



Posgrado en Ciencias del Mar y Limnología
Universidad Nacional Autónoma de México
Unidad Académica Mazatlán



BIOSORCIÓN DE Cd (II) y Pb (II) POR LA BACTERIA *Bacillus thioparans* CEPA U3.

T E S I S

Que para obtener el grado académico de:

MAESTRO EN CIENCIAS
(QUIMICA ACUATICA)

P R E S E N T A:

JORGE LUIS LÓPEZ MAGAÑA

Director de Tesis: Dr. Carlos Réne Green Ruiz

Comité Tutorial: Dr. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala

Dr. Mario Villalobos Peñalosa

Dr. Domenico Voltolina Lobina

Dr. Martín Frias Espericueta



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mis padres

Gracias por todo su amor, comprensión y confianza en mí. Por todos esos momentos que me apoyaron a lo largo de este recorrido.

Los Amo

ÍNDICE

		Pág.
	ÍNDICE DE FIGURAS	V
	ÍNDICE DE TABLAS	VI
	RESUMEN	VII
	ABSTRACT	IX
1	INTRODUCCIÓN	1
2	ANTECEDENTES	6
3	JUSTIFICACIÓN	11
4	OBJETIVOS	12
5	HIPÓTESIS	13
6	MATERIALES Y MÉTODOS	14
6.1	Origen de la cepa U3	14
6.2	Inoculación de la bacteria	14
6.3	Curva de crecimiento	15
	Curva de crecimiento a diferentes porcentajes de salinidad	
6.4	y control en la entrada de oxígeno	16
6.5	Efecto de la exposición a Cd y Pb sobre la tasa de	
	crecimiento bacteriana	17
6.6	Obtención de biomasa	18
6.7	Determinación del efecto del pH en la biosorción de <i>B.</i>	
	<i>thioparans</i> cepa U3 (no viable)	18
	Determinación del efecto de la temperatura en la	
6.8	biosorción	19
6.9	Modelos de equilibrio para la biosorción de Pb y Cd	20
7	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
7.1	Curva de crecimiento y tolerancia a la salinidad	21
7.2	Efecto de la presencia de Cd y Pb en el crecimiento de <i>B.</i>	
	<i>thioparans</i>	24
7.3	Cinética de biosorción (adsorción) de Pb por <i>B. thioparans</i>	
	bajo diferentes condiciones de pH y concentraciones	
	iniciales	32

7.4	Cinética de biosorción (adsorción) de Cd por <i>B. thioparans</i> bajo diferentes condiciones de pH y concentraciones iniciales	39
7.5	Efecto de la temperatura en la biosorción de los metales e isoterma en equilibrio	42
7.5.1	Pb	42
7.5.2	Cd	45
8	CONCLUSIONES	51
9	AGRADECIMIENTOS	52
10	LITERATURA CITADA	54

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
1.1 Estructura de las bacterias Gram-positivas en la cual se lleva a cabo el proceso de adsorción.	4
1.2 Proceso de Bioacumulación mediante el cual el metal es llevado hacia el interior de la célula.	4
6.1 Metodología de inoculación de la bacteria.	15
6.2 Metodología para determinar la curva de crecimiento.	16
6.3 Crecimiento de la cepa, controlando la entrada de aire.	17
6.4 Obtención de biomasa e inactivación.	18
6.5 Determinación del efecto del pH en la biosorción de Cd y Pb en <i>B. thioparans</i> (biomasa no viable).	19
7.1 Desarrollo de <i>B. thioparans</i> .	22
7.2 Desarrollo de <i>B. thioparans</i> a diferentes salinidades	22
7.3 Diferencias significativas entre diferentes porcentajes de salinidad en la fase estacionaria.	23
7.4 Tolerancia de <i>B. thioparans</i> al Cd a diferentes concentraciones (0.1, 0.5, 1, 5 10 y 20 mg L ⁻¹).	25
7.5 Diferencias significativas entre diferentes concentraciones de Cd en la fase estacionaria.	26
7.6 Tolerancia de <i>B. thioparans</i> al Pb a bajas concentraciones (0.1, 0.5, 1 y 5 mg L ⁻¹).	27
7.7 Diferencias significativas entre concentraciones bajas de Pb en la fase estacionaria.	28
7.8 Tolerancia de <i>B. thioparans</i> al Pb a altas concentraciones (20, 40, 60, 80 y 100 mg L ⁻¹).	29
7.9 Diferencias significativas entre concentraciones altas de Pb en la fase estacionaria.	29
7.10 Tolerancia de <i>B. thioparans</i> al CdCl ₂ a bajas concentraciones (0.5 y 10 mg L ⁻¹).	31
7.11 Tolerancia de <i>B. thioparans</i> al PbCl ₂ a bajas	32

concentraciones (0.5 y 10 mg L⁻¹).

7.12	Efecto de la concentración de Pb en la adsorción.	34
7.13	Controles de Pb a una concentración de 1 mg L ⁻¹ y diferentes pH y 25 °C.	35
7.14	Cinética de biosorción de Pb mediante el uso de <i>B. thioparans</i> .	37
7.15	Porcentaje de remoción de Pb a diferentes concentraciones iniciales y variación de pH, a 25 °C y , biomasa de 0.1 g.	38
7.16	Efecto de la concentración de Cd en la adsorción a 25 °C y 0.1 g de biomasa.	40
7.17	Porcentaje de remoción de Cd a diferentes concentraciones iniciales y variación de pH. 25 °C, 0.1 g de biomasa.	41
7.18	Efecto de temperatura en la adsorción de Pb a diferentes concentraciones (0.1, 0.5, 1, 5 y 10 mg L ⁻¹), biomasa de 0.1g y pH 4.5.	44
7.19	Isotermas de adsorción de (a) Freundlich y (b) Langmuir en la adsorción de Pb a diferentes concentraciones iniciales (0.1, 0.5, 1, 5 y 10 mg L ⁻¹), 0.1 g de biomasa, temperaturas (35, 25 y 15 °C) y pH 4.	45
7.20	Efecto de temperatura en la adsorción de Cd a diferentes concentraciones (0.1, 0.5, 1, 5 y 10 mg L ⁻¹), 0.1 g de biomasa y pH 4.5.	47
7.21	Isotermas de adsorción de (a) Freundlich y (b) Langmuir en la adsorción de Cd a diferentes concentraciones iniciales (0.1, 0.5, 1, 5 y 10 mg L ⁻¹), 0.1 g de biomasa, temperaturas de (35, 25 y 15 °C) y un pH 4.5.	47

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
1.1 Límites máximos de Pb y Cd permitidos en agua para consumo humano.	2
1.2 Límites máximos de Pb y Cd permitidos para descarga de agua al medio ambiente.	2
1.3 Tecnologías convencionales para la remediación de metales.	5
6.1 Modelos de biosorción en equilibrio.	20
7.1 Concentraciones experimentales de Pb y sus desviaciones estándar (SD) a diferentes pH.	36
7.2 Porcentajes en la biosorción de Pb mediante el uso de <i>B. thioparans</i> a diferentes concentraciones iniciales, pH y desviación estándar (SD).	38
7.3 Porcentajes en la biosorción de Cd mediante el uso de <i>B. thioparans</i> a diferentes concentraciones iniciales, pH y desviación estándar.	39
7.4 Concentraciones de Pb y sus desviaciones estándar (SD) a diferentes temperaturas.	44
7.5 Porcentajes en la biosorción de Pb a diferentes concentraciones iniciales, variación de temperaturas, un pH= 4.5 y desviación estándar (SD).	44
7.6 Parámetros de los modelos (Langmuir y Freundlich) para la adsorción de Pb por <i>B. thioparans</i> (0.1 g de biomasa, pH= 4.5), b (L mg ⁻¹), qmax (mg g ⁻¹), 1/n (adimensional), kf (mg L ⁻¹).	45
7.7 Porcentajes en la biosorción de Cd a diferentes concentraciones iniciales, variación de temperaturas y pH= 6.	47
7.8 Parámetros de los modelos (Langmuir y Freundlich) para la adsorción de Cd por <i>B. thioparans</i> (0.1 g de biomasa, pH= 6), b (L mg ⁻¹), qmax (mg g ⁻¹), 1/n (adimensional), kf (mg L ⁻¹).	48

RESUMEN

El proceso de biosorción consiste en la retención de metales mediante su inmovilización en diferentes sorbentes biológicos los cuales pueden ser hongos, algas o bacterias. Entre las bacterias, los géneros más importantes como biosorbentes son *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces*. Se realizaron bioensayos con la bacteria *Bacillus thioeparans* para determinar el pH y temperatura óptimos de biosorción de los metales Pb y Cd. Se realizaron pruebas a pH de 3, 4.5 y 6 encontrándose que el valor de pH óptimo para Pb fue de 4.5 (25 °C y una biomasa de 0.1 g L⁻¹), con concentraciones iniciales de 0.05, 0.56, 0.74, 3.42 y 8.14 mg L⁻¹ con una remoción del 77.64, 93.45, 100, 93.2 y 92.4 % respectivamente. Para los experimentos con Cd se utilizaron los mismos valores de pH (25 °C y una biomasa de 0.1g L⁻¹) y se encontró que el pH óptimo fue 6, con concentraciones iniciales de 0.1, 0.5, 1, 5, 10 mg L⁻¹ y una remoción del 100, 95.13, 93.99, 94.86 y 90.62 %, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en la capacidad de adsorción de los metales cuando la temperatura varió (15, 25 y 35 °C); sin embargo, se presentaron diferencias entre los modelos de las isotermas. A temperaturas de 15 y 25 °C, en el caso de Pb, y 15 °C para Cd, el modelo que mejor se ajustó fue el sugerido por Freundlich, que explica el proceso de adsorción como un sistema heterogéneo en donde actúan múltiples capas, siendo así, se obtienen diferentes sitios activos donde el metal podrá adsorberse. A una temperatura de 35 °C, para los experimentos con Pb, y 25 y 35 °C para Cd, el modelo que mejor se ajustó fue el propuesto por Langmuir, que explica el proceso de adsorción por mono capas. Este estudio ha demostrado que la bacteria *Bacillus thioeparans* cepa U3 puede ser empleada como un buen biosorbente.

ABSTRACT

The biosorption process refers to the metal retention by immobilization in different biological sorbents such as fungal, algae or bacteria. Among the bacteria, the most important genus as biosorbents are *Bacillus*, *Pseudomonas* and *Streptomyces*. Bioassays with the bacterium *Bacillus thioeparans* were performed to determine the optimal pH and temperature of the Pb and Cd biosorption. Experiments were conducted at pH 3, 4.5 and 6 and it was found that the optimum pH for Pb was 4.5 (25 °C and a biomass of 0.1 g L⁻¹), with initial concentrations of 0.05, 0.56, 0.74, 3.42 and 8.14 mg L⁻¹, with removal of 77.64, 93.45, 100, 93.2 and 92.4 % respectively. For Cd experiments, the same values of pH were used (25 °C and a biomass of 0.1 g L⁻¹) and it was observed that the optimal pH was 6, with initial concentrations of 0.1, 0.5, 1, 5, 10 mg L⁻¹, with removal of 100, 95.13, 93.99, 94.86 and 90.62 %, respectively. No significant differences were found in the adsorption capacity of the metals when the temperature varied (15, 25 and 35 °C), However, differences between the isotherms models were shown. At temperatures of 15 and 25 °C, in the case of Pb and 15 °C for Cd, Freundlich model best fitted the adsorption data, which explains the process as a heterogeneous system where multiple layers interact, getting different active sites where metal can be adsorbed. At a temperature of 35 °C for the experiments with Pb, and 25 and 35 °C for Cd, the best fit was produced by the Langmuir model, which explains the process of adsorption as monolayers. This study demonstrated that *Bacillus thioeparans* strain U3 can be used as a good biosorbent.

1. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de grandes industrias trae como consecuencias problemas ambientales como la contaminación por metales de los cuerpos de agua. La toxicidad y los riesgos a la salud asociados con estos contaminantes se han establecido más allá de cualquier duda, debido a que los metales persisten de forma permanente en el ambiente (Ribeiro et al., 2008). La contaminación por metales proviene, por lo general, de procesos como galvanoplastia, fabricación de plásticos, fertilizantes, pigmentos, minería y procesos metalúrgicos (Zouboulis et al., 2004).

Existen diversos métodos para la remoción de metales, de los cuales la biosorción es el proceso que será estudiado en este trabajo ya que es un método eficaz y económico para la remediación de zonas polucionadas (Wan et al., 2010). Los puntos más importantes a considerar para hacer un estudio enfocado a la remoción de metales son: (I) que por su toxicidad constituyan un peligro directo para la salud, (II) que el precio del metal sea tal que exista un interés económico por recuperarlo, y/o (III) que exista un interés de la comunidad científica por conocer el comportamiento de dicho metal (Volesky, 2007).

El proceso de biosorción consiste en la retención de metales mediante su inmovilización en diferentes sorbentes biológicos para su eliminación o recuperación de un medio líquido (Tuzen et al., 2007). Dichos biosorbentes pueden ser hongos, algas o bacterias, ya que en general todos los tipos de materiales biológicos demuestran capacidad de biosorción hacia los iones metálicos, aunque la tasa de remoción depende del tipo de material seleccionado. Entre las bacterias, los géneros más importantes como biosorbentes son *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces* (Vijayaraghavan y Yeoung, 2008).

Entre los metales que causan la mayor preocupación por sus efectos sobre el ambiente se encuentran Cd y Pb (Sardans et al., 2010), cuyos límites en agua para consumo humano se muestran en la Tabla 1.1 y para descargas de agua en la Tabla 1.2. Además de las fuente naturales, el plomo se encuentra en diversos tipos de ecosistemas por causas antropogénicas y por su capacidad de

permanencia en la atmósfera puede viajar a grandes distancias, encontrándose en suelo, agua, rocas y sedimentos (Paulino et al., 2007). En el caso del Cd, el interés para este metal se debe a su alta toxicidad, ya que es un elemento que puede tener importantes impactos en los ecosistemas marinos en concentraciones del orden de $1 \mu\text{g L}^{-1}$. En ambientes acuáticos se encuentra generalmente en estado de oxidación Cd(II) y no es directamente afectado por fluctuaciones en el estado de oxidación-reducción, posee una fuerte afinidad por los iones halógenos, por lo que se espera que forme fuertes complejos con el Cl en agua marina (Lebeau, 2001; Frédérique, 2002; Thomais, 2007).

Tabla 1.1. Límites máximos de Pb y Cd permitidos en agua para consumo humano.

Metal	Límite establecido NOM-127-SSA1-1994	OMS
Plomo	0.025 mg L^{-1}	0.01 mg L^{-1}
Cadmio	0.005 mg L^{-1}	0.003 mg L^{-1}

Fuentes: DOF (2000). OMS (2008)

Tabla 1.2. Límites máximos de Pb y Cd permitidos para descarga de agua al medio ambiente.

Metal	Límite de NOM-001-SEMARNAT-1996	USEPA
Plomo	0.2 mg L^{-1}	0.02 mg L^{-1}
Cadmio	0.1 mg L^{-1}	0.006 mg L^{-1}

Fuentes: www.semarnat.gob.mx ; www.epa.gov/.

La bacteria *Bacillus thioparans* es Gram+ (Jung-Hoon et al., 2001; Pérez-Ibarra, 2007). Bacterias de este genero han demostado características para estudios de biosorción por adsorción.

El término biosorción comprende la adsorción y absorción. En la primera, los cationes metálicos en la fase acuosa son atraídos por la diferencia de cargas en la superficie de la bacteria (-), debido a que los ácidos teicoicos, que son presentes

en la pared celular de las bacterias Gram+ dan una carga negativa por la presencia de enlaces fosfodiéster entre los ácidos y la presencia de ácidos carboxílicos provenientes del copolímero peptidoglicano (Figura 1.1) (Sonnenfeld et al., 1985; Chatterjee et al., 2010).

En el proceso de absorción interviene el secuestro intracelular (Figura 1.2), mediante el cual el metal es acumulado dentro de la célula por transporte activo al interior del organismo y formación de complejos endocelulares por interacción con las metalotioneínas.

Por tanto, se comprende como biosorción un proceso independiente del metabolismo en la primera fase de adsorción, que se puede realizar en células vivas o muertas. y dependiente del metabolismo para su transporte hacia el interior (absorción) (Srinath et al., 2002). Resumiendo, los mecanismos de remoción por biosorción de metales se pueden dividir en 3 categorías (1) adsorción de los metales en la capa externa de la pared celular, (2) secuestro de iones metálicos y (3) transformación química de los iones por los microorganismos (Hassan et al., 2009).

Existen diferentes técnicas para la remediación del ambiente, las cuales incluyen: extracción con disolventes, precipitación química, intercambio iónico, adsorción por carbón activado, quelación, ósmosis inversa, galvanoplastia, tratamiento electroquímico (Tabla 1.3), aunque muchas de estas técnicas son caras o ineficientes en comparación con la técnica de biosorción, que tiene la ventaja que puede ser aplicada con niveles bajos de concentración de metales y un bajo costo de tratamiento, su desventaja es que los sustratos tienen un tiempo de vida más corto en comparación con sorbentes convencionales. Las técnicas mencionadas anteriormente, que no incluyen sorción, se utilizan sólo para concentraciones muy elevadas de contaminantes pero no para concentraciones bajas ($1-100 \text{ mg L}^{-1}$) (Kao et al., 2008; Tsekova et al., 2008; Liet al., 2010; Gadd, 2008).

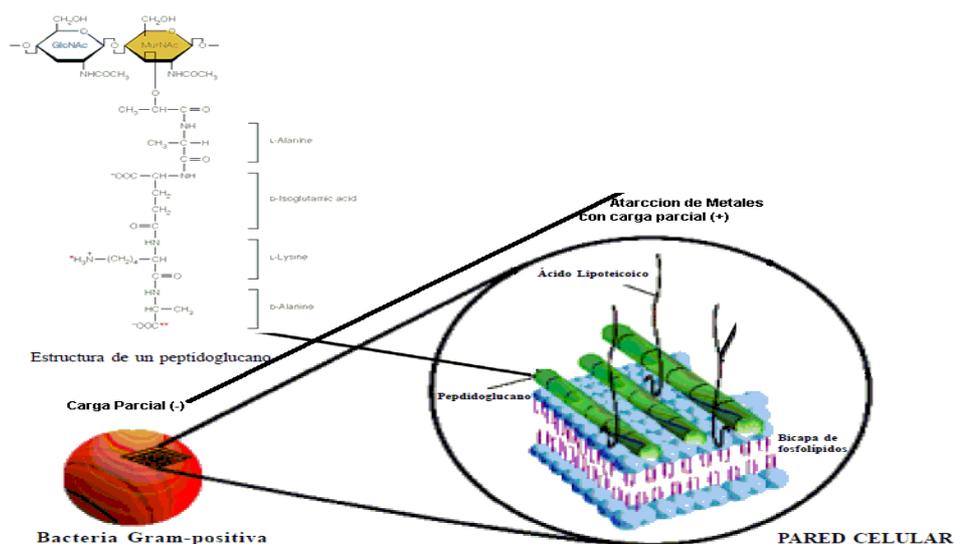


Figura 1.1.-Estructura de las bacterias Gram-positivas en la cual se lleva a cabo el proceso de adsorción (Adaptada de Sonnenfeld et al., 1985; Gutiérrez-Venegas y Cardoso-Gimenez, 2006).

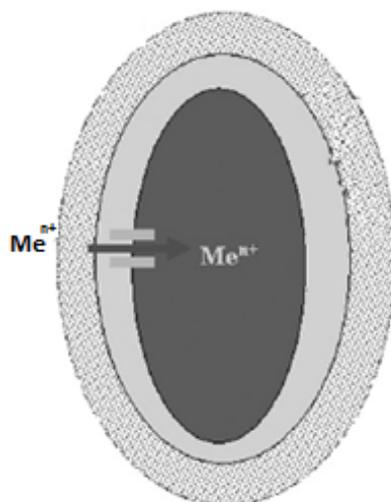


Figura 1.2.- Proceso de bioacumulación mediante el cual el metal es llevado desde la membrana celular hasta el interior de la célula (Adaptada de Chojnacka, 2010).

Tabla 1.3. Tecnologías convencionales para la remediación de metales

Método	Desventaja	Ventaja
Precipitación química	-Difícil separación -Se obtienen lodos tóxicos como resultado -No muy efectiva	Simple Bajo costo
Tratamiento electroquímico	-Aplicable para concentraciones altas de metales -Sensible a condiciones específicas como la presencia de ciertos componentes	Recuperación del metal
Ósmosis inversa	-Aplicación de presión alta -Escalamiento de membranas	Efluente para fácil tratamiento de reciclado
Intercambio iónico	-Sensible a la presencia de partículas -Resinas costosas	Recuperación de metales Efectivo
Adsorción	-No es muy efectivo para ciertos metales	Sorbentes convencionales

Fuente: Zouboulis et al. (2004).

2. ANTECEDENTES

Como se ha mencionado antes, el proceso de biosorción conlleva el uso de materiales de origen biológico, los cuales se encuentran en abundancia y son transformables a biosorbentes. Dicho proceso involucra la captación fisicoquímica de metales, mediante la cual los iones de metales se unen a los centros activos de adsorción y posteriormente el material biológico forma complejos, independientemente del metabolismo (Puranik y Paknikar 1997 y Nelson et al., 2003). Uno de los primeros autores que definió el término biosorción fue Ruchhoft (1949; citado en Rodríguez-Tirado, 2006), cuando estudiaba la posibilidad de eliminar desechos radiactivos por tratamientos biológicos y observó que una parte de los desechos radiactivos se había adsorbido en el lodo y en flora y fauna.

Entre la gran variedad de materiales biológicos que se pueden utilizar en los procesos de biosorción se encuentran bacterias, algas, levaduras y hongos (Wang y Chen, 2008). De acuerdo con Kratochvil y Volesky (1998), el uso de biomasa muerta o metabólicamente no viable es efectivo en la biosorción de metales y descontaminación de efluentes industriales en comparación con otros métodos como lo precipitación e intercambio iónico, debido a que es una alternativa muy rentable por su capacidad de eliminar metales y recuperar sitios polucionados; además, ofrece las ventajas de bajo costo de operación, minimización del volumen de químicos y/o lodos biológicos que hay que eliminar, alta eficacia en la desintoxicación de efluentes muy diluidos y elimina la necesidad de suministrar nutrientes.

Chojnacka (2010) definió el término de biosorción como un proceso metabólico pasivo que es realizado por biomasa no viva; mientras que si se utilizan células vivas o metabólicamente activas el proceso se denomina bioacumulación. En el último caso existe un riesgo de toxicidad por el sorbato hacia el sorbente, mientras que en la adsorción este peligro no existe. Por otro lado, otros autores como Velásquez y Dussan (2009) y Li et al. (2010) han empleado el término biosorción para referirse al uso de biosorbentes vivos o muertos. En ambos casos, el proceso se ha considerado una biotecnología rentable para el tratamiento de grandes

volúmenes de agua residual que contienen metales pesados a bajas o grandes concentraciones.

A continuación se mencionan algunos de los trabajos que han sido de gran aporte hacia el avance de las técnicas de biosorción por medio del uso de diferentes microorganismos como biosorbentes.

Shu et al. (1997) investigaron los efectos de los factores ambientales y las condiciones de crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* PU21 en la biosorción, así como su tolerancia a la exposición a Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} y Cd^{2+} y observaron que esta cepa soporta concentraciones de estos metales de hasta 50, 500, 300 y 200 mg L^{-1} , respectivamente. En cuanto a la adsorción de Pb^{2+} , Cu^{2+} y Cd^{2+} en función de su estado, ya sea no viable o viable, se obtuvo que la capacidad de sorción de los metales en células viables fue aparentemente mayor que en células no viables, posiblemente porque la etapa de esterilización a vapor, puede destruir o inactivar parte de los sitios de unión a metales o por la acumulación intracelular de iones metálicos en células viables.

En el mismo estudio, la biomasa bacteriana mostró diferente capacidad de adsorción de Pb y Cd en diferentes fases de crecimiento; mientras que el efecto de la fase de crecimiento en la biosorción de Cu fue insignificante. La capacidad de adsorción del metal hacia las células tendió a aumentar a medida que el pH aumentó, hasta que los metales precipitaron en forma de hidróxidos. Sin embargo, con la restricción de la formación de hidróxidos insolubles a valores de pH alto, el pH óptimo de funcionamiento en este estudio fue de 5,5, 5,0 y 6,0 para la biosorción de Pb, Cu y Cd, respectivamente.

Hassen et al. (1998) trabajaron con *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus thuringiensis*, que se encuentran frecuentemente en ambientes contaminados. Este estudio se enfocó en el crecimiento bacteriano a diferentes concentraciones de Cd, Co, Cu, Hg, Cr y Zn y la biosorción de cada uno de estos metales. Se observó una inhibición en el crecimiento de *Bacillus thuringiensis* de aproximadamente 30 % con respecto al control a concentraciones de 0.5 y 1 mM de Cr y 0.2 mM de Cu y Co. Con una concentración de 0.05 mM de Hg el crecimiento se redujo aproximadamente a un 20 %; mientras que la exposición a

0.05 y 0.2 mM de Zn no provocó efectos significativos. Con respecto a la biosorción en *P. aeruginosa*, se observó el mayor porcentaje de adsorción para Hg (59.7%; 469.7 $\mu\text{g mg}^{-1}$), seguido por Cr y los menores porcentajes para Cd y Cu; mientras que en el caso de *B. thuringiensis* también se observó la mayor adsorción con Hg (925 $\mu\text{g mg}^{-1}$), seguido por Cu y con los porcentajes más bajos para Cd y Cr.

Mohamed (2001) utilizó células viables y no viables, así como polisacáridos de la cianobacteria *Gloeotheca magna* para realizar experimentos de biosorción de Cd^{2+} y Mn^{2+} y empleó el modelo de Freundlich, obteniendo que el coeficiente de afinidad fue mayor para la biomasa no viable ($K_F = 912.6$ y $K_F = 2398$, para Cd y Mn, respectivamente), que para la biomasa viable ($K_F = 151.4$ y $K_F = 63$, respectivamente). Los polisacáridos adsorbieron 115–425 $\mu\text{g Cd}^{2+} \text{mg}^{-1}$ y 473–906 $\mu\text{g Mn}^{2+} \text{mg}^{-1}$. Para poder determinar si *Gloeotheca magna* era tóxica se realizó un ensayo con *Artemia franciscana*, y se demostró que a concentraciones de 200 mg células secas L^{-1} , ya sea en fase acuosa o en extracto metanólico, la cianobacteria no fue tóxica.

Yilmaz (2003) realizó un estudio de tolerancia a la presencia de metales, biosorción y susceptibilidad frente a antibióticos de microorganismos recolectados en el río Tigris, identificando sólo aquellos que pudieron soportar altas concentraciones de metales. Utilizando métodos de identificación del genoma DNA, se concluyó que la especie y género que tenía más tolerancia era *Bacillus circulans*. El estudio de absorción se llevó a cabo desde el punto de inoculación (tiempo cero) hasta las 50 horas con diferentes soluciones metálicas como Cd, Co, Cu, Ni, Zn y Mn tomando muestras cada 5 horas para analizar la captación de los metales. De acuerdo a los resultados de este trabajo, *B. circulans* cepa EB1 fue capaz de remover el 90 % de Mn, 68 % de Zn, 65 % de Cu, 45 % de Ni y 40 % de Co, con una capacidad de biosorción específica de 25, 22, 20, 13 y 12 mg L^{-1} , respectivamente.

Posteriormente, Yilmaz y Ensari (2005) estudiaron la remoción de Cd con la misma cepa de *B. circulans* (EB1) en diferentes fases de crecimiento y encontraron una mayor capacidad de biosorción en la fase de crecimiento

exponencial, demostrando que células cultivadas en presencia de $28.1 \text{ mg Cd L}^{-1}$ tenían una capacidad específica de biosorción de 5.8 mg L^{-1} en las primeras 8 horas y que cuando las células fueron pre-acondicionadas a bajas concentraciones de Cd la captación de Cd aumentó a $6-7 \text{ mg L}^{-1}$.

Rodríguez-Tirado (2006) realizó un estudio de biosorción en la cepa U3 (viable) de *Bacillus jeotgali* para conocer el efecto del pH, la salinidad y la temperatura en la cinética de biosorción de Cd, Pb, Cu y Zn. De acuerdo a sus resultados, las condiciones óptimas para la biosorción de Cd fueron: pH 7, temperatura $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, salinidad 0 con las cuales, usando 0.5 g L^{-1} de biomasa y una concentración inicial de $34.7 \pm 5.4 \text{ mg L}^{-1}$, obtuvo una remoción del 50 % en una hora. Para Pb, las condiciones óptimas fueron pH 4, temperatura de $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, salinidad de 30 con las cuales, usando una biomasa de 0.5 g L^{-1} y una concentración inicial de $41.5 \pm 2.0 \text{ mg g}^{-1}$, la remoción fue del 98 % en 20 minutos. En el caso de los metales esenciales, las condiciones óptimas para Cu fueron pH 6, temperatura de $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, salinidad 0, que, con una biomasa de 0.5 g L^{-1} y una concentración inicial de $40.6 \pm 3.7 \text{ mg L}^{-1}$, resultó en una remoción del 48% en 1.5 horas; mientras que para Zn los valores óptimos fueron pH 7, temperatura $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y salinidad 0, que conllevaron una remoción del 32% en 50 horas, cuando se emplearon una biomasa 0.5 g L^{-1} y una concentración inicial de $75.5 \pm 3.7 \text{ mg g}^{-1}$.

Carrasco-Valenzuela (2007) realizó un estudio sobre los efectos de los factores ambientales en la biosorción de Hg(II) con la biomasa viable y no viable de la cepa U3 de *Bacillus jeotgali*. Los resultados demostraron que con la biomasa viable hubo mayor absorción a pH 7.5 y 9 a concentraciones de $20 \text{ mg Hg (II) L}^{-1}$ y $100 \text{ mg Hg (II) L}^{-1}$, con valores de 14 ± 2.8 y $14.9 \pm 2.4 \text{ mg Hg (II) g}^{-1}$, 76.20 ± 2.9 y $74.9 \pm 3.7 \text{ mg Hg(II) g}^{-1}$, respectivamente, obteniendo con ambas concentraciones porcentajes de remoción del 82 y 79 % en pH 9 y 80 % de remoción a pH 7.5 . Utilizando biomasa no viable, se obtuvo una mayor biosorción a pH 7.5 y 9, a concentraciones de $20 \text{ mg Hg (II) L}^{-1}$ y en concentraciones de $100 \text{ mg Hg (II) L}^{-1}$, con un 80, 78 , 81 y 56% respectivamente. Se encontró la mayor biosorción en biomasa viable a temperaturas de 15 y $45 \text{ }^{\circ}\text{C}$, mientras que con biomasa no viable

la mayor biosorción se presentó a temperaturas de 25 °C y 35 °C.

Khanafari et al. (2008), en un estudio de biosorción de plomo y cromo en *Bacillus circulans*, determinaron las condiciones óptimas del proceso. El experimento constó en determinar las concentraciones mínimas inhibitorias (MICs) y las concentraciones bactericidas mínimas (MBCs), para lo cual se utilizaron concentraciones progresivamente crecientes de 20 hasta 1100 mg Pb L⁻¹ y mg Cr L⁻¹, obteniéndose una reducción del 65 y 48 %, en 5 y 4 días, en las concentraciones de 500 mg L⁻¹, respectivamente. Los MICs y MBCs fueron de 950 y 1050-1100 mg L⁻¹ para Pb y Cr, respectivamente. Además, se observó que a medida que el pH incrementaba (5.5, 6, 6.5 y 7) la biosorción de plomo y cromo fue aumentando.

Gabr et al. (2008) emplearon *Pseudomonas aeruginosa* (ASU 6) aislada del canal de El-Malah, Assiut, Egipto para cuantificar la adsorción y bioacumulación de Ni y Pb y encontraron que la capacidad de adsorción de las células viables es significativamente inferior a la de las células no viables, dando resultados de capacidad máxima de biosorción para el Pb y el Ni de 123 y 113,6, y 79 y 70 mg g⁻¹, respectivamente. Los valores de pH óptimo para el Ni(II) y el Pb(II) en la adsorción fueron 7 y 6, respectivamente. En conclusión, los datos que se obtuvieron sobre el mecanismo de biosorción comprenden las interacciones iónicas y formación de complejos entre los cationes metálicos y los sitios ácidos en la pared celular de la bacteria. Esta conclusión fue confirmada por análisis con la técnica de Infrarojo (IR) y de pH, donde las capacidades máximas de adsorción (q_{max}) del Ni y Pb por células secadas por calor, células liofilizadas o acumuladas por células viables se calcularon con la ecuación de Langmuir y se obtuvo que estas eran 113,6, 77,5, 70 y 123, 93, 79 mg g⁻¹, respectivamente. La biomasa bacteriana tiene una mayor afinidad por el Pb que por el Ni debido a la diferencia en los radios iónicos y la electronegatividad.

En conclusión, todos los autores comparten que el uso de material de origen biológico, ya sea viable o no viable, es de gran utilidad para las técnicas de remediación.

3. JUSTIFICACIÓN

La contaminación por metales de los ecosistemas acuáticos y terrestres se debe principalmente a actividades industriales, agrícola, mineras o tratamiento insuficiente de los efluentes que son vertidos hacia los ecosistemas o por causas naturales como el intemperismo y el vulcanismo. Entre estos contaminantes se seleccionaron el plomo, con una amplia distribución en todo el mundo debido a su capacidad de viajar largas distancias a través del aire, y el cadmio; ambos son considerados contaminantes prioritarios por su alta toxicidad. El peligro causado por la introducción de estos agentes reside en que no se degradan como otros contaminantes, sino que permanecen en el ecosistema causando daños tanto a las poblaciones residentes como al mismo ecosistema. Sin embargo, se pueden utilizar técnicas de remediación que modifiquen su concentración, forma química (especie) o disponibilidad. Las técnicas convencionales de remediación para metales usualmente son caras, además de que son eficaces para altas concentraciones, pero no lo son cuando se presentan bajas concentraciones. Por lo anterior, se propone el uso de microorganismos como una alternativa para la remoción de metales, usando la bacteria *B. thioparans* que pertenece a uno de los géneros más importante para utilizarse como biosorbentes.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar la influencia de la exposición a Cd, Pb y diferentes salinidades sobre el crecimiento de la bacteria *Bacillus thioparans* cepa U3, así como del pH y la temperatura sobre la capacidad de biosorción de dichos metales en la biomasa producida.

4.2 Objetivos particulares

Determinar el efecto de la exposición a diferentes salinidades en el crecimiento de la bacterias *B. thioparans* cepa U3.

Determinar el efecto de la exposición a Cd y Pb en la tasa de crecimiento de las bacterias *B. thioparans* cepa U3.

Determinar la capacidad de biosorción del Cd y Pb en *B. thioparans* cepa U3 bajo diferentes condiciones de pH, temperatura y concentración de metal.

Determinar los modelos de equilibrio que se ajusten adecuadamente al proceso de biosorción del Cd y Pb en la biomasa bacteriana.

Comparar la capacidad de remoción del Cd y Pb por *B. thioparans* cepa U3 y otras bacterias.

5.HIPÓTESIS

- 1) La tasa de crecimiento de la cepa U3 de la bacteria *B. thioparans* disminuirá al exponerla a diferentes concentraciones de Cd y Pb en el medio de cultivo.
- 2) Debido a que la cepa se ha recolectado en un ambiente estuarino, se espera que la presencia de NaCl en el medio de cultivo en concentraciones similares a la de su habitat incremente su tasa de crecimiento.
- 3) La capacidad de biosorción de los metales por las bacterias es afectada por la temperatura y el pH, por lo tanto deben existir condiciones óptimas de éstas variables que conlleven a una mayor capacidad de adsorción.
- 4) Los datos experimentales de biosorción se ajustarán a uno de los modelos propuestos para su equilibrio.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Origen de la cepa U3 de *Bacillus thioparans*

Como parte de una investigación previa, la cual se enfocó en la oxidación de Mn(II) por bacterias, se aislaron 5 cepas de bacterias de sedimentos colectados de la laguna costera de Urías, Mazatlán, Sinaloa. De estas 5 cepas se seleccionó la cepa U3 como organismo de prueba en el presente estudio, debido a su alta capacidad de oxidación de Mn(II). Dicha cepa fue inicialmente identificada como *Bacillus jeotgalli* (Rodríguez-Tirado, 2006), debido a su gran similitud (97%) en el análisis molecular 16S ribosomal RNA; sin embargo, recientemente Pérez-Ibarra et al. (2007) describieron una nueva especie denominada *Bacillus thioparans*, con la cual nuestra cepa tiene más de 99.5 % de similitud, por lo que en adelante se hará referencia a ella como *B. thioparans*. Las bacterias fueron criopreservadas a -70 °C en perlas de vidrio previamente esterilizadas como lo recomienda Gherma (1994), y almacenadas en la colección de microorganismos de importancia acuática en el laboratorio de microbiología del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A.C (CIAD), a cargo del Dr. Bruno Gomez Gil Rodríguez Sala.

6.2 Inoculación de la bacteria

Antes de iniciar todos los procedimientos, los materiales fueron lavados con ácidos clorhídrico y nítrico, ambos en concentración 2M y/o esterilizados según su uso. La cepa U3 de *B. thioparans* fue reactivada en el CIAD en cajas Petri con medio Agar Tryptocaseina (TSA) a 30 °C por 24 horas. Posteriormente, se prepararon 50 mL de caldo de Soya Tryptocaseina (TSB) con agua milli-Q purificada a la cual se adicionó NaCl para simular la salinidad de su ambiente natural y se vertió en 3 tubos de ensayo con rosca con 15 mL del medio TSB. Después de su esterilización, los tres tubos se inocularon con la biomasa

reactivada de las cajas petri y se incubaron a una temperatura de 30 °C por 24 horas. No se necesitó agitación para este paso, debido al crecimiento rápido de las bacterias (Figura 6.1).

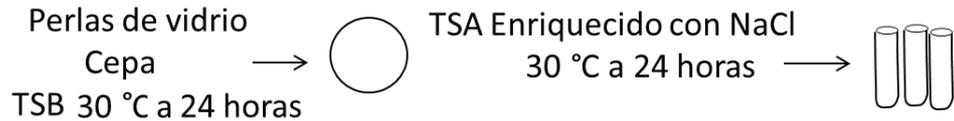


Figura 6.1.-Metodología de inoculación de la bacteria

6.3 Curva de crecimiento

Se prepararon 4 matraces de 250 ml con 150 mL de medio TSB estéril (pH inicial 7.3 ± 0.2), tres de los cuales se inocularon con 1mL de uno de los cultivos en tubo de ensayo. El cuarto matraz sirvió como blanco para las lecturas de densidad óptica (610 nm) con un espectrofotómetro UV visible marca Perkin Elmer modelo Lambda10 que se utilizaron para determinar el crecimiento bacteriano y poder partir de un punto más amplio para la comparación de los próximos estudios de toxicidad y biosorción. Los matraces se agitaron a 120 rpm a una temperatura de 30 °C y se muestrearon 4 mL de cada matraz cada 2 horas hasta 50 horas para determinar el tiempo necesario para alcanzar la fase de crecimiento estacionario con la finalidad de reducir el tiempo en otros experimentos, si es el caso de que ésta alcanzase su etapa estacionaria antes de las 50 horas. (Figura 6.2).

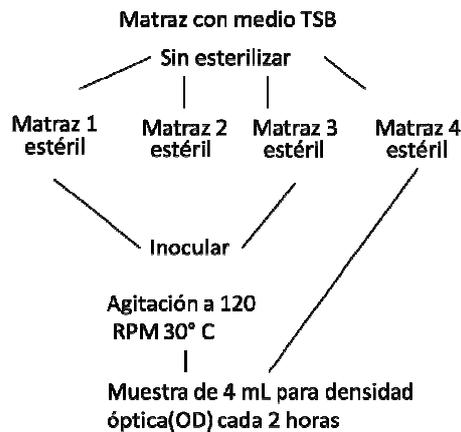


Figura 6.2.-Metodología en curva de crecimiento

6.4 Curva de crecimiento a diferentes salinidades y control en la entrada de aire

Se prepararon medios de cultivos TSB con distintos porcentajes de salinidad (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 4 %) y un pH inicial de 7.3 ± 0.2 , con la finalidad de observar si la cepa *B. thioparans* U3 es capaz de sobrevivir en cuerpos de agua dulce, salobre e hipersalina, así como para determinar si es factible utilizar un porcentaje bajo de salinidad sin alterar el crecimiento de la cepa, ocasionando menor ruido analítico en los experimentos siguientes.

Para poder obtener un mejor control en el crecimiento de la cepa, se optó por manipular la entrada de aire por medio de unos matraces tapados con caucho, en los cuales se incrustaron tubos de cristal para la entrada de aire, salida de aire y la salida de la muestra. Para la entrada de aire se utilizó una manguera de plástico adicionada con un filtrador de aire el cual posee un filtro de $0.20 \mu\text{m}$ para evitar el paso de contaminantes (Figura 6.3). La temperatura fue controlada con un baño María (Precision Scientific modelo 25) a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ y, utilizando unas bombas de acuario se envió aire al medio, provocando una agitación continua. Los protocolos para la preparación del medio y la toma de muestra fueron los mismos que se mencionaron en el párrafo anterior. Finalmente, se utilizó un espectrómetro UVvisible marca Perkin Elmer modelo Lambda10m para medir la densidad óptica.

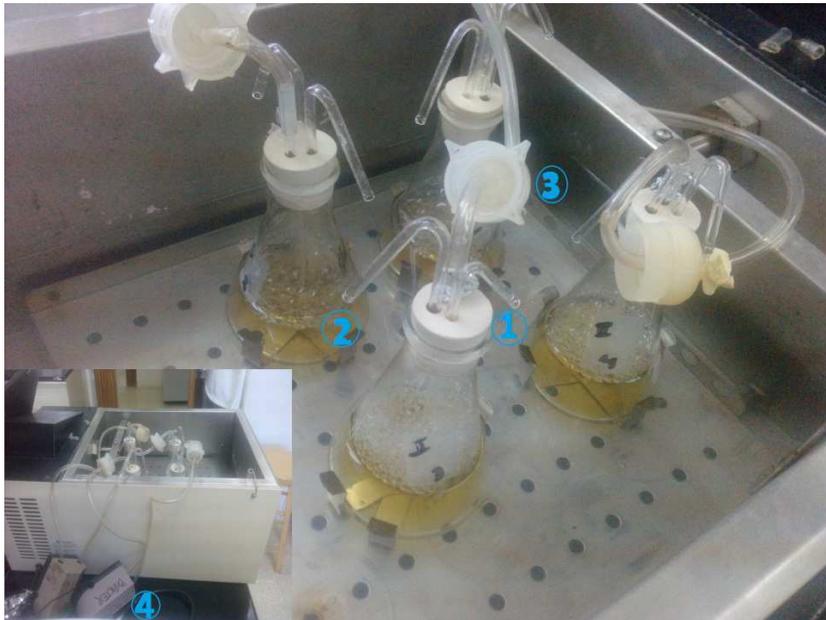


Figura 6.3.- Crecimiento de la cepa, controlando la entrada de aire. (1) Salida de aire, (2) salida de muestra, (3) entrada de aire con un filtro de $0.22 \mu\text{m}$ y (4) bombas tipo acuario.

6.5 Efecto de la exposición a Cd y Pb sobre la tasa de crecimiento bacteriana

Para determinar el efecto de Cd y Pb sobre el crecimiento de *B. thioparans* U3, esta cepa se cultivó en triplicado en medio TSB adicionado con 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 mg L^{-1} de dichos metales, se siguió el mismo procedimiento indicado en el apartado anterior, excepto que el medio de cultivo (TSB) fue enriquecido con las concentraciones de metal antes mencionadas y a una salinidad del 2.5 %. Para estos bioensayos se emplearon las sales $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, posteriormente en otros bioensayos, para eliminar el efecto de la adición de nitratos, se realizaron experimentos adicionales con concentraciones de 0.5 y 10 mg L^{-1} de Cd y Pb, a partir de las sales CdCl_2 y PbCl_2 . Estos experimentos tuvieron una duración de 64 horas con entrada de aire limitada (16, 34, 58 horas) y el crecimiento en biomasa se determinó mediante lecturas de densidad óptica con

un espectrofotómetro portátil HACH DR.

6.6 Obtención de biomasa

Debido a los resultados obtenidos en los experimentos de tolerancia a la salinidad y a la exposición a Cd y Pb (ver apartados 7.1 y 7.2), se decidió realizar los experimentos de biosorción con biomasa no viable de *B. thioparans*.

Para obtener la mayor cantidad de biomasa posible se utilizaron placas Petri cuadradas (25 cm x 25 cm) (Figura 6.4) y las bacterias se cosecharon 16 horas después de la inoculación para permitir que los cultivos llegaran a su fase estacionaria. Posteriormente se recolectó la biomasa en viales de plástico y las células se esterilizaron e inactivaron en una autoclave a 15 libras de presión durante 20 minutos. Después, se lavaron con agua Milli-Q y centrifugaron a 4500 rpm para limpiar las impurezas que hubiesen quedado en el vial de plástico (el proceso de lavado se realizó 3 veces), y se almacenaron en congelación hasta los experimentos de biosorción.

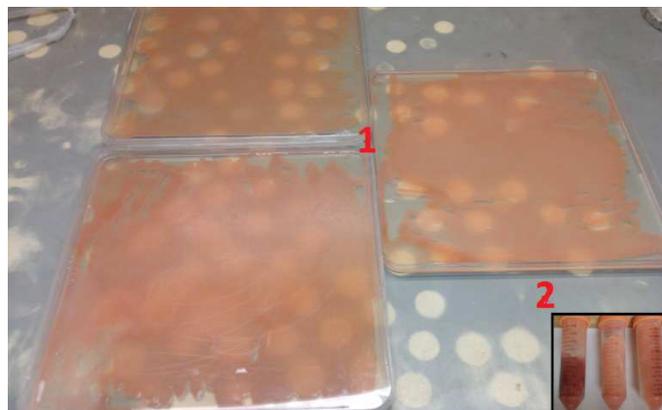


Figura 6.4.-Obtención de biomasa e inactivación. (1) desarrollo de *B. thioparans* y (2) células inactivas.

6.7 Determinación del efecto del pH en la biosorción de *B. thioparans* cepa U3 (biomasa no viable)

Para la determinación del efecto del pH en la biosorción de las bacterias no viables se utilizaron 0.1 g de biomasa en matraces que contenían 100 ml de solución metálica. Se prepararon 5 diferentes concentraciones iniciales, considerando el límite máximo permisible de acuerdo a la normatividad mexicana. El experimento se realizó por cuadruplicado y el pH de las soluciones experimentales se ajustó mediante el uso de ácido clorhídrico 0.5 M o hidróxido de sodio 0.5 M. Los matraces fueron sometidos a una agitación de 120 rpm a temperatura ambiente (25 °C) y se tomaron muestras a 0, 40, 60, 120, 240 y 360 minutos. Para medir la biosorción, las muestras fueron centrifugadas a 4500 rpm por 10 minutos y las concentraciones de Cd y Pb en el sobrenadante se analizaron en un espectrofotómetro de absorción atómica marca Varian modelo SpectrAA 220, con horno de grafito acoplado (Figura 6.5).

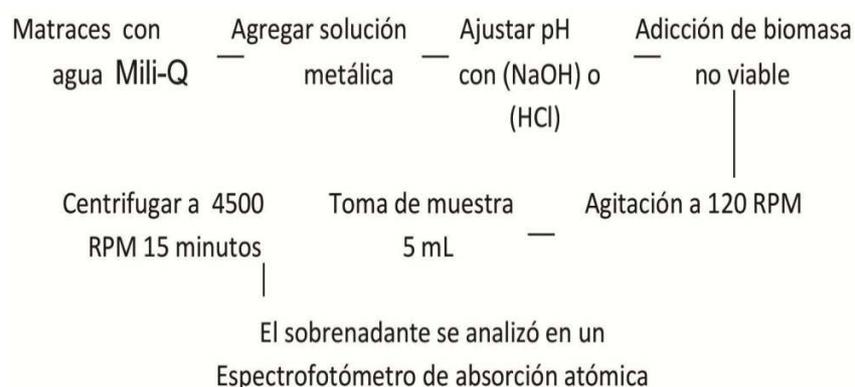


Figura 6.5.- Determinación del efecto del pH en la biosorción de Cd y Pb en *B. thioparans* (biomasa no viable).

6.8 Determinación del efecto de la temperatura en la biosorción

Para la determinación del efecto de la temperatura se utilizaron cultivos con las mismas concentraciones que los experimentos de pH, así como el valor de pH óptimo que se obtuvo en anteriores bioensayos mantenidos en una agitadora orbital con controlador de temperatura a 15, 25 y 35 °C .

6.9 Modelos de equilibrio para la biosorción de Pb y Cd

Para establecer cual es el mejor modelo para describir los efectos causados por la temperatura y la concentración en el proceso de biosorción, se utilizaron los modelos de Langmuir y Freundlich (Tabla 6.1), el primero de los cuales considera la biosorción tipo monocapa y supone que todos los sitios activos en la superficie del absorbente tienen la misma afinidad por el sorbato; mientras que, el segundo es una ecuación que supone un sistema de biosorción multicapa heterogéneo con diferentes sitios activos (Li et al., 2010).

Tabla 6.1. Modelos de biosorción en equilibrio.

Modelo	Ecuación	Ecuación lineal
Langmuir	$q_e = \frac{q_{\max} K_L C_e}{1 + K_L C_e}$	$1/q_e = 1/b * 1/C_e + 1/q_{\max}$
Freundlich	$q_e = k_F C_e^{1/n}$	$\log q_e = (1/n) \log C_e + \log K_f$

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

7. RESULTADOS Y DISCUSIONES

7.1 Curva de crecimiento y tolerancia a la salinidad

Mediante pruebas estadísticas se determinó que los datos de crecimiento registrados a las 40 horas no difieren de los determinados a las 50 horas (figura 7.1), por lo cual los siguientes experimentos terminaron a las 40 horas.

Respecto a las pruebas de salinidad, el valor de 2.5 % es una concentración ampliamente utilizada en experimentos de tolerancia a dicha variable (Gómez-Gil et al.,1999); además, el hábitat en donde fue recolectada la cepa U3 (origen estuarino; Rodríguez-Tirado, 2006) tenía una salinidad de 4 %. Esta prueba bioquímica (efecto de la salinidad) fue realizada para determinar la salinidad óptima de crecimiento de las bacterias y observar si nuestra cepa es capaz de sobrevivir también en agua dulce, dando como resultado que aún cuando la cepa mostró crecimiento a la salinidad 0 % (el medio de cultivo fue preparado a partir de los mismos ingredientes que el TSB, solo que sin NaCl), la biomasa obtenida fue menor que cuando hay presencia de NaCl. El mayor crecimiento fue obtenido con 2,5 y 4 % de salinidad (Figura 7.2). Este resultado es comparable con el trabajo realizado por Pérez Ibarra et al. (2007), en el cual se observó que la cepa *B. thioparans* logró resistir hasta un 5 % de salinidad. Tomando en consideración los valores de crecimiento (densidad óptica) después de 34 horas de iniciado el experimento, se observó que al incrementar la concentración de NaCl hay un aumento significativo en la curva de crecimiento (Figura 7.3). Dado que el mejor crecimiento fue encontrado a 2.5 y 4 % de salinidad y no hubo diferencia significativa entre estas dos condiciones, se empleó la concentración más baja (2.5 %) para reducir el ruido analítico en los siguientes experimentos.

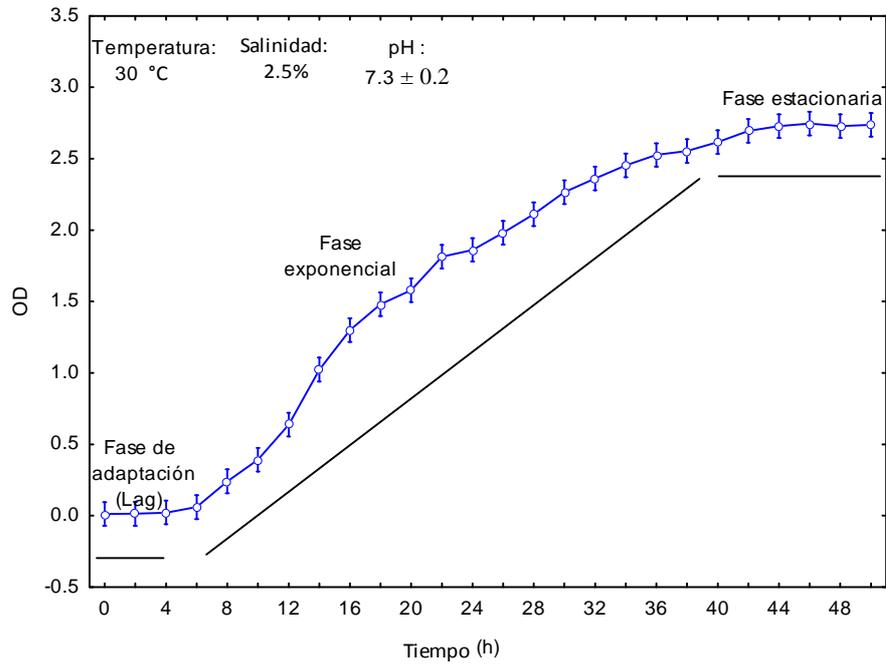


Figura 7.1.- Curva de crecimiento de *Bacillus thioparans* (n=9); las barras verticales denotan un intervalo del 0.95 de confianza.

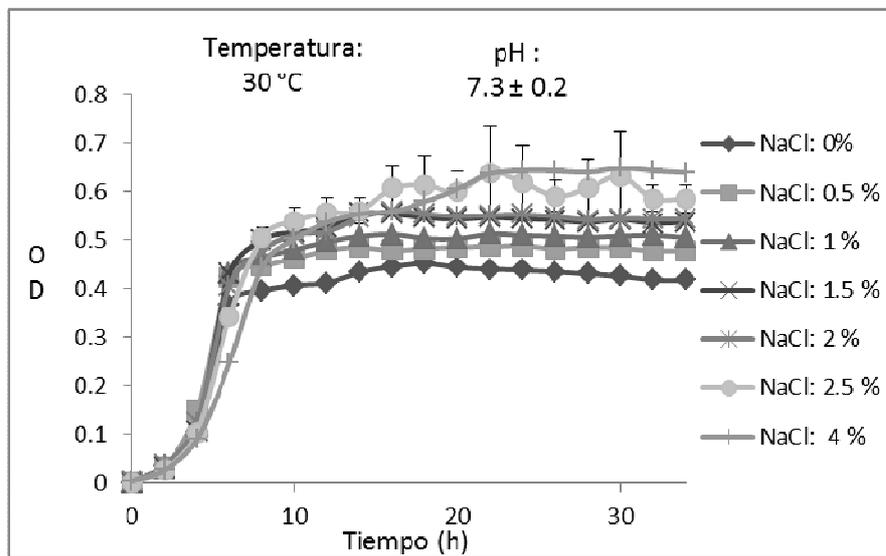


Figura 7.2.- Curva de crecimiento de *Bacillus thioparans* a diferentes salinidades

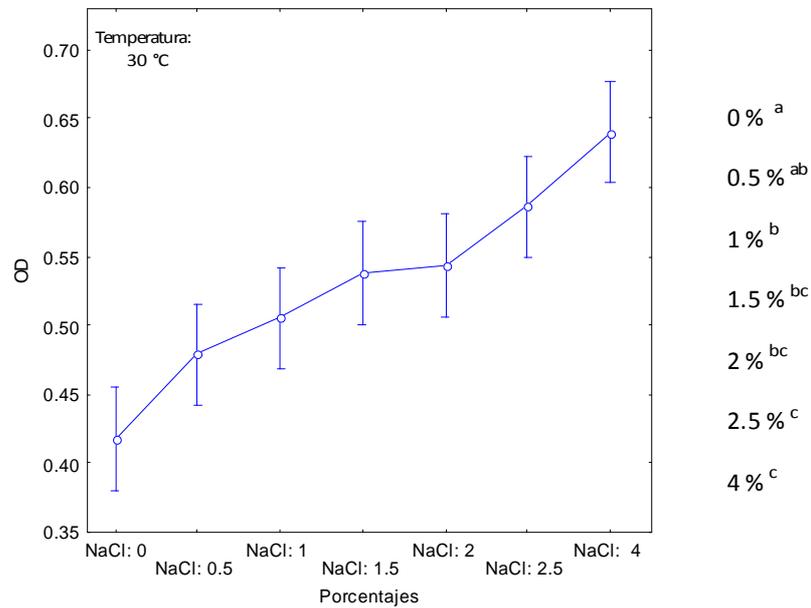


Figura 7.3.- Diferencias significativas entre diferentes porcentajes de salinidad en la fase estacionaria de *Bacillus thioparans* Tiempo: 34 horas. pH = 7.3 ± 0.2. Las barras verticales denotan un intervalo de confianza del 0.95. (Letras diferentes indican diferencia significativa).

El primer experimento se llevó a cabo con entrada intermitente de aire debido a la aereación durante la toma de muestras cada 2 horas, y se obtuvo una densidad óptica mayor (Fig. 7.1) que en aquellos experimentos en los que no existió entrada adicional de oxígeno (Fig. 7.2), debido al uso del espectrofotómetro portátil HACH DR que permitió realizar el bioensayo sin abrir y cerrar las tapas de los tubos, ya que sólo se transportaban a la cámara del espectrofotómetro y se analizaban. La razón de la diferencia de crecimiento respecto a la presencia o ausencia de aereación se debe a la propiedad de *B. thioparans* de formar esporas (Rodríguez-Tirado, 2006), lo cual hace que al acabarse el oxígeno en el contenedor donde se colocó el caldo nutritivo, la cepa empiece a esporular y ya no crezca normalmente. La germinación de la célula empezará nuevamente en presencia de oxígeno (Murray et al., 2009).

Adicionalmente, se realizó una prueba en la cual se mantuvo una entrada

constante de oxígeno (aireación con mangueras y filtros) para observar si existía un mejor crecimiento de las bacterias, mostrando una completa inhibición en el crecimiento, lo cual indica que la cepa es muy susceptible al exceso de aereación.

7.2 Efecto de la presencia de Cd y Pb en el crecimiento de *Bacillus thioparans*.

Respecto al efecto de la presencia de Cd sobre el desarrollo de las bacterias, se observó una pequeña disminución cuando la concentración fue de 0.1 mg L⁻¹. Dicho efecto fue más notable cuando se aumentó la concentración a 0.5 mg L⁻¹ (Figura 7.4). A partir de esta concentración, al incrementar el contenido de Cd (1, 5 y 10 mg L⁻¹), se presentó una recuperación en la curva de crecimiento, llegando a ser similar al control (sin Cd) a una concentración de 10 mg L⁻¹. Como ejemplo, en la misma figura se incluye la curva de crecimiento a una concentración de 20 mg Cd L⁻¹, que indica una inhibición en el desarrollo de la bacteria a partir de esta concentración, que continuó con las concentraciones mayores (40, 60, 80 y 100 mg L⁻¹), no mostradas en la figura.

En las concentraciones de 0.1 y 0.5 mg L⁻¹, se observó el efecto de Cd sobre el organismo, en tanto que en concentraciones intermedias (1 a 10 mg L⁻¹), su efecto tóxico está contrarrestado por un efecto benéfico producido por la presencia de nitrógeno (Pivnicková et al., 2010), dado que el Cd se adicionó como nitrato, cuya concentración aumentó al incrementar la de Cd.

Sin embargo, se observó una etapa de adaptación lenta, por lo que se asume que (1) a concentraciones > 20 mg L⁻¹ la cepa no pasó de la etapa de adaptación y no alcanzó la fase exponencial durante el tiempo que duraron los experimentos (24 h), ó (2) el efecto tóxico de la alta concentración del Cd dominó sobre el efecto benéfico de la presencia de N.

Respecto al efecto tóxico del Cd (NO₃)₂4H₂O, Lebeau et al. (2001) reportaron que en concentraciones de 10 mg L⁻¹ se observó un comportamiento similar, con un efecto débil del Cd sobre el crecimiento de la cepa R27 debido a que el efecto del nutriente es más notorio cuando sus concentraciones son elevadas.

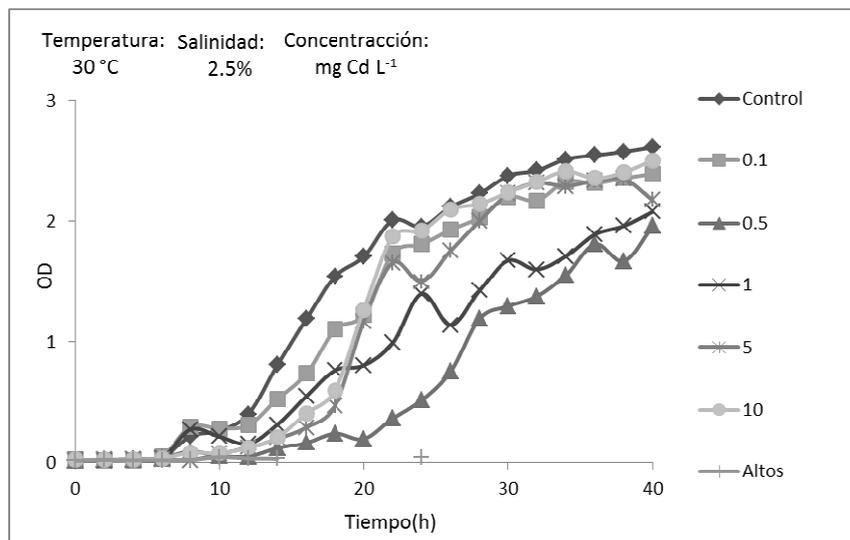


Figura 7.4.- Tolerancia de *Bacillus thioparans* a diferentes concentraciones de Cd (n=3).

Después de 40 horas, se observó (Figura 7.5) que al incrementar la concentración de Cd $(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ hubo una disminución significativa del 24.92 % en la densidad óptica en la concentración 0.5 mg L⁻¹, el cual fue el valor mínimo de crecimiento y al seguir aumentando la concentración hasta 10 mg L⁻¹ se observó una recuperación del 95.82% en la curva de crecimiento con respecto al blanco.

Por otro lado, los resultados obtenidos en la prueba de exposición a Pb a concentraciones bajas (0.1 y 0.5 mg L⁻¹) e intermedias (1, 5 y 10 mg L⁻¹) mostraron, en términos generales, un comportamiento similar al Cd. Sin embargo, se presentó una diferencia en el tiempo de la fase de adaptación de las bacterias. En el experimento con Pb dicha etapa duró 6 horas; mientras que con Cd empezó a crecer exponencialmente después de 9-10 horas. Como se observa en la figura 7.6, el mayor crecimiento se obtuvo en la concentración de 0.1 mg L⁻¹, siguiendo la concentración de 10 mg L⁻¹ y los valores mínimos de crecimiento se obtuvieron en las concentraciones de 0.5 mg L⁻¹ y 5 mg L⁻¹.

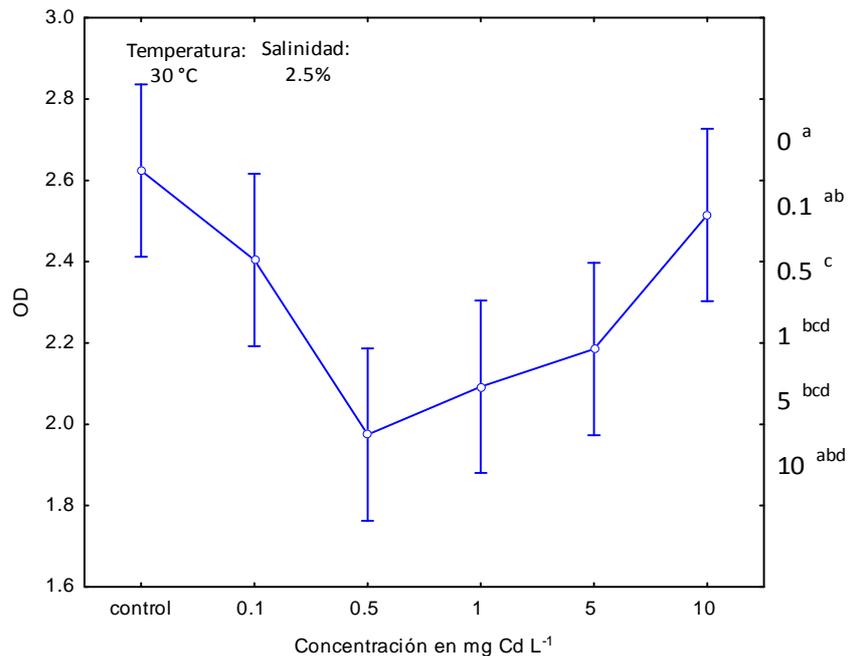


Figura 7.5.- Diferencias significativas entre diferentes concentraciones de Cd entrando en la fase estacionaria de *Bacillus thioparans*. Tiempo: 40 horas. Las barras verticales denotan un intervalo de confianza del 0.95. (Letras diferentes indican diferencia significativa).

Como se mencionó anteriormente, el efecto del nutriente contra el efecto del metal se ve relacionado con los crecimientos de la cepa U3, en los que se observa que a concentraciones bajas el efecto tóxico del Pb es ligeramente mayor al benéfico del N; sin embargo, en las concentraciones 0.5, 1 y 5 mg L⁻¹ el efecto del Pb es más fuerte, por lo que se observa una reducción en el crecimiento de la cepa.

A concentraciones de 10 mg L⁻¹, el efecto del N se hace notar más que el efecto del Pb. El Pb²⁺ es, en general, una de las especies más tóxicas de dicho metal. Cualquier factor que incremente la formación de complejos y por tanto, decrezca la concentración de Pb²⁺ afectanegativamente la toxicidad del Pb. El estudio realizado por Freedman et al. (1980), relativo al efecto de la toxicidad sobre las diferentes especies de Pb en *Hyalella azteca*, demostró que la

mortalidad más alta fue provocada por Pb^{2+} . Los iones cloruro y carbonato en el agua de mar forman complejos con el plomo; por lo tanto, un incremento en la salinidad y dureza podrá resultar en un decremento de la toxicidad y por ende un mejor crecimiento de la cepa (Louma y Rainbow, 2008).

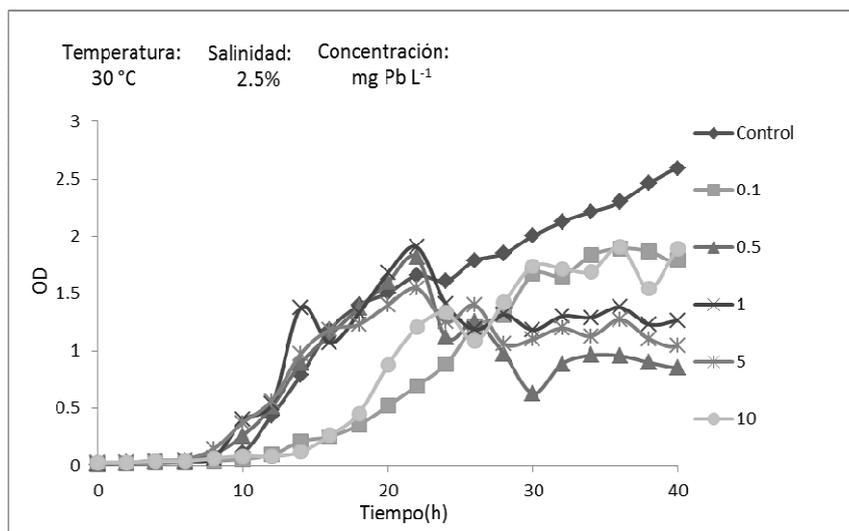


Figura 7.6 Tolerancia de *Bacillus thioparans* a bajas concentraciones de Pb(0.1, 0.5, 1, 5 y 10 mg L⁻¹) (n=3).

A las de 40 horas de iniciado el experimento, se observaron datos similares a los de Cd (Figura 7.7), en el cual al incrementar la concentración de Pb (NO₃)₂ se observó una disminución significativa del 67.17 % en la curva de crecimiento en la concentración 0.5 mg L⁻¹, la cual presentó el valor mínimo de crecimiento, y al seguir aumentando la concentración hasta 10 mg L⁻¹ se observó una recuperación en el crecimiento bacteriano del 72.90 %, con respecto al blanco.

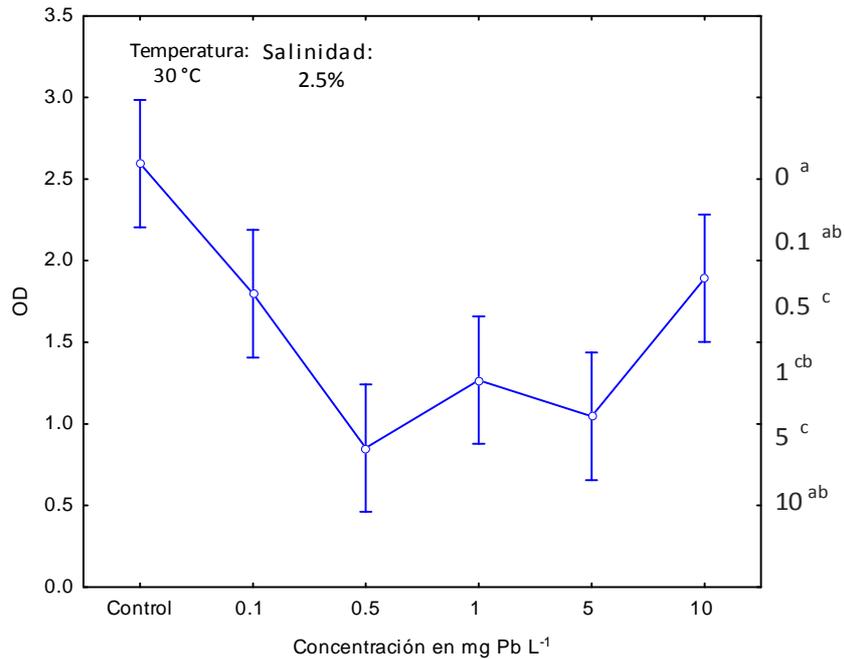


Figura 7.7.-Diferencias entre concentraciones bajas de Pb en la fase estacionaria de *Bacillus thioeparans*. Tiempo: 40 horas. Las barras verticales denotan un intervalo de confianza del 0.95 (letras diferentes indican diferencia significativa).

Por otro lado, a diferencia que con el Cd, el resultado obtenido en la prueba de exposición a concentraciones altas de Pb (20, 40, 60, 80 y 100 mg L⁻¹) fue que a mayor concentración del metal se presentó mayor crecimiento de las bacterias (Figura 7.8).

Tomando en consideración los valores de crecimiento (densidad óptica) después de 40 horas de iniciado el experimento, se observó (Figura 7.9) que al incrementar la concentración de Pb (NO₃)₂ existió una disminución significativa del 20.49 % en la curva de crecimiento en la concentración de 20 mg L⁻¹, el cual fue el valor mínimo de crecimiento y al seguir aumentando la concentración hasta 100 mg L⁻¹, se observó una recuperación en el crecimiento bacteriano con respecto al blanco del 89.94 %; así como una disminución del pH inicial que fue 7.3 hasta 5.

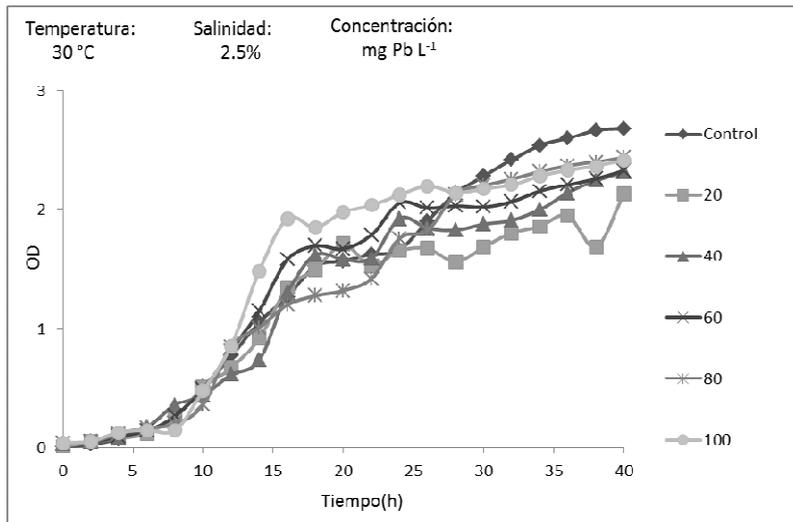


Figura 7.8 Tolerancia de *Bacillus thioparans* al Pb en altas concentraciones (20, 40, 60, 80 y 100 mg L⁻¹) (n=3).

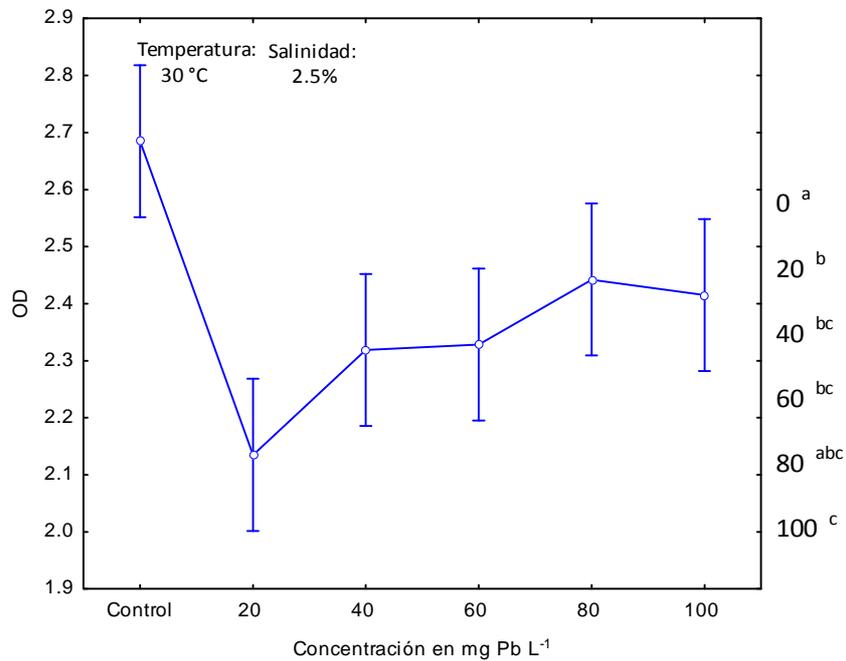


Figura 7.9. Diferencias significativas entre concentraciones altas de Pb en la fase estacionaria de *Bacillus thioparans*. Tiempo: 40 horas. Las barras verticales

denotan un intervalo de confianza del 0.95 (letras diferentes indican diferencia significativa).

Con la finalidad de eliminar el efecto del nitrógeno en las sales utilizadas anteriormente, se procedió a realizar experimentos con cloruros de Cd y Pb, pero únicamente a concentraciones de 0 (control), 0.5 y 10 mg L⁻¹. Estas últimas fueron seleccionadas porque fueron en las que se observó mayor inhibición y recuperación (respectivamente) en el crecimiento bacteriano al emplear las sales nitrogenadas. Se observó una completa inhibición del crecimiento al utilizar CdCl₂ (Fig. 7.10), tanto en la concentración de 0.5 mg L⁻¹ como en la de 10 mg L⁻¹, a diferencia de cuando se enriqueció el caldo con N.

Como se observa en la figura 7.10, existe una discontinuidad en el crecimiento del experimento control; esto es debido a que fue realizado principalmente sin oxígeno, con la finalidad de observar su fase estacionaria a las 16 horas y siguiendo hasta las 34 horas, como se muestra anteriormente en la prueba de salinidad realizada sin la entrada de oxígeno. Sin embargo, para comprobar que la entrada de oxígeno dispara el crecimiento de la cepa estudiada, se optó por seguir tomando muestras a más tiempo y se observó que las bacterias siguieron desarrollándose. Por lo anterior, se obtuvieron dos tipos de fase estacionaria en la curva de crecimiento; la primera sin entrada de oxígeno y la segunda con mayor desarrollo debido a la entrada intermitente de oxígeno.

Estudios anteriores sobre el desarrollo de esta cepa con la entrada intermitente de oxígeno demuestran una densidad óptica similar a la determinada en este estudio (Valencia-Valdez, 2008) y estudios sobre la cepa *Bacillus thioparans* demuestran que esta puede producir esporas para protegerse del ambiente adverso en el que se encuentra, ya sea por la falta de nutrientes, la presencia de tóxicos o por la falta de oxígeno disuelto en el medio (Rodríguez-Tirado, 2006).

Sin embargo, no se había considerado realizar esta prueba sin la entrada de oxígeno, debido a que no se contaba con el equipo necesario. El equipo utilizado para realizar la prueba sin la entrada de oxígeno fue un espectrofotómetro portátil HACH DR/2010, propiedad del Laboratorio de Microbiología del CIAD Mazatlán

Sinaloa.

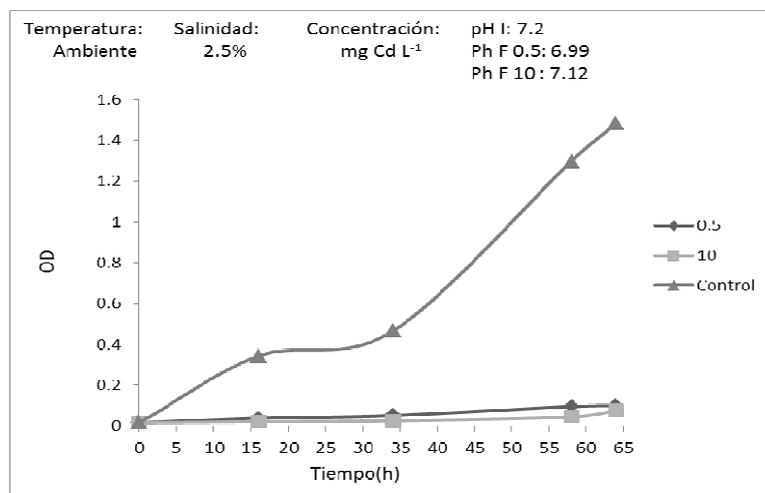


Figura 7.10.- Tolerancia de *Bacillus thioparans* al CdCl₂ a bajas concentraciones (0.5 y 10 mg L⁻¹) (n=4).

Los resultados obtenidos para la prueba de exposición ante PbCl₂ fueron parecidos a los encontrados cuando se utilizó Pb (NO₃)₂ con una concentración de 0.5 mg L⁻¹, demostrando que el efecto benéfico del N es más débil que el efecto tóxico del Pb. A una concentración de 10 mg L⁻¹, se observó un menor crecimiento con respecto a los bioensayos en los que se utilizó la sal nitrogenada, debido a que en estos últimos se hace notar más el efecto positivo del N que el tóxico del Pb. Asimismo, en estos experimentos también se observó una discontinuidad en el crecimiento entre las horas 16 y 34 (Figura 7.11).

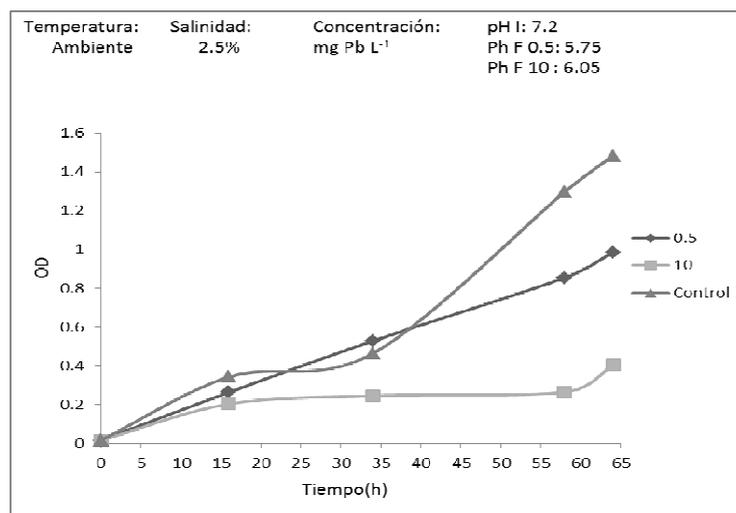


Figura 7.11.- Tolerancia de *Bacillus thioparans* a bajas concentraciones de PbCl₂ (0.5 y 10 mg L⁻¹) (n=4).

Inicialmente el objetivo general de este proyecto era determinar tanto el efecto de la exposición a Cd y Pb en el crecimiento de la cepa bacteriana *Bacillus thioparans* U3; así como la influencia del pH y la temperatura en la biosorción de dichos contaminantes por biomasa viable de la bacteria *B. thioparans* cepa U3, pero, debido a los resultados sobre el efecto de otras sales en las soluciones, así como el efecto tóxico del Cd y Pb sobre la bacteria, se optó por usar la cepa no viable en los siguientes experimentos de biosorción.

7.3 Cinética de biosorción (adsorción) de Pb por *Bacillus thioparans* no viable bajo diferentes condiciones de concentraciones iniciales y pH

Para determinar la capacidad de biosorción de Pb por *Bacillus thioparans* a diferentes concentraciones iniciales del metal (0.1, 0.5, 1, 5, 10 mg L⁻¹; concentraciones nominales), así como a diferentes valores de pH (3, 4.5 y 6), se realizaron bioensayos a una temperatura de 25 °C y una biomasa no viable de 0.1 g L⁻¹. Primeramente, se determinó el tiempo de equilibrio entre el adsorbente y el adsorbato usando muestras obtenidas después de 0, 20, 40, 60, 120, 240 y 360

min. Se observó una adsorción rápida en los primeros 20 minutos, llegando al equilibrio en la mayoría de las concentraciones experimentadas y a distintos pH. Al final del proceso, la adsorción logró una remoción casi total para pH 4.5 y 6.

A pH 3 y concentraciones de 0.11, 0.50, 1.02, 5.31, 10.35 mg L⁻¹, la adsorción alcanzó su equilibrio a los 20 minutos (Figura 7.12), observándose un equilibrio al contacto en diferentes concentraciones de Pb. Para un pH de 4.5 y concentraciones de 0.06, 0.56, 0.74, 3.42, 8.14 mg L⁻¹, el equilibrio del proceso fue alcanzado en 20 min en las 3 primeras concentraciones y a las 2 h en las más altas. Existen varios pasos involucrados en el mecanismo de adsorción que se ocupan de la transferencia de metal de la solución a la superficie del biosorbente (Weber, 1985): en el primer paso se lleva a cabo el mezclado de los iones metálicos a la solución; en el segundo paso, se da la difusión del metal hacia una capa límite hidrodinámica alrededor de la superficie del biosorbente; y en el tercero los iones metálicos son adsorbidos por los sitios activos de la biomasa, la adsorción se considera que es rápida, lo que equivale a una reacción en equilibrio, similares a los resultados obtenidos a pH 4.5, en el cual el equilibrio se alcanzó en tiempo corto.

Para un pH de 6 y concentraciones de 0.01, 0.07, 0.52, 2.77 y 7.44 mg L⁻¹, el proceso alcanzó su equilibrio a los 20 min, excepto para 0.52 mg L⁻¹ en la cual ocurrió a los 40 min, observándose un equilibrio de manera similar que a pH 3. Lo anterior es debido a que a pH 3 quedan pocos sitios de interacción entre el metal y los sitios activos protonados de la membrana celular (Gadd, 1988) y para pH 6 el equilibrio alcanzado a tiempos de 20 y 40 min se debe a que a un pH alto el plomo empieza a precipitar (según Golab et al. (1991) y Volesky y Holan (1995) el Pb precipita a pH 5) y, debido a esto, no se obtienen las concentraciones teóricas deseadas (0.1, 0.5, 1, 5 y 10 mg L⁻¹), asimismo a estas condiciones de pH la pared celular empieza a desprotonarse, por lo tanto las concentraciones reales son menores y existe un mayor número de sitios activos; por esto, al ser menos cationes se lograran acomodar más rápidamente en los sitios activos de membrana celular alcanzando su equilibrio en menor tiempo (Guibal et al., 1992).

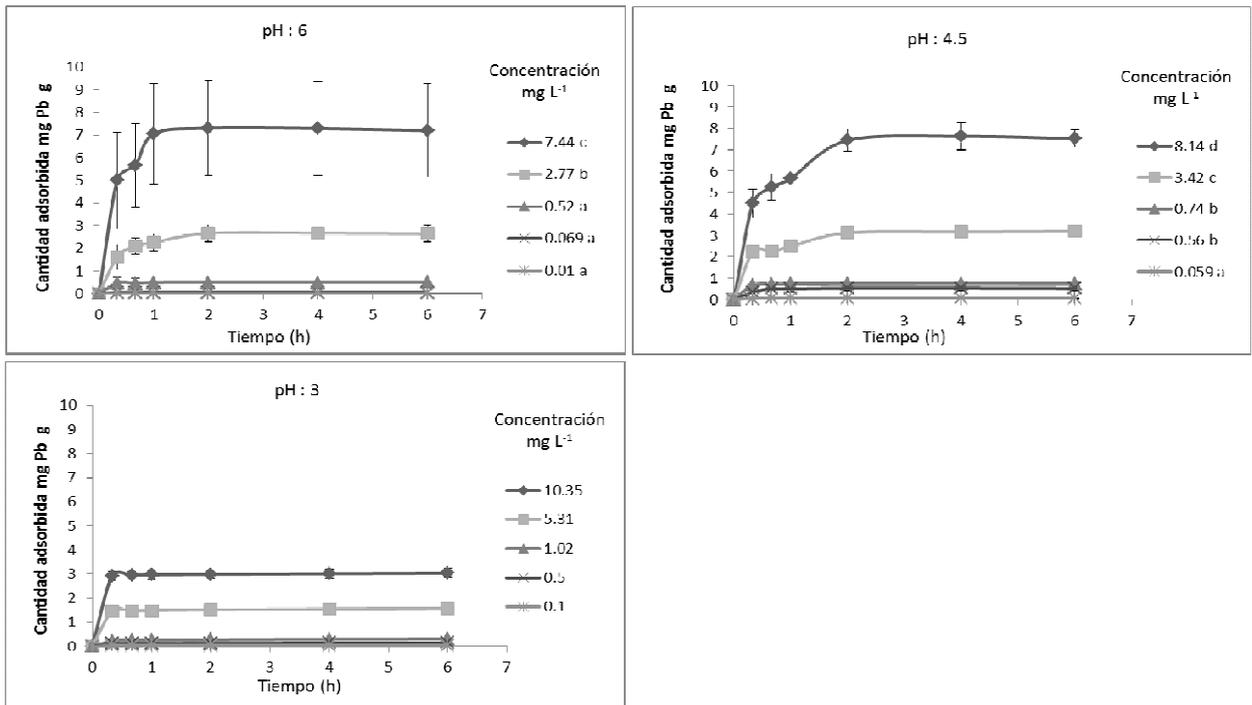


Figura 7.12.- Efecto de la concentración de Pb en la adsorción de biomasa no viable de *Bacillus thioparans*. Temperatura 25 °C, biomasa: 0.1 g L⁻¹. Análisis de varianza de dos vías (ANOVA) p<0.05; Bonferroni post-tests p<0.05 (95% intervalos de confianza), n=4. (Letras diferentes indican diferencia significativa).

Resultados observados en los blancos, muestran que a pH 3 las concentraciones teóricas fueron prácticamente las esperadas, y en los bioensayos a pH de 4.5 y 6 se observó un precipitado (Figura 7.13). Se observó una diferencia significativa entre pH 4.5 y 3, y entre pH 6 y pH 3 y 4.5 lo cual indica que a pH elevados el Pb comienza a precipitar. Asimismo, se realizaron blancos con la cepa en las soluciones para determinar si la bacteria o los residuos del medio contenían trazas de Cd o Pb, dando resultados de niveles no detectables de estos metales.

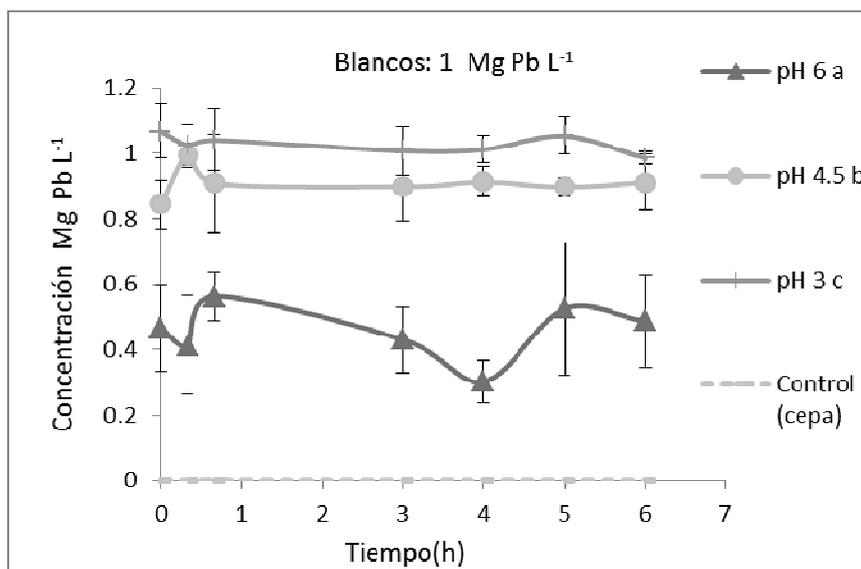


Figura 7.13.- Controles de Pb a una concentración de 1 mg L⁻¹, diferentes pH, 25 °C y 0.1 g L⁻¹ de biomasa. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) p<0.05; post prueba Tukey p<0.05 (95% intervalos de confianza), n=4. (Letras diferentes indican diferencia significativa).

Al incrementar la concentración de Pb, se observó un aumento de la adsorción (Figura 7.12) debido a la presión ejercida por los iones metálicos que están en competencia con los iones hidrógeno (Adesola-Babarinde et al., 2010, López-Mesas et al., 2011).

Al obtenerse una discontinuidad en las concentraciones iniciales (tabla 7.1), debido a la precipitación de Pb causada por el pH, no se pudieron verificar diferencias significativas de adsorción para cada concentración. Sin embargo, de acuerdo con la tabla 7.1 y usando el software Graphpad-prisma versión 5, se pudieron comparar las adsorciones a concentraciones iniciales que no presentaron diferencias significativas entre sí a los diferentes pH y, con base en ello, se obtuvo en general una diferencia significativa en la adsorción a pH 6 y 4.5 respecto a la de pH 3; siendo a pH 3 en el que se obtuvo la menor cantidad adsorbida. Entre pH 6 y 4.5 no hay diferencias significativas entre la adsorción a diferentes concentraciones.

Tabla 7.1. Promedio de las concentraciones de Pb y sus desviaciones estándar (SD) a diferentes pH. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) $p < 0.05$; post prueba Tukey $p < 0.05$ (95% intervalos de confianza), $n=4$ y t de student. (Letras diferentes indican diferencia significativa y letras iguales indican que no hay diferencia significativa). Temperatura de 25 °C, biomasa de 0.1 g.

pH	Concentraciones mg Pb L ⁻¹									
	± SD		± SD		± SD		± SD		± SD	
6	0.01	0.00	0.06 ^a	0.03	0.52 ^b	0.26	2.77 ^c	0.37	7.44 ^d	2.07
4.5	0.05 ^a	0.01	0.56 ^b	0.14	0.74	0.04	3.42 ^c	0.10	8.14 ^d	0.55
3	0.11	0.02	0.50 ^b	0.22	1.02	0.01	5.31 ^d	0.10	10.35	0.01

En la Figura 7.14 se observa la cantidad adsorbida de Pb y en la figura 7.15 y la tabla 7.2 se presentan los porcentajes de remoción de dicho metal. A una concentración inicial promedio de 6.96 ± 1.47 , 3.09 ± 0.46 , 0.53 ± 0.03 y 0.05 ± 0.01 mg Pb L⁻¹, no se observaron diferencias significativas entre los resultados de los experimentos realizados a la misma concentración a valores de pH de 4.5 y 6. Siendo significativamente mayores a la remoción observada a pH 3 y concentraciones iniciales de 6.96 ± 1.47 y 0.53 ± 0.03 mg Pb L⁻¹. Al tener una menor cantidad de cationes en el agua y siendo que al incrementar el pH la pared celular empieza a desprotonarse, hay más sitios activos para la interacción entre el metal y la pared celular (Guibal et al., 1992), dando como resultado una remoción más alta conforme aumenta el pH.

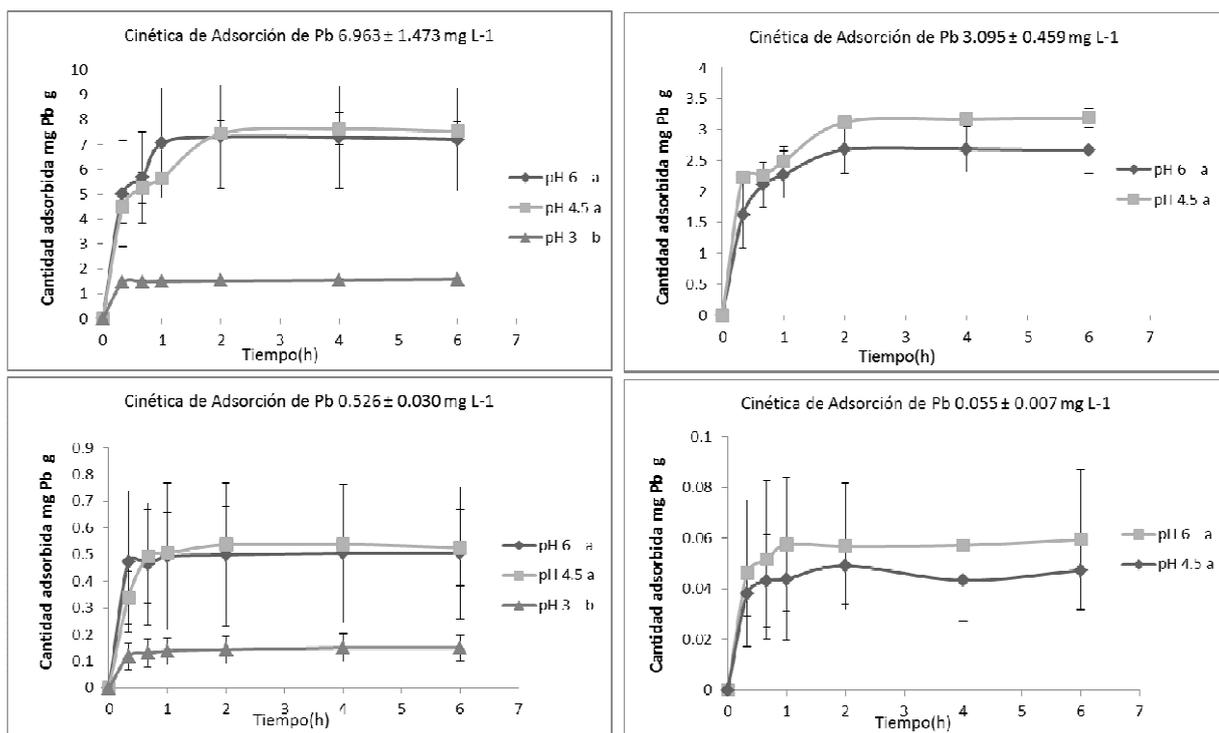


Figura 7.14.- Cinética de biosorción de Pb mediante el uso de *Bacillus thioparans* no viable, a una temperatura de 25 °C y biomasa 0.1 g L⁻¹ (n=4). Análisis de varianza de una vía (ANOVA) p<0.05; post prueba Tukey p<0.05 (95% intervalos de confianza), n=4. (Letras diferentes indican diferencia significativa). Concentraciones iniciales: 5.31, 7.44, 8.14; promedio = 6.963 ± 1.473 (ver tabla 7.1).

Se optó por utilizar el pH 4.5 en siguientes experimentos de temperatura, ya que con éste se determinó la mayor cantidad adsorbida, así como menor precipitación o sin precipitación. Bioensayos realizados por Rodríguez-Tirado (2006) indicaron que a pH 4 se obtiene un buen porcentaje de remoción así como en otros estudios realizados por Sag et al. (1995), quienes trabajaron con *Zoogloea ramigera* y *Rhizopus arrhizus*, encontrando el valor más alto de adsorción de Pb a pH de 4.5-5, que es un valor similar al obtenido en este estudio.

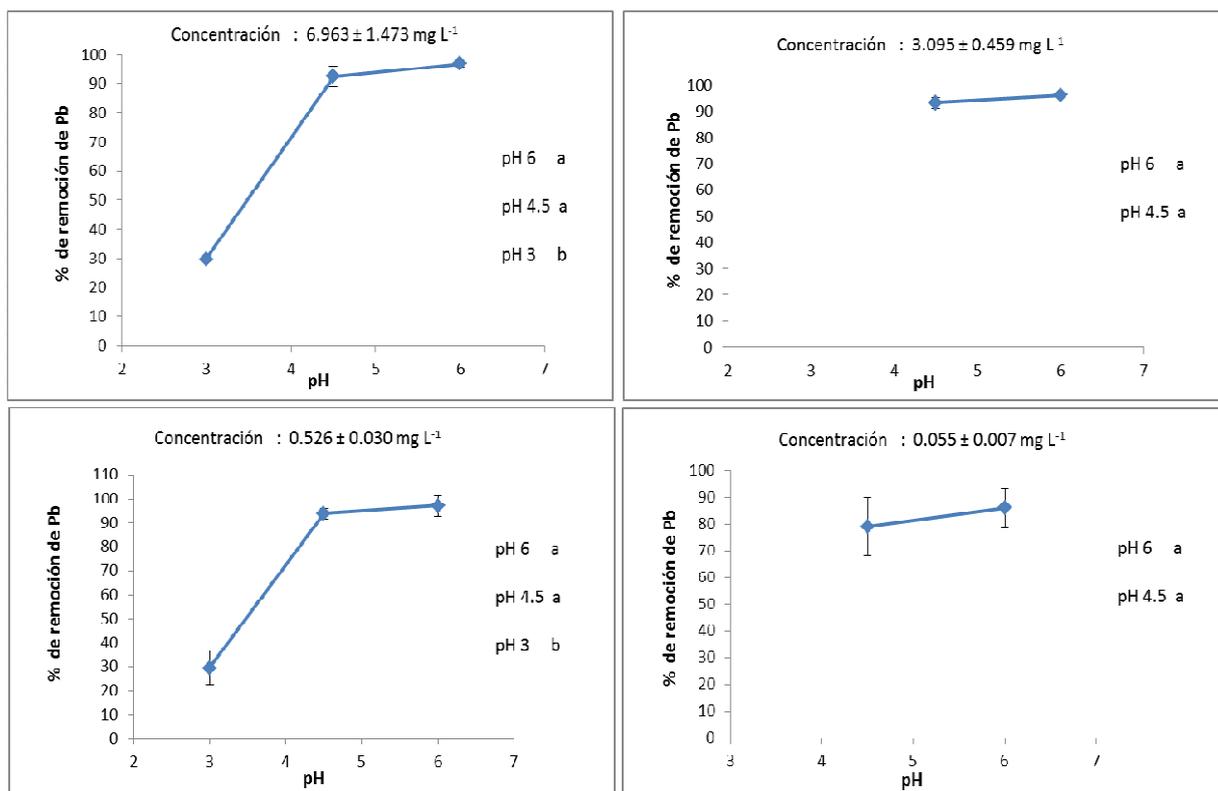


Figura 7.15.-Porcentaje de remoción de Pb por biomasa no viable de *Bacillus thioparans*, a diferentes concentraciones iniciales y diferentes pH. 25 °C, biomasa de 0.1 g L⁻¹. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) p<0.05; post prueba Tukey p<0.05 (95% intervalos de confianza), n=4. (Letras diferentes indican diferencia significativa).

Tabla 7.2. Porcentajes en la biosorción de Pb mediante el uso de *Bacillus thioparans* a diferentes concentraciones iniciales, pH y desviación estándar (SD). Letras diferentes indican diferencia significativa análisis de varianza de una vía (ANOVA) p<0.05; post prueba Tukey p<0.05 (95% intervalos de confianza), n=4. (Letras diferentes indican diferencia significativa).

pH	% de Pb adsorbido									
	± SD	±SD	± SD	± SD						
6	90.8	5.28	83.93a	7.24	97.41b	4.22	95.95c	0.53	96.61d	1.09
4.5	77.64a	10.95	93.45b	2.09	100	0	93.2c	1.75	92.4d	1.56
3	27.16	7.85	29.5b	7.09	30.59	3.18	29.7d	0.53	29.34	1.81

Durante los bioensayos se observó que el pH inicial cambiaba cuando se adicionaba la solución de metal. Cuando los valores de pH en los experimentos eran ácidos estos tendían a subir hasta su neutralidad. Tsezos y Volesky (1981), observaron este proceso y explicaron este aumento de pH como un proceso de hidrólisis inversa del ion metálico que libera grupos OH⁻.

7.4 Cinética de biosorción (adsorción) de Cd por *Bacillus thioparans* bajo diferentes condiciones de pH y concentraciones iniciales.

Para determinar la capacidad de biosorción de Cd por *Bacillus thioparans* a diferentes pH (3, 4, 5 y 6), así como a diferentes concentraciones iniciales (0.1, 0.5, 1, 5, 10 mg L⁻¹), se realizaron bioensayos a una temperatura de 25 °C y una biomasa de 0.1 g L⁻¹; primeramente se determinó el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio entre adsorbente y adsorbato por lo que se muestreó a 0, 20, 40, 60, 120, 240 y 360 minutos, observándose que alcanza un equilibrio en la adsorción a concentraciones bajas como 0.1 y 0.5 mg L⁻¹ a los diferentes pH dados. Al igual que el Pb al terminar los bioensayos, la adsorción alcanzó una remoción casi total para pH 4.5 y 6 (Tabla 7.3).

Tabla 7.3. Porcentajes en la biosorción de Cd mediante el uso de *Bacillus thioparans* no viable a diferentes concentraciones iniciales pH y desviación estándar (SD). Prueba de Tukey p<0.05, n=4.

pH	% de Cd adsorbido									
	0.1 mg L ⁻¹	±SD	0.5 mg L ⁻¹	±SD	1 mg L ⁻¹	±SD	5 mg L ⁻¹	±SD	10 mg L ⁻¹	±SD
6 a	100	0	95.13	2.28	93.99	1.25	94.86	1.46	90.62	0.75
4.5 a	100	0	95.04	0.99	94.72	1.44	96.58	1.85	89.51	3.51
3 b	13.55	7.95	30.15	12.71	37.47	5.2	25.32	0.71	12.14	1.08

A pH 3 y concentraciones de 0.1, 0.5, 1, 5, 10 mg L⁻¹ se alcanzó el equilibrio a los 20, 40, 20, 40 y 40 minutos, respectivamente (Figura 7.16), obteniendo una

remoción del 13.55, 30.15, 37.47, 25.32 y 12.14 % respectivamente (Figura 7.17). Para pH 4.5 y concentraciones de 0.1, 0.5, 1, 5, 10 mg L⁻¹ el equilibrio se alcanzó a los 20, 20, 20, 40 y 20 minutos, con remociones del 100, 95.04, 94.72, 96.58 y 89.51 %, respectivamente, observando que el equilibrio se alcanza después de 20 minutos con todas las concentraciones.

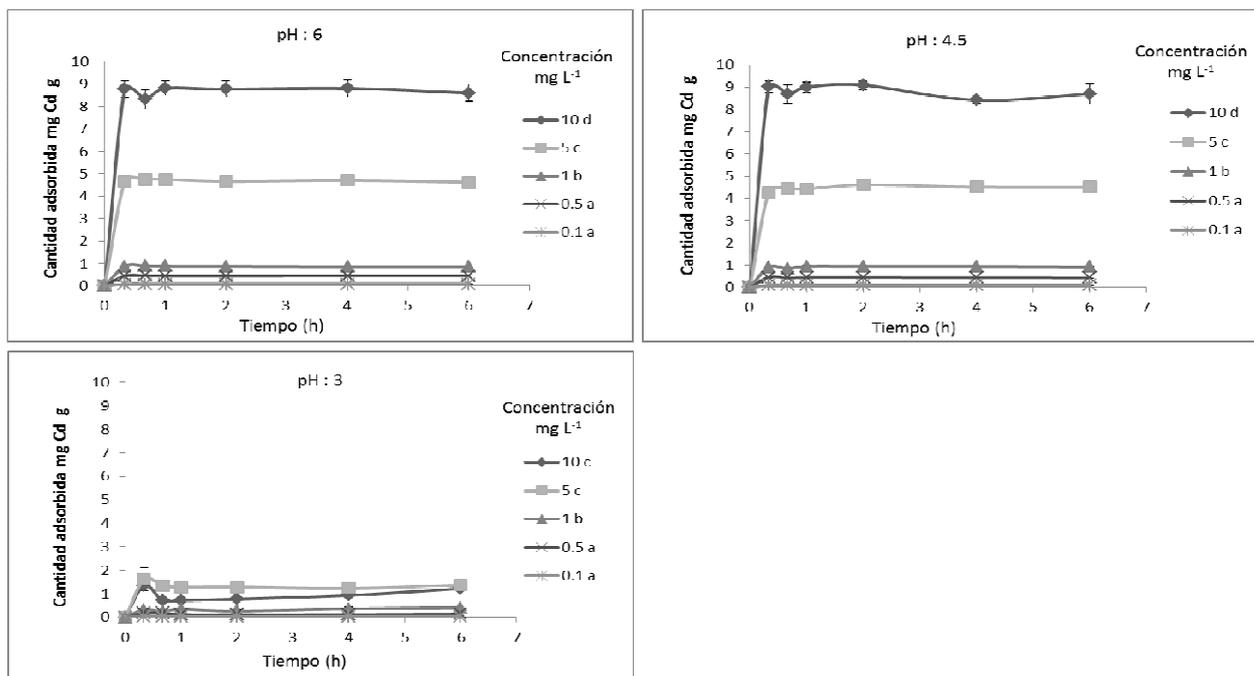


Figura 7.16.- Efecto de la concentración inicial (0.1,0.5,1,5 y 10 mg L⁻¹) de Cd en la adsorción de biomasa no viable de *Bacillus thioeparans*. Temperatura de 25 °C, biomasa de 0.1 g L⁻¹. Análisis de varianza de dos vías (ANOVA) p<0.05; Bonferroni post-tests p<0.05 (95% intervalos de confianza), n=4. (Letras diferentes indican diferencia significativa).

Para un pH de 6 y concentraciones de 0.1, 0.5, 1, 5, 10 mg L⁻¹, se alcanzó el equilibrio a los 20, 20, 20, 20 minutos y 1 h, con una remoción del 100, 95.13, 93.99, 94.86 y del 90.62 %, respectivamente. Se observó que a pH 6 el equilibrio se alcanzó a menor tiempo a concentraciones bajas, indicando que al existir pocos cationes disueltos en las soluciones experimentales así como que al aumentar el pH se desprotonan los sitios activos para la interacción entre metal y la pared

celular, por lo que hay más sitios disponibles para una rápida adsorción. Se observó una discontinuidad en el equilibrio para el pH de 3, debido a que los sitios activos están protonados (López-Mesas et al., 2011).

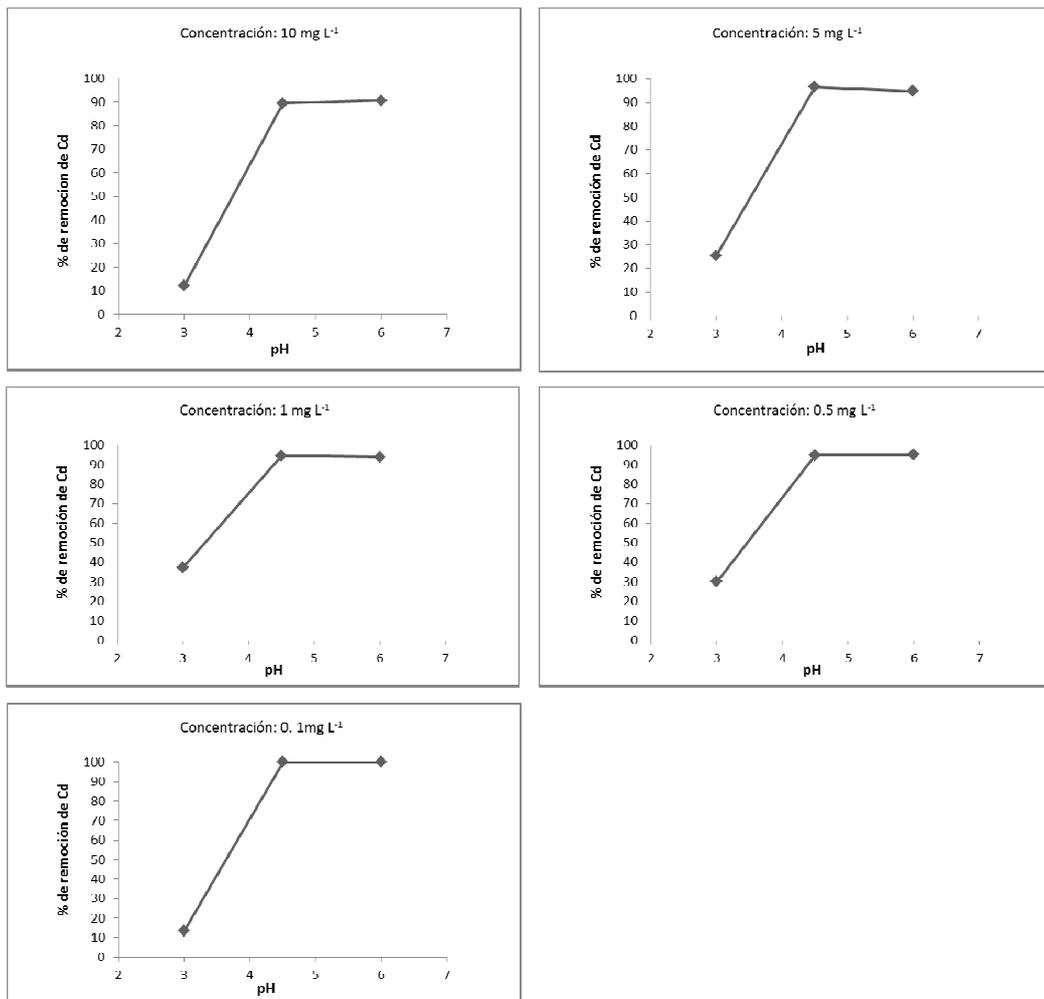


Figura 7.17.- Porcentaje de remoción de Cd por biomasa no viable de *Bacillus thioparans* a diferentes pH y concentraciones iniciales(0.1,0.5,1,5 y 10 mg L⁻¹) . Temperatura de 25 °C y biomasa de 0.1 g L⁻¹.

Se observó que al incrementar la concentración inicial de Cd aumenta la adsorción (Figura 7.16), debido a la presión ejercida por los iones metálicos que están en competencia con los iones hidrógeno (Adesola-Babarinde et al., 2010;

López-Mesas et al., 2011).

Se realizaron pruebas estadísticas para cada pH a las diferentes concentraciones para encontrar si existen diferencias significativas entre las cantidades adsorbidas de Cd (Figura 7.17) y determinar en qué pH se logró adsorber mayor cantidad de Cd. Se observó que a un pH de 3 disminuyó la cantidad adsorbida con respecto a pH mayores, debido a que los sitios activos disponibles para la interacción entre el catión y la pared celular se encuentran protonados.

Puranik et al. (1995) utilizaron *Streptomyces pimprina* para cuantificar la remoción de Cd y demostraron que a un pH de 2 no hay adsorción y que el grado de adsorción aumenta conforme incrementa el pH. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas entre los experimentos realizados a pH 4.5 y 6 para todas las concentraciones iniciales de Cd.

En estudios realizados por Rodríguez-Tirado (2006) se observó que existe una tendencia a incrementar el porcentaje de remoción conforme el pH aumenta y que el pH óptimo encontrado en su estudio es 7; por este motivo, en el presente estudio se seleccionó el pH 6. Esto quiere decir que la biosorción es dependiente del pH, así como de la concentración inicial de iones metálicos disueltos en la solución.

Tangaromsuk et al. (2002) mencionan respecto al rendimiento de remoción por *Sphingomonas paucimobilis* en condición no viable, que los procesos de la autoclave para inactivar las células destruyen los sitios activos entre el metal y la pared celular, por lo que al utilizarlas no se logra una remoción eficiente. En el presente estudio no hay lisis celular demostrado en anteriores estudios por Green-Ruiz et al. (2008) y se presentan resultados de buena biosorción a pH altos, debido la menor competencia de H^+ o H_3O^+ en la solución.

7.5 Efecto de la temperatura en la biosorción de los metales e isothermas en equilibrio

7.5.1 Pb

Se evaluó el efecto de la temperatura a 35, 25 y 15 °C, a un pH de 4.5 y

biomasa de 0.1 g/L. Los datos obtenidos no variaron en su concentración inicial ya que no hubo precipitación de Pb (tabla 7.4), encontrándose que no hay diferencia significativa entre las diferentes temperaturas al alcanzar un equilibrio en la adsorción (Figura 7.18), y llegando a un porcentaje de remoción casi total (tabla 7.5). Las isothermas de adsorción se procesaron con los modelos de Freundlich y de Langmuir (Figura 7.19) para determinar a cual se ajustaban mejor los datos experimentales y se verificó que el mejor ajuste a temperaturas de 15 y 25°C fue al de Freundlich, debido a que las concentraciones fueron menores a la saturación de los sitios superficiales, con un coeficiente R^2 de 0.9897 y 0.6596, respectivamente (tabla 7.6); a la temperatura de 35 °C el mejor ajuste fue con el modelo de Langmuir, con un coeficiente de correlación R^2 de 0.9665. Los datos obtenidos por Rodríguez-Tirado (2006) muestran que al realizar el bioensayo con células viables a temperaturas de 35 °C y una concentración inicial de 83.0 ± 2.2 mg L⁻¹ los datos de biosorción de Pb se ajustaron a la isoterma de Langmuir que indica que el proceso de adsorción se lleva a cabo siguiendo una monocapa este estudio se observó que al realizarlos con biomasa bacteriana no viable a temperaturas de 35 °C se ajusta al modelo de Langmuir. La temperatura del medio afecta el modo en que se ajustan los modelos isotérmicos ya que la energía depende de la temperatura. A mayor temperatura existirá mas movimiento y mayor energía cinetica entre los cationes, por lo cual existe un constante intercambio con la membrana celular formando una sola capa como sugiere Langmuir; mientras que a temperaturas bajas existe poco movimiento de los cationes y se forma un agregado de capas múltiples como propone Freundlich (Zouboulis et al., 2004).

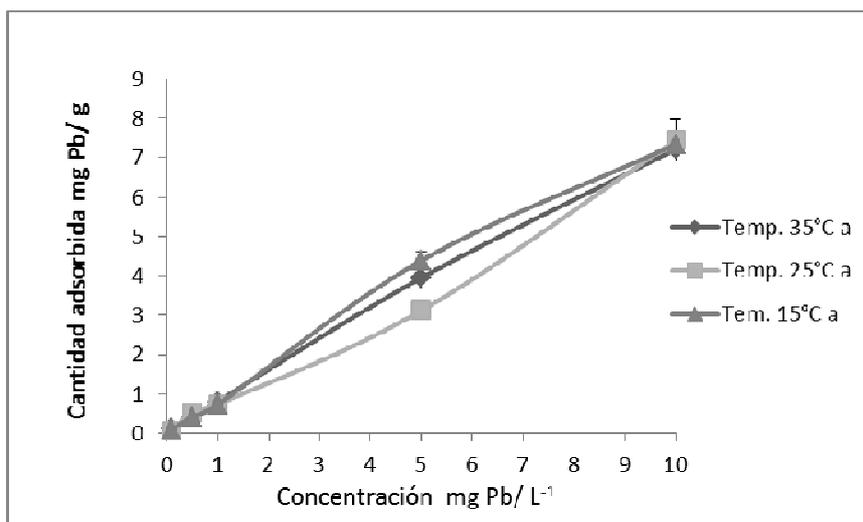


Figura 7.18.- Efecto de temperatura en la adsorción de Pb por *Bacillus thioparans* no viable, a diferentes concentraciones (0.1, 0.5, 1, 5 y 10 mg L⁻¹), biomasa 0.1 g L⁻¹ y pH 4.5 ($n=4$). Análisis de varianza de una vía (ANOVA) $p<0.05$; post prueba Tukey $p<0.05$ (95% intervalos de confianza) (Letras diferentes indican diferencia significativa).

Tabla 7.4. Concentraciones iniciales de Pb y sus desviaciones estándar (SD) a diferentes temperaturas.

Temperatura	Concentraciones mg Pb L ⁻¹									
		± SD		± SD		± SD		± SD		± SD
15 °C	0.1	0.003	0.44	0.034	0.78	0.063	4.665	0.242	9.15	0.118
25 °C	0.05	0.013	0.56	0.141	0.74	0.041	3.42	0.103	8.14	0.551
35 °C	0.11	0.008	0.44	0.031	0.85	0.033	4.45	0.074	9.53	0.113

Tabla 7.5. Porcentajes en la biosorción de Pb por *Bacillus thioparans* no viable, a diferentes concentraciones iniciales, a diferentes temperaturas, un pH= 4.5 y desviación estándar (SD). Las concentraciones fueron promediadas para un mejor entendimiento ya sea $0.1+0.05+0.11$ promedio = 0.0866 ± 0.032 ver tabla 7.6.

Porcentaje biosorbido						
Concentración	Temperatura					
	35 °C	± SD	25 °C	± SD	15 °C	± SD
0.086 ± 0.032	95.77	0.427	91.36	0.484	96.94	0.8877
0.48 ± 0.069	94.09	0.316	91.12	1.9992	94.14	1.1969
0.79 ± 0.055	94.11	2.0819	99.19	1.0334	93.52	1.2529
4.178 ± 0.665	90.05	2.7239	95.87	1.8785	93.63	1.927
8.94 ± 0.718	96.76	2.848	82.07	7.5247	88.72	1.9816

Tabla 7.6. Parámetros de los modelos (Langmuir y Freundlich) para la adsorción de Pb por *Bacillus thioparans* no viable (0.1 g L⁻¹ de biomasa, pH= 4.5), b (l mg), q_{max}(mg g⁻¹), 1/n (adimensional), k_f (adimensional).

Temperatura	Langmuir			Freundlich		
	B	q _{max}	R ²	1/n	K _f	R ²
35 °C	0.019	31.746	0.9665	1.084	0.058	0.9373
25 °C	0.093	26.881	0.0887	1.349	0.048	0.6596
15 °C	0.102	7.745	0.9608	0.834	0.138	0.9897

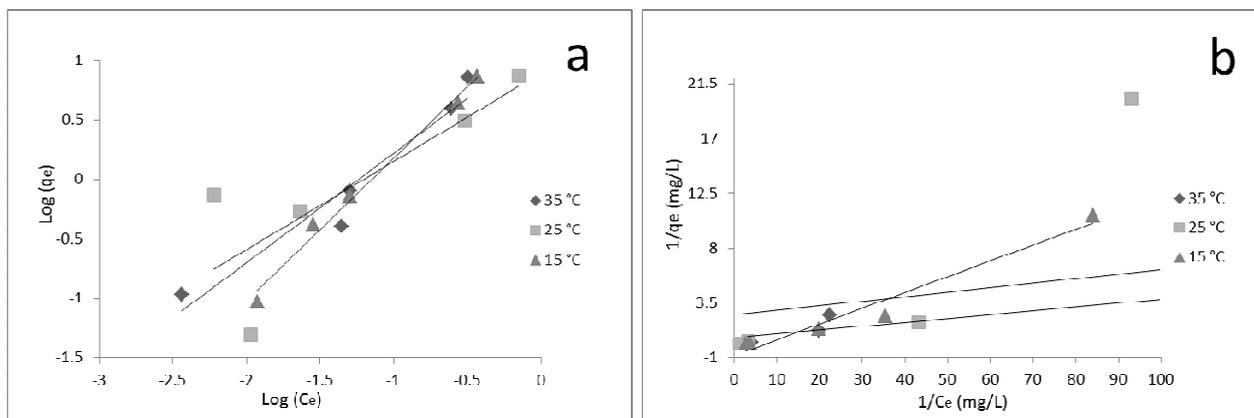


Figura 7.19.- Isothermas de adsorción de Freundlich (a) y Langmuir (b) linealizadas en la adsorción de Pb por *Bacillus thioparans* no viable, a diferentes concentraciones iniciales (0.1, 0.5, 1, 5 y 10 mg L⁻¹), 0.1 g L⁻¹ de biomasa, temperaturas de 35, 25 y 15 °C y un pH de 4.5.

7.5.2 Cd

Se evaluó el efecto de la temperatura a 35, 25 y 15 °C con un pH de 6 y biomasa no viable de 0.1 g L⁻¹ de *Bacillus thioeparans* y concentraciones iniciales de 0.1, 0.5, 1, 5 y 10 mg Cd L⁻¹. Se encontró que no hay diferencia significativa entre las diferentes temperatura al alcanzar un equilibrio en la adsorción(Figura 7.20), llegando a un porcentaje de remoción por arriba del 90 % (Tabla 7.7). Se calcularon los parámetros de las isothermas utilizando los modelos de Freundlich y Langmuir (Figura 7.21) para observar a cual se ajustaban mejor los datos experimentales y se concluyó que se ajustaba mejor al modelo de Freundlich a temperatura de 15°C con un coeficiente de (R²) de 0.8074 mientras que a las temperaturas de 25 y 35°C se ajustó al modelo de Langmuir con coeficientes R² de 0.9735 y 0.9739, respectivamente (tabla 7.8). Se realizaron comparaciones con los datos obtenidos por Rodríguez-Tirado (2006), quien usó en sus bioensayos biomasa viable de la misma cepa y encontró que sus datos de adsorción se ajustaron mejor al modelo de Langmuir a una temperatura de 35 °C y una concentración inicial de 42.4 ±1.0 mg Cd L⁻¹. Como antes mencionado, el cambio de la temperatura afecta el modo en que se comportan los cationes debido a que a mayor temperatura existe mas movimiento y mayor energía cinetica entre los cationes. Al encontrarse inactivas las células no hay intereferencia en la adsorción por parte del metabolismo de la célula por lo cual se considera que el uso de microorganismos no viables es un método de tratamiento más eficaz que de manera viable (Zouboulis et al., 2004). Existen un sin numero de trabajos sobre la biosorción de metales por medio de bacterias, pero no se puede hacer una comparacion directa de estos ya que los parámetros que fueron tomados inicialmente, o el tiempo de submuestreo, no son los mismos. En la tabla 7.9 se muestran los resultados de varios trabajos de biosorción con bacterias.

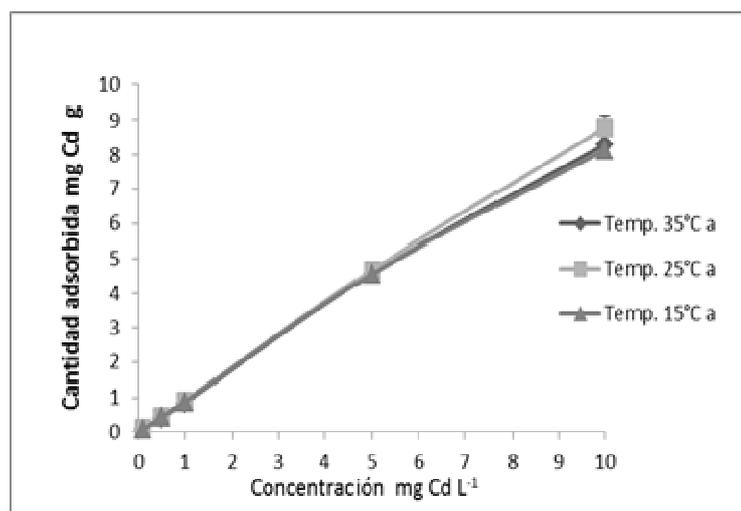


Figura 7.20.- Efecto de temperatura en la adsorción de Cd por *Bacillus thioeparans* no viable, a diferentes concentraciones (0.1, 0.5, 1, 5 y 10 mg L⁻¹), biomasa 0.1 g L⁻¹ y pH 6 ($n=4$). Análisis de varianza de una vía (ANOVA) $p<0.05$; post prueba Tukey $p<0.05$ (95% intervalos de confianza) (Letras diferentes indican diferencia significativa).

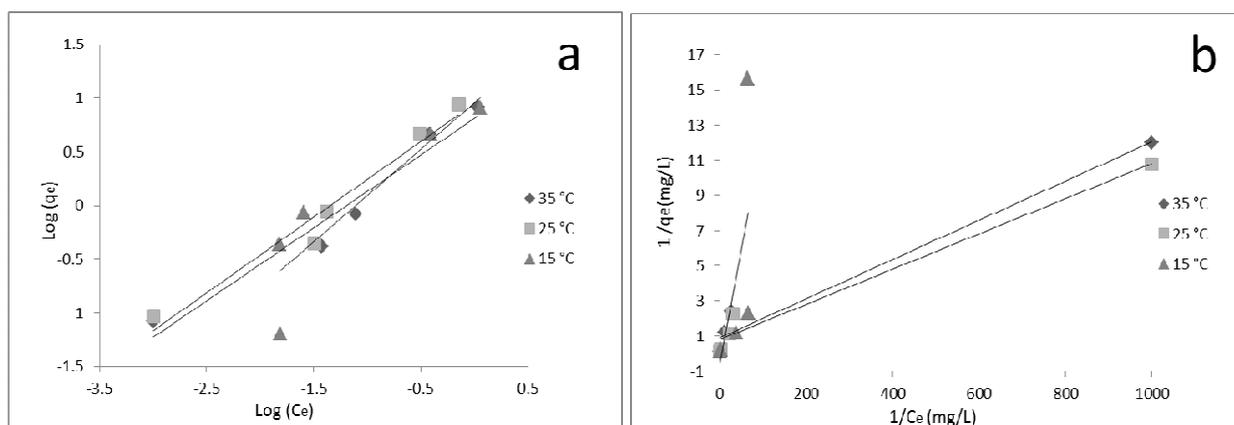


Figura 7.21.- Isothermas de adsorción de Freundlich (a) y Langmuir (b) linealizadas en la adsorción de Cd por *Bacillus thioeparans* no viable, a diferentes concentraciones iniciales (0.1, 0.5, 1, 5 y 10 mg L⁻¹), 0.1 g L⁻¹ de biomasa, temperaturas de (35, 25 y 15 °C) y un pH de 6.

Tabla 7.7. Porcentajes en la biosorción de Cd por *Bacillus thioeparans* no viable, a diferentes concentraciones iniciales, variación de temperaturas, un pH= 6 y desviación estándar (SD).

Porcentaje biosorbido						
Concentración	Temperatura					
	35 °C	SD	25 °C	SD	15 °C	SD
0.1	88.45	0.452	92.47	0.774	87.73	1.044
0.5	92.3	0.517	95.64	1.331	92.14	0.646
1	91.36	1.539	95.44	1.0145	97.12	0.272
5	91.7	4.611	93.32	1.618	96.67	0.604
10	100	0	100	0	80.75	9.454

Tabla 7.8. Parámetros de los modelos (Langmuir y Freundlich) para la adsorción de Cd por *Bacillus thioeparans* (0.1 g L⁻¹ de biomasa, pH= 6), b (L m g⁻¹), q_{max}(mg g⁻¹), 1/n (adimensional), k_f (adimensional).

Temperatura	Langmuir			Freundlich		
	b	q _{max}	R ²	1/n	K _f	R ²
35 °C	0.009	89.285	0.9739	1.4799	0.0933	0.955
25 °C	0.008	99.009	0.9735	1.4198	0.0205	0.9628
15 °C	0.089	7.645	0.4065	1.1642	0.0221	0.8074

Tabla 7.9. Biosorción de Cd y Pb por diferentes tipos de bacterias.

Metal	Bacteria	q _{max} (mg g ⁻¹)	1/n	pH	Temperatura		Referencia
						(°C)	
Cd	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	47.86		5		30	Hassan et al., 2009
	<i>Pseudomonas veronii</i>	54		7.5		32	Vullo et al., 2008
	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	42.9		6		65±1	Chatterjee et al., 2010
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30.05		3-6		nd	Shu et al., 1997
	<i>Bacillus licheniformis</i>	142.73		7		25	Zouboulis et al., 2004
	<i>Bacillus licheniformis</i>	140.41		7		37	Zouboulis et al., 2004
	<i>Bacillus licheniformis</i>	138.45		7		50	Zouboulis et al., 2004
	<i>Bacillus laterosporus</i>	159.5		7		nd	Zouboulis et al., 2004
	<i>Bacillus jeotgali U3</i>	57.9		7		35	Rodríguez-Tirado, 2006

	<i>Bacillus jeotgali</i> U3	53.5		7	30	Rodríguez-Tirado, 2006
	<i>Bacillus thioparans</i> U3	89.28		6	35	Este estudio
	<i>Bacillus thioparans</i> U3	99		6	25	Este estudio
	<i>Bacillus thioparans</i> U3		1.16	6	15	Este estudio
	<i>Enterobacter</i> sp		0.59	6	25	Wei-Bin et al., 2006
	<i>Escherichia coli</i>	24.27		5	25±2	Almaguer-Cantú et al., 2010
	<i>Chlorella</i> sp.	103.5		5	25±2	Almaguer-Cantú et al., 2010
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	47.86		5	30	Oh et al., 2009
	<i>Pseudomonas putida</i>	1.16		6	nd	Choi et al., 2009
Pb	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	123		6	30±2	Gabr et al., 2008
	<i>Pseudomona putida</i>	36		4.5	30	Pardo et al., 2003
	<i>Citrobacter</i> sp.	58.5		4.5	30	Puranik y Paknikar, 1999
	<i>Pseudomonas</i> sp.	68.7		5	37	Chang et al., 1997
	<i>Bacillus cereus</i>	72.5		6	nd	Pan et al., 2006
	<i>Citrobacter freundii</i>	42.5		4	25	Al garni, 2005
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	48.9		4	25	Al garni, 2005
	<i>Arthrobacter</i> sp.	130		5-5.5	30	Veglio et al., 1997
	<i>Corynobacterium glutamicum</i>	567		5	22	Choi y Yun, 2004
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	71.56		3-6	nd	Shu et al., 1997
	<i>Bacillus jeotgali</i> U3	90.1		4	35	Rodríguez-Tirado, 2006
	<i>Bacillus jeotgali</i> U3	200.1		4	30	Rodríguez-Tirado, 2006
	<i>Bacillus thioparans</i> U3	31.74		4.5	35	Este estudio
	<i>Bacillus thioparans</i> U3		1.34	4.5	25	Este estudio
	<i>Bacillus thioparans</i> U3		0.83	4.5	15	Este estudio
	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>		5.88	4.5	65±1	Chatterjee et al., 2010
	<i>Enterobacter</i> sp		0.219	5	25	Wei-Bin et al., 2006

<i>Escherichia coli</i>	28.14	5	25±2	Almaguer-Cantú et al., 2010
<i>Chlorella</i> sp.	285.72	5	25±2	Almaguer-Cantú et al., 2010
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	153.3	6	30	Oh et al., 2009
<i>Pseudomonas putida</i>	1.76	6	nd	Choi et al., 2009

nd: no disponible.

8. CONCLUSIONES

El utilizar biomasa bacteriana viable en experimentos de biosorción con diferentes condiciones de pH, temperatura, salinidad y diferentes contaminantes (Pb, Cd) implica alteraciones y, en algunos casos, inhibición total de la tasa de crecimiento. Debido a que la biosorción depende de la cantidad de biomasa existente en el bioensayo, no se pudo determinar su biosorción en estado viable, por lo cual se optó por seguir los experimentos utilizando biomasa no viable; estas alteraciones no afectan el desarrollo del bioensayo en términos de producción de biosorbente. Los conocimientos obtenidos durante los experimentos de crecimiento de la cepa fueron utilizados para una mejor y rápida producción de biomasa bacteriana.

El valor óptimo de pH en la biosorción de Cd fue de 6 con un porcentaje de remoción de 95.37, observándose que con el incremento del pH desde 3 a 6, se obtuvo una mejor biosorción; en tanto que para Pb fue de 4.5 con un porcentaje de biosorción de 91.92, observándose que al incrementar el pH a partir de 4.5 este metal precipitaba.

No se observó diferencia significativa en las diferentes temperaturas sobre la capacidad de biosorción en Cd o Pb, ni en la adsorción a pH 4.5 y 6.

A temperaturas de 15 y 25 °C en el caso de Pb y 15 °C para Cd el modelo que mejor se ajustó fue el sugerido por Freundlich, que explica el proceso de adsorción como un sistema heterogéneo en donde actúan múltiples capas, siendo así que se obtienen diferentes sitios activos donde el metal podrá adsorberse. A una temperatura de 35 °C para los experimentos con Pb y 25 y 35 °C para Cd, el modelo que mejor se ajustó fue el propuesto por Langmuir, que explica el proceso de adsorción por mono capas. La temperatura influye en el comportamiento de los cationes debido a que a mayor temperatura existirá mas movimiento y mayor energía cinética de los cationes provocando una configuración por monocapa, en tanto que a temperaturas bajas, toma una configuración de multiples capas.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Carlos René Green Ruiz, director de este trabajo, por el apoyo, por las facilidades para la realización de este trabajo, gracias por su gran amistad y su confianza en mí, gracias por todo. También, agradezco a los Drs. Bruno Gómez Gil Rodríguez Sala, Mario Villalobos Peñalosa, Domenico Voltolina Lobina y Martín Frías Espericueta, por sus comentarios acertados, aportaciones y apoyo para la finalización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico para la realización de mis estudios de posgrado, Así mismo, le agradezco al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM por el financiamiento recibido a través del proyecto de investigación PAPIIT IN111406 Estudio comparativo de adsorción de metales por caolín enriquecido con ácidos húmicos y bacterias *Bacillus jeotgali* cepa U3, como alternativas para la remediación de aguas contaminadas.

También agradezco al Quim. Humberto Bojórquez Leyva por su gran ayuda con el manejo del equipo de laboratorio; a la Ing. Alejandra Trejo Alduenda por su apoyo, amistad y por su valiosa ayuda a lo largo de la finalización de dicho trabajo; a la Lic. Clara Ramírez Jáuregui por su ayuda en la búsqueda bibliográfica; a los encargados del centro de cómputo del ICMYL, unidad Mazatlán, Mat. Germán Ramírez Reséndiz y Lic. Carlos Suarez Gutiérrez; a la Lic. Margarita Cordero Ruiz por su amabilidad, paciencia y ayuda en los trámites del posgrado; a la QFB. Carmen Bolan Técnica del laboratorio de bacteriología del CIAD Mazatlán, por su ayuda y amabilidad y por las facilidades brindadas para el uso de equipo. Al personal de la Unidad Académica Mazatlán del Instituto de Ciencias de Mar por hacer de mi estancia más confortable.

Gracias a mis compañeros del laboratorio, Carolina, Daniela, Roberto y a mis

compañeros de generación gracias por su amistad y por todo lo que nos tocó compartir juntos que fue de lo mejor.

10. LITERATURA CITADA

Adesola-Babarinde N.A., Oyebamiji-Babalola J., John A., Uchechi M., Temitope O., Fopofoluwa O. (2012). Kinetic, equilibrium and thermodynamic studies of the biosorption of Ni(II), Cr(III) and Co(II) from aqueous solutions using banana (*Musa acuminata*) leaf. *Journal of Physical Sciences* 7: 1376 – 1385.

Al-Garni S.M. (2005). Biosorption of lead by Gram ve capsulated and non-capsulated bacteria. *Water SA* 31: 350–354.

Almaguer-Cantú V., Morales-Ramos L., Arevalo-Niño K., Garza-González M.T., Balderas-Rentería. (2010). Cadmium (II) and Lead (II) removal by *Chlorella sp.* Immobilized and *E. coli* genetically engineered with mice Metallothionein. *MRS Proceedings* 1277 -2010.

Carrasco-Valenzuela . (2007).Efecto de factores ambientales en la absorción y adsorción de Hg(II) por la bacteria *Bacillus jeotgali* cepa U3.Tesis de Maestría en Química Acuática. Universidad Nacional Autónoma de México. 51 p.

Chang J.S., Law R., Chang C.C. (1997). Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU21. *Water Research* 31: 1651–1658.

Choi J., Lee J.Y., Yang, J.S. (2009). Biosorption of heavy metals and uranium by starfish and *Pseudomonas putida*. *Journal of Hazardous Materials* 161 (1) :157-162 .

Chatterjee K., Bhattacharjee I., Chandra G. (2010). Biosorption of heavy metals from industrial waste water by *Geobacillus thermodenitrificans*. *Journal of Hazardous Materials* 175: 117–125.

Choi S.B., Yun Y.S. (2004). Lead biosorption by waste biomass of *Corynebacterium glutamicum* generated from lysine fermentation process. *Biotechnology Letters* 26: 331–336.

Chojnacka K. (2010). Biosorption and bioaccumulation the prospects for practical applications. *Environment International* 36: 299–307.

DOF. (2000). Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-127SSA1-1994, Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de

calidad y tratamiento a que debe someterse el agua para su potabilización. Diario Oficial de la Federación. 22 de Noviembre, 2000.

Freedman M.I.J., Conningham P.M.J., Shindler J.F.J., Zimmermeim M.J. (1980). Effect of lead especiation on toxicity. Bulletin of Enviromental Contamination and Toxicology 25: 389-393.

Fr  rique O., Michael R., David K. (2002). The use of transplanted cultured tropical oysters (*Saccostrea commercialis*) to monitor Cd levels in North Queensland coastal waters (Australia). Marine Pollution Bulletin 44: 1051–1062.

Gadd G.M. (1988). Accumulation of Metals by Microorganisms and Algae. In: Rehm, H.-J., Reed, G. (Eds.). Special Microbial Processes. Biotechnology 6b: 401-433.

Gadd G.M. (2008). Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 84: 13–28.

Gabr R.M., Hassan S.H.A., Shoreit A.A.M. (2008). Biosorption of lead and nickel by living and non-living cells of *Pseudomonas aeruginosa* ASU 6a. International Biodeterioration and Biodegradation 62: 195–203.

Gherna L.R. (1994). Culture preservation. In: Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A., Krieg, N.R. (Eds.), Methods for General and Molecular Bacteriology. American Society for Microbiology Press, Washington, 278–292.

Golab Z., Orłowska B., Smith R.W. (1991). Biosorption of lead and uranium by *Streptomyces sp.* Water Air and Soil Pollution. 60: 99–106.

Gómez-Gil B., Bolan-Mejia C., Roque A. (1999). Métodos Bacteriol  gicos. Laboratorio de Bacteriolog  a, CIAD/ Unidad Mazatlán en Acuicultura y Manejo Ambiental 37.

Green-Ruiz C., Rodríguez-Tirado V., Gomez-Gil B. (2008). Cadmium and zinc removal from aqueous solutions by *Bacillus jeotgali*: pH, salinity and temperature effects. Bioresource Technology 99 : 3864–3870

Guibal E., Roulph C., Le Cloirec P. (1992). Uranium biosorption by a filamentous fungus *Mucormiehe* pH effect on mechanisms and performances of uptake. Water Research 26: 1139–1145.

Gutiérrez-Venegas G., Cardoso-Giménez P. (2006). Acido Lipoteicoico: Receptores y Mecanismos de Transducción. *Revista de Educación Bioquímica* 25: 41-49.

Hassan H.A., Kim S.J., Jung A.Y., Joo J.H., Oh S.E., Yang J.E. (2009). Biosorption capacity of Cd (II) and Cu (II) by liophilized cells of *Pseudomonas stutzeri*. *Journal of General and Applied Microbiology* 55: 27-34.

HassenH.A., Saidi N., Cherif M., Boudabous A. (1998). Effects of Heavy Metals on *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus thuringiensis*. *Bioresource Technology* 65: 73-82.

Jung-Hoon Y., Seok-Sung K., Keun-Chul L., Yung-Hee K., Seong-Hyun C., Kook-Hee K., Yong-Ha P. (2001). *Bacillus jeotgali* sp. nov., isolated from *jeotgal*, Korean traditional fermented seafood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 51: 1087–1092.

Kao W., Hugang C., Chang J. (2008). Biosorption of nickel, chromium and zinc by MerP-expressing .recombinant *Escherichia coli*. *Journal of Hazardous Materials* 158: 100–106.

Khanafari A., Eshghdoost S., Mashinchian A. (2008). Removal of lead and chromium from aqueous solution by *Bacillus circulans* biofilm. *Journal of Environmental Health Science and Engineering* 5: 195-200.

Kratochvil D., Volesky B. (1998). Advances in the biosorption of heavy metals. *Trends in Biotechnology* 16: 291-300.

Lebeau T., Bagot D., Jézéquel K., Fabre B. (2001). Cadmium biosorption by free and immobilized microorganisms cultivated in a liquid soil extract medium: effects of Cd, pH and techniques of culture. *Science of the Total Environment* 291: 73–83.

Li H., Lin Y., Guan W., Chang J., Xu L., Guo J., Wei G.(2010). Biosorption of Zn(II) by live and dead cells of *Streptomyces ciscaucasicus* strain CCNWHX 72-14. *Journal of Hazardous Materials* 179: 151-159.

López-Mesas M., Ruperto Navarrete E., Carrillo F., Palet C. (2011). Bioseparation of Pb(II) and Cd(II) from aqueous solution using cork waste biomass. Modeling and optimization of the parameters of the biosorption step. *Chemical*

Engineering Journal 174 : 9-17.

Louma S.N., Rainbow P.S. (2008). Metal Contamination in Aquatic Environments. Cambridge University Press, New York.

Mohamed Z.A. (2001). Removal of cadmium and manganese by a non-toxic strain of the freshwater cyanobacterium *Gloeothoece magna*. Water Research 35: 4405–4409.

Nelson J., Tapia H., Muños C., Torres D., Yarango R. (2003). Biosorción de Pb (II) por cáscara de naranja, *Citrus chinensis*, modificada. Departamento de Química, Universidad Peruana Cayetano Heredia 5: 48- 52.

Oh S.E., Hassan, S.H.A., Joo, J.H.(2009). Biosorption of heavy metals by lyophilized cells of *Pseudomonas stutzeri*. World Journal of Microbiology and Biotechnology 25:1771–1778.

Pan J., Ge X., Liu, R., Tang, H. (2006). Characteristic features of *Bacillus cereus* cell surfaces with biosorption of Pb (II) ions by AFM and FTIR. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 52: 89–95.

Pardo R., Herguedas M., Barrado E., Vega M. (2003). Biosorption of cadmium, copper, lead and zinc by inactive biomass of *Pseudomonas putida*. Analytical and Bioanalytical Chemistry 376: 26–32.

Paulino A.T., Guilherme M.R., Reis A.V., Tambourgi E.B., Nozaki J., Muniz E.C. (2007). Capacity of adsorption of Pb²⁺ and Ni²⁺ from aqueous solutions by chitosan produced from silkworm chrysalides in different degrees of deacetylation. Journal of Hazardous Materials 147:139–147.

Pérez-Ibarra B.M., Flores M.E., García-Varela M. (2007). Isolation and characterization of *Bacillus thioparus* sp.nov., chemolithoautotrophic, thiosulfate-oxidizing bacterium. FEMS Microbiology Letter 271: 289–296.

Pivnicková B., Rejmánková E., Snyder M.J., Santrucková H. (2010). Heterotrophic microbial activities and nutritional status of microbial communities in tropical marsh sediments of different salinities: the effects of phosphorus addition and plant species. Plant Soil 336:49–63.

Puranik P.R., Chabukswar N.S., Paknikar K.M. (1995). Cadmium biosorption by *Streptomyces pimprina* waste biomass. Applied Microbiology and Biotechnology

43 :1118–1121.

Puranik P.R., Paknikar K.M. (1997). Biosorption of lead and zinc from solutions using *Streptoverticillium cinnamoneum* waste biomass. *Journal of Biotechnology* 55: 113–124.

Puranik P.R., Paknikar K.M. (1999). Biosorption of lead, cadmium and zinc by *Citrobacter* strain MCM B-181: characterization studies. *Biotechnology Progress* 15: 228–237.

Ribeiro .P. N., Lepes A., Fachini A. (2008). Cleansing contaminated seawaters using marine cyanobacteria: evaluation of trace metal removal from the medium. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 88: 701-710.

Rodríguez-Tirado, V. (2006). Efecto de factores ambientales (pH, temperatura y salinidad) en la biosorción de metales por la bacteria *Bacillus jeotgali* cepa U3. Tesis de Maestría Química Acuática. Universidad Nacional Autónoma de México. 90.

Ruchhoft C. (1949). The possibilities of disposal of radioactive wastes by biological treatment methods. *Sewage Works Journal* 21:877-883.

Sag Y., Ozer D., Kutsal T. (1995). A comparative study of the biosorption of Lead(II) ions to *Z. ramigera* and *R. arrhizas*. *Process Biochemistry* 30:169–174.

Sardans J., Montes F., Peñuelas J. (2010). Determination of As, Cd, Cu, Hg and Pb in biological samples by modern electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta B* 65: 97–112.

Shu J.C., Law .R., Cheng C.C. (1997). Biosorption of lead, copper and cadmium by biomass of *Pseudomonas aeruginosa* PU21. *Water Reserch* 31: 1651-1658.

Srinath T., Verma T., Ramteke P.W., Garg S.K. (2002). Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. *Chemosphere* 48: 427–435.

Sonnenfeld M., Beveridge J., Koch L., Doyle J. (1985). Asymmetric distribution of charge on the cell wall of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* 163: 1167–1171.

Tangaromsuk J., Pokethitiyook P., Kruatrachue M., Upatham E.S.(2002).

Cadmium biosorption by *Sphingomonas paucimobilis* biomass. *Bioresource Technology* 85 :103–105.

Thomais V., Manos D., Michael J, S., Athanasios V. (2007). Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels *Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Marine Pollution Bulletin* 54: 1361–1371.

Murray R.P., Rosenthal S.K., Pfaller A.M. (2009). *Microbiología médica*. MMIX Mosby Inc., an Elsevier Imprint, Geaconsultoria Editorial : SL.

Tsekova K., Todorova D., Dencheva V., Ganeva S. (2008). Biosorption of copper(II) and cadmium(II) from aqueous solutions by free and immobilized biomass of *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology* 101: 1727-1731.

Tsezos M., Volesky B. (1981). Biosorption of uranium and thorium. *Biotechnology and Bioengineering* 23: 583-604.

Tuzen M., Dogan O., Usta C., Soylak M. (2007). Biosorption of copper (II), lead(II), iron(III) and cobalt(II) on *Bacillus sphaericus*-loaded Diaion SP-850 resin. *Analytica Chimica Acta* 581: 241-246.

U.S. Environmental Protection Agency. (2000). Development Document For The Proposed Effluent Limitations Guidelines And Standards For The Metal Products & Machinery Point Source Category. Office of Water Washington, DC.

Valencia-Valdez, N.C. (2008). Biosorción de Cr(VI) por la bacteria *Bacillus jeotgali* cepa U3 como alternativa para la remediación de aguas contaminadas con metales pesados. Tesis para obtener el grado de Licenciado en Biología. Universidad Nacional Autónoma de México : 47.

Veglio F., Beolchini F., Gasbarro A. (1997). Biosorption of toxic metals: an equilibrium study using free cells of *Arthrobacter sp.* *Process Biochemistry* 2: 99–105.

Velásquez L., Dussan J. (2009). Biosorption and bioaccumulation of heavy metals on dead and living biomass of *Bacillus sphaericus*. *Journal of Hazardous Materials* 167: 713–716.

Vijayaraghavan K., Yun G.S. (2008). Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology Advances* 26: 266-291.

- Volesky B. (2007). Biosorption and me. *Water Research* 41: 4017-4029.
- Volesky B., Holan Z. (1995). Biosorption of heavy metals. *Biotechnology Progress* 11: 235-250.
- Vullo D.L., Ceretti H.M., Daniel M.A., Ramirez S.A.M., Zalts A. (2008). Cadmium, zinc and copper biosorption mediated by *Pseudomonas veronii* 2E. *Bioresource Technology* 99: 5574–5581.
- Wan M.-W., Kan C.-C., Rogel B.D., Dalida M.L.P. (2010). Adsorption of copper (II) and lead (II) ions from aqueous solution on chitosan-coated sand. *Carbohydrate Polymers* 80: 891–899.
- Wang J., Chen C. (2008). Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances* 27: 195-226.
- Weber W.J., Jr. (1985). Adsorption theory, concepts, and models. In: Slejko, F.L. (Ed.) *Adsorption Technology: A Step-by-Step Approach to Process Evaluation and Application*. Marcel Dekker, New York: 1-35.
- Wei-Bin L., Jun-Ji H., Ching-Hsiung W., Jo-Shu C. (2006). Biosorption of lead, copper and cadmium by an indigenous isolate *Enterobacter sp.* J1 possessing high heavy-metal resistance. *Journal of Hazardous Materials B134* : 80–86.
- Yilmaz E.I. (2003). Metal tolerance and biosorption capacity of *Bacillus circulans* strain EB1. *Research in Microbiology* 154: 409- 415.
- Yilmaz E.I., Ensari Y. (2005). Cadmium biosorption by *Bacillus circulans* strain EB1. *World Journal Microbiology and Biotechnology* 21: 777–779.
- Zouboulis A.I., Loukidou M.X., Matis K.A. (2004). Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal-polluted soils. *Process Biochemistry* 39: 909–916.

SITIOS WEB

Límite de NOM-001-SEMARNAT-1996,
www.semarnat.gob.mxwww.semarnat.gob.mx. Visitada el 22/marzo/2010

Límites máximos de Pb y Cd permitidos para descarga de agua al medio ambiente.www.epa.gov. Visitada el 23/marzo/2010