



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES

Propuesta de un sistema de lixiviación-biosorción con hongos filamentosos para la biorremediación de matrices contaminadas con plomo

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS AMBIENTALES

Presenta

Sagrario Hernández Velázquez

Dirigido por

Dra. Tania Lorena Volke Sepúlveda

C. U. Santiago de Querétaro, Qro., Junio 2011



Propuesta de un sistema de un lixiviación-biosorción con hongos filamentosos
para la biorremediación de matrices contaminadas con plomo

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

Maestro en Ciencias Ambientales

Presenta:

Biól. Sagrario Hernández Velázquez

Dirigido por:

Dra. Tania Lorena Volke Sepúlveda

SINODALES:

Dra. Tania Lorena Volke Sepúlveda
Presidente

Firma

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas
Secretario

Firma

Dr. Miguel Ángel Rea López
Vocal

Rubrica

Firma

Dra. Maricela González Leal
Suplente

Firma

M. en C. Eustolia Rodríguez Muñoz
Suplente

Firma

Q.B. Magali Elizabeth Aguilar Ortiz
Director de la Facultad de Química

Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Director de Investigación y Posgrado

DEDICATORIAS

A mi familia:

A mi hija Donaxhi por todo su apoyo, comprensión y cariño durante la realización de este trabajo, además, por ser ese motor que me mueve día a día.

A mi compañero de vida Raúl, por su tiempo y apoyo incondicional en todo momento para ayudarme a alcanzar esta meta anhelada.

Este logro, va para ustedes.

A mis padres:

Reynaldo y Roselia, por ser mi ejemplo de esfuerzo y lucha en la vida. Y sobre todo a ti *mami* por tus palabras de aliento cuando el camino se tornaba sombrío.

A mis hermanos:

Jesús, Reyna, Carilú, Adriana y Reynaldo porque, aunque lejos debido a las circunstancias, yo sé que cuento con su apoyo y cariño.

A mis sobrinos:

Mara, Jesús, Miguel, Aris, Eri, Frida, Gemma, Ulises, Emma, Bianni y Vica, por compartir conmigo su alegría y por todas las muestras de cariño.

A mis ángeles de la guarda:

Mi abuela Tomasa, Chayito y Ameyalli, quienes sin importar la hora del día siempre están conmigo cuando más lo necesito.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Residuos Sólidos de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Agradezco sinceramente a todas las personas que forman parte de este Laboratorio y a todas aquellas que contribuyeron de alguna manera en la realización de este trabajo, pero en forma especial agradezco a las siguientes personas:

A la Dra. Tania Lorena Volke Sepúlveda, a quien no tengo palabras para agradecerle una vez más todo el apoyo brindado, la paciencia y esfuerzo que hicieron posible la realización de este trabajo.

Al Dr. Mariano Gutiérrez Rojas, por su confianza, además de su gran apoyo, experiencia y orientación durante el tiempo de realización de este trabajo.

Al Dr. Ernesto Favela Torres, por su valiosa ayuda y conocimientos, así, como su apoyo en la utilización de equipos de laboratorio.

A los compañeros del Laboratorio de Residuos Sólidos: especialmente a César, Areli, Nancy, Candi, Manuel, Víctor, Vicky, Caliope, Diana, Felipe y Olivia por su apoyo en todo momento y brindarme una sonrisa o una palabra de aliento cuando hizo falta.

A mis sinodales, el Dr. Miguel Rea López, Dra. Maricela González Leal y a la M. en C. Eustolia Rodríguez Muñoz por contribuir a mi formación profesional.

A mis amigas Griselda, Wendy y Rocío por brindarme su amistad, por su gran apoyo incondicional, consejos y ánimos en todo momento.

A las secretarias del posgrado, Carmelita y Laura, por apoyarme y orientarme amablemente durante los trámites administrativos de este trabajo.

A Vera, Binisa y a la tía Alicia por la ayuda, apoyo y paciencia que me brindaron durante la realización de este trabajo.

RESUMEN

La contaminación ambiental generada por el crecimiento inmoderado de la industria y la población es un problema que afecta al planeta en general. La contaminación del agua, aire y suelo por metales pesados constituye uno de los problemas más severos. Lo anterior, ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento de matrices contaminadas, entre las cuales, se encuentran la lixiviación y la biosorción. Mediante la lixiviación, los metales pueden ser extraídos en fase acuosa a partir de matrices sólidas contaminadas, lo que permite tener al metal disponible para su recuperación. La biosorción implica la captación de iones metálicos por biomasa, a través de mecanismos fisicoquímicos como la adsorción o intercambio iónico. El uso de biomasa de hongos filamentosos como material biosorbente representa una alternativa rentable y ambientalmente amigable. Con base en lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue proponer un sistema para la remediación de matrices sólidas contaminadas con plomo, involucrando mecanismos de lixiviación química y biosorción por hongos filamentosos. Para cumplir con este objetivo, el trabajo se dividió en dos etapas. En la primera, se evaluó la capacidad de dos ácidos (cítrico y EDTA) para lixiviar el Pb presente en agrolita, encontrando que el EDTA fue más eficiente para formar complejos solubles estables con el Pb, alcanzando porcentajes de lixiviación de hasta 100%. En la segunda etapa, se determinó la capacidad de biosorción de Pb por biomasa activa e inactiva de *Lewia* sp. y *A. niger*, encontrando que la capacidad de biosorción por biomasa inactiva fue mayor (> 30%) con respecto a la biomasa activa. Se determinó que las condiciones más eficientes para la biosorción de Pb fue a pH 6 utilizando biomasa inactiva de *A. niger*. Con base en los resultados, para la descontaminación de un soporte contaminado con Pb mediante un sistema de lixiviación-biosorción puede recomendarse, para la etapa de lixiviación, el uso de una solución de EDTA en una concentración tal que su relación estequiométrica con el plomo en la matriz sea entre 7 y 20 veces mayor. Para la etapa de biosorción, se propone ajustar a 6 el pH de la solución y emplear biomasa inactiva de *A. niger* en concentración no menor a 1 g/L, permitiendo el contacto durante al menos 30 min. Así, los resultados obtenidos sugieren que los mecanismos de lixiviación y biosorción con hongos filamentosos acoplados en un sistema integral pueden ser una estrategia de limpieza viable para biorremediar matrices sólidas contaminadas con Pb, reduciendo de esta manera su toxicidad.

(Palabras clave: Biosorción, lixiviación, hongos filamentosos, plomo).

ABSTRACT

Environmental pollution generated by immoderate growth of the industry and population is a problem affecting the planet. Pollution of water, air and soil by heavy metals constitutes one of the most severe problems. Because of that, there has been a search of new alternatives for the treatment of contaminated matrices, like chemical leaching and biosorption of heavy metals. By means of chemical leaching, metals can be extracted in an aqueous phase from contaminated solid matrices, which allow the recovering of available metals. Biosorption involves the collection of metal ions by biomass, through physical-chemical mechanisms like the adsorption or ion exchange. The use of filamentous fungal biomass as biosorbent material represents a profitable and environmentally friendly alternative. Based on the previous statement, the aim of the present study was to propose a system for remediation of contaminated solid matrices with lead, involving chemical leaching and biosorption mechanisms by using filamentous fungi. To achieve this objective, the work was divided into two stages. In the first one, the ability of two acids (citric and EDTA) to leach the present lead in perlite substrate was evaluated. It was obtained that, EDTA was more efficient to form stable soluble complexes with lead, reaching up to 100% of lead leaching. In the second stage, it was determined the biosorption capacity of the lead by active and inactive biomass of *Lewia* sp. and *A. niger*, finding that biosorption capacity by inactive biomass was higher (> 30%) compared to the active biomass. It was determined that the most efficient condition for the lead biosorption was at pH 6 using inactive biomass of *A. niger*. Based on the results, for the treatment of contaminated solid matrices with lead by means of a leaching-biosorption system, it can be recommended for the leaching stage, the use of EDTA solution in a concentration between 7 and 20 times greater of their stoichiometric relation with respect to the lead present in the matrix. For the biosorption stage, it is proposed to adjust the pH to 6 in the solution, and the use of *A. niger* inactivated biomass in a concentration of not less than 1 g / L, allowing the contact for at least 30 min. Therefore, the obtained results suggested that the mechanisms of leaching and biosorption with filamentous fungi coupled in an integral system, can be a strategy of viable cleaning for a bioremediation treatment for lead contaminated solid matrices, reducing in this way their toxicity.

(Key words: Biosorption, leaching, filamentous fungi, lead).

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
ÍNDICE	iii
ÍNDICE DE CUADROS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
I. INTRODUCCION	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Metales pesados	3
2.2 Principales fuentes de emisión y generación de plomo en México	8
2.3 Convenios internacionales y legislación en materia de metales pesados	9
2.4 Remediación de matrices contaminadas con metales	12
2.5 Biolixiviación de metales	17
2.6 Biosorción de metales	20
2.7 Contribuciones al estudio de la remediación de metales pesados	28
III. HIPÓTESIS	30
IV. OBJETIVOS	30
4.1 Objetivo general	30
4.2 Objetivos específicos	30
V. MATERIALES Y MÉTODOS	31
5.1 Estrategia experimental	31
5.2 Soporte sólido contaminado	32
5.3 Evaluación de la efectividad del ácido cítrico y EDTA en la lixiviación de plomo	32
5.4 Determinación del efecto de la concentración de plomo sobre la producción de ácido cítrico por <i>Aspergillus niger</i>	33
5.5 Cinéticas de biosorción de plomo en biomasa de <i>Lewia</i> sp y <i>A. niger</i>	35
5.6 Cinéticas de sorción y desorción	38
5.7 Métodos analíticos	40
5.8 Análisis estadísticos	42

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
6.1 Evaluación de la efectividad del ácido cítrico y EDTA en la lixiviación de plomo	43
6.2 Determinación del efecto de la concentración de plomo sobre la producción de ácido cítrico por <i>A. niger</i>	50
6.3 Cinéticas de biosorción de plomo en biomasa de <i>Lewia</i> sp. y <i>A. niger</i>	54
6.4 Recuperación del biosorbente	62
6.5 Propuesta de las condiciones más adecuadas para el acoplamiento de un sistema de lixiviación-biosorción	65
VII. CONCLUSIONES	68
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
2.1 Resumen de algunos estudios que involucran la participación de microorganismos y los mecanismos empleados para la remoción de metales en matrices contaminadas.	28
6.1 Composición química de la agrolita.	32
6.2 Composición del medio de cultivo para producción de ácido cítrico.	34
6.1 Efecto de la concentración de EDTA sobre el pH de la solución, durante la desorción de Pb a partir de agrolita contaminada, en función del tiempo de contacto a 30°C.	46
6.2 Efecto de la concentración de ácido cítrico sobre el pH, durante la desorción de Pb en agrolita contaminada, en función del tiempo de contacto a 30°C.	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
2.1	Efecto del pH del suelo en la disolución del plomo.	6
2.2	Interacciones entre metales y microorganismos.	13
2.3	Morfología microscópica de <i>Lewia</i> sp.	23
2.4	Mecanismos que contribuyen a la captación microbiana y detoxificación de metales.	25
2.5	Principios básicos involucrados en la eliminación/recuperación de metales de soluciones acuosas por biomasa microbiana.	27
6.1	Estrategia experimental.	31
6.2	Proceso experimental de biosorción para la eliminación de iones de Pb a partir de soluciones acuosas.	39
6.1	Efecto de la concentración de soluciones de EDTA (0.25, 0.50, 50, 100 y 200 mM) en la lixiviación de Pb a partir de agrolita, en función del tiempo de contacto a 30°C. Como control se usó agua meteórica a pH 5.5.	44
6.2	Efecto de la concentración de soluciones de ácido cítrico (0.20, 0.35, 50, 100 y 200 mM) en la lixiviación de Pb a partir de agrolita (1 g), en función del tiempo de contacto a 30°C. Como control se usó agua meteórica a pH 5.5.	48
6.3	Efecto de la concentración de plomo (0, 250, 500 y 1000 mg/kg de soporte seco) sobre la producción de ácido cítrico y biomasa por <i>A. niger</i> .	52
6.4	Efecto del ácido cítrico producido por <i>A. niger</i> sobre la lixiviación del Pb presente en los tratamientos con una concentración inicial de 0, 250, 500 y 1000 mg/kg de soporte seco.	53
6.5	Capacidad de biosorción de Pb por biomasa activa de <i>Lewia</i> sp y <i>A. niger</i> en función del pH de la solución. El Pb se extrajo a 30°C y 150 rpm durante 24 h.	55
6.6	Capacidad de biosorción de Pb por biomasa inactiva de <i>Lewia</i> sp y <i>A. niger</i> en función del pH inicial de la solución. El Pb se extrajo a 30°C y 150 rpm durante 24 h.	58
6.7	Capacidades de biosorción de Pb por biomasa muerta (1 g/L) de <i>Lewia</i> sp. y <i>A. niger</i> a pH 6.	60
6.8	Cinética de desorción de plomo a partir de biomasa (10 g/L) de <i>Lewia</i> sp. y <i>A. niger</i> , utilizando ácido clorhídrico (0.1 M) como solución desorbente.	63

I. INTRODUCCION

La contaminación del suelo, aire y agua por metales pesados, es uno de los problemas ambientales más severos que afecta a nuestro país desde hace muchos años. Si bien la presencia de estos contaminantes puede proceder de forma natural como producto de la actividad volcánica, la mayor parte de la contaminación por metales pesados que afecta a la población en general, ha sido generada por el hombre, resultado del empleo de prácticas agrícolas inadecuadas, diversos procesos industriales y la explotación minera (Rojas-Loria, 2010).

En México, la minería es una de las principales actividades que genera este tipo de contaminación, la cual además, es una actividad económica presente en el proceso histórico del país. La tradición minera en México se remonta a la época prehispánica, con la explotación de yacimientos ubicados principalmente en las zonas de Taxco, Pachuca, Guanajuato y Querétaro, aunque es hasta el periodo colonial cuando adquirió una gran relevancia tanto económica como social (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005). Actualmente México ocupa el tercer lugar a nivel mundial en la producción de plata (Ag), el quinto en plomo (Pb) y el sexto en molibdeno (Mo) y zinc (Zn) (INEGI, 2010). Cabe mencionar que la producción minera aporta el 1.4% del Producto Interno Bruto del país, sólo detrás de la industria petrolera, turística y de las remesas (Cámara Minera de México, 2010).

Aunque la minería ha traído grandes beneficios al país, la consecuencia derivada de varios siglos de actividad minera, ha sido la producción de una gran cantidad de residuos mineros. De acuerdo con Cortinas de Nava (1998), un mineral típico puede contener alrededor de 6% de zinc y 3 % de plomo, el cual, al ser concentrado puede generar alrededor de 850 kg de residuos sólidos y una cantidad equivalente de agua conteniendo cerca de un kilogramo de sustancias químicas residuales por cada tonelada de mineral procesado. Durante 2006, se produjeron a nivel mundial 3.3 millones de toneladas de concentrados de plomo, producto de las operaciones mineras, de los cuales el 4.2 % fueron producidas

en nuestro país, ubicándolo así en el 5° lugar entre los países que mayor contaminación genera por este concepto (USGS, 2006). Es importante mencionar que una práctica comúnmente empleada por las empresas durante muchos años fue descartar estos residuos en ríos o en grandes pilas sobre los suelos a cielo abierto, generando así problemas de contaminación en cuerpos de agua y grandes extensiones de suelos que ahora deben remediarse (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005; Rojas-Loria, 2010).

En muchos países, el cadmio, mercurio y plomo están incluidos entre los contaminantes prioritarios debido a su alta toxicidad, por lo que requieren un tratamiento adecuado antes de su liberación al medio ambiente (Rao *et al.*, 2005). Debido a la problemática de la contaminación ambiental por metales pesados, el objetivo de este trabajo es contribuir al desarrollo de una opción integral para biorremediar una matriz sólida contaminada con plomo. El trabajo se desarrolló en dos etapas: (i) se evaluó la efectividad de dos ácidos (cítrico y EDTA) para lixiviar o solubilizar el plomo presente en una matriz contaminada; (ii) se determinó la capacidad de biosorción de plomo soluble de la biomasa de dos hongos filamentosos, *Lewia* sp y *A. niger*. Con base en los resultados obtenidos, se proponen las condiciones más adecuadas para integrar un sistema de lixiviación-biosorción de plomo.

Cabe mencionar que los estudios sobre la remoción de metales pesados en el ambiente son de gran importancia en términos de contaminación, debido a sus efectos tóxicos sobre los organismos vivos. Actualmente, la comprensión de las respuestas biológicas y de los mecanismos de tolerancia y acumulación empleados por los microorganismos cuando se exponen a metales tóxicos, son herramientas que permiten proponer sistemas para la remediación de suelos y otras matrices contaminadas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Metales pesados

Los metales pesados se encuentran en forma natural en la corteza terrestre. Éstos tienen pesos atómicos altos, entre 63.5 y 200.6, y una densidad igual o superior a 5 g/cm^3 (Srivastava y Majumder, 2008). En general, el término de metal pesado se refiere a cualquier elemento químico metálico que tenga una alta densidad relativa y sea tóxico aún en concentraciones bajas. El rasgo distintivo de los metales pesados es que, aún cuando muchos de ellos son esenciales para el crecimiento, como el Na, K, Mg, Ca, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn y Mo, en cierta concentración también pueden tener efectos tóxicos sobre las células, principalmente como resultado de su capacidad para alterar o desnaturalizar proteínas (Cañizares-Villanueva, 2000).

En las últimas décadas, con el acelerado desarrollo industrial y crecimiento de las poblaciones, se han generado serios problemas de contaminación por metales pesados. Dichas actividades han provocado un incremento en la concentración de muchos metales y metaloides en el ambiente, así como su migración a suelos no contaminados, deteriorando la calidad del suelo, aire y agua (Pineda, 2004). Debido a su movilidad en los ecosistemas acuáticos naturales y a su toxicidad para las formas superiores de vida, a los iones de metales pesados presentes en los cuerpos de aguas superficiales y subterráneas, se les ha dado prioridad como los contaminantes inorgánicos más importantes en el ambiente. Aún cuando se encuentren en baja concentración, la recalcitrancia y persistencia de los metales pesados en cuerpos de agua, implica que a través de procesos naturales como la biomagnificación, su forma química puede ser altamente tóxica. Una vez en el ambiente, los metales pueden sufrir transformaciones a diferentes formas móviles y/o ser inmovilizados a través de su acomplejamiento con otros compuestos o elementos, formando sales insolubles (Cañizares-Villanueva, 2000). De cualquier manera, es importante considerar que los iones metálicos no pueden ser destruidos o degradados por ningún método y que, aún en pequeñas cantidades, se pueden incorporar a

diversos organismos a través de la ingesta de alimentos, agua potable y del aire (LENNTECH, 2010).

2.1.1 Los metales pesados en el ambiente

Los efectos de los metales en el funcionamiento de los ecosistemas varían considerablemente y tienen un significado económico y de salud pública. Los metales pesados se pueden convertir en contaminantes si su distribución en el ambiente se altera mediante actividades humanas. Así, la inadecuada disposición de residuos que los contienen también ha ocasionado la contaminación de suelos, aguas superficiales y subterráneas y de ambientes acuáticos (INE, 2010).

Las principales fuentes de metales pesados son actividades naturales, como los desgastes de cerros y erupciones volcánicas. Entre las actividades antropogénicas que contribuyen a la liberación de metales al ambiente, una de las principales es la industria minera, además de operaciones de refinación, aguas residuales, procesos nucleares y de manufactura de productos como baterías, pigmentos y colorantes, componentes eléctricos, aleaciones de metales, plaguicidas y fertilizantes (Alloway, 1990; Chaney, 1997; Ahluwalia y Goyal, 2007).

En la atmósfera, los metales liberados por fuentes de emisión como la combustión de nafta de plomo, se encuentran como material suspendido en el aire que respiramos. Por otro lado, las aguas residuales no tratadas y las provenientes de minas y fábricas, contaminan ríos y aguas subterráneas, además de que muchos desechos que contienen metales tóxicos son simplemente abandonados en el ambiente, contaminando el suelo y acumulándose en plantas y tejidos orgánicos, lo que representa un riesgo de su entrada a la cadena trófica (Liesko *et al.*, 1999; Chen, 1992).

2.1.2 Biodisponibilidad de los metales pesados

Los metales pesados son tóxicos solo si se encuentran biodisponibles para ser captados por los organismos, es decir, en un suelo éstos son los que se

encuentran solubles y adsorbidos en los sitios de intercambio. Se entiende por biodisponibilidad la cantidad de un elemento que se encuentra soluble en un medio y que es susceptible a ser absorbida por un organismo. El concepto de biodisponibilidad está estrechamente relacionado con las condiciones fisicoquímicas del ambiente, las cuales a su vez, pueden determinar la especiación y, por lo tanto, la concentración disponible de un metal tóxico (Vullo, 2003; Rojas-Loria, 2010). La especiación se refiere a la forma química en que un elemento se encuentra, ya que una forma más soluble incrementa la toxicidad de un metal. Así, la toxicidad de un metal se encuentra controlada por la concentración de la(s) forma(s) disponible(s) y no por la concentración total del metal. En otras palabras, la biodisponibilidad y la toxicidad dependen de la concentración de las diferentes formas fisicoquímicas (especiación) (Rojas-Loria, 2010).

Entre los factores que influyen en la biodisponibilidad y, por consiguiente, en la toxicidad de los metales pesados en un suelo, se encuentran: el pH, la temperatura, potencial redox, capacidad de intercambio catiónico de la fase sólida (retención en arcillas y materia orgánica) y la competencia entre iones (Rojas-Loria, 2010). El pH del suelo es el principal factor que afecta la biodisponibilidad de gran parte de los metales pesados, pues modifica el equilibrio entre la especiación metálica, solubilidad, adsorción e intercambio de iones en el suelo. En los suelos ácidos se produce una competencia entre los iones de hidrógeno (H^+) y los cationes metálicos por los sitios de intercambio. Un valor bajo de pH produce la desorción (disolución) de los metales pesados, aumentando su concentración y biodisponibilidad en los suelos (Alloway, 1995; Lasat, 2001; Rojas-Loria, 2010). Por otra parte, un elevado pH provoca que estos iones sean eliminados de la solución del suelo y queden adsorbidos en las partículas del suelo, disminuyendo así su biodisponibilidad. Con excepción del Mo, Se y As, la biodisponibilidad de los metales disminuye con el aumento del pH del suelo debido a su precipitación como hidróxidos insolubles, carbonatos y complejos orgánicos (Rojas-Loria, 2010).

Los metales como el Cu y Pb, tienden a estar más biodisponibles en suelos ácidos debido a que presentan una menor capacidad de intercambio catiónico. En este tipo de suelos, los iones hidrógeno desplazan a los cationes que normalmente se encuentran unidos a partículas como las arcillas y materia orgánica, dejando libres a los metales en la solución del suelo (Figura 2.1).

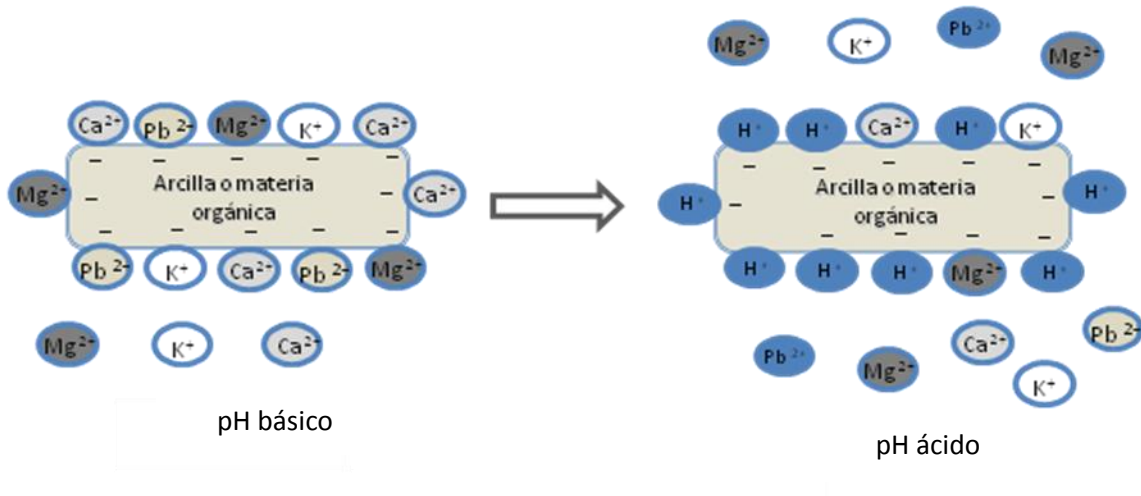


Figura 2.1 Efecto del pH del suelo en la disolución del plomo. Al disminuir el pH en el suelo los iones de hidrógeno desplazan a los cationes metálicos y minerales que se encuentran unidos a los sitios de intercambio de algunas partículas del suelo (Rojas-Loria, 2010).

2.1.3 Toxicidad de los metales pesados

Los metales pesados son especies persistentes en el ambiente, pues no pueden degradarse por vía fisicoquímica ni biológica y, una vez liberados, pueden distribuirse entre los entornos aire, agua y suelo, en ocasiones cambiando su estado de oxidación, o bien incorporándose a los seres vivos. Los organismos expuestos a estos contaminantes, tienden a acumularlos en sus tejidos, incluso en concentraciones más altas que las que normalmente se encuentran en el ambiente, por lo que la ingesta de plantas o animales contaminados puede provocar síntomas de intoxicación (Pineda, 2004).

Las características tóxicas de los metales pesados se pueden analizar desde diferentes puntos de vista, como son:

- Toxicidad a largo plazo
- Transformación a formas tóxicas bajo ciertas condiciones
- Biomagnificación a través de la cadena alimenticia, lo que pone en peligro la vida humana
- No se degradan por ningún método, incluyendo los biológicos y, finalmente
- La toxicidad por metales pesados ocurre cuando se encuentran presentes aún en bajas concentraciones (entre 1 a 10 mg/L)

Algunos metales como el mercurio y el cadmio son muy tóxicos, incluso en concentraciones del orden de 0.001 a 0.1 mg/L (Cuizano y Navarro, 2008). La toxicidad de los metales pesados es muy alta con respecto a los metales en general. Su acción sobre los seres vivos ocurre a través del bloqueo de las actividades biológicas, es decir, la inactivación de enzimas debido a la formación de enlaces entre los iones metálicos y los grupos sulfhidrilo (-SH) de las proteínas, causando daños irreversibles en los organismos (Vullo, 2003). La exposición de seres humanos a los metales pesados, causa una amplia gama de enfermedades, entre las que destacan: enfermedad de Minamata (Hg), Itai-Itai (Cd), cáncer, anemia, daños hepáticos, renales, pulmonares y en vías respiratorias.

Dentro del estudio de los metales pesados, existe un creciente interés por el plomo, debido a que se encuentra ampliamente distribuido como producto de las actividades asociadas con el hombre y, particularmente en México, se encuentra entre los principales contaminantes. El Pb, es un metal de color azul grisáceo, blando, maleable y dúctil, que se encuentra en forma natural en pequeñas cantidades (0.002%) en la corteza terrestre. Tiene un número atómico de 82 y un peso atómico de 207.2. El Pb se encuentra ampliamente distribuido en el ambiente, del cual, la mayor parte proviene de actividades como la minería, donde se obtiene como coproducto o subproducto en las minas de plata y zinc, de la manufactura industrial y de la quema de combustibles fósiles. Este metal

tiene muchos usos; por ejemplo, se utiliza en grandes cantidades para la fabricación de baterías, en el revestimiento de cables eléctricos, redes de tuberías, tanques, aparatos de rayos X, se usa como blindaje protector de materiales radiactivos y en compuestos como pinturas y pigmentos. Una vez que entra en el medio ambiente, sus compuestos son transformados por la luz natural, el aire y el agua. Cuando se libera al aire, puede movilizarse largas distancias antes de depositarse en el suelo, en donde se adhiere a las partículas (ATSDR, 2007; Cámara Minera de México, 2010).

El plomo es altamente tóxico, ya que ingerido o inhalado puede afectar a casi todos los órganos y sistemas en el cuerpo. El blanco más sensible es el sistema nervioso, tanto en niños como en adultos. También puede producir debilidad en los dedos, las muñecas o los tobillos, aumento en la presión sanguínea y anemia. En niños, el plomo puede causar serios dolores de estómago, disminución de la inteligencia, debilidad muscular y daño cerebral (ATSDR, 2007).

2.2 Principales fuentes de emisión y generación de plomo en México

El plomo puede ser liberado al ambiente por fuentes tanto naturales como antropogénicas. Cabe señalar que al comparar las emisiones globales, la emisión de elementos como selenio, mercurio y manganeso son, en su mayoría, por fuentes naturales. Sin embargo, en el plano regional, las fuentes antropogénicas pueden contribuir de manera importante y estos metales se convierten en contaminantes en la escala local (INE, 2010).

Como contaminante ambiental, el Pb normalmente se encuentra en su forma elemental, como óxidos e hidróxidos y como complejos oxianiónicos. Este metal tiene valencias +2 y +4, de las cuales el Pb(II) es la forma más común y reactiva. Cuando forma complejos con ligandos orgánicos (ácidos húmicos y fúlvicos) o inorgánicos (Cl^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , PO_4^{3-}), se forman compuestos poco solubles. El carbonato de plomo, formado a pH menor a 6, y el sulfuro de plomo son las formas sólidas más estables de este metal (Volke-Sepúlveda *et al.*,

2005). En México, entre las principales fuentes de emisión de plomo se encuentran las siguientes (INE, 2010):

- Fundición primaria y secundaria de metales
- Loza vidriada
- Producción de pinturas
- Elaboración de latas soldadas con plomo
- Industria electrónica y de cómputo
- Uso de gasolina con plomo

Otras fuentes de contaminación por Pb incluyen también el procesamiento y producción secundaria de metales, la manufactura de baterías de plomo y la de pigmentos y químicos. La contaminación atmosférica por el uso del Pb en gasolinas (como tetraetilo de plomo) también ha sido de importancia. La mayor parte del Pb liberado en el ambiente es retenido por el suelo; los principales procesos que dictan su destino en éste incluyen la adsorción, el intercambio iónico, la precipitación y el acomplejamiento con materia orgánica (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005).

El plomo es un elemento comúnmente obtenido como un coproducto o subproducto en las minas de plata y de zinc, razón por la cual su producción es fuertemente dependiente del comportamiento de estos metales. Debido al incremento en la producción mundial de zinc, el plomo también vio un incremento de 6.6% en su producción, alcanzando una producción de 3.6 millones de toneladas en 2008, ubicando a México en la quinta posición mundial, con una participación de 3.6% (Cámara Minera de México, 2010).

2.3 Convenios internacionales y legislación en materia de metales pesados

México ha tenido una participación importante en convenios internacionales en materia de protección ambiental, de donde se han derivado diversos compromisos y oportunidades para el control de la contaminación por metales pesados. Algunos de estos convenios son:

Convenio de Basilea, 1989. Cuyo objetivo principal es regular los movimientos transfronterizos de materiales y residuos peligrosos.

Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE), 1990.

En este año, el Consejo de la OCDE adoptó la Decisión-Recomendación para la cooperación en la investigación y la reducción de riesgos de las sustancias químicas existentes. Aquí se trata la reducción de riesgos de sustancias químicas al ambiente, o que dañen la salud de poblaciones o trabajadores.

Grupo de Trabajo para la Selección de Sustancias Químicas de la Comisión de la Cooperación de América del Norte, 1995. Este grupo de trabajo, el cual

forma parte del Grupo de Trabajo de Manejo Adecuado de Sustancias Químicas (MASQ), está trabajando para incluir al plomo como elemento para el cual se tomen acciones para su control en Canadá, Estados Unidos y México.

Declaración para la Reducción de Riesgos por Plomo, 1996. Esta declaración fue adoptada por los gobiernos de los países miembros de la OCDE en la reunión del Comité de Políticas Ambientales a nivel Ministerial (INE, 2010).

Si bien, estos convenios han permitido un incremento en la toma de conciencia acerca del peligro que representa para el ambiente y los seres humanos la contaminación por metales pesados, y han establecido estrategias para reducir los riesgos y darles un manejo ambientalmente adecuado, también es cierto que aún falta mucho por hacer ya que se requiere de una mayor participación para cumplir con las disposiciones acordadas y reconocer las limitaciones que aún existen para hacer cumplir la ley.

De manera particular, en México, la escasa regulación existente en materia de remediación de suelos contaminados ha contribuido en la aparición de sitios afectados por metales pesados. Debido a los problemas que esto representa, se han establecido Normas Oficiales Mexicanas (NOM) que regulan la concentración de metales pesados y otros contaminantes en suelos y efluentes de aguas residuales que se descargan en cuerpos de agua.

1. **NOM-001-Semarnat-1996**, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes

nacionales. En esta NOM se consideran como contaminantes elementos como el arsénico, cadmio, cobre, cromo, mercurio, níquel, plomo y zinc, que en concentraciones por encima de determinados límites pueden producir efectos negativos en la salud humana, flora o fauna.

2. **NOM-002-Semarnat-1996**, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal. En esta NOM se regulan contaminantes como grasas y aceites, y elementos como arsénico, cadmio, cobre, cromo, mercurio, níquel, plomo y zinc.
3. **NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004**, que establece los criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio.

La observancia de dichas NOM corresponden a la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), a través de dependencias como la Comisión Nacional de Agua (CONAGUA) y la Procuraduría Federal de Protección Ambiental (PROFEPA), así como a los gobiernos estatales y municipales, cuya responsabilidad es la de realizar los trabajos de inspección y vigilancia necesarios.

En junio de 2004 se publicó un reglamento para el Registro de Emisiones y Transferencia de Contaminantes, con el propósito de conocer los niveles de contaminantes que emiten las empresas de los sectores público y privado. A pesar del compromiso que adquirió la industria de establecer dicho registro, se considera que aún no se cuentan con los resultados exactos y se desconocen las características reales de esta contaminación, ya que en ocasiones se opta por ocultar la información (Norandi, 2005).

2.4 Remediación de matrices contaminadas con metales

A la fecha se han empleado diversas tecnologías de remediación para la recuperación de suelos, efluentes y otras matrices contaminadas con metales pesados, estos generalmente se dividen en dos grandes grupos: las tecnologías fisicoquímicas y las tecnologías biológicas.

2.4.1 Tecnologías fisicoquímicas

Los tratamientos fisicoquímicos utilizan las propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes o del medio contaminado para transformar, separar o inmovilizar el contaminante. Son tratamientos económicamente factibles y la mayoría se encuentra disponible comercialmente, motivo por el cual son las técnicas más empleadas para la remediación de diferentes matrices contaminadas con residuos peligrosos desde hace décadas. Estas tecnologías involucran una variedad de procesos como la filtración, neutralización, precipitación, oxidación/reducción, sorción, evaporación y floculación, entre otros. Algunos de estos procesos pueden emplearse para el tratamiento de suelos contaminados con elementos potencialmente tóxicos, como la oxidación/reducción (transformación), lavado de suelos (separación) y solidificación/ extracción (inmovilización) (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005).

La principal desventaja de la aplicación de este tipo de tecnologías en la remediación de sitios contaminados radica en que, la mayoría requiere de la excavación del suelo y de al menos un proceso secundario de tratamiento o disposición final del contaminante transformado, separado o inmovilizado, lo que incrementa los costos del tratamiento (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005). En el tratamiento de aguas, estas tecnologías pueden llegar a ser costosas e ineficientes, especialmente cuando la concentración de los metales en la solución es baja (de 1-100 mg/L). También puede haber producción de lodos químicos tóxicos con altas concentraciones de metales, lo que las hace no amigables con el ambiente (Ahluwalia y Goyal, 2007; Cañizares-Villanueva, 2000).

2.4.2 Tecnologías biológicas

Actualmente los métodos biológicos son una alternativa técnica y económicamente factible a las tecnologías fisicoquímicas. Los métodos biológicos, conocidos en su conjunto como biorremediación, tienen como objetivo el empleo de procesos naturales para la recuperación de sitios contaminados con el fin de disminuir el impacto de los contaminantes en el ambiente. La biorremediación implica el aprovechamiento de la capacidad metabólica de organismos vivos como plantas, hongos y bacterias, entre otros, para limpiar ambientes contaminados (Rojas-Loria, 2010).

Se ha demostrado que es posible llevar a cabo la remediación *in situ* de sitios contaminados con metales por vía microbiana, esto se ha conseguido básicamente, a través de cambios en el estado redox del elemento contaminante, favoreciendo así mecanismos que modifican la solubilidad, movilidad y/o toxicidad (Figura 2.2), esto hace posible la remediación del suelo a través de la separación o la disolución del contaminante (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005).

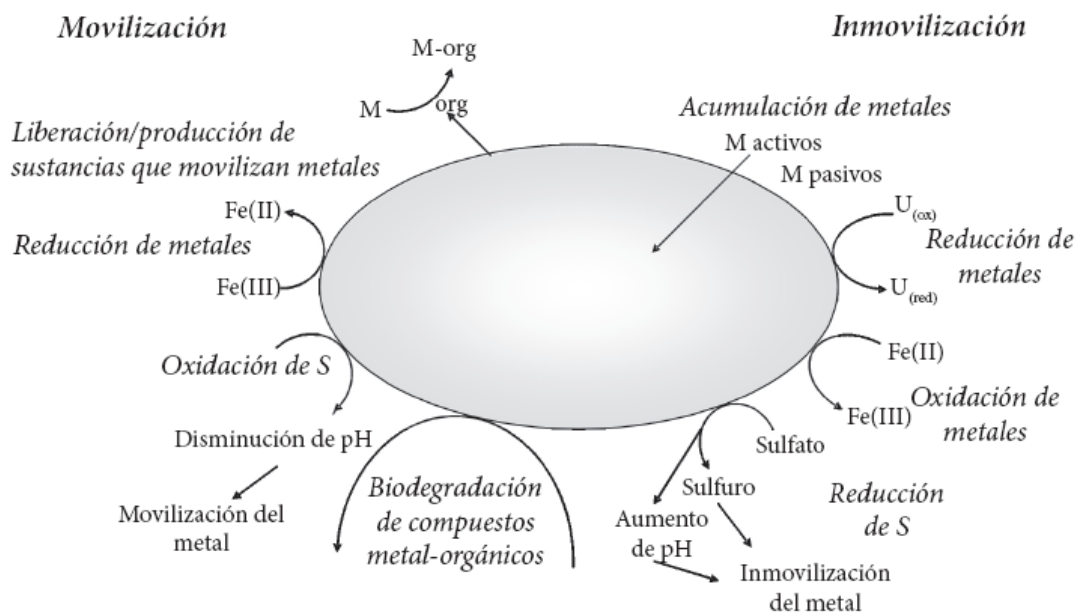


Figura 2.2 Interacciones entre metales y microorganismos. Fuente: Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005.

Los mecanismos por los cuales los microorganismos interactúan con los metales son diversos. En la Figura 2.2, se muestran algunos de los procesos que tienen lugar, como son: a) sorción o acumulación de metales mediante mecanismos pasivos (M pasivos) o activos (M activos); b) transformación de ciertos metales por procesos redox o por alquilación, afectando su movilidad y/o toxicidad; c) producción microbiana y liberación de sustancias (ej. sulfuros) que alteran la movilidad de muchos metales; d) degradación microbiana de complejos metal-orgánicos (M-org) que pueden cambiar la especiación del metal (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005).

Con base en lo anterior, las metas de la biorremediación de contaminantes inorgánicos pueden alcanzarse de acuerdo con los siguientes principios: (i) la precipitación del contaminante y, en consecuencia, su inmovilización; (ii) la concentración del contaminante con la posterior reducción del volumen de la matriz contaminada; y (iii) la separación de metales a un ambiente en donde su riesgo potencial se reduzca (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005). Estos métodos tienen tres principales ventajas que son: (i) realización *in situ*, (ii) suelen ser ambientalmente amigables pues generalmente no hay contaminantes secundarios, y (iii) son rentables (Vijayaraghavan y Yun, 2008).

Dentro de los métodos biológicos, cabe destacar el uso de la biolixiviación y la biosorción como alternativas interesantes que permiten la remoción de los metales del suelo, son técnicas basadas en el aprovechamiento de la capacidad de los microorganismos para acumular y/o estabilizar este tipo de contaminantes. A continuación se describe cada una de dichas técnicas.

2.4.2.1 Movilización microbiana de metales: biolixiviación

La movilización microbiana de metales y metaloides incluye procesos de biolixiviación y cambios en el estado redox (oxidación de formas metálicas reducidas insolubles a formas solubles), que favorecen la disolución o volatilización de los mismos. La biolixiviación puede definirse como la capacidad de ciertos microorganismos para liberar metales a partir de compuestos químicos (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005; Suárez y Reyes, 2002).

En la industria minera, la disolución de metales es un mecanismo ampliamente usado para movilizar metales presentes en minerales (Rodríguez-Luna, 2009). Mediante este proceso, los metales pueden ser extraídos en fase acuosa, con lo cual es posible su recuperación a partir de materiales sólidos contaminados como suelos, cenizas resultantes de la quema de desechos y sedimentos. Puede llevarse a cabo en condiciones aerobias o anaerobias, así como en ambientes ácidos o alcalinos (Vullo, 2003).

El principio de la biolixiviación puede aplicarse para el bio-beneficio, un proceso en el que un mineral se enriquece en cuanto al contenido de sus componentes metálicos de valor por la remoción selectiva de componentes indeseables (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005).

2.4.2.2 Inmovilización microbiana de metales

La inmovilización microbiana puede definirse como la capacidad que presenta la biomasa para atrapar metales, uniéndolos a sus componentes estructurales. Implica mecanismos de biosorción (sorción del contaminante en biomasa) y cambios en el estado redox (reducción de formas metálicas oxidadas solubles a formas insolubles). Esta capacidad, que se utiliza para recuperar metales de matrices contaminadas, depende de las propiedades físicas, químicas y biológicas de la biomasa microbiana (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005; Suárez y Reyes, 2002).

Dentro de la diversidad microbiana, existen microorganismos resistentes y otros tolerantes a los metales. Los resistentes se caracterizan por poseer mecanismos de detoxificación codificados genéticamente, inducidos por la presencia del metal. En cambio, los tolerantes no se ven afectados por la presencia del metal. Ambos tipos de microorganismos son de interés como captadores de metales en sitios contaminados debido a que ambos pueden extraer los contaminantes mediante mecanismos como: biosorción, precipitación (precipitación reductora y biomineralización) y bioacumulación (Vullo, 2003; Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005). A continuación se detalla cada uno de estos mecanismos.

Biosorción. Es una propiedad de la biomasa, en particular la microbiana, para captar y concentrar metales incluso de soluciones acuosas muy diluidas. La biomasa que presenta esta propiedad actúa como una sustancia química o como un intercambiador de iones de origen biológico. Es particularmente la estructura de la pared celular de ciertas algas, hongos y bacterias, la que se considera responsable de este fenómeno (Ahluwalia y Goyal, 2007). La biosorción se caracteriza por la retención de un metal mediante una interacción fisicoquímica con ligandos presentes en la superficie celular. Esta interacción ocurre con grupos funcionales en el exterior celular que forman parte de moléculas que componen las paredes celulares, como grupos carboxilo, amino, hidroxilo, fosfato y sulfhidrilo (Cuizano y Navarro, 2008).

Precipitación. La mayoría de las transformaciones de metales mediadas por microorganismos, incluyendo la oxidación-reducción y alquilación-desalquilación, no tiene funciones biológicas conocidas. Éstas ocurren a través de procesos cuyas funciones primarias no están relacionadas con la transformación de metales, pero que alteran su solubilidad, movilidad y toxicidad y, por lo tanto, pueden usarse como estrategias de remediación. Entre los mecanismos de precipitación, se distinguen la precipitación reductora y la biomineralización (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005).

- a) **Precipitación reductora.** Este mecanismo permite a los microorganismos reducir la movilidad y/o toxicidad de un metal o metaloide, a través de su reducción a un estado redox más bajo. Muchos de los organismos que catalizan estas reacciones utilizan los metales o metaloides como aceptores de electrones durante su respiración anaerobia, reduciendo formas oxidadas altamente solubles a formas elementales (reducidas) insolubles, dando como resultado la detoxificación y/o precipitación del contaminante.
- b) **Biomineralización.** Implica la formación de precipitados metálicos insolubles por interacciones con productos del metabolismo microbiano tales como: sulfuros, carbonatos y fosfatos. La biomineralización de metales

y metaloides en forma de minerales de azufre, hidróxido, fosfato y carbonato tiene aplicaciones potenciales para biorremediación.

Bioacumulación. Este proceso puede definirse como la absorción de sustancias tóxicas por células vivas. Ciertos elementos o sustancias tóxicos pueden ser transportados al interior de la célula y acumularse intracelularmente a través del ciclo metabólico (Malik, 2004). Este mecanismo involucra un sistema de membrana que captura al metal presente en el entorno celular, implicando un gasto de energía, a través del sistema H^+ -ATPasa. Una vez incorporado al citoplasma, el ión metálico es secuestrado por proteínas ricas en grupos sulfhidrilo llamadas metalotioneinas, o puede ser compartimentalizado dentro de la vacuola, como ocurre en los hongos (Vullo, 2003).

2.5 Biolixiviación de metales

La biorremediación de suelos contaminados con metales por lixiviación microbiana o biolixiviación es una tecnología relativamente nueva, simple y efectiva, utilizada para extraer metales de minerales y concentrados que los contienen (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005). La biolixiviación ocurre a través de la liberación de compuestos orgánicos, como ácidos carboxílicos o sideróforos, que acomplejan y solubilizan metales. Los sideróforos son péptidos con capacidad acomplejante que son liberados al medio por algunos hongos y bacterias para facilitar la captación de Fe, el cual es un importante oligoelemento dentro del metabolismo celular (Vullo, 2003).

Algunos microorganismos heterótrofos, como los hongos filamentosos, han demostrado tener potencial para la biolixiviación de metales (biolixiviación heterotrófa) (Ren *et al.*, 2009). En la lixiviación heterótrofa, la extracción de metales se lleva a cabo principalmente por hongos, en un proceso mediado por la producción de ácidos orgánicos y compuestos quelantes (moléculas que presentan dos o más átomos donantes que se coordinan simultáneamente a un ión metálico para formar una estructura de anillo) y acomplejantes (moléculas que presentan un átomo donante coordinado a un ión metálico en una sola posición)

excretados al medio, que proveen una fuente de protones y aniones que acomplejan metales (Skoog, 2001).

Entre las ventajas de la biolixiviación para la remediación de materiales y matrices contaminadas con metales pesados se encuentran: (a) sus bajos costos en capital y energía; (b) su flexibilidad operativa, debido a que puede llevarse a cabo *on site* sin causar contaminación ambiental, y (c) la remoción de contaminantes del suelo puede disminuir significativamente los costos de disposición permitiendo la recuperación de metales preciosos (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005).

2.5.1 Microorganismos usados para biolixiviación

En la actualidad se sabe que el proceso de biolixiviación de metales puede llevarse a cabo por un gran número de microorganismos, entre los que se encuentran bacterias, hongos y levaduras. Por ejemplo, la recuperación de metales a partir de minerales de azufre o de hierro, se basa en la actividad de bacterias quimiolitótrofas como *Thiobacillus ferrooxidans*, *T. thiooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans*, las cuales oxidan hierro y azufre, convirtiendo los sulfuros metálicos insolubles (S^0) a sulfatos solubles y ácido sulfúrico. Esta disolución hace que los metales puedan recuperarse fácilmente de ambientes contaminados y suelos superficiales (Volke- Sepúlveda *et al.*, 2005). Otros géneros bacterianos estudiados incluyen *Serratia*, *Pseudomonas* y *Bacillus*, los cuales son capaces de disolver metales presentes en matrices sólidas mediante la producción de ácidos orgánicos e inorgánicos (Suárez y Reyes, 2002).

En el suelo, la biolixiviación mediada por hongos (heterótrofa) ha resultado ser más efectiva que la mediada por bacterias (autótrofa). La biolixiviación heterótrofa puede influir también sobre otras tecnologías de tratamiento para suelos contaminados, a través de la translocación fúngica de ciertos metales como Cs, Zn y Cd, lo que puede conducir a su separación y concentración en regiones específicas del micelio y/o cuerpos fructíferos (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005).

Los géneros de hongos más estudiados han sido *Aspergillus* y *Penicillium*, debido a su capacidad para biolixiviar metales, generalmente mediante la producción de aminoácidos y ácidos orgánicos. Particularmente *A. niger* se ha usado ampliamente en procesos de biolixiviación, en donde se ha demostrado que ácidos como cítrico, oxálico, málico y glucónico, permiten la movilización de los metales presentes en minerales, residuos sólidos, suelos y otras matrices contaminadas (Ren *et al.*, 2009). *Trichoderma harzianum* es otro hongo que se ha empleado por su capacidad para liberar compuestos orgánicos capaces de acomplejar y solubilizar MnO_2 , Fe_2O_3 y Zn metálico (Vullo, 2003).

2.5.2 Biolixiviación de metales por *Aspergillus niger*

A. niger es un hongo filamentoso de la división *Deuteromycota* u hongos imperfectos, que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Es uno de los microorganismos más importantes empleados en procesos biotecnológicos. Se utiliza comercialmente debido a su capacidad para producir ácido cítrico y otros ácidos con menos importancia comercial, como fumárico y oxálico. Estos ácidos son conocidos como agentes lixiviantes que pueden emplearse para la solubilización de Al, Fe, Mn, Ni, Pb, Cd, Cu y Zn (Schuster *et al.*, 2002; Ren *et al.*, 2009).

Varios trabajos reportan la rentabilidad y eficacia de *A. niger* para producir ácidos orgánicos y su relación con la lixiviación de metales. Por ejemplo, Anjum *et al.* (2010), emplearon los ácidos orgánicos producidos por *A. niger* para biolixiviar iones de Cu, Zn y Co del esquisto negro (piedra negra), un mineral de baja ley. En este estudio demostraron que la efectividad de los ácidos para solubilizar los iones metálicos, se mejoró con la adición al medio de ácido sulfúrico, así como de diferentes residuos agrícolas (cáscara de mango, salvado de arroz y glucosa empleados como sustratos). Ren *et al.* (2009), llevaron a cabo la biolixiviación de metales presentes en un suelo contaminado de una zona industrial, utilizando principalmente ácidos orgánicos como ácido glucónico, cítrico, oxálico y málico, producidos por *A. niger*. Este grupo demostró que los ácidos orgánicos son efectivos para la solubilización de metales como Cu, Cd,

Pb y Zn. Mulligan *et al.* (2004), mediante el empleo de *A. niger*, desarrollaron una técnica económica y factible para recuperar Cu, Zn y Ni de minerales de baja ley. Este grupo consiguió optimizar la efectividad de los ácidos orgánicos producidos por *A. niger*, al agregar ácido sulfúrico y residuos agrícolas como cáscaras de papa y sacarosa al medio.

A. niger también se ha empleado para movilizar el Pb de la pirimorfita, $Pb_5(PO_4)_3Cl$, donde una vez disuelto, puede ser acumulado por medio de plantas que crecen en suelos contaminados con dicho mineral (Vullo, 2003). En el presente trabajo, se evaluó la capacidad de *A. niger* para producir ácido cítrico, el cual fue empleado como un agente lixivante para disolver en solución acuosa, el plomo presente como contaminante en un soporte sólido.

2.6 Biosorción de metales

La biosorción es la separación pasiva de metales y metaloides por interacciones con material biológico vivo o muerto y es, hasta ahora, el acercamiento más práctico y ampliamente usado para la biorremediación de aguas contaminadas con metales. Implica mecanismos fisicoquímicos por los que las especies metálicas son sorbidas y/o acomplejadas en biomasa o productos microbianos. Los procesos de biosorción son, esencialmente, pseudo-procesos de intercambio iónico en los cuales, los iones metálicos son intercambiados hacia componentes de carga opuesta unidos a la biomasa o a una resina. En general, depende del pH del líquido y de las características químicas del metal. La pared celular de ciertas algas, hongos y bacterias, es considerada como responsable de este fenómeno (Ahluwalia y Goyal, 2007; Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005). Entre los componentes de la superficie celular que actúan como biosorbentes, se encuentran polímeros estructurales (polisacáridos y glicoproteínas como glucano, quitina, manano y fosfomanano) y extracelulares con grupos funcionales (carboxilo, amino, hidroxilo, fosfato y sulfidrilo) que interactúan con los metales, atrapándolos dentro de su estructura. En general, la pared celular de los hongos se considera como un sistema de dos fases compuesta de un esqueleto de quitina embebida en una matriz amorfa de

polisacáridos, donde la quitina es un componente importante en la captación de metales (Ahluwalia y Goyal, 2007; Suárez y Reyes, 2002).

El proceso de biosorción involucra una fase sólida (sorbente o biosorbente) y una fase líquida (solvente) que contiene las especies disueltas que van a ser sorbidas (sorbato, i.e. iones metálicos). Debido a la gran afinidad del sorbente por las especies del sorbato, este último es atraído hacia el sólido y enlazado por diferentes mecanismos. Este proceso continúa hasta que se establece un equilibrio entre el sorbato disuelto y el sorbato enlazado al sólido. Así, la afinidad del sorbente por el sorbato determina su distribución entre las fases sólida y líquida. La calidad del sorbente está dada por la cantidad del sorbato que puede atraer y retener en forma inmovilizada (Karnika *et al.*, 2007).

Actualmente, la biosorción se ha evaluado principalmente como una estrategia para la remoción de metales de corrientes de residuos y para el tratamiento de aguas, pero es un proceso con aplicaciones promisorias para la concentración de metales en suelos. Al respecto, se ha sugerido que la estimulación del crecimiento de microorganismos nativos con capacidad para la biosorción de metales es una estrategia útil para inmovilizar metales en suelos y así evitar la contaminación de cuerpos de agua (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005).

Entre las ventajas de la biosorción se encuentran: a) la recuperación selectiva de metales valiosos en bajas concentraciones; b) la disminución de la concentración de metales en efluentes, permitiendo el cumplimiento de regulaciones de calidad del agua; c) es una tecnología económica, que requiere poco capital y tiene bajos costos de operación; d) los metales absorbidos se pueden recuperar de forma eficiente minimizando la generación de residuos y, e) puede emplearse como material biosorbente la biomasa de desecho generada en procesos de fermentación a gran escala (Suárez y Reyes, 2002).

2.6.1 Biosorbentes

Se ha investigado una gran cantidad de materiales para su uso como biosorbentes en la eliminación de contaminantes metálicos y orgánicos. Estos materiales proceden principalmente de biomasa de bacterias (ej. *Bacillus*

subtillis), hongos (ej. *Rhizopus arrhizus*), levaduras (ej. *Saccharomyces cerevisiae*) y algas (ej. *Sargassum nodosum*), así como de desechos agro-industriales (ej. residuos de lignina procedente de la industria papelera y residuos de paja de avena) y de ciertos polisacáridos (ej. quitina) (Vijayaraghvan y Yun, 2008; Wang y Chen, 2009). Otros materiales que pueden ser usados como biosorbentes de metales, incluyen el corcho, hueso de oliva, quitosano, el raspo de uva (residuo procedente de la industria vinícola), lana, arroz, cáscaras y fibras de coco y nuez, residuos de té, salvado de arroz, cáscaras de soya, semillas de algodón y semillas de mostaza (Karnika *et al.*, 2007; Torres y Juvina, 2005).

En los últimos años, la biomasa procedente de algas marinas es un grupo de biosorbentes que ha cobrado impulso; algunas especies de algas cafés, como *Ascophyllum* y *Sargassum*, han sido utilizados como material biosorbente en la remoción de Pb y Cd a partir de soluciones muy diluidas, en donde estas algas pueden acumular más de 30% (peso seco) del metal en la biomasa (Vijayaraghavan y Yun, 2008; Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005; Wang y Chen, 2009).

Los hongos se han empleado como potentes biosorbentes de iones metálicos, ya que su biomasa puede atraerlos y acumularlos; esta característica es el resultado de reacciones metabólicas y de la captura debido a la constitución química de las células y sus constituyentes (Vijayaraghavan y Yun, 2008). Se ha reportado que el micelio de hongos de uso industrial, como *Rhizopus* y *Absidia*, son excelentes biosorbentes de metales como Pb, Cd, Cu y Zn y también tienen la capacidad para atrapar otros metales pesados hasta en un 25% del peso seco de la biomasa (Volesky y Holan, 1995). Por ejemplo, Goyal *et al.* (2003), estudiaron la biosorción de iones de Cr(VI) y Fe(III) empleando tres diferentes microorganismos, *Streptococcus equisimilis* (bacteria), *Saccharomyces cerevisiae* (levadura) y *Aspergillus niger* (hongo). Este grupo demostró que *A. niger* fue el más eficiente en la biosorción de mayores concentraciones de Cr(VI) en comparación con los otros microorganismos. En otro estudio realizado por Say *et al.* (2001), empleando micelio del hongo

Phanerochaete chrysosporium como biosorbente para remover iones de Cd(II), Pb(II) y Cu(II) presentes en un agua residual artificial, obtuvieron que este hongo remueve eficientemente los iones metálicos a un pH de 6. Otro género fúngico que ha mostrado capacidad para biosorber metales como el plomo es *Lewia* sp. Rojas-Loria (2010), demostró que esta cepa tiene una alta capacidad para tolerar (hasta 500 mg/L) y acumular Pb a partir de una sal soluble ($Pb(NO_3)_2$) y una insoluble (PbS). En dicho estudio se encontró que la cepa tiene una capacidad sobresaliente para acumular plomo, ya que se alcanzaron valores mayores a 100 mgPb/g (peso seco) para concentraciones de 500 mgPb/L, independientemente de la solubilidad de la fuente de Pb.

El género *Lewia* (Ascomycota) fue descrito por primera vez en 2003 por Kwaśna y Kosiak, y comprende cuatro especies, todas asociadas con anamorfos de *Alternaria*: *L. ethzedia*, *L. infectoria*, *L. photistica* y *L. scrophulariae* (Simmons 1986). En la Figura 2.3, se muestra una imagen de la morfología microscópica del hongo filamentoso *Lewia* sp.

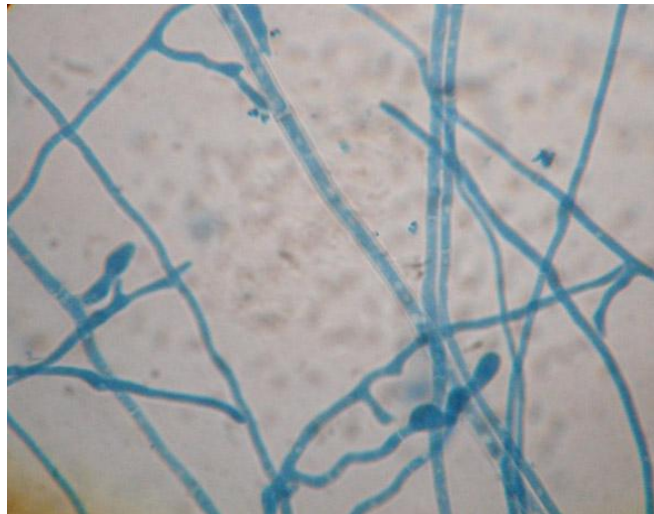


Figura 2.3 Morfología microscópica de *Lewia* sp. Imagen proporcionada por el Laboratorio de Residuos Sólidos de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

A continuación se describen los principales mecanismos involucrados en la biosorción de metales por biomasa microbiana.

2.6.2 Mecanismos involucrados en la biosorción de metales por biomasa microbiana

En la Figura 2.4 se muestran los mecanismos que contribuyen a la captación microbiana y detoxificación de metales. Cuando un hongo filamentoso entra en contacto con un contaminante como los metales, se activan mecanismos que le permiten tolerar su presencia. Estos mecanismos, que inciden directamente sobre la detoxificación de los metales, se clasifican en extracelulares e intracelulares. Los mecanismos extracelulares participan evitando la entrada de los metales al interior de la célula, mientras que la función de los mecanismos intracelulares es reducir la toxicidad de estos iones en el interior de las células (Bellion *et al.*, 2006; Gadd, 1993).

I) Mecanismos intracelulares. Los mecanismos intracelulares le infieren a algunos hongos la capacidad para tolerar la presencia de metales pesados. Al interior de la célula se han encontrado metalotioneinas (MT), una familia de proteínas de bajo peso molecular con un alto contenido de grupos sulfhidrilo, que pueden unirse a iones metálicos formando complejos metalotioneina-metal (MT-M). Las MT actúan como transportadores de metales, los cuales son enviados a compartimentos en el interior de la célula, como la vacuola, o hacia el exterior, como la pared celular. Las MT desempeñan funciones importantes en el mantenimiento de las condiciones de homeostasis tanto de elementos traza como de metales tóxicos (Rojas-Loria, 2010).

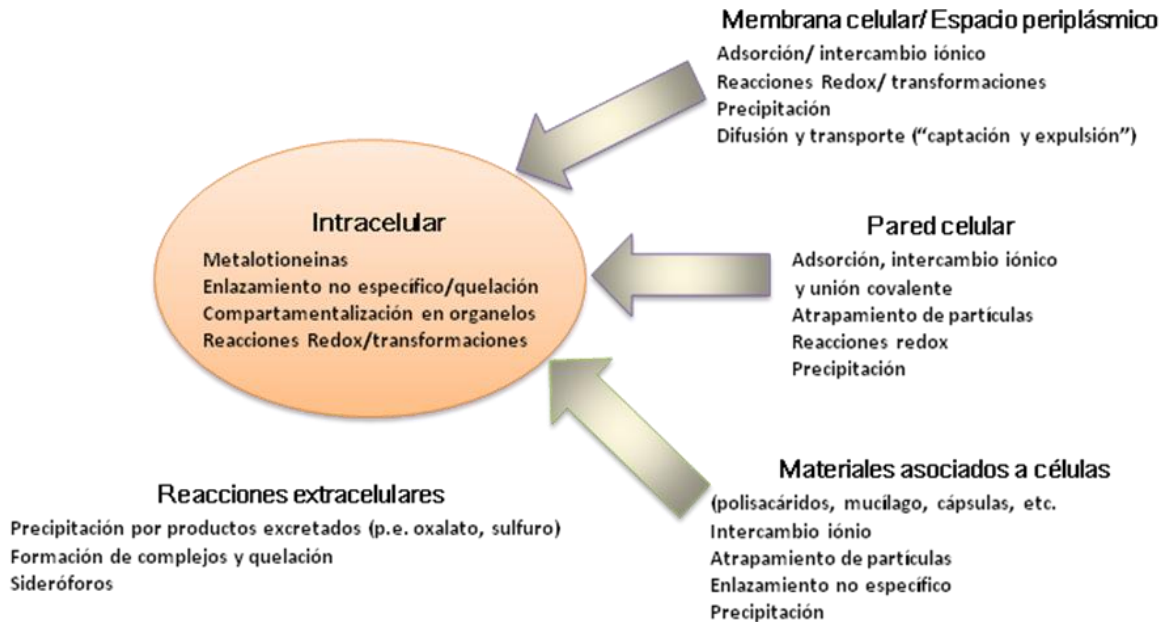


Figura 2.4 Mecanismos que contribuyen a la captación microbiana y detoxificación de metales. Fuente: Cañizares-Villanueva, 2000.

Otro componente en el interior de las células fúngicas es el glutati6n (GSH), un tiol no proteico con muy bajo potencial redox involucrado en procesos celulares, que juega un papel importante en respuesta a diversas situaciones de estr6s en el hongo. El GSH actúa quelando y secuestrando los iones metálicos que penetran en el citoplasma, con lo cual se logra reducir los efectos dañinos producidos por metales t6xicos. Tambi6n se han observado mecanismos antioxidantes de tolerancia a metales pesados en los hongos, a trav6s de la acci6n de enzimas oxido-reductasas como las tioredoxinas. Recientemente se ha observado que las tioredoxinas contribuyen a mantener las condiciones redox de homeostasis en respuesta a condiciones de estr6s oxidativo y reductor (Rojas-Loria, 2010).

II) Mecanismos extracelulares. Uno de los principales mecanismos extracelulares que se conoce en los hongos para evitar la entrada de metales a su interior, es su capacidad para producir ácidos orgánicos en respuesta al

contacto de sus hifas con los metales tóxicos. Ácidos como el cítrico y láctico, son excretados por las células fúngicas y actúan como quelantes de iones metálicos. Estos ácidos actúan como fuente de protones, lo cual interviene en la disolución de minerales metálicos que son posteriormente acumulados en compartimentos específicos de las células, como la vacuola.

Se ha encontrado también que los hongos presentan algunos mecanismos pasivos que no dependen directamente de su actividad metabólica. Lo anterior ha sido demostrado con el uso de biomasa muerta de muchos hongos, la cual se ha usado de manera exitosa como biosorbente. Esto se debe a que la pared celular de las hifas, en donde ocurre el contacto inicial con los metales, está compuesta principalmente por quitina, glucanos y polímeros de galactosamina, además de proteínas que actúan como sitios potenciales de unión para los iones metálicos. La presencia de pigmentos como la melanina puede también aumentar la capacidad de biosorción. Estos compuestos, presentes en la pared celular de los hongos, contienen un gran número de sitios potenciales de unión como los grupos fosfato, mercapto, hidroxilo, amino y carboxilos libres, generalmente con cargas negativas que atraen a los cationes metálicos (Rojas-Loria, 2010).

2.6.3 Recuperación de metales por biosorción

Las fuentes de metales no son renovables y las reservas naturales están siendo consumidas, por lo tanto, se requiere que aquellos considerados como peligrosos desde el punto de vista ambiental, o los de importancia tecnológica y valor económico, podrían ser eliminados y/o recuperados de las matrices en las que se encuentren, utilizando sistemas de tratamiento apropiados. En la Figura 2.5, se muestra un esquema que ilustra los principios básicos implicados en la eliminación/recuperación de metales a partir de soluciones acuosas por biomasa microbiana. Inicialmente, la biomasa es puesta en contacto con una solución que contiene metales y, una vez que éstos son removidos por biosorción, es posible recuperar la biomasa utilizando reactivos químicos suaves para retirar los

metales sin destruirla, permitiendo así su utilización posterior en un nuevo ciclo de tratamiento (Cañizares-Villanueva, 2000).

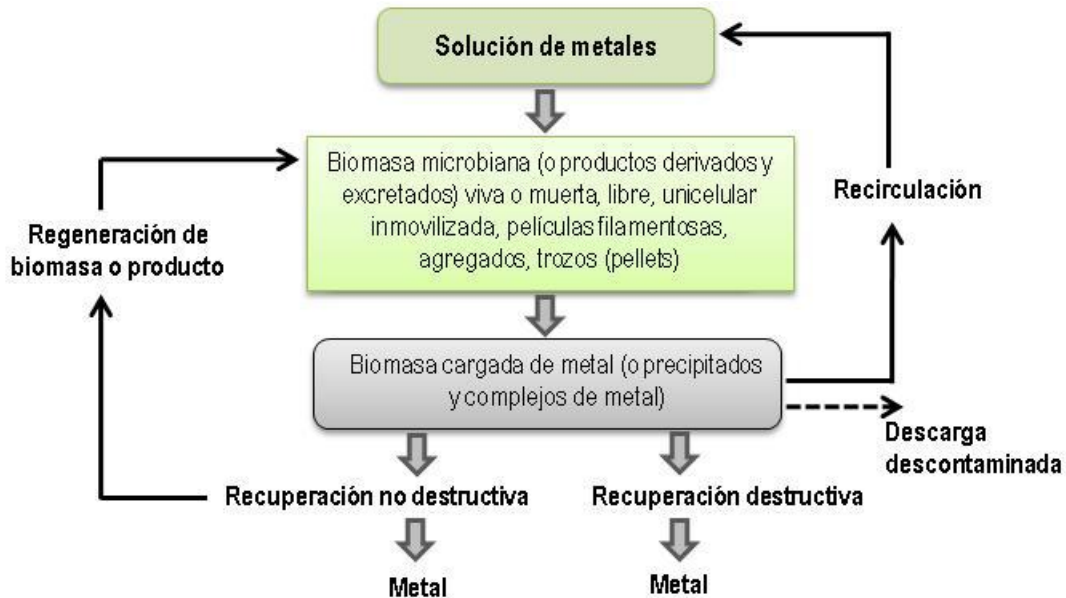


Figura 2.5 Principios básicos involucrados en la eliminación/recuperación de metales de soluciones acuosas por biomasa microbiana. Fuente: Cañizares-Villanueva, 2000.

En caso de que no importe la integridad de la biomasa, el metal puede ser retirado de la misma por técnicas destructivas como la incineración o la desorción con ácidos o bases fuertes. Como puede observarse, cuando la biomasa se satura con el metal, es posible recircular parte de la solución que aún contiene metales, para ser sometida a un nuevo ciclo de biosorción por biomasa fresca o regenerada, mientras que por otra parte se tiene una descarga descontaminada o con una concentración de metal menor a la inicial (Cañizares-Villanueva, 2000).

2.7 Contribuciones al estudio de la remediación de metales pesados

La problemática de la contaminación de suelos con metales pesados ha sido objeto de estudio desde hace ya algunos años. En la mayoría de los trabajos realizados, el objetivo consiste en lograr su eliminación de la matriz contaminada, o bien, la recuperación por diferentes mecanismos mediante el empleo de métodos químicos y biológicos. El presente trabajo se enfoca al tratamiento de una matriz sólida contaminada, mediante mecanismos de lixiviación y biosorción. Para lo anterior, se utilizaron dos hongos filamentosos (*A. niger* y *Lewia* sp.), que pueden representar una buena alternativa para la biolixiviación y/o biosorción de plomo. En el Cuadro 2.1 se resumen algunos estudios relevantes realizados al respecto.

Cuadro 2.1 Resumen de algunos estudios que involucran la participación de microorganismos y los mecanismos empleados para la remoción de metales en matrices contaminadas.

MICROORGANISMO	METAL	MECANISMO	REFERENCIA
<i>Aspergillus niger</i>	Cu, Zn y Co	Biolixiviación	Anjum <i>et al.</i> 2010
<i>A. niger</i> , <i>Penicillium</i> spp.	Pb	Biolixiviación	Arwidsson <i>et al.</i> 2010
<i>A. niger</i>	Cu, Cd, Pb y Zn	Biolixiviación	Ren <i>et al.</i> 2009
<i>A. niger</i> , <i>Rhizopus nigricans</i> y <i>Penicillium chrysogenum</i>	Pb, Zn, Cd, Cr, Cu y Ni	Biosorción	Ahluwalia y Goyal, 2007
<i>R. arrhizus</i>	Pb	Biosorción	Bahadir <i>et al.</i> 2007
<i>A. flavus</i>	Pb y Cu	Biosorción	Akar y Tunali, 2006
<i>A. niger</i>	Pb y Cu	Biosorción	Dursun, 2006
<i>Botrytis cinerea</i>	Pb	Biosorción	Akar <i>et al.</i> 2005
<i>A. fumigatus</i>	Cd, Co, Cu y Ni	Biosorción	Rao <i>et al.</i> 2005
<i>S. cerevisiae</i> y <i>A. niger</i>	Cr y Fe	Biosorción	Goyal <i>et al.</i> 2003
<i>P. chrysogenum</i>	Zn, Cu y Ni	Biosorción	Zouboulis <i>et al.</i> 2003
<i>A. niger</i>	Cu, Zn y Ni	Biolixiviación	Mulligan <i>et al.</i> 2004
<i>P. chrysosporium</i>	Cd, Pb, Cu	Biosorción	Say <i>et al.</i> 2001
<i>Rhizopus</i> y <i>Absidia</i>	Pb, Cd, Cu y Zn	Biosorción	Volesky y Holan, 1995

Puede observarse que, desde hace algunos años, las investigaciones relativas a la aplicación de tecnologías como la biolixiviación y/o biosorción de iones metálicos mediante el empleo de hongos filamentosos, han demostrado que es posible la eliminación o recuperación de diferentes metales a partir de matrices contaminadas. En la actualidad el estudio de la eliminación de metales pesados de suelos y efluentes contaminados ha cobrado importancia debido a sus repercusiones sobre el ambiente, ya que la presencia de estos elementos puede generar daños, como la contaminación de cuerpos de agua y, en casos extremos, destruir el ecosistema (Rojas-Loria, 2010).

III. HIPÓTESIS

Es posible biorremediar una matriz contaminada con plomo con el uso de hongos filamentosos, a través de procesos de lixiviación y biosorción, los cuales podrán acoplarse en un sistema integral.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar la factibilidad de aplicación de un sistema para la biorremediación de matrices sólidas contaminadas con plomo, que involucre mecanismos de lixiviación y biosorción por hongos filamentosos.

4.2 Objetivos específicos

- a. Evaluar la efectividad del ácido cítrico y el ácido etilen-diamino-tetraacético (EDTA) para la lixiviación de plomo de un soporte sólido contaminado.
- b. Determinar el efecto de la concentración de plomo sobre la producción de ácido cítrico por *A. niger* en un soporte contaminado con plomo.
- c. Realizar cinéticas de biosorción de plomo en solución con el uso de biomasa de *Lewia* sp. y *A. niger*.
- d. Proponer las condiciones más adecuadas para el acoplamiento del sistema de lixiviación-biosorción con el uso de hongos filamentosos.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Estrategia experimental

En la Figura 5.1 se presenta el esquema de la estrategia general de trabajo seguida para alcanzar los objetivos propuestos. Ésta se compone de dos etapas, en la primera se evaluó la efectividad de dos ácidos (cítrico y EDTA) para lixiviar el plomo presente en un soporte sólido contaminado. En la segunda etapa, se determinó la capacidad de biosorción de plomo en solución por biomasa viva y muerta de *Lewia* sp. y *A. niger*. Con base en los resultados, se proponen las condiciones más adecuadas para integrar un sistema de lixiviación-biosorción con el uso de biomasa fúngica. Posteriormente se detallan los métodos y materiales empleados para llevar a cabo el estudio.

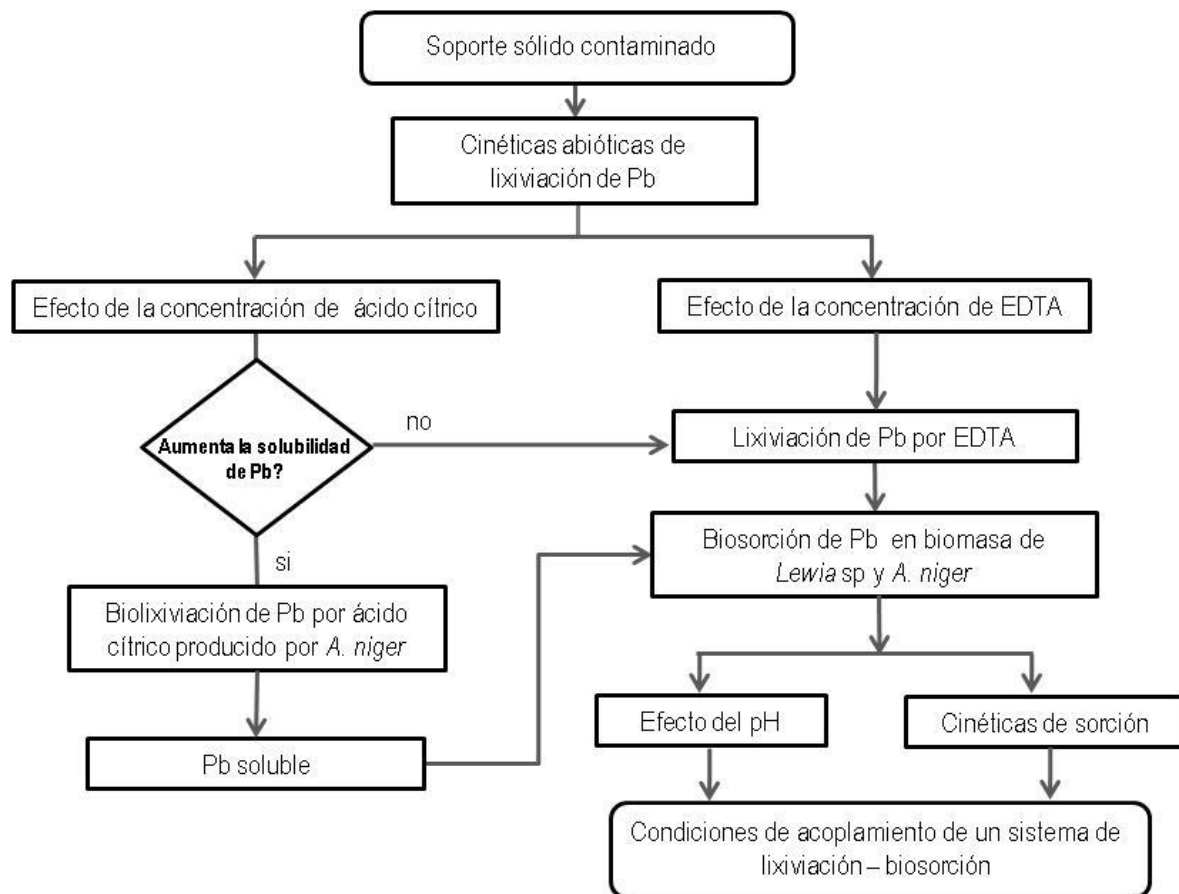


Figura 5.1 Estrategia experimental.

5.2 Soporte sólido contaminado

El material empleado como matriz sólida fue agrolita (Perlita), un material que se utiliza como suelo modelo en el cultivo de plantas (Martínez *et al.*, 2006), cuya composición química se detalla en el Cuadro 5.1.

Cuadro 5.1 Composición química de la agrolita.

Componente	Composición (% en peso)
SiO ₂	71-75
Al ₂ O ₃	12.5-18
Na ₂ O	2.9-4
K ₂ O	4-5
CaO	0.5-0.2
Fe ₂ O ₃	0.1-1.5
MgO	0.03-0.5

Fuente: Sari, *et al.*, 2007.

Previo a su uso, la agrolita fue tamizada para obtener una fracción con tamaño de partícula entre 1.99 y 4.76 mm de diámetro (entre mallas 4 y 10). Posteriormente fue lavada tres veces con agua destilada tibia para remover el polvo y otras impurezas, se dejó secar y, finalmente, se contaminó con plomo (250, 500 y 1000 mg/Kg), adicionado en forma soluble como Pb(NO₃)₂ (Sigma).

5.3 Evaluación de la efectividad del ácido cítrico y EDTA en la lixiviación de plomo

Se realizaron cinéticas abióticas de lixiviación, a fin de determinar el efecto de la concentración de ácido cítrico y EDTA para lixiviar plomo, y solubilizarlo en la fase acuosa, a partir de una muestra de agrolita contaminada con 250 mg Pb/kg. Las concentraciones evaluadas de cada ácido fueron: 0.20, 0.35, 50, 100 y 200 mM para ácido cítrico y 0.25, 0.50, 50, 100 y 200 mM para EDTA.

Como control se utilizó agua en equilibrio con CO₂ o agua meteórica (H₂O-CO₂). Este procedimiento permite lixiviar la fracción soluble de un metal

contenido en una matriz contaminada mediante el uso de una solución extractante (NOM-147 SEMARNAT/ SSA1-2004). El agua meteórica se preparó burbujeando aire en agua destilada durante 12 h o hasta alcanzar un pH de 5.5 ± 0.2 . En caso de que burbujeando aire no se logre alcanzar el pH indicado, se adicionan pequeños volúmenes de una solución de HCl 0.01 N.

Para llevar a cabo las cinéticas de lixiviación del plomo presente en la agrolita contaminada, a muestras de 1 g se les adicionó 15 ml de H₂O-CO₂ o de la solución de ácido cítrico o EDTA. Las muestras se agitaron (150 rpm, 30 °C) durante 24 horas, tomando muestras a las 0.5, 1, 2, 6, 14 y 24 h. Cada concentración de la solución extractante y cada tiempo fueron evaluados por triplicado.

Para cada tiempo de muestreo, la fase acuosa se separó de la agrolita por filtración a vacío (Whatman 42), y en el líquido obtenido se cuantificó el plomo en solución por espectrometría de absorción atómica (EAA) en su modalidad de flama (Sección 5.7.3.2).

5.4 Determinación del efecto de la concentración de plomo sobre la producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger*

El objetivo de esta etapa consistió en evaluar la capacidad de producción de ácido cítrico por *A. niger* con el objeto de su potencial empleo como agente lixivante de plomo. Para tal fin, se utilizó una cepa de *Aspergillus niger* 10, reportada por Sánchez-Soto (2005) como buena productora de ácido cítrico. La cepa fue proporcionada por la Planta Piloto 4 de Fermentaciones en Medio Sólido de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa.

5.4.1 Propagación y conservación de la cepa

Para propagar y conservar la cepa de *A. niger* 10 se utilizó medio agar papa dextrosa (PDA), un medio selectivo para el cultivo de hongos y levaduras. El medio se vació en tubos de ensaye de (20 mL) para su conservación y en matraces Erlenmeyer (250 mL) para la obtención de esporas y se esterilizó en autoclave (15 lb/plg², 15 min). Una vez solidificado el medio, se inoculó la cepa y

se incubó durante 5 días a 30°C. Para su conservación, la cepa crecida en tubos inclinados, fue almacenada a 4°C.

5.4.2 Medio de cultivo para producción de ácido cítrico

Para la producción de ácido cítrico por *A. niger*, se utilizó un medio de cultivo de referencia (Cuadro 5.2), modificado por Sánchez-Soto (2005), quien reporta una alta producción de ácido cítrico (149 mg/g de soporte) bajo tales condiciones nutricionales. El pH del medio se ajustó a 5.5 con una solución de NaOH 0.5 N o HCl 0.5 N.

Cuadro 5.2 Composición del medio de cultivo para producción de ácido cítrico.

Compuesto	g/L
Glucosa	300
NaNO ₃	16.5
K ₂ HPO ₄	5.50
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.284
Oligoelementos (µL)	600
Solución de oligoelementos (g/L)	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.15
ZnSO ₄	0.166
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.08
NaMnO ₄ ·2H ₂ O	0.10

5.4.3 Preparación del inóculo

Con el objeto de preparar una suspensión de esporas de *A. niger* como inóculo, a un matraz Erlenmeyer (250 mL) con el hongo crecido durante 5 días, se le adicionó 15 mL de una solución estéril de Tween 80 (0.5%) y, bajo condiciones asépticas, con un agitador magnético se desprendieron suavemente las esporas formadas sobre el micelio del hongo. De esta manera, se obtuvo una suspensión de esporas, cuya concentración se determinó por conteo en cámara de Neubauer utilizando la siguiente relación:

Esporas/mL = No. esporas promedio x 25 x 10⁴ x factor de dilución.

En donde:

25: corresponde al número de cuadros de la cámara

10⁴: corresponde al volumen de la cámara

Factor de dilución: es el inverso de la dilución realizada a la muestra

Una vez realizado el conteo, a cada unidad experimental se le adicionó la cantidad correspondiente de la suspensión de esporas para obtener un inóculo inicial de 2 x10⁷ esporas/g de soporte seco.

5.4.4 Condiciones de cultivo

Las unidades experimentales (UE) donde se llevó a cabo este ensayo fueron matraces Erlenmeyer de 125 mL con 3 g de soporte seco contaminado con 0, 250, 500 y 1000 mg/kg de plomo. A cada UE se le adicionó 6.6 mL de medio de cultivo y la cantidad necesaria de la suspensión de esporas, y se agitó manualmente para homogeneizar la agrolita con el medio y el inóculo. La cantidad de líquido adicionado a cada UE permitió tener en el sistema un 50% de humedad. Las muestras se corrieron por triplicado y se incubaron durante 6 días a 30 °C.

Después del periodo de incubación, cada UE fue adicionada con 30 mL de agua destilada y se agitó con un agitador magnético durante 10 minutos. Las muestras obtenidas se filtraron a vacío (Whatman 42) para obtener el extracto acuoso. Las variables evaluadas en la solución acuosa fueron ácido cítrico y plomo soluble. La primera variable se cuantificó mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) y la segunda por espectrofotometría de absorción atómica (EAA).

5.5 Cinéticas de biosorción de plomo en biomasa de *Lewia* sp y *A. niger*

Esta etapa tuvo como objetivo evaluar las capacidades de biosorción de plomo en biomasa (viva y muerta) de *Lewia* sp. y *A. niger* en función del pH inicial de la solución, para establecer las condiciones que favorecen la biosorción del metal.

5.5.1 Microorganismos

Para las pruebas de biosorción se evaluó la biomasa de dos hongos filamentosos: una cepa de *Lewia* sp., reportada por su capacidad para tolerar y acumular Pb (Rojas-Loria, 2010), y una cepa de *A. niger*, reportada en estudios de biosorción de metales como Pb, Cd, Cu, Ni, Au, Co entre otros (Wang y Chen, 2009; Ahluwalia y Goyal, 2007). La primera cepa fue proporcionada por el Laboratorio de Residuos Sólidos y la segunda por la Planta Piloto 4 de Fermentación en Medio Sólido de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa. Ambas cepas fueron conservadas en Agar de Papa y Dextrosa (PDA) a 4°C.

5.5.2 Medio de cultivo y preparación del inóculo

Para la producción de biomasa de *A. niger* se empleó caldo extracto de malta (15 g/L). La cepa se inoculó (1×10^7 esporas/mL) en matraces Erlenmeyer con 50 mL de medio y se incubaron durante 24 horas a 150 rpm y 30 °C. Posteriormente, el medio se filtró a vacío para obtener la biomasa producida. La biomasa así obtenida se colocó en un tubo de cultivo con agua destilada estéril (5 mL) y perlas de ebullición y se agitó en vórtex hasta la disgregación de micelio. Se adicionaron 10 mL más de agua destilada estéril y se agitó nuevamente hasta obtener una suspensión homogénea de biomasa.

Para la obtención de biomasa de *Lewia* sp., la cepa se inoculó en cajas de Petri con medio PDA que se incubaron durante 10 días a 30°C. Después del tiempo de incubación, se cortaron cuadros (5 x 5 mm) de la periferia de las colonias, recuperando solo el micelio. Los cuadros se colocaron en un tubo de cultivo con agua destilada estéril y perlas de ebullición y se realizó el mismo procedimiento descrito para *A. niger*.

Para los ensayos con biomasa muerta, la suspensión de micelio de cada cepa se sometió a esterilización en autoclave (15 lb/plg², 15 min).

5.5.3 Pruebas de biosorción de Pb con biomasa viva y muerta

Se probó la capacidad de biosorción de la biomasa viva o muerta con los siguientes valores de pH: 3, 4, 5, 6 y 7. Para lo anterior se prepararon soluciones de plomo (25 mg Pb/L) con los diferentes valores de pH. El plomo fue adicionado como nitrato de plomo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$). Se pusieron en contacto 20 mL de cada solución de plomo con 1 g/L de biomasa viva, la solución con la biomasa se agitó a 150 rpm (30 °C) durante 24 horas. Las células fueron removidas de la solución por filtración a vacío (Whatman 40) y en el filtrado se midió el pH y la concentración de plomo por EAA (Sección 5.7.3.2).

La cantidad de Pb retenido en biomasa y el porcentaje de remoción se determinaron con el uso de las Ecuaciones 1 y 2 (Meena *et al.*, 2008):

$$\frac{g(\text{Pb})}{g(\text{BM})} = \frac{[(C_i - C_f) * V_f] / \text{WBM}}{100} \quad \text{Ecuación 1}$$

$$\text{Remoción (\%)} = \frac{(C_i - C_f) * 100}{C_i} \quad \text{Ecuación 2}$$

En donde:

C_i = Concentración de plomo inicial en solución (mg/L)

C_f = Concentración de plomo final en solución (mg/L)

V_f = Volumen final de la solución (mL)

WBM = Peso de la biomasa viva o muerta (g)

5.6 Cinéticas de sorción y desorción

Una vez determinada la capacidad de biosorción de la biomasa viva y muerta, se seleccionó el pH que favoreció la mayor remoción de plomo de la solución. El mejor resultado para ambas cepas se obtuvo a pH 6 con biomasa muerta, por lo que las cinéticas de sorción y desorción se llevaron a cabo bajo tales condiciones.

5.6.1 Cinética de sorción

Las cinéticas de sorción de Pb con biomasa muerta de *A. niger* y *Lewia sp.* se llevaron a cabo en vasos de plástico (120 mL) con 20 mL de una solución de plomo (25 mg/L) a pH 6. Cada unidad experimental se adicionó con 1 g/L de biomasa muerta y se dejó en agitación a 150 rpm (30 °C) durante los siguientes tiempos: 0, 0.5, 1, 3, 6, 14, 24, 48 y 72 h.

En cada tiempo, las células fueron removidas por filtración a vacío (Whatman 40). La capacidad de biosorción en cada tiempo fue evaluada, por triplicado, mediante la cuantificación del plomo en solución por EAA. Esto se muestra esquemáticamente en la Figura 5.2.

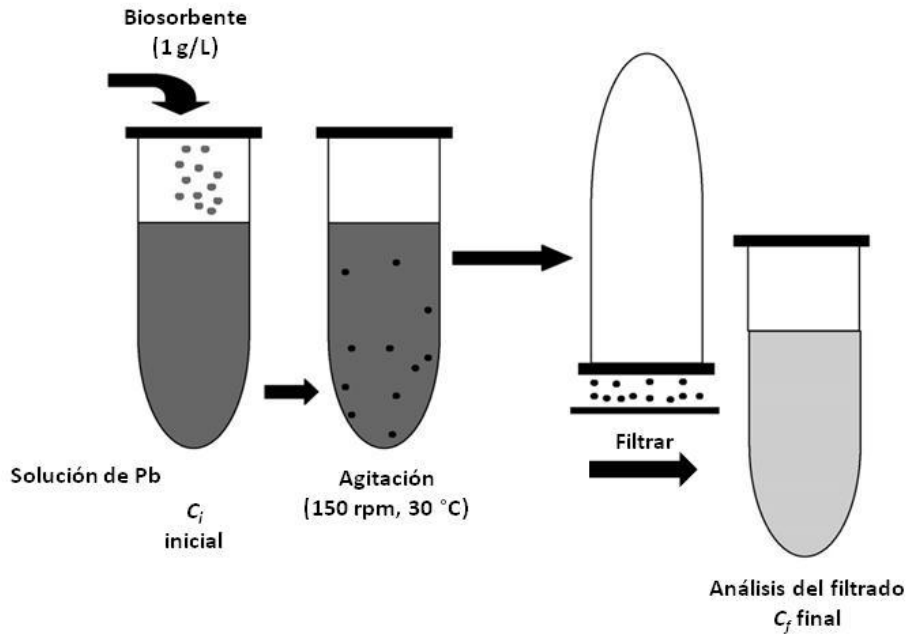


Figura 5.2 Proceso experimental de biosorción para la eliminación de iones de Pb a partir de soluciones acuosas. Fuente: Vijayaraghavan y Yun, 2008.

5.6.2 Cinética de desorción

En algunos materiales biosorbentes, principalmente cuando éstos son caros, es importante estudiar su capacidad de regeneración y reutilización (Vijayaraghavan y Yun, 2008). La forma de proceder en tal caso, es poniendo en contacto el material cargado con el metal, con un medio que favorezca la liberación del metal de su superficie (ácidos o bases fuertes que permiten solubilizar los metales).

En este estudio se determinó la capacidad de la biomasa muerta de *Lewia* sp. y *A. niger* para biosorber iones de Pb y posteriormente liberarlos o solubilizarlos en una solución desorbente. Para esto, se realizó una cinética de desorción del Pb sorbido en la biomasa contaminada, con la finalidad de poder reutilizarla en un siguiente ciclo de biosorción.

Para lo anterior, la biomasa muerta de ambos hongos se contaminó con una solución de plomo (25 mg/L) durante 72 horas. Posteriormente, la biomasa

con plomo se colocó en vasos de plástico (120 mL) con 20 mL de una solución de ácido clorhídrico 0.1 M con un pH de 1.4. Cada unidad experimental se adicionó con 10 g/L de biomasa y se dejó en agitación a 150 rpm (30 °C) durante 0, 0.5, 1, 3, 6, 14, 24, 48 y 72 h. La capacidad de desorción de plomo por el ácido clorhídrico se determinó, por triplicado, después de retirar la biomasa de la solución por filtración (Whatman 40), cuantificando el plomo en solución por EAA.

5.7 Métodos analíticos

5.7.1 Determinación de parámetros fisicoquímicos del soporte sólido

Humedad. La humedad de las muestras de agrolita se determinó por diferencia de peso en una termobalanza (Ohaus, modelo MB45).

pH. El pH del soporte (agrolita) se determinó en solución en una mezcla soporte: agua destilada (1:10). La fase acuosa fue separada del soporte por filtración a vacío (Whatman 42) y el pH se determinó en un potenciómetro (Conductronic pH 130).

5.7.2 Cuantificación de ácido cítrico

Para la cuantificación de ácido cítrico a partir de *A. niger*, se obtuvo un extracto acuoso. Para lo anterior, el material de cada unidad experimental donde creció *A. niger*, se adicionó con 30 mL de agua destilada y se mantuvo en agitación por 10 min. La suspensión obtenida se filtró al vacío (Whatman 42) y el sobrenadante se usó para determinar el pH y la concentración de ácido cítrico por HPLC.

El ácido cítrico se determinó en un HPLC (Perkin Elmer modelo 250) con una columna (Phenomenex Rezex Organic Acid) en una chaqueta de calentamiento (Eppendorf) a 60 °C y, un detector de índice de refracción (Perkin Elmer LC-30-RI bajo). Las muestras se filtraron (0.2 µm, Nylaflo PALL) y se inyectaron (20 µL) en el HPLC con una fase móvil de H₂SO₄ (5 mM), filtrada y desgasificada con un flujo de 0.6 mL/min, y se determinó la concentración de acuerdo al cálculo con el estándar.

5.7.3 Análisis de plomo

5.7.3.1 Digestión ácida de muestras sólidas

Para extraer el plomo de las muestras de agrolita, éstas se secaron (60°C) hasta peso constante y se sometieron a digestión ácida. Para lo anterior, una muestra de 0.5 g de agrolita se adicionó con 10 mL de ácido nítrico concentrado y se digirió a 175°C (1600 watts) por aproximadamente 10 min en un digester de microondas (*CEM, MARSXpress*).

Para determinar el plomo acumulado en biomasa fúngica, las muestras de biomasa se enjuagaron con agua desionizada y se secaron (60°C) hasta peso constante. Las muestras secas (0.05 – 0.1 g) se digirieron (~20 min) con 5 mL de HNO₃ concentrado y 4 mL de H₂O desionizada (PURELAB Option-Q Elga), en un digester de microondas (*CEM, MARSXpress*). Una vez que las muestras se enfriaron, se filtraron con membranas de 0.45 µm (Nylaflo PALL) y se aforaron a un volumen de 10 mL con agua desionizada (18 MΩ/cm) para su análisis por EAA.

5.7.3.2 Análisis de plomo por espectrometría de absorción atómica (EAA)

Las muestras obtenidas de la digestión fueron analizadas EAA para cuantificar la concentración de plomo en los extractos. Asimismo, las muestras líquidas obtenidas de las cinéticas de sorción-desorción fueron usadas directamente para cuantificar el plomo en solución por EAA.

El análisis se llevó a cabo en un espectrofotómetro de absorción atómica (Shimadzu, AA-6300) por el método de flama, utilizando una longitud de onda de 283 nm, con una mezcla de aire-acetileno (1.5-2 L/min) y con una abertura del quemador de 0.5 mm. Las curvas patrón para la cuantificación de Pb se prepararon con una solución estándar de 1000 µg Pb/mL (grado absorción atómica, J. T. Baker) en ácido nítrico (0.1%), en un rango de 0 a 12.5 mg/L.

Todo el material utilizado para los experimentos con plomo, fue sumergido por 12 horas en una solución de ácido nítrico al 10% y posteriormente enjuagado con agua destilada (NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004).

5.8 Análisis estadísticos

Todas las pruebas y determinaciones se realizaron por triplicado. La comparación de medias de los datos obtenidos se llevó a cabo mediante un análisis de varianza con una prueba de Duncan ($p < 0.05$).

Todos los resultados se expresan como medias con sus correspondientes errores estándar y letras que indican diferencias significativas entre las medias. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa IBM SPSS Statistics versión 18.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Evaluación de la efectividad del ácido cítrico y EDTA en la lixiviación de plomo

La capacidad para lixiviar metales tóxicos de una matriz sólida mediante la formación de complejos solubles, es una propiedad de los agentes quelantes que permite tener a los metales disponibles para que puedan ser removidos con fines de biorremediación (Lestan, *et al.*, 2008). De acuerdo con Wasay *et al.* (1998), al elegir un agente quelante se considera que los ligandos: 1) deben ser capaces de formar complejos estables con los metales en un amplio rango de pH, 2) deben tener baja toxicidad y un bajo impacto sobre el medio ambiente y 3) deben ser rentables.

En el presente estudio, para lixiviar Pb de agrolita contaminada, se utilizó EDTA y ácido cítrico en diferentes concentraciones. El EDTA, fue elegido por ser un ligando orgánico capaz de formar complejos solubles con la mayoría de los metales divalentes y el ácido cítrico por su capacidad para solubilizar metales como Al, Fe, Mn, Ni y Pb, entre otros (Wasay *et al.*, 1998; Ren *et al.*, 2009).

6.1.1 Efecto del ácido EDTA sobre la lixiviación de plomo

El EDTA, es un ligando complejante que tiene dos o más grupos de electrones que forman más de un enlace entre el metal y el ligando. Los múltiples enlaces forman una estructura de anillo alrededor del ión metálico, lo que permite al EDTA solubilizar los metales pesados y lixiviarlos de una matriz contaminada (Skoog *et al.*, 2001).

En la Figura 6.1 se muestra el efecto de diferentes concentraciones de EDTA sobre la capacidad para lixiviar o desorber Pb a partir de la agrolita, en función del tiempo de contacto. La capacidad de lixiviación de Pb por todas las soluciones de EDTA fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que la del control con agua meteórica. Se encontró que todas las soluciones de EDTA probadas lixivieron más del 65% del plomo sorbido en la agrolita en 0.5 h. Después de 2 h

de contacto se obtuvo el máximo valor de lixiviación para la solución de EDTA con una concentración 0.5 mM. Los resultados obtenidos indican que la eficiencia del EDTA para lixiviar Pb a partir de agrolita disminuye al aumentar su concentración, por lo tanto una concentración de 0.50 mM podría resultar suficiente para lixiviar todo el Pb de la muestra (196.4 ± 2.4 mg Pb/kg soporte seco, SS). En la concentración más baja probada (0.25 mM), el porcentaje de lixiviación fue menor con respecto a las demás concentraciones, y alcanzó un valor máximo a las 24 h.

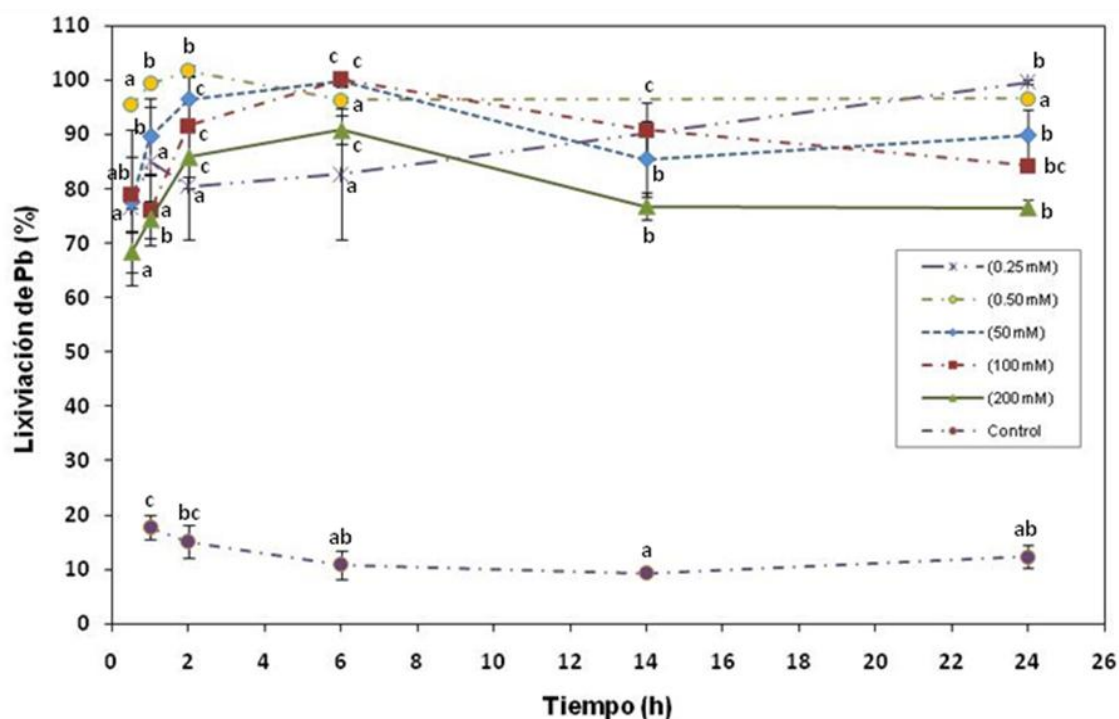


Figura 6.1 Efecto de la concentración de soluciones de EDTA (0.25, 0.50, 50, 100 y 200 mM) en la lixiviación de Pb a partir de agrolita, en función del tiempo de contacto a 30°C. Como control se usó agua meteórica a pH 5.5. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan, $p < 0.05$).

Estos resultados pueden compararse con los obtenidos por Wasay *et al.* (1998), quienes con una solución de EDTA 1.0 mM lograron lixiviar hasta un 90% de iones de Cd, Cu, Pb y Zn de un suelo contaminado con concentraciones

iniciales de 794, 926, 1036 y 1029 mg/kg respectivamente. En otro estudio realizado por Labanowski *et al.* (2008), obtuvieron una remoción de Pb de casi 90% con EDTA 0.05 M, partiendo de un suelo con 100 mg Pb/kg. El EDTA tiene la capacidad de formar complejos solubles estables con los iones metálicos, donde dicha estabilidad, se debe a los distintos sitios de complejación que existen dentro de la molécula, lo que le confiere una estructura en forma de jaula que encierra al catión y lo aísla (Skoog, *et al.*, 2001).

En el presente trabajo se encontró que las soluciones de EDTA con concentraciones de 0.5, 50 y 100 mM, la máxima desorción de Pb (casi 100%) se obtuvo a las 6 h de contacto. Lo anterior coincide con lo reportado por Kim *et al.* (2003), quienes determinaron que con altas concentraciones de EDTA (7 - 20 veces más EDTA que Pb, de acuerdo a la relación estequiométrica) es posible extraer todo el Pb presente en un suelo contaminado. En el caso de la solución con la concentración más alta de EDTA (200 mM), los valores de lixiviación fueron menores que el resto, lo que indica una pérdida de la eficiencia de desorción cuando se manejan concentraciones excesivas del agente quelante, esto puede ser atribuido a que a altas concentraciones, el EDTA puede reaccionar con los iones metálicos de Al^{3+} y Fe^{3+} presentes en forma de óxidos (Al_2O_3 y Fe_2O_3) en la composición del soporte, ya que estos metales tienen constantes de estabilidad ($\log K$) de 16.13 y 25.1 respectivamente en los complejos de EDTA, motivo por el cual pueden competir con el Pb (18.04) disminuyendo su lixiviación (Skoog *et al.*, 2001). Un resultado similar fue obtenido por Kim *et al.* (2003), quienes determinaron una baja lixiviación de Pb (< 10%) al emplear un exceso de EDTA (300 veces más con respecto al Pb), lo que atribuyeron a que a pH inferiores a 6, los iones de Fe y otros metales como el Zn y Cu presentes en la matriz del suelo pueden competir con el Pb disminuyendo su eficiencia de extracción.

Un factor clave para la sorción y desorción de iones metálicos a partir de una matriz sólida es el pH. En ambientes ácidos se produce una competencia entre los iones de hidrógeno (H^+) y los cationes metálicos por los sitios de intercambio. De esta manera, un valor bajo de pH produce la desorción de los

metales pesados, aumentando su biodisponibilidad (Alloway, 1995; Lasat, 2001; Sari *et al.*, 2007). En el Cuadro 6.1 se muestran los valores de pH correspondientes a cada solución de EDTA probada, en función del tiempo de contacto con la matriz contaminada.

Cuadro 6.1 Efecto de la concentración de EDTA sobre el pH de la solución, durante la desorción de Pb a partir de agrolita contaminada, en función del tiempo de contacto a 30°C.

Tiempo (h)	pH*				
	(0.25 mM)	(0.50 mM)	(50 mM)	(100 mM)	(200 mM)
0.5	5.34 ± 0.19 ^a	5.03 ± 0.13 ^a	4.52 ± 0.03 ^{ab}	4.61 ± 0.01 ^a	4.65 ± 0.07 ^a
1	6.04 ± 0.24 ^b	5.16 ± 0.21 ^a	4.57	4.68	4.57
2	7.03 ± 0.01 ^c	6.08 ± 0.02 ^b	4.54 ± 0.03 ^{ab}	4.61 ± 0.03 ^a	4.63
6	4.96 ± 0.08 ^a	5.29 ± 0.16 ^a	4.51 ± 0.01 ^a	4.61	4.73 ± 0.03 ^b
14	ND	ND	4.52 ± 0.04 ^{ab}	4.65	4.58
24	6.92 ± 0.32 ^c	6.50 ± 0.33 ^b	4.59 ± 0.02 ^b	4.62	4.59

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan $p < 0.05$).

* Los valores sin desviación estándar fueron determinados con una medición.

ND: No determinado para 14 h.

Se encontró que para las soluciones de EDTA menos concentradas (0.25 y 0.50 mM), el pH fue más variable en función del tiempo de contacto, en comparación con las soluciones más concentradas, en las cuales, los cambios en el pH no fueron significativos a través del tiempo (pH 4.5 a 4.7), aunque sí se observaron diferencias significativas en la lixiviación del metal (Figura 6.1).

Similar a nuestros resultados, Wasay *et al.* (1998) encontró que a pH 7.0 se alcanzó una lixiviación de Pb de hasta 90% a partir de un suelo con una concentración inicial de 1036 mg/kg, utilizando una solución de EDTA 1 mM. Esto indica que el EDTA tiene una alta capacidad para formar complejos

solubles estables con iones metálicos en un amplio rango de pH (Wasay *et al.*, 1998).

6.1.2 Efecto del ácido cítrico en la lixiviación de plomo

Varios trabajos (Anjum, *et al.*, 2010; Ren, *et al.*, 2009; Wasay, 1998) han reportado la capacidad de soluciones de ácido cítrico para lixiviar metales a partir de matrices contaminadas. Por ejemplo, Ren *et al.* (2009), empleando una solución de ácido cítrico 0.031 M lograron lixiviar hasta 40, 100, 90 y 43% de iones de Cu, Cd, Pb y Zn, a partir de un suelo contaminado con 1100, 105, 21138 y 7760 mg/kg respectivamente.

En el presente estudio se determinó el efecto de cinco soluciones de ácido cítrico con diferente concentración (0.20, 0.35, 50, 100 y 200 mM), sobre su capacidad para lixiviar Pb a partir de agrolita contaminada con 196.4 ± 2.4 mg Pb/kg SS. En la Figura 7.2 se muestra la eficiencia de lixiviación de Pb en el tiempo, para cada solución de ácido cítrico y se compara con un control con agua meteórica. En este caso, se determinó que la capacidad de lixiviación de Pb por soluciones con ácido cítrico también fue significativamente mayor ($p < 0.05$) que la del control con agua meteórica. Sin embargo, se encontró que bajas concentraciones (0.20 y 0.35 mM) de ácido cítrico tienen una baja eficiencia de desorción de Pb, alcanzando valores máximos inferiores a 75.2 ± 1.5 y 58.9 ± 7.4 % respectivamente, a las 2 h de contacto. En contraste, las soluciones con alta concentración de ácido cítrico (50, 100 y 200 mM) fueron muy eficientes para lixiviar plomo a partir de la agrolita, obteniendo valores de desorción superiores a 90% desde la primera media hora de contacto.

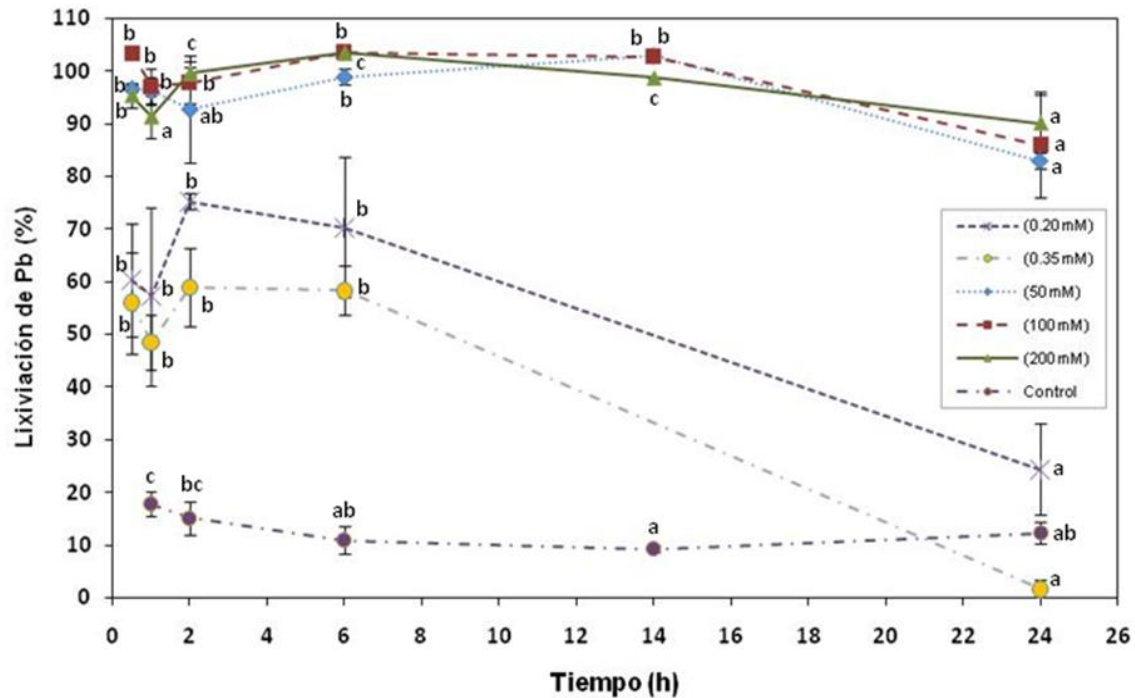


Figura 6.2 Efecto de la concentración de soluciones de ácido cítrico (0.20, 0.35, 50, 100 y 200 mM) en la lixiviación de Pb a partir de agrolita (1 g), en función del tiempo de contacto a 30°C. Como control se usó agua meteórica a pH 5.5. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan, $p < 0.05$).

Los resultados indican que bajo estas condiciones, concentraciones de ácido cítrico mayores a 50 mM son altamente eficientes para lixiviar el Pb de la matriz contaminada en estudio. Lo anterior sugiere que, a estas concentraciones, se formó un complejo soluble (citrato de plomo) que permitió su lixiviación. En contraste, Wasay (1998) encontró que con ácido cítrico (0.26 M) solo se logró extraer entre 30-40% de Pb de un suelo contaminado (1036 mg Pb/kg). Este mismo autor, sugiere que para la desorción eficiente de metales de un suelo contaminado empleando ácido cítrico, se requieren concentraciones entre 30 y 160 mM.

Al igual que con el EDTA, el pH de las soluciones de ácido cítrico en contacto con la agrolita contaminada, tampoco sufrió cambios significativos en el

tiempo (Cuadro 6.2). En las soluciones con baja concentración de ácido, el pH osciló entre 2.7 y 6.0 durante el tiempo. No obstante, el pH de las soluciones concentradas de ácido cítrico, se mantuvo entre 2.2 y 2.5 independientemente del tiempo de contacto, lo cual favoreció significativamente la desorción de Pb. Estos resultados sugieren que la alta eficiencia de lixiviación de Pb obtenida con soluciones concentradas de ácido cítrico, puede deberse al bajo pH durante toda la cinética, o bien, a un exceso en la concentración del ácido utilizado. Dicho exceso puede permitir que los grupos carboxilo del citrato, los cuales poseen una carga negativa que les proporciona una alta energía de coordinación, se unan eficientemente a los iones metálicos, permitiendo así su lixiviación (Wasay, 1998).

Cuadro 6.2 Efecto de la concentración de ácido cítrico sobre el pH, durante la desorción de Pb en agrolita contaminada, en función del tiempo de contacto a 30°C.

Tiempo (h)	pH*				
	(0.20 mM)	(0.35 mM)	(50 mM)	(100 mM)	(200 mM)
0.5	6.04 ± 0.06 ^{ab}	4.39 ± 0.13 ^b	2.30 ± 0.03 ^{ab}	2.24	2.25
1	5.51 ± 0.29 ^b	4.57 ± 0.06 ^b	2.28	2.28	2.21
2	2.71 ± 0.11 ^a	4.24 ± 0.22 ^b	2.48 ± 0.06 ^c	2.22 ± 0.06 ^a	2.13 ± 0.01 ^a
6	5.59 ± 0.05 ^b	3.86 ± 0.24 ^a	2.35 ± 0.03 ^b	2.30 ± 0.01 ^b	2.29 ± 0.01 ^b
14	ND	ND	2.25 ± 0.06 ^a	2.31	2.32 ± 0.04 ^b
24	6.17 ± 0.32 ^c	5.32 ± 0.11 ^c	2.33	2.33	2.28 ± 0.04 ^b

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan $p < 0.05$).

* Los valores sin desviación estándar fueron determinados con una medición.

ND: No determinado para 14 h.

Para el caso particular de las soluciones de ácido cítrico 0.20 y 0.35 mM, se alcanzó un máximo valor de desorción de 75.2 y 58.9% respectivamente, a las 2 h de contacto. Posteriormente, se registró una disminución significativa en

la capacidad de lixiviación por estas soluciones, hasta alcanzar valores similares a los encontrados para el control, a las 24 h de contacto. Estos resultados pueden deberse a un aumento en el pH de las soluciones a partir de las 6 h. Ambos fenómenos podrían estar relacionados con la formación de complejos insolubles (citratos de Pb, $Pb_3(C_6H_8O_7)_2$) entre el ácido cítrico y el ión metálico, lo que resultó en una disminución en la solubilidad del metal (Dean, 1999).

Los resultados experimentales obtenidos, indican que el EDTA resulta un mejor agente para la lixiviación de plomo que el ácido cítrico. Es probable que este resultado se deba a los cambios en el pH y, por tanto, a la formación de complejos insolubles con el citrato.

En el caso de EDTA, la mayor eficiencia de lixiviación puede atribuirse a los múltiples enlaces presentes en la molécula, los cuales forman una estructura de anillo alrededor del ión metálico, permitiendo así su solubilización y lixiviación (Wasay, 1998). Así, los resultados obtenidos, demuestran una vez más el potencial del EDTA como agente quelante en la remoción de metales de suelos contaminados, lo que coincide con lo reportado en otros estudios (Wasay, 1998; Kim *et al.* 2003; Labanowski *et al.* 2008; Lestan *et al.* 2008).

6.2 Determinación del efecto de la concentración de plomo sobre la producción de ácido cítrico por *A. niger*

A. niger es un hongo utilizado comercialmente para la producción de ácidos orgánicos, como el cítrico, que es conocido por ser un lixivante de metales pesados. De hecho, este hongo ha sido anteriormente estudiado por su capacidad para la biolixiviación de metales y su recuperación a partir de matrices sólidas como suelos y minerales de baja ley (minerales valiosos con grandes cantidades de impurezas no deseables) (Ren *et al.*, 2009; Mulligan, *et al.*, 2004). Con base en lo anterior, en esta etapa del estudio, se propuso estudiar el efecto del plomo sobre la producción de ácido cítrico por *A. niger* en agrolita contaminada. Para esto, el hongo se creció en agrolita contaminada con diferentes concentraciones de Pb (0, 250, 500 y 1000 mg/kg de soporte seco), humectada con un medio mineral propuesto por Sánchez-Soto (2005), para la

producción de ácido cítrico por esta cepa. En la Figura 6.3 se presentan los resultados obtenidos del efecto de la concentración de plomo inicial sobre la producción de biomasa (peso seco) y ácido cítrico por *A. niger*.

Se puede observar que no hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) en la producción de ácido cítrico por efecto de la concentración inicial de plomo en el soporte, con respecto al control sin el metal, en donde se alcanzó una concentración de ácido cítrico de 6.9 ± 0.3 g/L (35.7 ± 1.7 mM). Al final del periodo de crecimiento se registró una disminución del pH, encontrando valores entre 3.4 y 3.5, independientemente de la concentración de plomo. Este resultado puede atribuirse a la producción de ácidos orgánicos, como el ácido cítrico (Arwidsson, *et al.*, 2010).

Como se muestra en la Figura 6.3, aunque no hubo diferencias significativas en la producción de ácido cítrico por efecto de la concentración de plomo, sí se registró un aumento significativo en la biomasa. Esta respuesta puede deberse al plomo acumulado en la biomasa fúngica, el cual generalmente aumenta junto con el incremento en la concentración del metal en el medio (Angumeenal y Venkappayya, 2004). No obstante, la acumulación de plomo en la biomasa de *A. niger* no se determinó, por lo que no es posible afirmar lo anterior. Por otra parte, también es posible atribuir el aumento en la producción de biomasa a una respuesta de *A. niger* ante una situación de estrés provocado por la presencia del contaminante (Chojnacka, 2010). Este resultado, puede explicarse por un fenómeno conocido como hormesis, una característica adaptativa en algunos organismos, caracterizada por el aumento en respuestas fisiológicas (como el crecimiento) en presencia de bajas concentraciones de un tóxico (Calabrese *et al.* 2007). Angumeenal y Venkappayya (2004), reportaron una alta producción de biomasa en presencia de Pb comparado con otros iones metálicos como Cd, Cr y Mo, dato que coincide con el obtenido bajo estas condiciones de estudio, donde la mayor producción de biomasa (0.7 ± 0.1 g) se alcanzó con la concentración más alta de Pb.

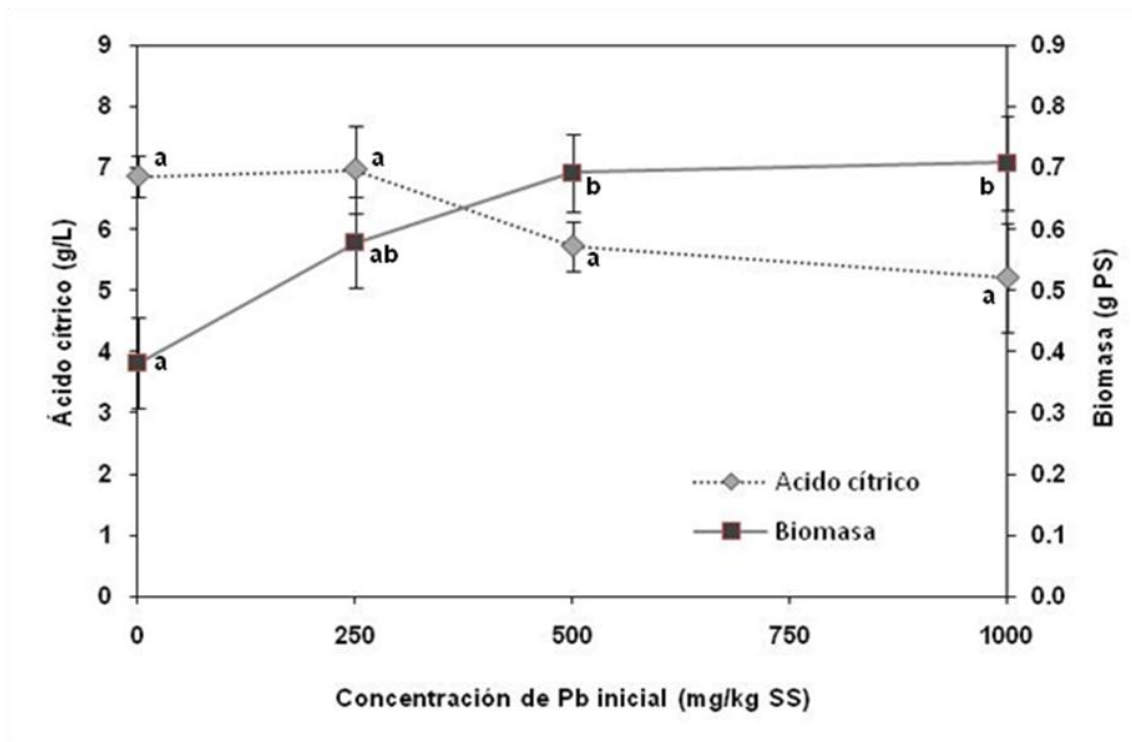


Figura 6.3 Efecto de la concentración de plomo (0, 250, 500 y 1000 mg/kg de soporte seco) sobre la producción de ácido cítrico y biomasa por *A. niger*. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan, $p < 0.05$).

En la Figura 6.4 se muestra el efecto del ácido cítrico producido por *A. niger* sobre la lixiviación de Pb a partir de agrolita, en función de la concentración inicial del metal. En este caso, se encontró que no hubo diferencias significativas en la capacidad de lixiviación de Pb por el ácido cítrico producido por *A. niger* en los tratamientos ensayados. En todos los tratamientos con Pb, se lixivió menos del 6% del Pb total sorbido en la agrolita, lo que indica una baja eficiencia del ácido cítrico producido bajo estas condiciones (27 a 36 mM), comparada con los resultados obtenidos en la lixiviación química usando concentraciones inferiores (0.25 y 0.5 mM).

Es probable que la baja capacidad de lixiviación del ácido cítrico en este caso, pueda deberse a que una parte del Pb pudo quedar sorbido en la biomasa de *A. niger* (Angumeenal y Venkappayya, 2004), o bien, a una competencia del

Pb con los iones de Fe^{3+} y Al^{3+} presentes como óxidos en la agrolita. En los complejos de ácido cítrico, las constantes de estabilidad de estos metales son mayores (12.5 y 7.0 respectivamente) con respecto al Pb (6.5), esto podría explicar la baja lixiviación de Pb obtenida, debido a que cuando en un sistema se encuentra presente más de un metal, se forma primero el quelato cuya constante de estabilidad es mayor (Skoog *et al.*, 2001; Ringbom, 1979).

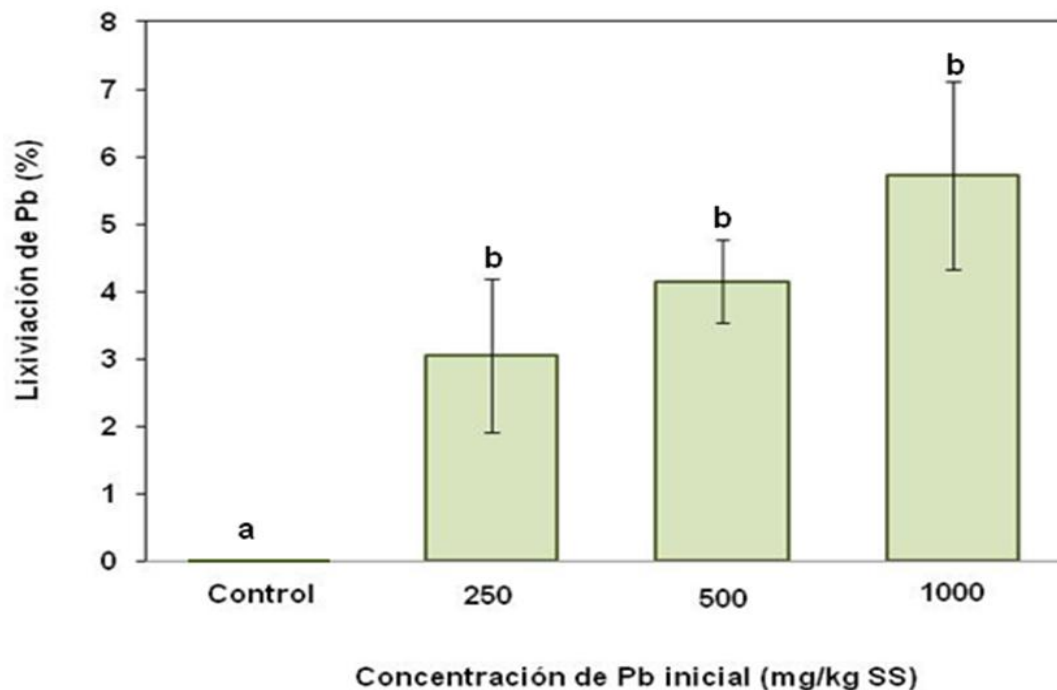


Figura 6.4 Efecto del ácido cítrico producido por *A. niger* sobre la lixiviación del Pb presente en los tratamientos con una concentración inicial de 0, 250, 500 y 1000 mg/kg de soporte seco. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan, $p < 0.05$).

En contraste con estos resultados, Ren *et al.* (2009), emplearon el ácido cítrico producido por *A. niger* para lixiviar plomo a partir de un suelo con 21138 mg/kg, obteniendo eficiencias de lixiviación de hasta 30% con concentraciones del ácido entre 450 y 950 mg/L (2.3 y 4.9 mM). Anjum *et al.* (2010), encontraron una mejora en la efectividad de desorción de Cu, Zn y Co de esquisto negro por

los ácidos orgánicos producidos por *A. niger* con la adición de ácido sulfúrico y residuos agrícolas al medio. Similar a lo obtenido en nuestro estudio, Arwidsson *et al.* (2010), reportaron una producción de ácido cítrico por *A. niger* en un rango entre 10 - 30 mM, obteniendo una baja biolixiviación de Pb (3 - 5%) de un suelo contaminado.

Con base en lo reportado con respecto a la lixiviación de metales pesados por ácidos orgánicos, puede decirse que la movilización de iones metálicos a partir de matrices sólidas contaminadas, no solamente depende de la concentración de los ácidos orgánicos, sino que también de otros factores como el pH y la capacidad de intercambio catiónico de los suelos, (Arwidsson, *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2009). De esta manera, se puede concluir que la producción de ácido cítrico por *A. niger* en el sistema propuesto no fue suficiente para biolixiviar el Pb presente en la matriz contaminada y dejarlo soluble para una posterior etapa de recuperación por un proceso de biosorción.

Debido a lo anterior, en este trabajo se propone el uso de EDTA para llevar a cabo la lixiviación de Pb de la matriz de estudio. La selección de este ácido se basó en su capacidad de formar complejos solubles estables con los iones metálicos (Skoog, *et al.*, 2001; Kim, *et al.*, 2003), con lo que es posible tener altos porcentajes del metal en solución.

6.3 Cinéticas de biosorción de plomo en biomasa de *Lewia* sp. y *A. niger*

Los mecanismos mediante los cuales los hongos pueden acumular metales como el Pb en su biomasa aún no son totalmente claros, pero se sabe que ocurren a través de mecanismos pasivos, por captación en biomasa (incluso muerta), o activos, que implica la actividad metabólica del hongo (Rojas-Loria 2010). Pese al conocimiento limitado, muchos investigadores han explicado los mecanismos responsables de la biosorción. Éstos pueden ocurrir por una combinación de factores como el intercambio iónico, complejación, coordinación, adsorción, interacciones electrostáticas, quelación y microprecipitación (Ahluwalia y Goyal, 2007; Wang y Chen, 2009; Vijayaraghavan y Yun, 2008).

En el presente estudio se encontró que la biosorción de Pb en biomasa fúngica fue mayor en biomasa inactiva que en biomasa activa. El pH de la solución (3 - 7) fue un parámetro clave en la capacidad de biosorción de ambas biomásas. La capacidad de biosorción se define como la cantidad máxima de iones metálicos que pueden ser sorbidos en un material biosorbente y se expresa en mg/g de biomasa seca (BMS) (Wang y Chen, 2009; Bahadir *et al.*, 2007).

6.3.1 Biosorción de plomo en biomasa viva de *Lewia sp.* y *A. niger*

Con el objeto de evaluar la capacidad de biosorción de la biomasa activa de *Lewia sp.* y *A. niger*, se prepararon soluciones de Pb (25 mg Pb/L) en un rango de pH de 3 - 7. En la Figura 6.5 se muestran los resultados de las capacidades de biosorción de biomasa activa (viva) de *Lewia sp.* y *A. niger* en función del pH de la solución de plomo.

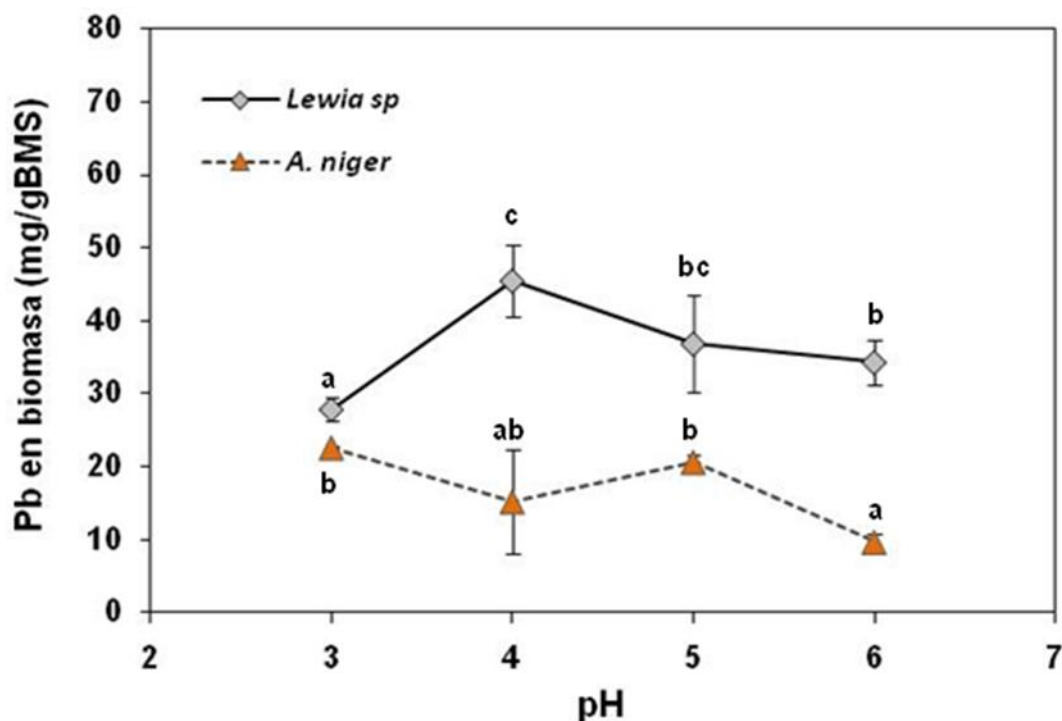


Figura 6.5 Capacidad de biosorción de Pb por biomasa activa de *Lewia sp.* y *A. niger* en función del pH de la solución. El Pb se extrajo a 30°C y 150 rpm durante 24 h. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan, $p < 0.05$).

En general, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la capacidad de biosorción de Pb entre biomasa activa de *Lewia* sp. y de *A. niger* en función del pH de la solución. La biomasa activa de *Lewia* sp. presentó una mayor capacidad de biosorción con respecto a la de *A. niger*. El mayor valor de biosorción alcanzado (45.4 ± 4.8 mg Pb/g BMS) para la biomasa de *Lewia* sp. se obtuvo a pH 4, mientras que para *A. niger* no se encontraron diferencias significativas en la biosorción para valores de pH entre 3 y 5, obteniendo valores máximos alrededor de 20 mg Pb/g BMS y alcanzando el mínimo valor (9.7 ± 1.1 mg Pb/g BMS) a pH 6. La mayor capacidad de biosorción por biomasa de *Lewia* sp. podría ser atribuido a que esta cepa tolera concentraciones de Pb soluble de hasta 500 mg/kg sin presentar signos de toxicidad, lo cual corrobora los resultados obtenidos por Rojas-Loria (2010), quien propuso que el principal mecanismo de sorción de Pb por biomasa de *Lewia* sp. es activo.

Varios estudios han comparado la capacidad de biosorción de la biomasa activa de diversos hongos filamentosos, encontrando un amplio rango de valores, que va desde 17 (*Mucor rouxii*) hasta 116 mg Pb/g BMS (*Penicillium chrysogenum*) (Wang y Chen, 2009; Ahluwalia y Goyal, 2007; Say *et al.*, 2001). En el caso de este estudio, el valor de biosorción más bajo obtenido para *Lewia* sp. fue de 27.8 ± 1.6 mg Pb/g BMS a pH 3, lo que indica que a valores bajos de pH, la protonación de los componentes de la pared celular del hongo afecta negativamente la capacidad de biosorción, efecto disminuye al aumentar el pH de la solución (Sari *et al.*, 2007; Bahadir *et al.*, 2007).

La menor capacidad de biosorción observada para *A. niger*, puede deberse a una mayor sensibilidad de esta cepa a los efectos tóxicos del contaminante (Chojnacka, 2010). Similar a nuestros resultados, Wang y Chen (2009), encontraron una capacidad de biosorción de 2.3 mg Pb/g BM en biomasa activa de *A. niger* en una solución a pH 4. No obstante, Dursun (2006), reporta una máxima capacidad de biosorción de 32.6 mg Pb/g BM en biomasa activa de este mismo hongo a pH 4. Las diferencias encontradas en la capacidad de biosorción de un metal por la biomasa activa o inactiva de un mismo hongo,

pueden deberse a los diferentes parámetros utilizados en cada estudio como son: el pH, que es un parámetro muy importante debido a que afecta la química de la solución de los metales, la actividad de los grupos funcionales y la competencia cuando otros iones metálicos están presentes en un sistema; así también, la temperatura, concentración inicial de iones metálicos y de biomasa y el tiempo de contacto son factores que afectan la capacidad de biosorción de una biomasa determinada (Wang y Chen, 2009; Nilanjana *et al*, 2008; Ahluwalia y Goyal, 2007).

6.3.2 Biosorción de plomo en biomasa muerta de *Lewia* sp. y *A. niger*

La acumulación de metales en la biomasa de los hongos puede ocurrir de forma activa o pasiva; esta última ocurre a través de la adsorción del metal en biomasa muerta por adhesión a ciertos compuestos de la quitina que compone la pared celular de muchos hongos (Rojas-Loria, 2010). El uso de biomasa muerta permite estimar la cantidad del metal que se acumula en la biomasa de forma pasiva (adsorción) (Ahluwalia y Goyal, 2007), así como eliminar los efectos tóxicos provocados por los metales, que pueden conducir a envenenamiento o inactivación (Cañizares-Villanueva, 2000). Así, con el objetivo de evaluar el efecto de la biomasa inactiva en la biosorción de Pb, se determinó la capacidad de biosorción a partir de biomasa muerta de *A. niger* y *Lewia* sp. En la Figura 6.6 se muestran los resultados de las capacidades de biosorción en función del pH de una solución con 25 mg Pb/L.

En este caso, también se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la capacidad de biosorción de *Lewia* sp. y la de *A. niger* con respecto al pH de la solución. Puede verse que, en un rango de pH entre 4 y 6, la capacidad de biosorción de *A. niger* aumentó significativamente con respecto a la biomasa activa y a *Lewia* sp. Este resultado puede atribuirse a que, bajo tales condiciones, la biomasa inactiva mostró una menor sensibilidad a la toxicidad del contaminante en comparación con la biomasa activa, lo que permitió obtener un aumento en su eficiencia para remover Pb de la solución (Cañizares-Villanueva, 2000; Chojnacka, 2010).

La mayor capacidad de biosorción en biomasa inactiva por ambas cepas se obtuvo a pH 6, en donde se alcanzaron valores de 80 y 96 mg Pb/g BMS, para *Lewia* sp. y *A. niger* respectivamente. Algunos estudios (Say *et al.*, 2001; Akar y Tunali, 2006) indican que a pH cercano a 6 se alcanzaron las máximas capacidades de biosorción de iones metálicos, como Cd^{2+} , Pb^{2+} y Cu^{2+} , en biomasa inactiva de *Phanerochaete chrysosporium* y *A. flavus*. Así mismo, Yan y Viraraghavan (2003), determinaron que la capacidad de biosorción de iones de Pb^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} y Ni^{2+} en biomasa muerta de *Mucor rouxii* se incrementaron con el aumento del pH de 5 a 6.

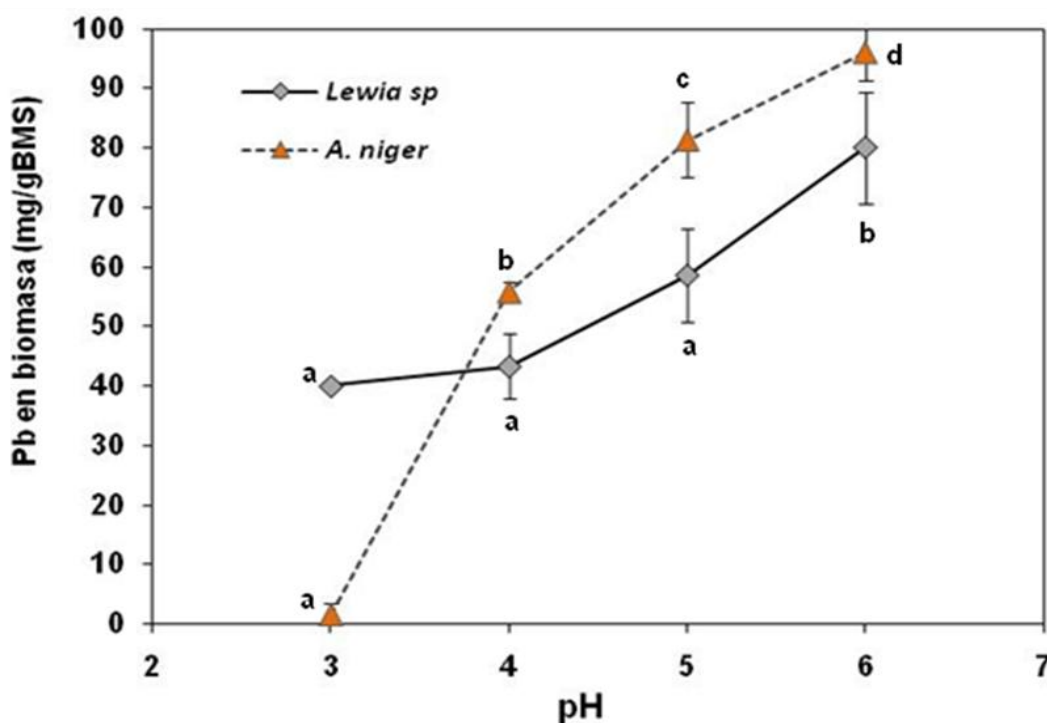


Figura 6.6 Capacidad de biosorción de Pb por biomasa inactiva de *Lewia* sp y *A. niger* en función del pH inicial de la solución. El Pb se extrajo a 30°C y 150 rpm durante 24 h. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan, $p < 0.05$).

Por otra parte, varios estudios reportan que la biomasa del género *Aspergillus* adsorbe eficientemente iones metálicos en solución (Wang y Chen, 2009; Ahluwalia y Goyal, 2007; Volesky y Holan, 1995). Así, los resultados

obtenidos en este estudio son similares a los reportados por Wang y Chen (2009), quienes encontraron 93 mg Pb/g de biomasa seca inactiva de *A. niger*, en una solución con un valor de pH de 6. Como puede verse, a pH 3, la capacidad de biosorción fue menor para *A. niger* (1.6 ± 1.4 mg Pb/g BMS) con respecto a *Lewia* sp. (40.1 ± 0.5 mg Pb/g BMS). Lo anterior, podría atribuirse a que a valores bajos de pH, la concentración de protones (H^+) se incrementa y la biosorción de metales disminuye por efecto de un aumento en la densidad de cargas positivas en los sitios de unión de los metales. Es decir, los iones H^+ compiten eficazmente con los iones metálicos por los sitios de unión, efecto que disminuye con el aumento del pH (Say, *et al.*, 2001; Akar y Tunali, 2006).

Es importante destacar que la biomasa inactiva removió significativamente más Pb de la solución que la biomasa activa (viva), aumentando la capacidad de biosorción en ~58 % para *A. niger* y ~30 % para *Lewia* sp. Así, de acuerdo con los resultados obtenidos, se estableció que las mejores condiciones para llevar a cabo la biosorción de Pb en solución, es el empleo de un sistema con biomasa inactiva a pH 6. Con base en lo anterior, se llevó a cabo una cinética de biosorción de Pb a pH 6, durante 72 h, con el propósito de determinar el tiempo en el que una concentración de 1 g/L de biomasa inactiva alcanza su máxima capacidad de biosorción de Pb. Los resultados de la cinética se muestran en la Figura 6.7.

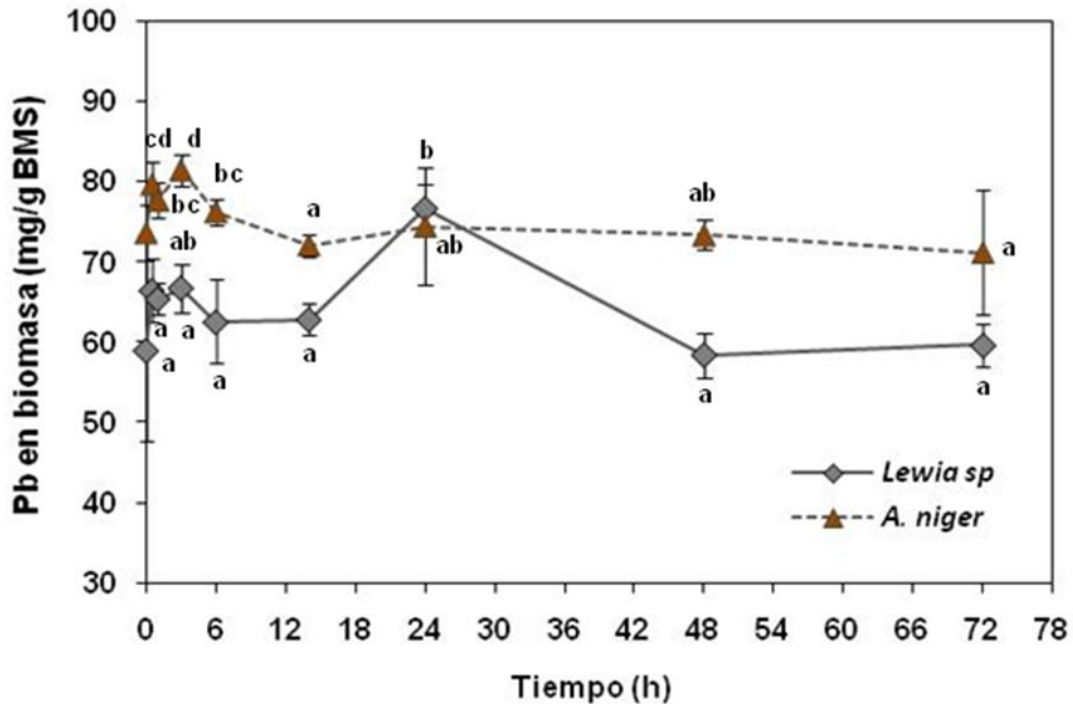


Figura 6.7 Capacidades de biosorción de Pb por biomasa muerta (1 g/L) de *Lewia sp.* y *A. niger* a pH 6. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan, $p < 0.05$).

Bajo las condiciones ensayadas, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las capacidades de biosorción de biomasa inactiva de *Lewia sp.* y de *A. niger* con respecto al tiempo. En ambos casos, se encontró que el Pb es rápidamente sorbido durante los primeros 30 min de contacto, por ambos tipos de biomasa, alcanzando valores de 66.4 ± 4.0 y 79.6 ± 2.7 mg Pb/g BMS para *Lewia sp.* y *A. niger*, respectivamente. De forma similar, Akar *et al.* (2005), determinaron una biosorción (~ 20 mg Pb/g BM) de iones de Pb en biomasa inactiva de *Botrytis cinerea* desde los 30 min de contacto, partiendo de una solución con 100 mg Pb/L. Bahadir *et al.* (2007), también encontraron la máxima capacidad de biosorción (2.3 mg/g BM) de Pb de un agua residual (3.1 mg/L) por biomasa inactiva de *Rhizopus arrhizus* en 1.5 h.

De acuerdo con los resultados obtenidos para 72 h de contacto, la mayor capacidad de biosorción correspondió a *A. niger*, con un valor de 81.5 ± 1.9 mg Pb/g BMS a las 3 h de contacto. A las 24 h se tuvo un valor de 74.4 ± 7.2 mg Pb/g BMS y, posteriormente, el Pb biosorbido se mantuvo sin cambios significativos hasta las 72 h. En el caso de la biomasa de *Lewia* sp., la mayor capacidad de biosorción se alcanzó a las 24 h de contacto, encontrando un valor de 76.7 ± 2.8 mg Pb/g BMS.

Si se compara la capacidad de biosorción de Pb por biomasa inactiva de *A. niger* y *Lewia* sp. obtenida en este estudio con resultados reportados en la literatura, puede decirse que la biomasa de ambos hongos podría considerarse como un biosorbente efectivo para la remoción de Pb a partir de soluciones diluidas, ya que los valores de biosorción encontrados se encuentran dentro del rango adecuado para tal propósito (Wang y Cheng, 2009; Ahluwalia y Goyal, 2007). Por ejemplo, Dursun (2006), reportó una capacidad de biosorción de 32.6 mg Pb/g de biomasa de *A. niger* pretratada con NaOH. Yan y Viraraghavan (2003), reportaron una capacidad de biosorción de iones de Pb^{2+} de 53.7 mg/g de biomasa muerta de *Mucor rouxii*. Say *et al.* (2001) encontraron que la máxima capacidad de biosorción de Pb (45.2 mg/g BM) por biomasa de *P. chrysosporium* se obtuvo a pH 6. Uslu (1999), reportó una capacidad de biosorción de Pb de 36.4 mg/g de biomasa inactiva de *R. arrhizus* a un pH cercano a 6.

Como se puede apreciar, existe una variedad de biomazas fúngicas que han demostrado una gran capacidad para actuar como biosorbentes altamente eficientes en la eliminación de metales. Cabe mencionar, que esta tecnología no tiene necesariamente que reemplazar a los tratamientos existentes, pero sí puede actuar como un sistema de pulimiento para procesos que no resultan completamente eficientes, como la remoción de metales en soluciones diluidas, especialmente cuando la concentración de iones se encuentra en un rango de 1-100 mg/L (Cañizares-Villanueva, 2000; Bahadir, *et al.*, 2007).

6.4 Recuperación del biosorbente

En caso de que la obtención de biomasa fúngica resulte costosa (elevados costos de preparación y/o transporte), es de suma importancia un proceso de recuperación, mediante la lixiviación de los iones atrapados en ésta. Con esto, es posible disminuir los costos de un proceso, debido a que el biosorbente puede ser reutilizado en un siguiente ciclo de biosorción y también, por la recuperación de metales de importancia económica (Vijayaraghavan y Yun, 2008).

El proceso de desorción requiere de una adecuada selección del agente desorbente y depende, en gran medida, del tipo de biosorbente y del mecanismo de biosorción. Además, el proceso debe cumplir con los siguientes requisitos: i) no causar daño a la biomasa, ii) bajos costos, iii) ambientalmente amigable, y iv) que sea eficaz, es decir, que a bajas concentraciones, permita una máxima recuperación (> 90%) del metal unido al biosorbente (Ferraz, *et al.*, 2004; Atkinson, *et al.*, 1998). No obstante, si la biomasa es obtenida de manera gratuita o con costos mínimos, los metales pueden ser extraídos empleando técnicas destructivas como la incineración o su exposición a ácidos o bases fuertes (Cañizares-Villanueva, 2000; Vijayaraghavan y Yun, 2008).

Así, con el objetivo de evaluar la posible recuperación del biosorbente para su reutilización, se determinó la capacidad de desorción de Pb a partir de biomasa muerta de *Lewia* sp. y *A. niger*, cargada con Pb (2.8 ± 0.3 y 1.7 ± 0.1 mg Pb/g BMS respectivamente). Para esto, se empleó como desorbente una solución de ácido clorhídrico 0.1 M (pH inicial de 1.4), seleccionada con base en su capacidad para modificar el pH del medio y así favorecer la solubilización de los iones de Pb, además de no dañar al biosorbente (Rao, *et al.*, 2005, Puranik y Paknikar, 1999). En la Figura 6.8 se muestran los resultados obtenidos.

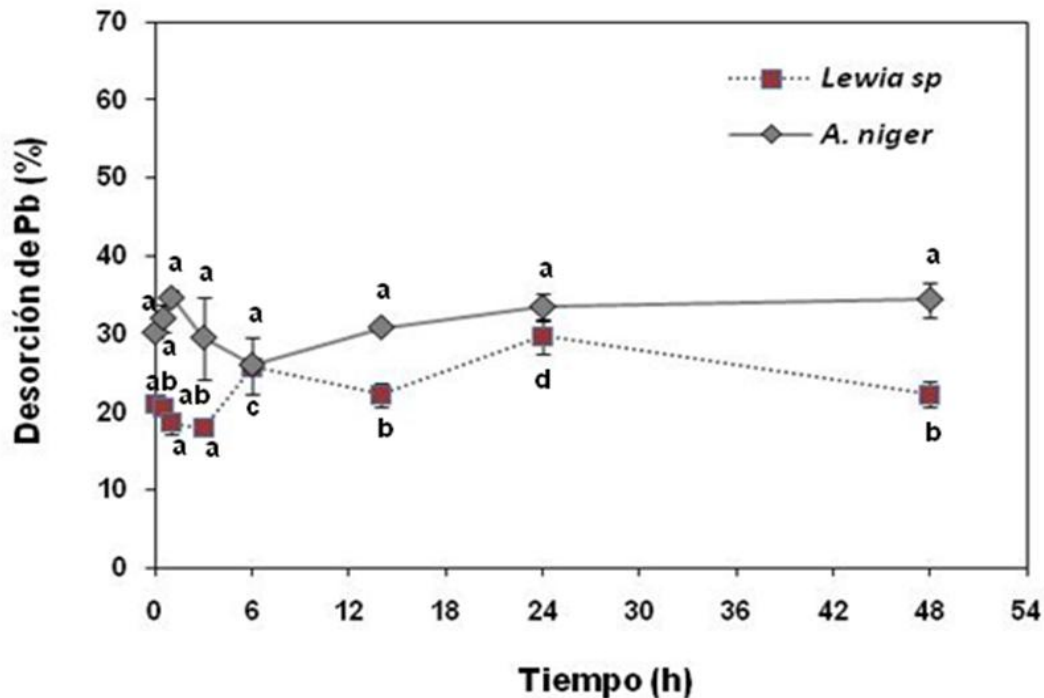


Figura 6.8 Cinética de desorción de plomo a partir de biomasa (10 g/L) de *Lewia sp.* y *A. niger*, utilizando ácido clorhídrico (0.1 M) como solución desorbente. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Duncan, $p < 0.05$).

Se encontró que con la solución desorbente probada se obtuvo una máxima capacidad de desorción de 34.6 ± 0.93 y $29.6 \pm 2.3\%$ para *A. niger* y *Lewia sp.*, a un tiempo de contacto de 1 y 24 h, respectivamente. Asimismo, se encontró que la solución desorbente solubilizó el Pb sorbido en biomasa desde los primeros minutos de contacto (tiempo inicial).

Pundir y Dastidar (2010), determinaron que una solución de HCl 1.0 M permitió una lixiviación rápida de iones de Cu y Ni sorbidos en biomasa de *A. flavus*, estableciéndose un equilibrio en los primeros 15 min de contacto. Ferraz *et al.* (2004), encontraron que con una solución de HCl 0.5 M, se alcanza una máxima desorción de Cr(III) sorbidos en biomasa de *S. cerevisiae* desde los 5 min de contacto. Lo anterior, puede atribuirse al pH ácido del HCl con que se llevó a

cabo la lixiviación. Bajo tales condiciones, grupos funcionales como carboxilo, carbonilo e hidroxilo, presentes en la pared celular de la biomasa fúngica, se protonan y no atraen a los iones metálicos cargados negativamente, por lo tanto, el metal queda libre en la solución. De acuerdo con Wilde y Benemann (1993) (citados por Ferraz *et al.* (2004)), el pH óptimo para la lixiviación de iones metálicos, corresponde a un valor por debajo del cual no se presenta la sorción de iones, este valor correspondió a un pH de 2 en un estudio realizado por Ferraz y Teixeira (1998).

En el caso de *A. niger*, no se registraron diferencias significativas en la desorción de Pb por efecto del tiempo de contacto, lo que indica que la desorción obtenida desde los 30 min de contacto, es la máxima cantidad de Pb que se puede desorber con esta solución. Similar a nuestros resultados, Pundir y Dastidar (2010), encontraron que el tiempo de contacto de biomasa de *Aspergillus flavus* con una solución 1.0 M de HCl no influyó significativamente en la desorción de iones metálicos después de los 30 min. De forma similar Ferraz *et al.* (2004), señalan que el tiempo de contacto de biomasa de *S. cerevisiae* con una solución 0.1 M de HCl no aumentó la eficiencia de desorción de Cr(III) después de los 5 min.

En el caso de *Lewia* sp. se encontró un incremento significativo en la desorción a partir de las 6 h de contacto, permaneciendo sin cambios significativos hasta las 48 h. Como puede verse (Figura 6.8), los valores de desorción alcanzados corresponden a aproximadamente una tercera parte del Pb total presente en la biomasa contaminada. Debido a lo anterior, es posible decir, que la concentración de la solución desorbente empleada (HCl 0.1 M) no fue eficiente en la desorción de Pb a partir de la biomasa fúngica bajo las condiciones de este estudio. En contraste, Akar *et al.* (2005), obtuvieron hasta 97% de desorción de Pb de biomasa inactiva de *Botrytis cinerea* en 90 min de contacto, utilizando una solución de HCl (10 mM), logrando así la reutilización del biosorbente en 5 ciclos consecutivos de adsorción-desorción. Rao *et al.* (2005), utilizando una solución de HCl 0.1 M lograron desorber ~70 % de iones de Cu^{2+} , Co^{2+} y Cd^{2+} de biomasa muerta de *A. fumigatus*, logrando incorporar

esta biomasa a un siguiente ciclo de reuso. En un estudio realizado por Ferraz *et al.* (2004), determinaron un incremento en la eficiencia de desorción de iones de Cr (III) con el aumento en la concentración de HCl de 0.1 a 0.5 M, indicando, que una concentración de 0.5 M fue suficiente para alcanzar una máxima desorción del metal a partir de biomasa de *S. cerevisiae*.

Las diferencias encontradas en la eficiencia de lixiviación de un metal utilizando HCl, puede deberse a los diferentes parámetros utilizados en cada estudio como son: concentración de la solución, pH, temperatura, concentración de iones metálicos y biomasa y tiempo de contacto.

Así, con base en los resultados obtenidos en este estudio, es probable que la menor capacidad de lixiviación de la solución ensayada (HCl 0.1 M), pueda deberse a la existencia de una alta afinidad de los sitios activos de la pared celular fúngica por los cationes de Pb durante el proceso de biosorción, lo que hace difícil la recuperación del metal usando esta concentración (Hammami, *et al.*, 2007; Ferraz, *et al.*, 2004). Debido a lo anterior, se recomienda ensayar diferentes concentraciones de este ácido con la finalidad de encontrar la concentración adecuada que permita mejorar la desorción del metal de la biomasa.

6.5 Propuesta de las condiciones más adecuadas para el acoplamiento de un sistema de lixiviación-biosorción

En relación a la problemática actual que representa la contaminación de suelos por metales pesados, uno de los objetivos del presente trabajo fue proponer las condiciones para acoplar un sistema de lixiviación-biosorción, con el uso de hongos filamentosos, para la remediación de una matriz sólida contaminada con plomo. Con base en las condiciones evaluadas en este estudio, a continuación se proponen las condiciones en las que podría llevarse a cabo la remediación de una matriz contaminada con plomo, mediante el uso de un sistema de lixiviación química y de sorción biológica.

(I) Etapa de lixiviación o solubilización química de plomo. Para la extracción eficiente de plomo a partir de materiales porosos contaminados, como la agrolita, se propone utilizar una solución de EDTA con una concentración tal que su relación estequiométrica con respecto a la concentración de plomo en el material sólido sea entre 7 y 20 veces mayor. El resultado de esta etapa permitirá tener en solución al metal para su posterior recuperación mediante un proceso de biosorción. Este tipo de sistemas tiene la ventaja de permitir una alta efectividad en la solubilización de los iones metálicos contenidos en materiales contaminados, a través de la formación de complejos solubles que son estables en un amplio rango de pH (Wasay *et al.*, 1998).

(II) Etapa de biosorción de Pb soluble en biomasa fúngica. Con base en los resultados, en esta etapa se propone utilizar biomasa inactiva de *A. niger*, y ajustar el pH inicial de la solución a tratar a un valor de 6. Asimismo, es recomendable dejar en contacto la biomasa con la solución durante un periodo de al menos, 30 min. De acuerdo con nuestros resultados, es posible recomendar el uso de biomasa inactiva de *A. niger* para remover plomo a partir de soluciones diluidas (1-100 mg/L). Así, los niveles de biosorción obtenidos para ambos tipos de biomasa, particularmente la de *A. niger* inactiva, sugieren que su uso como biosorbentes puede ser efectivo.

En relación a la recuperación de biomasa y, con base en estos resultados, se sugiere evaluar el efecto de soluciones de HCl con concentraciones > 0.1 M, para mejorar la eficiencia de lixiviación del metal. Se sugiere el uso de este ácido debido a ventajas como su bajo costo, a su eficiencia demostrada (Ferraz *et al.*, 2004; Rao *et al.*, 2005; Akar *et al.*, 2005) y a que no causa daño a la biomasa.

Bajo las condiciones aquí estudiadas, se puede decir que es posible llevar a cabo la remediación de una matriz sólida contaminada con Pb mediante el sistema propuesto, acoplado una etapa de lixiviación química, usando una solución de EDTA con una concentración entre 7-20 veces más con respecto al

Pb de acuerdo a la relación estequiométrica, con una etapa de biosorción con biomasa muerta de *A. niger*, ajustando el pH de la solución a un valor de 6.

Así, los datos obtenidos arrojan resultados que pueden ser utilizados como referencia en estudios posteriores de remediación de matrices contaminadas con metales pesados.

VII. CONCLUSIONES

1. El EDTA fue más eficiente que el ácido cítrico para lixiviar plomo a partir de agrolita contaminada, obteniendo porcentajes de lixiviación de hasta 100% en 2 h, cuando se uso una concentración 0.5 mM.
2. El uso de bajas concentraciones de ácido cítrico (0.20 y 0.35 mM) provocaron un aumento en el pH, disminuyendo significativamente la capacidad de lixiviación de plomo, alcanzando un valor máximo de 75.2 ± 1.5 % en 2 h.
3. No se encontraron diferencias significativas en la producción de ácido cítrico por *Aspergillus niger* en agrolita, por efecto de la concentración inicial de Pb, en un rango de 0 a 1000 mg/kg. Bajo tales condiciones, *A. niger* produjo una concentración máxima de ácido cítrico de 6.9 ± 0.3 g/L (35.7 ± 1.7 mM), en el medio sin plomo. No obstante, esta concentración no fue suficiente para biolixiviar el Pb contenido en el soporte.
4. La capacidad de biosorción de Pb por biomasa inactiva de *A. niger* y *Lewia* sp. fue mayor (~58 y 30%, respectivamente) que la obtenida con biomasa activa. La mayor capacidad de biosorción (81.5 y 76.7 mg Pb/g BMS para *A. niger* y *Lewia* sp., respectivamente) en biomasa inactiva se obtuvo a pH 6.
5. Para la descontaminación de un soporte contaminado con plomo mediante un sistema de lixiviación-biosorción pueden recomendarse las siguientes condiciones:
 - a) Para la etapa de lixiviación, es recomendable utilizar EDTA en una concentración tal que su relación estequiométrica con el plomo contenido en la matriz sea entre 7 y 20 veces mayor.
 - b) Para la etapa de biosorción, se propone ajustar a 6 el pH de la solución y emplear biomasa inactiva de *A. niger* en concentración no menor a 1 g/L., permitiendo el contacto durante al menos 30 min.
 - c) Para determinar la capacidad de reutilización de la biomasa usada para la biosorción, es recomendable llevar a cabo estudios con

soluciones más concentradas ($> 0.1 \text{ M}$) de diferentes ácidos (orgánicos e inorgánicos).

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agency of Toxic Substances and Disease Register (ATSDR). 2007. Toxicological Profile for lead. U. S. Department of health and human services. 35-46 y 277-280 p.
- Ahluwalia S.S., Goyal D. 2007. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresource Technology*. 98: 2243-2257.
- Akar T., Tunali S., Kiran I. 2005. *Botrytis cinerea* as a new fungal biosorbent for removal of Pb (II) from aqueous solutions. *Biochemical Engineering Journal*. 25: 227-235.
- Akar T., Tunali S. 2006. Biosorption characteristics of *Aspergillus flavus* biomass for removal of Pb (II) and Cu (II) ions from an aqueous solution. *Bioresource Technology*. 97: 1780-1787.
- Alloway B.J. 1990. Soil processes and the behavior of metals. *Heavy Metals in Soils. Blackie Academic and Professional*, Glasgow. 7-28 pp.
- Alloway B.J. 1995. Heavy Metals in Soils. *Blackie Academic and Professional*. London. 370 pp.
- Angumeenal A.R., Venkappayya D. 2004. Growth kinetics of heavy metal adapted *Aspergillus niger* during citric acid biosynthesis. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 63: 610-613.
- Anjum F., Nawaz B. H., Asgher M., Shahid M. 2010. Leaching of metal ions from black shale by organic acids produced by *Aspergillus niger*. *Applied Clay Science*. 47: 356-361.
- Arwidsson Z., Johansson E., Von Kronhelm T., Allard B., Van Hees, P. 2010. Remediation of metal contaminated soil by organic metabolites from fungi I. Production of organic acids. *Water Air and Soil Pollut*. 205: 215-226.
- Atkinson B.W., Box F., Kusan H.C. 1998. Considerations for application of biosorption technology to remediate metal contaminated industrial effluents. *Water SA*. 24:129-135.

- Bahadir T., Bakan G., Altas L., Buyukgungor H. 2007. The investigation of lead removal by biosorption: An application at storage battery industry wastewaters. *Enzyme and Microbial Technology*. 41: 98-102.
- Bellion M., Courbout M., Jacob C., Blaudez D., Chalot M. 2006. Extracellular and cellular mechanisms sustaining metal tolerance in ectomycorrhizal fungi. *FEMS Microbiology Letters*. 254: 173-181.
- Calabrese E.J., Bachmann K.A., Bailer A.J., Bolger P.M., Borak J. 2007. Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and reconditioning stress within a hermetic dose–response framework. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 222: 122–128.
- Cámara Minera de México.
<http://camimex.org.mx/publicaciones/suplemento3.pdf>, consultado el 10 de marzo de 2010.
- Cañizares-Villanueva R.O. 2000. Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 42: 131-143.
- Chaney R.L., Malik M., Li Y.M., Brown S.L., Brewer E.P., Angle J.S., Baker A.J. 1997. Phytoremediation of soils metals. *Current Opinion in Biotechnology*, 8:279-284.
- Chen Z.S. 1992. Metal contamination of flood soils, rice plants and surface water in Asia. *Biogeochemistry of trace metals*. 85-108.
- Chojnacka K. 2010. Biosorption and bioaccumulation – the prospects for practical applications. *Environment International*. 36: 299-307.
- Cortinas de Nava C. 1998. Manejo ambiental de los relaves o jales mineros. *Gaceta Ecológica*, México, 46 pp.
- Cuizano N.A., Navarro A.E. 2008. Biosorción de metales pesados por algas marinas: posible solución a la contaminación a bajas concentraciones. *Química y Medio Ambiente*, 104(2): 120-125.

Dean J.A. 1999. Lange's Handbook of Chemistry. Fifteenth Edition. McGraw-Hill Book Company.

Dursun A.Y. 2006. A comparative study on determination of the equilibrium, kinetic and thermodynamic parameters of biosorption of copper (II) and lead (II) ions onto pretreated *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*. 28: 187-195.

Ferraz A. I., Teixeira J.A. 1998. The use of flocculating Brewer's yeast for Cr(III) and Pb(II) removal from residual wastewater. *Bioprocess Engineering*. 21: 431-437.

Ferraz A.I., Tavares T., Teixeira J.A. 2004. Cr(III) removal and recovery from *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemical Engineering Journal*. 105: 11-20.

Gadd G.M. 1993. Interactions of fungi with toxic metals. *New Phytologist*. 124: 25-60.

Goyal N., Jain S.C., Banerjee U.C. 2003. Comparative studies on the microbial adsorption of heavy metals. *Advances in Environmental Research*. 7: 311-319.

Hammami A., González F., Ballester A., Blázquez M.L. 2007. Biosorption of heavy metals by activated sludge and their desorption characteristics. *Journal of Environmental Management*. 84: 419-426.

Instituto Nacional de Ecología (INE).

<http://www.ine.gob.mx/sqre-temas/763-agre-metales>, consultado el 15 de febrero de 2010.

Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI).

<http://cuentame.inegi.gob.mx/impresion/economia/mineria.asp>, consultado el 3 de febrero de 2010.

Karnika A. H., Reddy R. S., Saradhi S. V., Bondii S. J., Suryanarayana V., Venkateshwar P. 2007. Biosorption: An eco-friendly alternative for heavy metal removal. *African Journal of Biotechnology*. 6 (25): 2924-2931.

- Kim C., Lee Y., Ong S.K. 2003. Factors affecting EDTA extraction of lead from lead-contaminated soils. *Chemosphere*. 51: 845-853.
- Kwaśna H., Kosiak B. 2003. *Lewia avernicola* sp. and its *Alternaria* amorph from oat grain, with a key to the species of *Lewia*. *Mycological Research*. 107: 371-376.
- Labanowski J., Monna F., Bermond A., Cambier P., Fernandez C., Lamy I., Van Oort F. 2008. Kinetic extractions to asses mobilization of Zn, Pb, Cu and Cd in a metal-contaminated soil: EDTA vs citrate. *Environmental Pollution*. 152: 693-701.
- Lasat M. 2001. The uses of plant for removal of toxic metal from contaminated soil. US-EPA.
- LENNTECH. <http://www.lenntech.es/metales-pesados.htm>. *Metales pesados*. Consultado el 15 de febrero de 2010.
- Lestan D., Luo Chun, Li Xiang. 2008. The use of chelating agents in the remediation of metal-contamiated soils : A review. *Environmental Pollution*. 153: 3-13.
- Liesko I., Lois I., Szebenyi G. 1999. Tailings as a source of environmental pollution. *Water Science Technology*. 39 (10-11): 333-336.
- Malik A. 2004. Metal bioremediation through growing cells. *Environment International*. 30: 261-278.
- Martínez D.A., Landini A.M., Svartz H., Vence L., Bottini L., Mascarini L., Orden S., Villela, F. 2006. Propiedades físicas e hidráulicas de perlita en cultivos de rosa y sus variaciones temporales. *Ciencia del Suelo*. 24(2): 177-182.
- Meena A.K., Kardirvelu K., Mishra G.K., Rajagopal C., Nagar P.N. 2008. Adsorptive removal of heavy metals from aqueous solution by treated sawdust (*Acacia Arabica*). *Journal of Hazardous Materials*. 150: 604-611.

- Mulligan C.N., Kamali M., Gibbs B.F. 2004. Bioleaching of heavy metals from a low-grade mining ore using *Aspergillus niger*. *Journal of Hazardous Materials*. 110: 77-84.
- Nilanjana D., Vimala R., Karthika P. 2008. Biosorption of heavy metals – An overview. *Indian Journal of Biotechnology*. 7: 159-169.
- Norandi M. 2005. Arsénico, plaguicidas, petróleo: la creciente contaminación del agua. *La Jornada*. Edición especial. 52-62.
- Pineda H.R. 2004. Presencia de hongos micorrízicos arbusculares y contribución de *Glomus intraradices* en la absorción y traslocación de cinc y cobre en girasol (*Helianthus annuus L.*) crecido en un suelo contaminado con residuos de mina. Tesis doctoral. Universidad de Colima.
- Pundir R., Dastidar M. G. 2010. Recovery of Cu and Ni ions from metals-loaded fungal biomass using acidic eluent. *International Journal of Chemical and Environmental Engineering*. 1: 63-66.
- Puranik P.R., Paknikar K.M. 1999. Biosorption of lead, cadmium and zinc by *Citrobacter* strain MCM B-181: characterization studies. *Biotechnology Progress*. 15: 228-237.
- Rao K.R., Rashmi K., Lavanya L.J.N., Maruthi M. P. 2005. Bioremediation of toxic metal ions using biomass of *Aspergillus fumigatus* from fermentative waste. *Indian Journal of Biotechnology*. 4: 139-143.
- Ren Wan-Xia, Pei-jun Li, Yong Geng, Xiao-Jun Li. 2009. Biological leaching of heavy metals from a contaminated soil by *Aspergillus niger*. *Journal of Hazardous Materials*, 167: 164-169.
- Ringbom A. 1979. Formación de complejos en Química Analítica. 1ª edición. Editorial Alhambra, S. A.
- Rodríguez-Luna W.T. 2009. Estudio de la remoción vía microbiana de Ni y V presentes en catalizadores gastados. Tesis de Maestría, *Posgrado en Tecnología Avanzada*. Instituto Politécnico Nacional. 70 pp.

- Rojas-Loria C.C. 2010. Efecto de la interacción hongo - *Dodonaea viscosa* L. Jacq en la fitorremediación de plomo en un sistema *in vitro*. Tesis de Maestría, *Posgrado en Biotecnología*. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. 79 pp.
- Sánchez-Soto J.M. 2005. Efecto de la composición del medio de cultivo en el metabolismo de *Aspergillus niger* 10 en fermentación en medio sólido. Tesis de Maestría, *Posgrado en Biotecnología*. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
- Sari A., Tuzen M., Citak D., Soylak M. 2007. Adsorption characteristics of Cu (II) and Pb(II) onto expanded perlite from aqueous solution. *Journal of Hazardous Materials*. 148: 387-394.
- Say R., Denizli A., Yapup A.M. 2001. Biosorption of cadmium(II), lead(II) and copper(II) with the filamentous fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresource Technology*. 76: (67-70).
- Schuster E., Coleman N.D., Frisvad J., Van Dijck P. 2002. On the safety of *Aspergillus niger* – a review. *Applied Microbiology and Biothechnology*. 59: 426-435.
- Simmons E.G. 1986. *Alternaria* themes and variations. *Mycotaxon*. 25: 203-216.
- Skoog D.A., West D. M., Holler F. J., Crouch S. R. 2001. Química Analítica. 7ª edición. McGraw-Hill Interamericana Editores, S. A. de C. V.
- Srivastava N.K., Majumder C.B. 2008. Novel biofiltration methods for the treatment of heavy metals from industrial wastewater. *Journal of Hazardous Materials*. 151: 1-8.
- Suárez P., Reyes R. 2002. La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia para el ambiente. *Interciencia*. 27: 160-164.
- Torres R.A., Juvina P.J. 2005. Desarrollo e implementación de un sistema de monitorización mediante sensores químicos de un proceso de biosorción para la recuperación de ión cobre (II) en efluentes acuosos. Universitat

Politécnica de Catalunya. Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Industrial de Barcelona.

- U. S. Geological Survey (USGS). 2006. Minerals Yearbook. Disponible en: http://minerals.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/stone_dimension/myb1-2006-stond.pdf. Consultado el 23 de febrero de 2010.
- Uslu G. 1999. The effects of cadmium (II), lead(II) and copper(II) ions on the growth kinetics of *R. arrhizus* and their adsorption. Ph. D.Thesis, Firat University, Elazig, Turkey.
- Vijayaraghvan K., Yun Y.S. 2008. Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology Advances*, 26: 266-291.
- Volesky B., Holan Z.R. 1995. Biosorption of heavy metals. *Biotechnology Progress*. 11: 235-250.
- Volke-Sepúlveda T., Velasco T.J., de la Rosa P.D. 2005. Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. 1ª Edición. *Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología*, México. 141 pp.
- Vullo D.L., 2003. Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Química Viva*, 2: 1-12.
- Wang J., Chen C. 2009. Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances*. 27: 195-226.
- Wasay S.A. 1998. Bioremediation of soils polluted by heavy metals using organic acids. Ph. D. Thesis, Macdonald Campus of McGill University, Quebec, Canada.
- Wasay S.A., Barrington S., Tokunaga S. 1998. Remediation of soils polluted by heavy metals using salts of organic acids and chelating agents. *Environmental Technology*. 19: 369-380.
- Wilde E.W., Benemann J.R. 1993. Bioremoval of heavy metals by the use of microalgae. *Biotechnology Advances*. 11: 781-812.

Yan G., Viraraghavan T. 2003. Heavy metal removal from aqueous solution by fungus *Mucor rouxii*. *Water Research*. 37: 4486-4496.

Zouboulis A. I., Matis K. A. Loukidou M. 2003. Metal biosorption by PAN-immobilized fungal biomass in simulated wastewaters. *Colloids and Surfaces*. 212: 185-195.