



**UNIVERSIDAD DE SONORA**  
**DIVISIÓN DE INGENIERÍA**

**POSGRADO EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA**

**BIOSORCIÓN DE Cu Y Fe CON BIOMASA ANAEROBIA  
ACIDOGÉNICA INMOVILIZADA EN CLINOPTILOLITA**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN CIENCIAS DE LA INGENIERIA**

**PRESENTA:**

**GONZALO MAURICIO FIGUEROA TORRES**

**HERMOSILLO, SONORA**

**Enero 2013**

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

# UNIVERSIDAD DE SONORA

## APROBACION DEL JURADO

de la tesis presentada por:

**Gonzalo Mauricio Figueroa Torres**

Esta tesis ha sido revisada por cada uno de los miembros del Jurado y por mayoría de votos la han encontrado satisfactoria.

23/01/2013  
Fecha

  
(Dra. María Teresa Certucha Barragán)  
Presidente

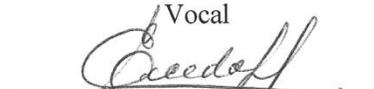
23/01/2013  
Fecha

  
(Dra. Onofre Monge Amaya)  
Secretario

23/01/2013  
Fecha

  
(Dr. Francisco Javier Almendariz Tapia)  
Vocal

23/I/2013  
Fecha

  
(Dra. Evelia Acedo Félix)  
Sinodal Externo

**UNIVERSIDAD DE SONORA**  
**AUTORIZACION DEL EXAMEN DE GRADO**

Enero 21, de 2013.

Por la presente se hace constar que el estudiante Gonzalo Mauricio Figueroa Torres ha cumplido satisfactoriamente con los requisitos académicos correspondientes para la realización del Examen de Grado del programa de Maestría en Ciencias de la Ingeniería.



**DR. FRANCISCO JAVIER ALMENDARIZ TAPIA**  
**COORDINADOR**  
**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA INGENIERIA**

## RESUMEN

En este trabajo se investigó la biosorción de Cu (II) y Fe (II) y su efecto sobre biomasa acidogénica inmovilizada en clinoptilolita en un sistema continuo, para lo cual se utilizó un reactor anaerobio de lecho empacado. Además, mediante experimentación en lote se determinó la toxicidad de los metales en términos de la concentración inhibitoria media,  $CI_{50}$ , y se realizaron cinéticas de biosorción para obtener las isothermas de adsorción. Los resultados de los estudios en lote arrojaron las siguientes  $CI_{50}$ : 205 mgCu(II)/L, 606 mgFe(II)/L y 550 mgCu-Fe/L, éstas concentraciones son las máximas tolerables por la biomasa, ya que ocasionan una disminución del 50 % de actividad. Los datos de las cinéticas de biosorción se ajustaron adecuadamente al modelo de Langmuir, y se encontró que la biosorción de cobre se favorece en presencia de hierro, ya que la capacidad máxima de biosorción de la biomasa aumentó de  $q_{max} = 28.23$  mgCu(II)/gSSV (sin hierro) a  $q_{max} = 35.46$  mgCu(II)/gSSV (con hierro). En cuanto a los estudios en continuo, las condiciones de operación establecidas en la etapa de acondicionamiento fomentaron el desarrollo de una biopelícula de microorganismos Gram + y Gram -. Asimismo, la baja remoción de la demanda química de oxígeno (DQO) y acumulación de ácidos grasos volátiles (AGV's), indicaron que se favoreció la fase acidogénica de la digestión. En la etapa de biosorción se alimentaron 100 mgCu(II)/L y 300 mgFe(II)/L. La alimentación continua de los metales provocó inhibición en el metabolismo de la biomasa, específicamente sobre el consumo de dextrosa y la producción de AGV's. El tiempo de ruptura ( $t_b$ ) de ambos metales ocurrió a los 3 días, durante los cuales se tuvieron eficiencias de remoción superiores al 90 % y se encontró una eficiencia de remoción global del 51 % durante los 25 días en que el reactor se alimentó con cobre y hierro. En conclusión, éste tipo de biomasa puede ser utilizada en un proceso de tratamiento de aguas contaminadas con cobre y hierro, pero los efectos inhibitorios de ambos metales deberán tomarse en cuenta para aumentar la eficiencia del proceso.

## ABSTRACT

This work investigated the biosorption of Cu (II) and Fe (II) and its effect on acidogenic biomass immobilized in clinoptilolite in a continuous system, which consisted of an anaerobic packed bed reactor. Batch experiments were used to determine the toxicity of copper and iron in terms of the half inhibitory concentration,  $IC_{50}$ , and biosorption kinetics were performed to obtain adsorption isotherms. The batch studies resulted in the following  $IC_{50}$ : 205 mgCu(II)/L, 606 mgFe(II)/L y 550 mgCu-Fe/L, these are the maximum tolerable concentration of the biomass, since they cause an inhibition of 50% in the metabolic activity. Biosorption kinetics data were fitted adequately to the adsorption Langmuir model, and it was found that copper biosorption is favored in the presence of iron, since the maximum biosorption capacity increased from  $q_{max} = 28.23$  mgCu/gSSV (without iron) to  $q_{max} = 35.46$  mgCu(II)/gSSV (with iron). During the continuous studies, the operation conditions set at the start-up stage favored the development of a biofilm conformed of Gram + and Gram – microorganisms. Furthermore, low chemical oxygen demand (COD) removals and the accumulation of volatile fatty acids (VFA's) indicated that the biomass was performing the acidogenic phase of anaerobic digestion. During the biosorption stage, the reactor was fed with 100 mgCu(II)/L and 300 mgFe(II)/L. The metals inhibited the biomass metabolism, specifically dextrose consumption and VFA's production. Breakthrough time ( $t_b$ ) was found at 3 days, during which removal efficiencies were higher than 90 %. An overall removal efficiency of 51 % was found for both metals at the end of the 25 days of the biosorption stage. In conclusion, this type of biomass can be used for the treatment of water contaminated with copper and iron, but inhibitory effects must be taken into account to improve process efficiency.

## **DEDICATORIA**

Para mi madre, Karina, y mi padre, Gonzalo, por darme la dicha de estar vivo y brindarme la seguridad de un hogar en donde siempre podré sentir la más plena y genuina felicidad.

Para mi hermana, Cesiah, por esa confianza mutua que va más allá de las palabras y a quien admiro profundamente.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
RESUMEN .....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABLAS .....	xii
AGRADECIMIENTOS .....	xiii
1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.....	1
1.1 Introducción. ....	1
1.2 Objetivos.....	4
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 Los metales pesados y su problemática ambiental.....	5
2.1.1 Definición y toxicidad de los metales pesados.....	5
2.1.2 Problemática ambiental en el mundo. ....	8
2.1.3 Problemática ambiental en México. ....	10
2.1.3.1 Problemática en Sonora. ....	11
2.2 Métodos de remoción de metales pesados. ....	12
2.2.1 Métodos físico-químicos. ....	13
2.2.2 Métodos biológicos/bioquímicos.....	17
2.3 Biosorción. ....	21
2.3.1 Mecanismos de biosorción. ....	22
2.3.2 Equilibrio de biosorción. ....	24
2.4 Biomasa disponible. ....	25
2.4.1 Digestión anaerobia. ....	27
2.5 Biosorción en reactores. ....	30
2.5.1 Técnicas de inmovilización. ....	33
3. METODOLOGÍA.....	36
3.1 Diagrama experimental. ....	36

3.2. Estudios en lote. ....	36
3.2.1 Acondicionamiento de la biomasa.....	36
3.2.2 Estudios de toxicidad.....	39
3.2.3 Isotermas de biosorción de Cu (II) y Fe (II).....	40
3.3 Estudios en continuo. ....	43
3.3.1 Etapa de acondicionamiento.....	43
3.3.1.1 Caracterización del lecho.....	45
3.3.1.2 Demanda química de oxígeno (DQO). ....	45
3.3.1.3 Ácidos grasos volátiles (AGV's). ....	45
3.3.2 Etapa de biosorción. ....	45
3.3.2.1 Caracterización del lecho.....	45
3.3.2.2 Efecto del Cu (II) y Fe (II) sobre la DQO y AGV's. ....	46
3.3.2.3 Efecto del Cu (II) y Fe (II) sobre el consumo de dextrosa. ....	46
3.3.2.4 Cinética de biosorción del Cu (II) y Fe (II). ....	46
3.4 Métodos Analíticos. ....	47
3.4.1 Sólidos. ....	47
3.4.2 Demanda Química de Oxígeno (DQO). ....	48
3.4.3 Ácidos Grasos Volátiles (AGV's). ....	48
3.4.4 Dextrosa.....	49
3.4.5 Microscopía Electrónica de Barrido.....	50
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	51
4.1 Estudios en lote. ....	51
4.1.1 Acondicionamiento de la biomasa.....	51
4.1.2 Estudios de toxicidad.....	53
4.1.3 Isotermas de biosorción del Cu (II) y el Fe (II).....	60
4.2 Estudios en continuo. ....	71
4.2.1 Etapa de acondicionamiento.....	71
4.2.1.1 Caracterización del lecho.....	71
4.2.1.2 Demanda química de oxígeno (DQO). ....	77
4.2.1.3 Ácidos grasos volátiles (AGV's). ....	79
4.2.2 Etapa de biosorción. ....	81

4.2.2.1 Caracterización del lecho.....	81
4.2.2.2 Efecto del Cu (II) y Fe (II) sobre la DQO y AGV's.....	84
4.2.2.3 Efecto del Cu (II) y Fe (II) sobre el consumo de dextrosa.....	85
4.2.2.4 Cinética de biosorción del Cu (II) y el Fe (II).....	88
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....	92
5.1 Conclusiones.....	92
5.2 Recomendaciones.....	94
ANEXO A : Curvas de Calibración.....	96
ANEXO B : Estudios en Lote .....	101
ANEXO C : Estudios en Continuo.....	107
BIBLIOGRAFÍA .....	112

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
2.1 Clasificación de los métodos de remoción de metales pesados.....	14
2.2 Etapas de la digestión anaerobia.....	28
3.1 Diagrama experimental.....	37
3.2 Reactor Anaerobio Acidogénico con biomasa inmovilizada en clinoptilolita. ....	44
4.1 Consumo de dextrosa por la biomasa expuesta a Cu (II) y Fe (II). ....	54
4.2 Actividad de consumo de sustrato de la biomasa expuesta a Cu (II). ....	57
4.3 Actividad de consumo de sustrato de la biomasa expuesta a Fe (II). ....	58
4.4 Actividad de consumo de sustrato de la biomasa expuesta a Cu (II) y Fe (II). ....	59
4.5 Cinética de biosorción del Cu (II) en el sistema sencillo. ....	61
4.6 Cinética de biosorción del Cu (II) en el sistema binario (Cu-Fe).....	62
4.7 Cinética de biosorción del Fe (II) en el sistema sencillo. ....	63
4.8 Cinéticas de biosorción del Fe (II) en el sistema binario (Cu-Fe).....	64
4.9 Isoterma de biosorción del Cu (II) en el sistema sencillo.....	66
4.10 Isotermas de biosorción del Fe (II) en el sistema sencillo. ....	67
4.11 Isotermas de biosorción del Cu (II) y el Fe (II) en el sistema binario. ....	68
4.12 Microorganismos dentro del reactor. ....	74
a) Muestra con tinción de Gram. b) Muestra fresca.	
4.13 Micrografías representativas durante la etapa de acondicionamiento. ....	76
a) Clinoptilolita sin biomasa. b) Clinoptilolita con biomasa.	
4.14 Eficiencia de remoción de DQO en el bioreactor. ....	78
4.15 Concentración de AGV's en el efluente del reactor. ....	80
4.16 Micrografías representativas por MEB durante la etapa de biosorción.....	83
a) Microorganismos observados al final de la experimentación.	
b) Metales bioacumulados y biosorbidos en los microorganismos.	
4.17 Remoción de la DQO antes y durante la etapa de biosorción. ....	86
4.18 Consumo de dextrosa en el reactor antes y durante la etapa de biosorción. ....	87
4.19 Curvas de ruptura de los metales Cu (II) y Fe (II) en el reactor. ....	89

A.1	Curva de calibración de la DQO.....	96
A.2	Tabla de resultados arrojada por el equipo de HPLC. ....	97
A.3	Curva de calibración del ácido acético. ....	98
A.4	Curva de calibración del ácido propiónico. ....	98
A.5	Curva de calibración del ácido butírico. ....	99
A.6	Curva de calibración de dextrosa. ....	100
B.1	Imágenes de la experimentación durante los estudios de toxicidad.....	101
B.2	Imágenes de la experimentación de las cinéticas de biosorción. ....	103
B.3	Ajuste de los datos al modelo de Langmuir. ....	105
B.4	Ajuste de los datos al modelo de Freundlich. ....	105
C.1	Análisis de la clinoptilolita por DRX.....	107
C.2	pH en el efluente del reactor durante las tres etapas de experimentación.....	108
C.3	Comparación de AGV's totales por HPLC y retrotitulación. ....	109
C.4	Concentración de metal retenida ( $C_{ads}=C_o-C$ ) durante la etapa de biosorción. ....	111

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
2.1 Efectos tóxicos y límites de descarga [mg/L] de algunos metales. ....	6
2.2 Criterios Ecológicos de Calidad del Agua para diferentes usos. ....	7
2.3 Ventajas y desventajas de los métodos de tratamiento .....	20
2.4 Tipos de biomasa utilizada como biosorbentes. ....	26
2.5 Materiales utilizados para inmovilización de biomasa .....	34
3.1 Medio mineral utilizado para el acondicionamiento.....	38
3.2 Arreglo experimental para los estudios de toxicidad.....	42
3.3 Arreglo experimental para la obtención de las isotermas de biosorción. ....	42
4.1. AGV's producidos por día por el lodo en el acondicionamiento en lote.....	52
4.2 Determinación de sólidos en el lodo durante el acondicionamiento en lote.....	52
4.3 Parámetros del modelo de Langmuir encontrados en los diversos sistemas. ....	65
4.4 Capacidades de biosorción del Cu por distintas clases de biomasa .....	70
4.5 Capacidades de biosorción del Fe por distintas clases de biomasa .....	70
4.6 Evolución de sólidos en el reactor durante la experimentación en continuo. ....	72
4.7 Evolución de sólidos en el reactor durante la etapa de biosorción. ....	82
4.8 Parámetros de biosorción del Cu (II) y el Fe (II) en el reactor anaerobio. ....	91
B.1 Resultados experimentales utilizados en el cálculo de la actividad acidogénica.	102
B.2 Resultados experimentales obtenidos durante las cinéticas de biosorción. ....	104
B.3 Ajuste lineal de los datos a los modelos de Langmuir y Freundlich.....	106
C.1 Resultados experimentales obtenidos durante la etapa de biosorción. ....	110
C.2 Valores de integración numérica para el cálculo de Qads. ....	111

## AGRADECIMIENTOS

Gracias a Dios, por esas pequeñas y hermosas bendiciones que llegan inesperadamente.

Gracias infinitas a mi familia, que siempre ha estado presente para darme ese apoyo incondicional que me motiva a lograr mis metas y superarme como persona. Los amo con todo mi corazón.

Un agradecimiento especial a la Dra. María Teresa Certucha Barragán, mi directora de tesis, por el conocimiento y apoyo otorgado a lo largo del programa de maestría y sobre todo por el tiempo y la dedicación brindados para la culminación de ésta tesis. Es un placer contar con su amistad.

Agradezco también a mis sinodales, la Dra. Evelia Acedo Félix, la Dra. Onofre Monge Amaya y el Dr. Francisco Javier Almendariz Tapia, por los consejos y comentarios realizados, los cuales sin duda ayudaron en la realización de éste proyecto de investigación y en la escritura de tesis.

Gracias a Lupita, Karla, Glenda, y Luis, compañeros y amigos que sin pensarlo pusieron su granito de arena, pero sobre todo gracias porque su compañía hizo más agradable el trabajo de laboratorio.

Gracias a la Universidad de Sonora y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado para la obtención de un grado de maestría en el Posgrado en Ciencias de la Ingeniería: Ingeniería Química.

Por último, un agradecimiento para todas aquellas personas - familiares, amigos y compañeros - que a través de su *amistad* contribuyeron indirectamente en la realización de ésta tesis. Tú eres una de ellas.

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

### 1.1 Introducción.

La industrialización y urbanización han promovido la generación de grandes cantidades de efluentes acuosos, los cuales pueden contener altos niveles de compuestos tóxicos (Park *et al.*, 2010). Esto da como resultado la acumulación de contaminantes a concentraciones perjudiciales para el correcto funcionamiento de los ecosistemas, lo que constituye un problema de importancia económica y salud pública (Cañizares-Villanueva, 2000).

Un grupo específico de contaminantes liberados al ambiente como resultado de actividades industriales, como la minería, son los metales pesados, o elementos potencialmente tóxicos, los cuales pueden ocasionar daños a la salud. Una de las principales actividades económicas de nuestro país es la minería, siendo el oro, la plata y el cobre los metales preciosos de mayor producción (Monge-Amaya *et al.*, 2008). Las etapas de extracción y purificación de minerales de los procesos metalúrgicos conllevan la liberación de efluentes (drenaje ácido de mina, DAM) con metales pesados que acaban en los cuerpos de agua.

En el Estado de Sonora, el río San Pedro ha sido contaminado por metales pesados debido a su cercanía con la actividad minera de la región. Entre los metales pesados detectados en las aguas del río se encuentran: cadmio, cobalto, cromo, hierro, manganeso, cobre, zinc, níquel y plomo. Sin embargo, dos de los metales que se encuentran en concentraciones altas son el cobre y el hierro, los cuales exceden los valores máximos permisibles establecidos en las leyes de calidad de agua de nuestro país para fuentes de abastecimiento de agua potable (Gómez-Álvarez *et al.*, 2004).

Para la remoción de metales pesados existen diversos métodos de separación convencionales, entre los que se encuentran: ósmosis inversa, electrodiálisis, ultrafiltración, precipitación química e intercambio iónico (Ahalya *et al.*, 2003). Estos métodos tienen la desventaja de tener altos costos de operación. Por ejemplo, las resinas de intercambio

iónico han sido reconocidas comercialmente por su efectividad como adsorbentes en el tratamiento de aguas contaminadas, pero los altos costos limitan sus aplicaciones a nivel industrial (Park *et al.*, 2010).

La búsqueda de alternativas económicas y eficientes ha propiciado la realización de numerosos estudios con un gran número de materiales que puedan ser usados como adsorbentes. Una de las alternativas recientes y que ha resultado atractiva dentro del ámbito ambiental involucra el uso de materiales biológicos y su capacidad para captar y concentrar los metales pesados presentes en aguas contaminadas por medio de mecanismos físico químicos y/o metabólicos (Park *et al.*, 2010).

Esta alternativa se conoce como biosorción y se basa en el proceso de concentración de un sorbato (iones metálicos) por un material sorbente, en donde el prefijo “bio” indica que el sorbente es un material biológico (Chojnacka, 2010). Desarrollos en el campo de la biotecnología ambiental indican que para la biosorción se puede utilizar: hongos, levaduras, algas y bacterias (Sag y Kutsal, 2001). Este proceso se puede llevar a cabo en un bioreactor, en donde el agua contaminada fluye a lo largo de una cama de microorganismos que captan y concentran los metales. La ventaja de los bioreactores es que permiten tratar un gran volumen de agua, transfiriendo la “porción” contaminada a un volumen considerablemente más pequeño.

No obstante, durante la operación de los bioreactores pueden ocurrir ciertos problemas, como el lavado de la biomasa, dificultad en la separación líquido-sólido y caídas de presión; esto sucede debido a que la biomasa microbiana se encuentra constituida por partículas pequeñas con baja densidad, baja rigidez y poca fuerza mecánica (Montalvo *et al.*, 2012), lo que ocasiona una disminución en la eficiencia del proceso. La inmovilización de la biomasa en una matriz conveniente puede solucionar estos problemas, ya que permite que la biomasa tenga un tamaño apropiado, mayor fuerza mecánica y rigidez.

Debido a esto, una de las configuraciones de reactor más usadas es el reactor de lecho empacado, pues además de su sencilla implementación en laboratorio y fácil escalamiento

a nivel industrial, permite inmovilizar fácilmente a la biomasa dentro del reactor con la ayuda de un material de soporte (Park *et al.*, 2010). Los materiales de soporte deben permitir el fácil crecimiento de la biomasa sobre su superficie, formando lo que se conoce como una biopelícula constituida por células microbianas y sustancias poliméricas extracelulares.

Entre los materiales de soporte que se han utilizado en procesos de biosorción se incluyen: espuma de poliuretano (Pakshirajan y Swaminathan, 2009), perlas de vidrio (García-Morales *et al.*, 1999), zeolitas (Fernandez *et al.*, 2008), entre otros. Las zeolitas son un grupo de compuestos minerales cristalinos, cuyas características estructurales permiten que los reactores anaerobios retengan altas concentraciones de biomasa, logrando altas eficiencias y bajos tiempos de retención hidráulica (Montalvo *et al.*, 2012). La clinoptilolita es la zeolita natural más abundante que existe en México, y por lo tanto, es un material muy económico (Halbinger-Flores *et al.*, 2002).

Otro punto importante a considerar cuando se trabaja con microorganismos vivos es el grado de toxicidad ejercido por los metales. Los microorganismos anaerobios llevan a cabo como parte de su metabolismo lo que se conoce como digestión anaerobia, la cual ha sido implementada como una de las tecnologías más adecuadas para el tratamiento y estabilización de efluentes con alta carga orgánica. Los dos grupos bacterianos principales encontrados en los tratamientos anaerobios corresponden a la biomasa acidogénica, que convierte la materia orgánica en ácidos grasos volátiles (AGV's), y la biomasa metanogénica, cuyo producto final es el metano. Se considera que la biomasa metanogénica es generalmente más sensible a cambios en sus condiciones de desarrollo debido a que sus requerimientos ambientales (como temperatura, pH, presencia de tóxicos) son más estrictos que los de la biomasa acidogénica (García-Morales *et al.*, 1999). Además, ha sido reportado que, durante un proceso anaerobio, las bacterias acidogénicas son más resistentes a la inhibición causada por la presencia de metales (Lin y Chen, 1999).

Por estas razones, fue de especial interés realizar una investigación que permitiera conocer el desempeño de un reactor anaerobio acidogénico empacado con zeolita (clinoptilolita)

como soporte para la biosorción de Cu (II) y Fe (II) y de esta manera aportar conocimiento científico que ayude a disminuir los problemas ambientales generados en algunos procesos de la industria metalúrgica.

## **1.2 Objetivos.**

### **Objetivo general.**

Evaluar la biosorción de Cu (II) y Fe (II) mediante biomasa anaerobia acidogénica inmovilizada en clinoptilolita en un sistema continuo.

### **Objetivos específicos.**

1. Cuantificar el efecto tóxico de Cu (II) y Fe (II) en sistema en lote.
2. Determinar las isotermas de biosorción de Cu (II) y Fe (II), en sistema en lote.
3. Caracterizar el sistema clinoptilolita-biomasa-metal antes y después del proceso de biosorción en sistema continuo.
4. Evaluar el comportamiento del reactor en presencia del Cu (II) y Fe (II).
5. Determinar la cinética de biosorción del Cu (II) y Fe (II) en sistema continuo.

## CAPÍTULO 2

### REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### **2.1 Los metales pesados y su problemática ambiental.**

##### **2.1.1 Definición y toxicidad de los metales pesados.**

Uno de los principales problemas de la sociedad en el siglo XXI es la contaminación ambiental. Entre los principales contaminantes se encuentran los metales pesados, cuya cantidad se incrementa constantemente debido al crecimiento de las actividades industriales, entre ellas la minería. “Metal pesado” es un término que se aplica a un grupo de elementos (metales y metaloides) que presentan una densidad mayor a  $5000 \text{ kg/m}^3$ , o 5 veces mayor que la del agua (Chojnacka, 2010; Hashim *et al.*, 2011). Los metales pesados se encuentran naturalmente en la corteza terrestre, y pueden ser solubilizados fácilmente en el agua subterránea o superficial a través de procesos naturales o por cambios en el pH del suelo. Las especies metálicas liberadas al ambiente por las actividades industriales tienden a persistir indefinidamente, circulando y acumulándose eventualmente en la cadena alimenticia, planteando un serio problema para animales y humanos (Volesky y May-Phillips, 1995). El envenenamiento puede suceder por contaminación del agua potable, la movilización del metal a través de la cadena alimenticia, o por concentraciones en el aire extremadamente altas cercanas a las fuentes de emisión (Hashim *et al.*, 2011).

Los metales más peligrosos para el ser humano conforman un famoso “trío tóxico” que incluye al cadmio (Cd), el plomo (Pb) y el mercurio (Hg), a los cuales no se les ha encontrado ninguna función biológica (Chojnacka, 2010). Sin embargo, otros metales que, aunque son esenciales en dosis pequeñas para el crecimiento como el Na, K, Mg, Ca, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn y Mo, pueden convertirse también en compuestos tóxicos debido a su capacidad para alterar o desnaturalizar las proteínas (Cañizares-Villanueva, 2000), como se puede observar en la Tabla 2.1.

**Tabla 2.1** Efectos tóxicos y límites de descarga [mg/L] de algunos metales.

<b>Metal</b>	<b>Límite descarga</b>	<b>Riesgos potenciales a la salud</b>	<b>Fuentes de contaminación</b>
Arsénico	0.2	Problemas en la piel, daños al sistema circulatorio, riesgo de contraer cáncer.	Erosión natural, desechos de la producción del vidrio y electrónicos.
Cadmio	2.0	Daños a los riñones.	Corrosión de tubos galvanizados, erosión natural, refinерías de metales.
Cromo (VI)	0.1	Dermatitis alérgica	Descargas de industrias químicas y agrícolas.
<b>Cobre</b>	3.0	Problemas gastrointestinales, daños al hígado y riñones.	Corrosión en los sistemas de drenaje, desechos mineros.
Plomo	0.1	Retraso en el desarrollo físico y mental de infantes, daños a los riñones en los adultos.	Corrosión, desechos de industrias químicas.
<b>Hierro</b>	3.0	Riesgo de cáncer de pulmón.	Común en aguas subterráneas, efluentes mineros.
Zinc	5.0	Náusea, vómito, dolores abdominales.	Corrosión de tuberías, efluentes de industrias mineras y de fertilizantes.
Níquel	3.0	Fibrosis pulmonar, dermatitis, problemas gastrointestinales.	Producción de pinturas, industrias electro-refinación, producción de minerales.

Fuente: Mungray *et al.*, 2012

El cobre y el hierro fueron los metales de interés en el presente trabajo de investigación debido a la problemática existente en el Estado de Sonora, como se abordará en las siguientes secciones. El cobre se encuentra en la naturaleza principalmente en forma de sulfuros, sulfatos, carbonatos y compuestos minerales como la cuprita, la calcopirita, la bornita y la azurita. El cobre también se puede encontrar en muchos organismos formando parte del metabolismo celular, ya que juega un papel importante en estructura de la enzima citocromo c-oxidasa, la cual participa en la cadena respiratoria celular. La toxicidad del cobre es causada por una acumulación excesiva, causando problemas como hemólisis, necrosis hepática y hemorragias gastrointestinales (Nies, 1999; Monge-Amaya *et al.*, 2008). La presencia del cobre en forma disuelta en los efluentes mineros es la principal causa de contaminación por cobre en las corrientes de agua, aunque también se puede deber a los desechos de otras industrias como el refinado del petróleo, pinturas, acero, fertilizantes y electrolaminado (Malamis *et al.*, 2010).

Por su parte, el hierro es el único macroelemento de los metales pesados. La presencia del ion ferroso en los sistemas metabólicos juega un papel importante como aceptor de electrones en los sistemas de transporte de las bacterias que se desarrollan en ambientes anaerobios (Nies, 1999). El hierro también es liberado en mayor proporción por las industrias mineras, ya que los efluentes metalúrgicos se originan generalmente a partir de la oxidación de minerales como la pirita ( $\text{FeS}_2$ ) y otros compuestos sulfurosos, lo que resulta en la liberación de soluciones ácidas cargadas de hierro (Díaz *et al.*, 2003).

Los valores establecidos en los Criterios Ecológicos de Calidad del Agua (SEDUE, 1989) en México para descargas de cobre y hierro se presentan en la Tabla 2.2.

**Tabla 2.2** Criterios Ecológicos de Calidad del Agua para diferentes usos.

<b>Metal</b>	<b>Fuente de Agua Potable [mg/L]</b>	<b>Recreativo e industrial [mg/L]</b>
<b>Cu</b>	1	0.1
<b>Fe</b>	0.3	-

Fuente: Gómez-Álvarez *et al.*, 2004

### **2.1.2 Problemática ambiental en el mundo.**

Los metales pesados son liberados al ambiente a través de los efluentes acuosos de un gran número de industrias, entre ellas las relacionadas con la fabricación de automóviles, los fertilizantes, pinturas, baterías, y el procesamiento y purificación de minerales (Apiratikul *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005). Los elementos de mayor importancia liberados por este tipo de industrias incluyen al cadmio, cromo, plomo, níquel, cobre, hierro, zinc y arsénico (Barakat, 2011). En el caso de las industrias metalúrgicas, la principal fuente de contaminación se debe al drenaje ácido de mina (DAM). El DAM es un lixiviado resultante de la oxidación de compuestos sulfurosos al ser expuestos al aire, agua, y otros minerales. Éste lixiviado se caracteriza principalmente por tener: bajos valores de pH (entre 2 y 5), altos contenidos de sulfatos, hierro (entre 50 y 1,000 mg/L), zinc (hasta 200 mg/L), manganeso (entre 1 y 100 mg/L), aluminio, plomo, cobre, níquel, mercurio, cadmio, cromo y otros elementos tóxicos como el arsénico y concentraciones elevadas de calcio y magnesio (Díaz, 2003).

Estos elementos son descargados en los sistemas acuáticos y terrestres principalmente como solutos o partículas, llegando a alcanzar altas concentraciones, especialmente cerca del sitio de descarga. Debido a su movilidad en los ambientes acuáticos y a su toxicidad, los iones metálicos han sido considerados como los mayores contaminantes inorgánicos de aguas superficiales y subterráneas (Cañizarez-Villanueva, 2000). Por su parte, las aguas subterráneas resultan contaminadas por la filtración de las lagunas de desechos industriales, lixiviados de rellenos sanitarios y plantas mineras o por derrames y fugas industriales (Hashim *et al.*, 2011). Entre los principales problemas ocasionados por la presencia de metales pesados en los ecosistemas se encuentran la inutilización de tierras para agricultura previamente fértiles, y el surgimiento de aguas ricas en metales (a partir de vertederos de desechos o drenajes ácidos de mina) que subsecuentemente contaminan los ríos, lagos y zonas costeras (Ramirez-Paredes *et al.*, 2011). Los efectos nocivos de los efluentes industriales han sido reconocidos en varios lugares del mundo, incrementado la necesidad de encontrar alternativas de tratamiento de desechos.

Por ejemplo, el efecto devastador de la contaminación de suelos y aguas subterráneas sobre la población humana quedó de manifiesto en 1978 en la tragedia de “Love Canal”, una población en la ciudad de Niagara, Estados Unidos. En este desastre, toneladas de desechos químicos industriales, enterrados entre los años 40’s y 50’s por una compañía petrolera comenzaron a escapar hacia la superficie, causando una emergencia de salud pública (Hashim *et al.*, 2011).

El envenenamiento de plomo en niños fue reconocido desde los años setenta como un problema grave por las autoridades de salud en Estados Unidos. Una vez reconocido el problema, el creciente cuerpo de información sobre el efecto nocivo del plomo condujo a las autoridades de salud a emitir normas cada vez más estrictas sobre los niveles de este metal en la sangre. Además, las instituciones ambientales prohibieron el uso de las pinturas basadas en plomo en 1978 y se empezó a sustituir paulatinamente el plomo en las gasolinas a partir de la década de los setenta (Valdés-Peresgasca, 1999).

En Brasil, los drenajes ácidos de mina (DAM) provenientes de las empresas mineras de carbón en la región de Santa Catarina, han sido la causa principal de la contaminación que ha afectado las corrientes de agua de tres cuencas importantes, correspondientes a los ríos: Aranraguá, Tubarão, y Urussanga. Estos ríos tienen un total de 20, 209.5 km y han sido completamente dañados por la actividad minera (Pires-Freitas *et al.*, 2011).

Otro ejemplo de contaminación, ocurrido en Sevilla, España, el 28 de abril de 1998 fue la dispersión de metales a través de la cuenca del río Guadalquivir y sobre la reserva natural de Doñana, resultado del colapso de un depósito de aguas ácidas de mina (Ramírez-Paredes *et al.*, 2011). En India, la descarga de metales pesados también ha sido motivo de preocupación en las últimas décadas desde que la industrialización se dio a pasos agigantados debido a un plan de desarrollo puesto en marcha en los años cincuenta (Ahalya *et al.*, 2003).

### 2.1.3 Problemática ambiental en México.

México ha experimentado un desarrollo industrial en las últimas décadas, debido especialmente a las actividades petroleras y metalúrgicas, que han traído como consecuencia el grave problema de la contaminación. La industria minera es una de las actividades económicas más importantes en nuestro país, en donde los metales preciosos de mayor producción son el cobre, la plata y el oro, además del zinc y el plomo. Como consecuencia se han producido una gran cantidad de desechos que favorecen la contaminación de los cuerpos de agua (Monge-Amaya *et al.*, 2008).

La contaminación por metales pesados y sus efectos ha sido ampliamente investigada en nuestro país, ya que varias regiones han sido afectadas por descargas de aguas residuales urbanas, agrícolas e industriales. En el río Zahuapan-Atoyac, en Tlaxcala, se han encontrado niveles de arsénico y plomo que superan los valores establecidos en normas nacionales e internacionales (García-Nieto *et al.*, 2011). En la laguna de Mandinga, Veracruz, se han detectado severos daños - utilizando técnicas histopatológicas - en la ostra *Crassostrea virginica* (la ostra de mayor producción en México), relacionados con la presencia de Cr, Cd, y Pb en las aguas de la laguna (Guzmán-García *et al.*, 2009).

En Nayarit, uno de los flujos de agua más importantes es el río Molula, cuya corriente ha sido deteriorada debido a la contaminación urbana e industrial. Existen dos fuentes importantes de contaminación, que corresponden a lixiviados de los depósitos de basura que se filtran hacia las aguas del río y a las descargas de grandes volúmenes de aguas sépticas parcialmente tratadas. La Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) ha detectado la presencia de metales que se originan en los lixiviados. Además, menciona que el agua del río se está utilizando como fuente de irrigación para campos agrícolas, lo que tiene un impacto directo sobre la calidad de productos naturales que se destinan para el consumo humano (Mondragon *et al.*, 2011).

El río Tecate, en Tijuana, forma parte de la cuenca del río Tijuana, cuyo caudal es compartido por México y por los Estados Unidos. La corriente del río fluye solamente durante inundaciones eventuales asociadas a las tormentas de agua. Sin embargo, las

descargas de agua de las plantas de tratamiento localizadas en Tecate producen una corriente de agua de baja calidad que fluye todo el tiempo. La calidad del agua se ha evaluado, encontrándose concentraciones elevadas de metales cercanas a los sitios de uso urbano e industrial. Esto se debe a que la industria principal de Tecate corresponde al sector maquilador, abarcando la fabricación de muebles e industrias metalúrgicas. Algunas de estas industrias utilizan procesos de galvanoplastia, convirtiéndose en fuente de residuos metálicos (Wakida *et al.*, 2008).

### **2.1.3.1 Problemática en Sonora.**

En el Estado de Sonora también se encuentran ejemplos de la contaminación por metales pesados. Como resultado de las descargas domésticas e industriales, se ha reportado la presencia de altos niveles de metales (en el orden  $Fe > Mn > Zn > Pb > Cu > Cr > Cd$ ) en los sedimentos de la presa Abelardo L. Rodríguez, en la ciudad de Hermosillo. Esto es de especial interés, ya que los metales adsorbidos en los sedimentos pueden ser liberados si cambia la composición iónica del agua (Gómez-Álvarez *et al.*, 2011).

En la bahía de Bacochibampo, en la parte sur del estado, se encontraron trazas de los metales Cd, Pb, Zn en forma disuelta, mientras que en forma particulada se detectó Cu, Fe y Mn. Todos los metales se encontraron por debajo de los criterios de la Agencia de Protección Ambiental, a excepción del Pb. Aunque las aguas de la bahía no parecen estar muy contaminadas, es importante reducir los desechos domésticos e industriales para minimizar y prevenir los riesgos ambientales (García-Rico *et al.*, 2011).

El ejemplo más claro de contaminación de aguas por metales pesados se puede encontrar en el río San Pedro, localizado al norte del estado, considerado la principal fuente de abastecimiento de agua para las actividades agrícolas y ganaderas de la región. Este río es transfronterizo y tiene su origen cerca del municipio de Cananea, el cual se ha caracterizado por tener los distritos mineros más explotados del estado de Sonora, donde la minería se ha dedicado principalmente a la producción de cobre y plata (Monge-Amaya *et al.*, 2008).

Actualmente, los suministros de agua del río son considerados escasos, con retiros de agua que exceden las recargas por aproximadamente 6-12 millones de metros cúbicos de agua. El incremento de la producción de cobre de las extensas reservas de minerales limita la disponibilidad de las aguas superficiales para usos municipales y agrícolas, y esto se agrava con los efectos de la variabilidad climática. Además, la calidad del agua subterránea y superficial se ha visto deteriorada debido a la introducción de numerosos compuestos provenientes de basureros sin revestimientos y sobretodo de los desechos de las minas de cobre (Browning-Aiken *et al.*, 2007).

Los efluentes mineros, provenientes del almacenamiento de aguas ferrocupríferas de un depósito llamado “concentradora vieja”, han propiciado la contaminación del río. En estaciones de muestreo cercanas a la actividad minera de la región, se han detectado bajos valores de pH y altos niveles de sulfatos, así como de los metales Cd, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn, cuyas concentraciones fueron mayores a los niveles máximos establecidos en los Criterios Ecológicos de Calidad del Agua CE-CCA-001/89 (SEDUE, 1989). (Gómez-Alvarez *et al.*, 2004). Con el propósito de reducir y prevenir el impacto ambiental sobre los cuerpos de agua (incluyendo el río San Pedro) se han desarrollado numerosos proyectos de investigación, entre ellos el presente trabajo. Estas alternativas deben ser eficaces y de bajo costo, y su objetivo es eliminar o reducir la presencia de metales en el agua hasta que los valores se encuentren por debajo de los niveles máximos establecidos en las leyes ambientales.

## **2.2 Métodos de remoción de metales pesados.**

El agua es un recurso importante y vital para el crecimiento social y económico de una población. Debido a ello, es completamente necesario que el agua se maneje de acuerdo con los principios del desarrollo sustentable, de manera que se pueda disminuir el deterioro ambiental causado por el crecimiento y el desarrollo económico. Por otro lado, el uso masivo de la energía y de los recursos limitados por la sociedad crea la necesidad de realizar cambios en los sistemas de tratamiento de aguas residuales (Certucha-Barragan *et al.*, 2011).

Las inadecuadas o inexistentes plantas de tratamiento en las poblaciones o en la misma industria también contribuyen a las descargas sin control de aguas residuales. Virtualmente, todas las industrias que usan metales tienen problemas de eliminación de desechos. No obstante, las descargas de las industrias mineras pueden ser consideradas como fuentes de emisión puntuales, lo que ofrece la posibilidad de implementar acciones factibles para la remediación de los procesos (Volesky y May-Phillips, 1995).

Existen varios métodos de tratamiento para la remoción de metales pesados. En la Figura 2.1 se presenta una clasificación general de las diversas tecnologías usadas en los últimos años. Una breve descripción de los métodos se encuentra en las secciones 2.2.1 y 2.2.2.

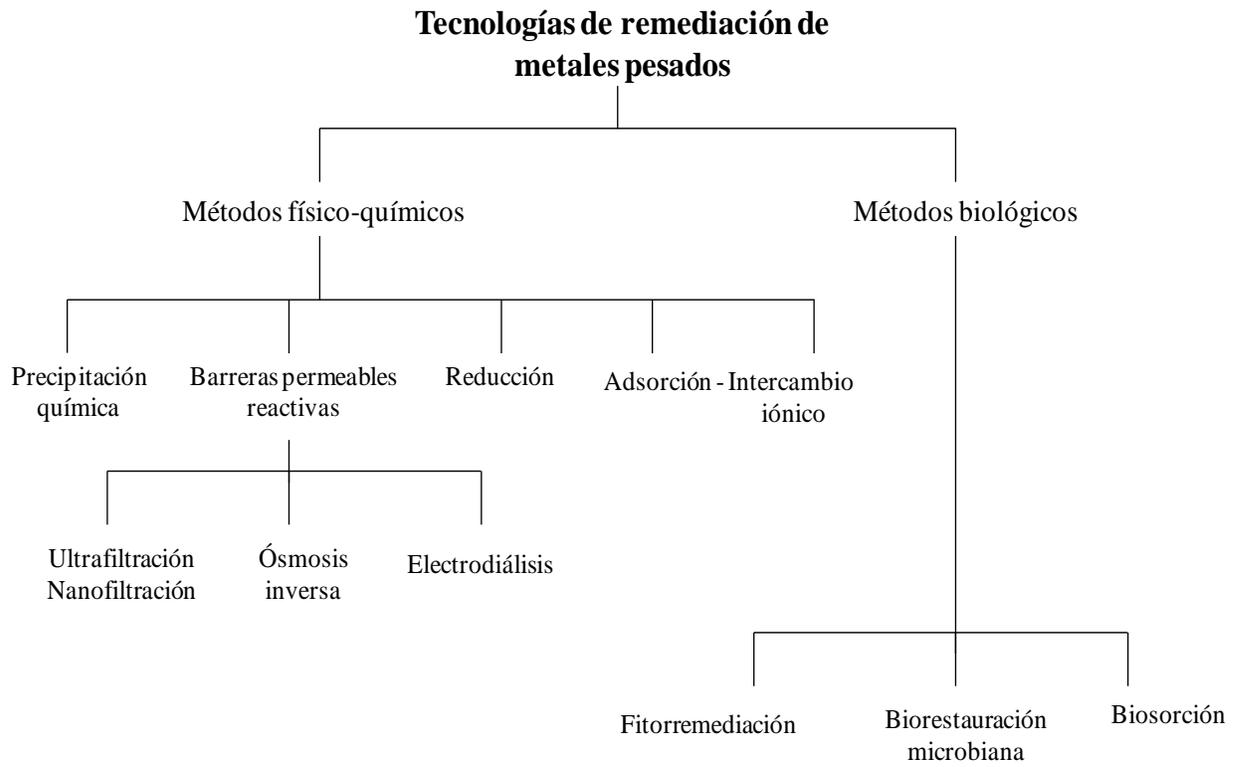
### 2.2.1 Métodos físico-químicos.

#### *Precipitación química:*

La precipitación química es una tecnología ampliamente utilizada para la remoción de metales pesados. El proceso involucra la transformación de los contaminantes, comenzando como sólidos disueltos y terminando como sólidos insolubles, lo que permite la separación. El mecanismo conceptual se presenta en la Ec. (2.1):



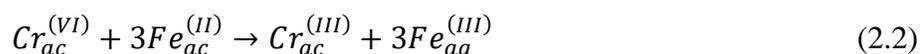
Donde  $M^{2+}$  y  $OH^{-}$  representan al ion metálico disuelto y al agente precipitante, respectivamente, mientras que  $M(OH)_2$  es el hidróxido metálico insoluble. El pH de la solución es uno de los parámetros más importantes en el proceso, ya que disminuye o mejora significativamente la remoción. La precipitación ha sido el método primario de tratamiento de aguas residuales de las industrias metalúrgicas. Usualmente se utiliza hidróxido de sodio durante la precipitación, pero también se ha utilizado carbonato de calcio y cal granulada. En un estudio con cal granulada se reportó una remoción del 98 % de arsénico y níquel. La precipitación por cal permite tratar concentraciones metálicas mayores a 1000 mg/L. Además, el proceso es simple y la implementación y operación del equipo es sencilla y de bajo costo. Sin embargo, la precipitación es lenta e insuficiente, y la producción de lodo residual es excesiva, lo que plantea un costo adicional de tratamiento (Akpor *et al.*, 2010; Barakat, 2011).



**Figura 2.1** Clasificación de los métodos de remoción de metales pesados.

### *Reducción.*

El método consiste en hacer pasar el agua a través de una “zona” de reducción, en donde el metal será reducido a un estado de oxidación menos tóxico. Por ejemplo, el cromo es un metal tóxico y cancerígeno en su estado más oxidado, Cr (VI). El Cr (VI) puede ser reducido e inmovilizado a su forma menos tóxica, Cr (III), por acción del sulfato ferroso. Una de las reacciones sugeridas en la literatura por Hashim *et al.* (2011) es la Ec. (2.2):



En un pH de solución neutro, se formaría entonces el siguiente precipitado Ec. (2.3):



Otros agentes reductores pueden ser las ditionitas ( $[S_2O_4]^{2-}$ ) y el sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ), que son utilizados para convertir a al uranio (U), y el torio, (Th), a sus estados de oxidación menos tóxicos. Algunas de las desventajas de este método incluyen la formación de intermediarios gaseosos que también pueden ser tóxicos y la difícil manipulación de algunos agentes reductores (Hashim *et al.*, 2011).

### *Ultrafiltración-Nanofiltración.*

La ultrafiltración utiliza membranas permeables con un tamaño de poro de 5-20 nm, mientras que las membranas para nanofiltración tienen tamaños de poro mucho más pequeños. La membrana permite el paso del agua y solutos de bajo peso molecular, mientras que las macromoléculas, sólidos suspendidos y compuestos metálicos, con tamaños de partícula mucho mayores que el tamaño de poro, son retenidos. Se ha reportado el uso de membranas de celulosa-quitosano y membranas formadas de un compuesto metálico ( $ZnAl_2O_4-TiO_2$ ) para la remoción de Cu (II) y Zn (II), y Cd (II) y Cr (III), respectivamente. Debido a la alta densidad de empaquetamiento de las membranas, sus requerimientos de espacio son pequeños, pero su rendimiento se ve afectado por los taponamientos que causan subidas de presión y disminución en los flujos de agua (Barakat, 2011).

### *Ósmosis inversa.*

La ósmosis inversa es una operación en donde los metales son separados por medio de una membrana semi-permeable. Es necesario ejercer presión para forzar sólo el paso del solvente (agua residual) hacia un lado de la membrana, concentrando los solutos (metales) del otro lado. Este proceso es muy efectivo para la remoción de especies iónicas en solución y otros compuestos orgánicos. La ósmosis inversa ha sido aplicada para la remoción de cobre y cadmio, alcanzando eficiencias por arriba del 90 %. La desventaja de este método es que involucra altos costos de implementación y mantenimiento, debido al uso de presiones elevadas (Ahalya *et al.*, 2003; Akpor *et al.*, 2010).

### *Electrodiálisis.*

La electrodiálisis es un proceso en el que los componentes iónicos (metales) se separan mediante el uso de membranas semipermeables selectivas de iones. Al aplicar un potencial eléctrico entre dos electrodos se provoca una migración de cationes y aniones hacia sus respectivos electrodos. Debido al espaciado entre las membranas, se forman celdas con sales metálicas concentradas y diluidas. La principal desventaja de la electrodiálisis se debe a la formación de hidróxidos metálicos, los cuales tapan las membranas. La corrosión de los electrodos también es un factor limitante (Ahalya *et al.*, 2003; Barakat, 2011).

### *Adsorción - Intercambio iónico.*

Los metales pesados pueden ser retenidos por acción de un material en el cual se concentran los iones metálicos, esto puede suceder por medio de dos mecanismos principales, la adsorción y el intercambio iónico. La adsorción es un proceso de transferencia de masa en la que una sustancia se transfiere de una fase líquida hacia la superficie de un sólido, en donde se une por interacciones físico-químicas. El carbón activado es uno de los materiales más utilizados actualmente, y se ha empleado para la remoción de un sinnúmero de contaminantes, entre ellos los metales pesados. El carbón activado puede ser sometido a un tratamiento previo para mejorar sus características adsorbentes, aumentando el área superficial y el volumen de poro. Otros materiales utilizados han sido cenizas, carbón de leña, arcillas, zeolitas tratadas, óxidos de hierro entre otros (Barakat,

2011; Hashim *et al.*, 2011). El intercambio iónico, por otro lado, involucra una reacción química reversible en donde el ion presente en solución (soluto) es intercambiado por otro de igual carga adherido a una partícula sólida. Los materiales usados en esta técnica deben ser capaces de intercambiar cationes o aniones y se han utilizado en mayor cantidad resinas poliméricas derivadas de hidrocarburos. La técnica se ha utilizado exitosamente para la remoción de muchos metales pesados, pero las resinas de intercambio iónico pueden llegar a ser muy caras. Además, no se pueden manejar soluciones altamente concentradas, ya que los materiales se saturan fácilmente con compuestos orgánicos y otros sólidos presentes en la solución (Akpor *et al.*, 2010; Barakat, 2011).

### **2.2.2 Métodos biológicos/bioquímicos.**

Las tecnologías biológicas ofrecen suficientes ventajas, ya que se ha demostrado que pueden ser al mismo tiempo igual de efectivas que otros métodos y sustancialmente económicas (Certucha-Barragán *et al.*, 2011). Los métodos de tratamiento biológicos hacen uso de los procesos naturales de ciertas plantas y microorganismos.

#### *Fitorremediación.*

La fitorremediación es una tecnología ecológica en la que se utilizan plantas para estabilizar o remover compuestos orgánicos e inorgánicos presentes en el suelo o aguas contaminadas. A comparación de otros métodos, la fitorremediación es una técnica de bajo costo y eficiente y puede ser realizada *in situ*. Actualmente, 500 especies vegetales han sido identificadas por su uso potencial en los tratamientos de biorremediación. Dentro de los mecanismos principales de la fitorremediación se incluyen: fitoextracción, rizofiltración, fitoestabilización y fitovolatilización (Singh y Prasad, 2011).

En la fitoextracción las raíces de las plantas absorben y almacenan a los contaminantes en conjunto con nutrientes y agua. Este método es usado principalmente para desechos que contienen metales. Cada planta tiene diferentes habilidades para captar y soportar altos niveles de contaminantes, por lo que se puede usar una gran variedad de especies. Los compuestos metálicos que han sido fitoextraídos exitosamente incluyen al zinc, al cobre y al níquel, pero en la literatura también se han reportado buenos resultados en cuanto a la

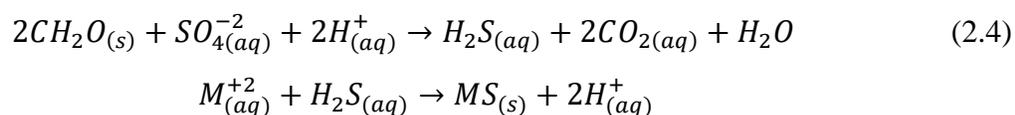
absorción de cromo y plomo. La rizofiltración es un proceso en donde las plantas son cultivadas en invernaderos, con sus raíces sumergidas en agua. El proceso involucra la ruptura de compuestos orgánicos por medio de microorganismos localizados en la raíz de la planta y la adsorción y/o absorción de contaminantes por la raíz. Una variedad de especies vegetales han sido reportadas para la remoción efectiva de metales como Cu (II), Cd (II), Cr (VI), Ni (II), Pb (II) y Zn (II) (Akpor *et al.*, 2010).

La fitoestabilización se refiere al uso de las plantas para disminuir la movilidad de los metales pesados por medio de la adsorción y precipitación, disminuyendo su biodisponibilidad. Las plantas actúan como una barrera que bloquea los contaminantes del agua que escurre hacia la matriz del suelo. Es muy efectiva cuando se necesita una rápida inmovilización que ayude a preservar los suelos y aguas contaminadas. En la fitovolatilización, los contaminantes son adsorbidos y transferidos a formas volátiles que son liberadas hacia la atmósfera a través de los procesos respiratorios de las plantas. Por ejemplo, la planta *Arabidopsis thaliana* ha sido modificada genéticamente para convertir el mercurio Hg (II) a su forma menos tóxica, Hg (0) (Singh y Prasad, 2011).

#### *Biorremediación microbiana.*

La biorremediación microbiana se refiere al conjunto de procesos por medio de los cuales los microorganismos son estimulados para degradar contaminantes orgánicos hasta niveles ambientalmente seguros. Los microorganismos aplican reacciones enzimáticas para convertir los compuestos tóxicos en una forma menos tóxica, utilizando la energía liberada para sus procesos metabólicos (Akpor *et al.*, 2010). Las propiedades de los microorganismos en la transformación y detoxificación de contaminantes orgánicos e inorgánicos han sido de especial interés para las áreas de la microbiología y la biotecnología ambiental, lo que ha resultado en el surgimiento de muchos procesos de biorremediación. Los microorganismos pueden descomponer un amplio rango de sustancias orgánicas de origen natural y antropogénico. Además, pueden realizar cambios en la especiación y movilidad de metales, radionúcleos, y otras especies inorgánicas mediante reacciones de óxido-reducción y otras transformaciones propias del metabolismo microbiano (Gadd, 2009).

Una manera de remover los metales pesados en aguas contaminadas es a través del proceso de sulfato-reducción. En este proceso el sulfato es reducido a sulfuro por acción de bacterias anaerobias, o bacterias sulfatoreductoras, las cuales usan al sulfato como aceptor de electrones. Los sulfuros metálicos precipitan en la solución debido a su baja solubilidad. El drenaje ácido de mina se caracteriza por sus bajos valores de pH y altas concentraciones de sulfato, hierro y otros metales, por lo que el proceso de sulfato reducción puede utilizarse para la remoción de metales. La reacción biológica propuesta para este proceso es la siguiente Ec. (2.4):



Donde: CH<sub>2</sub>O es un carbón orgánico, M<sup>+2</sup> es un catión metálico y MS es el compuesto metálico precipitado (Hashim *et al.*, 2011).

Se ha reportado que la especie *Geobacteraceae* puede reducir sustancialmente uranio, U (II), a una forma menos tóxica utilizando acetato como donador de electrones, lo que estimula la actividad del microorganismo. La bioprecipitación *in situ* es otro proceso en el que los metales presentes en aguas subterráneas son inmovilizados en forma de precipitados. Fuentes de carbono como molasas, lactato, y acetato se inyectan en los acuíferos, en donde se fermentan y favorecen el atrapamiento de los metales en una matriz orgánica. Este proceso ha sido investigado para la estabilización de Cu, Zn Cd, Ni, Co, Fe, Cr y As, obteniendo buenos resultados (Hashim *et al.*, 2011).

Las principales ventajas y desventajas de los métodos antes mencionados se presentan en la Tabla 2.3. Se puede observar que el principal inconveniente de los métodos de tratamiento físico-químicos es su elevado costo y además la formación de residuos sólidos que también deben ser eliminados, incrementando aun más el costo del proceso.

**Tabla 2.3** Ventajas y desventajas de los métodos de tratamiento.

<b>Métodos</b>	<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
Precipitación química	-Bajo costo -Operación simple	-Producción excesiva de lodo -Precipitación puede ser lenta e insuficiente
Reducción	-No hay generación de lodo	-Formación de productos gaseosos tóxicos -Difícil manipulación de agentes reductores
Ultrafiltración Nanofiltración	-Se requiere poco espacio -Alta separación	-Altos costos de operación -Taponamientos de membrana
Ósmosis inversa	-Alta eficiencia -Remoción de otros compuestos iónicos	-Altos costos de operación y mantenimiento
Electrodialisis	-Alta eficiencia	-Altos consumo de energía por el uso de presión -Taponamientos
Adsorción- Intercambio iónico	-Operación sencilla -Alta capacidad de remoción	-Baja selectividad -Sensible a pH
<b>Fitorremediación</b>	-Tecnología ecológica y de bajo costo -Se puede tratar más de un contaminantes	-Depende de las condiciones de crecimiento. Tiempos largos de remediación. Requiere acceso a equipo agrícola y de gran escala
<b>Biorremediación microbiana</b>	-Tecnología ecológica y de bajo costo -Genera residuos no tóxicos (CO <sub>2</sub> , H <sub>2</sub> O)	-Rango de contaminantes limitado -Se necesitan niveles adecuados de crecimiento y nutrientes para el crecimiento.

Fuente: Akpor *et al.*, 2010; Hashim *et al.*, 2010; Barakat, 2011.

### 2.3 Biosorción.

Una de las alternativas que ha sido ampliamente estudiada desde hace varios años debido a su simplicidad es la biosorción, donde el prefijo “bio” indica el uso de un material de origen biológico. La biosorción se basa en la capacidad de diversas clases de biomasa para captar y concentrar a los metales y otros compuestos presentes en solución. Este proceso involucra una fase sólida, que es la biomasa (sorbente) y una fase líquida que es el agua (solvente) donde se encuentran disueltas las especies metálicas (sorbato) que serán removidas (Ahalya *et al.* 2003; Gadd, 2009).

Dentro de los métodos de tratamiento, las resinas de intercambio iónico y el carbón activado han sido reconocidas por su efectividad como adsorbentes en el tratamiento de aguas contaminadas, pero su alto costo limita sus aplicaciones a nivel industrial. Por su parte, los sorbentes de origen biológico o biosorbentes, constituyen una alternativa eficiente y económica comparados con las resinas sintéticas, cuyos precios son más elevados (Park *et al.*, 2010). Otras ventajas de la biosorción sobre los métodos convencionales de tratamiento son (Ahalya *et al.*, 2003; Chojnacka, 2010):

- Bajo costo.
- Altas eficiencias.
- Minimización de lodos residuales.
- Posibilidad de recuperar el metal.
- Operación sencilla.
- Efectivo en el tratamiento de efluentes diluidos.

El primer estudio cuantitativo sobre la biosorción de metales fue realizado por Hecke (1902), quien reportó la capacidad de los hongos *T. tritici* y *U. crameri* para biosorber cobre. Desde entonces se han publicado numerosos artículos sobre el fenómeno de biosorción (en Park *et al.*, 2010). Los resultados de estas investigaciones indican que la biosorción puede llevarse a cabo por bacterias, hongos, algas y levaduras, aunque la compleja estructura de dichos organismos indica que los metales pueden ser capturados de diversas maneras (Sag y Kutsal, 2001).

### 2.3.1 Mecanismos de biosorción.

Los mecanismos por medio de los cuales los metales son capturados por las células en el proceso de biosorción se pueden dividir en dos: físico-químicos y metabólicos (bioacumulación).

*Mecanismos metabólicos:* Estos mecanismos consisten en el transporte activo de metales pesados hacia el interior de la membrana celular, por medio de rutas metabólicas. Este fenómeno sólo es llevado a cabo por biomasa viva, y produce la acumulación intracelular del contaminante, por lo que se denomina bioacumulación (Volesky, 2003). El transporte de los metales pesados a través de la membrana celular puede estar regulado por los mismos mecanismos que permiten el ingreso de algunos iones esenciales para las células como el potasio, el magnesio y el sodio. Este sistema de transporte puede confundirse en la presencia de metales con la misma carga y radio iónico de los iones esenciales (Ahalya *et al.*, 2003).

Algunos estudios señalan que los procesos con biomasa muerta son más aplicables que aquellos que usan biomasa viva, ya que para mantener viva a la biomasa se requieren sistemas de alimentación de nutrientes para las células. El mantenimiento de la población microbiana es complejo ya que también se deben tomar en cuenta el grado de toxicidad ejercido por los metales. Sin embargo, la biomasa viva ofrece varios atributos que pueden ser explotados a nivel industrial (Park *et al.*, 2010).

En la bioacumulación es posible alcanzar una menor concentración residual del contaminante, ya que el sorbato puede ser unido tanto en la superficie como en el interior de la célula. Además, la concentración celular puede aumentar eventualmente, ofreciendo más sitios disponibles para la captación del sorbato (Chojnacka, 2010). Los mecanismos metabólicos también se pueden asociar con los sistemas de defensa de los microorganismos en presencia de concentraciones tóxicas de metal, ya que pueden producir compuestos que favorezcan la precipitación del metal en la solución o en la membrana celular (Ahalya *et al.*, 2003).

*Mecanismos físico-químicos:* En el caso de los mecanismos físico-químicos, la estructura celular externa juega un papel importante durante la biosorción. Las membranas celulares de la biomasa microbiana están compuestas en su mayoría por polisacáridos, proteínas y lípidos. Estos compuestos contienen una variedad de grupos funcionales que ofrecen una gran cantidad de sitios activos para la retención de los metales pesados. Algunos de estos grupos funcionales son: carboxilos, hidroxilos, sulfhidrilos, aminos y fosfatos (Sag y Kutsal, 2001).

En general, la captación de metales por mecanismos físico-químicos puede ocurrir por la acción de uno o una combinación de los procesos siguientes: complejación, coordinación, quelación, intercambio iónico y adsorción. A continuación se define brevemente cada uno de estos mecanismos (Volesky, 2003):

- *Complejación:* se define como la formación de una especie por la asociación de dos o más especies anteriores. Cuando una de las especies es un ion metálico, la entidad resultante se conoce como un complejo metálico. Como regla general, el ion metálico ocupa una posición central dentro del complejo formado.
- *Coordinación:* Se da cuando el átomo metálico central de un complejo se une a sus vecinos inmediatos como resultado de enlaces covalentes entre el átomo metálico (aceptor de electrones) y los átomos no metálicos (donadores de electrones). El enlace formado se denomina enlace coordinado.
- *Quelación:* Es el proceso por medio del cual se forma un anillo heterocíclico cuando el metal se une a algún compuesto orgánico, los cuales presentan ciertos grupos llamados ligandos (-COOH, -NH<sub>2</sub>, -SH, entre otros).
- *Intercambio iónico:* es el intercambio de iones que se da por ganancia o pérdida de electrones de las especies moleculares presentes.
- *Adsorción:* Es el proceso por medio del cual las moléculas se adhieren a superficies sólidas. La atracción se basa en fuerzas electrostáticas. Aunque la adsorción implica un fenómeno de superficie, la captación puede suceder por mecanismos físicos o químicos:

- Fisisorción: Depende estrictamente de las fuerzas físicas existentes entre la superficie y el sorbato, las cuales son generalmente débiles. Por ejemplo: fuerzas de Van der Waals.
- Quimisorción: Involucra uniones químicas por medio de fuerzas mucho más fuertes que las encontradas en fisisorción.

### **2.3.2 Equilibrio de biosorción.**

Debido a la afinidad del biosorbente por el sorbato, éste último es atraído y unido durante la biosorción por medio de los diversos mecanismos que se explicaron anteriormente. Este proceso se lleva a cabo hasta que se alcanza un equilibrio entre la cantidad de sorbato unido al biosorbente y la porción de sorbato remanente en la solución. La “calidad” de un biosorbente puede medirse entonces por su capacidad de biosorción,  $q$ , que es la cantidad de sorbato que puede captar. El cálculo de  $q$  para un metal específico puede llevarse a cabo implementando un sistema experimental que permita conocer la diferencia entre la concentración inicial del metal en solución y su concentración final una vez que se ha puesto en contacto con el biosorbente (Volesky, 2003).

La cuantificación de las interacciones sorbato-biosorbente es fundamental para la evaluación de la capacidad de biosorción. Debido a la semejanza del proceso de biosorción con los fenómenos de adsorción, la capacidad de biosorción se puede analizar por medio de la obtención de las isotermas de equilibrio. Estas curvas pueden ser modeladas por medio de ecuaciones que expliquen y representen los mecanismos del comportamiento experimental o que simplemente representen la tendencia de los datos. Los modelos de Langmuir y Freundlich han sido los más utilizados para representar procesos de adsorción (Park *et al.*, 2010). El desarrollo de los sistemas de biosorción de metales depende de muchos factores que incluyen temperatura, pH de solución, capacidad y selectividad del biosorbente, su facilidad de recuperación y su resistencia a otros componentes de los efluentes o de las condiciones de operación. No obstante, la mayoría de los estudios de biosorción se enfocan en la medición de la capacidad de biosorción de la biomasa (Volesky y May-Phillips, 1995).

Debe tomarse en cuenta que la capacidad de biosorción de cualquier biosorbente depende de sus métodos de tratamiento, así como de las condiciones experimentales, principalmente el pH y la temperatura. De estos factores, el pH de la solución metálica juega un papel muy importante en la biosorción, ya que afecta principalmente a la solubilidad de los metales y los grupos funcionales de la biomasa disponibles para la captación de los iones metálicos (Park *et al.*, 2010). A mayor pH, la solubilidad del metal disminuye, lo que provoca la precipitación del mismo. Esto complica el proceso de biosorción, generando mediciones erróneas. Durante la biosorción de metales por biomasa bacteriana, se ha encontrado que un pH entre 3 y 6 es favorable para el proceso debido a la presencia de los grupos carboxilos cargados negativamente, que son responsables del intercambio iónico de los metales (Vijayaraghavan y Yun, 2008).

#### **2.4 Biomasa disponible.**

La mayor parte de los materiales biológicos tiene afinidad por los metales, debido a ello la selección de la biomasa como biosorbente potencial es uno de los pasos más importantes durante del proceso. Generalmente, se planea que la biomasa se implemente a nivel industrial y a gran escala, por lo que los factores principales que deben tomarse en cuenta son el precio y la disponibilidad. Para evaluar la capacidad de biosorción de metales pesados se han investigado un gran número de biomazas, como se muestra en la Tabla 2.4.

La captación de especies metálicas por medio de hongos se ha atribuido principalmente a la pared celular, compuesta en un 90 % por polisacáridos y otros compuestos como proteínas y lípidos. Además, existen grandes cantidades de grupos fosfatos, ácido glucurónico y complejos quitina-quitosano que ofrecen la posibilidad de unir a los metales por medio del intercambio iónico y la complejación (Sag y Kutsal, 2001). Durante el fenómeno de biosorción en algas, se ven involucrados enlaces iónicos y covalentes, en donde las proteínas y polisacáridos juegan un papel importante. La composición de la pared celular de las algas es muy variada, pero el componente principal es la celulosa. También se pueden encontrar proteínas y otros polisacáridos como xilano y ácido algínico. Estos componentes brindan sitios de unión como grupos aminos, amidos, hidroxilos, fosfatos y sulfatos (Gadd, 2001; Gadd, 2009).

**Tabla 2.4** Tipos de biomasa utilizada como biosorbentes.

<b>Categoría</b>	<b>Ejemplos</b>
Bacterias	Gram positivas ( <i>Bacillus sp.</i> , <i>Corynebacterium sp.</i> ) Gram negativas ( <i>Escherichia sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> ) Cianobacterias
Hongos y levaduras	Hongos ( <i>Aspergillus sp.</i> , <i>Rhizopus sp.</i> , <i>Agaricus sp.</i> , <i>Trichaptum sp.</i> ) Levaduras ( <i>Saccharomyces sp.</i> , <i>Candida sp.</i> )
Algas	Microalgas ( <i>Clorella sp.</i> , <i>Chlamydomonas sp.</i> ) Macroalgas ( <i>Enteromorpha sp.</i> , <i>Codium sp.</i> )
Desechos industriales	Desechos de fermentaciones, alimentos, bebidas, lodos activados, lodos anaerobios.
Desechos agrícolas	Desechos alimenticios (arroz, frutas, trigo)
Residuos naturales	Plantas, cortezas, hierbas.

Fuente: Park *et al.*, 2010.

La superficie de las células de las levaduras puede actuar como una resina de intercambio iónico, ya que contiene una gran cantidad de compuestos orgánicos complejos como proteínas, lípidos y sacáridos como el glucano, los cuales son los responsables de la captación de diversos compuestos, entre ellos los metales pesados. Por ejemplo, una de las levaduras más conocidas, la *Saccharomyces cerevisiae*, ha sido estudiada ampliamente para evaluar su capacidad de biosorción de metales (Cu, Pb, Zn, Cd y Fe) con buenos resultados (Sag y Kutsal, 2001; Pacheco *et al.*, 2011). Una gran variedad de biomasas provenientes del desecho de industrias de proceso y tratamiento de drenajes también se han estudiado, aunque algunas veces sus propiedades sorbentes son muy bajas. Bacterias y hongos se pueden obtener de las fermentaciones de las industrias alimenticias y de destilación. Otros residuos naturales como la composta en los cultivos agrícolas o las algas en la acuicultura también aportan biomateriales que pueden ser usados como biosorbentes potenciales (Gadd, 2009).

La biomasa bacteriana se obtiene generalmente de desechos industriales como la fermentación y puede obtenerse a gran escala. Las bacterias contienen capas compuesta de polisacáridos y proveen de grupos aminos, carboxilos, fosfatos y sulfatos para la biosorción de los metales. Las paredes celulares de las bacterias pueden contener un polisacárido conocido como peptidoglicano que contiene grupos carboxilo, que son los principales sitios de unión para los cationes metálicos. Las paredes celulares de las arqueobacterias son de composiciones muy diversas, pero pueden contener pseudomureína (similar al peptidoglicano), polisacáridos sulfonados y glicoproteínas, lo que provee de grupos carboxilos y grupos sulfatos (Gadd, 2009).

#### **2.4.1 Digestión anaerobia.**

De acuerdo con sus requerimientos de oxígeno, las bacterias se pueden clasificar en aerobias (requieren oxígeno), anaerobias (no requieren oxígeno) o facultativas (se desarrollan en presencia o ausencia de oxígeno). Las bacterias anaerobias llevan a cabo como parte de su metabolismo un proceso complejo de reacciones consecutivas y paralelas conocido como digestión anaerobia, cuyo esquema general se presenta en la Figura 2.2 (Hutnan *et al.*, 1999).

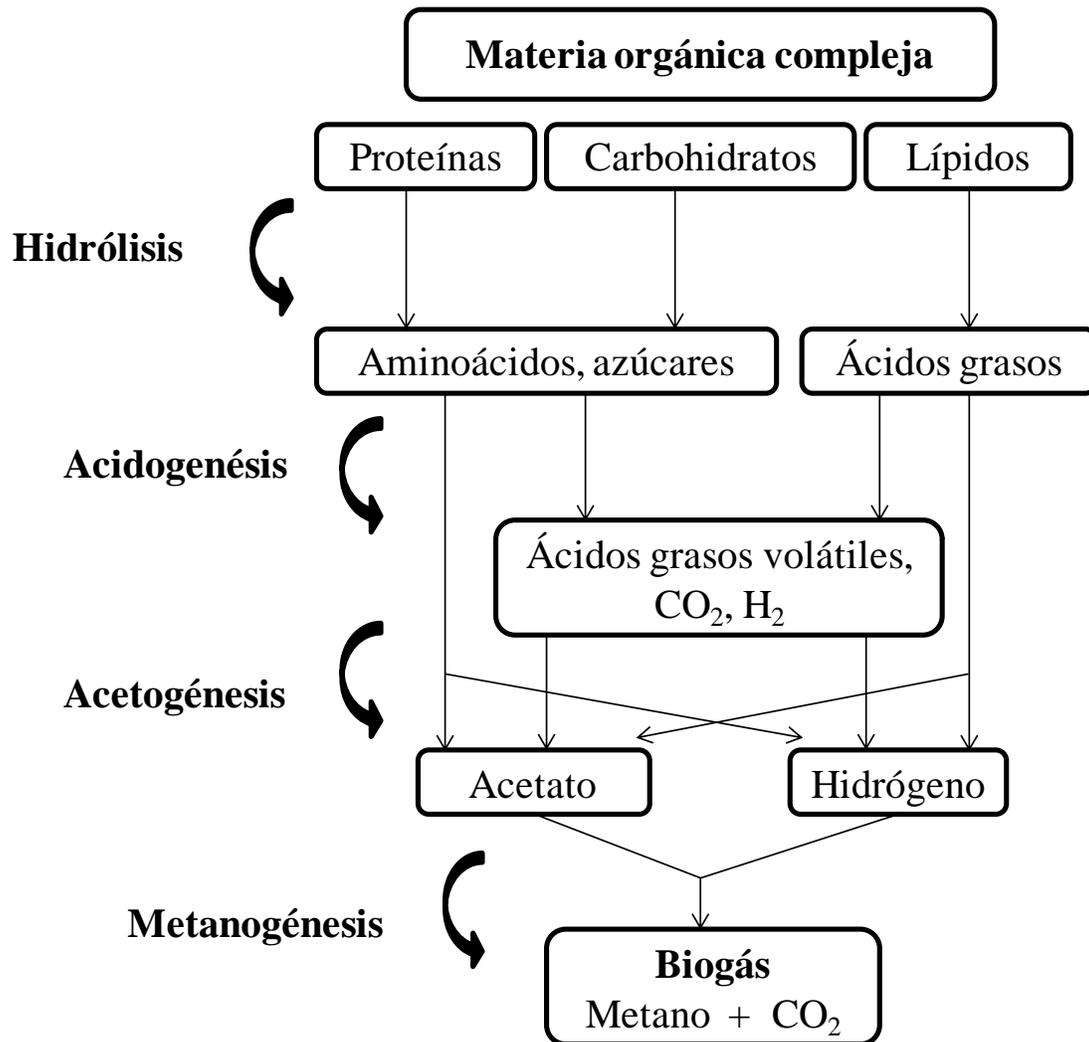


Figura 2.2 Etapas de la digestión anaerobia.

La digestión anaerobia es una de las tecnologías más adecuadas para el tratamiento de efluentes con alta carga orgánica, y comprende las siguientes etapas (Almendariz-Tapia, 2001):

1.- *Hidrólisis*. Durante la primera etapa, los compuestos orgánicos complejos presentes en las aguas residuales son degradados a compuestos de bajo peso molecular. La degradación de estos compuestos ocurre por la actividad enzimática de las bacterias hidrolíticas, en donde se pueden encontrar celulasas, hemicelulasas, xilanasas, pectinasas, amilasas, proteasas, lipasas y fosfolipasas.

2.- *Acidogénesis*: Posteriormente, los compuestos de bajo peso molecular, como los azúcares y los aminoácidos, son fermentados y convertidos en bióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), hidrógeno ( $\text{H}_2$ ), cétulas y ácidos grasos volátiles (AGV's) como: ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico. La fermentación en esta etapa ocurre por acción de las bacterias acidogénicas. Una etapa paralela a la acidogénesis corresponde a la oxidación anaerobia de los ácidos grasos de cadena larga y alcoholes provenientes de los lípidos (Hutnan, 1999).

3.- *Acetogénesis*: En esta etapa, los organismos acetogénicos y productores de hidrógeno utilizan los productos de la fermentación de la etapa anterior y los convierten en acetato,  $\text{H}_2$  y  $\text{CO}_2$ .

4.- *Metanogénesis*: Finalmente, el  $\text{CO}_2$  y el  $\text{H}_2$  son convertidos a un biogás compuesto principalmente por metano y  $\text{CO}_2$  en menor cantidad. El grupo bacteriano responsable de esta etapa corresponde a las bacterias metanogénicas, que son anaeróbicas estrictas.

Se han implementado varias técnicas de análisis que dan información sobre la naturaleza y rendimiento del proceso de digestión. Estas técnicas incluyen la medición del contenido de demanda química de oxígeno (DQO), sólidos suspendidos volátiles (SSV), concentración de sustrato y varias técnicas experimentales que permiten medir la actividad microbiana de

las etapas de degradación. Además, es importante considerar el efecto tóxico e inhibitorio que pueden tener algunos compuestos, entre los que se encuentran los metales pesados, sobre la actividad metabólica de los microorganismos anaerobios (Hutnan *et al.*, 1999).

Se considera que la biomasa metanogénica es generalmente más sensible a cambios en sus condiciones de desarrollo debido a que sus requerimientos ambientales (como temperatura, pH, concentración) son más estrictos que los de la biomasa acidogénica (García-Morales *et al.*, 1999). El efecto inhibitorio de los metales pesados sobre la producción de AGV's y metano ha sido reportada por Lin y Chen (1997, 1999) y colaboradores, quienes estudiaron el efecto tóxico de los metales pesados Cd, Cr, Cu, Zn y Ni en sistemas por lote. Esta inhibición fue medida en términos de la concentración inhibitoria media,  $CI_{50}$ , que es la concentración que ocasiona una inhibición del 50% de la actividad metabólica, y se encontró que los microorganismos en la fase metanogénica exhibían mayor sensibilidad a la presencia de metales que los microorganismos en la fase acidogénica. Por otro lado, debido a los bajos valores de pH, la alta concentración de sulfatos y los iones metálicos disueltos, la diversidad biológica de las aguas expuestas a los desechos mineros es dominada por organismos acidofílicos, lo que también corrobora su mayor resistencia (Pires Freitas *et al.*, 2011). Esto indica que la biomasa acidogénica tiene potencial para ser utilizada en procesos de biorremediación de aguas contaminadas con metales pesados.

## **2.5 Biosorción en reactores.**

El proceso de biosorción se puede llevar a cabo en un bioreactor, en donde se hace pasar el agua contaminada a lo largo de una cama de microorganismos que captan y concentran los metales. El objetivo de la biosorción es lograr que la concentración del metal a la salida del reactor disminuya considerablemente (niveles cercanos a cero, si es posible) con respecto a la concentración de entrada. Una de las ventajas del uso de bioreactores es que permiten tratar un gran volumen de agua, mientras que la "porción" contaminada se transfiere a un volumen considerablemente más pequeño (Figueira *et al.*, 2000; Volesky, 2003).

Se han propuesto diferentes tipos de configuraciones, entre las que se incluyen principalmente: reactores de flujo ascendente o descendiente, reactores de tanque agitado,

reactores de lecho fluidizado, y de lecho fijo o empacado. En teoría, los reactores con flujo descendente presentan la configuración más económica ya que el movimiento del fluido depende solamente de las fuerzas gravitacionales, pero el control de los tiempos de retención es muy complejo. Debido a esto la mayoría de las configuraciones involucran el uso del flujo ascendente (Park *et al.*, 2010).

Los reactores de tanque agitado son muy poco usados para la biosorción, ya que los gradientes de concentración que favorecen a los procesos de adsorción disminuyen a causa de la agitación. Además, las concentraciones de salida son altas y se necesitan etapas de separación sorbente-sólidos. En los reactores de lecho fluidizado las partículas de biomasa son fluidizadas y expandidas a lo largo del reactor por medio de altos flujos ascendentes. Esta configuración permite que la corriente de alimentación no se encuentre completamente libre de impurezas, ya que el lecho de partículas expandidas permitirá el paso de las impurezas suspendidas. Sin embargo, los volúmenes del reactor son grandes y su operación es relativamente más costosa por que requiere de mayor energía para la fluidización (Volesky, 2003).

Una de las configuraciones más usadas es el reactor de lecho empacado, pues además de su sencilla implementación en laboratorio y sencillo escalamiento a nivel industrial, permite inmovilizar fácilmente a la biomasa dentro del reactor. Tampoco se necesitan etapas de separación sólido-líquido y permite la fácil regeneración del biosorbente (Park *et al.*, 2010). La fuerza motriz para el proceso de biosorción en este tipo de reactores se basa en el gradiente de concentración que prevalece a lo largo de la columna y que favorece a los mecanismos de biosorción (Sivaprakash *et al.*, 2010).

La operación de este tipo de reactores consiste en hacer pasar el agua contaminada a través del lecho del reactor (relleno de biomasa y algún material para inmovilización), en donde la especie metálica será removida de la solución hasta que la biomasa alcanza su punto de saturación. El desempeño de los reactores de lecho empacado se analiza por medio de una gráfica de la concentración de salida contra el tiempo. Esta curva recibe el nombre de curva de ruptura, y para el proceso contrario, desorción, recibe el nombre de curva de elución.

Ambas curvas son función de parámetros de flujo, de equilibrio y de factores de transferencia de masa (Volesky, 2003).

Por otro lado, el proceso de la digestión anaerobia también puede ser aplicado de manera continua para el tratamiento de aguas residuales con alto contenido de compuestos orgánicos. Entre los reactores anaerobios comúnmente utilizados e investigados se encuentran el reactor anaerobio de lecho de lodo de flujo ascendente (Upflow Anaerobic Packed Bed reactor, UASB), el reactor anaerobio de lecho fluidizado (Anaerobic Fluidized Bed reactor) y el reactor anaerobio de lecho empacado (Anaerobic Packed Bed reactor, APBR).

Certucha-Barragán *et al.*, (2009) llevó a cabo un estudio de biosorción de cobre en un reactor anaerobio de lecho de flujo ascendente (Upflow Anaerobic Sludge Bed reactor, UASB), sin medio de soporte, logrando una alta remoción de cobre por medio de lodos metanogénicos. Además, se llegó a la conclusión de que la eficiencia del reactor se incrementa al trabajar con soluciones diluidas de cobre, en este caso, 20 mgCu(II)/L. Los métodos experimentales llevados a cabo en este estudio, como la puesta en marcha del reactor, la preparación del medio de alimentación, y las pruebas de toxicidad y actividad metanogénica, guardan una estrecha relación con los métodos que se implementaron en el presente proyecto de investigación, por lo que la descripción de los mismos constituye una aportación relevante para el desarrollo de la etapa experimental.

Cabe mencionar que la mayoría de los trabajos de investigación se enfocan en el estudio de la biosorción en presencia de un solo metal y son pocos los estudios que reportan resultados para una mezcla de metales. Uno de estos estudios investiga la biosorción de una serie de mezclas binarias de metales, y se reporta que en la mayoría de los casos analizados, la capacidad de biosorción de una mezcla binaria fue menor que en presencia de un solo metal. Se puede concluir que existe una interacción compleja entre cada especie metálica durante la biosorción, ya sea inhibición o competitividad por los sitios de adsorción disponibles. Estas interacciones deben tomarse en cuenta al momento de diseñar un proceso

de biosorción para el tratamiento de aguas residuales que presenten un conjunto de metales pesados, como ocurre en la mayoría de los casos (Apiratikul *et al.*, 2004).

### **2.5.1 Técnicas de inmovilización.**

Durante la operación de los bioreactores pueden ocurrir ciertos problemas de control, como el lavado de la biomasa, dificultad en la separación líquido-sólido y caídas de presión. Estos problemas suceden debido a que la biomasa microbiana se encuentra constituida generalmente por partículas pequeñas con baja densidad, baja rigidez y poca fuerza mecánica (Montalvo *et al.*, 2012), lo que ocasiona una disminución en la eficiencia de los procesos en columnas. La inmovilización de la biomasa en una matriz conveniente puede solucionar estos problemas, ya que permite que la biomasa tenga un tamaño apropiado, mayor fuerza mecánica y rigidez.

Existen numerosas técnicas disponibles para la inmovilización de biomasa, entre las que se encuentran principalmente: atrapamiento en matrices poliméricas, entrecruzamiento e inmovilización en un soporte inerte (Ahalya *et al.*, 2003). En la Tabla 2.5 se presentan algunos ejemplos de los materiales utilizados en las distintas técnicas de inmovilización.

La biomasa inmovilizada se utiliza en los sistemas de tratamiento que involucran el uso de reactores, especialmente en los reactores de lecho empacado y de lecho fluidizado, aunque también puede aplicarse en sistemas por lote. No obstante, el costo de las técnicas de inmovilización también es un factor importante que debe considerarse en la implementación del proceso. Por lo que, para que el proceso que se desee implementar tenga aplicaciones industriales se deben utilizar estrategias que reduzcan y minimicen los costos de la inmovilización (Park *et al.*, 2010).

**Tabla 2.5** Materiales utilizados para inmovilización de biomasa.

<b>Técnica</b>	<b>Material</b>
Inmovilización celular en un soporte inerte	Arena, perlas de vidrio, papel, fibras textiles, polímeros, carbón activado.
Atrapamiento en matrices poliméricas	Alginato, poliacrilamida, polietileno, poliuretano, polisulfonas.
Entrecruzamiento	Formaldehído, glutaraldehído, mezclas de urea-formaldehído, epóxidos

Fuente: Park *et al.*, 2010.

En cuanto al uso de materiales de soporte, estos deben permitir el fácil crecimiento de la biomasa sobre su superficie, formando lo que se conoce como biopelícula, constituida por células microbianas y sustancias poliméricas extracelulares (EPS, por sus siglas en inglés). Como estos materiales deben propiciar la fácil adhesión microbiana, la selección del soporte es una de las variables más significativas en la puesta en marcha de un bioreactor (Kida *et al.*, 1990). Entre los materiales de soporte que se han utilizado en procesos de biosorción se incluyen: espuma de poliuretano (Pakshirajjan y Swamintahan, 2009), perlas de vidrio (García-Morales *et al.*, 1999), carbón activado (Ahalya *et al.*, 2003), zeolitas (Fernandez *et al.*, 2008), entre otros. Las zeolitas son materiales porosos cuya estructura consiste en arreglos tridimensionales compuestos de tetraedros de  $\text{SiO}_4$  y  $\text{AlO}_4$ . Las características estructurales permiten que los reactores anaerobios retengan altas concentraciones de biomasa, logrando altas eficiencias y bajos tiempos de retención hidráulica (Malamis *et al.*, 2010; Montalvo *et al.*, 2012).

La zeolita del tipo clinoptilolita se ha usado como material de soporte en un sistema continuo para la biosorción de Cu mediante bacterias aerobias aisladas del río San Pedro, y se reporta que el medio de soporte ayudó a conservar la biomasa dentro del reactor (Monge-Amaya *et al.*, 2008). Además, la clinoptilolita es la zeolita natural más abundante que existe en México, y por lo tanto es un material muy económico y factible para ser usado como material de soporte en procesos de biorremediación (Halbinger- Flores *et al.*, 2002).

## CAPÍTULO 3

### METODOLOGÍA

#### **3.1 Diagrama experimental.**

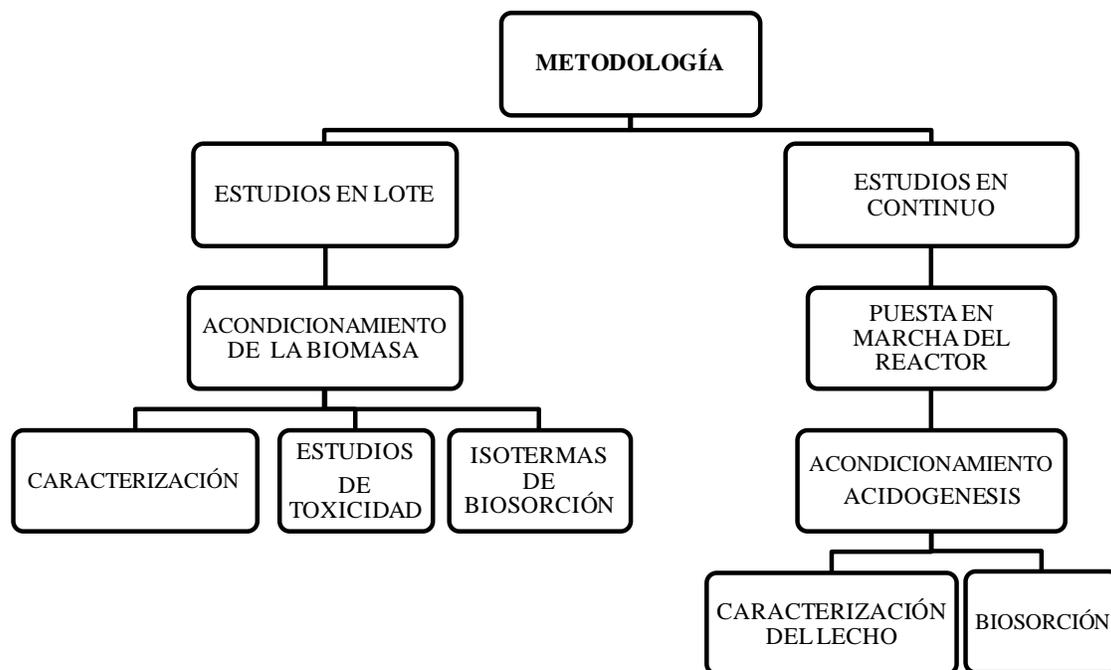
En la Figura 3.1 se presenta el diagrama general de la experimentación, la cual se dividió en los estudios en lote y los estudios en continuo. Para ambas etapas la biomasa utilizada se obtuvo de la planta de tratamiento de aguas residuales de la industria cervecera Corona, ubicada en Ciudad Obregón, Sonora.

#### **3.2. Estudios en lote.**

##### **3.2.1 Acondicionamiento de la biomasa.**

El acondicionamiento de la biomasa se llevó a cabo en un matraz Erlenmeyer de 1 L durante 8 semanas, inoculando 300 mL de lodos anaerobios y 100 g de zeolita del tipo clinoptilolita. Los lodos se mantuvieron en un cuarto con temperatura controlada a 30°C. La fuente de alimentación de la biomasa consistió en el medio mineral que se muestra en la Tabla 3.1, ajustado a pH 4 con ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 0.02N para inhibir a los microorganismos metanogénicos, cuyo desarrollo se favorece a pH neutro.

El sustrato consistió en 5 g/L de dextrosa como fuente de materia orgánica para fomentar la producción de ácidos grasos volátiles (AGV's). Para corroborar la formación de AGV's y medir su concentración, durante las dos últimas semanas del acondicionamiento se tomaron 5 muestras (en intervalos de 3 días) del medio mineral remanente y se analizaron mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) para medir la producción diaria de AGV's. Los ácidos analizados fueron: ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico. Al término del acondicionamiento se tomaron muestras por triplicado del lodo para la determinación de los sólidos totales (ST), sólidos fijos (SF), y sólidos suspendidos volátiles (SSV), esto con la finalidad de conocer la cantidad de biomasa presente.



**Figura 3.1** Diagrama experimental.

**Tabla 3.1** Medio mineral utilizado para el acondicionamiento.**Macronutrientes**

Compuesto	[mg/L]
NH <sub>4</sub> Cl	703
KCl	270
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	169
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	150
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	50
Extracto de levadura	18
Soln. de elementos traza	1 mL/L

**Solución de elementos traza**

Compuesto	[mg/L]
FeCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	2000
MnCl <sub>2</sub>	500
EDTA *	500
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	100
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	50
ZnCl <sub>2</sub>	50
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	50
AlCl <sub>3</sub>	50
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	50
CoCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	50
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	50
HCl concentrado	1 mL/L
*EDTA=Ácido Etileno Diamino Tetracético	

### 3.2.2 Estudios de toxicidad.

Los estudios se realizaron por duplicado en botellas serológicas con un volumen de operación de 120 mL. Cada botella se inoculó con 5 g de lodo acidogénico + zeolita, y se alimentó con 5 g/L de dextrosa (0.625 g-dextrosa/botella). Las botellas se pusieron en contacto con distintas concentraciones de los iones metálicos, mezclados y por separado, de acuerdo al arreglo experimental que se muestra en la Tabla 3.2. Las soluciones metálicas se prepararon a partir de soluciones madre (10,000 mg/L) de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) y sulfato ferroso ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). Las botellas se mantuvieron a una temperatura de  $30^\circ\text{C}$  colocándose en una incubadora New Brunswick Scientific C76 con agitación a 25 rpm. Al cabo de 48 horas se tomaron muestras para calcular la concentración de dextrosa remanente en cada botella.

Por diferencia con la concentración inicial se calculó la dextrosa consumida por la biomasa. Tomando como el 100 % de actividad acidogénica a la dextrosa que fue consumida en las botellas patrón (0 mg/L ion metálico) se calculó el porcentaje de actividad en las botellas restantes, en base a la Ec. (3.1), adaptada de Lin y Chen, 1999:

$$A(\%) = \frac{D_0 - D_{48}}{D_{C0} - D_{C48}} \times 100\% \quad (3.1)$$

Donde:

A (%): Actividad acidogénica en base a consumo de sustrato.

$D_0$ ,  $D_{48}$ : Concentración de dextrosa a tiempos 0 y 48 h, respectivamente.

$D_{c0}$ ,  $D_{c48}$ : Concentración de dextrosa de la botella control, a tiempos 0 y 48 h, respectivamente.

Se graficaron los resultados obtenidos y con ayuda de la curva de tendencia se calcularon los valores de la  $\text{CI}_{50}$ , que es el valor de concentración que ocasiona una actividad de 50 %.

### 3.2.3 Isotermas de biosorción de Cu (II) y Fe (II).

Se utilizaron matraces de 250 mL, los cuales fueron inoculados con 6.5 g de biomasa acidogénica inmovilizada en clinoptilolita. Los matraces se alimentaron con soluciones a distintas concentraciones de Cu y Fe, en base a la Tabla 3.3, y fueron ajustadas a pH 4.5. Los matraces se colocaron en una incubadora con agitación Brunswick Scientific C76 a 30°C y 25 rpm, durante 75 minutos. Se tomaron muestras de la solución remanente cada 15 minutos para determinar la concentración de metal en un espectrómetro de absorción atómica Analyst 400. Una vez alcanzado el equilibrio se calculó la capacidad de biosorción de la biomasa en cada sistema mediante la Ec. (3.2) (Volesky, 2003):

$$q = \frac{V(C_0 - C_f)}{S} \quad (3.2)$$

donde:

$q$  = capacidad de biosorción, [mg metal/g biosorbente].

$C_0$  = concentración inicial de metal en solución [mg metal/L].

$C_f$  = concentración final de metal en solución [mg metal/L].

$S$  = cantidad de biosorbente [g].

$V$  = volumen de solución [L].

Los datos de equilibrio de cada sistema (Cu, Fe, y Cu-Fe) se ajustaron a los modelos de adsorción de Langmuir Ec. (3.3) y Freundlich Ec. (3.4) y se calcularon los factores de correlación mediante un ajuste lineal para determinar qué modelo presentaba un mayor ajuste.

*Modelo de Langmuir:*

$$q_e = \frac{q_{\max} b C_e}{1 + b C_e} \quad (3.3)$$

$$\frac{1}{q_e} = \left( \frac{1}{b q_{\max}} \right) \left( \frac{1}{C_e} \right) + \left( \frac{1}{q_{\max}} \right)$$

donde:

$q_e$ : Capacidad de biosorción en equilibrio [mg/g SSV].

$q_{max}$ : Capacidad máxima de biosorción [mg/g SSV].

$C_e$ : Concentración de metal en equilibrio [mg/L].

b: Coeficiente de afinidad entre el sorbente y el sorbato.

Los parámetros  $q_e$  y  $C_e$ , se obtienen en el punto de equilibrio, mientras que los parámetros  $q_{max}$  y b pueden calcularse utilizando el modelo de Langmuir en su forma linealizada. Una gráfica de  $(1/q_e)$  vs  $(1/C_e)$  genera una línea recta, cuya pendiente e intersección permiten el cálculo de los parámetros b y  $q_{max}$ , respectivamente, así como el factor de correlación  $R^2$ .

*Modelo de Freundlich:*

$$q_e = kC_e^{1/n}$$

$$\ln(q_e) = \frac{1}{n} \ln(C_e) + \ln(k) \quad (3.4)$$

donde:

$q_e$ : Capacidad de biosorción en equilibrio.

$C_e$ : Concentración de metal en equilibrio.

k,n: Constantes de Freundlich.

Al igual que en el modelo de Langmuir, los parámetros k y n se pueden encontrar utilizando la ecuación del modelo en su forma linealizada. Una gráfica de  $\ln(q_e)$  contra  $\ln(C_e)$  genera en una línea recta cuya ecuación permite el cálculo de k, y n, además del factor de correlación.

Con el objetivo de facilitar la presentación de los resultados de los estudios en lote, se le denominará sistema sencillo a la serie de experimentos en donde se utilizó solamente cobre o solamente hierro, mientras que sistema binario se le nombrará al sistema en donde se utilizó la mezcla de ambos metales.

**Tabla 3.2** Arreglo experimental para los estudios de toxicidad.

<b>Sistemas sencillos</b>	<b>Concentración [mg/L]</b>					
Cu (II)	0	50	100	150	200	300
Fe (II)	0	100	200	400	600	800

<b>Sistema Binario</b>	<b>Concentración [mg/L]</b>					
Cu (II)	0	50	100	150	200	300
Fe(II)	0	100	200	400	600	800

**Tabla 3.3** Arreglo experimental para la obtención de las isotermas de biosorción.

<b>Sistemas sencillos</b>	<b>Concentración [mg/L]</b>					
Cu (II)	0	50	100	150	200	300
Fe (II)	0	100	200	400	600	800

<b>Sistema Binario</b>	<b>Concentración [mg/L]</b>					
Cu (II)	0	100	200	300	400	500
Fe(II)	0	100	200	300	400	500

### 3.3 Estudios en continuo.

#### 3.3.1 Etapa de acondicionamiento.

Los estudios en continuo se llevaron a cabo en un reactor de acrílico con volumen de operación de 1.9 L, altura 50 cm y diámetro 7cm, como se observa en la Figura 3.2. El reactor se empacó con 1.05 kg de clinoptilolita con tamaño de partícula de 4 – 4.75 mm y se inoculó con 300 mL de lodos metanogénicos. La temperatura se mantuvo a 30°C y se estableció un tiempo de residencia hidráulica (TRH) de 1 día. El acondicionamiento tuvo una duración de 125 días, durante los cuales el reactor se alimentó con el medio mineral de la Tabla 3.1, ajustado a un pH de 4 y dextrosa como fuente de materia orgánica. En una primera etapa (I), con duración de 45 días, el medio de alimentación se preparó con 4g/L de dextrosa. Este valor se incrementó a 5 g/L de dextrosa en una segunda etapa (II) para favorecer la producción de ácidos grasos volátiles (AGV's). Para fomentar el desarrollo de los microorganismos, el efluente se recirculó a un flujo de 50 mL/min. Diariamente se tomaron muestras de influente y efluente del reactor para la determinación de AGV's y la demanda química de oxígeno (DQO). La carga orgánica volumétrica (COV) y el porcentaje de remoción de DQO se calcularon en base a la Ec. (3.5) y a la Ec. (3.6), respectivamente.

$$\eta = \frac{S_0 - S_f}{S_0} \times 100 \quad (3.5)$$

$$COV = \frac{S_o}{TRH} \quad (3.6)$$

Donde:

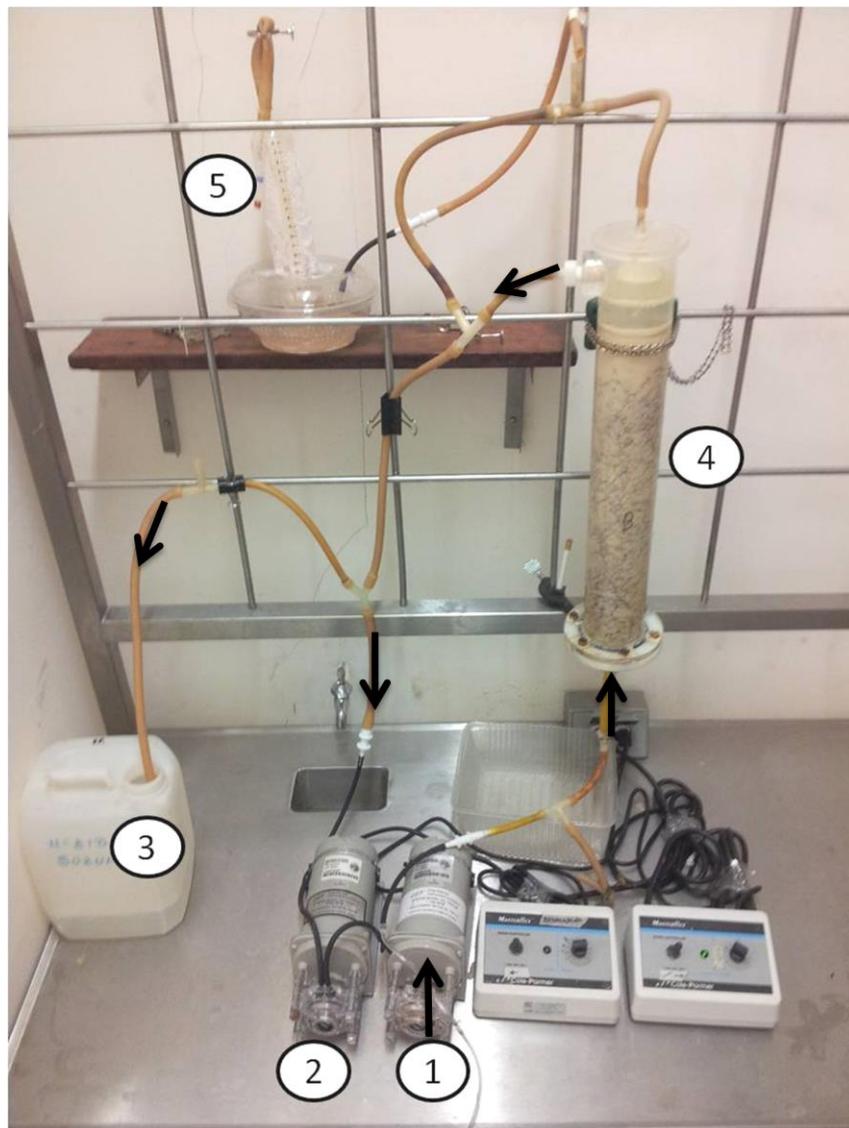
$\eta$ : Eficiencia de remoción [%].

$S_o$ : Concentración de DQO de entrada [gDQO/L].

$S_f$ : Concentración de DQO de salida [gDQO/L].

COV: Carga orgánica volumétrica [gDQO/L-d].

TRH: Tiempo de residencia hidráulica [d].



**Figura 3.2** Reactor Anaerobio Acidogénico con biomasa inmovilizada en clinoptilolita.

1.- Bomba de influente, 2.- Bomba de recirculación, 3.- Toma de efluente, 4.- Columna de acrílico, 5.- Medidor de biogás.

### **3.3.1.1 Caracterización del lecho.**

La caracterización del lecho consistió en los siguientes análisis: determinación de la fracción de sólidos, observación de la biomasa en microscopio óptico y observación de la clinoptilolita por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). Ver sección 3.4

### **3.3.1.2 Demanda química de oxígeno (DQO).**

La demanda química de oxígeno (DQO) se determinó de acuerdo a los procedimientos establecidos en APHA (1995), para lo cual se tomaron muestras diarias del influente y efluente del reactor. Ver sección 3.4

### **3.3.1.3 Ácidos grasos volátiles (AGV's).**

Se tomaron muestras diarias en el efluente del reactor para determinar la concentración de AGV's por cromatografía líquida de alta presión. Los ácidos individuales analizados fueron el ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico. También se realizó un método de retrotitulación para obtener los AGV's totales. Ver sección 3.4

## **3.3.2 Etapa de biosorción.**

La etapa de biosorción tuvo una duración de 25 días (etapa III), durante los cuales el reactor fue alimentado con los metales Cu (II) y Fe (II). Para ello, se prepararon soluciones estándar de ambos metales (10,000 mg/L) a partir de  $\text{CuSO}_4$  y  $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y se añadieron al medio mineral de alimentación para obtener una concentración de entrada de 100 mg/L de Cu (II) y 300 mg/L de Fe (II).

### **3.3.2.1 Caracterización del lecho.**

La caracterización del lecho durante la etapa de biosorción consistió en los siguientes análisis: determinación de la fracción de sólidos y observación de la clinoptilolita + biomasa por MEB. Ver sección 3.4

### 3.3.2.2 Efecto del Cu (II) y Fe (II) sobre la DQO y AGV's.

Con la finalidad de evaluar el efecto de ambos metales sobre la remoción de DQO y la formación de AGV's, se continuó con la alimentación de dextrosa en el medio mineral a una concentración de 5g/L (5.333 gDQO/L) y se tomaron muestras diarias del influente y efluente del reactor para la medición de éstos parámetros, de acuerdo a los procedimientos descritos en la sección 3.4.

### 3.3.2.3 Efecto del Cu (II) y Fe (II) sobre el consumo de dextrosa.

El consumo de dextrosa en el reactor se determinó midiendo la concentración de dextrosa en el influente y efluente del reactor, por medio del método del DNS. Ver sección 3.4

### 3.3.2.4 Cinética de biosorción del Cu (II) y Fe (II).

Para la determinación de la concentración de los metales (influyente y efluente) se utilizó un espectrofotómetro de absorción atómica AAnalyst 400. Con la información proporcionada por estas mediciones se determinaron las curvas de ruptura ( $C/C_0$  vs  $t$ ) de cada metal presente en el sistema, a partir de las cuales se obtuvieron: el tiempo de ruptura,  $t_b$ , tiempo en el cual la concentración de efluente alcanza un nivel máximo permisible y el tiempo de saturación,  $t_s$ , tiempo en el que la columna se satura completamente. La capacidad de retención de los iones Cu (II) y Fe (II) de la columna se calculó de acuerdo a la Ec. (3.7), obtenida a partir de un balance en el reactor:

$$Q_{ads} = \frac{C_0 F}{m_s} \int_{t=0}^{t_s} \left(1 - \frac{C}{C_0}\right) dt \Rightarrow Q_{ads} = \frac{F}{m_s} \int_{t=0}^{t_s} C_{ads} dt \quad (3.7)$$

Donde:

$Q_{ads}$ : capacidad de retención ( $t=0 \rightarrow t=t_s$ , tiempo de saturación) [mg/gSSV].

$C_0$ : Concentración del metal en el influente del reactor [mg/L].

$C$ : Concentración del metal en el efluente del reactor [mg/L].

$C_{ads}$ :  $C_0 - C$  [mg/L].

F: flujo volumétrico de alimentación [L/d].

La integral en el lado derecho de la ecuación se resolvió calculando el área bajo la curva (integración numérica) por medio del programa ORIGIN Pro8. En base a la cantidad total de metal alimentado se obtuvieron los rendimientos de biosorción (Anexo C).

### 3.4 Métodos Analíticos.

#### 3.4.1 Sólidos.

El análisis de sólidos consistió en la determinación de los sólidos totales (ST), sólidos fijos (SF) y sólidos suspendidos volátiles (SSV) de acuerdo al procedimiento establecido en los métodos estándares (APHA, 1995) y para esto se utilizaron crisoles, los cuales fueron lavados perfectamente para después colocarse en una mufla a una temperatura de 550 °C durante 30 min. Se dejaron enfriar en un desecador y después fueron pesados hasta obtener un peso constante. El peso se registró como “peso del crisol”. Posteriormente, se colocaron 5 g de lodo acidogénico con zeolita (“peso de la muestra”) en los crisoles y se introdujeron en una estufa a una temperatura de 105 °C – 110 °C por 24 horas. Al cabo de este tiempo los crisoles se dejaron enfriar en el desecador y se pesaron nuevamente, registrando este peso como “peso seco a 110° C”. Finalmente, los residuos se calcinaron en la mufla a 550 °C durante 2 horas, se dejaron enfriar antes de pesarlos y el valor se registró como “peso seco a 550°C”. Al finalizar el procedimiento se calcularon los sólidos totales, fijos y volátiles de acuerdo a las Ecuaciones (3.8), (3.9) y (3.10):

$$\text{Sólidos Totales (g/g)} = \frac{\text{Pesosecoa } 110^{\circ}\text{C} - \text{Pesodel crisol}}{\text{Pesode la muestra}} \quad (3.8)$$

$$\text{Sólidos Fijos (g/g)} = \frac{\text{Pesosecoa } 550^{\circ}\text{C} - \text{Pesodel crisol}}{\text{Pesode la muestra}} \quad (3.9)$$

$$\text{Sólidos Suspendidos Volátiles (g/g)} = \text{Sólidos Totales} - \text{Sólidos Fijos} \quad (3.10)$$

### 3.4.2 Demanda Química de Oxígeno (DQO).

La DQO se determinó de acuerdo al procedimiento establecido en los métodos estándares (APHA, 1995). Para ello se tomaron 2 mL de la muestra de interés y se pusieron en contacto con 1 mL de solución digestora ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) y 2 mL de ácido sulfúrico con sulfato de plata. Los tubos se homogenizaron con ayuda de un Vórtex y finalmente se colocaron en un digestor Hach DRB-200 a 150 °C durante 2 horas. Los tubos se dejaron enfriar y posteriormente se midió la absorbancia a una longitud de onda de 620 nm en un colorímetro Hach DR/890. Para calcular la concentración de DQO (mg/L) se realizó una curva de calibración (0 - 1000 mgDQO/L) base dextrosa (Anexo A). Las muestras experimentales fueron diluidas previamente para lograr que los valores de absorbancia estuvieran dentro de la curva estándar.

### 3.4.3 Ácidos Grasos Volátiles (AGV's).

La concentración de los ácidos se determinó mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC), para lo cual se utilizó una columna Varian Hi-Plex H a una temperatura de 65°C y un detector de UV-visible a una longitud de onda de 210 nm. La fase móvil consistió en ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )  $9 \times 10^{-3}$  M a un flujo de 0.6 mL/min. Las muestras fueron centrifugadas por 15 minutos a 1500 rpm, el sobrenadante se filtró a través de una membrana con un tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$ . Para el cálculo de la concentración en mg/L se realizaron previamente las curvas de calibración de ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico (Anexo A).

Para la determinación de los AGV's totales se utilizó el método volumétrico propuesto por Powell y Archer (1989), el cual consiste en la siguiente metodología:

1. Se toman 100 mL de muestra y se mide el pH (pH<sub>m</sub>).
2. Se añade hidróxido de sodio (NaOH) hasta llegar a pH<sub>2</sub> = 11.8.

3. Titular con ácido clorhídrico (HCl) hasta llegar a  $\text{pH}_3 = 9.4$ . Anotar la cantidad de ácido utilizado entre  $\text{pH}_2$  y  $\text{pH}_3$ , registrar el valor  $T_{2,3}$ .
4. Continuar añadiendo HCl y registrar la cantidad de ácido  $V_{4,5}$  necesario para pasar de  $\text{pH}_4 = 6.9$  a  $\text{pH}_5 = 4.8$ .
5. Añadir ácido hasta  $\text{pH}_6 = 2.2$ . Que es cuando todo el  $\text{CO}_3$  y  $\text{HCO}_3$  se han convertido a  $\text{CO}_2$ . Burbujear el matraz con aire para eliminar el  $\text{CO}_2$  de la solución.
6. Titular con NaOH y registrar la cantidad de volumen necesario  $T_{7,8}$  para pasar de  $\text{pH}_7 = 4.8$  a  $\text{pH}_8 = 6.9$ .

Para el cálculo de los AGV's totales, se utilizó la Ec. (3.11):

$$[\text{AGV}'\text{s}]_{\text{tot}} = \frac{1}{V_m} \cdot \frac{T_{7,8} \cdot [\text{álcali}]}{f(\text{pH}_8, \text{pK}_{\text{AGV}'\text{s}}) - f(\text{pH}_7, \text{pK}_{\text{AGV}'\text{s}})} \quad (3.11)$$

Donde:

$[\text{AGV}'\text{s}]_{\text{tot}}$ : concentración de ácidos grasos volátiles totales [eq/L].

$V_m$ : volumen de la muestra [mL].

[álcali]: concentración de NaOH [eq/L].

$\text{pK}_{\text{AGV}'\text{s}}$ : 4.8

#### 3.4.4 Dextrosa.

La concentración de dextrosa se determinó por medio del método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS), el cual se basa en la reducción del DNS (color amarillo) por la dextrosa (o cualquier azúcar reductor) al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (color rojo ladrillo). La presencia de este compuesto se detecta por la lectura de absorbancia en la zona de 540 – 570 nm. El reactivo DNS consiste en una solución compuesta por: ácido 3,5-dinitrosalicílico ( $\text{C}_7\text{H}_4\text{N}_2\text{O}_7$ ) 0.1 % (p/v), tartrato sódico potásico ( $\text{NaK}(\text{COO})_2(\text{CHOH})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) 30% (p/v) e hidróxido de sodio (NaOH) 0.4 M (Miller, 1959). Para la medición se tomaron 0.2 mL de muestra y se colocaron en tubos de vidrio con tapón de rosca, posteriormente se agregaron 2 mL del reactivo DNS y la mezcla se

homogeneizó con ayuda del Vórtex. Los tubos se colocaron en una estufa a una temperatura de 100 °C durante 10 minutos. Se dejaron enfriar y se determinó la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro Thermo Spectronic 20D+. Previamente se realizó una curva estándar de dextrosa en el rango de 0 - 5 g/L (Anexo A).

### **3.4.5 Microscopía Electrónica de Barrido.**

La observación de la biomasa dentro del reactor se realizó en un microscopio óptico Olympus CX31 con procesador de imágenes para medir el tamaño de los microorganismos analizados. Las muestras fueron sometidas a una tinción de Gram previo a la observación.

Para el análisis por MEB se tomó de muestra una pequeña cantidad de clinoptilolita y se introdujo en un tubo eppendorff para su tratamiento de acuerdo a la siguiente metodología:

1. Fijación con glutaraldehído al 5% (24 horas a temperatura ambiente).
2. Lavado con disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 M hasta la desaparición del olor a glutaraldehído.
3. Fijación con tetróxido de osmio (2 horas en refrigeración).
4. Lavado con disolución amortiguadora de fosfatos 0.1 M.
5. Desección con acetona al 30, 40, 50, 70, 80 y 90% y grado absoluto. Cada disolución se añadió por duplicado con un tiempo de reposo de 15 minutos, a excepción de la acetona absoluta, la cual tuvo un tiempo de reposo de 20 minutos.
6. Desección al punto crítico.
7. Recubrimiento con carbón y oro.
8. Observación al microscopio electrónico de barrido.

## CAPÍTULO 4

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1 Estudios en lote.

##### 4.1.1 Acondicionamiento de la biomasa.

La concentración promedio de los ácidos grasos volátiles (AGV's) producidos diariamente por la biomasa se presenta en la Tabla 4.1. Se observa que la concentración de ácido acético producido se encuentra por encima de 500 mg/L, que es considerada la concentración máxima tolerable por los microorganismos metanogénicos (*Fernandez et al.*, 2008). Por otro lado, la concentración de ácido butírico es mayor a la concentración de ácido propiónico. Se ha reportado que la presencia de ácido butírico en concentraciones superiores a 5 mg/L es un indicador de fallas en la digestión de la materia orgánica durante la operación de reactores anaerobios, sin embargo, el acondicionamiento de la biomasa se llevó a cabo en un sistema por lotes, cambiando el medio mineral a intervalos regulares, lo que pudo ocasionar la acumulación de ácido butírico. Además, el pH del medio se mantuvo siempre en valores cercanos a 4, lo que indica que las condiciones de acondicionamiento del lodo inhibieron el desarrollo de los microorganismos metanogénicos (*Parawira et al.*, 2004).

En la Tabla 4.2 se presentan las fracciones de sólidos obtenidas por el método gravimétrico. Los sólidos suspendidos volátiles (SSV) son un parámetro importante ya que son una medida indirecta de la cantidad de biomasa presente. Los resultados indican que el lodo inmovilizado en clinoptilolita contenía 0.04375 g de biomasa (SSV) por cada gramo de muestra (lodo + clinoptilolita), lo que permitió calcular la cantidad de biomasa empleada durante los estudios en lote. En los estudios de toxicidad las botellas fueron inoculadas con 5 g de lodo, correspondiente a ~0.2gSSV/botella, mientras que para la determinación de las isotermas de biosorción las botellas se inocularon con 6.5 g de lodo, correspondiente a ~0.3gSSV/botella.

**Tabla 4.1.** AGV's producidos por día por el lodo en el acondicionamiento en lote.

<b>Ácido</b>	<b>Promedio diario [mg/L]</b>
Ácido acético	966.758
Ácido propiónico	24.298
Ácido butírico	85.036
Total	1076.093

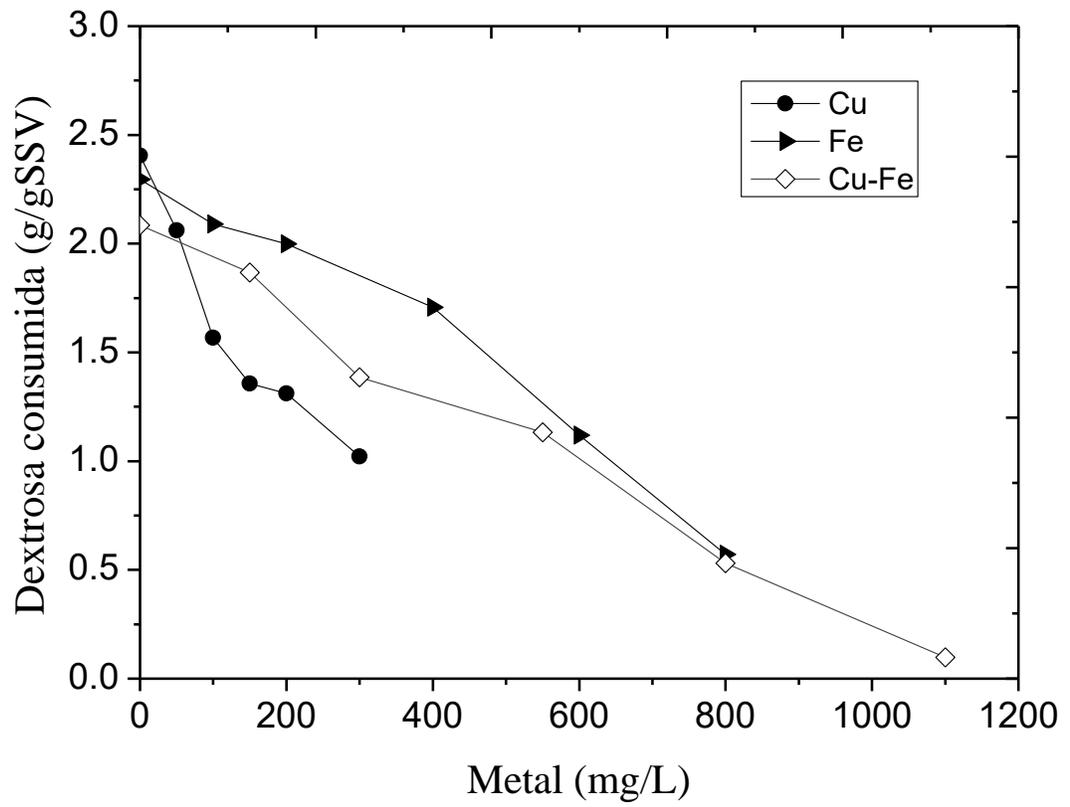
**Tabla 4.2** Determinación de sólidos en el lodo durante el acondicionamiento en lote.

<b>Parámetro</b>	<b>g / g lodo + zeolita</b>
Sólitos totales	0.4918
Sólidos fijos	0.44805
Sólidos suspendidos volátiles	0.04375

#### 4.1.2 Estudios de toxicidad.

En los estudios de toxicidad, se midió la inhibición ejercida por el Cu (II) y Fe (II) sobre el consumo de sustrato de la biomasa acidogénica, a partir del cual se producen los AGV's. En la Figura 4.1 se muestra la cantidad de dextrosa consumida por la biomasa al ser expuesta a las distintas concentraciones de los metales Cu (II) y Fe (II) en las botellas serológicas. En ésta figura se aprecia el efecto inhibitorio de los metales cobre y hierro sobre el consumo de dextrosa. Además, se observa que el cobre fue el metal que causó una mayor inhibición, ya que a diferencia del hierro, el consumo disminuyó más rápido al aumentar la concentración de cobre. Por otra parte, la mezcla de cobre y hierro provocó una inhibición intermedia en comparación con los sistemas con un solo metal. Los datos a partir de los cuales se obtuvo la gráfica se encuentran en el Anexo B.

El efecto tóxico de los metales pesados se atribuye a la inhibición de las funciones enzimáticas y al rompimiento de las proteínas celulares. Algunos metales son importantes en los procesos bioquímicos de cualquier organismo vivo, y se requieren en pequeñas cantidades ya que tienen una función biológica. Por ejemplo, el cobre es parte esencial de las enzimas superoxidasa-dismutasa, hidrogenasa, nitrito-reductasa, y acetil-CoA sintetasa, mientras que el hierro forma parte de las enzimas hidrogenasa, metano monoxigenasa, NO-reductasa y superóxido dismutasa. Estas enzimas se ven involucradas en el proceso de transformación y digestión anaerobia (Fermoso *et al.*, 2009). No obstante, la presencia de altas concentraciones de metales no significa que los microorganismos sean capaces de captar a los metales e incorporarlos a los centros catalíticos de sus enzimas, por el contrario, una concentración en exceso puede provocar inhibición del metabolismo celular (Chen *et al.*, 2008). Esto se ejemplifica con los resultados obtenidos en los estudios en lote, donde se observa que el aumento de concentración de los metales estudiados provocó la inhibición del consumo de dextrosa.



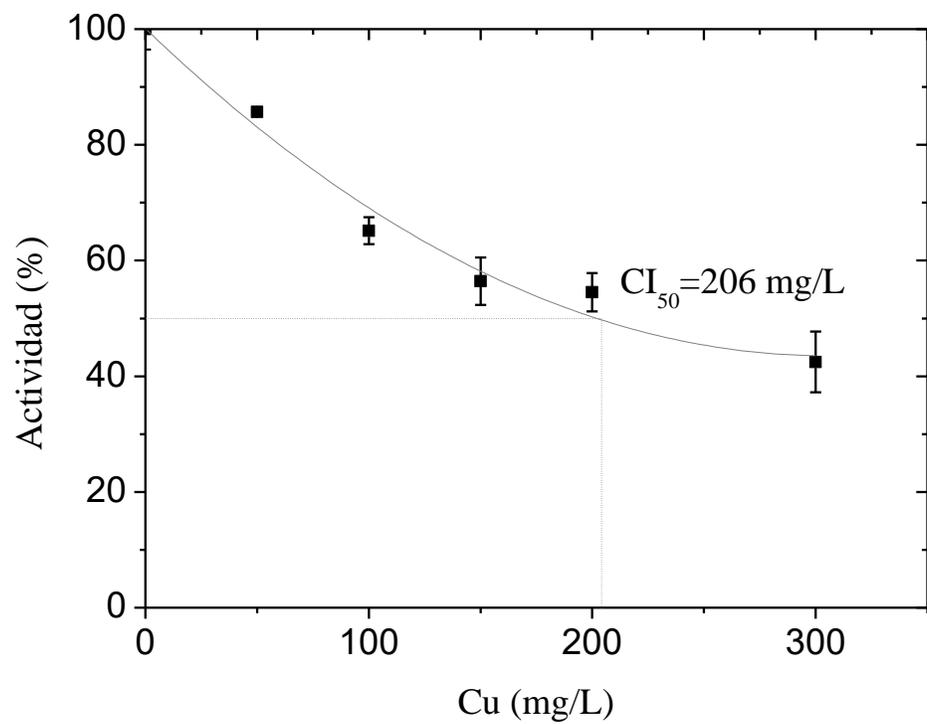
**Figura 4.1** Consumo de dextrosa por la biomasa expuesta a Cu (II) y Fe (II).

El grado de inhibición de los metales pesados puede determinarse por medio de la concentración inhibitoria media,  $CI_{50}$ , que se define como la concentración de metal que causa una disminución del 50 % de la actividad metabólica de los microorganismos. En este trabajo la inhibición fue medida en base al consumo de sustrato. La  $CI_{50}$  se puede calcular a partir de una gráfica de la actividad porcentual contra la concentración de metal, midiendo la concentración de metal (eje x) que hace contacto con la curva de actividad en el valor correspondiente al 50% de actividad (eje y) (Valenzuela, 2011). En las Figuras 4.2, 4.3 y 4.4 se presentan las gráficas correspondientes de la actividad porcentual de consumo de sustrato contra concentración de metal, a partir de las cuales se obtuvieron los valores de la concentración inhibitoria media. En los sistemas sencillos se obtuvo una  $CI_{50}$  Cu (II) = 206 mg/L, como se observa en la Figura 4.2 y una  $CI_{50}$  Fe (II) = 606 mg/L, como se observa en la Figura 4.3. Se puede concluir que el cobre es el metal más tóxico, ya que la  $CI_{50}$  del cobre fue mayor que la del hierro. En la Figura 4.4, referente al sistema binario, se obtuvo una  $CI_{50}$  correspondiente a una mezcla de 150 mgCu/L + 400 mgFe/L. En estudios realizados por Lin *et al.*, (1993,1997) se investigó el efecto del cobre y otros metales sobre la actividad de lodo anaerobio en condiciones metanogénicas y se reportó una  $CI_{50}$  de Cu (II) de 90 mg/L, el cual es menor al encontrado en esta investigación.

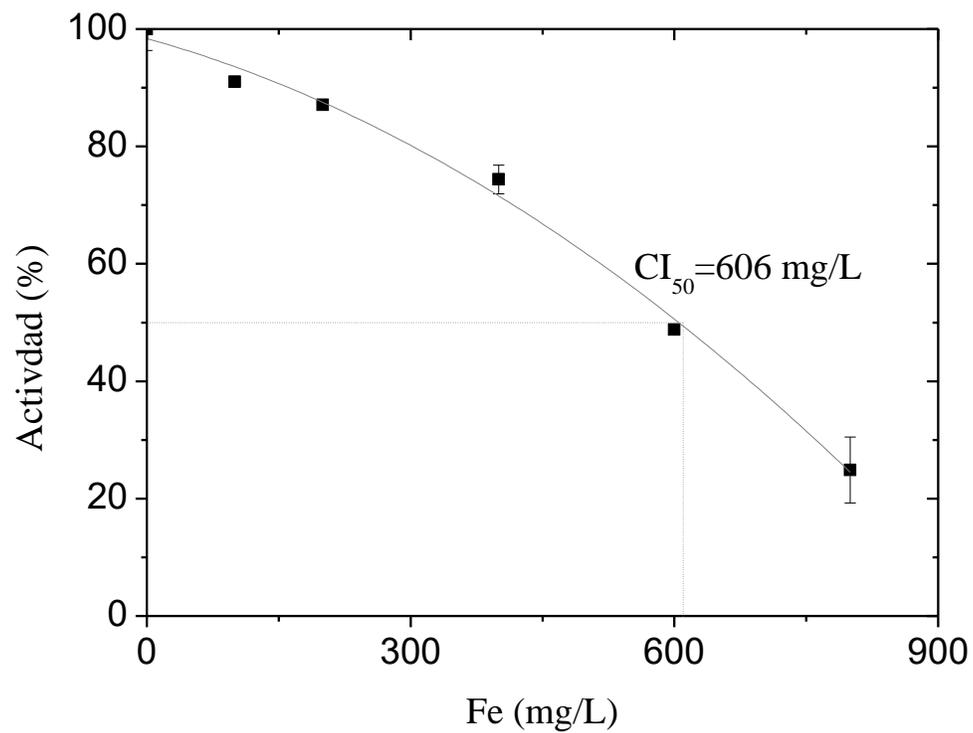
Los lodos anaerobios provenientes de las fermentaciones industriales están conformados por un consorcio de diversos microorganismos que pueden presentar características muy diversas. No obstante, la degradación anaerobia de la materia orgánica involucra siempre las etapas de: fermentación, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis. La última etapa (metanogénesis) generalmente se considera como la etapa limitante del proceso, ya que la producción de metano es más sensible a la presencia de compuestos tóxicos. Por ejemplo, Bae *et al.* (2000) midió la inhibición ejercida por los metales Cu (II), Cr (III), Cd (II), Zn (II) y Ni (II) sobre el consumo de acetato (acetogénesis) y la producción de metano (metanogénesis) en gránulos anaerobios provenientes del tratamiento de agua residual de fermentaciones alcohólicas. En dicho trabajo se observó que la producción de metano se inhibió en mayor grado que el consumo de acetato, ya que la  $CI_{50}$  del cobre

sobre las etapas de metanogénesis y acetogénesis fue de 360 mg/gSSV y 580mg/gSSV, respectivamente. Cabe mencionar que en el trabajo de Bae *et al.* la inhibición se midió determinando la concentración de cobre acumulado en la biomasa.

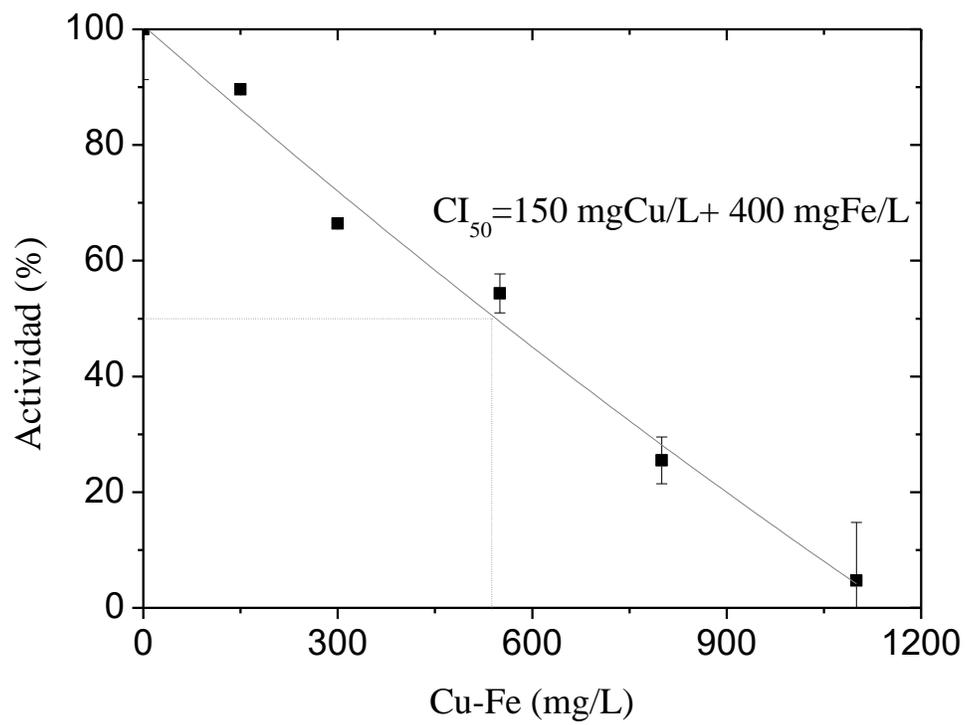
Como se mencionó anteriormente, en la Figura 4.4 se observó que la  $CI_{50}$  del sistema binario corresponde a una combinación de 150mg/L Cu (II) y 400 mg/L Fe (II). Estos valores son de utilidad ya que corresponden a la concentración máxima tolerable por la biomasa. Arriba de dichos niveles el metabolismo de la biomasa se afecta más del 50%, lo que puede causar bajas eficiencias de remoción de materia orgánica durante un proceso anaerobio e inhibir el crecimiento de la biomasa. Los resultados obtenidos en esta investigación indican que este tipo de lodo puede ser utilizado en condiciones acidogénicas durante un proceso de tratamiento de aguas sin que se afecte el consumo de sustrato de los microorganismos, siempre y cuando la concentración de los metales no sea mayor a 550 mgCu+Fe/L. Particularmente, esta biomasa puede ser utilizada en un proceso de tratamiento de las aguas provenientes del río San Pedro, ya que los niveles de concentración de cobre y hierro en el agua superficial del río se han encontrado generalmente por debajo de los valores de  $CI_{50}$  obtenidos (Gómez-Álvarez *et al.*, 2009). Sin embargo, también es importante tomar en cuenta la inhibición provocada por otros metales que también se encuentran presentes en las aguas, entre los que se encuentran el Cd, Mn, Pb, y el Zn.



**Figura 4.2** Actividad de consumo de sustrato de la biomasa expuesta a Cu (II).



**Figura 4.3** Actividad de consumo de sustrato de la biomasa expuesta a Fe (II).

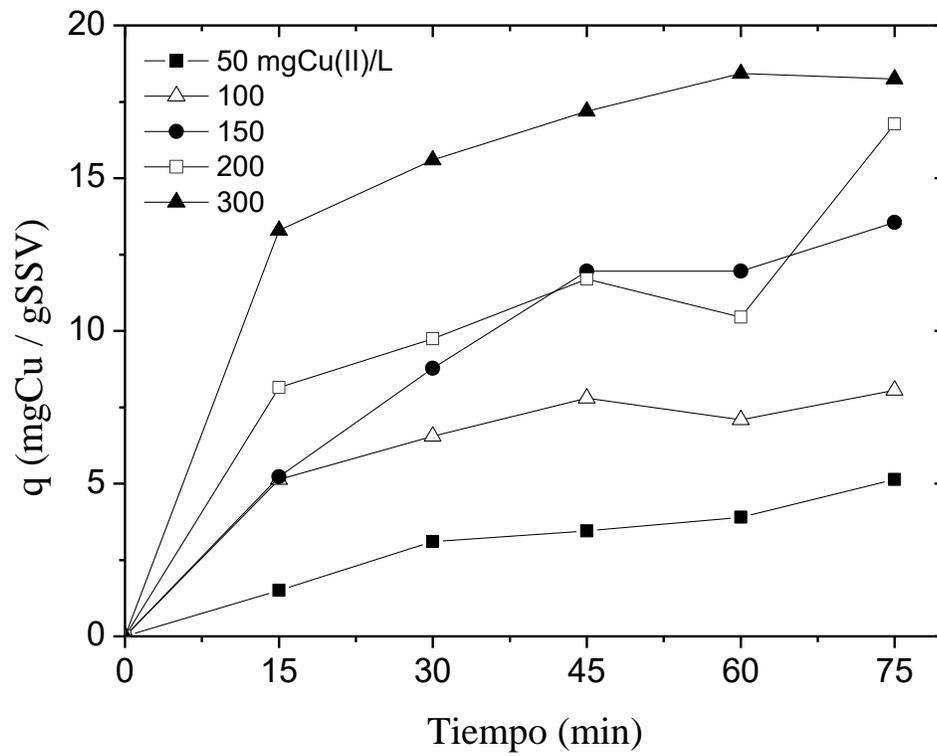


**Figura 4.4** Actividad de consumo de sustrato de la biomasa expuesta a Cu (II) y Fe (II).

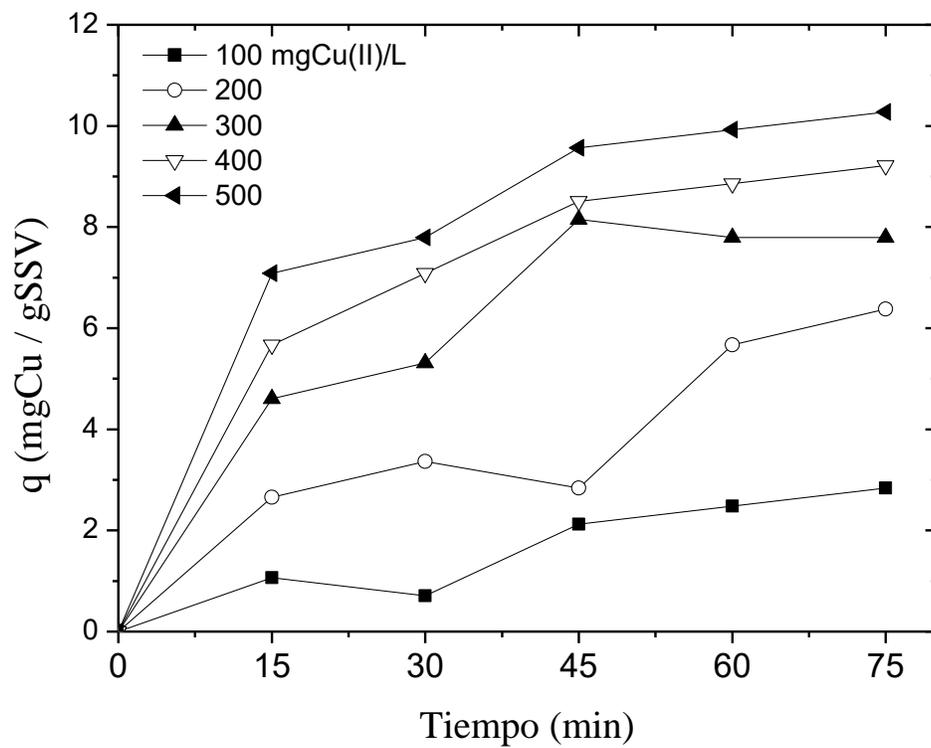
#### 4.1.3 Isotermas de biosorción del Cu (II) y el Fe (II).

En las Figura 4.5, 4.6, 4.7 y 4.8 se presentan las cinéticas de biosorción de los metales Cu y Fe en los sistemas sencillos y en el sistema binario. Se puede observar en las cinéticas de cada sistema que la biosorción se lleva a cabo durante los primeros 30 minutos de contacto entre la solución metálica y la biomasa. Este comportamiento indica que el proceso de biosorción de los metales es un fenómeno rápido, ya que la mayor captación de los metales se lleva a cabo durante este tiempo. A partir de los 30 minutos, la capacidad de biosorción  $q$ , permanece relativamente constante hasta alcanzar el equilibrio entre el metal presente en solución y el metal presente en la biomasa. En la Figura 4.7, correspondiente al sistema con hierro, se aprecia que el equilibrio se alcanza a partir de los 45 minutos. Los datos experimentales se encuentran en el Anexo B.

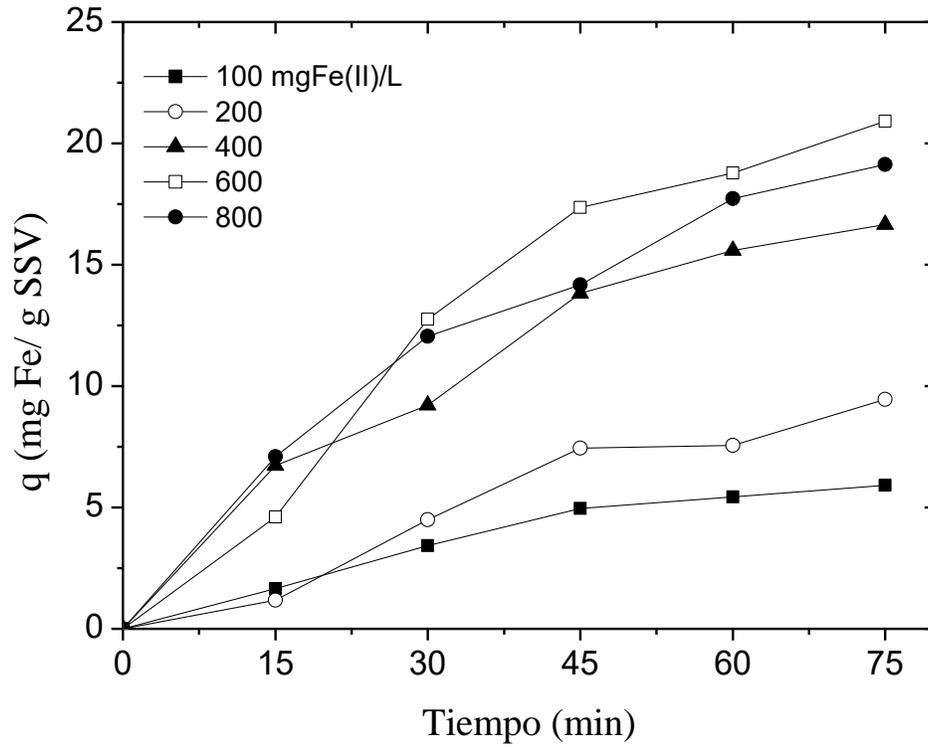
La rapidez del proceso de biosorción se ha reportado ampliamente en la literatura, en donde se considera que la biosorción se lleva a cabo en dos etapas: La primera etapa se caracteriza por una sorción rápida e intensa, la cual puede ocurrir durante los primeros 15 minutos en que la biomasa se pone en contacto con la solución metálica. La rapidez de esta etapa se debe al alto gradiente de concentración producido por la accesibilidad de los sitios activos que se encuentran en la superficie del biosorbente. En la segunda etapa, la cual corresponde al tiempo en que se alcanza el equilibrio, la velocidad de captación de los metales disminuye debido en parte a la ocupación gradual de los sitios activos, aunque pueden ocurrir otros fenómenos, entre los que se encuentran: a) difusión del metal dentro del biosorbente, b) intercambio iónico entre los iones metálicos y los iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  del biosorbente, y c) interacción con los grupos funcionales de la biomasa (Volesky y May-Phillips, 1995; García-Mendieta, 2012; Witek-Krowiak, 2012).



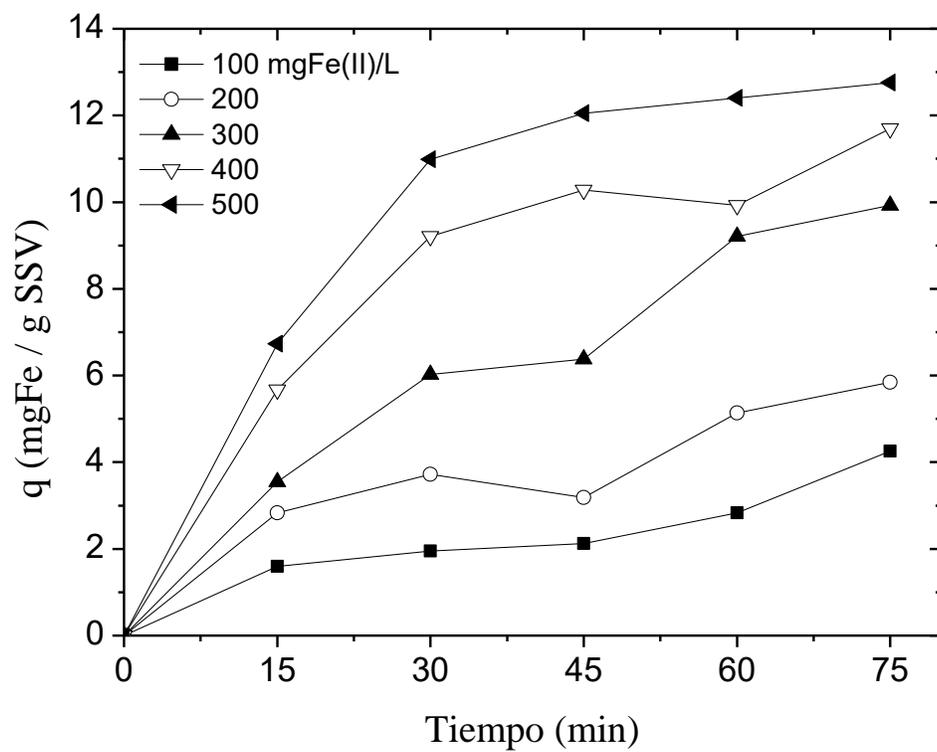
**Figura 4.5** Cinética de biosorción del Cu (II) en el sistema sencillo.



**Figura 4.6** Cinética de biosorción del Cu (II) en el sistema binario (Cu-Fe).



**Figura 4.7** Cinética de biosorción del Fe (II) en el sistema sencillo.



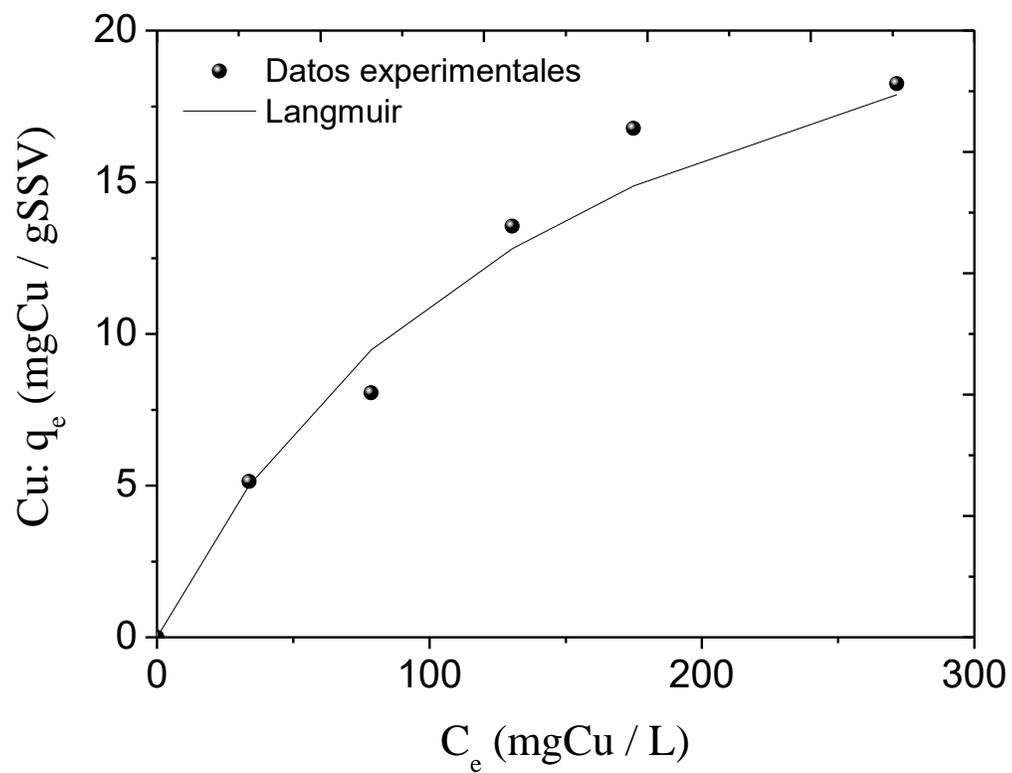
**Figura 4.8** Cinéticas de biosorción del Fe (II) en el sistema binario (Cu-Fe).

Es importante mencionar que existen varios grupos funcionales en la superficie celular que pueden ser responsables de la captación de los metales, entre los que se encuentran: grupos fosfatos y aminos en los ácidos nucleicos, los grupos aminos, amidos, sulfhidrilos y carboxilos en las proteínas y grupos hidroxilos y carboxilos de los polisacáridos. Sin embargo, la presencia de alguno de estos grupos no garantiza su accesibilidad para la biosorción (Volesky y May-Phillips, 1995).

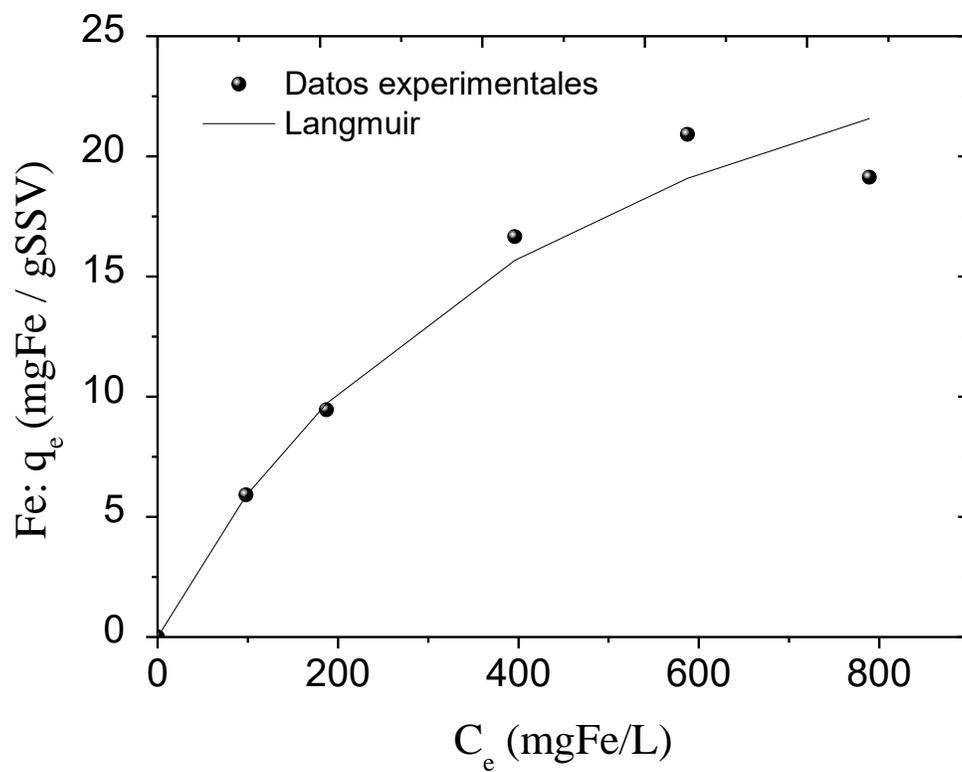
Los datos correspondientes al punto de equilibrio se ajustaron a los modelos de adsorción de Langmuir Ec. (3.3) y Freundlich Ec. (3.4). Ambos modelos arrojaron buenos factores de correlación, como se observa en la Tabla 4.3. No obstante, el modelo de Langmuir tuvo factores de correlación más altos que el modelo de Freundlich, con excepción del sistema con hierro en el sistema binario, en donde el factor de correlación de Freundlich fue ligeramente mayor. El modelo de Langmuir ha sido el más utilizado en la literatura ya que sus parámetros permiten tener un mayor entendimiento del proceso de biosorción (Volesky, 2003). Debido a esto, se seleccionó el modelo de Langmuir para la determinación de las isotermas de biosorción, utilizando los parámetros correspondientes. Las isotermas de Langmuir para los sistemas sencillos y el sistema binario se presentan en las Figura 4.9, 4.10 y 4.11, respectivamente.

**Tabla 4.3** Parámetros del modelo de Langmuir encontrados en los diversos sistemas.

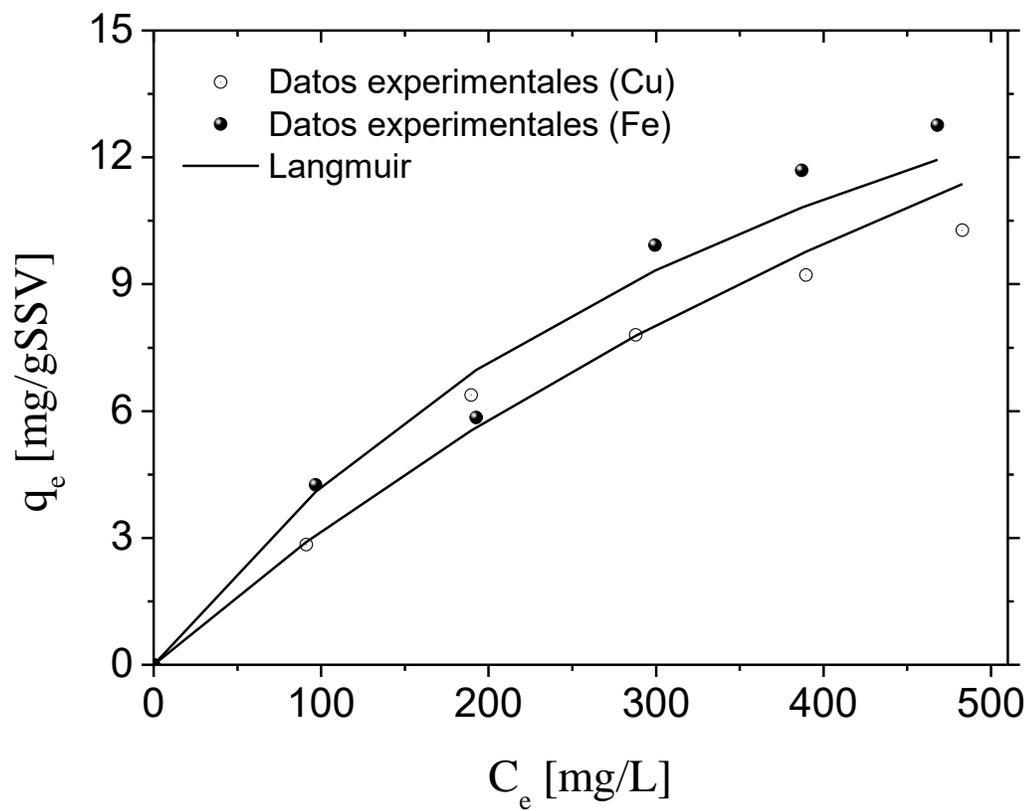
	Metal	Langmuir			Freundlich		
		$q_{\max}$	$b$	$R^2$	$n$	$k$	$R^2$
<b>Sistemas sencillos</b>	Cu (II)	28.65	0.00627	0.975	1.51	0.50	0.969
	Fe (II)	34.72	0.00207	0.992	1.62	0.37	0.951
<b>Sistema Binario</b>	Cu (II)	35.46	0.00096	0.983	1.31	0.10	0.959
	Fe (II)	23.86	0.00214	0.947	1.34	0.13	0.969



**Figura 4.9** Isotherma de biosorción del Cu (II) en el sistema sencillo.



**Figura 4.10** Isothermas de biosorción del Fe (II) en el sistema sencillo.



**Figura 4.11** Isothermas de biosorción del Cu (II) y el Fe (II) en el sistema binario.

La isoterma de Langmuir considera que la “sorci3n” es un fen3meno qu3mico. El modelo no arroja conclusiones sobre los aspectos mec3nicos de la biosorci3n, s3lo genera informaci3n sobre las capacidades de biosorci3n y puede predecir el comportamiento del proceso. Tambi3n se asume que las fuerzas por medio de las cuales los 3tomos no saturados (sitios activos) atraen a los metales no se extienden m3s all3 del di3metro de una sola mol3cula, y por lo tanto, el proceso se restringe a una monocapa de mol3culas adsorbidas (Volesky, 2003). Se puede observar en la Tabla 4.3 que el valor de la capacidad m3xima de biosorci3n del cobre, aument3 de  $q_{\max} = 28.23 \text{ mgCu(II)/gSSV}$  en el sistema sencillo a  $q_{\max} = 35.46 \text{ mgCu(II)/gSSV}$  en el sistema binario de concentraciones iguales. Esto permite suponer que la biosorci3n de cobre se favorece en presencia del hierro en el rango de concentraciones utilizadas. Sin embargo, se debe tener en cuenta que  $q_{\max}$  es un par3metro inherente al modelo de Langmuir que se define como el n3mero total de sitios activos que se encuentran disponibles para la biosorci3n, mientras que la capacidad de equilibrio,  $q_e$ , representa el n3mero de sitios que realmente se encuentran ocupados por el sorbato a la concentraci3n de equilibrio,  $C_e$ . Por lo tanto,  $q_{\max}$  es un par3metro que solamente da una idea de la m3xima cantidad de metal que podr3a ser captada por la biomasa en el proceso de biosorci3n, pero no representa un resultado experimental, pues aunque el modelo de Langmuir indica que la capacidad m3xima de cobre aumenta en presencia de hierro, los datos experimentales muestran que la capacidad de biosorci3n de la biomasa en equilibrio,  $q_e$ , disminuye cuando se encuentran combinados, como se observa en las Figuras 4.6 y 4.8.

En las Tablas 4.4 y 4.5 se presentan las capacidades de biosorci3n de distintas clases de biomasa reportadas en la literatura. Se puede concluir que la biomasa acidog3nica utilizada en este estudio posee un potencial intermedio para la biosorci3n del metal cobre, aunque su capacidad para biosorber hierro es m3s baja que la reportada por otros autores. No obstante, es importante mencionar que se han encontrado pocos reportes en la literatura acerca de la biosorci3n del hierro y sus par3metros de equilibrio, a diferencia del cobre (el cual ha sido ampliamente estudiado), por lo que los resultados de este trabajo aportan informaci3n adicional a la existente en la literatura.

**Tabla 4.4** Capacidades de biosorción del Cu por distintas clases de biomasa.

<b>Biomasa</b>	<b>q [mg/g]</b>
Hojas de Moringa Oleifera (modificada)	146.87
Candida Tropicalis (levadura)	80.0
Semilla de girasol	57.14
Residuos de Zanahoria	32.74
<b><i>Biomasa acidogénica (Este trabajo)</i></b>	<b>28.65</b>
Bacillus thioparans (cepa U3)	27.35
Abono de estiércol	27.18
Cáscara de cacahuete	25.39
Cladosporium resinae (hongo)	18
Cáscara de naranja (tratada)	15.27
<i>Aspergillus flavus</i>	10.82
<i>Scenedesmus obliquus</i>	10
<i>Bacillus sp</i> (bacteria)	5
Semilla de aceituna	1.97

Fuente: Volesky y May-Phillips, 1995; Witek-Krowiak, 2012.

**Tabla 4.5** Capacidades de biosorción del Fe por distintas clases de biomasa.

<b>Biomasa</b>	<b>q [mg/g]</b>
<i>Biomasa</i> (Bacilos)	107
<i>Bacillus licheniformes</i>	45
<b><i>Biomasa acidogénica (Este trabajo)</i></b>	<b>34.72</b>
<i>Bacillus subtilis</i>	20

Fuente: Volesky y May-Phillips, 1995.

## 4.2 Estudios en continuo.

### 4.2.1 Etapa de acondicionamiento.

En esta sección se presentan los resultados correspondientes a la etapa de acondicionamiento, la cual tuvo una duración de 125 días. En esta etapa se realizó la caracterización de lecho, y los parámetros analizados en el reactor fueron la demanda química de oxígeno y los ácidos grasos volátiles.

#### 4.2.1.1 Caracterización del lecho.

Un análisis previo de la clinoptilolita por difracción de rayos X se presenta en el Anexo C. El difractograma indica que el medio de soporte está compuesto efectivamente por clinoptilolita, además de cuarzo y albita alta. Por otra parte, la composición elemental del material se ajusta la definición de las zeolitas, las cuales son aluminosilicatos hidratados y cristalinos compuestos de una red tridimensional de tetraedros de  $\text{SiO}_4^{4-}$  y  $\text{AlO}_4^{5-}$  enlazados a través de átomos de oxígeno (Montalvo *et al.*, 2012).

La producción de biomasa fue analizada durante la operación del reactor acidogénico, tomando muestras de la parte superior de la columna durante días específicos de cada etapa. Los resultados de estos análisis se presentan en la Tabla 4.6. Los sólidos suspendidos volátiles (SSV) calculados en el reactor muestran que la cantidad de biomasa dentro del reactor se incrementó durante la etapa de acondicionamiento, lo que indica que las condiciones de operación utilizadas, en conjunto con el medio de alimentación, propician el desarrollo de los microorganismos. García-Morales *et al.*, (1999) realizó un estudio con biomasa anaerobia en un reactor de lecho fijo con volumen de operación de 2 L ( $T=55^\circ\text{C}$ ) utilizando un material poroso comercial (SIRAN) en forma de perlas de vidrio con un diámetro medio de 1.5-2 mm, obteniendo un valor de 0.0530 gSSV/g, el cual es similar al que se obtuvo en este trabajo durante los últimos días del acondicionamiento.

**Tabla 4.6** Evolución de sólidos en el reactor durante la experimentación en continuo.

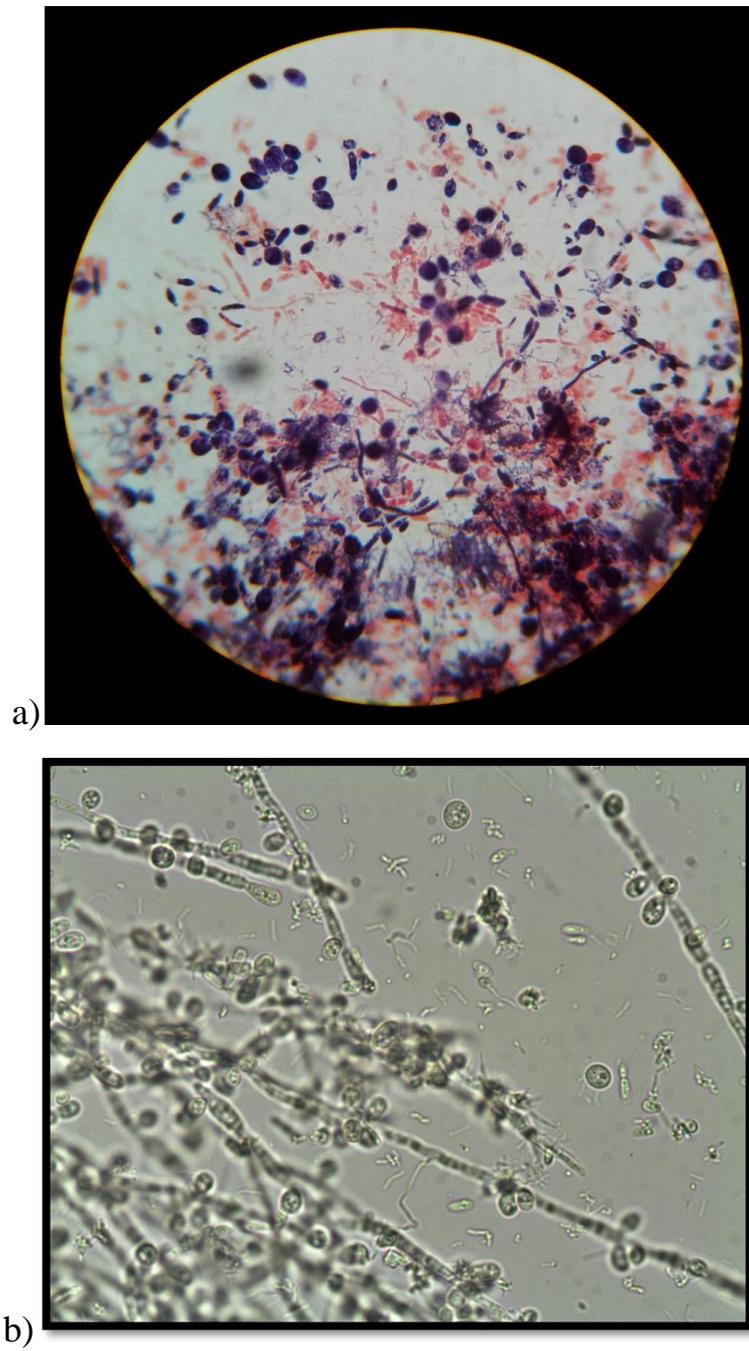
Sólidos Suspendidos	Acondicionamiento		
	Arranque	85 d	125d
Volátiles (SSV)*	0.0264	0.04632	0.05297

\*g/g lodo+clinoptilolita

En la Figura 4.12, obtenida en el microscopio óptico (amplificación de 100X), se observa que la biomasa del biorreactor consistió en bacterias Gram positivas (+) y Gram negativas (-) con estructuras bacilares y en forma de cocos, y además se observó la presencia de levaduras. Las bacterias se pueden encontrar en numerosas formas, entre las que se incluyen tubos (bacilos), cocos, espirilos y filamentos. Las paredes celulares de los microorganismos no son idénticas, por lo que su composición es uno de los factores más importantes en el análisis y en la diferenciación de las especies bacterianas.

En base a su estructura externa, las bacterias se clasifican en Gram positivas (+) y Gram negativas (-). La membrana celular de las bacterias Gram + consiste en una capa gruesa compuesta en un 90% de peptidoglicano conectada mediante puentes de aminoácidos. En esta capa se encuentran incrustados algunos polialcoholes conocidos como ácidos teicóicos. Por otro lado, la membrana de las bacterias Gram - es más delgada y se compone sólo de 10-20% de peptidoglicano, pero presenta una capa adicional compuesta de fosfolípidos y polisacáridos. La naturaleza de estos grupos funcionales aniónicos confieren a las bacterias Gram + y Gram - una carga global negativa, la cual es la responsable de la capacidad de captación de los cationes metálicos (Vijayaraghavan y Yun, 2008). Algunos de los géneros más comunes asociados con las bacterias acidogénicas son: *Lactobacillus*, *Selenomonas*, *Sarcinas* y *Zymomonas* (Almendáriz-Tapia, 2001), sin embargo, para determinar específicamente el tipo de bacterias se deben llevar a cabo pruebas de biología molecular, las cuales no se contemplaron en el desarrollo de este trabajo.

Por su parte, la presencia de levaduras en el consorcio microbiano también beneficia al proceso de biosorción, ya que las paredes celulares de las levaduras contienen un gran número de compuestos orgánicos complejos como: glucano (28%), manano (31%), proteínas (13%), lípidos (8%), quitina y quitosano (2%). Estos compuestos orgánicos proveen a las levaduras una distribución de cargas muy variada que permite la captación de una gran variedad de compuestos entre los que se encuentran los metales pesados (Pachecho *et al.*, 2011).



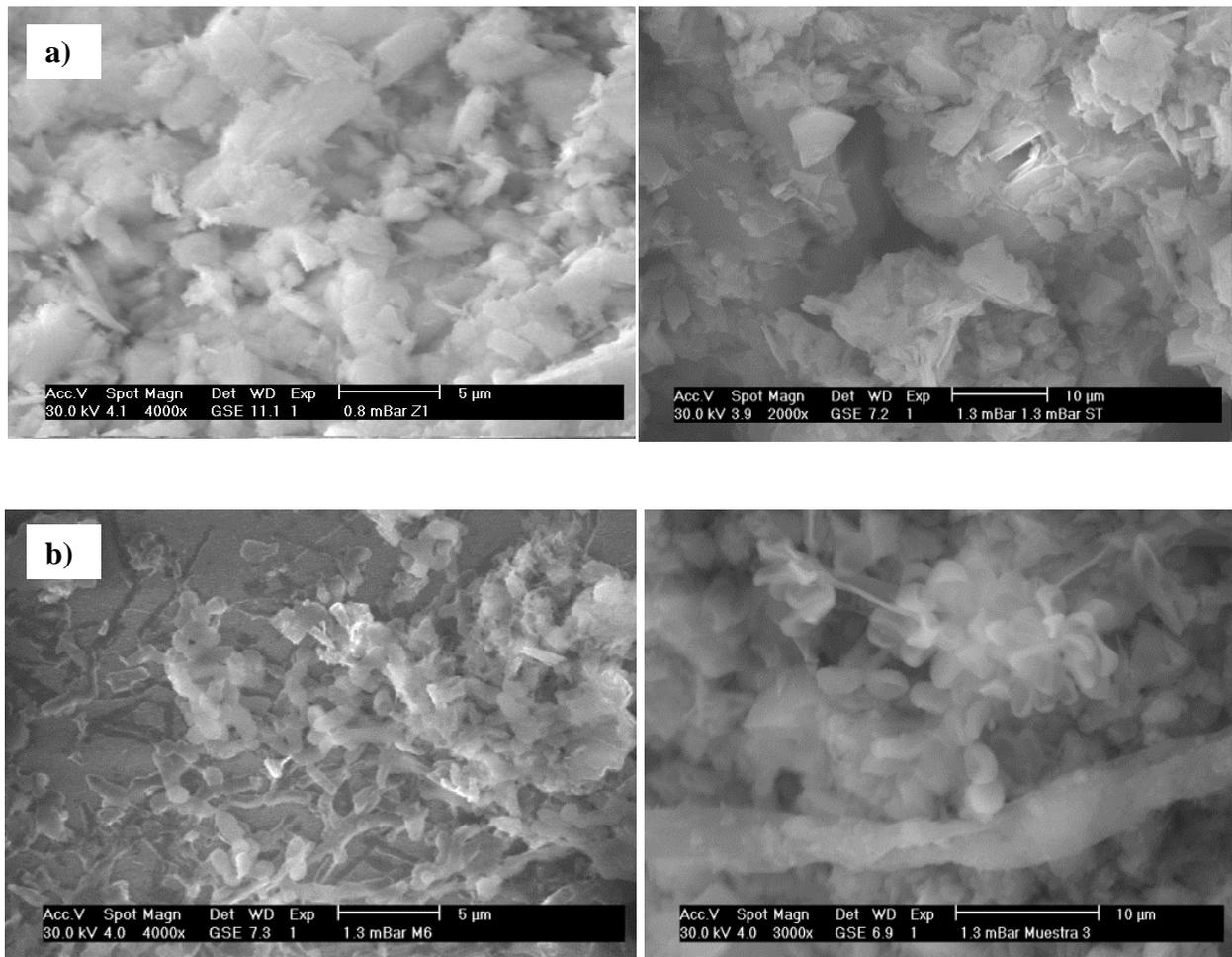
**Figura 4.12** Microorganismos dentro del reactor.

a) Muestra con tinción de Gram.

b) Muestra fresca.

Los resultados obtenidos por Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) se presentan en la Figura 4.13, en donde las micrografías corresponden a muestras de clinoptilolita sin biomasa y clinoptilolita con biomasa. En las muestras de clinoptilolita sin biomasa, correspondientes al inicio de la experimentación en continuo, se aprecian estructuras cristalinas en la superficie, las cuales son propias de las zeolitas. Como consecuencia de la inoculación del reactor con lodos anaerobios y la alimentación del medio mineral, también se puede observar el desarrollo de una biopelícula compuesta por bacterias y levaduras, además de sustancias poliméricas extracelulares (EPS). Esta biopelícula recubre la superficie de la clinoptilolita y es en donde ocurre la inmovilización de los microorganismos dentro del bioreactor.

Las EPS son biopolímeros producidos durante el crecimiento de microorganismos eucariotes y procariotes ya sea en ambientes naturales o artificiales. Estos compuestos se localizan en el exterior de la membrana celular y están constituidas por una gran variedad de moléculas orgánicas de alto peso molecular como proteínas, ácidos nucleicos, fosfolípidos y polisacáridos como componentes principales, que representan del 40 al 95 % de las EPS. Las EPS juegan un papel importante en la adhesión celular y en la formación de la biopelícula microbiana, pero también se ven involucradas en la captación de solutos disueltos como los metales pesados. La unión de cationes metálicos a estos biopolímeros celulares ocurre generalmente debido a la acción de interacciones electrostáticas con los grupos funcionales aniónicos presentes en las SPE como los ácidos urónicos (ácido glucurónico, galacturónico y manurónico), los grupos fosforilos asociados con la membrana celular y los grupos carboxílicos de los aminoácidos (Pal y Paul, 2008). También se puede apreciar que la biomasa se encuentra conformada por microorganismos con estructuras alargadas (bacilos) y esféricas (cocos), lo que guarda semejanza con las imágenes obtenidas en el microscopio óptico. La presencia de la biopelícula sobre la superficie de la clinoptilolita indica que éste mineral, abundante en nuestro estado, puede ser utilizado adecuadamente como medio de soporte para la inmovilización de biomasa en reactores de tipo APBR.



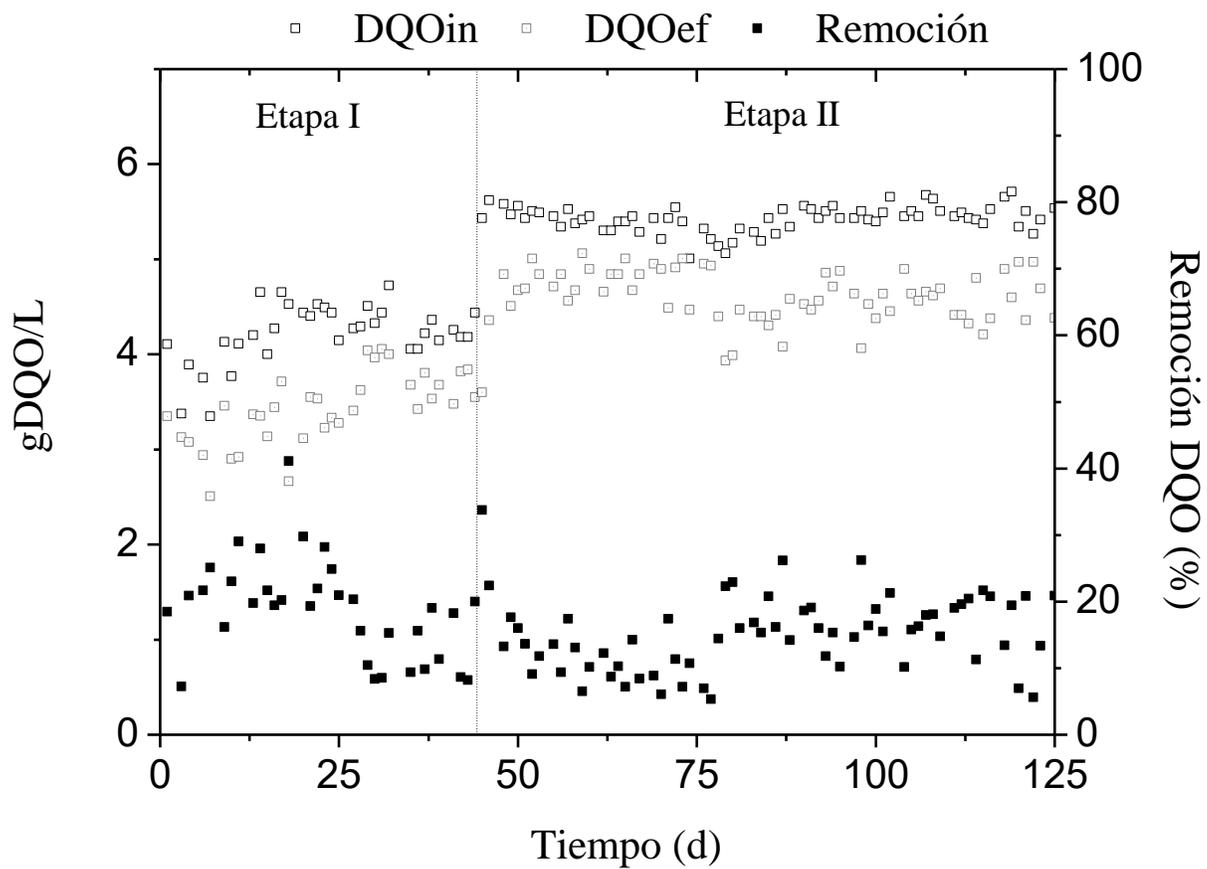
**Figura 4.13** Micrografías representativas durante la etapa de acondicionamiento.

a) Clinoptilolita sin biomasa. b) Clinoptilolita con biomasa.

#### 4.2.1.2 Demanda química de oxígeno (DQO).

En la Figura 4.14 se presenta la DQO de entrada y salida en el reactor. Se puede observar que el reactor presentó valores cercanos al 30% de eficiencia cuando el reactor se alimentó con 4.266 gDQO/L (Etapa I), mientras que al aumentar a 5.333 gDQO/L (Etapa II) la eficiencia de remoción disminuyó a valores cercanos a 20 %. Los bajos porcentajes de remoción de DQO, inferiores al 30%, muestran que el efluente del reactor contiene materia orgánica, lo que indica que la biomasa no degradó por completo la materia orgánica hasta la producción de metano, como sucede durante la metanogénesis, en donde se alcanzan altas eficiencias de remoción. Por el contrario, la presencia de materia orgánica permite concluir que la digestión solo se llevó a cabo hasta una etapa intermedia, como la acidogénesis, en donde ocurre la formación de ácidos grasos volátiles (AGV's). Bajo condiciones estables de operación, tanto el ácido acético como el hidrógeno (H<sub>2</sub>) producido por los microorganismos acidogénicos y acetogénicos son utilizados inmediatamente por los microorganismos metanogénicos y convertidos a metano. En consecuencia, la concentración de AGV's es baja y estable. Sin embargo, cuando existe una sobrecarga de alimentación, o en la presencia de compuestos tóxicos, la actividad de las bacterias metanogénicas disminuye, ocasionando una disminución de la remoción completa de la materia orgánica y una acumulación de AGV's que aumenta la acidez del medio interno (Lahav y Morgan, 2004).

Es importante mencionar que el efluente del reactor siempre arrojó valores ácidos de pH, en el rango de 3 – 3.5 (Anexo C). Durante el proceso de digestión anaerobia, el pH es uno de los parámetros más importantes, ya que cada uno de los grupos microbianos involucrados en las reacciones de degradación anaerobia tiene un rango de pH específico para su crecimiento. El pH puede influir sobre la utilización de las fuentes de carbono, la asimilación del sustrato, la síntesis de proteínas y la liberación de productos metabólicos. El pH óptimo para el desarrollo de los microorganismos metanogénicos se encuentra dentro del rango 6.8-7.2, y su velocidad de crecimiento se ve afectada severamente a pH's por debajo de 6.6 (Parawira *et al.*, 2004).

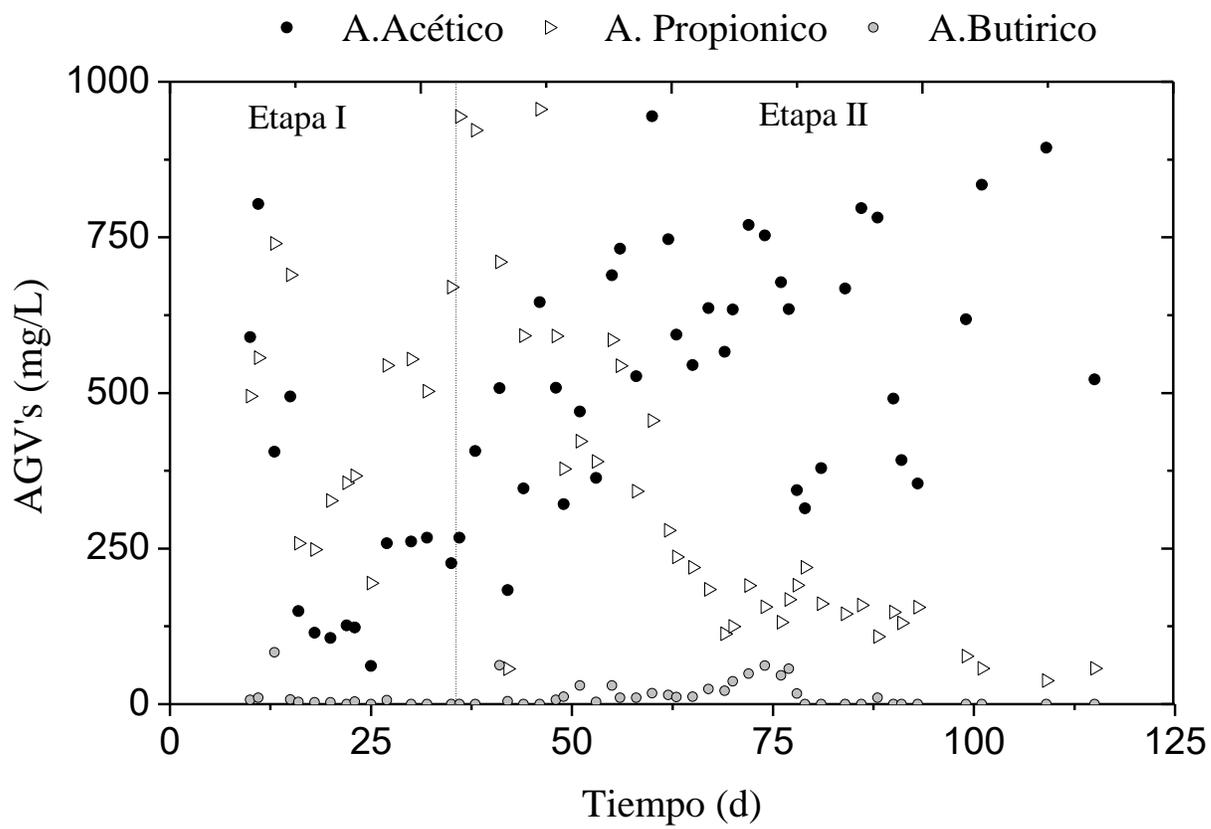


**Figura 4.14** Eficiencia de remoción de DQO en el bioreactor.

#### 4.2.1.3 Ácidos grasos volátiles (AGV's).

Para corroborar la formación de AGV's, el efluente del reactor se analizó por HPLC, en donde se determinó la concentración de ácido acético, ácido propiónico y ácido butírico. Los resultados de dicho análisis se presentan en la Figura 4.15. Se ha reportado que la presencia de ácido butírico en concentraciones superiores a 5 mg/L es un indicador de fallas en la digestión de la materia orgánica; por otra parte, se mencionó anteriormente que la concentración máxima de ácido acético tolerable por microorganismos metanogénicos es 500 mg/L (Fernandez *et al.*, 2007). Se puede observar también que el ácido butírico en el efluente se encuentra en concentraciones muy pequeñas, lo que es un resultado favorable. Se observa también que la concentración de ácido acético aumenta a partir del día 45 con respecto a la concentración de ácido propiónico, lo que concuerda con el incremento de 4 g/L a 5 g/L de dextrosa entre las Etapas I y II. Además, los niveles de ácido acético se encuentran por encima de 500 mg/L, lo que favorece a los microorganismos acidogénicos. La presencia de AGVs, incluyendo la baja remoción de DQO y la acidez del medio interno del reactor, permiten concluir que la biomasa se encontraba en la etapa acidogénica de la digestión anaerobia.

Los datos de concentración de la Figura 4.15 obtenidos por HPLC fueron convertidos a moles con el fin de realizar una comparación con resultados obtenidos con el método de retrotitulación, por medio del cual se obtiene una aproximación de los AGV's totales (en unidades de Mol/L) (Anexo C). Se pudo apreciar que ambos métodos arrojaron comportamientos similares, con la diferencia de que la curva de AGV's obtenida por HPLC se encontró por debajo de la curva obtenida por retrotitulación, este resultado es adecuado ya que la técnica de retrotitulación arroja una aproximación de los ácidos grasos totales presentes en la muestra, entre los que se pueden incluir no sólo el ácido acético, ácido propiónico y el ácido butírico, sino también otros ácidos como ácido caproico, ácido valérico, ácido iso-valérico, entre otros. Debido a que los resultados entre las dos técnicas empleadas durante el acondicionamiento fueron similares, se decidió seguir con la técnica de retrotitulación durante la etapa de biosorción.



**Figura 4.15** Concentración de AGV's en el efluente del reactor.

## 4.2.2 Etapa de biosorción.

### 4.2.2.1 Caracterización del lecho.

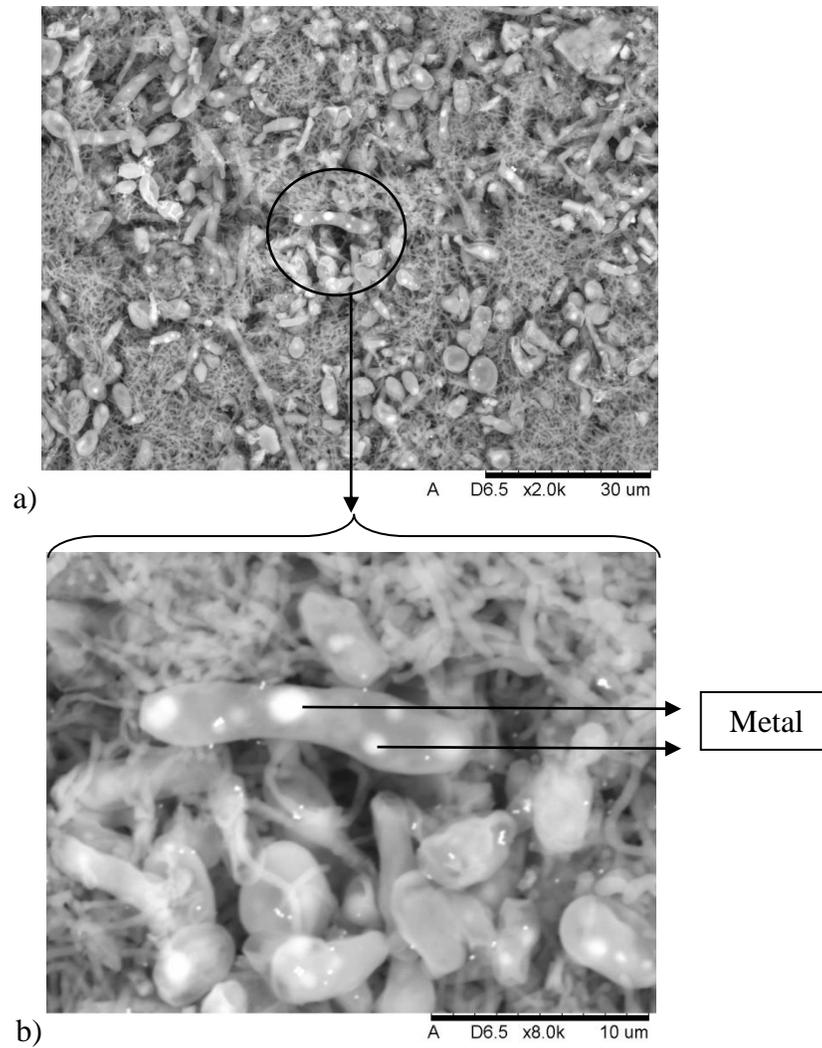
La caracterización de la superficie de los materiales utilizados como biosorbentes es de mucha importancia, ya que la biosorción es un proceso que se realiza en mayor parte sobre la superficie del material. Esto quiere decir que las etapas principales de la transferencia de masa ocurren en la capa externa del material que se utiliza como biosorbente, donde los iones metálicos son captados por medio de distintos mecanismos (Witek-Krowiak, 2012). En cuanto a la fracción de sólidos, durante la etapa de biosorción se puede observar que los SSV disminuyeron gradualmente conforme los metales eran alimentados al reactor (Tabla 4.7). Esta disminución de los SSV, de aproximadamente un 40 %, puede ocasionarse por un desprendimiento de los microorganismos presentes en la biopelícula, este fenómeno se conoce como muda o *sloughing* (García-Morales *et al.*, 1999), y se debe fundamentalmente a la actividad inherente al desarrollo de la microbiota, el cual puede ser afectado por la presencia de los metales. Además, cabe mencionar que la recirculación del efluente fue interrumpida durante esta etapa para evitar la obtención de resultados imprecisos en la biosorción de metales, lo que también pudo haber afectado el desarrollo de los microorganismos.

En la Figura 4.16 se presentan las micrografías obtenidas por MEB de las muestras al final de la etapa de biosorción. Se observa que la morfología de los microorganismos no fue afectada por la adición de los metales, ya que aún se pueden apreciar las estructuras bacilares y esféricas que se observaron en las muestras correspondientes a la etapa de acondicionamiento (Figura 4.13). Asimismo, se puede apreciar cómo el metal fue bioacumulado en los microorganismos que componen la biomasa, lo que indica que la remoción del metal se llevó a cabo por el consorcio bacteriano y no por el medio de soporte. Las partículas brillantes que se observan en la superficie de los microorganismos corresponden a restos de tetróxido de osmio utilizado en la tinción biológica para la observación por MEB.

**Tabla 4.7** Evolución de sólidos en el reactor durante la etapa de biosorción.

	<b>Biosorción</b>			
Sólidos Suspendidos	<b>125d</b>	<b>127 d</b>	<b>135 d</b>	<b>150 d</b>
Volátiles (SSV)*	0.05297	0.03536	0.03055	0.03014

\*g/g lodo+clinoptilolita



**Figura 4.16** Micrografías representativas por MEB durante la etapa de biosorción.

- c) Microorganismos observados al final de la experimentación.
- d) Metales bioacumulados y biosorbidos en los microorganismos.

#### 4.2.2.2 Efecto del Cu (II) y Fe (II) sobre la DQO y AGV's.

En la Figura 4.17 se pueden observar los resultados de la medición de la DQO en el reactor acidogénico antes y durante la etapa de biosorción. Los primeros 125 días corresponden a la operación del reactor antes de la alimentación del cobre y el hierro. El porcentaje de remoción se mantenía en valores por debajo del 30 %; como se mencionó anteriormente, esto indica que la biomasa se encontraba en la fase acidogénica de la digestión. A partir del día 125 se comenzó la alimentación de la mezcla metálica conformada por 100 mg/L Cu (II) y 300 mg/L Fe (II). Se observa que los metales no causaron un efecto significativo sobre la remoción de la DQO. Sólo durante los últimos 10 días (Etapa III) se aprecia una disminución en el porcentaje de remoción, alcanzando valores de 10 %.

El efecto de los metales sobre la producción total de ácidos grasos en el reactor se observa también en la Figura 4.17. Previo a la alimentación de los metales, la concentración de AGV's se encontró en un nivel promedio de 0.012 eq/L. A partir del día 125 se observa una disminución significativa sobre la producción de AGV's, ya que durante los primeros 3 días en que se alimentó el cobre y el hierro, su concentración disminuye desde un valor de 0.008 eq/L hasta un valor de 0.004 eq/L. Esto indica que los metales provocaron una inhibición de casi 70% sobre la producción de AGV's. Después de los primeros 10 días en que se alimentaron los metales, se puede apreciar un ligero aumento en la producción de AGV's, alcanzando valores de 0.0065 eq/L, lo que puede indicar que la biomasa se encontraba en una etapa de adaptación a la presencia de los metales.

El efecto de los metales sobre la producción y degradación de AGV's ha sido reportado ampliamente por Lin *et al.*, (1996, 1997), quienes han estudiado la toxicidad de los metales Cu, Cr, Zn, Cd, Ni, y Pb sobre biomasa acidogénica; en dichos estudios se encontró que el metal más tóxico fue el cobre. La concentración de cobre que ocasionó una disminución del 50 % sobre la producción de AGV's fue de 282 mg/L, mientras que para la biomasa metanogénica la concentración fue de 31 mg/L de cobre. Cabe

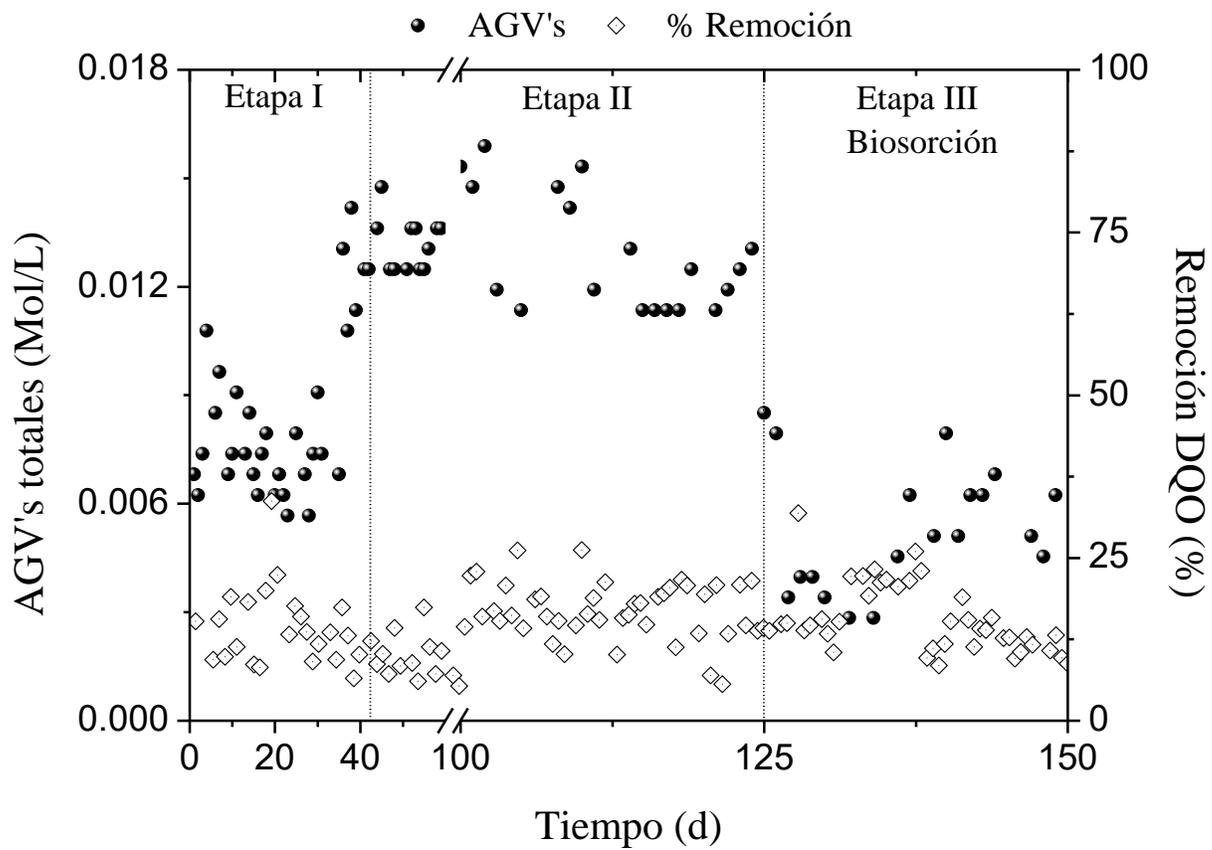
mencionar que estos estudios se llevaron a cabo en sistemas en lote, en donde el metal no es alimentado de manera continua, pero demuestran el efecto tóxico ejercido por los metales y además confirman la mayor resistencia a los metales de la biomasa acidogénica.

Es importante mencionar que los AGV's producidos en un reactor acidogénico pueden ser reutilizados como sustrato para un reactor metanogénico en un sistema en serie. Esto permitiría establecer un proceso ecológico y sustentable con altas eficiencias de remoción de materia orgánica, por ello, la medición de la inhibición ejercida por los metales aporta información que ayuda en el diseño y planeación de un proceso de biorremediación.

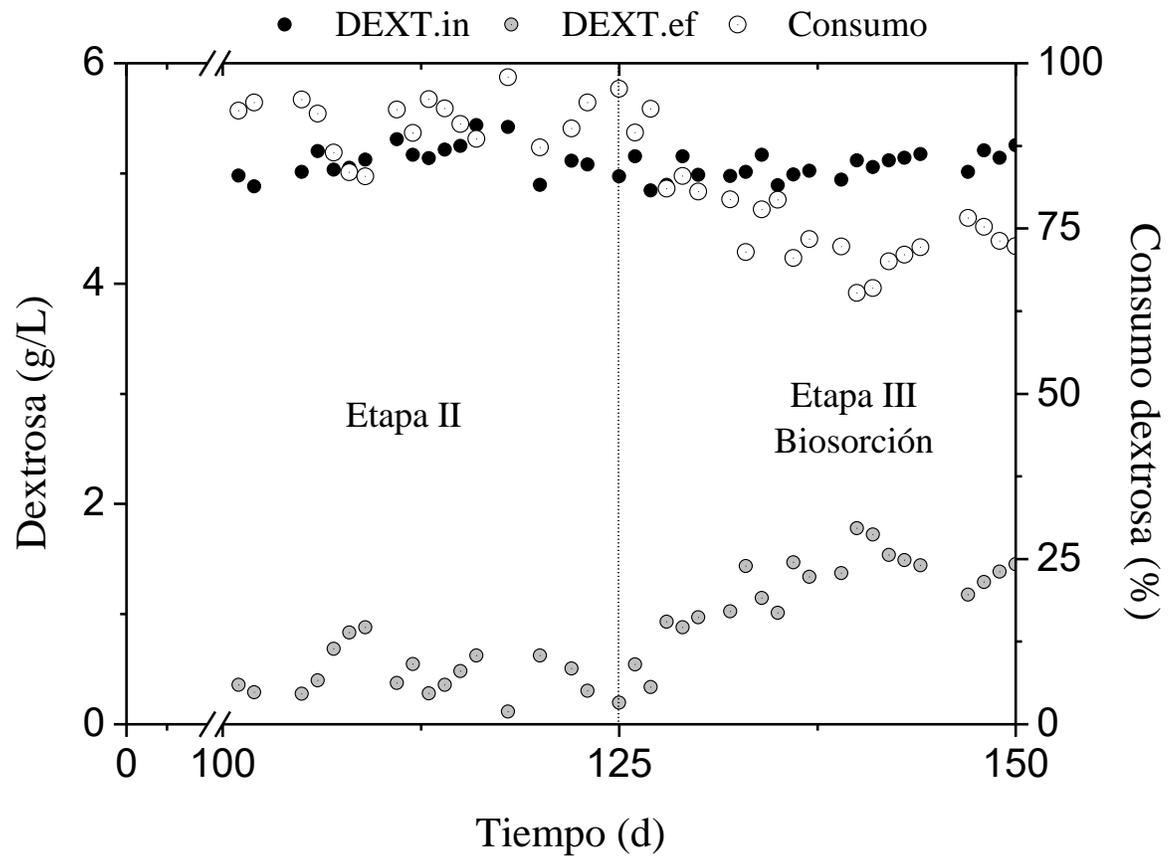
#### **4.2.2.3 Efecto del Cu (II) y Fe (II) sobre el consumo de dextrosa.**

Una manera de evaluar el grado de acidogénesis puede ser midiendo el consumo del sustrato utilizado por los microorganismos (García-Morales *et al.*, 1999). En la Figura 4.18 se presenta el grado de consumo de dextrosa en el reactor. La dextrosa fue alimentada a una concentración constante de 5 g/L durante todo el experimento. Se observa que antes de la alimentación de los metales al reactor, la dextrosa presente en el efluente se encontró en niveles cercanos a cero, lo que indica que la biomasa se encontraba metabólicamente activa, pues se tenían porcentajes de remoción de dextrosa mayores a 90%.

Una vez que el cobre y el hierro fueron alimentados (día 125), la dextrosa consumida disminuyó gradualmente. El porcentaje de consumo de dextrosa disminuyó a valores entre 85% y 80% durante los primeros 20 días de la Etapa III, para finalmente disminuir hasta un 750 % en los últimos días del experimento (días 145-150).



**Figura 4.17** Remoción de la DQO antes y durante la etapa de biosorción.

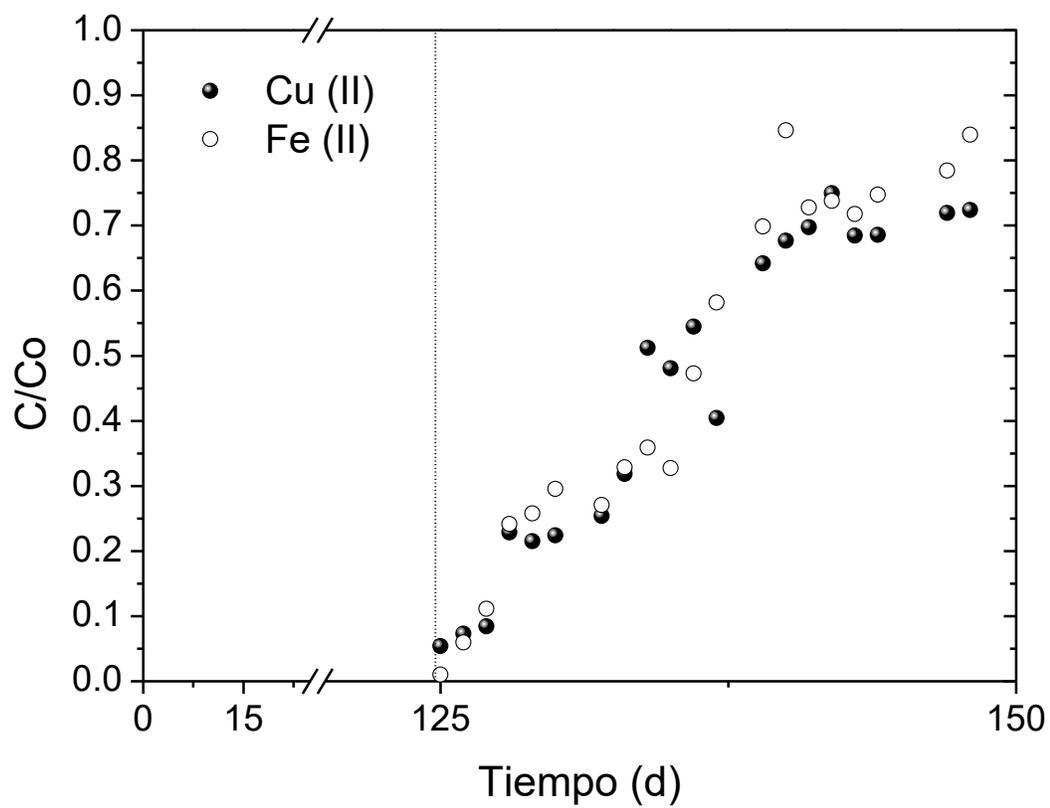


**Figura 4.18** Consumo de dextrosa en el reactor antes y durante la etapa de biosorción.

El efecto tóxico de los metales pesados se atribuye al rompimiento de las proteínas celulares y a la inhibición de las enzimas que participan en las reacciones de transformación anaerobias. Por lo tanto, una concentración en exceso de metales causa una disminución en el crecimiento de las células microbianas y constituye una de las desventajas de utilizar biomasa viable (viva). Sin embargo, el uso de biomasa viable, con un sustrato adecuado, permite la implementación de sistemas autoregenerables de células microbianas en los que ocurre una remoción simultánea de materia orgánica y metales pesados. Esto tiene aplicaciones prácticas ya que la mayoría de las plantas municipales de tratamiento de agua operan con organismos vivos, pero la contribución de los fenómenos de biosorción y bioacumulación en el proceso de la digestión han sido poco estudiados (Chojnacka, 2010). Los resultados de este trabajo guardan estrecha relación con lo mencionado anteriormente, ya que los datos experimentales permiten tener un mayor entendimiento de las eficiencias de los procesos de remoción, tanto de contaminantes orgánicos como inorgánicos, y de la tolerancia de los sistemas microbianos a compuestos tóxicos, como lo son el cobre y el hierro.

#### **4.2.2.4 Cinética de biosorción del Cu (II) y el Fe (II).**

El rendimiento de los procesos de biosorción en reactores de columna se analiza por medio de las curvas de ruptura, las cuales consisten en gráficas de concentración de salida del metal contra tiempo. Las curvas de ruptura del cobre y el hierro obtenidas en este trabajo se presentan la Figura 4.19. El tiempo de ruptura,  $t_b$ , de las curvas  $C/C_0$  vs  $t$  se define como el punto en el que la concentración de salida del soluto alcanza un nivel máximo permisible de descarga con respecto a la concentración de entrada, mientras que el tiempo de exhaución,  $t_e$ , es el tiempo en el que la columna se satura completamente por el sorbato y se vuelve ineficiente (Volesky *et al.*, 2003). En este trabajo, el nivel máximo permisible de descarga se consideró como el punto en que la  $C/C_0=0.1$ . Se observa en la Figura 4.19 que el  $t_b$  para ambos metales ocurrió a los 3 días del experimento, ya que de ese punto en adelante,  $C/C_0$  fue mayor a 0.1. La biosorción se siguió llevando a cabo durante los 25 días hasta que  $C/C_0 \sim 0.9$ , tiempo en que se consideró que la columna se saturó completamente ( $t_e=25$ ).



**Figura 4.19** Curvas de ruptura de los metales Cu (II) y Fe (II) en el reactor.

Otro punto importante a considerar es el hecho de que las curvas de ambos metales exhibieron comportamientos similares. Esto permite suponer que la biomasa tiene una mayor afinidad por el ion cobre, pues considerando que la cantidad de hierro alimentado fue 3 veces mayor, se esperaría que los grupos funcionales de la biomasa fueran saturados por el hierro en mayor proporción, eliminando los sitios disponibles para la biosorción del cobre. Este resultado concuerda con lo reportado en un estudio en donde se investigó el efecto del hierro sobre la biosorción de cobre, en donde se concluyó que la presencia de Fe (II), en un rango de concentración de 50 – 300 mg/L, aumentó la biosorción de cobre (el cual se mantuvo a 50 mg/L). Esto se puede deber a la transición de Fe (III) y Fe (II) por acción de bacterias reductoras de hierro y a la formación de compuestos minerales que precipitan en el medio como siderita ( $\text{FeCO}_3$ ), vivianita [ $\text{Fe}(\text{PO}_4)_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})^8$ ], y sulfuro de hierro ( $\text{FeS}$ ) (Certucha-Barragan *et al.*, 2011).

En la Tabla 4.8 se presentan algunos parámetros de biosorción calculados durante la alimentación del reactor. Los resultados de la integración numérica en la Ec. (3.11) y el cálculo de la capacidad de biosorción de la columna se presentan en el Anexo C. Se observa que el rendimiento general de la biosorción en el reactor fue ligeramente mayor para el cobre que para el hierro. En un estudio realizado por Pakshirajan y Swaminathan (2009), en el que se realizaron dos ciclos de biosorción, se obtuvo un rendimiento de hasta 57 % durante el primer ciclo utilizando el hongo *P. chrysosporium* en una columna empacada con cubos de espuma de poliuretano (1x1x1cm). Este resultado es parecido al rendimiento de biosorción del cobre de 53% encontrado en esta investigación. Por otro lado, la capacidad de retención de cobre en la columna es similar al reportado por Certucha-Barragán (2009), quien estudió la biosorción de cobre en un reactor UASB utilizando lodos metanogénicos (alimentando el cobre a una concentración de 20 mgCu(II)/L y a un flujo de 1.7 L/d), alcanzando una concentración de 61.6 mgCu(II)/gST durante un período de 30 d.

Generalmente para que un material se considere buen biosorbente, es deseable que el tiempo de ruptura sea grande, que tenga una alta capacidad de biosorción y que la

pendiente de la curva de ruptura sea muy marcada; estos parámetros permiten evaluar con facilidad el rendimiento del proceso, sin embargo, factores como la concentración inicial de metal, el flujo volumétrico y la cantidad de biosorbente utilizada también tienen una influencia sobre los parámetros antes mencionados (Park *et al.*, 2010). Estos resultados indican que este tipo de biomasa acidogénica podría ser utilizada durante un proceso de tratamiento secundario de las aguas provenientes de los efluentes mineros, pero se deben tomar en cuenta los efectos tóxicos provocados por el cobre y el hierro con el objetivo de incrementar la eficiencia del proceso, así como también se debe considerar la toxicidad ejercida por la presencia de otros metales presentes.

**Tabla 4.8** Parámetros de biosorción del Cu (II) y el Fe (II) en el reactor anaerobio.

<b>Metal</b>	<b>Carga de metal [mg]</b>	<b>Metal adsorbido [mg]</b>	<b>Rendimiento [%]</b>	<b>Q<sub>ads</sub> [mg/gSSV]</b>
<b>Cu</b>	4,400.15	2,344.12	53.27	$73.25 \frac{\text{mgCu(II)}}{\text{gSSV}}$
<b>Fe</b>	12,913.35	6,482.08	50.19	$202.56 \frac{\text{mgFe(II)}}{\text{gSSV}}$

## CAPÍTULO 5

### CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

#### 5.1 Conclusiones.

##### *Estudios en lote:*

Los valores de la  $CI_{50}$  permitieron conocer la concentración máxima que puede ser tolerada por la biomasa. Los resultados indican que la biomasa puede utilizarse para tratar aguas residuales con concentraciones menores a Cu (II): 205 mg/L, Fe (II): 606 mg/L y Cu (II) - Fe(II): 150 mg/L - 400 mg/L.

Los datos experimentales obtenidos en las cinéticas de biosorción se ajustaron adecuadamente al modelo de adsorción de Langmuir, y se encontró que la biosorción de cobre se favorece en presencia de hierro en el rango de concentraciones utilizadas, ya que la capacidad máxima de biosorción de la biomasa aumentó de  $q_{\max} = 28.23$  mgCu(II)/gSSV en el sistema sencillo a  $q_{\max} = 35.46$  mgCu(II)/gSSV (sistema binario).

##### *Estudios en continuo:*

Las condiciones de operación establecidas en el reactor fomentaron el crecimiento de la biomasa inoculada. Además, el análisis del efluente del reactor – producción de AGV's y baja remoción de DQO - indica que se favoreció la etapa acidogénica de la digestión.

Se observó que la población microbiana del reactor consistió en un consorcio de microorganismos con estructuras en forma de bacilos y cocos.

El análisis por MEB permitió observar el desarrollo de una biopelícula compuesta por microorganismos y sustancias poliméricas extracelulares sobre la superficie de la clinoptilolita. Esto indica que la clinoptilolita funcionó adecuadamente como medio de soporte, y se puede utilizar para la inmovilización de biomasa en un reactor tipo APBR.

La alimentación continua de los metales Cu (II) y Fe (II) provocó inhibición sobre la producción de AGV's sólo durante los primeros diez días en que se alimentaron los metales. Mientras que el efecto sobre los sólidos suspendidos volátiles (SSV) y el consumo de dextrosa fue mínimo. Esto permite concluir que la biomasa acidogénica puede utilizarse en un proceso de remoción de Cu (II) y Fe (II).

Se encontró una eficiencia de remoción global del 51 % de Cu (II) y Fe (II) durante los 25 días en que el reactor se alimentó con los metales y se estableció un tiempo de ruptura de 3 días. Además, los resultados obtenidos por MEB muestran que hay una biosorción y una bioacumulación de ambos metales.

## 5.2 Recomendaciones.

Con la finalidad de mejorar y ampliar la información obtenida en esta investigación y sugieren las siguientes recomendaciones:

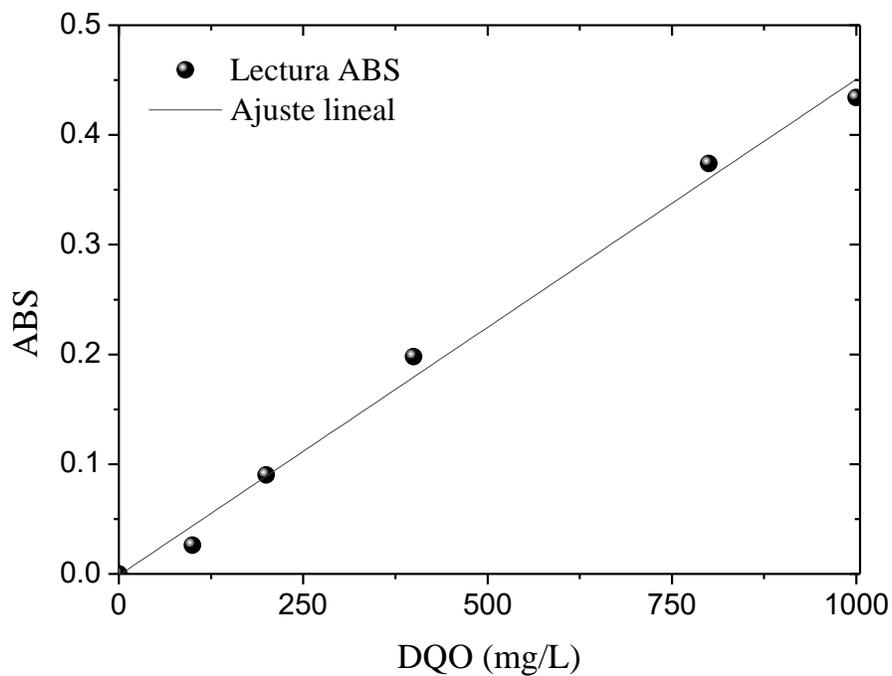
- Continuar con los estudios de toxicidad, realizando ensayos con otros metales pesados, por ejemplo: Ni, Mn, Zn, Cd, Co, Pb y Cr, los cuales se han encontrado en las aguas del Río San Pedro, en Sonora, México.
- Llevar a cabo pruebas de biología molecular para obtener la caracterización del consorcio microbiano utilizado en este estudio.
- Realizar un ensayo con efluentes reales en el sistema continuo para obtener resultados que permitan conocer las aplicaciones prácticas de éste proceso de biorremediación.
- Realizar un análisis del efecto del tiempo de residencia hidráulica (TRH) sobre la eficiencia de remoción de DQO y la producción de AGV's. Esto con el objetivo de conocer si existe un tiempo óptimo que mejore la eficiencia del proceso.
- Realizar un análisis de costos y escalamiento para determinar la rentabilidad del proceso.

# **ANEXOS**

## ANEXO A: Curvas de Calibración.

### DQO.

Se preparó una solución estándar de 1000 mgDQO/L, a partir de la cual se hicieron diluciones y se realizó el procedimiento descrito en los métodos estándares (APHA, 1995). La absorbancia se leyó a una longitud de onda de 620 nm.



**Figura A.1** Curva de calibración de la DQO.

El ajuste de los datos arrojó la siguiente ecuación:

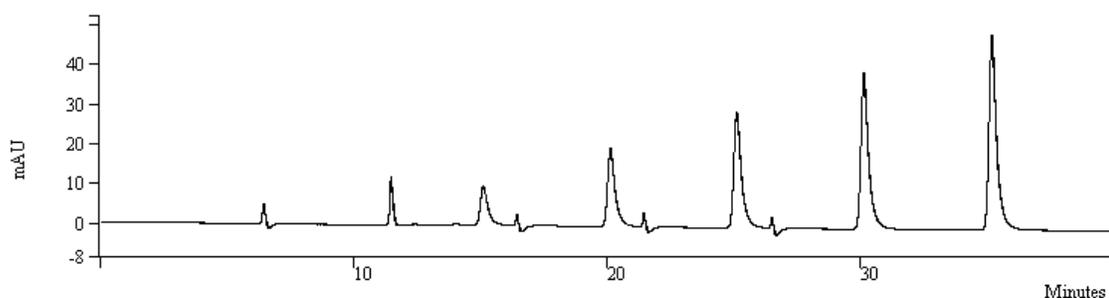
$$y = 0.00045x - 0.0014$$

$$R^2 = 0.9932$$

Esta ecuación se utilizó en las muestras experimentales para el cálculo de la DQO de entrada y salida del reactor.

### AGV's (HPLC).

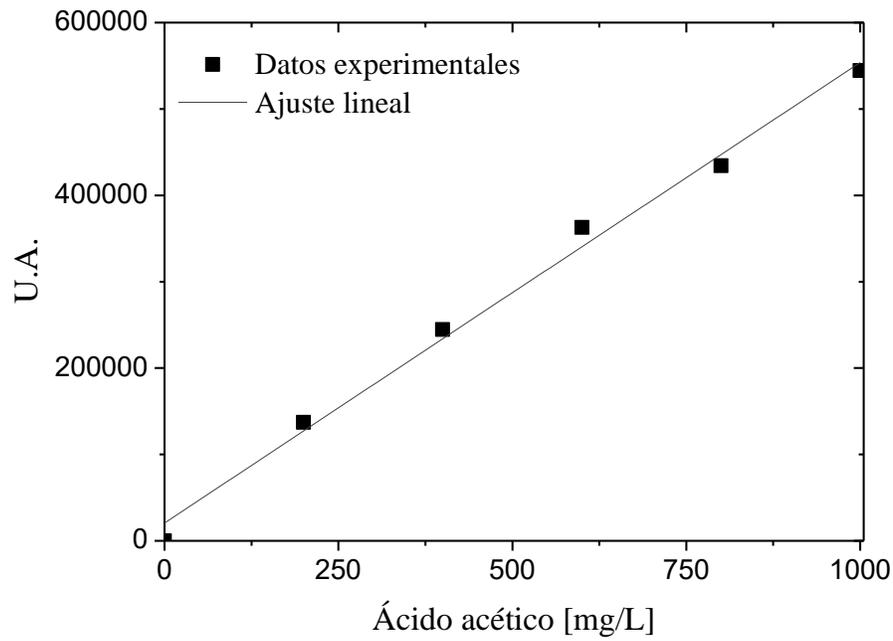
Para realizar las curvas de calibración se prepararon soluciones estándar de los ácidos analizados (0-1,000 mg/L á. acético, 0-1000mg/L á. propiónico, 0-250 mg/L á.butírico) así como las diluciones pertinentes. Al final del análisis el equipo arroja una gráfica como la que se muestra en la Figura A.2.



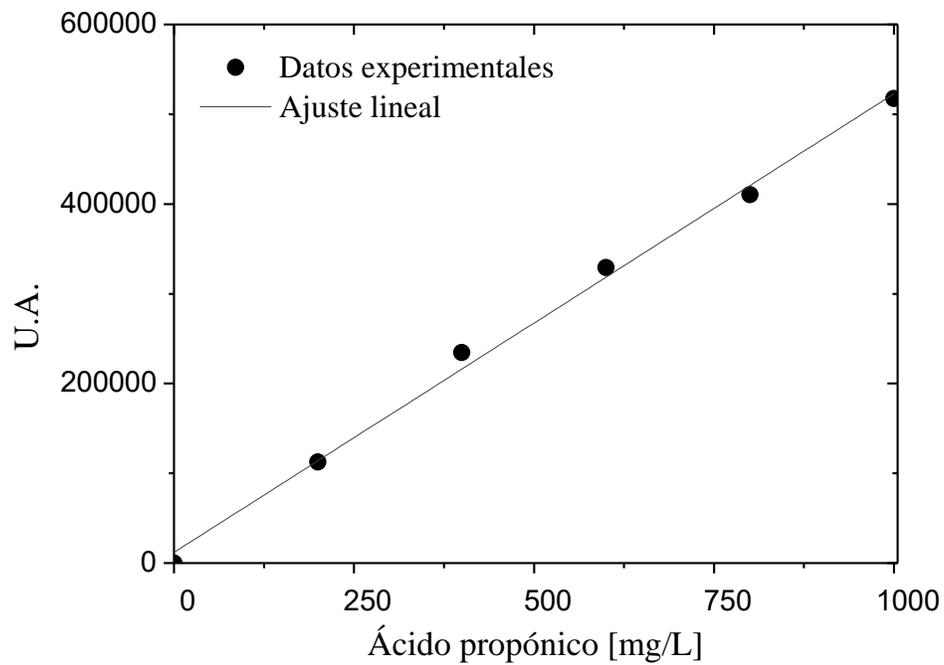
Peak No	Peak Name	Result ()	Ret. Time (min)	Time Offset (min)	Area (counts)	Rel Ret Time	Sep. Code	Width 1/2 (sec)	Status Codes	Group
1		1.1712	6.424	0.000	23769	0.00	BP	6.8		0
2		0.3620	7.163	0.000	7347	0.00	PV	0.0		0
3		0.1609	7.361	0.000	3265	0.00	VB	0.0		0
4		2.6699	11.453	0.000	54184	0.00	BP	7.8		0
5		0.0513	12.401	0.000	1040	0.00	BB	10.4		0
6		0.1352	14.038	0.000	2744	0.00	BB	16.2		0
7		6.7502	15.097	0.000	136993	0.00	BV	17.6		0
8		1.2062	16.427	0.000	24479	0.00	VP	6.2		0
9		3.0594	17.409	0.000	62090	0.00	PB	0.0		0
10		12.0595	20.121	0.000	244744	0.00	BV	17.5		0
11		1.1862	21.442	0.000	24074	0.00	VP	5.9		0
12		2.0569	22.393	0.000	41744	0.00	PB	0.0		0
13		17.8795	25.106	0.000	362860	0.00	BV	17.5		0
14		1.0880	26.496	0.000	22082	0.00	VP	5.4		0
15		1.9379	27.435	0.000	39329	0.00	PB	0.0		0
16		21.3969	30.128	0.000	434245	0.00	BB	17.5		0
17		26.8288	35.185	0.000	544483	0.00	BB	17.6		0
<b>Totals</b>		<b>100.0000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>2029472</b>					

**Figura A.2** Tabla de resultados arrojada por el equipo de HPLC.

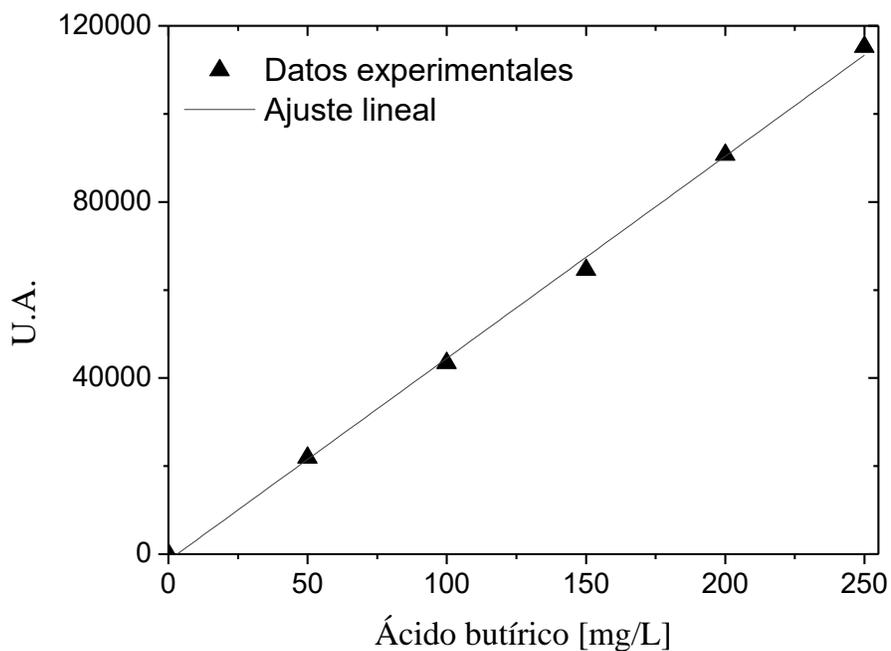
En gráfica de la Figura A.2 se pueden observar 5 picos principales (el resto corresponden a pequeñas interferencias) y el valor correspondiente del área bajo cada pico. Estos valores se utilizaron para la elaboración de las curvas de calibración.



**Figura A.3** Curva de calibración del ácido acético.



**Figura A.4** Curva de calibración del ácido propiónico.



**Figura A.5** Curva de calibración del ácido butírico.

El ajuste lineal de los datos experimentales resultó en las siguientes ecuaciones:

Ácido acético:

$$y = 0.561.31x$$

$$R^2 = 1$$

Ácido propiónico:

$$y = 527.11x$$

$$R^2 = 1$$

Ácido butírico:

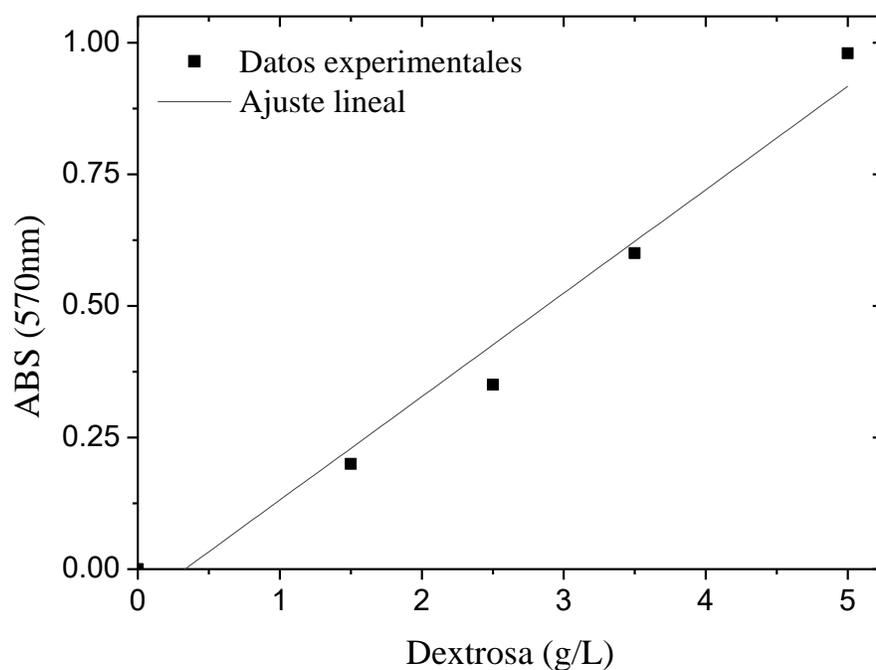
$$y = 451.29x$$

$$R^2 = 1$$

Estas ecuaciones se utilizaron para el cálculo de la concentración de AGV's en las muestras experimentales.

### Dextrosa.

Se prepararon soluciones de dextrosa en el rango de 0-5 g/L y se analizaron por el método del ácido dinitrosalicílico (DNS). Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm.



**Figura A.6** Curva de calibración de dextrosa.

A partir del ajuste de los datos se obtuvo la siguiente ecuación:

$$y = 0.196x - 0.07$$

$$R^2 = 0.9423$$

Esta ecuación se utilizó para la conversión de los valores de absorbancia a concentración de dextrosa.

## ANEXO B: Estudios en Lote

### Estudios de toxicidad.



Etapa de pesado del lodo acidogénico con clinoptilolita.



Botellas serológicas en la incubadora durante la experimentación.



Medición de la concentración de dextrosa por el método del DNS.

**Figura B.1** Imágenes de la experimentación durante los estudios de toxicidad.

**Tabla B.1** Resultados experimentales utilizados en el cálculo de la actividad acidogénica.

<b>Cu</b> [mg/L]	<b>ABS</b>		<b>Dext. remanente [g/L]</b>		<b>Dext. Consumida [g/L]</b>		
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>Promedio</b>
0	0.081	0.02	0.7704	0.4592	4.2296	4.5408	4.3852
50	0.175	0.172	1.2500	1.2347	3.7500	3.7653	3.7577
100	0.33	0.37	2.0408	2.2449	2.9592	2.7551	2.8571
150	0.39	0.46	2.3469	2.7041	2.6531	2.2959	2.4745
200	0.413	0.47	2.4643	2.7551	2.5357	2.2449	2.3903
300	0.5	0.59	2.9082	3.3673	2.0918	1.6327	1.8622

<b>Fe</b> [mg/L]	<b>ABS</b>		<b>Dext. Remanente [g/L]</b>		<b>Dext. Consumida [g/L]</b>		
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>Promedio</b>
0	0.06	0.12	0.6633	0.9694	4.3367	4.0306	4.1837
100	0.167	0.16	1.2092	1.1735	3.7908	3.8265	3.8087
200	0.2	0.192	1.3776	1.3367	3.6224	3.6633	3.6429
400	0.28	0.32	1.7857	1.9898	3.2143	3.0102	3.1122
600	0.505	0.515	2.9337	2.9847	2.0663	2.0153	2.0408
800	0.752	0.66	4.1939	3.7245	0.8061	1.2755	1.0408

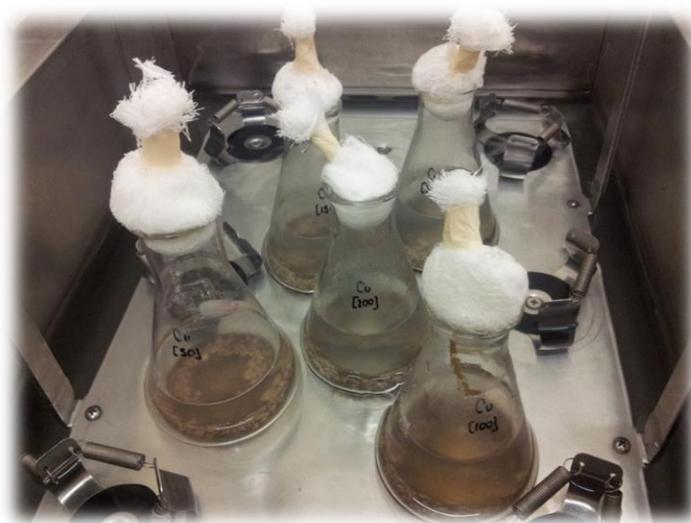
  

<b>Mezcla</b> [mg/L]	<b>ABS</b>		<b>Dext. Remanente [g/L]</b>		<b>Dext. Consumida [g/L]</b>		
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>Promedio</b>
0	0.23	0.1	1.5306	0.8673	3.4694	4.1327	3.8010
150	0.24	0.245	1.5816	1.6071	3.4184	3.3929	3.4056
300	0.42	0.41	2.5000	2.4490	2.5000	2.5510	2.5255
550	0.53	0.48	3.0612	2.8061	1.9388	2.1939	2.0663
800	0.75	0.69	4.1837	3.8776	0.8163	1.1224	0.9694
1100	0.8	0.95	4.4388	5.2041	0.5612	-0.2041	0.1786

### Isotermas de biosorción.



Preparación e inoculación de los matraces con el lodo acidogénico y las soluciones metálicas.



Matraces en la incubadora durante la experimentación.

**Figura B.2** Imágenes de la experimentación de las cinéticas de biosorción.

**Tabla B.2** Resultados experimentales obtenidos durante las cinéticas de biosorción.

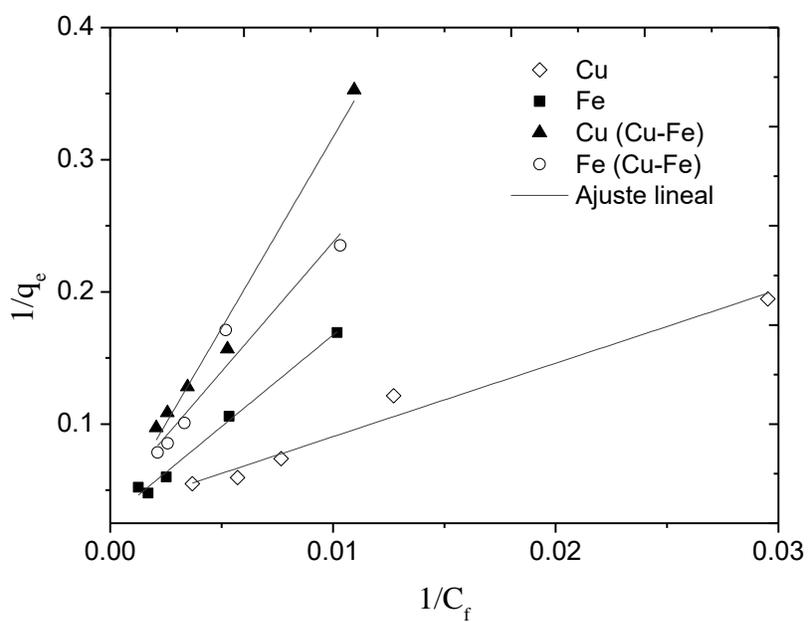
<b>Sistema sencillo: Cu [mg/L]</b>					
<b>t,min</b>	<b>50</b>	<b>100</b>	<b>150</b>	<b>200</b>	<b>300</b>
0	41.125	90.25	149.5	198.5	297.25
15	39	83	142.125	187	278.5
30	36.75	81	137.125	184.75	275.25
45	36.25	79.25	132.625	182	273
60	35.625	80.25	132.625	183.75	271.25
75	33.875	78.625	130.375	174.833	271.5

<b>Sistema sencillo: Fe [mg/L]</b>					
<b>t,min</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>400</b>	<b>600</b>	<b>800</b>
0	106.5	200.5	419.5	617	816
15	104.16	198.83	410	610.5	806
30	101.66	194.16	406.5	599	799
45	99.5	190	400	592.5	796
60	98.83	189.83	397.5	590.5	791
75	98.16	187.16	396	587.5	789

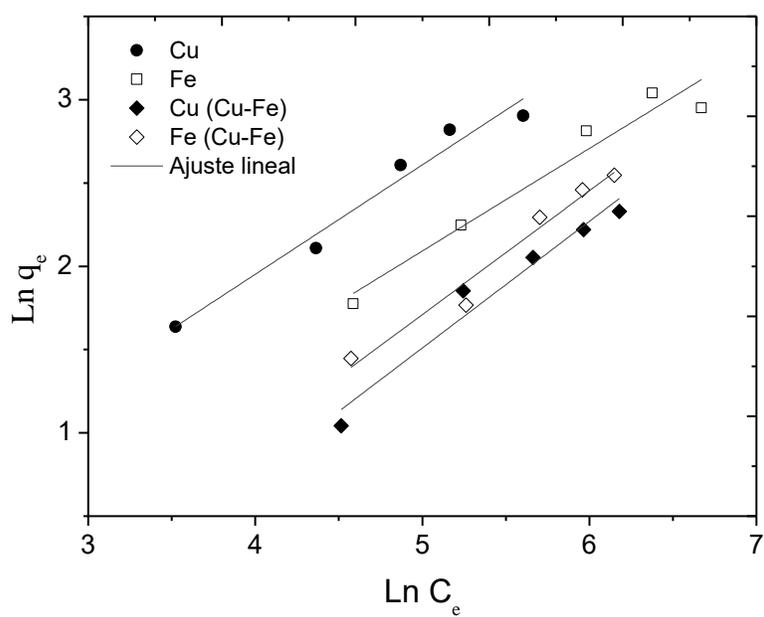
<b>Sistema binario: Cu (Cu-Fe) [mg/L]</b>					
<b>t,min</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>300</b>	<b>400</b>	<b>500</b>
0	95.25	198.75	299	402.5	497.5
15	93.75	195	292.5	394.5	487.5
30	94.25	194	291.5	392.5	486.5
45	92.25	194.75	287.5	390.5	484
60	91.75	190.75	288	390	483.5
75	91.25	189.75	288	389.5	483

<b>Sistema binario: Fe (Cu-Fe) [mg/L]</b>					
<b>t,min</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>300</b>	<b>400</b>	<b>500</b>
0	102.75	201	313.5	403.5	486
15	100.5	197	308.5	395.5	476.5
30	100	195.75	305	390.5	470.5
45	99.75	196.5	304.5	389	469
60	98.75	193.75	300.5	389.5	468.5
75	96.75	192.75	299.5	387	468

Ajuste de la capacidad de biosorción a los modelos de Langmuir y Freundlich.



**Figura B.3** Ajuste de los datos al modelo de Langmuir.



**Figura B.4** Ajuste de los datos al modelo de Freundlich.

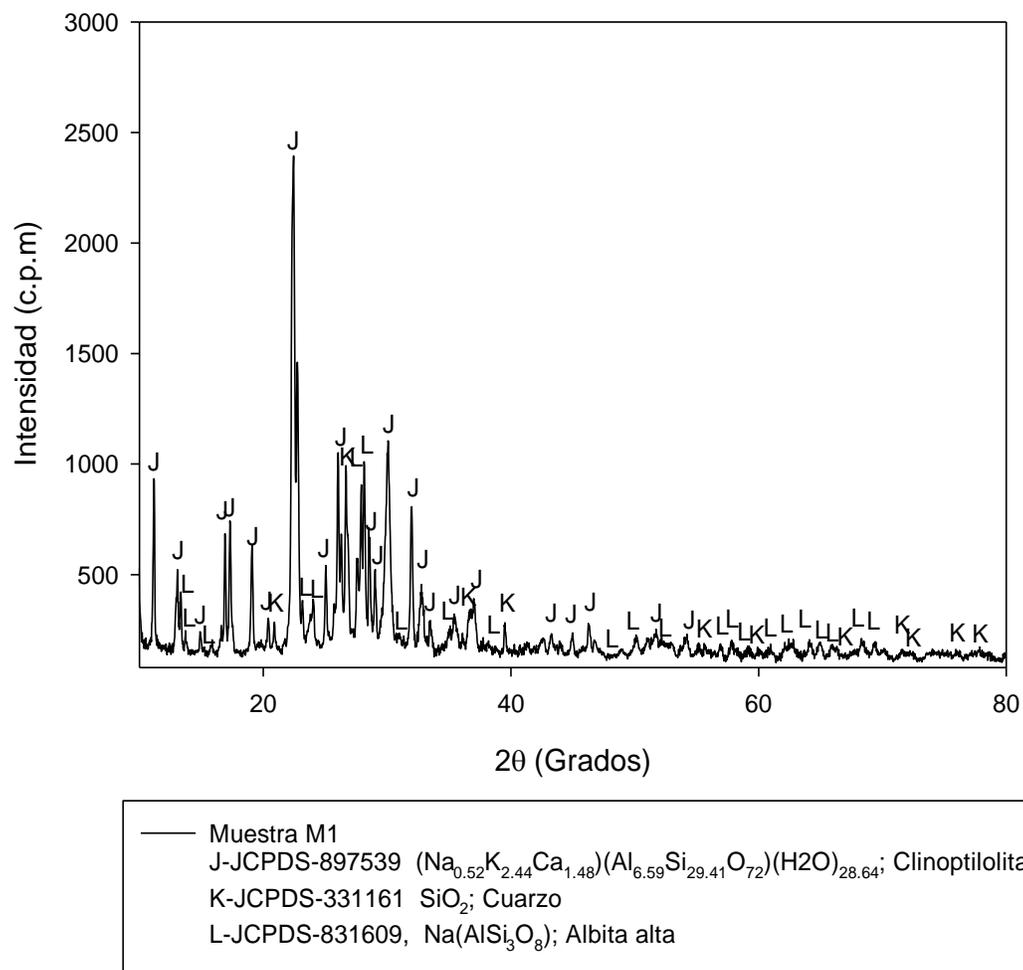
El ajuste lineal resultó en las ecuaciones lineales que se presentan en la Tabla B.3. A partir de dichas ecuaciones se obtuvieron los parámetros de cada modelo de acuerdo a la metodología descrita en el capítulo 3.

**Tabla B.3** Ajuste lineal de los datos a los modelos de Langmuir y Freundlich.

Sistema	Modelo de Langmuir		Modelo de Freundlich	
	Ecuación	R <sup>2</sup>	Ecuación	R <sup>2</sup>
Cu	$y = 5.559199x + 0.34893$	0.975	$y=0.656x-0.675$	0.969
Fe	$y = 13.856x + 0.0288$	0.992	$y=0.615x-0.987$	0.951
Cu (Cu-Fe)	$y = 28.871x + 0.0282$	0.983	$y=0.760x-2.293$	0.959
Fe (Cu-Fe)	$y = 19.567x + 0.0419$	0.947	$y=0.743x-2.00$	0.969

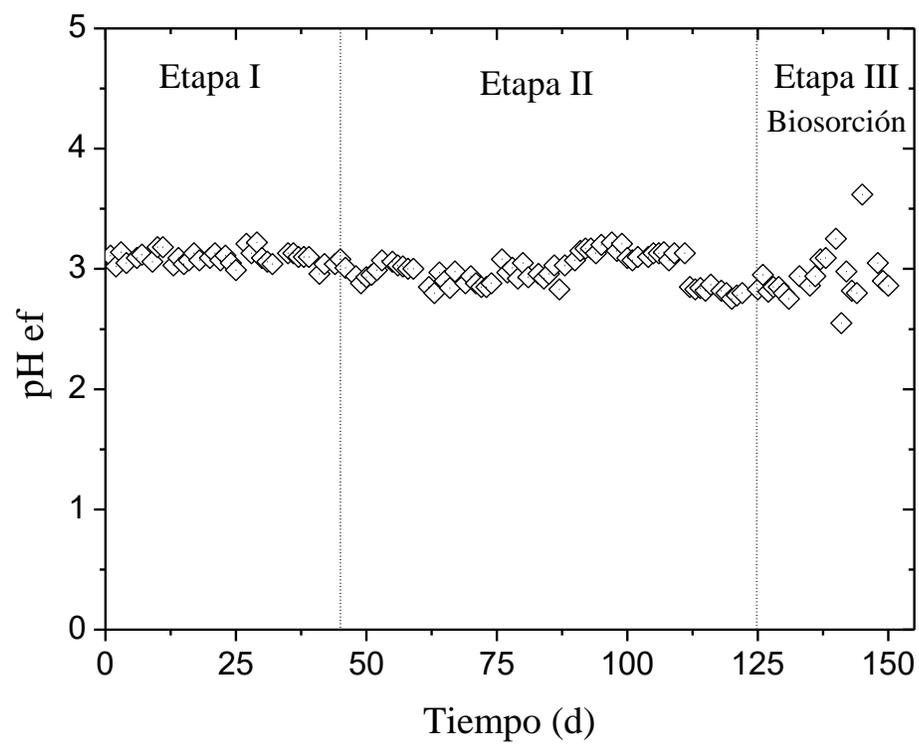
### ANEXO C: Estudios en Continuo.

#### Difractograma de la clinoptilolita por DRX.

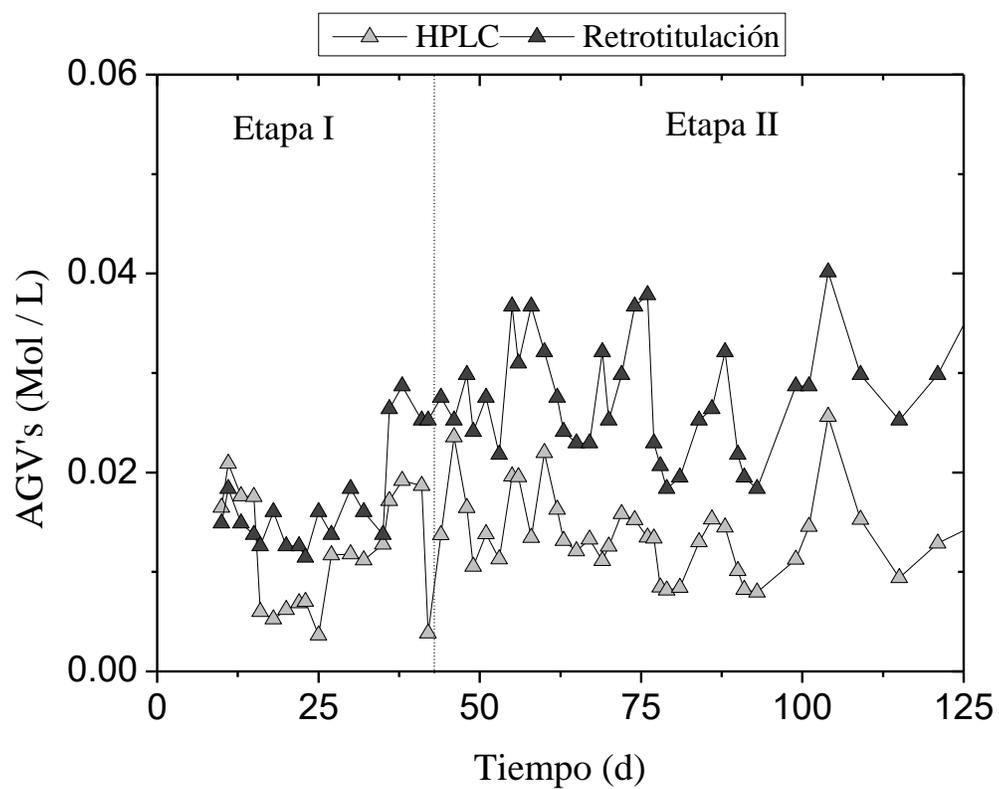


**Figura C.1** Análisis de la clinoptilolita por DRX.

**pH en el efluente del reactor.**



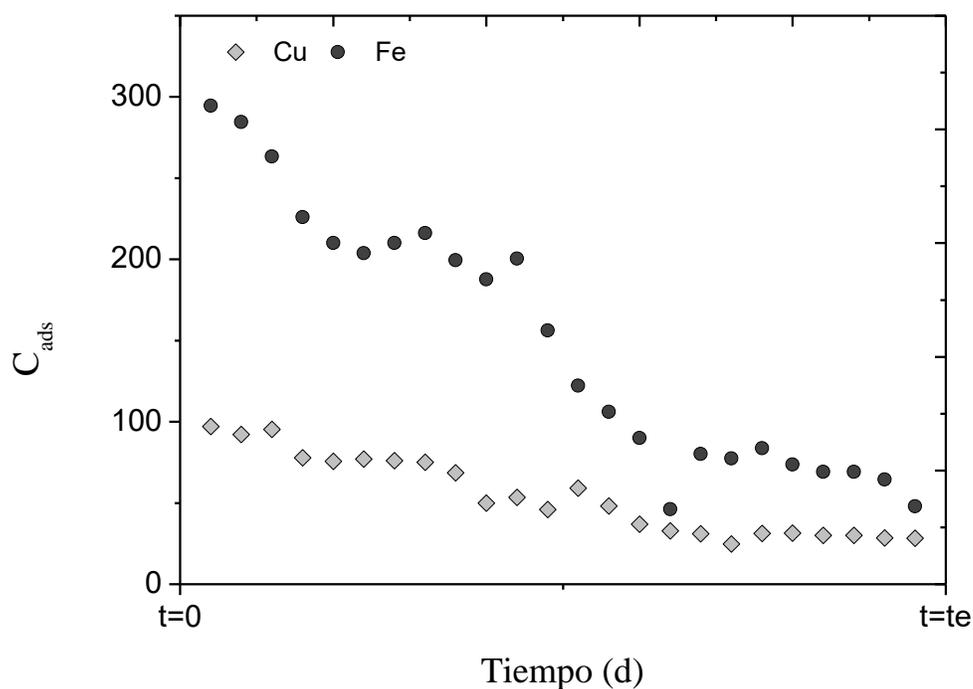
**Figura C.2** pH en el efluente del reactor durante las tres etapas de experimentación.

**Comparación de AGV's por Retrotitulación y HPLC.****Figura C.3** Comparación de AGV's totales por HPLC y retrotitulación.

### Cálculo de la capacidad de biosorción de la columna.

**Tabla C.1** Resultados experimentales obtenidos durante la etapa de biosorción.

<b>Tiempo</b>	<b>Cu</b>		<b>Fe</b>	
	<b>Co</b>	<b>C</b>	<b>Co</b>	<b>C</b>
1	102.5	5.5	297.5	3
2	99.5	7.25	302.5	18
3	104	8.75	296.25	33
4	100.75	23	298	72
5	96.5	20.75	283	73
6	99.25	22.25	289.25	85.5
7				
8	100.5	25.5	296.5	80.25
9	100.5	32	297	97.5
10	102.5	52.5	292.75	105
11	103	49.5	298	97.5
12	101	55	296.25	140
13	99.5	40.25	292.25	170
14				
15	103.25	66.25	298.5	208.5
16	101.25	68.5	300.75	254.5
17	102.5	71.5	294.75	214.5
18	98.75	74	295.75	218.25
19	99	67.75	296.25	212.5
20	100.25	68.75	291.75	218
21				
22	100	70.875	295.625	226.5
23	101.5	73	299.5	235
24	102.25	74	298.5	250.5



**Figura C.4** Concentración de metal retenida ( $C_{ads}=C_o-C$ ) durante la etapa de biosorción.

Para el cálculo de la capacidad de biosorción de la biomasa se utilizó la ecuación (3.11). El cálculo del área bajo las curvas se realizó mediante integración numérica utilizando el programa ORIGIN Pro8.

**Tabla C.2** Valores de integración numérica para el cálculo de  $Q_{ads}$ .

Cobre	Hierro
$\int_{t=0}^{t_e} C_{ads} dt = 1233.75 \text{ mg Cu (II) / L}$	$\int_{t=0}^{t_e} C_{ads} dt = 3411.625 \text{ mg Fe (II) / L}$
$Q_{ads} = \frac{F}{m_s} \int_{t=0}^{t_e} C_{ads} dt$	$Q_{ads} = \frac{F}{m_s} \int_{t=0}^{t_e} C_{ads} dt$
$Q_{ads} = \frac{1.9 \frac{L}{d}}{32 \text{ gSSV}} \left( 1233.75 \frac{\text{mgCu(II)}}{L} \right)$	$Q_{ads} = \frac{1.9 \frac{L}{d}}{32 \text{ gSSV}} \left( 3411.625 \frac{\text{mgFe(II)}}{L} \right)$
$Q_{ads} = 73.25 \frac{\text{mgCu(II)}}{\text{gSSV}}$	$Q_{ads} = 202.56 \frac{\text{mgFe(II)}}{\text{gSSV}}$

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahalya, N., T. V. Ramachandra, y R. D. Kanamadi, 2003, Biosorption of heavy metals: Research Journal Of Chemistry And Environment, v. 7.
- Almendariz-Tapia, F. J., 2001, Degradación del alquilbencen sulfonato lineal (LAS) en un reactor acidogénico bioaumentado con una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* M113, Universidad Autónoma Metropolitana, Iztapalapa, Edo. de México.
- APHA, 1995, Standard Methods: Washington, DC., American Public Health Association.
- Apiratikul, R., T. B. Marhaba, S. Wattanachira, y P. Pavasant, 2004, Biosorption of binary mixtures of heavy metals by green macro alga, *Caulerpa lentillifera*: Songklanakarin J. Sci. Technol, v. 26, p. 199-207.
- Barakat, M. A., 2011, New trends in removing heavy metals from industrial wastewater: Arabian Journal of Chemistry, v. 4, p. 361-377.
- Browning-Aiken, A., B. Morehouse, A. Davis, M. Wilder, R. Varady, D. Goodrich, R. Carter, D. Moreno, y E. D. McGovern, 2007, Climate, water management, and policy in the San Pedro Basin: results of a survey of Mexican stakeholders near the US-Mexico border: Climatic Change, v. 85, p. 323-341.
- Cañizares-Villanueva, R. O., 2000, Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana: Revista Latinoamericana de Microbiología, v. 42, p. 131-143.
- Certucha-Barragan, M. T., E. Acedo-Felix, F. J. Almendariz-Tapia, A. L. Leal-Cruz, R. Perez-Moreno, J. L. Valenzuela-García, y O. Monge-Amaya, 2011, Iron Influence on Copper Biosorption Using Anaerobic Sludge and Its Microstructural Characterization: Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review, v. 32, p. 60-67.
- Chen, Y., J. J. Cheng, and K. S. Creamer, 2008, Inhibition of anaerobic digestion process: A review: Bioresource Technology, v. 99, p. 4044-4064.
- Chojnacka, K., 2010, Biosorption and bioaccumulation - the prospects for practical applications: Environment International, v. 36, p. 299-307.

- Díaz, A., J. Arias, G. Gelves, A. Maldonado, D. Laverde, J. Pedraza, y H. Escalante, 2003, Biosorción de Fe, Al y Mn de drenajes ácidos de mina de carbón empleando algas marinas sargassum sp. en procesos continuos Revista Facultad de ingeniería, v. 30, p. 34-48.
- Fermoso, F. G., J. Bartacek, S. Jansen, y P. N. L. Lens, 2009, Metal supplementation to UASB bioreactors: from cell-metal interactions to full-scale application: Science of the Total Environment, v. 407, p. 3652-3667.
- Fernandez, N., S. Montalvo, R. Borja, L. Guerrero, E. Sanchez, I. Cortes, M. F. Colmenarejo, L. Travieso, y F. Raposo, 2008, Performance evaluation of an anaerobic fluidized bed reactor with natural zeolite as support material when treating high-strength distillery wastewater: Renewable Energy, v. 33, p. 2458-2466.
- Fernandez, N., S. Montalvo, F. Fernandez-Polanco, L. Guerrero, I. Cortes, R. Borja, E. Sanchez, y L. Travieso, 2007, Real evidence about zeolite as microorganisms immobilizer in anaerobic fluidized bed reactors: Process Biochemistry, v. 42.
- Figueira, M. M., B. Volesky, K. Azarian, y S. T. Ciminelli, 2000, Biosorption column performance with a metal mixture: Environmental Science & Technology, v. 34, p. 4320-4326.
- Gadd, G. M., 2001, Microbial metal transformations: Journal of Microbiology, v. 39, p. 83-88.
- Gadd, G. M., 2009, Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment: Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 84, p. 13-28.
- García-Morales, J., L. Romero-García, y D. Sales-Márquez, 1999, Influencia de las paradas estacionales sobre la biomasa inmovilizada en reactores anaerobios: Ingeniería del Agua, v. 6, p. 249-256.
- García-Nieto, E., L. Carrizales-Yañez, L. Juárez-Santacruz, E. García-Gallegos, E. Hernández-Acosta, E. Briones-Corona, y O. G. Vázquez-Cuecuecha, 2011, Plomo y Arsénico en la subcuenca del Alto Atoyac en Tlaxcala, México Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente, v. 7, p. 7-17.

- García-Rico, L., L. Tejeda-Valenzuela, M. E. Jara-Marini, y A. Gómez-Álvarez, 2011, Dissolved and particulate metals in water from Sonora Coast: a pristine zone of Gulf of California: *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 176, p. 109-123.
- Gómez-Álvarez, A., A. Villalba-Atondo, G. Acosta-Ruiz, M. Castañeda-Olivares, y D. Kamp, 2004, Metales pesados en el agua superficial del río San Pedro durante 1997-1999: *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, v. 20, p. 1-8.
- Gómez-Álvarez, A., D. Meza-Figueroa, A. I. Villalba-Atondo, J. L. Valenzuela-García, J. Ramirez-Hernandez, y F.J. Almendariz-Tapia, 2009, Estimation of potential pollution from mine tailings in the San Pedro River (1993-2005), Mexico-US border: *Environmental Geology*, v. 57, p. 1469-1479.
- Gómez-Álvarez, A., J. L. Valenzuela-García, A. I. Villalba-Atondo, D. Meza-Figueroa, F. J. Almendariz-Tapia, T. O. Whitaker-Bojorquez, F. Martinez-Morales, M. Valenzuela-Corral, y L. E. Ochoa-Valenzuela, 2011, Distribution of heavy metals and their chemical speciation in sediments from the Abelardo L. Rodriguez Dam, Sonora, Mexico: *Chemical Speciation and Bioavailability*, v. 23, p. 201-212.
- Guzmán-García, X., A. V. Botello, L. Martinez-Tabche, y H. Gonzalez-Marquez, 2009, Effects of heavy metals on the oyster (*Crassostrea virginica*) at Mandinga Lagoon, Veracruz, Mexico: *Revista De Biología Tropical*, v. 57, p. 955-962.
- Halbinger-Flores, C., R. M. Ramírez Zamora, y A. Durán Moreno, 2002, Eliminación de amoníaco en aguas residuales clarificadas por el proceso de intercambio iónico con zeolitas, Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales, Guanajuato, Gto, FEMISCA, p. 1-7.
- Hashim, M. A., S. Mukhopadhyay, J. N. Sahu, y B. Sengupta, 2011, Remediation technologies for heavy metal contaminated groundwater: *Journal of Environmental Management*, v. 92, p. 2355-2388.
- Hutnan, M., L. Mrafkova, M. Drtil, y J. Derco, 1999, Methanogenic and nonmethanogenic activity of granulated sludge in anaerobic baffled reactor: *Chemical Papers*, v. 53.

- Kida, K., S. Morimura, Y. Sonoda, M. Obe, y T. Kondo, 1990, Support media for microbial adhesion in an anaerobic fluidized-bed reactor: *Journal of Fermentation and Bioengineering*, v. 69, p. 354-359.
- Kim, T. Y., S. K. Park, S. Y. Cho, H. B. Kim, Y. Kang, S. D. Kim, y S. J. Kim, 2005, Adsorption of heavy metals by brewery biomass: *Korean Journal of Chemical Engineering*, v. 22.
- Lahav, O., y B. E. Morgan, 2004, Titration methodologies for monitoring of anaerobic digestion in developing countries - a review: *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 79, p. 1331-1341.
- Malamis, S., E. Katsou, M. Stylianou, K. J. Haralambous, y M. Loizidou, 2010, Copper removal from sludge permeate with ultrafiltration membranes using zeolite, bentonite and vermiculite as adsorbents: *Water Science and Technology*, v. 61.
- Miller, G., 1959, Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar: *Analytical chemistry*, v. 31, p. 426-428.
- Mondragon, V. A., D. F. Llamas-Perez, G. E. Gonzalez-Guzman, A. R. Marquez-Gonzalez, R. Padilla-Noriega, M. D. Duran-Avelar, y B. Franco, 2011, Identification of *Enterococcus faecalis* bacteria resistant to heavy metals and antibiotics in surface waters of the Mololoa River in Tepic, Nayarit, Mexico: *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 183, p. 329-340.
- Monge-Amaya, O., J. L. Valenzuela-García, E. Acedo-Felix, M. T. Certucha-Barragan, y F. J. Almendariz-Tapia, 2008, Copper biosorption in batch and continuous evaluation using immobilized aerobic bacteria in clinoptilolite: *Revista Internacional De Contaminacion Ambiental*, v. 24, p. 107-115.
- Montalvo, S., L. Guerrero, R. Borja, E. Sanchez, Z. Milan, I. Cortes, y M. A. de la Rubia, 2012, Application of natural zeolites in anaerobic digestion processes: A review: *Applied Clay Science*, v. 58, p. 125-133.
- Mungray, A. A., S. V. Kulkarni, y A. K. Mungray, 2012, Removal of heavy metals from wastewater using micellar enhanced ultrafiltration technique: a review: *Central European Journal of Chemistry*, v. 10, p. 27-46.

- Nies, D. H., 1999, Microbial heavy-metal resistance: Applied Microbiology and Biotechnology, v. 51, p. 730-750.
- Pacheco, P. H., R. A. Gil, S. E. Cerutti, P. Smichowski, y L. D. Martinez, 2011, Biosorption: A new rise for elemental solid phase extraction methods: Talanta, v. 85, p. 2290-2300.
- Pakshirajan, K., y T. Swaminathan, 2009, Biosorption of Copper and Cadmium in Packed Bed Columns with Live Immobilized Fungal Biomass of *Phanerochaete chrysosporium*: Applied Biochemistry and Biotechnology, v. 157, p. 159-173.
- Parawira, W., M. Murto, J. S. Read, y B. Mattiasson, 2004, Volatile fatty acid production during anaerobic mesophilic digestion of solid potato waste: Journal of Chemical Technology and Biotechnology, v. 79.
- Park, D., Y.-S. Yun, y J. M. Park, 2010, The Past, Present, and Future Trends of Biosorption: Biotechnology and Bioprocess Engineering, v. 15, p. 86-102.
- Pires Freitas, A. P., I. A. Homrich Schneider, y A. Schwartzbold, 2011, Biosorption of heavy metals by algal communities in water streams affected by the acid mine drainage in the coal-mining region of Santa Catarina state, Brazil: Minerals Engineering, v. 24.
- Ramirez-Paredes, F. I., T. Manzano-Munoz, J. C. García-Prieto, G. G. Zhadan, V. L. Shnyrov, J. F. Kennedy, y M. G. Roig, 2011, Biosorption of heavy metals from acid mine drainage onto biopolymers (chitin and alpha (1,3) beta-D-glucan) from industrial biowaste exhausted brewer's yeasts (*Saccharomyces cerevisiae* L.): Biotechnology and Bioprocess Engineering, v. 16, p. 1262-1272.
- Sivaprakash, B., N. Rajamohan, y A. M. Sadhik, 2010, Batch and column sorption of heavy metal from aqueous solution using a marine alga *Sargassum Tenerrimum*: International Journal of ChemTech Research, v. 2, p. 155-162.
- Valdés-Peresgasca, F., 1999, La contaminación por metales pesados en Torreón, Coahuila, México. , Texas Center for Policy Studies, 46 p.
- Valenzuela, Ramón, 2011, Bioprecipitación de cobre por sulfato-reducción en un reactor anaerobio de lodos granulares expandidos, Universidad de Sonora, Hermosillo, Sonora.

- Volesky, B., 2003, Sorption and Biosorption, BV Sorbex, Inc., 316 p.
- Volesky, B., J. Weber, y J. M. Park, 2003, Continuous-flow metal biosorption in a regenerable Sargassum column: *Water Research*, v. 37.
- Witek-Krowiak, A., 2012, Analysis of temperature-dependent biosorption of Cu<sup>2+</sup> ions on sunflower hulls: Kinetics, equilibrium and mechanism of the process: *Chemical Engineering Journal*, v. 192, p. 13-20.
- Wakida, F. T., D. Lara-Ruiz, J. Temores-Pena, J. G. Rodriguez-Ventura, C. Diaz, y E. García-Flores, 2008, Heavy metals in sediments of the Tecate River, Mexico: *Environmental Geology*, v. 54, p. 637-642.