



*Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología*  
Universidad Nacional Autónoma de México



**Efecto de los factores ambientales en la absorción y adsorción de Hg(II) por la bacteria *Bacillus jeotgali* cepa U3**

**T E S I S**

que para obtener el grado académico de:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**(QUÍMICA ACUÁTICA)**

P r e s e n t a

IBQ. Asia Cecilia Carrasco Valenzuela

Director de Tesis: Dr. Carlos René Green Ruiz

Comité Tutorial: Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala  
Dra. Silvia Castillo Blum  
Dr. Mario Villalobos Peñalosa  
Dr. Federico Páez Osuna



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

DEDICADO A AQUELLAS PERSONAS QUE ME HACEN SENTIR  
SIEMPRE QUERIDA, LOS QUE SIEMPRE ME ESTAN APOYANDO,  
ESCUCHANDO, ENSEÑÁNDOME Y QUE SIEMPRE CUENTO CON  
ELLOS. AQUELLAS PERSONAS QUE POR ESTAR AQUÍ ME HACEN  
**MI VIDA FELIZ: MI FAMILIA.**

Asia Cecilia Carrasco Valenzuela.

## AGRADECIMIENTOS.

Agradezco al Dr. Carlos René Green Ruiz, director de este trabajo, las facilidades y el apoyo prestado para la realización del mismo, además de su amistad y calor humano. También a los Drs. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala, Federico Páez Osuna, Mario Villalobos Peñalosa y Silvia Castillo Blum, por sus 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 y a la Dirección General de Educación Superior Tecnológica de la SEP por su apoyo parcial a través del proyecto “Diagnóstico y alternativa de mitigación de la contaminación por Cd, Cr, Hg y Pb, en dos sitios con actividad minera en el sur del Estado de Sinaloa”, con clave: 911.05-P, a cargo del Dr. Jorge Ruelas Inzunza, investigador adscrito al Instituto Tecnológico del Mar No. 2- Mazatlán. Asimismo, al principal apoyo financiero, otorgado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico a través del proyecto “Estudio comparativo de adsorción de metales por caolín enriquecido con ácido humito y bacterias *Bacillus jeotgali* cepa U3 como alternativas para la remediación de aguas contaminadas”, clave IN111406-3.

Agradezco también al Quím. Humberto Bojórquez Leyva por su valiosa ayuda en el manejo del equipo de laboratorio; a los encargados del centro de cómputo del ICMYL, unidad Mazatlán, Mat. Germán Ramírez Reséndiz por su ayuda en el análisis estadístico y Lic. Carlos Suárez Gutiérrez; al Lic. Pedro Allende Rosales y Ma. Clara Ramírez Jáuregui por su ayuda en la búsqueda bibliográfica. Así mismo doy las gracias a la Lic. Margarita Cordero Ruiz, auxiliar del posgrado, por su gran amabilidad y ayuda en los trámites.

Agradezco de igual forma a QFB. Carmen Bolán M., y M.C. Roxana Atondo Mexia, técnicas del laboratorio de bacteriología del CIAD Mazatlán, por su gran

amabilidad y ayuda en la preservación 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. Agradezco también a Alma, Yhara, Luis, por haberme brindado su amistad así como a todos mis compañeros de generación por todos los momentos de grata compañía. Y por supuesto a Claudia, Trini, África, Ame, Ile, Manuel, Omar y Omar (mi amor) por su cariño y comprensión. GRACIAS.

## INDICE

	<b>Pág.</b>
RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. ANTECEDENTES.....	8
2.1. Biosorción de metales por microorganismos.....	8
2.2. Biosorción de metales por bacterias del género <i>Bacillus</i> .....	9
2.3. Biosorción de Hg(II) por microorganismos .....	10
2.4. Biosorción de Hg(II) por bacterias del género <i>Bacillus</i> .....	14
3. OBJETIVOS.....	15
4. HIPÓTESIS.....	16
5. METODOLOGÍA.....	17
5.1. Microorganismos.....	17
5.1.1. Conteo bacteriano.....	18
5.2. Biomasa no viable.....	19
5.3. Sorción de Hg(II) .....	19
5.3.1. Determinación del efecto del pH .....	19
5.3.2. Determinación del efecto de la temperatura.....	21
5.3.3. Determinación del efecto de la fuerza iónica .....	21
5.4. Evaluación de la caducidad del sorbente .....	21
5.5. Modelos de equilibrio para la biosorción del Hg(II).....	22
5.6. Análisis estadísticos de los datos.....	23
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
6.1. Efecto del pH en la capacidad de absorción y adsorción del sorbente.....	24
6.1.1. Biomasa viable .....	24
6.1.2. Biomasa no viable .....	26
6.2. Efecto de la temperatura en la biosorción del Hg(II).....	29
6.2.1. Biomasa viable.....	29
6.2.2. Biomasa no viable.....	32

6.3. Efecto de la concentración inicial en la capacidad de biosorción....	36
6.3.1. Biomasa viable y no viable.....	36
6.4. Fuerza iónica.....	37
6.5. Comparación de la $q_{max}$ entre bacterias viables y no viables.....	40
6.6. Tiempo de caducidad del biosorbente.....	41
7. CONCLUSIONES.....	44
8. LITERATURA CITADA .....	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>5.1.</b> Obtención de la biomasa bacteriana.....	18
<b>5.2.</b> Diagrama del efecto del pH en la biosorción de Hg (II) en la bacteria.....	21
<b>6.1.</b> Porcentaje de remoción de Hg(II) por bacterias viables, a diferentes pH's para concentraciones de 20 y 100 mg Hg(II) g <sup>-1</sup> .....	25
<b>6.2.</b> Porcentaje de remoción de Hg (II) por bacterias no viables, a diferentes pH's para concentraciones de 20 y 100 mg Hg(II) g <sup>-1</sup> .....	27
<b>6.3.</b> Bioabsorción de Hg(II) por las bacterias viables a diferentes temperaturas y concentraciones iniciales.....	29
<b>6.4.</b> Efecto de la temperatura en la bioabsorción de Hg(II) por las bacterias viables.....	31
<b>6.5.</b> Capacidad de bioabsorción máxima de Hg(II) por la biomasa viable con respecto a la temperatura. Biomasa de 1 g L <sup>-1</sup> , pH 7.5 .....	31
<b>6.6.</b> Bioabsorción de Hg(II) por las bacterias no viables a diferentes temperaturas y concentraciones iniciales.....	32
<b>6.7.</b> Efecto de la temperatura en la bioadsorción de Hg(II) por las bacterias no viables.....	33
<b>6.8.</b> Capacidad de bioadsorción máxima de Hg(II) por la biomasa no viable con respecto a la temperatura. Biomasa de 1 g L <sup>-1</sup> , pH 7.5.....	34
<b>6.9.</b> Efecto de la fuerza iónica a pH de 7.5, con 1 g L <sup>-1</sup> , para la biomasa viable y no viable.....	37



<b>6.10.</b> Especiación inorgánica de mercurio en fase acuosa, calculada por MINEQL.....	39
<b>6.11.</b> Capacidad de bioabsorción de las bacterias viables y no viables, en condiciones probadas.....	40
<b>6.12.</b> Capacidad de biosorción de las bacterias viables y no viables a concentraciones de 20 y 100 mg Hg(II) g <sup>-1</sup> para 0, 1, 3 y 6 meses almacenadas a -80°C.	42

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>6.1.</b> Bioabsorción de Hg(II) por bacterias viables a diferentes pH's.....	23
<b>6.2.</b> Bioadsorción de Hg(II) por bacteria no viable a diferentes pH's.....	25
<b>6.3.</b> Constantes de Langmuir obtenidas mediante el método de mínimos cuadrados y regresión lineal para la bioabsorción de Hg(II) por las bacterias viables a diferentes temperaturas .....	29
<b>6.4.</b> Constantes de Langmuir obtenidas mediante el método de mínimos cuadrados y regresión lineal para la bioadsorción de Hg(II) por las bacterias no viables a diferentes temperaturas .....	32
<b>6.5.</b> Biosorción de Hg(II) por diferentes microorganismos.....	34
<b>6.6.</b> Concentraciones de Na <sup>+</sup> y Cl <sup>-</sup> de las soluciones iniciales.....	37
<b>6.7.</b> Biosorción de Hg(II) por bacterias viables y no viables, almacenadas y recientes.....	42

## RESUMEN

La contaminación por metales pesados representa un problema importante debido a sus efectos tóxicos, que conducen a serios peligros ecológicos y de salud. El mercurio es considerado uno de los metales pesados más tóxicos. El uso de materiales biológicos para la remoción y recuperación efectiva de metales pesados en aguas residuales contaminadas prometen ser una alternativa potencial para técnicas de tratamientos convencionales. Con el objetivo de determinar el efecto de variables ambientales (pH, temperatura) en la biosorción del Hg(II) en biomasa viable y no viable de la bacteria *Bacillus jeotgali* cepa U3 se llevó a cabo esta investigación.

La capacidad de la bacteria *Bacillus jeotgali* cepa U3 (viable y no viable) para la biosorción de Hg(II) en solución acuosa fue estudiada, analizando el efecto del pH, la temperatura y la fuerza iónica para obtener sus valores óptimos. También se estudió la conservación de la biomasa por el método de ultracongelación. Las bacterias viables y no viables en la biosorción de Hg(II) presentaron una tendencia a aumentar su capacidad de biosorción a pH de 7.5 (25°C, biomasa 1 g L<sup>-1</sup>, concentraciones iniciales de 20 y 100 mg L<sup>-1</sup>). La isoterma que mejor se ajustó fue la isoterma de Langmuir. La temperatura en el intervalo de 15-45°C no presentó un efecto significativo sobre la capacidad de biosorción de las bacterias viables y no viables. La máxima capacidad de biosorción para la bacteria viable y no viable fue de 117±6.4 y 52.8±4.6 mg g<sup>-1</sup> respectivamente. La fuerza iónica óptima para la biosorción del metal por ambas bacterias fue de cero. La capacidad de biosorción de las bacterias viables y no viables recientes resultó mejor que aquéllas almacenadas hasta por un periodo de seis meses. Se concluye que la biomasa bacteriana viable funciona mejor que la no viable, en las condiciones experimentales estudiadas, para llevar a cabo el proceso de adsorción.

## 1. INTRODUCCIÓN

El incremento de la actividad industrial ha intensificado el problema de la contaminación ambiental y el deterioro de varios ecosistemas, debido a la acumulación de muchos contaminantes, como son los metales tóxicos. Se ha dado gran atención a este problema debido a los efectos en la salud presentados por la existencia de metales pesados en el ambiente (Volesky, 2001).

Existen diferentes compuestos o elementos contaminantes que provocan diversos efectos en los sistemas acuáticos. Entre los principales contaminantes se encuentran la materia orgánica, los hidrocarburos, los nutrientes y los metales pesados. Todos los contaminantes están directamente relacionados con actividades humanas y llegan a los sistemas acuáticos por diferentes vías, principalmente por descargas directas: puntuales ó difusas y atmosféricas (Osuna-López et al., 1986; Soto-Jiménez, 1998; Páez-Osuna y Frías –Espiricueta, 2001).

Los metales pesados son agentes contaminantes que causan gran preocupación ambiental ya que no son biodegradables y por lo tanto son persistentes (Stratton, 1987). Los metales pesados constituyen un grupo cercano a los 40 elementos de la tabla periódica que tienen una densidad mayor o igual a 5 g/cm<sup>3</sup>. El rasgo distintivo de la fisiología de los metales pesados, es que aún cuando muchos de ellos son esenciales para el crecimiento como el Na, K, Mg, Ca, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn y Mo, se ha reportado que también tienen efectos tóxicos sobre las células (elementos potencialmente tóxicos como Hg, Cr, Pb, Zn, Cu, Ni, Cd, As, Co, Sn, etc.), principalmente como resultado de su capacidad para alterar o desnaturalizar las proteínas (Volesky, 1990a). La contaminación por metales pesados representa un problema importante debido a sus efectos tóxicos, solubilidad, movilidad y acumulación a través de la cadena alimenticia que conducen a serios peligros ecológicos y de salud (Malik, 2004).

Los metales se pueden fijar por adsorción sobre los sedimentos o acumular en organismos bénticos, a veces en niveles tóxicos. Por lo tanto, la biodisponibilidad y la subsecuente toxicidad por metales ha sido un área importante para la investigación (Ankley et al., 1996; Sharma et al., 1999; Singh, 2001). Los metales pesados se distribuyen durante su transporte entre la fase acuosa y los sedimentos suspendidos (Förstner y Müller, 1973).

La presencia de metales pesados en el ambiente acuático es conocida por causar severos daños a la vida acuática, ya que la mayoría de las sales de los metales pesados son solubles en agua y en soluciones acuosas y consecuentemente no pueden ser separados por métodos físicos (Volesky, 1990a; 1990b). Esto es especialmente significativo a valores de pH ácidos. Sin embargo, en condiciones neutras a básicas, los metales tienden a formar sólidos de óxidos-hidróxidos y de carbonatos, sumamente insolubles y su disponibilidad en la fase acuosa tiende a desaparecer. Por otro lado, la complejación con materia orgánica u otros ligantes tienen un efecto contrario que permite estabilizar las especies acuosas de metales y mantenerlos (bio) disponibles a valores de pH en que se otra forma precipitarían.

El mercurio es uno de los metales pesados más tóxicos y de fácil acumulación en los organismos, principalmente en los peces, por esta razón es de los contaminantes más preocupantes y uno de los más estudiados (Goldwater, 1972). Los desechos sólidos y líquidos que contienen metales pesados tóxicos pueden ser generados por procesos naturales y antropogénicos. El aporte natural de mercurio al ambiente se da como resultado del intemperismo de áreas mercuríferas, erupciones volcánicas, incendios forestales causados naturalmente y emisiones biogénicas (Morel et al., 1998). También, este metal puede ser liberado al ambiente por actividades antropogénicas que incluyen varios procesos industriales como: generación eléctrica, actividad minera, agricultura (fertilizantes), pigmentos, producción de baterías, combustión de combustibles fósiles, procesos metalúrgicos y aguas residuales de industrias. Todas estas actividades han provocado contaminación en grandes áreas de suelos y sedimentos en todo el mundo (Boening, 2002).

Canstein et al. (1999) reportó concentraciones altas de entre 1.6 a 7.6 mg Hg(II) L<sup>-1</sup> en efluentes de varias empresas cloro-alcali en Europa. Es importante la eliminación de este ion metal, ya que se convierte por acción bacteriana a metilmercurio (forma orgánica) compuesto altamente neurotóxico, que es depositado en los sedimentos y tomado por organismos acuáticos, siendo bioacumulado, y por su rápido desplazamiento en la cadena alimenticia, biomagnificado, amenazando así la salud del hombre (Braune et al., 1999). Los efectos del mercurio a nivel celular es la inhibición de la actividad enzimática y daño celular. La reacción particular del mercurio con enlaces del grupo tiol confirma la afinidad selectiva del metal. Los efectos principales del envenenamiento por mercurio en el cuerpo, son disturbios neurológicos y renales, así como la debilitación de la función pulmonar (Morel et al., 1998). Varias organizaciones internacionales han limitado el máximo contenido de Hg en agua y alimentos. La EPA ha limitado la concentración de mercurio en agua para consumo humano de 0.002 mg L<sup>-1</sup> en acuerdo a los estándares de agua de la comunidad europea la cual es de 0.001 mg L<sup>-1</sup>. El estándar de mercurio en agua residuales proporcionado por la EPA tiene como límite 0.2 mg Hg L<sup>-1</sup>.

La remoción de excesos y la recuperación de iones de metales pesados de aguas residuales y del ambiente son esenciales, debido a su extrema toxicidad en la vida acuática y humana, además de su importancia con respecto a consideraciones ambientales y económicas (Kapoor et al., 1999; Nourbakhsh et al., 2002). Para evitar peligros ambientales es necesario eliminar los metales contaminantes de las fuentes de efluentes (Sahoo et al., 1991). Los métodos convencionales para la eliminación de algunos metales en solución incluyen: precipitación química, oxidación o reducción química, intercambio iónico, filtración, tratamiento electroquímico, tecnología de membranas y recuperación por evaporación. Estos procesos pueden ser no efectivos o extremadamente caros, especialmente cuando los metales se encuentran en solución en contenidos del orden de 1 a 100 mg L<sup>-1</sup> de metales disueltos, además de que generan desechos secundarios durante el proceso (Aksu y Acikel, 2002; Volesky 1990a).

El uso de materiales biológicos, incluyendo los microorganismos vivos y muertos, para remover y/o recuperar metales tóxicos o preciados de las aguas residuales industriales, han ganado una importante credibilidad durante los recientes años, por el buen funcionamiento y bajo costo de estos materiales sorbentes (Kefala et al., 1999). Volesky (1990a) menciona que la biosorción puede ser basada en los siguientes mecanismos: adsorción física, intercambio iónico, complejación y precipitación. La remoción del metal por precipitación es un mecanismo de defensa activo de la biomasa viva a altas concentraciones del ión metálico tóxico.

Los microorganismos pueden remover los metales en una solución por dos mecanismos: activamente (bioacumulación) o pasivamente (adsorción) (Hussein et al., 2004). En el primero, los iones metálicos pueden entrar a la célula a través de la membrana celular y participar en rutas bioquímicas diversas, mientras que en el segundo, involucra el enlace superficial, el cual tiene lugar en la superficie de la pared celular (Al-Saraj et al. 1999). Estudios de viabilidad para la aplicación en gran escala demostraron que el proceso de bioadsorción es más eficiente que los procesos de bioacumulación, porque los sistemas vivos (absorción activa) requieren a menudo la adición de alimentos y por lo tanto aumentan la demanda bioquímica del oxígeno (DBO) o la demanda de oxígeno producido por reacción química (DQO) en el efluente. Además, el mantenimiento de la población microbiana sana es difícil debido a la toxicidad del metal y a otros factores ambientales inadecuados. También, el potencial para la recuperación del metal por desorción es restringido puesto que el metal puede ser retenido en la solución por enlace intracelular o productos metabólicos, formando complejos con los metales (Brown y Lester, 1982; Ajmal et al. 1996; Dilek et al. 1998).

La biosorción se puede definir como la capacidad de los materiales biológicos de acumular los metales pesados de las aguas residuales en la pared celular, donde la remoción del metal está fuertemente influenciada por parámetros fisicoquímicos tales como fuerza iónica, pH, temperatura y la concentración de compuestos orgánicos e inorgánicos (Fourest y Roux, 1992). La biosorción es posible tanto en biomasa viva como muerta (Sandau, 1996). Las ventajas principales de la biosorción sobre los

tratamientos de métodos convencionales incluyen: (1) bajo costo, (2) alta eficiencia, (3) minimización del producto químico y de lodo biológico, (4) regeneración del bioadsorbente y (5) posibilidad de recuperación del metal (Kratochvil y Volesky, 1998). La biosorción de metales ha sido comprobada en varios microorganismos, entre los que se encuentran hongos (Dilek et al., 2002; Bai y Abraham, 2002), levaduras (Al Saraj et al., 1999), algas (Aksu y Acikel, 2000; Pérez-Rama et al., 2002) y bacterias (Bruins et al., 2000). Las bacterias son nativas en un gran intervalo de ambientes geológicos como son la superficie del agua, sistemas acuíferos y del suelo, en los sedimentos, ventilas hidrotermales y aguas geotermas (Fein, 1997).

Las bacterias resultan eficientes para la adsorción de metales, debido a su gran área superficial relacionada con su volumen y a la presencia de grupos funcionales específicos en la pared celular con alta afinidad de enlace con metales (Beveridge y Murray, 1980; Beveridge et al., 1982; Goncalves et al., 1987; Beveridge, 1989; Fein et al., 1997; Daughney y Fein, 1998; Daughney et al., 1998; Fowle y Fein, 1999). Los sitios aniónicos o grupos funcionales responsables de la adsorción de cationes de metales incluyen a grupos fosforilo, carboxilo, sulfhídrido e hidroxilo de proteínas y lípidos de la membrana y componentes de la pared celular tales como peptidoglucano, entre otros (Ford et al., 1988). Entre los grupos fosforilos, participan grupos fosfodiéster del ácido teicóico en bacterias, además de grupos amino y grupos anteriores mencionados, los cuales son conocidos para enlazar cationes. Entre bacterias, diversas especies del género *Bacillus* han sido identificadas por tener un alto potencial de adsorción de metales y han sido utilizadas en la preparación de biosorbentes comerciales (Brierley et al., 1986). Además, se ha informado la adsorción de metales usando *Pseudomonas* sp, *Zoogloea ramigera* y *Streptomyces* sp (Strandberg y Shumate, 1981).

Según Malik (2004) en la biomasa no viable, el metal no es introducido al interior de las células, sino que es fijado sólo por adsorción en su superficie, es decir el ión puede acumularse en la parte de difusión eléctrica de la doble capa por la interacción entre la carga negativa de la biomasa y carga positiva del metal y así sólo una pequeña fracción de la capacidad de bioacumulación es empleada. Yan (2000),



determinó que cuando se utiliza biomasa no viable para la remoción de metales pesados, el tratamiento previo del álcali es un método eficaz para mejorar la capacidad de la bioadsorción para los iones del metal. Por lo tanto, la eficacia de la bioadsorción de la biomasa no viable puede ser mayor, equivalente, o menor que la de la biomasa viva dependiendo del método del pre-tratamiento aplicado.

Por todo lo anterior expuesto, bacterias tanto viables como no viables pueden ser utilizadas en la remoción de metales en efluentes contaminados, planteando así una nueva alternativa para resolver tal problemática.

## 2. ANTECEDENTES

Relativamente pocos estudios han sido realizados utilizando bacterias del género *Bacillus* en la remoción de Hg(II); sin embargo, se han encontrado algunos trabajos con organismos que tienen la capacidad de llevar a cabo la biosorción de ciertos metales por mecanismos que pueden ser empleados o aplicados en términos generales al mercurio.

### 2.1. Biosorción de metales por microorganismos

Kefala et al. (1999) investigaron la biosorción de Cd por biomasa bacteriana 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 donde la máxima capacidad de absorción se alcanzó después de los 5 minutos, (2) el pH, el cual fue de 7, (3) la temperatura de 18 a 20°C, (4) la concentración del metal. Aplicando las condiciones óptimas encontradas se obtuvo que la bacteria muerta mostraba una gran capacidad de biosorción por el cadmio a comparación de la bacteria viva, encontrando una adsorción de más del 95% con estas.

Hussein et al. (2003) investigaron la bioadsorción del Cr(VI), Cu(II), Cd(II) y Ni(II), usando biomasa no viable de diversas especies de *Pseudomonas*. La aplicación de los modelos de Langmuir y de Freundlich para los bioadsorbentes fue probada. La capacidad máxima de adsorción fue encontrada para el Ni(II) seguido por Cd(II), Cu(II) y Cr(VI) en un tiempo de 10 min. La bioadsorción de Cu(II) alcanzó una capacidad máxima de 39.84 mg g<sup>-1</sup> de peso seco de *Thiobacillus thiooxidans*, a un pH de 5.0. La adsorción máxima de Cr(VI) alcanzó alrededor 38%; El valor máximo de remoción de Cu(II) se observó en presencia de Cr(VI) como metal binario, alcanzando un 93%. En lo que concierne a Cd(II) y a Ni(II) porcentajes de remoción similares fueron obtenidas (entre 35 y 88%).

Al-Garni (2005) realizó un estudio de la biosorción del Pb por dos bacterias, *Klebsiella pneumoniae* encapsulada y *Citrobacter freundii* no encapsulada, encontrando que la cantidad biosorbida es influenciada por el pH de la solución, la concentración inicial del metal en la solución, la cantidad de biomasa en peso seco y el tiempo de contacto; donde la capacidad óptima de biosorción para las dos bacterias probadas fue lograda a un pH de 4, con concentración inicial de plomo de  $481.2 \text{ mg L}^{-1}$  en contacto con  $2 \text{ g L}^{-1}$  de células secas durante 100 min. Sin embargo, las células secas de ambos organismos pueden ser almacenadas con seguridad por largos periodos (125 d) a temperatura ambiente ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) sin pérdida de eficiencia de biosorción. Los resultados revelaron que la presencia de la cápsula de *K. pneumoniae*, aumentó la eficacia de la biosorción de la bacteria.

## **2.2. Biosorción de metales por bacterias del género *Bacillus***

El-Helow et al. (2000) investigaron la adsorción de Cd por la bacteria marina *Bacillus thuringiensis* (cepa DM55), encontrando que los componentes del medio de cultivo que más influenciaron en la remoción del metal fueron los fosfatos de potasio y la peptona. Las concentraciones óptimas del medio de cultivo (en  $\text{g L}^{-1}$ , peptona, 3; extracto de levadura, 3;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.76;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.51; NaCl, 2.5 y  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 2) permitieron una remoción del metal de un 79% durante las primeras 24 horas, con una capacidad de adsorción específica de  $21.57 \text{ mg g}^{-1}$  de biomasa.

Costa et al. (2001) demostraron la bioacumulación del cadmio, plomo, zinc y cobre por bacterias del género *Bacillus subtilis*, *B. sphaericus* y *B. cereus*, encontrando que la máxima bioacumulación del cobre era  $6.4 \text{ mol g}^{-1}$  de biomasa para *Bacillus*, del zinc era  $5.0 \text{ mol g}^{-1}$  de biomasa para *B. subtilis*, del cadmio era  $11.8 \text{ mol g}^{-1}$  de biomasa para *B. sphaericus* y del plomo era  $1.8 \text{ mol g}^{-1}$  de biomasa para *B. subtilis*. Las diferentes cepas de *Bacillus* presentaron distintas capacidades de adsorción y los mejores resultados fueron obtenidos para *B. subtilis* y *B. cereus*.

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 desprotonación 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.

Nourbakhsh et al. (2002) determinaron las condiciones óptimas de adsorción de Cr<sup>+6</sup>, Pb<sup>+2</sup> y Cu<sup>+2</sup> por *Bacillus* sp. (cepa OGUB 001), a 27°C y pH de 4 a 7. Estos autores encontraron valores de pH óptimos para la adsorción de metales de 2, 4.5 y 4, respectivamente. La capacidad de adsorción obtenida para el plomo (a pH 4) fue 71.8%, mientras que de 16.3 y 11.9% para los iones cobre y cromo respectivamente.

Kaewchai y Prasertsan (2002) estudiaron la biosorción del Ni y del Cd por células bacterianas secas de *Enterobacter agglomerans* SM 38 y encontraron que a un pH 5.5 alcanzó una eliminación de 25.2% y 32%, respectivamente. Mientras que para *Bacillus subtilis* WD 90 se exhibió una remoción del 27% y el 25%, respectivamente.

Sahin y Zturk (2006) demostraron la biosorción de Cr(VI) en solución acuosa por células vegetativas secas y esporas de *Bacillus thuringiensis*. La máxima adsorción fue observada a pH de 2 y temperatura de 25°C. En las condiciones óptimas, la adsorción del ion metálico fue aumentando con la concentración del metal. La adsorción de Cr(VI) por esporas de *B. thuringiensis* a 250 mg L<sup>-1</sup> fue de 24.1% mientras que para la célula vegetativa fue de 18%.

### **2.3. Biosorción de Hg(II) por microorganismos**

Aller et al. (1996) evaluaron la capacidad de remoción de Hg(II) y Hg(I) por células de bacterias liofilizadas y células vivas, encontrando que el porcentaje de retención de Hg(II) de las células vivas a pH neutro fue de 65.2% para *Escherichia coli*

y 44.5% para *Pseudomona putida*; mientras que para células liofilizadas al mismo pH fue de 36% para *E. coli* y 21% para *P. putida*, pero si las células liofilizadas eran usadas a su pH óptimo de retención se observó un aumento en su capacidad de remoción de 86.6% para *E. coli* a pH de 1 y 79.8% para *P. putida* pH de 3. Además, compararon la capacidad de retención de las células liofilizadas ( $7.65 \mu\text{g de Hg g}^{-1}$  de bacteria) y de células vivas ( $0.9 \mu\text{g de Hg g}^{-1}$  de bacteria) con la misma concentración original de Hg(II) ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ) concluyendo que el uso de células liofilizadas muestran mejor eficiencia de biosorción para ser utilizadas en sistemas de extracción.

Saglam et al. (2002) usaron basidioesporas de *Phanerochaete chrysosporium* inmovilizadas en carboximetilcelulosa para la eliminación de ion mercurio en solución acuosa. La biosorción de Hg(II) fue estudiada usando solución acuosa en un intervalo de concentración de  $30\text{-}700 \text{ mg L}^{-1}$ . La máxima capacidad de biosorción por *Phanerochaete chrysosporium* viva inmovilizada y muerta-inactivada fue de 83.10 y  $102.5 \text{ mg Hg(II) g}^{-1}$  respectivamente. Los cambios de temperatura entre  $15$  y  $45^\circ\text{C}$  con una concentración inicial de  $200 \text{ mg L}^{-1}$  no afectaron la capacidad de biosorción. El efecto de pH fue también investigado, encontrando que la máxima adsorción de Hg(II) fue observado a pH de 6.0. Con la finalidad de observar la desorción del metal desde la biomasa utilizada, ésta se trató usando  $10 \text{ mM HCl}$ , recuperando un 95% del mercurio previamente adsorbido. Los biosorbentes fueron usados en tres ciclos de adsorción-desadsorción y no se observó una pérdida significativa en la capacidad de biosorción.

Kaçar et al. (2002) inmovilizaron basidiosporas del hongo *Phanerochate chryosporium* que posteriormente fueron atrapadas en perlas de alginato de calcio e incubadas a  $30^\circ\text{C}$  por 5 días para la obtención de células vegetativas. Las perlas de alginato y ambas micelas viva e inactivadas (por calor) de *P. chryosporium* fueron usadas para la remoción de iones Hg(I II) y Cd(II) de solución acuosa en un rango de concentración de  $30\text{-}500 \text{ mg L}^{-1}$ . La biosorción de los iones Hg(II) y Cd(II) por los biosorbentes aumentó al incrementar la concentración inicial de dichos metales en el medio. El equilibrio de biosorción fue obtenido después de los 60 min; después de este periodo, la concentración de los iones del metal removidos no tuvo cambio significativo

con el tiempo. El efecto del pH fue también investigado y la máxima biosorción de Hg(II) y Cd(II) fue obtenido entre un pH de 5.0 y 6.0; la biosorción del Hg(II) a pH de 6.0 por el alginato, hongo vivo e inactivado fue de  $28.9 \pm 0.7$ ,  $52.4 \pm 0.9$  y  $75.1 \pm 1.3$ , respectivamente y para la biosorción de Cd(II) se encontró  $35.1 \pm 1.2$ ,  $49.7 \pm 1.5$  y  $66.3 \pm 1.8$  y a pH de 6.0 por el alginato, el hongo vivo e inactivado. La temperatura en el intervalo de 15-45°C no tuvo efecto significativo en la capacidad de biosorción. El orden de capacidad de remoción para Hg(II) y Cd(II) fue: hongo inactivado inmovilizado > hongo vivo inmovilizado > alginato de calcio.

Bae et al. (2003) evaluaron la capacidad de adsorción de una proteína metaloreguladora (MerR) modificada genéticamente sobre la superficie de las células de *E. coli*, durante una hora de exposición en una solución de  $1 \text{ mg L}^{-1} \text{ Hg}^{2+}$ , obteniendo una adsorción de  $3.47 \text{ mg g}^{-1}$  de peso seco de la célula. La bioadsorción del  $\text{Hg}^{2+}$  por MerR fue analizada variando los factores ambientales, presentando insensibilidad a diversas fuerzas iónicas, a cambios de pH y a la presencia de quelatos del metal.

Zeroual et al. (2003) llevaron a cabo la biosorción de mercurio en biomasa no viva protonada de la alga marina *Ulva lactuca*. La protonación de la biomasa fue preparada, lavando el alga con  $0.3 \text{ N H}_2\text{SO}_4$ , después de 3 h de contacto con el ácido, la biomasa fue enjuagada con agua destilada. Después de que la biomasa fue pre-tratada, fue secada en un horno a 50°C. La capacidad de biosorción a pH de 7 fue  $149.25 \text{ mg g}^{-1}$  cinco veces mayor que las de pH 3.5 ( $27.24 \text{ mg g}^{-1}$ ). La adsorción de mercurio disminuye con el incremento de la concentración inicial de la solución del metal y el biosorbente es rápidamente saturado a altas concentraciones. Después de la saturación, la biomasa fue eluida usando  $\text{H}_2\text{SO}_4 0.3 \text{ N}$ . El biosorbente regenerado fue reusado durante cinco ciclos de adsorción-desorción sin pérdida en la capacidad de adsorción.

Jian-Zhong Chen et al. (2005) evaluaron la capacidad de remoción en solución acuosa de  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Hg}^{2+}$  por la cianobacteria *Microcystis aeruginosa*, encontrando

el 90% de eficiencia de remoción para  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Hg}^{2+}$ , y el 80% para  $\text{Pb}^{2+}$ . En experimentos de biosorción competitiva en sistema binario y ternario, observaron que la biosorción de mercurio fue afectada por la presencia del  $\text{Pb}^{2+}$  y (2) una mayor biosorción de  $\text{Pb}^{2+}$  sobre  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Hg}^{2+}$ .

Herrero et al. (2005) mostraron la gran capacidad de bioabsorción de la macroalga *Cystoseira baccata*. Los experimentos se realizaron adicionando 0.25 g de biomasa en peso seco y una concentración inicial de  $500 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{Hg(II)}$ . Se alcanzó el equilibrio de absorción en un tiempo de contacto de 100 min, observando que la absorción del metal se incrementaba rápidamente en los primeros 50 min, esta absorción relativamente rápida indica que el proceso ocurre principalmente en la superficie del absorbente. Además realizaron estudios de salinidad, encontrando que la capacidad de bioabsorción del  $\text{Hg(II)}$  por la alga dependía del electrolito adicionado; mostraba dos efectos contrarios: (1) un incremento con la concentración de sales de nitrato ( $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ) la absorción del metal aumentaba ligeramente, por lo contrario, (2) la adición de  $\text{NaCl}$  disminuía la bioabsorción, en la cual altas concentraciones de  $\text{NaCl}$  1 M puede disminuir un 80% la capacidad de bioabsorción de *C. baccata*, mientras que bajos valores de salinidad 0.01 M tienen poca influencia en la bioabsorción del metal. Varios investigadores han divulgado una dependencia fuerte de la bioabsorción del  $\text{Hg(II)}$  por el pH (Wase y Forster, 1997; Volesky, 2003). Como regla general, la influencia del pH en la bioabsorción del  $\text{Hg(II)}$  por las algas marinas se relaciona con los estados iónicos de los grupos funcionales de la pared de las células así como la especiación del metal en la solución (Lodeiro et al., 2004). Finalmente, los resultados de equilibrio de biosorción fueron comparados con predicciones obtenidas de la aplicación de una muestra en un modelo químico competitivo, el cual envuelve tres constantes adicionales para el principal complejo de  $\text{Hg(II)}$  inorgánico neutro como  $\text{Hg(Cl)}_2$ ,  $\text{HgOHCl}$  y  $\text{Hg(OH)}_2$  en los sitios de la superficie del alga.

Jeon y Park (2005) mostraron cómo la capacidad de biosorción del ion mercurio por perlitas de quitosan (modificadas con la introducción de grupos aminos a la pared celular) aumentó cuando la temperatura de la solución metálica disminuyó de 40-60°C

a 10-25°C. Volesky (1990) informó que la formación de complejos coordinados de los cationes del metal y los ligandos de las aminas era exotérmica. La magnitud del calor de la biosorción puede proporcionar información útil referente a la naturaleza de la superficie y de la fase fijada por biosorción del adsorbente (Young and Crowell, 1962).

#### **2.4. Biosorción de Hg(II) por bacterias del género *Bacillus***

Hassen et al. (1998), al trabajar con la bioabsorción de Hg, Cr y Cu por *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus thuringiensis*, en solución acuosa a una temperatura de 37°C, encontraron que el mercurio alcanzó el más alto porcentaje de biosorción (*P. aeruginosa* 59.7 ± 9.4, *B. thuringiensis* 42.7 ± 1.4), seguido del cobre (*P. aeruginosa* 26.8 ± 3.5, *B. thuringiensis* 18.7 ± 3.7). Se observó además que al adicionar citrato al medio de cultivo, aumentaba las capacidades de biosorción de Cr de un 0.07 a un 45.9% y de Cu de un 18.7 a un 33.8%. Cabe mencionar que el término de biosorción usado en este trabajo se empleó para indicar la remoción del metal por uno o más procesos.

Green-Ruiz (2005) utilizó biomasa no viable de *Bacillus* sp. para la adsorción de iones de Hg(II) de una solución acuosa a diferentes concentraciones (0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 y 10 mg L<sup>-1</sup>) y observó que 0.2 g de peso seco de biomasa no viable, obtuvo la máxima capacidad de adsorción de 7.94 mg g<sup>-1</sup>, encontrando que a medida que aumentaba la concentración se incrementaba la capacidad de adsorción de la bacteria, sin embargo en términos de porcentaje se vio una disminución, estos experimentos fueron obtenidos después de 120 minutos de haber estado en contacto el ion metal con la bacteria, aunque en los primeros 20 min gran parte del mercurio adsorbido fue removido, además encontró que los cambios de pH tienen un efecto significativo en la capacidad de la bacteria para adsorber metales, obteniendo un pH óptimo entre 4.5 y 6.0 a una temperatura de 25°C en soluciones de 1.0, 5.0 y 10.0 mg L<sup>-1</sup>.



### 3. OBJETIVOS

#### General

Determinar el efecto de variables ambientales (pH, temperatura) en la biosorción del Hg(II) en biomasa viable y no viable de la bacteria *Bacillus jeotgali* cepa U3.

#### Particulares

1. Determinar la capacidad de biosorción del Hg en *Bacillus jeotgali* cepa U3, bajo diferentes condiciones de pH, temperatura y concentración inicial del metal.
2. Comparar la capacidad de remoción del Hg(II) por la bacteria viable y no viable.
3. Determinar los modelos de equilibrio que se ajusten adecuadamente al proceso de biosorción de Hg(II) por la biomasa bacteriana.
4. Evaluar la caducidad del adsorbente.

#### 4. HIPOTESIS

1. Las capacidades de biosorción de Hg en biomasa viable y no viable de la bacteria *Bacillus jeotgali* cepa U3 son influenciadas por los diferentes parámetros ambientales (temperatura, pH), de tal manera que debe existir un intervalo óptimo de estos parámetros.
2. La capacidad de biosorción de las bacterias no viables será mayor que la de las bacterias viables, ya que al someter a las bacterias al calor de la esterilización, se produce la destrucción de la membrana celular, quedan expuestos sus componentes intracelulares y disponible una gran área superficial, aumentando así los sitios de absorción (Errasquín y Vázquez, 2003).
3. La biosorción puede ser descrita mediante los modelos de equilibrio de Langmuir y Freundlich.

## 5. METODOLOGIA

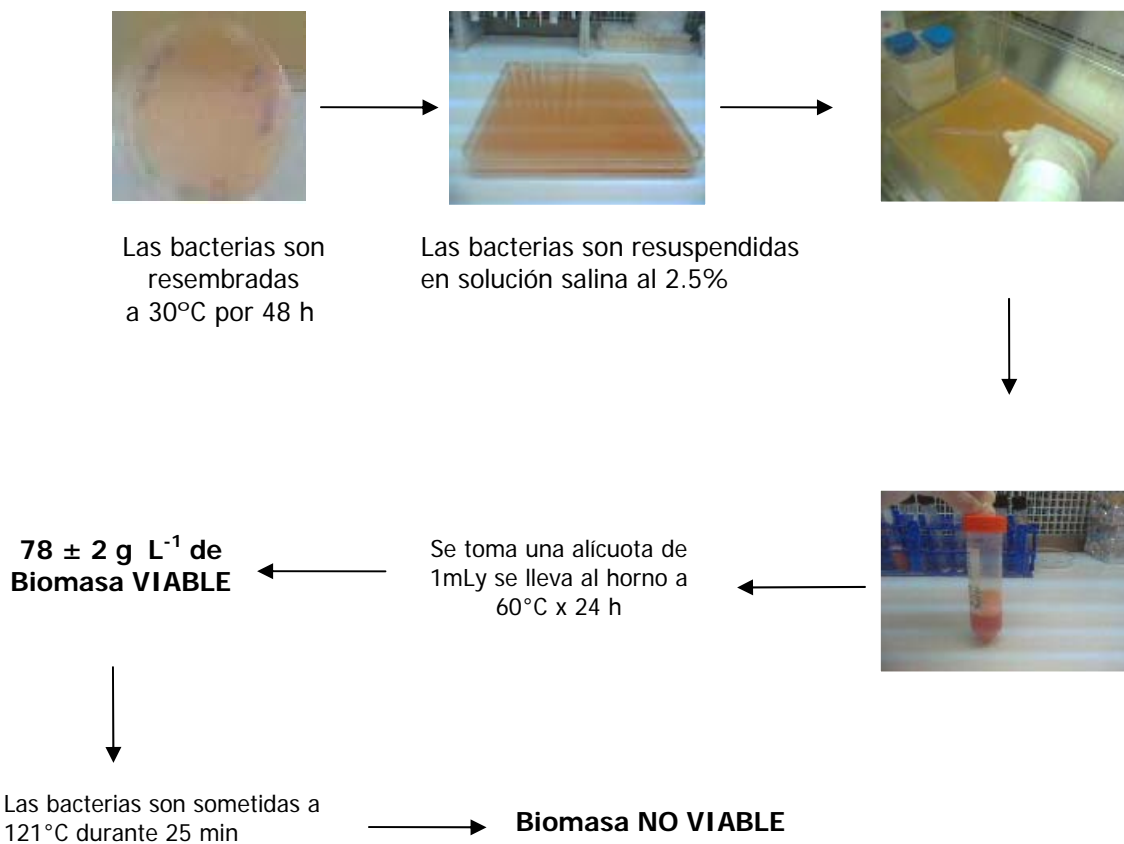
Como parte de un estudio previo enfocado a la oxidación de Mn(II) por bacterias autóctonas, varias cepas fueron aisladas de sedimentos recolectados en el estero de Urías, Sinaloa, México. Una de estas cepas (U3) fue seleccionada como organismo modelo debido a su mayor capacidad para oxidar Mn(II). De acuerdo a análisis bioquímicos y moleculares realizados en el laboratorio de microbiología del Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo Unidad Mazatlán, esta cepa pertenece a la especie *Bacillus jeotgali* (Rodríguez – Tirado, 2006).

Las bacterias fueron críopreservadas (-70°C) en perlas de vidrio esterilizadas previamente y fueron inoculadas conforme fue necesario para los experimentos de este trabajo.

### 5.1. Microorganismo

La bacteria fue sembrada en agar de soya tripticaseina (TSA) adicionado con 20 g L<sup>-1</sup> de NaCl a 30°C por 24 h, posteriormente se resembraron en cajas de petri cuadradas desechables (24.5 x 24.5 cm) que contenían TSA. Después de 48 h, los organismos fueron cosechados en un vial de plástico que contenía una solución salina al 2.5% para ser centrifugadas a 9000 rpm durante 10 min a 4°C (Selenska-Pobell et al., 1999), con el fin de eliminar residuos que pudieran haber quedado del medio donde fueron cultivadas. El sobrenadante fue desechado y las células se resuspendieron en 10 mL de solución salina al 2.5% repitiendo este procedimiento de lavado tres veces (Sahoo, 1991). La bacteria fue resuspendida nuevamente con 10 mL de solución salina al 2.5%, del cual se tomó una alícuota de 1ml y fue llevado a un horno convencional a 60°C por 24 horas y finalmente fue pesada para conocer el peso en seco de la biomasa correspondiente a dicho volumen, el cual fue de 78 ± 2 g L<sup>-1</sup> (Figura 5.1).

## *Bacillus jeotgali*



**Figura 5.1.** Obtención de la biomasa bacteriana.

### 5.1.1. *Conteo bacteriano*

Ya que se tuvo la biomasa, se llevó a cabo el conteo total viable es decir todas las bacterias que pueden crecer en un medio de cultivo artificial por medio de diluciones seriales, donde de cada dilución se toma 100  $\mu\text{L}$  y se inocula en cajas de petri que contiene TSA; estas cajas de petri son incubadas de 24 a 48 h, para la formación de colonias (UFC), obteniendo con este conteo  $1,15 \times 10^8$  UFC/mL.

También se realizó el conteo directo de las células bacterianas empleando un hematocitómetro o cámara de Petroff-Hausser para conocer el número de células totales independientemente si estén vivas o muertas en un volumen conocido de muestra, del cual se obtuvo  $1 \times 10^{11}$  cel/mL.

## **5.2. Biomasa no viable**

Para obtener biomasa no viable, se llevó a cabo el procedimiento anterior pero la solución bacteriana restante fue esterilizada a una temperatura de  $121^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos en una autoclave. Se verificó la no viabilidad de los organismos, realizando pruebas de sembrado en placas con agar TSA.

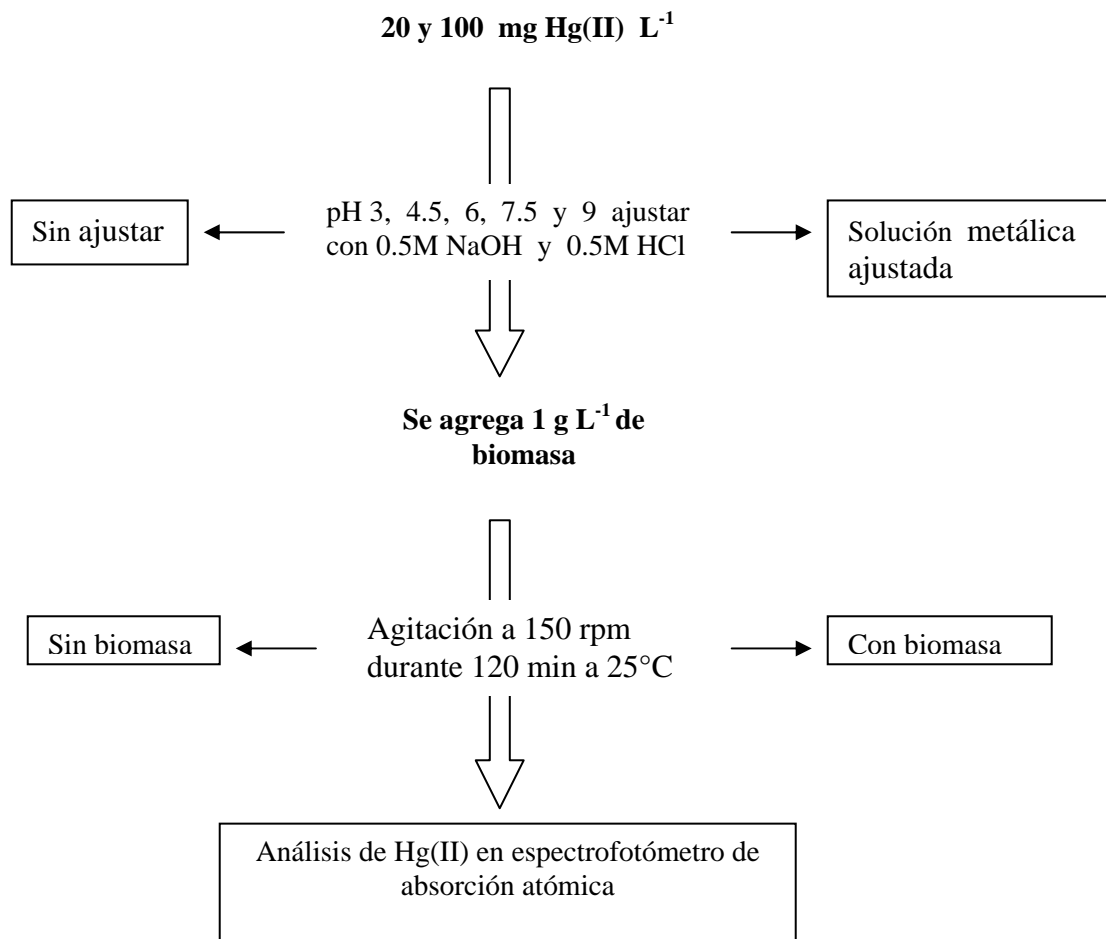
## **5.3. Sorción de Hg(II)**

La biomasa viable fue empleada directamente para los experimentos de remoción de Hg(II) de la fase acuosa. Para la preparación de soluciones de Hg(II) a diferentes concentraciones (20, 40, 60, 80 y  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ) se usó cloruro mercúrico ( $\text{HgCl}_2$ ) y agua purificada Mili-Q. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y/o cuadruplicado. Todo el material fue lavado con ácido nítrico (2 M) y clorhídrico (2 M) antes de su uso (Moody y Lindstrom, 1977).

### *5.3.1. Determinación del efecto del pH*

Para observar el efecto del pH sobre la capacidad de biosorción de Hg(II), únicamente se emplearon soluciones metálicas con concentraciones de 20 y  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , las cuales se ajustaron, mediante el uso de ácido clorhídrico 0.5 M o hidróxido de sodio 0.5 M. Las concentraciones de Hg(II) en las soluciones fueron cuantificadas antes y después de ajustar el pH, así como también en ausencia y presencia de la biomasa bacteriana. Las soluciones metálicas a las que se les agregó la biomasa fueron sometidas a una agitación de 150 rpm durante 120 min a temperatura ambiente, posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 6000 rpm por 20 min, si

el sobrenadante seguía teniendo una coloración rosada, debido a la presencia de las bacterias en suspensión, fue necesario filtrar las muestras. Finalmente las concentraciones de Hg(II) en el sobrenadante se analizaron mediante un espectrofotómetro de absorción atómica con un generador de vapor frío (Varian atomic absorption Spectrophotometer AA220) y de esta manera cuantificar la concentración no removida del Hg por la biomasa. Los experimentos se realizaron por triplicado con un volumen de la solución metálica de 25 mL y una concentración de biomasa de 1 g L<sup>-1</sup>. Terminados los experimentos se realizaron los cálculos necesarios para conocer la concentración de Hg sorbido por la biomasa bacteriana. Paralelamente, se realizaron ensayos siguiendo los mismos pasos, pero sin agregar biomasa, para cuantificar la cantidad de Hg que se puede perder por procesos diferentes a la biosorción de la bacteria (Fig. 5.2).



**Figura 5.2.** Diagrama del efecto del pH en la biosorción de Hg(II) en la bacteria.

### *5.3.2. Determinación del efecto de la temperatura*

Los experimentos para determinar la temperatura que sería utilizada en los análisis siguientes, se obtuvieron usando el valor de pH en el que hubo diferencia significativa por su mayor biosorción y eficiente, encontrado en el paso anterior, los valores para la temperatura se ajustaron entre 15°C y 45°C, con intervalos de 10°C, empleando para ello un agitador refrigerante marca Barnstead/Lab-line E-class modelo Max<sup>Q</sup> 4000. En este experimento las concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 mg L<sup>-1</sup> fueron utilizadas y una vez que las soluciones metálicas fueron ajustadas al pH óptimo encontrado, se les agregó la biomasa bacteriana y se prosiguió como en el experimento del pH para someter las muestras a una agitación de 150 rpm durante 120 min a las cuatro diferentes temperaturas, posteriormente fueron centrifugadas y filtradas hasta ser analizadas. Todos los análisis realizados se repitieron tres veces.

### *5.3.3. Determinación del efecto de la fuerza iónica*

Una vez obtenido el pH y la temperatura para la biomasa viable y no viable, se efectuaron experimentos para observar el efecto de la presencia de NaCl con concentraciones de 0.0001, 0.001 y 0.01 M NaCl para una solución metálica con concentración de 20 mg Hg (II) L<sup>-1</sup>, repitiendo los análisis para cada concentración de sal, tres veces.

## **5.4. Evaluación de la caducidad del sorbente**

La biomasa viable y no viable en solución salina al 2.5% fueron centrifugadas a 9000 rpm x 10 min a 4°C, para posteriormente agregarles un crioprotector que consistió en una solución de TSB al 15% de glicerol (Vispo et al., 2001), para poder ser almacenada a -80°C, por periodos de tiempo de 1, 3 y 6 meses en viales de plástico para analizar su capacidad de biosorción. Después de dichos periodos de tiempo se emplearon estas muestras en experimentos a pH y temperaturas óptimos y a concentraciones de 20 y 100 mg Hg(II) L<sup>-1</sup>.

### 5.5. Modelos de equilibrio para la biosorción de Hg(II)

La capacidad de sorción fue evaluada de acuerdo a los modelos de isothermas descritas por Freundlich y Langmuir (Adamson, 1976).

Para el modelo de Freundlich, la siguiente ecuación fue utilizada:

$$q = K \cdot C^{1/n} \quad \text{ó}$$
$$\log q = \log K + 1/n \cdot \log C$$

donde  $q$  (mg/g) y  $C$  (mg/mL) corresponden a los miligramos de metal (Hg) adsorbido por un gramo de biomasa bacteriana y a la concentración residual en equilibrio del metal en solución (equilibrios de concentración de solutos en fase sólida y líquida, respectivamente). La constante de Freundlich  $K$  (mg/g) y  $n$  (valor entre cero y uno) representan la capacidad de adsorción y la intensidad de adsorción del adsorbente, respectivamente.

La isoterma de Langmuir fue calculada mediante la ecuación:

$$q = q_{\max} C / (K_d + C)$$

La constante  $q_{\max}$  (mg/g) y  $K_d$  (mg/mL) son los parámetros de Langmuir. La constante  $q_{\max}$  representa la máxima capacidad de adsorción y  $K_d$  es el coeficiente de disociación del soluto-complejo adsorbente, el cual representa la afinidad entre el soluto y el adsorbente.

En este modelo se asume que (Daniels, 1984):

- (a) El adsorbato forma una capa monomolecular sobre la superficie.
- (b) Todos los sitios de la superficie son equivalentes.
- (c) No hay interacción entre las partículas adsorbidas.
- (d) Las moléculas adsorbidas no tienen movimiento sobre la superficie.



Estos modelos de isothermas descritos por Freundlich y Langmuir sirven como una herramienta práctica para los procesos de adsorción que han sido extensamente utilizadas como método de integración de datos experimentales. Debido a que son modelos básicamente empíricos, su utilidad estriba en la posibilidad de predecir fenómenos de adsorción en los sistemas estudiados.

### **5.6. Análisis estadístico de los datos**

Se calcularon medias y desviaciones estándares de los datos obtenidos del análisis de las muestras utilizando el programa Excel 2003. Para evaluar el ajuste del modelo teórico (Isothermas) a los datos experimentales se les aplicó el método de mínimos cuadrados. Los promedios de los resultados de someter a la bacteria a diferentes condiciones (pH, temperatura y salinidad) fueron analizados con una prueba de Kruskal-Wallis después de verificar que no estaban distribuidos normalmente. En los casos en que la prueba de Kruskal-Wallis indicó que había diferencias significativas entre tratamientos, se utilizó la prueba de comparaciones múltiples de Dunn. Para el análisis se utilizó el programa estadístico Sigma Stat 3.2.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSION

### 6.1. Efectos del pH en la capacidad de absorción y adsorción del sorbente

La determinación del pH óptimo para la bioabsorción del Hg(II) en la biomasa viable y no viable, se efectuó a temperatura ambiente, con una biomasa de  $1 \text{ g L}^{-1}$ , con concentraciones iniciales de 20 y 100 mg de Hg(II)  $\text{L}^{-1}$  y ajustando las soluciones a pH de 3, 4.5, 6, 7.5 y 9 con HCl y NaOH.

#### 6.1.1. Biomasa viable

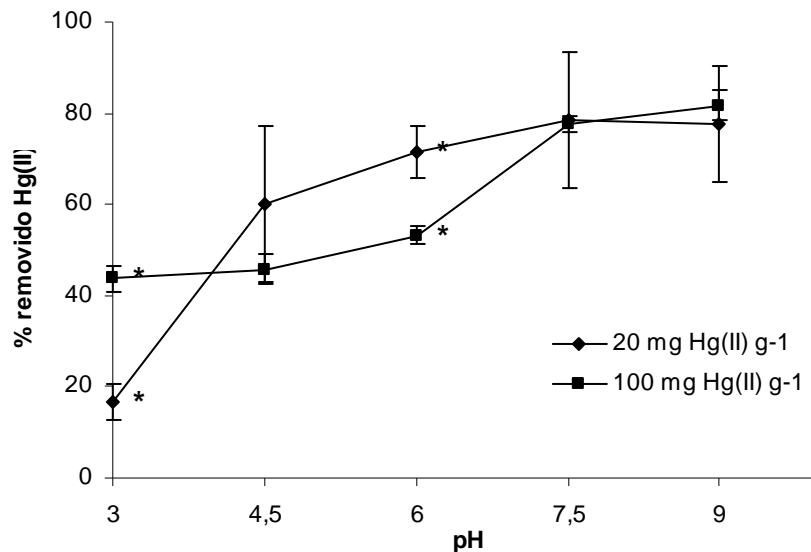
Las mayores capacidades de absorción para ambas concentraciones utilizadas se observaron a pH de 7.5 y 9 (Tabla 6.1), con valores de  $14 \pm 2.8$  y  $14.9 \pm 2.4 \text{ mg Hg g}^{-1}$  de biomasa bacteriana para la concentración de 20 mg Hg(II)  $\text{g}^{-1}$ , y  $76.20 \pm 2.9$  y  $74.9 \pm 3.7 \text{ mg Hg(II) g}^{-1}$  para la concentración de 100 mg Hg(II)  $\text{g}^{-1}$ , respectivamente.

**Tabla 6.1.** Bioabsorción de Hg(II) por bacteria viable a diferentes pH's. Datos con mismas letras no son significativamente diferentes, pruebas de Kruskal-Wallis y Dunn (para 20:  $H=9.03$ ; para 100:  $H=12.36$ ,  $n=3$ ,  $p<0.05$ ).

pH	[20] mg Hg(II) $\text{g}^{-1}$ (mg $\text{g}^{-1}$ )	[100] mg Hg(II) $\text{g}^{-1}$ (mg $\text{g}^{-1}$ )
3	$3.1 \pm 0.6^a$	$39.6 \pm 3.5^a$
4.5	$10.6 \pm 2.9^b$	$43.3 \pm 4.4^a$
6	$13.7 \pm 1.1^b$	$52.5 \pm 0.7^b$
7.5	$14.0 \pm 2.8^b$	$76.2 \pm 2.9^c$
9	$14.9 \pm 2.4^b$	$74.9 \pm 3.7^c$

En la concentración de 20 mg Hg(II)  $\text{g}^{-1}$ , la prueba de comparaciones múltiples de Dunn (Tabla 6.1) indicó que a pH 3 se presentó una disminución significativa en la

capacidad de biosorción en comparación de pH 9 al igual que los pH's de 4.5, 6 y 7.5, aunque estos se encontraron en el limite para presentar una significativa diferencia con el pH 3, el cual tuvo menor biosorción, por lo que se sugiere que a pH de 4.5 , 6, 7.5 y 9 la absorción de la bacteria es mayor (Dunn, n=3, p<0.05); esto puede ser debido a que los protones presentes en una solución con pH ácido, compiten con la carga positiva del ion metálico por los mismos sitios de enlace en la pared celular de la bacteria.



**Figura 6.1.** Porcentaje de remoción de Hg(II) por bacterias viables, a diferentes pH's para concentraciones de 20 y 100 mg Hg(II) g<sup>-1</sup> (Media y desviación estandar, n=3).  
 (\*) Presentan diferencias significativas entre las concentraciones para los mismos pH's.

Al aumentar la concentración inicial de Hg(II) en los experimentos, la prueba de Kruskal-Wallis indicó diferencias significativas en la capacidad de adsorción de la bacteria entre los diferentes pH's (H=12.36, P<0.05). La prueba de comparaciones múltiples de Dunn indicó que los pH de 3 y 4.5 la adsorción de la bacteria es significativamente menor que pH's de 7.5 y 9. En ambas concentraciones de las soluciones, la mayor absorción se obtenía a pH altos, alrededor del 7.5.

Por otro lado, se realizó una prueba de Mann-Whitney ( $n=3$ ,  $p<0.05$ ) para ver, en términos de porcentaje, si existían diferencias entre las concentraciones iniciales en la biosorción el Hg(II) para los diferentes pH's, obteniendo que los pH's 3 y 6 presentaron diferencia significativa ente las concentraciones de 20 y 100 mg Hg(II)  $g^{-1}$  (Fig. 6.1).

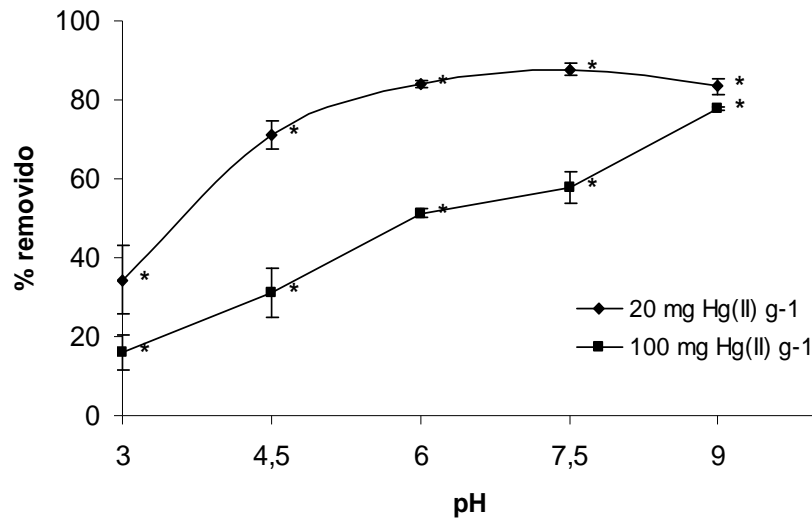
### 6.1.2. Biomasa no viable

Para la biomasa no viable también se aplicó la prueba de Kruskal-Wallis, la cual indicó diferencias significativas en la capacidad de adsorción para las concentraciones iniciales de 20 ( $H=10.83$ ,  $n=4$ ,  $P<0.05$ ) y 100mg Hg(II)  $g^{-1}$  ( $H=12.43$ ,  $n=4$ ,  $P<0.05$ ) entre los diferentes pH's. En la concentración inicial de 20 mg Hg(II)  $g^{-1}$  se obtuvo significativamente una mayor adsorción de Hg(II) a pH de 4.5, 6, 7.5 y 9 que a pH de 3 de acuerdo con el método de Dunn ( $n=4$ ,  $p<0.05$ ), mientras que para la concentración de 100 mg Hg(II)  $g^{-1}$ , se indicó que pH 3 la capacidad de adsorción es significativamente menor que pH 7.5 y 9 (Dunn,  $n=4$ ,  $p<0.05$ ). En la Tabla 6.2 se muestran los resultados de la absorción de las bacterias no viables para las dos diferentes concentraciones.

**Tabla 6.2.** Bioadsorción de Hg(II) por bacteria no viable a diferentes pH's. Datos con mismas letras no son significativamente diferentes, prueba de Dunn (para 20:  $H=10.83$  y para 100:  $H=12.43$ ,  $n = 4$ ,  $p<0.05$ ).

pH	[20] mg Hg (II) $g^{-1}$ (mg $g^{-1}$ )	[100] mg Hg(II) $g^{-1}$ (mg $g^{-1}$ )
3	$6.5 \pm 1.9^a$	$15.8 \pm 4.4^a$
4.5	$12.2 \pm 1.3^b$	$32.4 \pm 4.8^b$
6	$14.9 \pm 0.6^b$	$51.0 \pm 3.0^c$
7.5	$13.2 \pm 1.8^b$	$61.5 \pm 4.4^{cd}$
9	$14.9 \pm 0.4^b$	$69.9 \pm 5.3^d$

Se realizó también la prueba de Mann-Whitney ( $n=4$ ,  $p<0.05$ ), para saber si existe una diferencia significativa entre las concentraciones de 20 y 100 mg Hg(II)  $g^{-1}$  en términos de porcentaje para los distintos pH's, obteniendo para todos los pH's diferencia significativa entre las concentraciones iniciales (Fig. 6.2).



**Figura 6.2.** Porcentaje de remoción de Hg(II) por bacterias no viables, a los diferentes pH's para concentraciones de 20 y 100 mg Hg(II)  $g^{-1}$  (Media y desviación estandar,  $n=3$ ).

(\*) Presentan diferencias significativas entre las concentraciones para los mismos pH's.

Resultados semejantes fueron obtenidos por Zouboulis y Matis (1995), los cuales encontraron que la capacidad de absorción de Cd por *Actinomyces* AK61 y JL322 se vió aumentada a medida que se incrementaba el pH, ya que al haber una menor concentración de  $H^+$ , la competencia por los sitios de enlace disminuyó. Además, estos autores sugieren que valores altos de pH puedan resultar en un transporte más accesible del catión metálico hacia el interior de la célula, siendo más fácil la bioacumulación. Según Fourest y Roux (1992) y Guibal et al., (1992) concuerdan en que el incremento en niveles de bioabsorción que se observa con el incremento del pH, puede ser explicado por la fuerte relación con el número de sitios de carga negativa en la superficie de la célula, el cual depende de la disociación de los grupos funcionales

(fosforilo, carboxilo, sulfhidrilo e hidroxilo de proteínas y lípidos de la membrana y componentes de la pared celular tales como peptidoglucano, entre otros). La baja cantidad de ion metálico retenido por el bioabsorbente a pH por debajo de 4 puede ser explicada debido a que gran cantidad de grupos funcionales son disociados sólo a valores de pH neutro.

De acuerdo a Crist et al. (1994) y a Schiewer y Volesky (1996), un incremento en el pH resulta en un aumento en la carga negativa de la superficie de las células pues los grupos funcionales son desprotonados, lo que favorece la atracción electrostática de los cationes. El aumento en la bioabsorción de los metales con el incremento del pH puede ser el resultado de una competencia más eficiente de los cationes contra los protones por los sitios de bioabsorción en la bacteria. Es importante también resaltar algunas observaciones importantes del pH, mencionadas por Kefala et al. (1999), quién informó, que a valores de pH por encima de 7.5, casi el 100% de la concentración inicial de Cd había sido removido, utilizando bacterias. Estas observaciones fueron dadas a conocer por otros autores que trabajaron con diferentes tipos de biomasa tales como un hongo por Fourest y Roux (1992) y levaduras por Brady et al. (1994). Sin embargo, algunas investigaciones demuestran que no es factible utilizar valores de pH por arriba de 9, en concentraciones de Cd en un intervalo aproximadamente de 10-150 mg L<sup>-1</sup>, ya que el metal se precipita, interfiriendo y siendo indistinguible la bioacumulación del metal en la bacteria (Kefala et al., 1999).

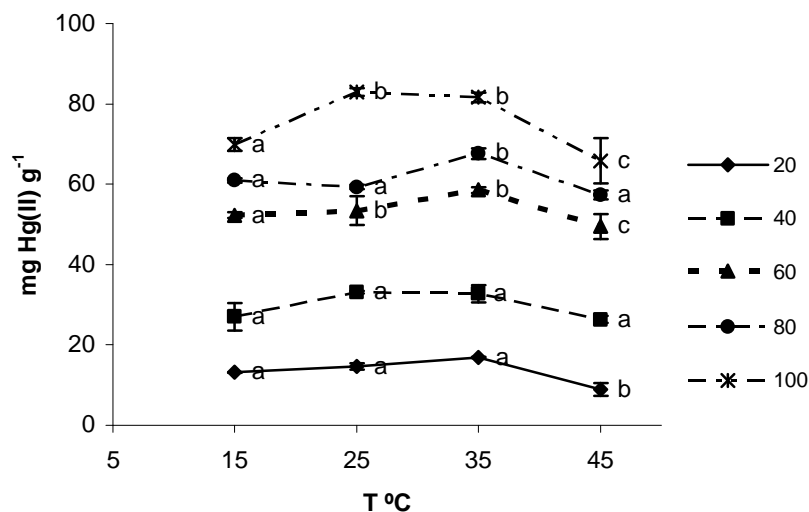
Los análisis estadísticos realizados en la biosorción de Hg(II) por la bacteria viable y no viable y utilizando concentraciones de 20 y 100 mg Hg(II) g<sup>-1</sup>, muestran que, para la menor concentración del ion metal, los pH's a los cuales se obtuvieron la mayor capacidad de biosorción fueron de 4.5, 6, 7.5 y 9 para ambas bacterias, teniendo una diferencia significativa con el pH 3. Al aumentar la concentración del ion metal, se encontró que, para la bacteria viable los pH's en los cuales absorbía mejor el Hg(II) fueron de 7.5 y 9, encontrándose diferencias significativas con los pH's 3, 4.5 y 6; mientras que para la bacteria no viable los pH's en los que se obtuvo mayor adsorción fueron de 6, 7.5 y 9. De acuerdo a las pruebas estadísticas realizadas, los pH's en los

cuales se obtuvo una mayor biosorción de Hg(II) por la bacteria tanto viable como no viable fueron similares, aunque al aumentar la concentración para las bacterias viables se encontró una significativa diferencia en su capacidad de absorción entre los pH's 7.5 y 9 con 3, 4.5 y 6; esta es una de las razones por la cual se tomó el pH de 7.5 para realizar los experimentos posteriores, además de resultar económico a gran escala y ser un pH óptimo para la bacteria.

## 6.2. Efecto de la temperatura en la capacidad de bioabsorción del absorbente

### 6.2.1. Biomasa Viable

Se realizó la prueba de Kruskal-wallis para las concentraciones de 20, 40, 60, 80 y 100 mg Hg(II) g<sup>-1</sup> (H=6.28, H=2.28, H=8.23, H=6.28, H=9.6, respectivamente; n=3, p<0.05), la cual indicó diferencias significativas en la capacidad de adsorción de las bacterias entre las temperatura de 15°, 25°, 35° y 45°C. Posteriormente se realizó el método de Dunn para ver si existía diferencia entre cada una de las temperatura a las diferentes concentraciones, indicando que las temperaturas de 25° y 35°C presentaron una absorción significativamente mayor que las temperaturas de 15 y 45°C (Fig. 6.3).



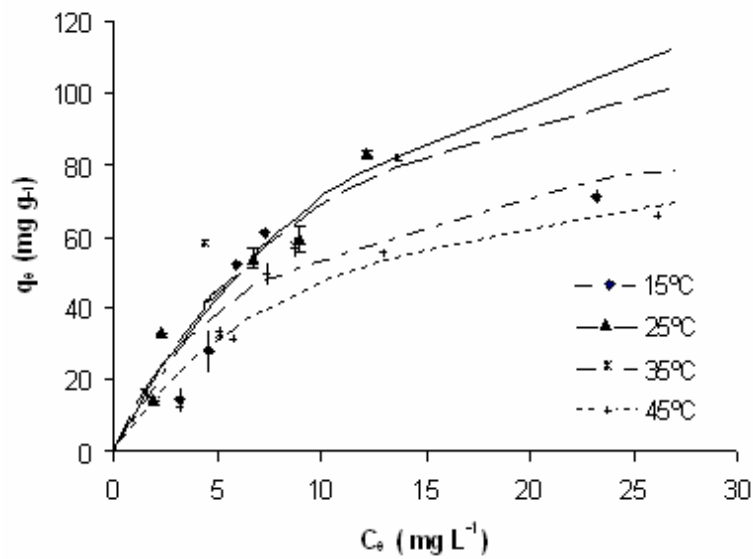
**Figura 6.3.** Bioabsorción de Hg(II) por las bacterias viables a diferentes temperaturas y concentraciones iniciales (mg Hg(II) g<sup>-1</sup>). Datos con mismas letras no son significativamente diferentes para una misma concentración, prueba de Dunn (n = 3, p<0.05).

La isoterma de Langmuir fue la que mejor se ajustó a los datos experimentales. En la Tabla 6.3 se muestran la máxima capacidad de biosorción ( $q_{max}$ ) y la constante de Langmuir ( $K_d$ ) para las diferentes temperaturas y el gráfico (Fig. 6.4) muestra las isotermas para cada una de las temperaturas de acuerdo al método de mínimos cuadrados. Las  $q_{max}$  obtenidas fueron sometidas a la prueba de Dunn ( $n=3$ ,  $p<0.05$ ), encontrando que no existía una diferencia significativa entre las máximas capacidades de absorción para las diferentes temperaturas y de acuerdo Wang (2002) el cual menciona que el proceso de bioabsorción no es operado usualmente a alta temperatura porque se incrementa el costo de producción; es por eso que el proceso de biosorción puede ser realizado a temperatura de 25°C (Fig. 6.5).

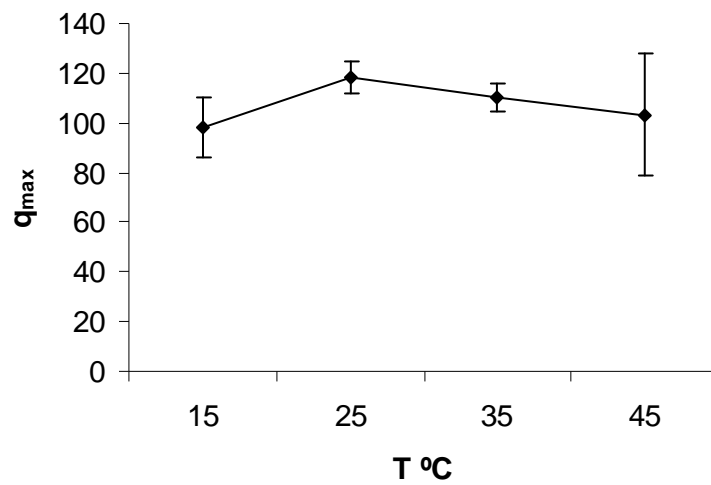
**Tabla 6.3.** Constantes de Langmuir obtenidas mediante el método de mínimos cuadrados y regresión lineal para la bioabsorción de Hg(II) por las bacterias viables a diferentes temperaturas. Letras diferentes indican diferencias significativas, prueba de Dunn ( $n=3$ ,  $p<0.05$ ).

Temp. °C	Programación no lineal		Regresión lineal	
	$q_{max}$ (mg/g)	$K_d$	$q_{max}$ (mg/g)	$K_d$
15	98 <sup>a</sup> ± 12	7.7 ± 1.7	118 ± 8.06	15.08 ± 2.91
25	117 <sup>a</sup> ± 6.4	7.5 ± 2.1	152 ± 10.59	14.13 ± 6.57
35	110 <sup>a</sup> ± 5.9	6.7 ± 0.3	129 ± 21.04	9.85 ± 1.67
45	103.3 <sup>a</sup> ± 24	11.5 ± 4.7	153 ± 80.47	24.97 ± 17





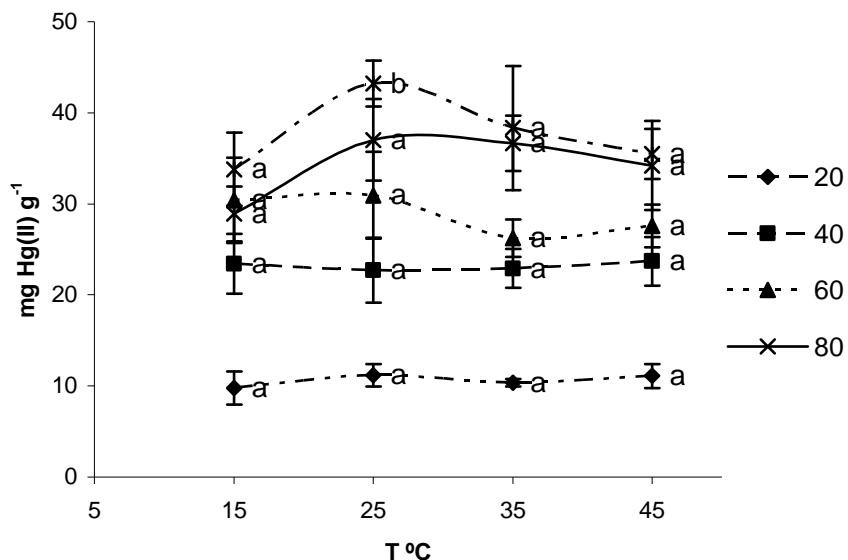
**Figura 6.4.** Efecto de la temperatura en la bioabsorción de Hg(II) por las bacterias viables. Las líneas describen el modelo de la isoterma de Langmuir.



**Figura 6.5.** Capacidad de bioabsorción máxima de Hg(II) por la biomasa viable con respecto a la temperatura. Biomasa de 1 g L<sup>-1</sup> y pH 7.5.

### 6.2.2. Biomasa no viable

La capacidad de adsorción de la bacteria no viable de acuerdo a la prueba de Dunn, no tuvo diferencia significativa para las cuatro primeras concentraciones de mercurio (Fig. 6.6), solamente a temperatura de 25°C en la concentración de 100 mg Hg(II) g<sup>-1</sup> si mostró una diferencia significativa con el resto de las temperaturas. La isoterma de Langmuir fue la que mejor se ajustó a los datos experimentales. En la Tabla 6.4 se muestra la máxima capacidad de bioadsorción ( $q_{max}$ ) para las cuatro diferentes temperaturas y el gráfico (Fig. 6.7) muestra las isotermas para cada una de las temperaturas según el método de mínimos cuadrados.

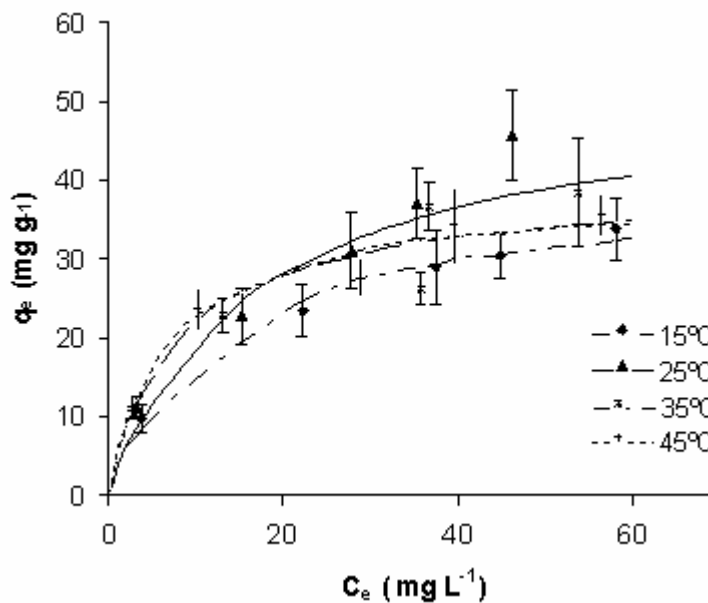


**Figura 6.6** Bioadsorción de Hg(II) por las bacterias no viables a diferentes temperaturas y concentraciones iniciales (mg Hg(II) g<sup>-1</sup>). Datos con mismas letras no son significativamente diferentes para una misma concentración, prueba de Dunn (n=4, p<0.05).

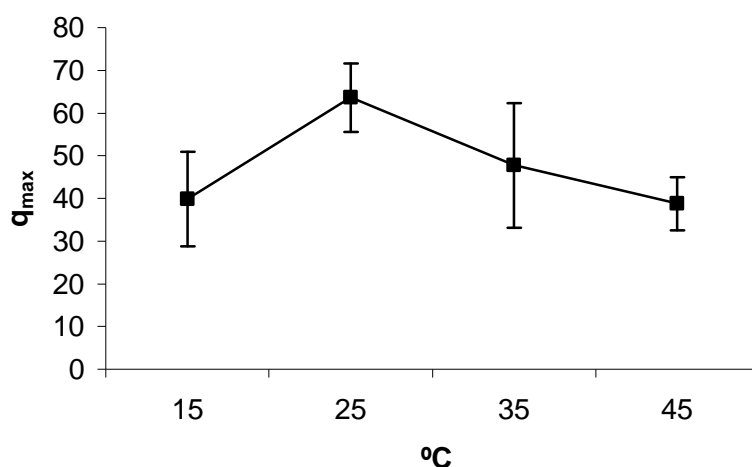
Las líneas de la Fig. 6.7 describen el modelo de la isoterma de Langmuir (15, 25, 35 y 45°C). Al analizar las capacidades máximas de adsorción de las diferentes temperaturas (Dunn, n=4, p< 0.05) se encontró un efecto significativo entre 25°C y 35°C con 15 y 45°C, ya que a 25°C y 35°C presentaban una mayor biosorción.

**Tabla 6.4.** Constantes de Langmuir obtenidas mediante el método de mínimos cuadrados y regresión lineal para la bioadsorción de Hg(II) por la biomasa no viable a diferentes temperaturas. Datos con mismas letras no son significativamente diferentes, prueba de Kruskal-wallis y Dunn (n=4, p<0.05).

Temp. °C	Programación no lineal		Regresión lineal	
	$q_{\max}$ (L mg <sup>-1</sup> )	$K_d$ (mg Hg g <sup>-1</sup> )	$q_{\max}$ (L mg <sup>-1</sup> )	$K_d$ (mg Hg g <sup>-1</sup> )
15	39.9 <sup>a</sup> ± 11.2	7 ± 1.3	37.1 ± 7.4	11.8 ± 9.0
25	63.63 <sup>b</sup> ± 8.02	16.3 ± 2.9	58.1 ± 11.3	20.0 ± 7.7
35	47.7 <sup>b</sup> ± 14.5	16.5 ± 2.5	41.8 ± 6.1	11.0 ± 5.7
45	38.7 <sup>a</sup> ± 6.3	7.6 ± 1.3	39.2 ± 5.6	8.2 ± 5.8



**Figura 6.7** Efecto de la temperatura en la bioadsorción de Hg(II) por las bacterias no viables, isoterma de Langmuir.



**Figura 6.8.** Capacidad de bioadsorción máxima de Hg(II) por la biomasa no viable con respecto a la temperatura. Biomasa de 1 g L<sup>-1</sup>, pH 7.5.

Esto mismo encontraron Wang y Chen (2006) al llevar a cabo el proceso de adsorción en un intervalo de 15-40°C, donde la máxima capacidad de biosorción en equilibrio para Pb(II), Ni(II) y Cr(VI) por la levadura inactiva *Saccharomyces cerevisiae* fue de 25°C, la capacidad decrece cuando la temperatura aumenta de 25 a 40°C por lo que consideran que el proceso de bioadsorción es exotérmico. Así mismo Kapoor y Viraraghavan (1997) mencionan que la adsorción es generalmente una reacción exotérmica y la remoción de contaminantes por el proceso de adsorción decrece con el incremento de la temperatura. Sin embargo Goyal et al. (2003) encontraron que la biosorción de Cr(VI) por *S. cerevisiae* se incrementaba al aumentar la temperatura en el intervalo de 24 a 45°C. Ellos explican que altas temperaturas podrían llevar a una alta afinidad de los sitios donde se enlaza el metal; pero cuando la temperatura es demasiado alta, disminuye la capacidad de biosorción debido a distorsión de algunos sitios de la superficie de la célula disponible para la biosorción del metal.

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 la Tabla 6.5 se muestra el resultado de varios trabajos de biosorción de Hg (II) por organismo.

**Tabla 6.5.** Biosorción de Hg(II) por diferentes microorganismos.

<b>Microorganismo</b>	<b>Biosorción <math>q_{max}</math> <math>mg\ g^{-1}</math></b>	<b>pH</b>	<b>Referencias</b>
E. coli inactiva	17.6	nd	Chen y Wilson (1997)
<i>Rhizopus arrhizus</i> y <i>E. coli</i>	71 y 17.6	nd	Özer et al. (1997)
<i>Phanerochate chryosporium</i>	61	7	Saglam et al. (1999)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	64.2	nd	Al- Saraj et al. (1999)
Hongo <i>Pleurotus sapidus</i> vivo e inactivado	207.89	6	Yalcinkaya Y., et al. (2002)
Hongo <i>Phanerochate chryosporium</i> viva	83.10 102.15	6	Saglam et al. (2002)
<i>P. chryosporium</i> no viable			
<i>Phanerochate chryosporium</i> viva	84.4	6	Kaçar et al. (2002)
<i>P. chryosporium</i> no viable	172.1		
Planta acuática <i>Potamogeton natans</i>	180	9-10	Leacher y Smith (2002)
Amina Chitosan	815		Babel y Kurniawan (2003)
Alga verde <i>Ulva lactuca</i> no viable	149.25	7	Zeroual et al. (2003)
<i>Cystoseira baccata</i>	178 329	4.5 6	Herrero et al. (2005)
<i>Bacillus jeotgali</i>	7.94	4.5 – 6	Green- Ruiz (2005)
<i>Bacillus jeotgali</i> viable	117± 6.4	7.5	En este estudio
<i>Bacillus jeotgali</i> no viable	52.8± 4.6		

### **6.3. Efectos de la concentración inicial en la capacidad de biosorción del adsorbente**

#### *6.3.1. Biomasa viable y no viable*

La capacidad de biosorción del Hg(II) por la bacteria viable se incrementó a medida que aumentó la concentración inicial del metal. Mientras que las células no viables indican un incremento gradual de biosorción arriba de la concentración de 40 mg Hg(II) g<sup>-1</sup>.

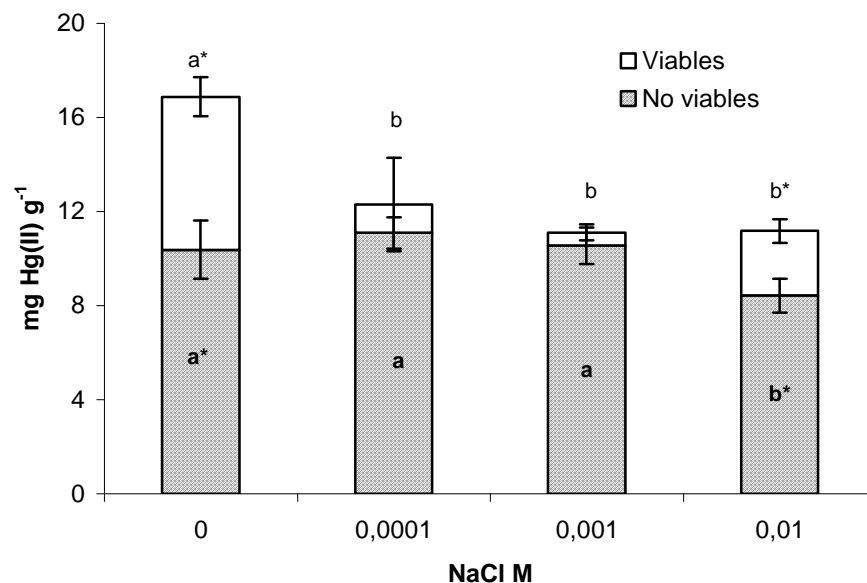
Al aumentar la concentración de Hg(II) en las soluciones, aumenta la capacidad de biosorción de la biomasa (Fig. 6.4 y 6.7), disminuyendo su eficiencia en términos de porcentaje. Además, se realizaron análisis estadísticos a los datos obtenidos y se encontró que existe diferencia significativa en la biosorción de Hg(II) por la bacteria viable y no viable en las cinco diferentes concentraciones. Este incremento en la capacidad de absorción de las biomásas con el incremento de la concentración metálica puede ser atribuido a una alta probabilidad de interacción entre los iones metálicos y el biosorbente.

Saglam (2002) menciona que generalmente la biosorción de los iones de metales pesados por microorganismos ocurre en dos etapas: (1) la rápida adsorción inicial debido a la adsorción en la pared celular y (2) por una subsecuente absorción lenta debido al transporte del ion metálico al citoplasma de la célula. La pared celular de muchos microorganismos consiste en polisacáridos, proteínas y lípidos y por lo tanto se tienen suficientes grupos funcionales capaces de enlazar a los metales pesados. Varios estudios muestran que a baja concentración del ion metálico, la masa del ion metálico acumulado por unidad de masa celular es directamente proporcional a la concentración del ión en solución (Ting y Lawson, 1991).

#### 6.4. Fuerza Iónica

Se realizó un experimento para analizar el efecto que tenía la fuerza iónica en la solución de mercurio, con concentraciones representativas de las condiciones de los experimentos al ajustar el pH (0.01, 0.001 y 0.0001 M NaCl) utilizando la concentración de 20 mg Hg(II) L<sup>-1</sup>, agregando 1g L<sup>-1</sup> de biomasa viable y no viable, a pH de 7.5 y temperatura de 25°C.

En las bacterias viables no existe diferencia significativa en la capacidad de bioabsorción entre los diferentes intervalos de concentración de NaCl aunque en ausencia de la sal se observó una biosorción significativamente mayor (Dunn, n=4, p <0.05). En las bacterias no viables se presentó una diferencia solamente en la concentración más alta (0.01M de NaCl).



**Figura 6.9.** Efecto de la fuerza iónica a pH de 7.5, con 1 g L<sup>-1</sup>, para la biomasa viable y no viable. Datos con mismas letras entre las fuerzas iónicas para la bacteria viable y no viable no son significativamente diferentes, prueba de Dunn, (n=3, p<0.05). (\*) Presentan diferencias significativas entre la bacteria viable y no viable para la misma fuerza iónica.

Una vez que se encontró una diferencia en la adsorción de Hg(II) por las bacterias no viables, se realizaron cálculos para determinar la cantidad de Na y Cl

presentes en la concentración inicial. Los cálculos para el contenido de Na fueron realizados tomando en cuenta los ml agregados de NaOH al ser ajustada la solución metálica a un pH de 7.5, mientras que la concentración de Cl se obtuvo, calculando los moles de  $\text{Cl}_2$  presentes en  $\text{HgCl}_2$  y multiplicar por dos para calcular los Cl (Tabla 6.6).

**Tabla 6.6.** Concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  de las soluciones iniciales, a pH 7.5.

[ ] de la solución	[ Na]	[Cl]
20 mg Hg(II) $\text{L}^{-1}$	$2.25 \times 10^{-4} \text{ M}$	$2 \times 10^{-4} \text{ M}$

Las concentraciones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  presentes en la solución de 20 mg Hg(II)  $\text{g}^{-1}$  se encontraron por debajo de 0.001 M; por lo cual, al hacer los comparativos se observa que no hay una diferencia significativa entre estas dos concentraciones de NaCl a diferencia de la 0.01M NaCl, por lo cual se puede decir que entre esos intervalos de concentración de NaCl no tiene un efecto considerable el proceso de absorción. Schiewer y Volesky (1997), afirman que aunque no se considera que el  $\text{Na}^+$  (componente mayoritario del agua de mar) pueda formar enlaces covalentes coordinados fuertes, si puede ser atraído electrostáticamente hacia la biomasa cargada negativamente.

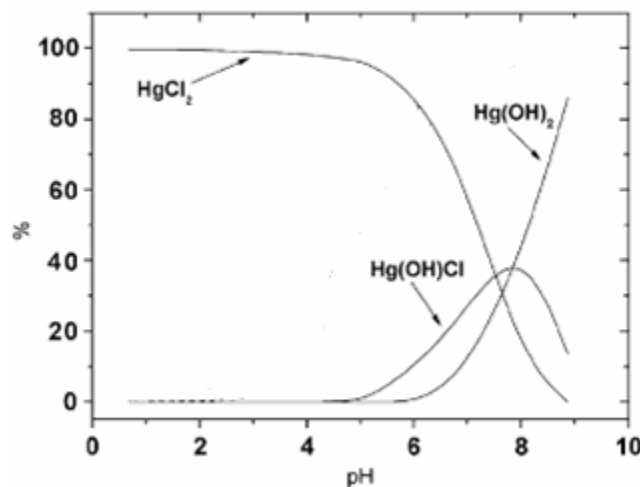
En la literatura se indica a menudo que los iones libres de metales, tales como sodio o potasio, compiten con los cationes divalentes para el enlace electrostático con la biomasa; por lo tanto, si un mecanismo similar estuvo implicado en el estudio, la biosorción del mercurio va a disminuir mientras que la concentración de ión metal libre aumentará (Schiewer y Wong, 2000).

El estudio de la influencia de la salinidad en la capacidad de absorción del Hg(II) por una alga (*Cystoseira baccata*) analizada por Herrero et al. (2005) exhibe dos efectos opuestos dependiendo del electrolito adicionado: (1) un incremento en la concentración de sales de nitrato ( $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ) causaba una gran biosorción de mercurio, desde 5% hasta un 12-15%, variando la concentración de la sal de 0.01 a 1 M, respectivamente. Por lo contrario, la adición de NaCl disminuía la biosorción, en la



cual altas concentraciones de NaCl 1 M puede disminuir un 80% la capacidad de biosorción del alga; mientras que, bajos valores de salinidad 0.01M tienen poca influencia en la bioabsorción del metal. Este trabajo concluye que el principal efecto en la capacidad de biosorción del mercurio por el alga es causado por el anión de la sal, y no por el sodio presente. La especiación del mercurio puede ser altamente afectada por la presencia de iones cloro, los cuales inducen la formación de complejos  $\text{HgCl}_3^-$  y  $\text{HgCl}_4^{2-}$  provocando una disminución en la capacidad de absorción en la pared celular (Herrero et al., 2005).

La especiación química de los metales pesados es también importante, ya que ésta no es igual cuando los metales se encuentran en agua dulce que en agua de mar (Pivovarov, 2003). En la Figura 6.11 se muestra las diferentes especies químicas de Hg(II) en fase acuosa, de acuerdo con Herrero et al. (2005), quienes utilizaron el programa MINEQL+ para realizar los cálculos de las diferentes especies, considerando que sus experimentos se realizaron a una salinidad de cero (agua dulce) y a una concentración inicial de  $500 \text{ mg Hg(II) L}^{-1}$  con una biomasa de  $2.5 \text{ g L}^{-1}$ . Los experimentos de esta tesis se realizaron en condiciones muy similares a las de Herrero et al. (2005), por lo que las especies químicas formadas se podría decir que son similares a las presentadas en la figura 6.11.

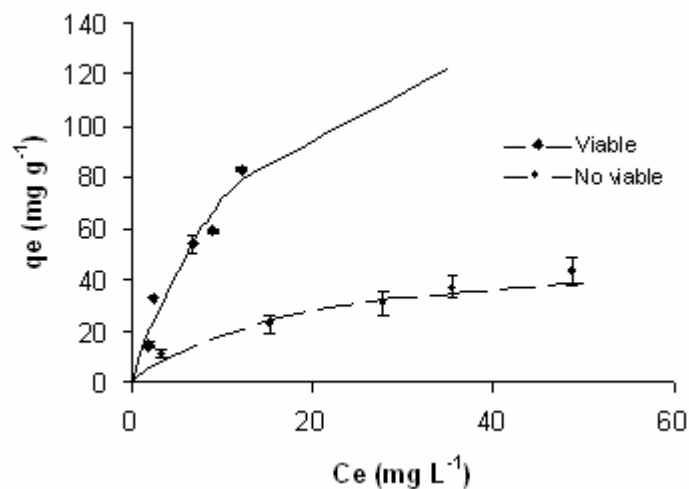


**Figura. 6.10.** Especiación inorgánica de mercurio en fase acuosa, calculada por MINEQL (Herrero et al. 2005)

Los resultados de estos análisis no pueden ser comparados directamente, ya que algunos parámetros utilizados no son iguales que los manejados en otras investigaciones como son, el biosorbente, la cantidad de biomasa, la concentración de la sal, entre otras.

### 6.5. Comparación de la $q_{max}$ entre bacterias viables y no viables

En los experimentos realizados se concluyó que las bacterias viables absorbieron mayor cantidad de Hg(II) en comparación de las bacterias no viables (Mann-Whitney,  $n=3$ ,  $p<0.05$ , Fig. 6.12), esto mismo observó Ozturk et al. (2004) al estudiar la capacidad de biosorción de Cu(II) y Zn(II) por células vivas y muertas, encontrando que la biosorción por células vivas se ve incrementada rápidamente cuando la concentración inicial del metal se incrementa, mientras que las células muertas indican un incremento gradual en la bioadsorción de estos elementos. Por lo que encontraron que la capacidad de biosorción de las células vivas para ambos metales fue significativamente mayor en comparación con las células muertas para todas las concentraciones metálicas.



**Figura 6.11.** Capacidad de bioadsorción de la bacteria viable y no viable, en condiciones probadas ( $25^{\circ}\text{C}$ , a pH de 7.5, a las cinco diferentes concentraciones y agregando  $1\text{g L}^{-1}$  de biomasa).

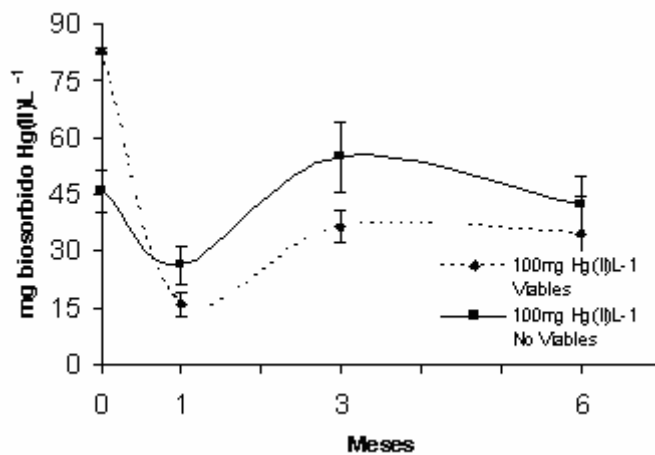
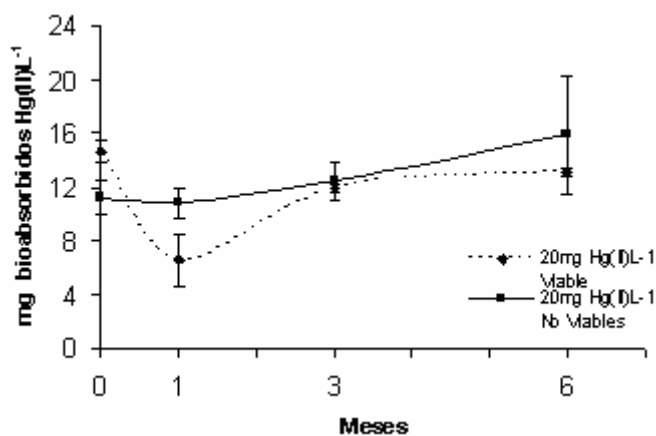
Chen et al. (2005) realizó experimentos con la bacteria *Pseudomona aueruginosa* viable y no viable para la biosorción de Cu(II), encontrando que la capacidad de absorción por las células vivas era aparentemente más alta que las células no viables, estos mismos resultados fueron encontrados en esta investigación con la cepa U3 de *Bacillus jeotgali* y, de acuerdo a este autor, estos resultados pueden ser atribuidos a la acumulación intracelular del ion metálico en las células vivas, resultando en un aumento en la capacidad de absorción. La otra posibilidad es que el paso de la esterilización en el autoclave de las bacterias pudo destruir o perder algunos sitios de adsorción al metal, resultando en la disminución de la capacidad de sorción de las células no viables.

#### **6.6. Tiempo de caducidad del biosorbente**

Como una alternativa para la conservación del biosorbente se liofilizó cierta cantidad de biomasa, ya liofilizada se resuspendió en agua destilada, se llevaron a cabo diluciones seriadas para realizar el conteo total viable y conteo directo en el cual se obtuvo  $10^4$  UFC/ml y  $1.5 \times 10^{10}$  cel ml<sup>-1</sup>, respectivamente; notándose una gran diferencia entre células viables y totales por lo que se piensa que están inactivadas o no viables. También se puso en conservación la bacteria utilizando el método de ultra congelación. Las bacterias fueron almacenadas a -80°C durante 1 mes y se llevaron a cabo diluciones seriadas para la realización del conteo total viable resultando  $3 \times 10^6$  UFC ml<sup>-1</sup>, encontrando que existía una mayor sobre vivencia para la bacteria ultracongelada con un mes de almacenada que las liofilizadas (con la ayuda del conteo total viable). Se realizó la conservación de las bacterias por el método de ultracongelación a una temperatura de -80°C durante 1, 3 y 6 meses y los análisis fueron realizados al pH y temperatura donde se observó obtuvo una mayor capacidad de biosorción encontrados en los experimentos anteriores y agregando  $1\text{g L}^{-1}$  de biomasa.

**Tabla 6.7.** Bioabsorción de Hg(II) por bacterias viables y no viables, almacenadas y recientes.

[mg g <sup>-1</sup> ] <sub>i</sub>	Meses							
	0		1		3		6	
	Viable	No viable	Viable	No viable	Viable	No viable	Viable	No viable
<b>20</b>	14.7± 0.8	11.2±1.2	6.5 ± 2.0	10.8±1.0	11.9 ± 0.3	12.41±1.4	12.7±0.8	15.84±4.4
<b>100</b>	82.9±0.9	45.7±5.7	19.5±7.6	26.3±4.7	38.4±1.3	54.81±6.3	34.6±9.9	42.3±7.6



**Figura 6.12.** Capacidad de biosorción de bacteria viable y no viable a concentraciones de 20 y 100 mg Hg(II) g<sup>-1</sup> para 0, 1, 3 y 6 meses almacenadas a -80°C.

Los resultados obtenidos por las pseudos-réplicas en la biosorción por la biomasa almacenada (1, 3 y 6 meses) con la biomasa reciente a pH de 7.5 y temperatura de 25°C para la concentración de 20 mg Hg(II) g<sup>-1</sup>, las células vivas conservadas durante 1 mes tuvieron una biosorción menor que aquellas obtenidas recientemente y almacenadas durante 3 y 6 meses, mientras que las células no viables no mostraron diferencias con las células recientes y almacenadas. Al aumentar la concentración de mercurio a 100 mg Hg(II) g<sup>-1</sup>, en las bacterias viables se presentó una diferencia entra la biosorción de las bacterias recientes con las bacterias almacenadas 1, 3 y 6 meses, y para las bacterias no viables almacenadas no se observa diferencia de biosorción entra las bacteria recientes y almacenadas. Las pruebas anteriores se realizaron por cuadruplicado, sin embargo debido a que solo se almacenó un pelet de biomasa para cada periodo, no se pudo realizar análisis estadístico.

## 7. CONCLUSIONES

El comportamiento de biosorción de Hg(II) por células viables y no viables de *Bacillus jeotgali* cepa U3 en solución acuosa fue investigado bajo diferentes condiciones haciendo variar el pH, temperatura, concentración inicial y fuerza iónica, además de analizar la capacidad de sorción de ambas bacterias al ser ultracongeladas durante diferentes tiempos, encontrando que:

- (1) El proceso de biosorción de Hg(II) por *Bacillus jeotgali* cepa U3 fue dependiente del valor al que se realizaron los experimentos, mostrando que existe una mayor biosorción a pH's por arriba de 6.
- (2) La variación de temperatura en un intervalo entre 15 y 45°C indicó dependencia del proceso de biosorción a temperatura de 25° y 35°C, por lo que se tomó la temperatura de 25°C para continuar con los experimentos, además de presentar a gran escala un proceso económico.
- (3) Los datos experimentales obtenidos para la biosorción de Hg(II) se ajustaron mejor al modelo de Langmuir que al de Freundlich.
- (4) De acuerdo con el método mencionado, la máxima capacidad de biosorción de bacterias viables ( $117 \pm 6.4 \text{ mg g}^{-1}$ ) a temperatura probada fue significativamente mayor que la correspondiente a las bacterias no viables ( $52.8 \pm 4.6 \text{ mg g}^{-1}$ ).
- (5) El porcentaje de biosorción de 20 y 100 mg Hg(II)  $\text{g}^{-1}$  a condiciones probadas para células viables fueron de 88.6% y 87.2% y para las células no viables fueron de 77.0% y 49.7%, respectivamente.
- (6) La presencia de NaCl en las soluciones experimentales mostró un efecto inhibitorio de la capacidad de biosorción de Hg(II), solamente en el caso de biomasa no viable a alta concentración del electrolito (0.01M).
- (7) El almacenamiento de la biomasa tanto viable como no viable por periodos mayores a 1 mes, presentó una tendencia a disminuir la capacidad de biosorción de la bacteria.

Con base en las aseveraciones anteriores se concluye que la biomasa viable de *B. jeotgali* cepa U3 funcionó como mejor sorbente que la biomasa no viable.

## 8. LITERATURA CITADA

- Ajmal, M., Rafaqat, A.K. and Bilquees, A.S. 1996. Studies on removal and recovery of Cr (VI) from electroplating wastes. *Water Research* 30:1478-1482.
- Aksu Z., Acikel U. 2000. Modelling of a single-staged bio-separation process for simultaneous removal of iron (III) and chromium (VI) by using *chlorella vulgaris*. *Biochemical Engineering Journal* 4: 229-238.
- Aller A.J., Lumbreras J.M., Robles L.C., Fernandez G.M. 1996. Stability of bacterium-mercury complexes and speciation of soluble inorganic mercury species. *Analytical chemistry* 330: 89-105.
- Al-Garni S.M. 2005. Biosorption of lead by Gram-ve capsulated and non-capsulated bacteria. Biological Sciences Department, Faculty of Science, King Abdulaziz University.
- Al-Saraj M., Adbel-Latif M., El-Nahal I., Baraka R., 1999. Bioaccumulation of some hazardous metals by sol-gel entrapped microorganisms. *Journal of Non-Crystalline Solids* 248: 137-140.
- Ankley G.T., Toro D.M., Hansen D.J., Berry W.J. 1996. Technical basis and proposal for deriving sediment quality criteria for metals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15: 2056–2066.
- Babel, Kurniawan, 2003. Low-cost adsorbents for heavy metals uptake from contaminated water: a review. *Journal of Hazardous Materials* 97: 219-243.
- Bae W., Wu C.H., Kostal J., Mulchandani A. y Chen W. 2003. Enhanced Mercury Biosorption by Bacterial Cells with Surface-Displayed MerR. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3176-3180.
- Bai R., Abrham T. 2002. Studies on enhancement of Cr (VI) biosorption by chemically modified biomass of *Rhizopus nigricans*. *Water Research* 36: 1224-1236.
- Beveridge T.J., 1989. Role of cellular design in bacterial metal accumulation and mineralization. *Annual Review of Microbiology* 43: 147-171.
- Beveridge T.J., Forsberg C.W., Doyle R.J. 1982. Major sites of metal binding in *Bacillus licheniformis* walls. *Journal of Bacteriology* 150: 1438-1448.
- Beveridge T.J., Murray R.G. 1980. Sites of metal deposition on the cell wall of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 141: 876-887.

- Boening D.W. 2002. Ecological effects, transport, and fate of mercury: a general review. *Chemosphere* 40: 1335-1351.
- Brady D., Stoll A., Duncan J.R. 1994. Biosorption of heavy metals cations by non-viable yeast biomass. *Environmental Technology* 15: 429-438.
- Braune B., Muir D., DeMarch B., Gamberg M., Poole K. 1999. Spatial and temporal trends of contaminants in Canadian Arctic freshwater and terrestrial ecosystems: a review. *The Science of the Total Environment* 230: 145–207.
- Brierley J.A., Brierley C.L., Goyak G.N. 1986. Fundamentals and Applied Biohydrometallurgy. Eds. Lawrence R. W., Branion R M. R. y Edner H.G. Elsevier Science 291-304.
- Brown M.J., Lester J.N. 1982. Role of bacterial extracellular polymers in metal uptake in pure bacterial culture and activated sludge. *Water Research* 16: 1539-1548.
- Bruins M., Kapil S., Oehme F. 2000. Microbial Resistance to metals in the Environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 45: 198-207.
- Canstein H., Li Y., Timmis K.N., Deckwer W.D., Wagner-Döbler 1999. Removal of mercury from chloralkali electrolysis wastewater by a mercury-resistant *Pseudomonas putida* strain. *Applied and Environmental Microbiology* 65:5279-5284.
- Chen S., D.B. Wilson, 1997. Construction and characterization of *Escherichia coli* genetically engineered for bioremediation of Hg(2+)-contaminated environments. *Applied Environmental Microbiology* 6: 2442-2445.
- Chen X. C., Peng W. Y., Qi L., Yan S. J., Xiang W. W., Xu C. Y. 2005. Biosorption of copper (II) and zinc (II) from aqueous solution by *Pseudomonas putida* CZ1. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 46: 101-107
- Costa A.D., Carlos A., Pereira F. 2001. Bioaccumulation of copper, zinc, cadmium and lead by *Bacillus* sp., *Bacillus cerus*, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus subtilis*, *Brazilian*. *Journal of Microbiology* 32: 1-5.
- Crist R. H., Martin J. R., Carr D., Watson J. R., Clarke H. 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.
- Daniels, F. 1984. Fisicoquímica Verxió SI, CECSA México.



- Daughey C.J., Fein J.B. 1998. The effect of ionic strength on the adsorption of  $H^+$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  by *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*: A surface complexation model. *Journal of Colloid and Interface Science* 198: 53-77.
- Daughney C.J., Fowle D.A., Fortin D., 2001. The effect of growth phase on proton and metal adsorption by *Bacillus subtilis*. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 65: 1025–1035.
- Dilek F., Erbay A. y Yetis U., 2002. Ni (II) biosorption by *Polyporus versicolor*. *Process Biochemistry* 37: 723-726.
- El-Hellow E., Sabry S., 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.
- Errasquín E., Vázquez C. 2003. Tolerance and uptake of heavy metals by *Trichoderma atroviride* isolated from sludge. *Chemosphere*, 50: 137-143.
- Fein J.B., Daughney C.J., Yee N., Davis T. 1997. A chemical equilibrium model for metal adsorption onto bacterial surface. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 61: 3319-3328.
- Ford T.E., Maki J.S., Mitchell R. 1988. Involvement of bacterial exopolymers in biodeterioration of metals. In *Biodeterioration*, 7<sup>th</sup> edn, D.R. Doughton, R.N. Smith, and Eggins H.O.W. Elsevier Applied Science Barking, pp. 78-84.
- Förstner U., Müller G. 1973. Heavy metal accumulation in river sediments: a response to environmental pollution. *Geoforum* 14: 53–61.
- Fourest E., Roux C.J. 1992. Heavy metal biosorption by fungal mycelial by-products: mechanisms and influence of pH. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37: 399-403.
- Fowle D.A., Fein J.B. 1999. Competitive adsorption of metal cations onto two gram positive bacteria: Testin the chemical equilibrium model. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 63: 3059-3067.
- Goldwater L. 1972. *Mercury: A History of Quicksilver*, Cork Press. Baltimore.
- Goncalves M.L., Sigg L., Reutlinger M. y Stumm W. 1987. Metal ion binding by biological surface: Voltametric assessment in the presence ok bacteria. *Science of the Total Environment* 60: 105-119.
- Goyal N., Jain SC., Banerjee UC. 2003. Comparative studies on the microbial adsorption of heavy metals. *Advance Environmental Research* 7: 311-319.

- Green-Ruiz. 2005. Mercury (II) removal from aqueous solutions by nonviable *Bacillus* sp. From a tropical estuary. *Bioresource Technology* 97: 1907-1911.
- Guibal E., Roulph C., Cloirec P. 1992. Uranium Biosorption by a Filamentous Fungus *Mucor miehei* pH Effect on Mechanisms and Performances of Uptake. *Water Research* 26: 1139-1145.
- Hassen A., Saidi N., Cherif M., Oudabous A. 1998. Effects of heavy metals on *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus thuringiensis*. *Bioresource Technology* 65: 73-82.
- Herrero R., Lodeiro P., Rey-Castro C., Vilarinô T., Sastre de Vicente M. E. 2005. Removal of inorganic mercury from aqueous solutions by biomass of the marine macroalga *Cystoseira baccata*. *Water Research* 39: 3199–3210
- Hussein H., Ibrahim Soha F., Kamal K., Hassan M. 2004. Biosorption of heavy metals from waste water using *Pseudomonas* sp. *Electronic Journal of Biotechnology* 7: 1- 15.
- Jian-Zhong C., Tao X. C., Xu J., Zhang T., Liu Z. L. 2005. Biosorption of lead, cadmium and mercury by immobilized *Microcystis aeruginosa* in a column. *Process Biochemistry* 40: 3675–3679.
- Jeon Choong, Ha Park Kwang 2005. Adsorption and desorption characteristics of mercury (II) ions using aminated chitosan bead. *Water Research* 39: 3938-3944.
- Kaçar Y., Arpa C., Tan S., Denizli A., Gen O., Yakup A.M. 2002. Biosorption of Hg(II) and Cd(II) from aqueous solutions: comparison of isorptive capacity of alginate and immobilized live and heat inactivated *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochemistry* 37: 601-610.
- Kaewchai S. y Prasertsan P. 2002. Biosorption of heavy metal by thermotolerant polymer producing bacterial cells and bioflocculant. *Songklanakarin Journal of Science and Technology* 24: 421-430
- Kapoor A. y Viraraghavan T. 1995. Fungal biosorption an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewaters: a review. *Bioresource Technology* 53: 195-206.
- Kapoor A. y Viraraghavan T. 1997. Fungi as biosorption. *Biosorbents for metal ions*. London, UK: Taylor and Francis, pp. 67-85.
- Kapoor A., Viraraghavan T. y Cullimore D.R. 1999. Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology* 70: 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 y Volesky B. 1998. Advances in the biosorption of heavy metals. *Trends in Biotechnology* 16: 291–300.
- Leacher C., Smith R.W. 2002. Sorption of Hg(II) by *Potamogeton natans* dead biomass. *Minerals Engineering* 15:187-191.
- Malik A. 2004. Metal bioremediation through growing cells. *Environment International* 30: 261–278.
- Morel F.M., Kraepiel A.M. y Amyot M. 1998. The chemical cycle and bioaccumulation of mercury. *Annual Review of Ecology and systematics* 29: 543-566.
- Nourbakhsh M., Kilicarslan S., Ilhan S. Y Ozdag H., 2002. Biosorption of Cr<sup>6+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, and Cu<sup>+</sup> ions in industrial wastewater on *Bacillus* sp. *Chemical Engineering Journal* 85: 351-355.
- Osuna López J. I., Páez-Osuna F., Ortega- Romero P.1986. Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb y Zn en los sedimentos del puerto y antepuerto de Mazatlán. *Ciencias Marinas* 12: 35-45.
- Ozturk A., Artan T., Ayar A. 2004. Biosorption of níkel (II) and copper (II) ions from aqueous solutions by *Streptomyces coelicolor*. *Colloids and Surfaces B* 34: 105.
- Özer A., Ekiz H. I., Özer D., Kutsal T., Çağlar A. 1997. A staged purification process to remove heavy metal ions from wastewater using *Rhizopus arrhizus* *Process Biochemistry* 32: 319-326.
- Páez- Osuna F., Frías- Espiricueta, M.G. 2001. Bioacumulación, distribución y efecto de los metales en los peneidos. *Camaronicultura y Medio Ambiente. ICMYL-UNAM, Mazatlán.*
- Pérez- Rama M., Abalde J., Herrero L.C. y Torres V.E. 2002. Cadmium removal by living cells of the marine microalga *Tetraselmis suecica*. *Bioresource Technology* 84: 265-270.
- Rodriguez-Tirado 2006. Efecto de factores ambientales, (pH, temperatura y salinidad) en la biosorción de metales por la bacteria *Bacillus jeotgali* cepa U3. Tesis de Maestría, Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM.
- Saglam N., Say, R., Denizli, A., Patir, S., Arica, M.Y. 1999. Biosorption of inorganic mercury and alkylmercury species on to by *P. chrysosporium* mycellium. *Process Biochemistry* 34: 725–730.
- Saglam A., Yalcinkaya Y., Denizli A., Arica M.Y., Genc O., Bektas S. 2002. Biosorption of mercury by carboxymethylcellulose and immobilized *Phanerochaete chrysosporium* . *Microchemical Journal* 71: 73-81.

- Sahin Y., Özturk A. 2005. Biosorption of chromium(VI) ions from aqueous solution by the bacterium *Bacillus thuringiensis*. *Process Biochemistry* 40: 1895–1901.
- Sahoo D., Kar R., Das R. 1991. Bioaccumulation of heavy metal ion by *Bacillus circulans*. *Bioresource Tecnology* 41: 177-179.
- Sandau E., Sandau P., Pulz P. 1996. Heavy metal sorption by microalgae. *Acta Biotechnology* 16: 227-235.
- Schiewer S., Volesky B. 1996. Modeling of multi-metal ion exchange in biosorption. *Environmental Science and Technology* 30: 2921–2927.
- Schiewer S., Volesky Bohumil (1997). Ionic strength and electrostatic effects in biosorption of divalent metal ions and protons. *Environmental Science and Technology* 31(9): 2478 -2485.
- Schiewer S., Wong M.H. 2000. Ionic strength effects in biosorption of metals by marine algae. *Chemosphere* 41: 271–282.
- Selenska-Pobell S., Panak P., Miteva V., Boudakov I., Bernhard G., Nitsche H. 1999. Selective accumulation of heavy metals by three indigenous *Bacillus* strains, *B. cereus*, *B. megaterium* and *B. sphaericus*, from drain waters of a uranium waste pile. *FEMS Microbiology Ecology* 29: 59.
- Sharma V.K., Rrhudy K.B., Koenig R., Vazquez F.G. 1999. Metals in sediments of the upper Laguna Madre. *Marine Pollution Bulletin* 38: 1221–1226.
- Singh M. 2001. Heavy metal pollution in freshly deposited sediments of the Yamuna River (the Ganga river tributary): A case study from Delhi and Agra urban centres India. *Environmental Geology* 40: 664–671.
- Soto-Jiménez M. 1998. Distribución y concentración de metales pesados em los sedimentos del Puerto de mazatlán y áreas adyacentes: su normalización y fraccionamiento químico. Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, UNAM.
- Stratton, G.W. 1987. Selective accumulation of heavy metals by three indigenous *Bacillus* strains, *B. cereus*, *B. megaterium* and *B. sphaericus*, from drain waters of a uranium waste pile. *FEMS Microbiology Ecology* 29: 59-67
- Strandberg G.W., Shumate S.E., Parrott J.R. 1981. Microbial cells as biosorbents for heavy metals: accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* 41: 237 – 245.

- Ting Y.P., Lawson I.G. 1991. Prince, Uptake of cadmium and zinc by the alga *Chlorella vulgaris*: Part II. Multi-ion situation. *Biotechnology and Bioengineering* 37: 445-455.
- Vispo S. N., Fernández J.R., Puchades Y., 2001. Los bacteriófagos en la biología molecular pasada y actual. In: Vispo S. N., (ed) *Combinatoria molecular. Elfos scientiae* 3: 42-55.
- Volesky B. 1990a. Biosorption and biosorbents. In: Volesky B (ed) *Biosorption of heavy metals*. CRC Press, Boca Raton, pp 3-5.
- Volesky B. 1990b. Removal and recovery of heavy metals by biosorption. In: Volesky B (ed) *Biosorption of heavy metals*. Boston. USA, CRC Press, Boca Raton, pp. 7-43.
- Volesky B. 2001. Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. *Hydrometallurgy* 59:203–216.
- Wang J. L., 2002. Biosorption of copper(II) by chemically modified biomass of *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry* 37:847–850
- Wang j., Chen C. 2006. Biosorption of heavy metals by *saccharomyces cerevisiae*: A review. *Biotechnology Advances* 24: 427-451.
- Yalçinkaya Y., Arica M.Y., Soysal L., Denizli A., Genç Ö., Bektaş S. 2002. Cadmium and Mercury Uptake by Immobilized *Pleurotus sapidus*. *Turk J Chemical* 26: 441-452.
- Yan G., Viraraghavan T. 2000. Effect of pretreatment on the bioadsorption of heavy metals on *Mucor rouxii*. *Water SA*. 26: 119-123.
- Zeroual Y., Moutaouakkil A., Zohra D., Talbi M., Ung Chung P., Lee K., Blaghen M. 2003. Biosorption of mercury from aqueous solution by *Ulva lactuca* biomass. *Bioresource Technology* 90: 349-351.
- Zouboulis A.I., Matis K.A. 1995. Removal of cadmium from solutions by flotation techniques. *Water Science and Technology* 31: 315-326.