivas durante los bioensayos.

Al encontrarse vivas las bacterias, durante el metabolismo, una fuerza motriz de protones inducida por la membrana, continuamente bombea protones hacia la pared celular. Lo que da como resultado, una competencia entre los protones y los iones metálicos por los sitios aniónicos de la pared celular, y con esto se enlaza menos metal en las células vivas que en aquellas muertas, o en las células en donde el plasma de la membrana ha sido removido. Una bacteria metabólicamente activa produce un potencial eléctrico de protones a través del plasma de la membrana y los concentra afuera de la célula, en parte por la fuerza motriz de protones, con lo que se bombean  $H^+$  al periplasma y a la matriz de la pared. Este proceso juega un rol esencial en la transducción de energía y es una



**Tabla 7.2.** Biosorción de Cd, Cu, Pb y Zn, por diferentes tipos de bacterias\*.

Metal	Bacteria	$q_{\max}$ (mg g <sup>-1</sup> )	pH	Temperatura (°C)	Referencia
<b>Cd</b>	<i>Alcaligenes sp.</i>	10	4-8	25	McEntee <i>et al.</i> , 1983
	<i>Bacillus subtilis</i>	101	nd	nd	Brierley <i>et al.</i> , 1986
	<i>Arthrobacter globiformis</i>	0.2	7	20	Scott y Palmer, 1988
	<i>Arthrobacter viscosus</i>	1.4	7	20	Scott y Palmer, 1988
	Exopolisacáridos de <i>Arthrobacter viscosus</i>	3.3	7	20	Scott y Palmer, 1988
	<i>Gram-negative bacteria</i>	13.5	6.7	30	Gourdon, 1990
	<i>Gram-positive bacteria</i>	18.5	6.6	30	Gourdon, 1990
	<i>Streptomyces noursei</i>	3.4	6	30	Mattuschka y Straube, 1993
	<i>Bacillus jeotgali</i> cepa U3	57.9	7	35	<i>Este estudio (método SAM)</i>
	<i>Bacillus jeotgali</i> cepa U3	53.5	7	30	<i>Este estudio (método normal)</i>
<b>Cu</b>	<i>Zoogloea ramigera</i>	270	5.5	nd	Norberg y Persson, 1984
	<i>Bacillus licheniformis</i>	32	nd	nd	Beveridge, 1986
	<i>Bacillus subtilis</i>	152	nd	nd	Beveridge, 1986; Brierley <i>et al.</i> , 1986; Brierley y Brierley, 1993
	Bacterias de lodos activados	50	5	25	Aksu <i>et al.</i> , 1991
	<i>Pseudomonas syringae</i>	25.4	nd	22	Cabral, 1992
	<i>Zoogloea ramigera</i>	29	4	25	Aksu <i>et al.</i> , 1992
	<i>Streptomyces noursei</i>	9	5.5	30	Mattuschka y Straube, 1993
	<i>Bacillus sp.</i>	5	nd	nd	Cotoras <i>et al.</i> , 1993
	<i>Arthrobacter sp.</i>	148	3.5-6	30	Veglio' <i>et al.</i> , 1997
	<i>Bacillus jeotgali</i> cepa U3	27.3	6	25	<i>Este estudio (método SAM)</i>
<i>Bacillus jeotgali</i> cepa U3	42.3	6	30	<i>Este estudio (método normal)</i>	
<b>Pb</b>	<i>Bacillus subtilis</i>	601	nd	nd	Brierley <i>et al.</i> , 1986
	<i>Streptomyces longwoodensis</i>	100	3	28	Friis y Myers-Keith, 1986
	<i>Arthrobacter sp.</i>	130	5-5.5	30	Veglio' <i>et al.</i> , 1997
	<i>Bacillus jeotgali</i> cepa U3	90.1	4	35	<i>Este estudio (método SAM)</i>
	<i>Bacillus jeotgali</i> cepa U3	200.1	4	30	<i>Este estudio (método normal)</i>
<b>Zn</b>	<i>Bacillus subtilis</i>	137	nd	nd	Brierley <i>et al.</i> , 1986
	<i>Pseudomonas syringae</i>	8	nd	22	Cabral, 1992

<i>MK-2</i> (bacteria que oxida Mn)	39	nd	nd	Stuetz <i>et al.</i> , 1993
<i>Bacillus sp.</i>	3.4	nd	nd	Cotoras <i>et al.</i> , 1993
<i>Streptomyces noursei</i>	1.6	5.8	30	Mattuschka y Straube, 1993

\*Salinidad no reportada en los trabajos consultados.

parte importante del metabolismo bacteriano (Urrutia-Mera *et al.*, 1992). En este mismo sentido, Calamita *et al.*, (2001) sugieren que efectivamente, la pared celular de *Bacillus subtilis* se encuentra protonada durante el crecimiento. Rius *et al.* (1994); Rius *et al.* (1995); Rius y Lorén (1998), han estudiado la capacidad amortiguadora y la conductancia de H<sup>+</sup> de la membrana tanto de bacterias Gram-positivas como Gram-negativas. Por su parte, Daughney y Fein, (1998) trabajando con *B. subtilis* y *B. licheniformis*, concluyen que la variación observada en su investigación de la concentración de sitios de la superficie es debida a la variación real en la estructura de la pared celular ya que ambas bacterias son capaces de formar esporas y la composición de la pared de la spora es diferente a la de la bacteria. Añaden también que los experimentos de biosorción duraron el tiempo suficiente como para permitir varios grados de esporulación en respuesta a los cambios en la química del medio. Por lo tanto, el comportamiento de la bacteria aquí estudiada, debió de ser similar al de las bacterias estudiadas por estos autores. De tal modo, tanto estos factores como los de la competencia de H<sup>+</sup> con los metales cuando las bacterias están vivas, explican la biosorción mayor con el método normal, debido a que el tiempo de exposición de las bacterias con la solución de metales, fue menor al tiempo requerido por el método SAM.

## 8. CONCLUSIONES

El modelo de cinética de pseudosegundo orden fue el que describió mejor la biosorción de los metales a diferentes valores de pH y salinidad. De acuerdo a dicho modelo, el metal que presentó una biosorción más rápida fue el Pb con un tiempo promedio de 0.3 horas, seguido del Cd y Cu con 1 hora, y finalmente el Zn con una biosorción lenta en la cual se obtuvo el equilibrio aproximadamente a las 50 horas.

Los valores óptimos de pH para la biosorción de los metales fueron de 7 para el Cd y Zn, 6 para el Cu y 4 para el Pb. La salinidad óptima fue de cero para los cuatro metales. Las temperaturas óptimas utilizando el método SAM, fueron de 25°C para el Cu, 30°C para el Zn y 35°C para el Cd y Pb. Utilizando el método normal a una temperatura de 30°C y con los valores de pH y salinidad óptimos para cada metal, y comparando los valores con el método SAM, la biosorción fue 0.12 veces mayor para el Cd, 3.97 veces para el Cu; 2.85 veces para el Pb. Sólo para el caso del Zn se observó que la capacidad de biosorción fue aproximadamente 2.5 veces mayor con el método SAM que con el normal.

La isoterma de biosorción que mejor se ajustó a los datos experimentales para la biosorción de Cd, Cu y Pb a diferentes temperaturas fue la de Langmuir. Las capacidades máximas de biosorción a las temperaturas óptimas para estos metales fueron de 57.9, 27.3 y 90.13 mg g<sup>-1</sup>, respectivamente. Para el caso del Zn, la isoterma de Freundlich fue la que mejor se ajustó a los datos experimentales de biosorción. Las constantes obtenidas a la temperatura óptima tuvieron valores de K<sub>F</sub> de 15.04 l g<sup>-1</sup> y n de 1.53.

En los bioensayos donde se estudió la biosorción en un sistema multimetálico con los cuatro metales utilizados, se obtuvieron los valores de  $q_{mix}/q_{ind}$  únicamente para el Pb; ya que este metal fue el que más biosorbido por las bacterias, aún cuando los experimentos se realizaron con las condiciones óptimas para los otros metales. Para un pH de 4, salinidad 0 y 30°C, se obtuvo un valor de  $q_{mix}/q_{ind}$  de

0.35; a estas condiciones el Cd y Zn, no compitieron por los sitios de biosorción de las bacterias. A pH 6 (salinidad 0, 30°C) el valor de la capacidad de biosorción de Pb fue de 139.4 mg g<sup>-1</sup>; y a pH 7 de 149.5 mg g<sup>-1</sup>.

## 10. LITERATURA CITADA

- Aksu Z. y Açıkel Ü. 1999. A single bioseparation process for simultaneous removal of copper(II) and chromium(VI) by using *C. vulgaris*. *Process Biochemistry* 34: 589-599.
- Aksu Z. y Açıkel Ü. 2000. Modelling of a single-staged bioseparation process for simultaneous removal of iron(III) and chromium(VI) by using *Chlorella vulgaris*. *Biochemical Engineering Journal* 4: 229–238.
- Aksu Z., Kutsal T., Gun S., Haciosmanoglu N. y Gholminejad M. 1991. Investigation of biosorption of Cu (II), Ni (II) and Cr (VI) ions to activated sludge bacteria. *Environmental Technology* 12: 915-921.
- Aksu, Z., Sag Y. y Kutsal T. 1992. The biosorption of copper (II) by *C. vulgaris* and *Z. ramigera*. *Environmental Technology* 13: 579-586.
- Al-Saraj M., Adbel-Latif M., El-Nahal I. y Baraka R. 1999. Bioaccumulation of some hazardous metals by sol-gel entrapped microorganisms. *Journal of non-crystalline solids* 248: 137-140.
- Bai R. y Abraham T. 2002. Studies on enhancement of Cr(VI) biosorption by chemically modified biomass of *Rhizopus nigricans*. *Water Research* 36: 1224- 1236.
- Banat F., Al-Asheh S. y Mohai F. 2002. Multi-metal sorption by spent animal bones. *Separation Science and Technology* 37(2): 311-327.
- Barkay T. y Schaefer J. 2001. Metal and radionuclide bioremediation: issues, considerations and potentials. *Current Opinion in Microbiology* 4: 318-323.
- Beolchini F., Pagnanelli F., Toro L. y Veglió F. 2003. Biosorption of copper by *Sphaerotilus natans* immobilised in polysulfone matrix : equilibrium and kinetics analysis. *Hydrometallurgy* 70: 101-112.
- Beveridge T. 1986. The immobilization of soluble metals by bacterial walls. En: Ehrlich . y Holmes D. (Eds). *Biotechnology and Bioengineering Symposium No. 16: Biotechnology for the Mining, Metal-Refining, and Fossil Fuel Processing Industries*. John Wiley Interscience. New York. P. 127-140.
- Beveridge T. y Murray R. 1979. How thick is the *Bacillus subtilis* cell wall. *Current Microbiology* 2: 1-4.

- Beveridge T. y Murray R. 1980. Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 141(2): 876-887.
- Brewer P. y Spencer D. 1971. Colorimetric determination of manganese in anoxic waters. *Limnology and Oceanography* 16: 107-112.
- Brierley C. y Brierley J. 1993. Immobilization of biomass for industrial application of biosorption. En: Torma A., Apel M. y Brierley C. (Eds). *Biohydrometallurgical Technologies*. The Minerals, Metals & Materials Society. Warrendale PA. Vol. 2: 35-44.
- Brierley C., Brierley J. y Davidson M. 1989. Applied microbial processes for metals recovery and removal from wastewater. En: Beveridge T. y Doyle R. (Eds). *Metal ions and bacteria*. John Wiley & Sons. USA. 461 p.
- Brierley J., Brierley C. y Goyak G. 1986. MT-BIOCLAIM: A new wastewater treatment and metal recovery technology. En: Lawrence R., Branion R. y Ebner M. (Eds). *Fundamental and Applied Biohydrometallurgy*. Elsevier Amsterdam. P. 291-304.
- Bruins M., Kapil S. y Oehme F. 2000. Microbial Resistance to Metals in the Environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 45: 198-207.
- Cabral J. 1992. Selective binding of metal ions to *Pseudomonas syringae* cells. *Microbios*, 71:47-53.
- Calamita H., Ehringer W., Koch A. y Doyle J. 2001. Evidence that the cell wall of *Bacillus subtilis* is protonated during respiration. *Proceedings of the National Academy Sciences* 98(26): 15260-15263.
- Cañizares-Villanueva R. 2000. Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología* 42: 131-143.
- Cerofolini G. 2002. Adsorption kinetics. *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*. Marcel Dekker Inc. P. 225-239.
- Cheung W., Porter F. y McKay G. 2001. Sorption kinetic analysis for the removal of cadmium ions from effluents using bone char. *Water Research* 35(3): 605-612.
- Chiron N., Guilet R. y Deydier E. 2003. Adsorption of Cu(II) and Pb(II) onto a grafted silica: isotherms and kinetic models. *Water Research* 37: 3079-3086.

- Costley S. y Wallis F. 2001. Bioremediation of heavy metals in a synthetic wastewater using a rotating biological contactor. *Water Resources* 35(15): 3715-3723.
- Cotoras D., Viedma P. y Pimentel J. 1993. Biosorption of metal ions by attached bacterial cells in a packed-bed bioreactor. En: Torma A., Apel M. y Brierley C. (Eds). *Biohydrometallurgical Technologies. The Minerals, Metals & Materials Society*. Warrendale PA. Vol. 2: 103-110.
- Crist R., Marin J., Carr D., Watson J., Clarke H. y Crist D. 1994. Interaction of metals and protons with algae. 4. Ion exchange vs adsorption models and a reassessment of scatchard plots; Ion-Exchange rates and equilibria compared with calcium alginate. *Environmental Science and Technology* 28: 1859-1866.
- Da Costa A. y Duta F. 2001. Bioaccumulation of copper, zinc, cadmium and lead by *Bacillus sp.*, *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaeroticus* and *Bacillus subtilis*. *Brazilian Journal of Microbiology* 32: 1-5.
- Darimont A. y Frenay J. 1990. Metal in aqueous solutions. En: Volesky B. *Biosorption of heavy metals*. CRC Press. USA. 396 p.
- Daughney C. y Fein J. 1998. The effect of ionic strength on the adsorption of  $H^+$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  by *Bacillus subtilis* and *Bacillus lincheformis*: A surface complexation model. *Journal of Colloid and Interface Science* 198: 53-77.
- Daughney C., Fowle D. y Fortin D. 2001. The effect of growth phase on proton and metal adsorption by *Bacillus subtilis*. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65(7): 1025-1035.
- Dilek F., Erbay A. y Yetis U. 2002. Ni(II) biosorption by *Polyporus versicolor*. *Process Biochemistry* 37: 723-726.
- Doyle R., Matthew T. y Streips U. 1980. Chemical basis for selectivity of metal ions by the *Bacillus subtilis* cell wall. *Journal of Bacteriology* 143(1): 471-480.
- Eccles H. 1999. Treatment of metal-contaminated wastes: why select a biological process?. *Trends in Biotechnology* 17: 462-465.
- El-Bishtawi R. y Al-Haj A. 2001. Sorption kinetics of lead ions by zeolite tuff. *Journal of Environmental Science and Health A36(6)*: 1055-1072.

- El-Hellow E. Sabry S. y Amer R. 2000. Cadmium biosorption by a cadmium resistant strain of *Bacillus thuringiensis*: regulation and optimization of cell surface affinity for metal cations. *BioMetals* 13: 273-280.
- Ephraim J., Alegret S., Mathuthu A., Bicking M., Malcolm R. y Marinsky J. 1986. A united physicochemical description of the protonation and metal ion complexation equilibria of natural organic acids (humic and fulvic acids). 2. Influence of polyelectrolyte properties and functional group heterogeneity on the protonation equilibria of fulvic acid. *Environmental Science and Technology* 20: 354-366.
- Fein J., Martin A. y Wightman P. 2001. Metal adsorption onto bacterial surfaces: Development of a predictive approach. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65(23): 4267-4273.
- Francis C., Edgie-Mark C. y Tebo B. 2001. Enzymatic manganese(II) oxidation by a marine  $\alpha$ -Proteobacterium. *Applied and Environmental Microbiology* 67(9): 4024-4029.
- Friis N. y Myers-Keith P. 1986. Biosorption of uranium and lead by *Streptomyces longwoodensis*. *Biotechnology and Bioengineering* 28: 21-28.
- Gherna, L. R. (1994). Culture Preservation. En: Gerhardt P., Murray R., Wood W., y Krieg N. *Methods for General and Molecular Bacteriology*, pp. 278-292. Washington, DC: ASM Press.
- Ghiorse C. 1984. Biology of iron- and manganese-depositing bacteria. *Annual Reviews of Microbiology* 38:515-550.
- Gourdon, R., Bhende, S., Rus, E. y Sofer, S. 1990. Comparison of cadmium biosorption by gram-positive and gram-negative bacteria from activated sludge. *Biotechnol. Lett.*, 12(11): 839-842.
- Guibal E., Roulph C. y Cloiree P. 1992. Uranium biosorption by a filamentous fungus *Mucor miehei*; pH effect on mechanisms and performances of uptake. *Water Research* 26: 1139-1145.
- Gupta V., Shrivastava A. y Neeraj Jain. 2001. Biosorption of chromium(VI) from aqueous solutions by green algae *Spirogyra* species. *Water Resources* 35(17): 4079-4085.



- Hammaini A., Ballester A., Blázquez M., González F. y Muñoz J. 2002. Effect of the presence of lead on the biosorption of copper, cadmium and zinc by activated sludge. *Hidrometallurgy* 67: 109-116.
- Ho Y., Ng Y. y McKay G. 2000. Kinetics of pollutant sorption by biosorbents: Review. *Separation and Purification Methods* 29(2): 189-232.
- Ho Y., Porter J. y McKay G. 2002. Equilibrium isotherm studies for the sorption of divalent metal ions onto peat: copper, nickel and lead single components systems. *Water, Air, and Soil Pollution* 141: 1-33.
- Horsfall Jr., Abia A. y Spiff A. 2005. Kinetic studies on the adsorption of  $Cd^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  ions from aqueous solutions by cassava (*Manihot sculenta* Cranz) tuber bark waste. *Bioresource Technology* 97: 283–291.
- Iqbal M. y Edyvean R. 2004. Biosorption of lead, copper and zinc ions on loofa sponge immobilized biomass of *Phanerochaete chrysosporium*. *Minerals Engineering* 17: 217-223.
- Jung-Hoon Y., Seok-Sung K., Keun-Chul L., Yung., Seong H., Kook H. y Yong-Ha P. 2001. *Bacillus jeotgali* sp. nov., isolated from jeotgal, korean traditional fermented seafood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 1087–1092.
- Kaçar Y., Arpa Ç., Tan S., Denizli A., Genç Ö. y Arica M. 2002. Biosorption of Hg(II) and Cd(II) from aqueous solutions: comparison of biosorptive capacity of alginate and immobilized live and heat inactivated *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochemistry* 37: 601-610.
- Kapoor A., Viraraghavan T. y Cullimore R. 1999. Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus niger*, *Bioresource Technology* 70(1): 95-104.
- Kefala M., Zouboulis A. y Matis K. 1999. Biosorption of cadmium ions by *Actinomicetes* and separation by flotation. *Environmental pollution* 104: 283-293.
- Kratochvil D. y Volesky B. 1998. Advances in the biosorption of heavy metals. *Trends in Biotechnology* 16: 291-300.
- Langley S. y Beveridge T. 1999. Effect of O-side-chain-lipopolysaccharide chemistry on metal binding. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 489-498.

- Ledin M., 2000. Accumulation of metals by microorganisms – process and importance for soil systems. *Earth-Science Reviews* 51: 1-31.
- Lee M. y Tebo B. 1998. Surface Charge Properties of and Cu(II) Adsorption by Spores of the Marine *Bacillus* sp. strain SG-1. *Applied and Environmental Microbiology* 64(3): 1123-1129.
- Leusch A., Holan Z. y Volesky B. 1996. Solution and particle effects on the biosorption of heavy metals by seaweed biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 61(3), 231-249.
- Lloyd J. y Lovley D. 2001. Microbial detoxification of metals and radionuclides. *Current Opinion in Biotechnology* 12: 248-253.
- Loaëc M., Olier R. y Guezennec J. 1997. Uptake of lead, cadmium and zinc by a novel bacterial exopolysaccharide. *Water Research* 31(5): 1171-1179.
- López A., Lázaro N., Priego J. y Marqués A. 2000. Effect of Ph on the biosorption of níkel and other heavy metals by *Pseudomonas fluorescens* 4F39. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 24: 146-151.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko y J. Parker, 1997. *Brock Biology of Microorganism*. Prentice Hall, Inc. New Jersey. 986 p.
- Marques P., Pinheiro H., Teixeira J. y Rosa M. 1999. Removal efficiency of Cu<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> and Pb<sup>2+</sup> by waste brewery biomass: pH and cation association effects. *Desalination* 124: 137-144.
- Martinez R. y Ferris F. 2001. Chemical equilibrium modeling techniques for the analysis of high-resolution bacterial metal sorption data. *Journal of Colloid and Interface Science* 243: 73-80.
- Mattuschka B. y Straube G. 1993. Biosorption of metals by a waste biomass. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 58: 57-63.
- McEntee, J., Minney S. y Quirk A. 1983. Adsorption of cadmium by a admium-resistant organism isolated from sewage sludge. In: *Progress in Biohydrometallurgy*, Cagliari: Associazione Mineraria Sarda. 617-625 p.
- Mohan D. y Chander S. 2001. Single component and multi-component adsorption of metal ions by activated carbons. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 177: 183-196.

- Moody R. y Lindstrom M. 1977. Selection and cleaning of plastic containers for storage of trace element samples. *Analytical Chemistry*. 49:2264-2267.
- Nealson Y., Lion L., Shuler M. y Ghiorse W. 1996. Modeling oligotrophic biofilm formation and lead adsorption to biofilm components. *Environmental Science and Technology* 30(6): 2027-2035.
- Ng J., Cheung W. y McKay G. 2003. Equilibrium studies for the sorption of lead from effluents using chitosan. *Chemosphere* 52:1021-1030.
- Norberg A. y Persson H. 1984. Accumulation of heavy-metal ions by *Zoogloea ramigera*. *Biotechnology and Bioengineering* 26: 239-246.
- Nourbakhsh M., Kiliçarslan S., İlhan S. y Ozdag H. 2002. Biosorption of  $\text{Cr}^{6+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ , and  $\text{Cu}^{2+}$  ions in industrial wastewater on *Bacillus* sp. *Chemical Engineering Journal* 85: 351-355.
- Nriagu J. y Pacyna M. 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333:134-139.
- Osuna-López J., Páez-Osuna F., Marmolejo-Rivas C. y Ortega-Romero P. 1989. Metales pesados disueltos y particulados en el puerto de Mazatlán. *Anales del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología*. Universidad Nacional Autónoma de México 16(2): 307-320.
- Pagnanelli F., Esposito A., Toro L. y Veglió F. 2003. Metal speciation and pH effect on Pb, Cu, Zn and Cd biosorption onto *Sphaerotilus natans*: Langmuir-type empirical model. *Water Research* 37: 627-633.
- Pagnanelli F., Papini M., Toro L., Trifoni M. y Veglió F. 2000. Biosorption of metal ions on *Arthrobacter* sp.: Biomass characterization and biosorption modeling. *Environmental Science and Technology* 34: 2773-2778.
- Pérez-Rama M., Abalde Alonso J., Herrero-López C. y Torres-Vaamonde E. 2002. Cadmium removal by living cells of the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Bioresource Technology* 84: 265 –270.
- Phillip L., Iyengar L. y Vencobachar C. 1995. Biosorption of copper(II) by *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Environment and Pollution* 5(1): 92-99.

- Pivovarov S. 2003. Physico-chemical modeling of heavy metals (Cd, Zn, Cu) in natural environments. Encyclopedia of Surface and Colloid Science. Marcel Dekker Inc.
- Pollman K., Raff J., Merroun M., Fahmy K. y Selenska-Pobell S. 2005. Metal binding by bacteria from uranium mining waste piles and its technological applications. Biotechnology Advances, en impresión.
- Pümpel T. y Schinner F. 1997. Metal biosorption: a structured data space? Research in Microbiology 148(6): 515-517.
- Puranik P. y Paknikar K. 1999. Influence of co-cations on biosorption of lead and zinc – a comparative evaluation in binary and multimetal systems. Bioresource Technology 70: 269-276.
- Puranik P., Modak J. y Paknikar K. 1999. A comparative study of the mass transfer kinetics of metal biosorption by microbial biomass. Hydrometallurgy 52: 189-197.
- Rius N. y Lorén J. 1998. Buffering capacity and membrane H<sup>+</sup> conductance of neutrophilic and alkalophilic gram-positive bacteria. Applied and Environmental Microbiology 64: 1344-1349.
- Rius, N., Solé M., Francia A. y Lorén J. 1994. Buffering capacity and membrane H<sup>+</sup> conductance of lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Letters 120: 291-296.
- Rius, N., Solé M., Francia A. y Lorén J. 1995. Buffering capacity and H<sup>+</sup> membrane conductance of Gram-negative bacteria. FEMS Microbiology Letters. 130:103-110.
- Ruchhoft C. 1949. The Possibilities of disposal of radioactive wastes by biological treatment methods. Sewage Works Journal 21(5): 877-883.
- Ruelas-Inzunza, J. y Páez-Osuna F. 1998. Barnacles as biomonitors of heavy metal pollution in the coastal waters of Mazatlán harbor (Mexico). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 61: 608-615.
- Ruíz-Manríquez A. 2000. Recuperación de metales pesados de soluciones diluidas por biosorción con bacteria. En: Medrano-Roldán H. y Galán Wong L. Biotecnología de minerales. CONACyT, COCyTED. México.

- Sağ Y. 2001. Biosorption of heavy metals by fungal biomass and modeling of fungal biosorption: a review. *Separation and purification methods* 30(1): 1-48.
- Sahoo D., Kar R. y Das R. 1992. Biaccumulation of heavy metal ions by *Bacillus circulans*. *Bioresource Technology* 41: 177-179.
- Schiewer S. y Volesky B. 1995. Mathematical evaluation of experimental and modeling errors in biosorption. *Biotechnology Techniques*. 9: 843-848.
- Schiewer S. y Volesky B. 1996. Modeling multi-metal ion exchange in biosorption. *Environmental Science and Technology* 30: 2921-2927.
- Schiewer S. y Volesky B. 1997. Ionic strength and electrostatic effects in biosorption of divalent metal ions and protons. *Environmental Science and Technology* 31: 2478-2485.
- Scott, J. y Palmer, S. 1988. Cadmium bio-sorption by bacterial exopolysaccharide. *Biotechnology Letters* 10(1): 21-24.
- Scragg A. 1999. *Biología medioambiental*. Editorial Acribia, S. A. España. 307 p.
- Seki H., Suzuki A. y Mitsueda S. 1998. Biosorption of Heavy Metal Ions on *Rhodobacter sphaeroides* and *Alcaligenes eutrophus* H16. *Journal of Colloid and Interface Science* 197(2):185-190.
- Sheng P., Ting Y., Cheng J. y Hong L. 2004. Sorption of lead, copper, cadmium, zinc, and nickel by marine algal biomass: characterization of biosorptive capacity and investigation of mechanisms. *Journal of Colloid and Interface Science* 275: 131-141.
- Shuttleworth K. y Unz R. 1993. Sorption of heavy metals to the filamentous bacterium *Thothrix* strain A1. *Applied and Environmental Microbiology* 59(5): 1274-1282.
- Singh S., Pradhan S. y Rai L. 1998. Comparative assesment of  $Fe^{+3}$  and  $Cu^{+2}$  biosorption by field and laboratory-grow *Microcystis*. *Process Biochemistry* 33(5): 495-504.
- Sismanoglu T. y Pura S. 2001. Adsorption of aqueous nitrophenols on clinoptilolite. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 180: 1-6.

- Soto-Jiménez, M. y F. Páez-Osuna, 2001. Cd, Cu, Pb and Zn in lagoonal sediments from Mazatlán harbor (SE Gulf of California). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 66: 350-356.
- Stuetz R., Madgwick J. y Gee A. 1993. Immobilization of biosorbed metal ions. En: Torma A., Apel M. y Brierley C. (Eds). *Biohydrometallurgical Technologies. The Minerals, Metals & Materials Society. Warrendale PA. Vol. 2: 85-93.*
- Tobin M., Cooper G. y Neufeld J. 1988. The effects of cation competition on metal adsorption by *Rhizopus arrhizus* biomass. *Biotechnology and Bioengineering* 31: 282-286.
- Tsezos M. 2001. Biosorption of metals. The experience accumulated and the outlook for technology development. *Hydrometallurgy* 59: 241-243.
- Tsezos M. y Volesky B. 1981. Biosorption of uranium and thorium. *Biotechnology and Bioengineering* 23: 583-604.
- Tsezos M., Baird M. y Shemilt L. 1986. Adsorptive treatment with microbial biomass of Ra-226 containing waste waters. *Chemical Engineering Journal* 32: B29-B38.
- Urritia-Mera M., Kemper M., Doyle R. y Beveridge J. 1992. The Membrane-induced proton motive force influences the metal binding ability of *Bacillus subtilis* cell walls. *Applied and Environmental Microbiology* 58(12): 3837-3844.
- Valdman E. y Leite S. 2000. Biosorption of Cu, Zn and Cu by *Sargassum* sp. waste biomass. *Bioprocess Engineering* 22: 171-173.
- Vecchio A., Finoli C., Di Simone D. y Andreoni V. 1998. Heavy metal biosorption by bacterial cells. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 361: 338-342.
- Veglió F., Beolchini F. y Gasbarro A. 1997. Biosorption of toxic metals: an equilibrium study using free cells of *Arthrobacter* sp. *Process Biochemistry* 32(2): 99-105.
- Veglio' F. y Belchioni F. 1997. Removal of metals by biosorption: a review. *Hydrometallurgy* 44: 301-316.
- Vieira R. y Volesky B. 2000. Biosorption: a solution to pollution? *International Microbiology* 3: 17-24.
- Volesky B. 2000. Removal and recovery of heavy metals by biosorption. En: Volesky B. *Biosorption of heavy metals. CRC Press. USA. 396 p.*

- Volesky B. 2001a. Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. *Hydrometallurgy* 59: 203-216.
- Volesky B. 2001b. The effect of impurities on metal biosorption. *International Biohydrometallurgy Symposium*. Ouro Preto, Brazil (September 2001): 181-187.
- Volesky B. y Holan Z. 1995. Biosorption of heavy metals. *Biotechnology progress* 11: 235-250.
- Watanabe M., Kawahara K., Sasaki. K. y Noparatnaraporn N. 2003. Biosorption of cadmium ion using a photosynthetic bacterium, *Rhodobacter sphaeroides* S and a marine photosynthetic bacterium, *Rhodovulum* sp. and their biosorption Kinetics. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 95 (4): 374-378.
- Westall J., Jones J., Turner G. y Zachara J. 1995. Models for association of metal ions with heterogeneous environmental sorbents. 1 .Complexation of Co(II) by leonardite humic acid as a function of pH and NaClO<sub>4</sub> concentration. *Environmental Science and Technology* 29: 951-959.
- Yilmaz E. 2003. Metal tolerance and biosorption capacity of *Bacillus circulans* strain EB1. *Research in Microbiology* 154(6):409-415.
- Zouboulis A., Loukidou M. y Matis K. 2004. Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils. *Process Biochemistry* 39: 909 - 916.

## ANEXO 1

### Comparación del ARN 16s de Bacillus jeotgali YKJ-11 con el de la bacteria de estudio.

Bacillus sp. YKJ-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Length=1505

Score = 2686 bits (1350), Expect = 0.0

Identities = 1473/1505 (97%), Gaps = 12/1505 (0%; Strand=Plus/Plus

```
Query 21 GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGATCTTCATTAGCTTGCTT 80
          |||
Sbjct 1 GACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGATCTTCATTAGCTTGCTT 60

Query 81 TTGAAGATCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGAT 140
          |||
Sbjct 61 TTGAAGATCAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTGTAAGACTGGGAT 120

Query 141 AACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATCCTTTCC-TCACATGAGG--AAGCTGA 197
          |||
Sbjct 121 AACTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAATCCTTTCCCTCACATGAGGGAAGCTGA 180

Query 198 A-GACGGTTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGGCCCGGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT 256
          |
Sbjct 181 AAGACGGTTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGGCCCGGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGT 240

Query 257 AATGGCTCACCAAGGCAGCAGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGA 316
          ||
Sbjct 241 AACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGA 300

Query 317 CTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGA 376
          |||
Sbjct 301 CTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGA 360

Query 377 AAGTCTGACGGAGCAACGC-GCGTGAACGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAGT-CTGTTG 434
          |||
Sbjct 361 AAGTCTGACGGAGCAACGC CGCGTGAACGATGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAGTTCTGTTG 420

Query 435 TTAGGGAAGAACAAGTACCGGAGTAACTGCCGGTACCTTGACGGTACCTAACCAGARAGC 494
          |
Sbjct 421 TCAGGGAAGAACAAGTACCGGAGTAACTGCCGGTACCTTGACGGTACCTGACCAGAAAGC 480

Query 495 CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCRAGCGTTGTCCGGAAT 554
          |||
Sbjct 481 CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAAT 540

Query 555 TATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCCTTAAGTCTGATGTGAA-GCCCCGGCTCA 613
          |||
Sbjct 541 TATTGGGCGTAAAGCGCGCGCAGGCGGTTTCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCA 600

Query 614 ACCGGGGAGGGTCATTGGAARCTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGCGGAATTCCA 673
          |||
Sbjct 601 ACCGGGGAGGGTCATTGGAARCTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGCGGAATTCCA 660

Query 674 CGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTG-CGAAGGCGGCTCTCTG 732
          |||
Sbjct 661 CGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGCGGAAGGCGGCTCTCTG 720
```





## ANEXO 2

**Tabla A2-1.** Constantes del modelo de pseudosegundo orden ( $k_2$  y  $q_e$ ) para la biosorción de Cd a diferentes valores de pH, obtenidas mediante el análisis de funciones de error. Biomasa  $0.5 \text{ g L}^{-1}$ , Salinidad 0,  $25^\circ\text{C}$ .

	<b>ERRSQ</b>	<b>HYBRD</b>	<b>MPSD</b>	<b>ARE</b>	<b>EABS</b>
<b>pH 3</b>					
Suma	<b>10.2134</b>	10.8282	12.9876	16.8391	10.4171
$k_2$	<b>0.14</b>	0.09	0.06	0.04	0.14
$q_e$	<b>9.24</b>	10.01	10.84	12.29	9.49
<b>pH 4</b>					
Suma	<b>8.5135</b>	8.5878	8.7469	9.0091	9.6481
$k_2$	<b>0.25</b>	0.26	0.27	0.35	0.31
$q_e$	<b>14.82</b>	14.71	14.55	14.56	15.05
<b>pH 5</b>					
Suma	1.6180	1.6157	1.6138	21.8774	<b>1.5743</b>
$k_2$	0.32	0.32	0.32	29.20	<b>0.30</b>
$q_e$	34.47	34.47	34.46	31.67	<b>34.55</b>
<b>pH 6</b>					
Suma	2.6810	2.6088	<b>2.5612</b>	2.6577	2.6336
$k_2$	0.12	0.12	<b>0.12</b>	0.11	0.11
$q_e$	22.88	22.93	<b>22.97</b>	23.43	23.41
<b>pH 7</b>					
Suma	<b>39.9594</b>	40.3344	41.5607	42.9280	42.9296
$k_2$	<b>0.11</b>	0.12	0.13	0.08	0.08
$q_e$	<b>34.01</b>	33.49	32.97	35.09	35.09

**Tabla A2-2.** Constantes del modelo de pseudosegundo orden ( $k_2$  y  $q_e$ ) para la biosorción de Cu a diferentes valores de pH, obtenidas mediante el análisis de funciones de error. Biomasa  $0.5 \text{ g L}^{-1}$ , Salinidad 0,  $25^\circ\text{C}$ .

	<b>ERRSQ</b>	<b>HYBRD</b>	<b>MPSD</b>	<b>ARE</b>	<b>EABS</b>
<b>pH 2</b>					
Suma	47.0270	<b>45.6681</b>	59.4054	87.9368	45.8860
$k_2$	0.07	<b>0.04</b>	0.02	5.01	0.04
$q_e$	6.50	<b>6.50</b>	6.50	1.09	6.50
<b>pH 4</b>					
Suma	<b>53.7181</b>	56.9247	66.2490	100.2327	54.8100
$k_2$	<b>0.05</b>	0.03	0.02	0.02	0.05
$q_e$	<b>16.91</b>	18.85	20.70	16.98	15.64
<b>pH 5</b>					
Suma	<b>15.1897</b>	15.4056	15.7202	15.8105	15.4839
$k_2$	<b>0.55</b>	0.61	0.68	0.44	0.40
$q_e$	<b>22.46</b>	22.30	22.14	22.35	22.51
<b>pH 6</b>					
Suma	31.4063	31.2315	<b>31.2087</b>	34.3393	34.6089
$k_2$	0.13	0.13	<b>0.14</b>	0.23	0.24
$q_e$	76.64	76.52	<b>76.40</b>	75.24	75.20

**Tabla A2-3.** Constantes del modelo de pseudosegundo orden ( $k_2$  y  $q_e$ ) para la biosorción de Pb a diferentes valores de pH, obtenidas mediante el análisis de funciones de error. Biomasa  $0.5 \text{ g L}^{-1}$ , Salinidad 30,  $25^\circ\text{C}$ .

	<b>ERRSQ</b>	<b>HYBRD</b>	<b>MPSD</b>	<b>ARE</b>	<b>EABS</b>
<b>pH 3</b>					
Suma	5.1854	5.1138	5.0505	<b>5.0014</b>	<b>5.0014</b>
$k_2$	1.01	1.02	1.04	<b>1.21</b>	<b>1.21</b>
$q_e$	23.96	23.93	23.91	<b>23.47</b>	<b>23.47</b>
<b>pH 4</b>					
Suma	1.0593	<b>1.0592</b>	<b>1.0592</b>	1.3390	1.3390
$k_2$	2.91	<b>2.91</b>	<b>2.91</b>	18.77	18.77
$q_e$	73.10	<b>73.10</b>	<b>73.10</b>	72.99	72.99
<b>pH 5</b>					
Suma	<b>43.1309</b>	43.2741	43.7321	91.1684	91.1684
$k_2$	<b>0.13</b>	0.13	0.14	0.24	0.24
$q_e$	<b>58.28</b>	57.96	57.65	53.19	53.19
<b>pH 6</b>					
Suma	9.9500	9.9063	<b>9.8703</b>	11.8155	11.8155
$k_2$	1.07	1.05	<b>1.04</b>	1.11	1.11
$q_e$	43.06	43.05	<b>43.04</b>	42.37	42.37

**Tabla A2-4.** Constantes del modelo de pseudosegundo orden ( $k_2$  y  $q_e$ ) para la biosorción de Zn a diferentes valores de pH, obtenidas mediante el análisis de funciones de error. Biomasa 0.5 g L<sup>-1</sup>, Salinidad 0, 25°C.

	<b>ERRSQ</b>	<b>HYBRD</b>	<b>MPSD</b>	<b>ARE</b>	<b>EABS</b>
<b>pH 4</b>					
Suma	<b>156.5844</b>	298.1307	869.4791	1143.8069	176.0127
$\alpha$	<b>0</b>	0	0	0	0
$k_d$	<b>13.18</b>	9.32	4.71	3.24	14.28
<b>pH 5</b>					
Suma	<b>12.9504</b>	16.0368	32.9981	13.8648	15.8199
$\alpha$	<b>0</b>	0	0	0	0
$k_d$	<b>5.15</b>	4.37	3.43	4.59	5.63
<b>pH 6</b>					
Suma	<b>11.1864</b>	11.3716	11.7959	13.7283	13.7283
$\alpha$	<b>0</b>	0	0	0	0
$k_d$	<b>17.09</b>	17.28	17.48	16.06	16.06
<b>pH 7</b>					
Suma	<b>195.3786</b>	220.5537	610.0364	384.0951	261.0225
$\alpha$	<b>0</b>	0	0	0	0
$k_d$	<b>15.34</b>	14.04	10.38	11.95	17.26

### ANEXO 3

**Tabla A3-1.** Constantes del modelo de pseudosegundo orden ( $k_2$  y  $q_e$ ) para la biosorción de Cd a diferentes salinidades, obtenidas mediante el análisis de funciones de error. Biomasa  $0.5 \text{ g L}^{-1}$ , pH 7,  $25^\circ\text{C}$ .

	ERRSQ	HYBRD	MPSD	ARE	EABS
<b>Salinidad 0</b>					
Suma	7.5063	7.4696	7.4480	7.4352	<b>7.4294</b>
$k_2$	1.75	1.81	1.87	2.03	<b>2.03</b>
$q_e$	28.45	28.39	28.33	28.14	<b>28.14</b>

**Tabla A3-2.** Constantes del modelo de pseudosegundo orden ( $k_2$  y  $q_e$ ) para la biosorción de Cu a diferentes salinidades, obtenidas mediante el análisis de funciones de error. Biomasa  $0.5 \text{ g L}^{-1}$ , pH 6,  $25^\circ\text{C}$ .

	ERRSQ	HYBRD	MPSD	ARE	EABS
<b>Salinidad 0</b>					
Suma	<b>17.6537</b>	17.6607	17.6859	18.1671	18.1196
$k_2$	<b>0.34</b>	0.34	0.34	0.30	0.30
$q_e$	<b>50.73</b>	50.70	50.66	50.71	50.74
<b>Salinidad 10</b>					
Suma	<b>44.4438</b>	44.6544	45.2453	52.5254	65.6112
$k_2$	<b>0.02</b>	0.02	0.02	0.02	0.03
$q_e$	<b>65.24</b>	64.98	64.23	60.44	58.50
<b>Salinidad 20</b>					
Suma	<b>85.4863</b>	106.3799	154.5590	187.4967	93.4253
$k_2$	<b>0.03</b>	0.01	0.00	0.01	0.04
$q_e$	<b>29.47</b>	39.17	58.77	40.12	29.10
<b>Salinidad 30</b>					
Suma	<b>5.6390</b>	5.6488	5.6631	5.7856	5.7929
$k_2$	<b>0.76</b>	0.76	0.77	0.52	0.52
$q_e$	<b>31.27</b>	31.24	31.21	31.99	31.99

**Tabla A3-3.** Constantes del modelo de pseudosegundo orden ( $k_2$  y  $q_e$ ) para la biosorción de Pb a diferentes salinidades, obtenidas mediante el análisis de funciones de error. Biomasa 0.5 g L<sup>-1</sup>, pH 4, 25°C.

	<b>ERRSQ</b>	<b>HYBRD</b>	<b>MPSD</b>	<b>ARE</b>	<b>EABS</b>
<b>Salinidad 0</b>					
Suma	11.7241	11.7164	11.7109	<b>11.8657</b>	11.9764
$k_2$	0.09	0.09	0.09	<b>0.09</b>	0.09
$q_e$	139.53	139.51	139.50	<b>139.29</b>	139.27
<b>Salinidad 10</b>					
Suma	<b>100.3730</b>	100.5172	101.0905	116.7725	112.3097
$k_2$	<b>0.03</b>	0.03	0.04	0.03	0.04
$q_e$	<b>118.63</b>	118.34	118.06	117.29	116.96
<b>Salinidad 20</b>					
Suma	<b>23.9860</b>	24.0910	24.4152	94.9869	27.5271
$k_2$	<b>0.01</b>	0.01	0.01	0.01	0.01
$q_e$	<b>118.16</b>	117.73	117.31	109.91	116.17
<b>Salinidad 30</b>					
Suma	<b>71.7285</b>	75.2230	84.6499	182.9310	71.8052
$k_2$	<b>0.00</b>	0.00	0.00	0.01	0.00
$q_e$	<b>119.29</b>	116.76	114.02	104.20	118.81

**Tabla A3-4.** Constantes del modelo de pseudosegundo orden ( $k_2$  y  $q_e$ ) para la biosorción de Zn a diferentes salinidades, obtenidas mediante el análisis de funciones de error. Biomasa 0.5 g L<sup>-1</sup>, pH 7, 25°C.

	<b>ERRSQ</b>	<b>HYBRD</b>	<b>MPSD</b>	<b>ARE</b>	<b>EABS</b>
<b>Salinidad 0</b>					
Suma	0.8361	0.8477	0.8646	1.1280	<b>0.7814</b>
$k_2$	0.19	0.19	0.19	0.23	<b>0.20</b>
$q_e$	16.83	16.79	16.75	16.33	<b>16.89</b>
<b>Salinidad 10</b>					
Suma	0.7469	0.7452	0.7447	0.6987	<b>0.6978</b>
$k_2$	0.94	0.96	0.98	0.85	<b>0.85</b>
$q_e$	9.27	9.25	9.23	9.48	<b>9.48</b>
<b>Salinidad 20</b>					
Suma	0.3880	0.3880	0.3880	<b>0.5973</b>	0.4403
$k_2$	666876.82	1015079.00	1801608.95	<b>13.56</b>	17608.02
$q_e$	10.45	10.45	10.45	<b>10.33</b>	10.60
<b>Salinidad 30</b>					
Suma	0.0897	0.0897	<b>0.0897</b>	0.0930	0.0923
$k_2$	40.26	40.26	<b>40.26</b>	40.26	2.38
$q_e$	7.92	7.92	<b>7.92</b>	7.89	7.94
<b>Salinidad 40</b>					
Suma	1.1556	<b>1.1516</b>	1.6656	31.4184	17.2532
$k_2$	5.52E-05	<b>5.10E-05</b>	7.25E-05	0.05	4.64E-03
$q_e$	144.83	<b>150.10</b>	127.16	21.95	28.54



## ANEXO 4

**Tabla A4-1.** Constantes de la isoterma de Langmuir ( $k_L$  y  $q_{max}$ ) para la biosorción de Cd a diferentes temperaturas, obtenidas mediante el análisis de funciones de error. Biomasa  $0.5 \text{ g L}^{-1}$ , pH 7, Salinidad 0.

	<b>ERRSQ</b>	<b>HYBRD</b>	<b>MPSD</b>	<b>ARE</b>	<b>EABS</b>
<b>25°C</b>					
Suma	<b>170.4992</b>	213.7063	299.0146	388.6037	221.4870
$k_L$	<b>0.20</b>	0.10	0.07	0.06	0.10
$q_{max}$	<b>37.33</b>	39.64	42.32	38.74	39.15
<b>30°C</b>					
Suma	<b>66.6593</b>	79.5001	125.2759	141.5772	73.4318
$k_L$	<b>0.07</b>	0.05	0.04	0.04	0.06
$q_{max}$	<b>47.54</b>	49.92	53.11	52.66	48.34
<b>35°C</b>					
Suma	<b>164.4197</b>	196.9176	279.1442	331.2705	207.7792
$k_L$	<b>0.07</b>	0.05	0.04	0.03	0.11
$q_{max}$	<b>57.86</b>	61.75	66.46	70.34	54.60
<b>30°C normal</b>					
Suma	<b>309.8022</b>	537.5262	1839.7194	2523.5940	522.1309
$k_L$	<b>0.09</b>	0.00	0.00	0.02	0.21
$q_{max}$	<b>72.57</b>	1879.50	480.62	44.03	53.46

**Tabla A4-2.** Constantes de la isoterma de Langmuir ( $k_L$  y  $q_{max}$ ) para la biosorción de Cu a diferentes temperaturas, obtenidas mediante el análisis de funciones de error. Biomasa  $0.5 \text{ g L}^{-1}$ , pH 6, Salinidad 0.

	<b>ERRSQ</b>	<b>HYBRD</b>	<b>MPSD</b>	<b>ARE</b>	<b>EABS</b>
<b>25°C</b>					
Suma	<b>4.2095</b>	4.5436	5.6162	7.3710	5.0588
$k_L$	<b>0.08</b>	0.07	0.07	0.06	0.09
$q_{max}$	<b>27.35</b>	27.88	28.47	29.44	26.35
<b>30°C</b>					
Suma	<b>0.7457</b>	0.7380	0.7339	0.7459	0.6700
$k_L$	<b>0.08</b>	0.08	0.08	0.08	0.07
$q_{max}$	<b>8.51</b>	8.53	8.54	8.46	8.55
<b>35°C</b>					
Suma	<b>16.3255</b>	18.0661	22.0158	28.1866	22.9480
$k_L$	<b>0.20</b>	0.15	0.12	0.11	0.34
$q_{max}$	<b>15.76</b>	16.37	16.94	16.78	14.89
<b>30°C normal</b>					
Suma	<b>4.4064</b>	4.3748	4.3492	4.8327	4.5413
$k_L$	<b>0.90</b>	0.91	0.91	0.92	0.96
$q_{max}$	<b>42.34</b>	42.32	42.29	41.88	41.83

**Tabla A4-3.** Constantes de la isoterma de Langmuir ( $k_L$  y  $q_{max}$ ) para la biosorción de Pb a diferentes temperaturas, obtenidas mediante el análisis de funciones de error. Biomasa  $0.5 \text{ g L}^{-1}$ , pH 4, Salinidad 0.

	<b>ERRSQ</b>	<b>HYBRD</b>	<b>MPSD</b>	<b>ARE</b>	<b>EABS</b>
<b>25°C</b>					
Suma	350.2617	529.3034	602.3351	1715.1526	<b>349.3694</b>
$k_L$	0.23	0.13	0.15	0.08	<b>0.22</b>
$q_{max}$	61.05	63.45	71.86	59.90	<b>60.29</b>
<b>30°C</b>					
Suma	<b>64.9507</b>	79.1093	128.5239	124.7373	80.4384
$k_L$	<b>0.40</b>	0.53	0.72	0.74	0.29
$q_{max}$	<b>54.48</b>	52.48	49.19	53.46	55.55
<b>35°C</b>					
Suma	<b>821.9134</b>	1188.3543	2030.4548	2975.2138	1109.8900
$k_L$	<b>0.14</b>	0.08	0.05	0.04	0.25
$q_{max}$	<b>90.13</b>	96.29	103.75	95.97	84.19
<b>30°C normal</b>					
Suma	28.4868	<b>28.2241</b>	30.0449	415.8955	29.5194
$k_L$	0.01	<b>0.01</b>	0.01	0.02	0.01
$q_{max}$	207.74	<b>210.13</b>	214.15	149.27	213.49

**Tabla A4-4.** Constantes de la isoterma de Freundlich ( $k_F$  y  $n$ ) para la biosorción de Zn a diferentes temperaturas, obtenidas mediante el análisis de funciones de error. Biomasa  $0.5 \text{ g L}^{-1}$ , pH 7, Salinidad 0.

	<b>ERRSQ</b>	<b>HYBRD</b>	<b>MPSD</b>	<b>ARE</b>	<b>EABS</b>
<b>25°C</b>					
Suma	0.00036	<b>0.00011</b>	0.00021	39.41957	50.67106
$K_F$	3.39	<b>3.39</b>	3.39	0.77	0.50
$n$	1.11	<b>1.11</b>	1.11	0.75	0.68
<b>30°C</b>					
Suma	0.07017	0.07368	0.08014	130.13166	<b>0.05990</b>
$K_F$	15.04	15.03	15.03	19.21	<b>15.03</b>
$n$	1.53	1.53	1.53	1.73	<b>1.53</b>
<b>30°C normal</b>					
Suma	<b>411.28440</b>	676.53812	979.79769	1138.42257	441.54836
$K_F$	<b>14.01</b>	6.64	4.55	4.02	13.72
$n$	<b>2.36</b>	1.72	1.51	1.51	2.38