



“Estudio de las Interacciones entre Metales y Componentes Celulares Bacterianos y su Aplicación en Biotratamiento de Aguas Residuales”

TESIS DOCTORAL

Lic. María Pia Busnelli

Directora: Dra. Diana L. Vullo

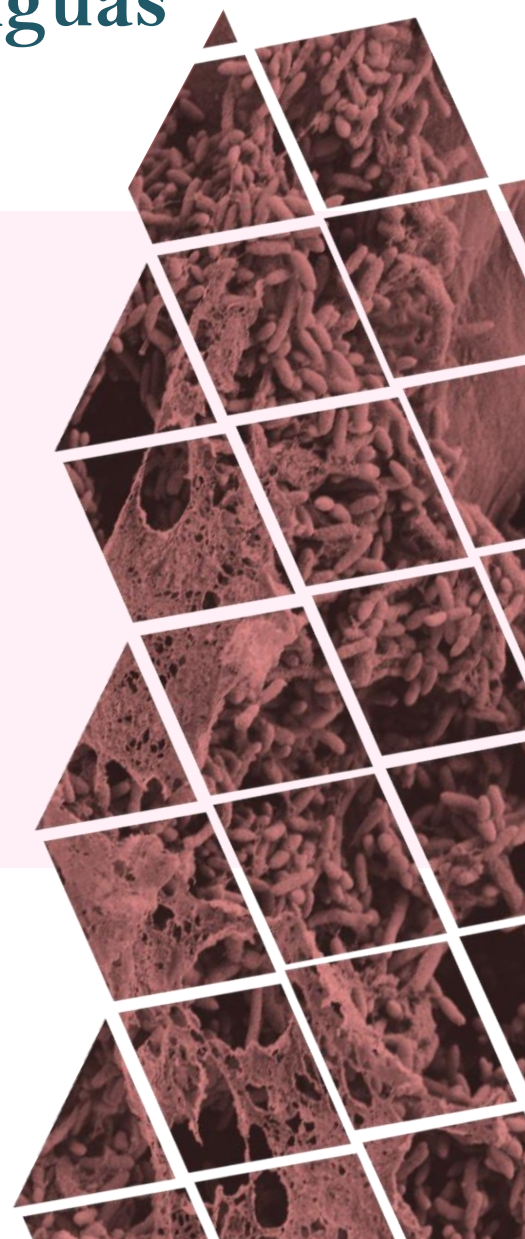
CONICET



Consejo Nacional de Investigaciones
Científicas y Técnicas



Universidad Nacional de
General Sarmiento
Instituto de Ciencias



DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

***“ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES ENTRE METALES Y
COMPONENTES CELULARES BACTERIANOS Y SU APLICACIÓN EN
BIOTRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES”***

Trabajo de tesis para optar por el título de Doctor en Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de General Sarmiento.

Autor: **María Pia Busnelli**

Director: Dra. Diana Lía Vullo

Fecha: (formato -- de marzo de 2021)

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

- h. Director de la Tesis (Apellidos y Nombres): Dra. Vullo Diana Lía
- i. Tutor de la Tesis (Apellidos y Nombres): Dra. Vullo Diana Lía
- j. Colaboradores con el trabajo de Tesis: ---
- k. Descripción física del trabajo de Tesis (cantidad total de páginas, imágenes, planos, videos, archivos digitales, etc.):

Cantidad total de Páginas:178 (ciento setenta y ocho).

Figuras: 54 (cincuenta y cuatro).

Tablas: 22 (veintidós).

Archivos digitales: 0 (cero).
- l. Alcance geográfico y/o temporal de la Tesis: ---
- m. Temas tratados en la Tesis (palabras claves): *Pseudomonas veronii* 2E; Sustancias Poliméricas Extracelulares; Biorreactores; Biosorción; Cobre; Inmovilización
- n. Resumen en español (hasta 1000 caracteres):

El objetivo de esta tesis fue utilizar células completas o subproductos de *Pseudomonas veronii* 2E, para eliminar cobre de efluentes y así desarrollar un sistema de biotratamiento eficaz. El trabajo consta de tres partes, en la primera parte, se estudió la interacción bacteria-Cu(II), obteniendo una retención del 90% y una recuperación del 70% de cobre. La segunda parte consistió en la inmovilización de la biomasa sobre diferentes soportes. Se estudiaron diversos diseños de biorreactores, alcanzando una biosorción del 71% (24 h) y 77% (216 h) del metal y una recuperación del 70% y 96% para reactores *batch* y continuos respectivamente, a 32 °C y pH 5,5. Finalmente, en la tercera parte del trabajo se aislaron las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) producidas por las bacterias para estudiar su interacción con cobre, obteniendo un 80% de retención, del cual se recuperó el 73%. Estos resultados son prometedores para la implementación de un biotratamiento a escala de laboratorio, sin embargo, también representa un primer paso necesario para la implementación de un biotratamiento de efluentes conteniendo Cu(II) sostenible a escala industrial.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

o. Resumen en portugués (hasta 1000 caracteres):

O objetivo desta tese foi a utilização de células inteiras ou subprodutos de *Pseudomonas veronii* 2E, para eliminar o cobre dos efluentes e assim desenvolver um sistema de biotratamento eficaz. O trabalho consiste em três partes, na primeira parte foi estudada a interação bactéria-Cu(II), obtendo-se uma retenção de 90% e uma recuperação de 70% do cobre. A segunda parte consistiu na imobilização da biomassa em diferentes suportes. Diferentes tipos de projetos de biorreatores foram estudados, alcançando uma bio sorção de 71% (24 h) e 77% (216 h) do metal e uma recuperação de 70% e 96% para reatores em batelada e contínuos, respectivamente, a 32 °C e pH 5.5. Por fim, na terceira parte do trabalho, as substâncias poliméricas extracelulares (EPS) foram isoladas da bactéria e sua interação com o cobre foi estudada, obtendo-se um 80% de retenção de Cu(II), dos quais o 73% foi recuperado. Esses resultados são promissores para a implementação de um biotratamento em escala de laboratório, porém, também representam um primeiro passo necessário para a implementação de um biotratamento de efluentes contendo Cu(II) em escala industrial.

p. Resumen en inglés (hasta 1000 caracteres):

The aim of this thesis was to use whole cells or excretion products of *Pseudomonas veronii* 2E, to remove copper from effluents for the development of a biotreatment system. For that purpose, the work was divided in three parts. In the first one, the interaction of bacteria-Cu(II) was studied, achieving a 90% of biosorption and 70% of the metal desorption. The second part consisted on the biomass immobilization studies on different matrices. In addition, types of bioreactor designs were studied, as a result, a metal biosorption of 71% (24 h) and 77% (216 h) and a recovery of 70% and 96% were obtained for batch and continuous reactors respectively, at 32 °C and pH 5.5. Finally, the third part of the work consisted on extracting the soluble extracellular polymeric substances (EPS) from bacterial cultures and on studying their interaction with copper, obtaining 80% retention, from which a 73% was recovered. The results obtained in this work are promissory for the implementation of a biotreatment at laboratory scale, however, it also represents the necessary first step for development of a sustainable biotreatment of effluents containing Cu(II) at industrial scale.

q. Aprobado por (Apellidos y Nombres del Jurado):

- ❖ Dr. Pablo Marcelo Fernández.
- ❖ Dra. Raquel Ofelia Bielsa.
- ❖ Dra. Sandra Mónica Ruzal.

Firma y aclaración de la firma del Presidente del Jurado:

Firma del autor de la tesis: Lic. Busnelli María Pia

***“ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES ENTRE METALES Y
COMPONENTES CELULARES BACTERIANOS Y SU APLICACIÓN EN
BIOTRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES”***

Publicaciones:

❖ Trabajos en revistas con referato:

Copper removal mediated by *Pseudomonas veronii* 2E in batch and continuous reactors.

M.P. Busnelli, D.L. Vullo (2020); Publicado en Journal of Sustainable Development of Energy, Water and Environmental Systems – JSDEWES; Volume X, Issue Y, 1080351.

(HYPERLINK “<http://dx.doi.org/10.13044/j.sdewes.d8.0351>”)

❖ Trabajos publicados en congresos científicos:

“Cu(II) biorecovery from electroplating effluents mediated by *Pseudomonas veronii* 2E”.

M.P. Busnelli, D.L. Vullo. Trabajo presentado como comunicación oral por M.P. Busnelli y publicado en Proceedings 2nd Latin American Sustainable Development of Energy, Water and Environment Systems (SDEWES) Conference Buenos Aires 2020 (ISSN 2706-3674). Editorial: Publisher Faculty of Mechanical Engineering and Naval Architecture, Zagreb. Editores: Marko Ban Neven Duić Daniel Rolph Schneider Zvonimir Guzović.

“Sistemas de tratamiento de efluentes con cobre mediados por *Pseudomonas veronii* 2E inmovilizada en matriz inerte”.

M.P. Busnelli, D.L. Vullo. Trabajo presentado como en formato póster en Congreso Argentino de Microbiología General – SAMIGE, Bs. As. – Argentina, 2019.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

Resumen publicado en actas de XV Congreso Argentino de Microbiología de Alimentos (V CAMA), V Congreso Latinoamericano de Microbiología de Medicamentos y Cosméticos (CLAMME 2019), XIV Congreso Argentino de Microbiología General (XIV SAMIGE), Buenos Aires 25 – 27 de septiembre, 2019, pág 501, ISBN: 978-98746701-5-1. Compilado por Paula Gagetti; María Victoria Preciado; María Alejandra Picconi. 1ª ed. – ciudad Autónoma de Buenos Aires; Asociación Argentina de Microbiología.

❖ Trabajos publicados en congresos y reuniones científicas:

***Pseudomonas veronii* 2E - mediated copper recovery from a model effluent**

M.P. Busnelli, D.L. Vullo. Trabajo presentado en formato póster en Reunión Conjunta SAIB-SAMIGE 2020.

Estudio de las interacciones entre Cobre y componentes celulares bacterianos y su aplicación en biotratamientos de aguas residuales

M.P. Busnelli, D.L. Vullo. Trabajo presentado como comunicación oral por M.P. Busnelli en. Jornadas de Investigación Área Química: Universidad Nacional de General Sarmiento. Los Polvorines – Bs. As., 01 de Marzo de 2020.

Estudio de las interacciones entre Cobre y componentes celulares bacterianos y su aplicación en biotratamientos de aguas residuales

M.P. Busnelli, D.L. Vullo. Trabajo presentado como comunicación oral por M.P. Busnelli en. Jornadas de Investigación Área Química: Universidad Nacional de General Sarmiento. Los Polvorines – Bs. As., 01 de Marzo de 2019.

Procesos de biosorción y recuperación de Cu(II) en reactores a escala laboratorio basados en células inmovilizadas de *Pseudomonas veronii* 2E sobre diferentes matrices

M.P. Busnelli, D.L. Vullo; Trabajo presentado en formato póster en XXIV congreso ALAM 2018 (Asociación Latinoamericana de Microbiología) Santiago – Chile, 2018.

Non pathogenic *Pseudomonas* for mining wastewater biotreatments: metal sensing and recovery and thiocyanate degradation

I.C. Lazzarini Behrmann, Y.Y. Dutra Alcoba, M.P. Busnelli, M.L. Ferreira, R.J. Candal, S.A. Ramirez and D.L. Vullo. Trabajo presentado en formato póster en ASM Microbe. Año 2018. Atlanta - EEUU.

DOCTORADO EN CIENCIA Y TECNOLOGIA

Evaluado y acreditado por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria (CONEAU). Resolución N° 1178/11. Calificación "B".

Estudio de las interacciones entre Cobre y componentes celulares bacterianos y su aplicación en biotratamientos de aguas residuales

M.P. Busnelli, D.L. Vullo. Trabajo presentado como comunicación oral por M.P. Busnelli en Jornadas de Investigación Área Química: Universidad Nacional de General Sarmiento. Los Polvorines – Bs. As., 01 de Marzo de 2018.

***Pseudomonas veronii* 2E: a multitask strain for environmental biotechnology**

M.P. Busnelli, M.L. Ferreira, I.C. Lazzarini Behrmann, G.A. Querejeta, R.J. Candal, S.A. Ramirez and D.L. Vullo. Trabajo presentado en formato póster en ASM Microbe, 2017. Nueva Orleans – EEUU.

Cu(II) biosorption mediated by *Pseudomonas veronii* 2E cells and extracellular products in batch and continuous reactors

M.P. Busnelli, D.L. Vullo. Trabajo presentado en formato póster en XII Congreso Argentino de Microbiología General – SAMIGE, Tucumán – Argentina, 2017.

Captación de Cobre mediada por diferentes tipos de crecimiento bacteriano para tratamientos de efluentes de galvanoplastia

M.P. Busnelli, D.L. Vullo. Trabajo presentado como comunicación oral por M.P. Busnelli en III Jornadas de Investigadores en formación del Instituto de Ciencias - Universidad Nacional de General Sarmiento (UNGS), Los Polvorines - Bs As, 2017.

Estudio de las interacciones entre Cobre y componentes celulares bacterianos y su aplicación en biotratamientos de aguas residuales

M.P. Busnelli, D.L. Vullo. Trabajo presentado como comunicación oral por M.P. Busnelli en Jornadas de Investigación Área Química: Universidad Nacional de General Sarmiento. Los Polvorines – Bs. As., 01 de Marzo de 2017.

Aportes Originales:

(Especificar cuales son los aportes originales o innovadores conseguidos en la realización de esta tesis. Indicar donde se encuentran. Máximo una carilla)

Pseudomonas veronii 2E es una bacteria autóctona, aislada del Río Reconquista, el cual se encuentra altamente polucionado con metales de relevancia ambiental debido a las diferentes descargas de cuerpos de aguas que recibe a lo largo de su recorrido, entre ellos efluentes

industriales. Se han llevado a cabo diversos estudios de *P. veronii* 2E por el grupo de investigación del laboratorio de microbiología de la UNGS evidenciando las diversas características y propiedades que posee la bacteria. Entre muchas de ellas se mencionan la resistencia a crecer en ambientes con elevadas concentraciones de metales de relevancia ambiental, capacidad de producir sideróforos y sustancias poliméricas extracelulares, capacidad de retener cationes metálicos como Cr, Cd, Zn, Cu, etc. Estas características convierten a *Pseudomonas veronii* 2E en un candidato potencial para el desarrollo de biotratamiento de efluentes industriales.

En el Capítulo 1 del presente trabajo se estudió la interacción bacteria-Cu(II), para ello se llevaron a cabo cinéticas de biosorción con biomasa libre en diferentes condiciones de trabajo como temperatura, medios de crecimiento y concentración inicial de metal. Además, se estudió el mecanismo de biosorción de cobre mediada por *P. veronii* 2E por el estudio de Isotermas de biosorción. También se estudió la capacidad de desorción de metal retenido mediante un agente de desorción a través de sucesivos ciclos de desorción en reactores tipo *batch*.

En el Capítulo 2 se estudió la inmovilización de *Pseudomonas veronii* 2E en diferentes matrices por Microscopia de Barrido Electrónico (SEM). Se estudió la interacción de cada sistema (BI-matriz), con un efluente modelo de cobre 1 mM en reactores tanto *batch* como continuo, y luego se evaluó la recuperación de cobre retenido en cada uno.

Por otro lado, se estudió la eficiencia presentada por diferentes diseños de reactores continuos, tanto para la retención como para la recuperación de cobre mediada por la biomasa inmovilizada en una matriz inerte. Para ello, se diseñó por un lado, un reactor continuo con recirculación del efluente y, por otro lado, se construyeron tres reactores continuos conectados uno secuencialmente después del otro. Se analizaron parámetros importantes para un biotratamiento de efluente como tiempo de retención hidráulica, cantidad de biomasa, cantidad inicial de metal, temperatura y pH.

En el Capítulo 3 se aislaron y purificaron las sustancias poliméricas extracelulares solubles de *Pseudomonas veronii* 2E y se estudió la capacidad tanto de retener como desorber cobre en reactores tipo *batch*.

Agradecimientos

Debo decir que en este transitar de emociones, desde mi primer paso en la querida UNGS, tuve el agrado de conocer personas maravillosas. Cada una con su forma peculiar de ser me llegó a lo más hondo, siempre dispuesta a brindarte ayuda cuando la necesitas, a veces pidiéndola...y a veces sin pedirla...Gracias Mery por las innumerables veces que me ayudaste, por los tours en los laboratorios ¡y los tips de ayuda! Gracias Alecita querida por tu apoyo incondicional en tantas ocasiones, tanto en lo profesional como en lo personal!

Gracias a mis compañeras más queridas, Irene y Andrea, por su eterna ayuda, por los momentos compartidos, por esos riquísimos mates y tantas historias. Que gran trío! Ustedes hicieron que valga la pena cada minuto pasado en el laboratorio de micro, y por si fuera poco aguantando mi música! Siempre que las necesité estuvieron ahí, fueron incondicionales para mí, y espero haberles retribuido de la misma manera, las llevo eternamente en mi memoria y corazón.

En estos 5 hermosos años comprendí que no hace falta pensar igual para poder tener una conversación rica en experiencias, opiniones y hasta llegar a entender el punto de vista más contrario a uno. Siendo una oficina con tantas personas quien diría que se lograría...por supuesto...nos llevó cinco años! Me llevo los mejores recuerdos de todos ellos, Marina, Nicolás, Pedro, Soledad, Giselle Q., Carmen Yamila, Guido, Gretel, muchas gracias por los incontables mates compartidos, las charlas de consuelo y ánimo mutuo, las picadas de los viernes ¡que al final fue un solo viernes! y los almuerzos bajo el sol en el campus.

Al grupo de merendadas online en este último tiempo! Ale, Belén, Gri, Peque, Ire y Andre, por esos mates y risas compartidas! Gracias por las charlas y la ayuda que cada uno me brindó!

A los queridos profesores Silvana B., Silvana R., Henry, Eduardo, Helena, Silvia y a todos los profesores que siempre me brindaron ayuda cada vez que acudí a ellos, eternamente agradecida con cada uno. Ustedes me ayudaron a crecer

profesionalmente, y me transmitieron la pasión y el amor al arte de la enseñanza y la docencia. ¡Eternamente agradecida con cada uno!

Gracias a mi familia por su apoyo, en especial a mi querida hermana Flavia que tanto la extraño! Por las innumerables charlas de consuelo, soporte de estudio y su cariño incondicional, estaré siempre agradecida.

Gracias a las hermosas Técnicas de la UNGS, Noelia, Laura y Gabriela por la eterna ayuda brindada, tanto en investigación como en docencia.

¿Qué decir de Lau y de Gaby? ¡Gracias por su hermosa amistad, sus palabras de aliento y cariño, su apoyo incondicional, y por tantos momentos vividos! Mis amigas fieles que juntos con Alejandro fueron motivo de apoyo que me ayudaron a seguir aún en los momentos más duros ¿Qué decir? Sólo esto... ustedes hacen que el irme sea doloroso, ¡gracias por tanto!

Los dos últimos agradecimientos son sumamente especiales. A vos Diana por la confianza depositada, por permitirme experimentar con todo lo que quise, gracias porque cada vez que recurrí a ti con dudas, contenta o desanimada tus palabras siempre fueron de aliento, tranquilizantes y motivadoras. Gracias por obligarme a dar ese discurso en inglés... ¡me hiciste superar el mayor de mis miedos!, me enseñaste a ser independiente y a confiar en cada cosa que hago. Se me ocurren millones de cosas más, así que repetiré solo dos palabras: ¡Muchas gracias!

Finalmente, gracias a Luciano que estuvo a cada paso, dejando todo lo que tenía atrás para acompañarme en esta aventura, no hay palabras para agradecer ese apoyo incondicional, así que simplemente muchas gracias, te deseo toda la felicidad del mundo...

Dejo un pedacito de corazón en esta querida universidad y me llevo los mejores recuerdos...

Índice

AGRADECIMIENTOS.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABLAS	9
ABREVIATURAS	10
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Importancia del agua	1
Consecuencias de la industrialización	1
Efectos tóxicos de los metales	2
Toxicidad del Cobre y su regulación.....	6
Contenido de metales en río: Impacto en la sociedad.....	8
Soluciones propuestas a la problemática establecida	10
Biorremediación.....	25
Factores que afectan un proceso de biorremediación	25
OBJETIVOS DE LA TESIS	29
Objetivo General:.....	29

CAPÍTULO 1: ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LA BACTERIAS EN ESTADO PLANCTÓNICO CON COBRE

INTRODUCCIÓN.....	33
Biorremediación.....	33
Antecedentes de <i>Pseudomonas veronii</i> 2E	40
Trabajos realizados por el grupo de investigación con <i>P. veronii</i> 2E:.....	41
OBJETIVOS.....	47
MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
Utilización de la cepa bacteriana.....	49
Activación de la cepa	49
Cuantificación de Cobre.....	49
Cinética de Biosorción de Cobre.....	51
Isotermas de Biosorción de Cobre	52
Desorción de Cobre por las células planctónicas	53
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	55
Cinéticas de Biosorción de Cobre	55
Isotermas de biosorción de Cu(II).....	59
Desorción de Cu(II) retenido en la biomasa libre	64
CONCLUSIONES	69
REFERENCIAS	72

CAPÍTULO 2: ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DE LA BIOMASA INMOVILIZADA CON COBRE EN REACTORES *BATCH* Y CONTINUO

INTRODUCCIÓN.....	78
Importancia de los microorganismos en estado planctónico en los procesos de biorremediación. ...	78
Factores que influyen en un proceso de biotratamiento.....	78
Ventajas del uso de células en estado inmovilizado	79
Estrategias de inmovilización	81
Parámetros a tener en cuenta en un proceso de biosorción	87
Comparación de sistemas: <i>Batch</i> vs. Continuo	88
OBJETIVOS.....	- 91 -
OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	- 91 -
MATERIALES Y MÉTODOS.....	- 93 -
Ensayos de inmovilización de la bacteria:	- 93 -
Elección del soporte	- 93 -
Tratamiento de los soportes:	- 93 -
Inmovilización de la biomasa bacteriana en los diferentes soportes	- 94 -
Retención de metal por la biomasa inmovilizada.....	- 98 -
Desorción de Cobre por la biomasa inmovilizada.....	- 98 -
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	100
Estudio de la inmovilización de la biomasa en matrices inertes	100
Cinéticas de biosorción de Cu(II) por la biomasa inmovilizada en reactores <i>Batch</i>	102
Diseño de los reactores.....	- 94 -
Reactor con recirculación	- 96 -
Reactores conectados en serie.....	- 97 -
Cinéticas de biosorción de Cu(II) en reactores continuos.....	104
Ensayos de desorción de cobre por la biomasa inmovilizada en reactores <i>batch</i>	107
Desorción de Cobre por la biomasa inmovilizada en reactores continuos	111
CONCLUSIONES	114
REFERENCIAS	118

CAPÍTULO 3: Estudio de la Interacción del EPS bacteriano con Cobre

INTRODUCCIÓN.....	124
Definición de EPS.....	124
Tipos de sustancias poliméricas extracelulares	125
Función de las sustancias poliméricas extracelulares	126
Composición de las sustancias poliméricas extracelulares	127
Factores que influyen en la producción de los EPS.....	128
Métodos de extracción de EPS.....	129
OBJETIVOS.....	134
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	134
MATERIALES Y MÉTODOS.....	136
Extracción y Purificación del EPS soluble	136
Estudio de la interacción EPS con Cobre	136
Desorción de cobre retenido en los exopolímeros.....	137

RESULTADOS Y DISCUSIONES	139
Composición del EPS utilizado.....	139
Diseño del proceso de biosorción de Cobre por el EPS.....	142
Desorción de cobre retenido por el EPS.....	144
CONCLUSIONES	147
REFERENCIAS	149
CONCLUSIONES GENERALES	151
PERSPECTIVAS A FUTURO.....	153
REFERENCIAS GENERALES.....	154
ANEXO I	158
Curva de Calibración.....	158

Índice de Figuras

Figura 1. A: Esquema del funcionamiento de filtración por membrana (Imagen extraída de http://yacumanta.org/docs/all.pdf), B: Geometría de poros en función de la estructura de la membrana (b) poros cilíndricos, (a) y (c) poros con geometría compleja (Imagen extraída de https://avanceyperspectiva.cinvestav.mx/filtracion-de-agua-por-membranas/). _____	11
Figura 2. Esquema del funcionamiento de un proceso por ósmosis inversa: La ósmosis inversa funciona mediante el uso de la presión, por medio de la cual, se conduce el agua por una membrana semipermeable, desde una solución menos concentrada a una solución más concentrada para equilibrar las concentraciones. Así, se produce la separación del agua de cualquier contaminante como el plomo, cloro o posibles contaminantes como virus y bacterias. (Imagen extraída de https://www.ews.com.gt/user_files/uploads/DAqua_Aplicaciones_con_Osmosis_inversa.pdf). _____	11
Figura 3. Esquema de capacidad de separación según las diferentes técnicas de filtrado (Imagen extraída de http://aguatratamiento.com.mx/productos/). _____	12
Figura 4. Tamaño de poros según las diferentes técnicas de filtrado (Imagen extraída de http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/mlci/filtracion_por_membrana.pdf). _____	13
Figura 5. Instalaciones donde se lleva a cabo la precipitación química (Imagen extraída de https://www.ceupe.com/blog/que-es-la-precipitacion-quimica.html). _____	14
Figura 6. Esquema del funcionamiento de un proceso de descontaminación por electrodiálisis (Imagen extraída de https://blog.fibrasynormasdecolombia.com/tipos-de-procesos-de-desalinizacion-del-agua-de-mar/). _____	15
Figura 7. Esquema del funcionamiento de un proceso de intercambio iónico (Imagen extraída de https://www.inin.gob.mx/documentos/publicaciones/contridelinin/Cap%C3%ADtulo%2012.pdf). _____	16
Figura 8. Esquema del funcionamiento de un proceso de adsorción química (Imagen extraída de https://www.studocu.com/ca-es/document/universitat-de-barcelona/quimica/apunts/intercambio-ionico/8030831/view). _____	17
Figura 9. A: Esquema del funcionamiento de un proceso de filtración por carbón activado, B: arreglo de los átomos de carbono activado (Imagen extraída de https://es.slideshare.net/renzodaviddelacruz/carbn-activado-45867315 y (Sevilla and Politécnica 2011). _____	17
Figura 10. Esquema un nanotubo de pared sencilla (Derecha) y pared múltiple (Izquierda) (Imagen extraída de (Andrade Guel, López López, and Sáenz Galindo 2012). _____	18
Figura 11. Esquema del funcionamiento de un proceso de tratamiento por electrocoagulación (Imagen extraída de http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/514/1/pl_v1n2_58-77_electrocoagulacion.pdf). _____	19
Figura 12. Esquema del funcionamiento de un proceso de coagulación-floculación (Imagen extraída de https://pirhua.udep.edu.pe/bitstream/handle/11042/1712/_Informe_Final_PMTAR.pdf?sequence=1). _____	20
Figura 13. Esquema del funcionamiento de un proceso de Electroflocculación (Imagen extraída de http://industrialwater.com.mx/portfolio-item1.html). _____	21
Figura 14. Esquema del funcionamiento de un proceso de flotación (Imagen extraída de https://docplayer.es/49811542-Modificaciones-del-proceso-de-flotacion-inversa-de-hierro-en-celdas-neumaticas-de-planta-magnetita.html). _____	22
Figura 15. Esquema del funcionamiento de un proceso de fotocatalisis (Imagen extraída de (Giraldo Garcés et al 2004). _____	23

Figura 16. Diagrama de distribución de especies del cobre (Imagen extraída de https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/12248/Anexo_B-C.pdf?sequence=3&isAllowed=y).	27
Figura 17. Esquema de los diferentes mecanismos de interacción de la célula bacteriana con metales de relevancia ambiental (Imagen extraída de Ferreira (2016)).	34
Figura 18. Ciclo biogeoquímico del Hg (Imagen extraída de (Vullo 2003)).	37
Figura 19. Imagen satelital de la ubicación donde la bacteria fue aislada.	40
Figura 20. Imagen satelital donde se observan algunas de los numerosos cuerpos de agua que desembocan en el Río Reconquista	40
Figura 21. Espectro ultravioleta-visible del complejo Cu(I)-BCA. El espectro de absorción se registró en buffer fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,0. La solución contenía 30 μ M Cu(II) en 60 μ M BCA con ascorbato como agente reductor (Brenner and Harris 1995).	51
Figura 22. Biosorción de Cu(II) en un reactor batch conteniendo un efluente modelo con 0,5 mM del metal: BL cosechada de medio PYG (en azul) y medio M9 (en rojo) a 32 $^{\circ}$ C.	57
Figura 23. Biosorción de Cu(II) en un reactor batch conteniendo un efluente modelo con 0,5 mM del metal: BL cosechada de medio PYG (en azul) y medio M9 (en rojo) a 25 $^{\circ}$ C.	57
Figura 24. Biosorción de Cu(II) en un reactor batch conteniendo un efluente modelo con 1 mM del metal: BL cosechada de medio PYG (en azul) y medio M9 (en rojo) a 32 $^{\circ}$ C.	57
Figura 25. Biosorción de Cu(II) en un reactor batch conteniendo un efluente modelo con 1 mM del metal: BL cosechada de medio PYG (en azul) y medio M9 (en rojo) a 25 $^{\circ}$ C.	57
Figura 26. Isotermas de biosorción de Cu(II), en un rango de 0 a 2,00 mM, en un reactor batch, para células tomadas de medio M9 (rojo) y PYG (azul).	61
Figura 27. Linealización de las Isotermas de biosorción según el modelo de Langmuir para Cu(II), en un rango de 0 a 2,00 mM, en un reactor batch, por células tomadas de medio M9 en rojo y PYG en azul.	62
Figura 28. Linealización de las Isotermas de biosorción según el modelo de Freundlich para Cu(II), en un rango de 0 a 2,00 mM, en un reactor batch, por células tomadas de medio M9 en rojo y PYG en azul.	62
Figura 29. Desorción de Cu(II) por la BL para 0,075, 0,1, 1 y 1,5 M de HCl en un volumen final de 2,5 mL de desorbente.	64
Figura 30 Desorción de Cu(II) por la BL para 1,0, 2,0 y 2,5 mL de volumen final	65
Figura 31. Maduración del biofilm: 1: Las células perciben una superficie de adherencia y forman una unión activa reversible por medio de fimbrias, apéndices, pilis, o proteínas de superficie. 2: Se produce un incremento de la biomasa celular, formando microcolonias alrededor del área de adherencia, así como la formación de EPS permitiendo que sea una unión irreversible. 3: El biofilm crece y madura, permitiendo la adhesión de nuevas colonias bacterianas. Finalmente, las células individuales o conglomerados se desprenden del biofilm por erosión, abrasión o separación para formar nuevos conglomerados. (Imagen extraída de https://www.aquamx.com.mx/single-post/2016/06/27/biofilms-bacterianos).	83
Figura 32. Esponja de luffa (Imagen extraída de (Garzón-Jiménez and Barragán-Huerta 2008)).	84
Figura 33. Esquema de inmovilización por atrapamiento en geles: Consiste en la inmovilización de células dentro de una matriz, la cual impide la difusión de las células en el medio, pero permite el paso de metabolitos y nutrientes (Imagen extraída de (Garzón-Jiménez and Barragán-Huerta 2008)).	85
Figura 34. Microfotografías obtenidas por SEM; a: Inmovilización bacteriana en los poros del grano verde de café; b: Inmovilización de la biomasa en espuma de poliuretano; c: biomasa inmovilizada en alginato de calcio; d: otros materiales utilizados para inmovilizar microorganismos (Imágenes extraídas de Garzón-Jiménez and Barragán-Huerta 2008 y (Martínez-Trujillo and García-Rivero 2012)).	86
Figura 35. Esquema del diseño de un reactor continuo.	- 95 -
Figura 36. Biorreactor con recirculación.	- 96 -
Figura 37. Biorreactores conectados en serie	- 97 -
Figura 38. Cambios macroscópicos de la matriz: a: EV, b: PS y c: PP antes de la inmovilización bacteriana y d: EV, e: PS y f: PP con la biomasa inmovilizada	100

<i>Figura 39. Análisis de la BI por SEM: a: EV, b: PS, c: PP con biomasa inmovilizada y d: EV, e: PS y f: PP sin la biomasa adherida.</i>	101
<i>Figura 40. Biosorción de Cu(II) por la BI en EV a 32 °C bajo agitación.</i>	102
<i>Figura 41. Biosorción de Cu(II) por la BI en PP a 32 °C bajo agitación.</i>	102
<i>Figura 42. Biosorción de Cu(II) por la BI en PS a 32 °C bajo agitación.</i>	103
<i>Figura 43 Biosorción de Cu(II) por la BI en EV, a 32 °C en un volumen final de 200 mL por 9 días, en un biorreactor continuo con recirculación. La concentración del metal medida en el sobrenadante se observa en rojo por la BI sobre la matriz y en azul la biosorción correspondiente a la matriz sola como control.</i>	105
<i>Figura 44. Biosorción de Cu(II) por la BI en EV a 32 °C en un volumen final de 200 mL en tres reactores continuos durante 24 h. En () se muestra la concentración residual de metal para el reactor 1 (en azul), para el reactor dos (en rojo) y para el reactor 3 (en verde). Los controles () con sus respectivos colores y la concentración inicial de metal en amarillo.</i>	105
<i>Figura 45. Desorción de Cu(II) retenida en la BI en EV en azul y su correspondiente control (EV) en verde a 32 °C, bajo agitación.</i>	109
<i>Figura 46. Desorción de Cu(II) retenida en la BI en PP en azul y su correspondiente control (PP) en verde a 32 °C, bajo agitación.</i>	109
<i>Figura 47. Desorción de Cu(II) retenida en la BI en PS en azul y su correspondiente control (PS) en verde a 32 °C, bajo agitación.</i>	109
<i>Figura 48. Desorción de Cu(II) retenida en la BI en EV en un reactor con recirculación a 32 °C.</i>	111
<i>Figura 49. Esquema de los diferentes tipos de EPS bacteriano: EPS soluble, EPS fuertemente unido (TB) y débilmente unido (LB). (Imágenes extraídas de Alaba et al. 2018 y Sheng et al 2010).</i>	125
<i>Figura 50. Esquema de Producción y extracción del EPS.</i>	139
<i>Figura 51. Esquema del proceso de biosorción de Cu(II) mediada por el EPS en un reactor batch.</i>	142
<i>Figura 52. Biosorción de Cu(II) mediada por el EPS en un reactor batch.</i>	143
<i>Figura 53. Desorción de Cu(II) mediada por el EPS en un reactor batch.</i>	145
<i>Figura 54. Curva de Calibración de Cu(II)</i>	159

Índice de Tablas

Tabla 1: Fuentes de contaminación de MRA en agua	9
Tabla 2. Preparación de la curva de calibrado.	52
Tabla 3. Resultados de cinéticas de biosorción de Cu(II) 0,5 mM por la BL a las 24 – 30 h.	58
Tabla 4. Resultados de cinéticas de biosorción de Cu(II) 1 mM por la BL a las 24 –30 h.	58
Tabla 5. Comparación de los parámetros de Langmuir reportados para diferentes biomásas.	63
Tabla 6. Isoterma de biosorción para células crecidas en medio M9	63
Tabla 7. Isoterma de biosorción para células crecidas en medio PYG	63
Tabla 8. Desorción de Cu(II) 1 mM retenida en la BL con 0,075 M y 0,1 M HCl.	66
Tabla 9. Desorción de Cu(II) 1 mM retenida en la BL con 1,0 M y 1,5 M HCl.	66
Tabla 10. Desorción de Cu(II) 1 mM retenida en la BL con 1 mL y 2 mL de HCl.	67
Tabla 11. Desorción de Cu(II) 1 mM retenida en la BL con 2,5 mL de HCl.	67
Tabla 12. Biosorción de cobre por la BI en diferentes matrices.	104
Tabla 13. Biosorción de cobre mediada por la BI en Rs	107
Tabla 14. Biosorción de cobre mediada por la BI en Rrc.	107
Tabla 15. Desorción de cobre retenida en la BI en EV y su control en reactor batch.	110
Tabla 16. Desorción de cobre retenida en la BI en PP y su control en reactor batch.	110
Tabla 17. Desorción de cobre retenida en la BI en PS y su control en reactor batch.	110
Tabla 18. Desorción de cobre retenida en la BI en EV en Rrc.	112
Tabla 19. Biosorción / Desorción de cobre por la BI en EV en Rs.	112
Tabla 20. Composición del EPS de <i>P. veronii</i> 2E (extraída de Ferreira (2016)).	140
Tabla 21. Cinética de biosorción de Cu(II) mediada por el EPS	143
Tabla 22. Desorción de Cu(II) mediada por el EPS en un reactor batch	145

Abreviaturas

ACUMAR: Autoridad de Cuenca Matanza Riachuelo.

BCA: Ácido Bicinconínico.

BI: Biomasa Inmovilizada.

BL: Biomasa Libre.

EPA: Agencia de Protección Ambiental.

EPS: Sustancias Poliméricas Extracelulares.

EV: Esponja Vegetal de *luffa*.

HEPES: Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico).

K_d : Constante de disociación de Langmuir.

K_f : Constante de Freundlich.

LPS: Lipopolisacáridos.

M: Molaridad [mol/L].

MES: Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico.

MRA: Metales de Relevancia Ambiental.

n : Indicador de la Intensidad de Freundlich.

PP: Piedra Pómez.

PS: Piedra Sanitaria o Diatomitas.

q : Capacidad de retención Específica [mmol de Cu(II)/g peso seco de biomasa].

q' : Capacidad normal de Biosorción [g^{-1}].

q_{max} : Capacidad máxima de retención específica [mmol de Cu(II)/g peso seco de biomasa].

Rrc: Reactor con Recirculación.

Rs: Reactor en Serie.

SEM: Microscopia de Barrido Electrónico.

INTRODUCCIÓN GENERAL

Importancia del agua

El agua es un compuesto presente en todos los ecosistemas, esencial para el sostenimiento y la reproducción de la vida en el planeta. En una perspectiva global, los cuerpos de agua constituyen más del 70% del total de la superficie terrestre, de los cuales sólo el 0,002% es apto para el consumo humano (Hegde et al. 2020). La disponibilidad de agua limpia es fundamental, por lo que su cuidado y mantenimiento es de vital importancia. Sin embargo su contaminación y escasez han provocado que la preservación de este recurso se convierta en un desafío (Kiran Marella, Saxena, and Tiwari 2020). El problema de la contaminación de las aguas es sin duda, uno de los aspectos más preocupantes de la degradación de los medios naturales por parte de la civilización contemporánea, siendo considerado como un problema universal. El agua recibe el aporte de muchas sustancias durante su recorrido por zonas agrícolas e industriales, tales como herbicidas, plaguicidas, fertilizantes, vertidos industriales y residuos de la actividad humana convirtiéndose en un riesgo para el ambiente (Vera Cabezas et al. 2016).

Consecuencias de la industrialización

Los avances tecnológicos emergentes y el estilo de vida antropogénico contemporáneo representan un enorme riesgo para el medioambiente (Kiran Marella, Saxena, and Tiwari 2020). Estos avances tecnológicos e industriales han incrementado la contaminación en el ambiente debido a la liberación de grandes cantidades de desechos, estos son con frecuencia coloreados, espumosos, contienen compuestos químicos peligrosos incluyendo, colorantes tóxicos, ácidos, álcalis, metales peligrosos tales como cadmio (Cd), cobre (Cu), cromo (Cr), plomo (Pb), zinc (Zn), mercurio (Hg), y metaloides (elementos que tienen propiedades intermedias entre los metales y no-metales como arsénico (As) y antimonio (Sb)) y contaminantes orgánicos (Ayangbenro and Babalola 2017).

La demanda de calidad de alimentos y cantidad de los mismos, ha llevado a una extensa actividad industrial gobernada por una exigencia cada vez mayor de una población en

constante crecimiento. La urbanización incontrolada trae como consecuencia un incremento en el consumo de energía, extensas actividades agrícolas, destrucción del hábitat, sobrepesca, caza, deforestación que, sumado a la industrialización y a la falta de capacitación en la utilización de los recursos naturales, ha provocado un enorme deterioro en la calidad de los mismos, principalmente del agua (Kiran Marella, Saxena, and Tiwari 2020; Galán Huertos and Romero Baena 2008). Un gran número de factores contribuyen a la contaminación de cuerpos de agua, esto incluye a los procesos geoquímicos, actividades agrícolas, plantas de tratamientos de desechos, aguas residuales derivadas de diferentes industrias como ser curtiembres, galvanoplastia, tintura, minería, fundición, desechos municipales, deposición atmosférica que representan las mayores causas de depósitos contaminantes en áreas urbanas y suburbanas (Hegde et al. 2020; Leong and Chang 2020; Rahman and Singh 2020; Kapahi and Sachdeva 2019; Saldarriaga-Hernandez et al. 2020; Azubuike, Chikere, and Okpokwasili 2016).

Estudios recientes han establecido que la descarga a largo plazo de desechos no tratados o parcialmente tratados, provenientes de efluentes industriales en cuerpos de agua, puede afectar negativamente la calidad de este recurso, haciéndola inapropiada para el consumo humano (Kiran Marella, Saxena, and Tiwari 2020). La contaminación de ríos con metales tóxicos trae como consecuencia la contaminación de aguas subterráneas o superficiales y aguas de lluvia. Los ríos son una de las fuentes más importantes de agua dulce y son severamente afectadas por la contaminación de fuentes antropogénicas (Kapahi and Sachdeva 2019).

Efectos tóxicos de los metales

La contaminación con metales tóxicos es una seria preocupación debido al peligroso impacto ambiental que representan, incluso a bajas concentraciones (Kapahi and Sachdeva 2019; García and Reyes 2009; Galán Huertos and Romero Baena 2008). Diferente a los contaminantes orgánicos, estos metales no pueden ser degradados por procesos químicos o biológicos, solo pueden ser transformados en especies menos tóxicas (Ayangbenro and Babalola 2017; Leong and Chang 2020; Marrero-coto and Coto-pérez 2010).

Se pueden clasificar a los metales presentes en nuestro planeta en tres grandes grupos:

- Clase A: Esenciales para procesos biológicos y a su vez no tóxicos a concentraciones altas.

- Borderline: Esenciales pero tóxicos más allá de una concentración límite.
- Clase B: Netamente tóxicos.

Dicha clasificación está basada en el comportamiento ácido de Lewis que posee cada catión metálico, de ello depende su tendencia hacia la formación de complejos con diferentes familias de ligandos. Entre los muchos ejemplos se puede mencionar al Ca y K, metales no tóxicos, pertenecientes a la Clase A; Cr y Cu, metales esenciales para ciertos procesos biológicos pero más allá de una concentración límite ejercen toxicidad debido a la capacidad de formar complejos con ligandos biológicos (Borderline) y por último Cd, Hg y Pb que no poseen utilidad biológica y ejercen una acción tóxica gracias a su alta afinidad por grupos funcionales con O, N y S (Clase B) (Barrionuevo et al. 2009).

Los metales tóxicos se denominan de diferentes maneras según el autor, algunos los definen como metales pesados, el término se refiere a todo elemento químico metálico que tenga una densidad relativamente alta y que sea tóxico o venenoso en concentraciones pequeñas. Otros autores establecen que los metales pesados son sustancias que por su resistencia a la biodegradación generan impactos negativos en ecosistemas en general (Montenegro, Pulido, and Calderón 2019). Algunos trabajos establecen definiciones más específicas, en donde definen a los metales pesados como aquellos metales que causan un impacto ambiental debido a su toxicidad y cuya propiedad principal es tener una densidad aproximadamente superior a 6 g/cm^3 exceptuando al Ti (Titanio) ($4,5 \text{ g/cm}^3$) pero también considerado como metal pesado y al As, que aunque es un metaloide, presenta una alta densidad de $5,7 \text{ g/cm}^3$ (Caviedes Rubio et al. 2015; Beltrán-Pineda and Gómez-Rodríguez 2016). En otros trabajos se refieren a metales y metaloides con una densidad superior a 5 g/cm^3 lo cual incluye al (As), cadmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), hierro (Fe), plomo (Pb), mercurio (Hg), plata (Ag), zinc (Zn) entre otros (Leong and Chang 2020). A lo largo de esta tesis nos referiremos a estos metales como metales de relevancia ambiental (MRA). Estos elementos se bioacumulan en tejidos y son biomagnificados a lo largo de la cadena trófica (Nguyen et al. 2020; Leong and Chang 2020; Kapahi and Sachdeva 2019; Kiran Marella, Saxena, and Tiwari 2020). Las subsecuentes liberaciones y la entrada de estos metales tóxicos en la cadena alimentaria dependen de su concentración y de la absorción por la flora y fauna local (Ayangbenro and Babalola 2017; Kapahi and Sachdeva 2019).

Los MRA más comunes encontrados en un ecosistema acuático son Cd, Cu, Zn, Pb, Cr y Hg. Las posibilidades de exposición a estos metales se han visto incrementadas debido a los sectores tecnológicos, domésticos, industriales y agrícolas (Ayangbenro and Babalola 2017). La descarga de estas especies en los cuerpos de agua puede producir una elevada toxicidad.

Un ejemplo de esto lo constituye el Cu, que debido a la naturaleza altamente soluble en agua de la especie Cu(II), puede entrar en cuerpos de agua a través de fuentes antropogénicas e industriales. El envenenamiento por este metal puede producir vómitos, dolores abdominales, complicaciones gastrointestinales y en casos extremos pueden causar fallos en los órganos e incluso la muerte (Kiran Marella, Saxena, and Tiwari 2020).

El suelo actúa en general como una barrera protectora de otros medios más sensibles; hidrológicos y biológicos; filtrando, descomponiendo, neutralizando o almacenando contaminantes, evitando en gran parte su biodisponibilidad que se define como la porción de la cantidad total de un metal en un entorno, dentro de un marco de tiempo, que está disponible o puesto a disposición para su absorción directa por organismos vivos. Esta capacidad depuradora de un suelo depende de los contenidos en materia orgánica, carbonatos, hidróxidos de hierro y manganeso, de la proporción y tipo de minerales de la arcilla, de la capacidad de intercambio catiónico del suelo, del pH y el potencial electroquímico (Eh), textura, permeabilidad y actividad microbiana. Por tanto, para cada situación, el poder depurador de un suelo tiene un límite. Cuando se superan esos límites para una o varias sustancias, el suelo toma la categoría de contaminado y es fuente de contaminantes (Galán Huertos and Romero Baena 2008).

Dependiendo de la concentración, los MRA pueden inducir efectos tanto positivos como negativos en la vida animal, vegetal y humana (Kapahi and Sachdeva 2019). Las características y efectividad del transporte de membrana condicionan la expresión de la toxicidad de las sustancias químicas al determinar su tiempo de permanencia junto a sus dianas. Estas características dependen de diversos factores entre los que destaca la hidro o liposolubilidad, volatilidad, masa molar y la existencia de mecanismos específicos de transporte. En el caso de los compuestos metálicos, las características mencionadas pueden diferir mucho entre distintos compuestos del mismo elemento. Las moléculas inorgánicas tienden a ser más hidrosolubles que las orgánicas aunque algunas sales, por ejemplo de plomo, son totalmente insolubles como sulfato, carbonato, cromato, fosfato y sulfuro de plomo. Por otro lado, no todas las moléculas orgánicas presentan la misma liposolubilidad como se verifica en el caso de los compuestos organomercuriales. En relación con la absorción y la distribución, los compuestos organometálicos se benefician de una mejor difusión por lo que se absorben bien por vía digestiva e incluso pueden absorberse por vía cutánea. La vía respiratoria es importante en el caso del mercurio, que es el único metal con alta presión de vapor. Las sales metálicas inorgánicas se absorben y difunden con mayor dificultad y algunas especies, como el mercurio metálico, no se absorbe por vía digestiva

salvo a dosis muy altas. La toxicidad de los compuestos metálicos se diferencia de la mayoría de las moléculas orgánicas por el hecho de depender de manera muy característica del elemento metálico en cuestión, aunque, como se ha indicado, la expresión de esa toxicidad depende también de las modificaciones toxicocinéticas derivadas del tipo de molécula. Un ejemplo de esto lo constituye el mercurio orgánico, que es principalmente neurotóxico por su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, mientras que el cloruro mercúrico es nefrotóxico al eliminarse por el riñón. Otro factor que influye en la toxicidad de los compuestos metálicos es el estado de oxidación en que el elemento metálico se encuentra. Así, el As(III) es más tóxico que el As(V) y el Cr(VI) es más peligroso que el Cr(III). Las dianas de toxicidad de los metales son proteínas, muchas de ellas con actividad enzimática, afectando a diversos procesos bioquímicos, membranas celulares y organelas. Los efectos tóxicos de los metales se ejercen, salvo pocas excepciones, por interacción entre el ion metálico libre y la diana. Se ha reportado que los MRA son tóxicos eminentemente lesionales que afectan gravemente a funciones celulares fundamentales para su supervivencia por mecanismos complejos, no siempre bien conocidos. Entre ellos destacan:

- Interacción con metales esenciales por similitud electrónica.
- Formación de complejos metal-proteína con inactivación de su función.
- Inhibición enzimática de proteínas con grupos SH.
- Afectación de organelas celulares (mitocondrias, lisosomas, microtúbulos).

Esto trae como consecuencia mutaciones, daño en el DNA y el sistema nervioso central. Existen diversas rutas de exposición de estos metales, por ejemplo el contacto directo, inhalación por polvos o humos e ingesta de estos compuestos a través de bebidas o alimentos (Kapahi and Sachdeva 2019; Leong and Chang 2020; Ferrer 2003).

A modo de resumen, la biodisponibilidad de los MRA y sus efectos dependen además de la naturaleza del metal, de sus propiedades fisicoquímicas y su solubilidad en lípidos lo que le confiere propiedades toxicológicas específicas. Características como la edad, el estado nutricional, las interacciones tróficas y las adaptaciones fisiológicas de los organismos son otras cuestiones a considerar para evaluar la toxicidad de los MRA (Kapahi and Sachdeva 2019; Galán Huertos and Romero Baena 2008). El metabolismo de los compuestos metálicos afecta en general muy poco a su toxicidad. Los compuestos orgánicos tienden a transformarse en inorgánicos lentamente aunque en algún caso, como el As, sucede lo contrario. La vida media de los compuestos metálicos en el organismo es variable pero tiende a ser prolongada debido a su afinidad y acumulación en el hueso. Se acumulan, por ejemplo el Pb y el Cd con

vidas medias superiores a los 20 años, mientras que otros como el As o el Cr no se acumulan y tienen vidas medias de días, aunque pueden detectarse durante más tiempo en lugares considerados de eliminación como pelo y uñas. La sangre, orina y pelo son las muestras biológicas más empleadas para medir una exposición o dosis. Las dos primeras para determinar una exposición reciente y la última para determinar una exposición anterior y su evolución en el tiempo. Con el aumento de la conciencia sobre la persistencia, la naturaleza y los efectos nocivos de los MRA, ha habido un creciente interés en el desarrollo de tecnologías para remediar ecosistemas con esta contaminación (Kapahi and Sachdeva 2019).

Toxicidad del Cobre y su regulación

El cobre es un elemento abundante en la naturaleza, la mayor parte del cobre del mundo se obtiene de los sulfuros minerales como la calcocita, covelita, calcopirita, bornita y enargita.

Este metal se usa en equipamiento eléctrico, maquinaria industrial, construcción, en aleaciones (bronce, latón en clavos, pernos, objetos decorativos, tuberías, techos, monedas, utensilios de cocina, joyería, muebles, maquillaje, pinturas, instrumentos musicales y medios de transporte). El sulfato de cobre fue uno de los primeros compuestos utilizados como plaguicidas (fungicidas y alguicidas). Aunque, el Cu es un micronutriente en bajas concentraciones y es reconocido como esencial para prácticamente todas las plantas y animales, los niveles elevados de cobre se han relacionado con efectos adversos en los organismos acuáticos y las preocupaciones han llevado a su inclusión como contaminante prioritario. Actualmente, hay 629 ríos y arroyos listados en EE.UU. como deteriorados por el cobre y 5 por sedimentos contaminados debido al cobre (U.S. EPA, 2007).

La exposición aguda por ingestión del sulfato de cobre puede producir necrosis hepática y muerte. La exposición crónica de alimentos conservados en recipientes de cobre genera lesiones hepáticas en niños. Algunos efectos de intoxicación son por ejemplo la hemólisis letal en vacas lecheras a dosis de 38 mg/kg. El ganado ovino es la especie más sensible a la intoxicación, con una tolerancia de apenas 25 mg/kg. Tanto en los casos agudos como en crónicos la mortalidad se acerca al 100%. En bovinos, consumos de 220 a 880 mg/kg de peso corporal pueden causar la muerte. Altas concentraciones de sales solubles de cobre conllevan a coagulación proteica e inflamación severa de mucosa digestiva y, si el animal sobrevive desarrollará hemólisis intravascular. Las muertes rápidas se deben a insuficiencia hepática, mientras que los decesos tardíos se producen por insuficiencia renal. Si bien no existe

evidencia de efectos cancerígenos del cobre o sus compuestos por ninguna vía de exposición, puede generar diversas alteraciones, además de las mencionadas anteriormente, puede producir: anemia hipocrómica, disminución de la tasa de crecimiento, diarreas, cambios de coloración del pelo o de lana, ataxia neonatal, alteración del crecimiento, infertilidad temporal e insuficiencia cardíaca (Londoño Franco, Londoño Muñoz, and Muñoz Garcia 2016).

La Agencia de protección Ambiental (EPA) en EE.UU. establece las pautas y estándares de limitaciones de efluentes para diferentes categorías no municipales (es decir, industriales). Estas pautas se desarrollan en base al grado de reducción de contaminantes que puede alcanzar una categoría industrial mediante la aplicación de tecnologías de control de contaminantes. Allí, se incluye la lista de contaminantes prioritarios los siguientes trece elementos traza: antimonio, arsénico, berilio, cadmio, cromo, cobre, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y zinc, introduciendo al berilio, respecto a las listas anteriores de los más tóxicos y disponibles (U.S. EPA, 2007; Galán Huertos and Romero Baena, 2008).

El cobre se encuentra comúnmente en los sistemas acuáticos como resultado de fuentes tanto naturales como antropogénicas. Las fuentes naturales de cobre en los sistemas acuáticos incluyen depósitos geológicos, actividad volcánica y meteorización y erosión de rocas y suelos. Las fuentes antropogénicas de cobre incluyen las actividades mineras, la agricultura, la fabricación de metales y electricidad, galvanoplastia, los lodos de las plantas de tratamiento de propiedad pública, el uso de plaguicidas y más. Una fuente importante de cobre en el medio marino son las pinturas anti-incrustantes, que se utilizan como revestimientos para cascos de barcos, boyas y superficies submarinas, y como contaminante de cubiertas, pilotes y algunas estructuras marinas que utilizaban maderas tratadas con arseniato de cobre cromado.

Según los criterios establecidos para el cobre en el Reglamento a la Ley de Gestión Ambiental para la Prevención y Control de la Contaminación Ambiental de calidad de aguas de Ecuador, los límites para consumo humano y doméstico es de 1 mg/L. Los criterios de calidad admisibles de Cu(II) para la preservación de la vida acuática y silvestre son 0,02; 0,02; y 0,05 mg/L para aguas frías dulces, aguas cálidas dulces y aguas marinas y estuarios respectivamente. El criterio de calidad de agua para uso agrícola en riego es 0,2 mg/L. Los límites de descarga al sistema de alcantarillado público es 1,0 mg/L (Revisión y actualización de la norma de calidad ambiental y de descarga de efluentes: Recurso agua) (Ministerio del Ambiente 2015).

Según la Autoridad de Cuenca Matanza Riachuelo (ACUMAR) los límites admisibles de cobre en vertido de efluentes líquidos para; colectora cloacal, fluvial / cuerpo superficial y absorción en suelos es; menor o igual a 2,0, menor o igual a 1,0 y ausente mg/L respectivamente. Además, ACUMAR establece la categoría I.a y I.b, para los límites cuantificados por parámetro y uso, para que sea apta para la protección de biota y uso recreativo con contacto directo cuyos valores deben ser menores a 9 mg/L; según la categoría II para que sea apta para actividades recreativas con contacto directo la concentración del metal debe ser menor a 200 mg/L, mientras que para actividades recreativas sin contacto directo y actividades recreativas pasivas el parámetro no es relevante, salvo en aquellos casos donde ACUMAR lo considere apropiado (ACUMAR 2017).

Contenido de metales en río: Impacto en la sociedad

Diversos estudios han analizado la composición de aguas residuales industriales y los suministros de aguas subterráneas en términos de MRA en comparación con los estándares para la descarga de contaminantes ambientales. En ellos, se evidenció que las aguas residuales industriales contienen MRA por encima de los límites permitidos para el agua potable o de superficie / agua de riego. Sin embargo, son utilizados para regar los campos en varias partes de la India y en prácticas agrícolas en diversas partes del mundo (Ver **Tabla 1**). La aplicación de aguas contaminadas con MRA en los campos agrícolas ha provocado su bioacumulación en los cultivos y las cadenas alimentarias asociadas. Algunos ejemplos de esto lo constituye un estudio reportado en la India, en donde se usaron cuerpos de agua contaminados con MRA en campos agrícolas. Según el informe "Estado de trazas y metales tóxicos en los ríos de la India", se puede verificar que de los 414 ríos del país, 57 contenían dos o más MRA por encima de los límites permitidos (Kapahi and Sachdeva 2019). Por otro lado, en diferentes regiones de Colombia, son frecuentes los reportes de MRA asociados a la industria, producción agrícola y minería, como el caso del mercurio en fuentes de agua en quebradas, lagunas de Meta, Boyacá, Antioquia; el arsénico en cultivos de hortalizas, legumbres y diversos vegetales en Nariño; el plomo y mercurio en el Chocó; el uso indiscriminado de cientos de toneladas de mercurio y cianuro en explotación minera, especialmente de oro en el Noreste y Bajo Cauca (Antioqueño), Marmato (Caldas) y en más de 500 minas en todo el país. Asimismo, otros países reportan presencia de MRA en peces y

camarones en Indonesia, Japón, México y Chile, cerdo contaminado con plomo proveniente de Australia, salmón fresco con niveles peligrosos de plomo y cadmio en Noruega y Rusia, materias primas para fabricación de alimentos contaminadas con zinc provenientes de China, entre otros muchos ejemplos (Londoño Franco, Londoño Muñoz, and Muñoz Garcia 2016).

Tabla 1: Fuentes de contaminación de MRA en agua¹

Element	References										
	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
As					•	x			x		
Cd	•	•		x	x		x	x		x	x
Cr	•	x		x			x	x		x	
Cu	x	x	•	•	•		•	•	x	x	x
Fe				x	•				x	x	
Hg					•						
Mn				•							
Ni	•	x	•	x			•	•		x	
Pb			•		x		•	•	x	x	x
Zn			•	•	•		•	•	x	x	x
Source	Textile mill effluent	Electroplating industry wastewater sample	Ganga river water quality	Ground water quality	Ground water quality	Water supply	Irrigation water	Irrigation water	Irrigation water	Lake water	Irrigation water

La situación demanda la acción inmediata de la remediación de estos cuerpos de agua contaminados debido a la elevada persistencia y toxicidad que presentan estos compuestos en la naturaleza, por lo que es de vital importancia trabajar en tecnologías que sean eficientes removiendo MRA de efluentes, además ser económicas y amigables con el ambiente (Kapahi and Sachdeva 2019; Azubuike, Chikere, and Okpokwasili 2016; Kiran Marella, Saxena, and Tiwari 2020).

¹ X: indica la concentración de metales / metaloides de relevancia ambiental encontrados que superan los límites permitidos.

. : Es la concentración de metales de relevancia ambiental que se encuentran por debajo del límite permitido.

Oficina de Normas de la India para el agua potable (BIS-10500-2012): valor aceptado en mg / L (límites permitidos en ausencia de una fuente alternativa en mg / L) - As, 0.01 (0.05); Cd, 0,003 (sin relajación); Cu: 0,05 (1,5); Pb: 0.01 (sin relajación); Hg, 0,001 (sin relajación); Fe: 0.3 (sin relajación); Ni: 0,02 (sin relajación); Cr: 0,05 (sin relajación); Zn: 5 (15); Mn: 0,1 (0,3).

Estándares de la Organización Mundial de la Salud para aguas superficiales (µg / L): As: 10; Cr: 50; Cd: 3; Cu: 2000; Ni: 70; Pb: 10; Hg: 0,1 (Kapahi and Sachdeva 2019).

Soluciones propuestas a la problemática establecida

Técnicas de remediación químicas/físicas

Para lograr una acción que contrarresten las consecuencias producidas por la contaminación de estos cuerpos de agua, se aplican diferentes técnicas de remediación para la eliminación de MRA. Las técnicas convencionales incluyen precipitación química, carbón activado, intercambio iónico, membranas de filtración, fotocátalisis, flotación, coagulación-precipitación y métodos electroquímicos (tales como electrodeposición, electroflotación y electrocoagulación). A continuación, se describe brevemente las diferentes técnicas convencionales:

- I. **Filtración por Membrana:** Se emplea en procesos para el tratamiento de agua potable, aguas residuales industriales y en menor medida aguas residuales domésticas. Las membranas pueden clasificarse de acuerdo a diferentes características como la masa molecular de corte (ver **Figura 1**), material de la membrana (sintéticos o polímeros naturales modificados, acoplados y estructurados), permeabilidad y solubilidad del soluto y el solvente en la película, superficie y espesor activo de la película, así como la carga de su superficie (Orozco et al. 2019). La separación por membrana se emplea comúnmente para tratar y recuperar sales metálicas de residuos generados en procesos galvanoplásticos, en el reciclaje de aceites, en la producción alimentos y bebidas y en la explotación y producción de hidrocarburos. Esta tecnología presenta altas eficiencias, requiere poco espacio, no es selectiva y es de fácil operación, pero genera una gran cantidad de lodos que contienen metales.

- II. **Osmosis Inversa:** Es un proceso de permeación a través de membrana para la separación por difusión controlada o cribado (Ver **Figura 2**). Tiene la capacidad de seleccionar elementos de tan solo 0,0001 mm, lo que le otorga un amplio abanico de capacidades de tratamiento. Una de las aplicaciones que tiene esta técnica es para la desalación de agua de mar. La desventaja de los tratamientos de ósmosis inversa es que requieren una enorme cantidad de agua. Tales sistemas típicamente devuelven tan solo entre el 5-15% del agua empujada a través del mismo, lo que significa que también tarda mucho tiempo para tratarla apropiadamente. Lo que queda, luego sale del sistema como agua residual (Caviedes Rubio et al. 2015).

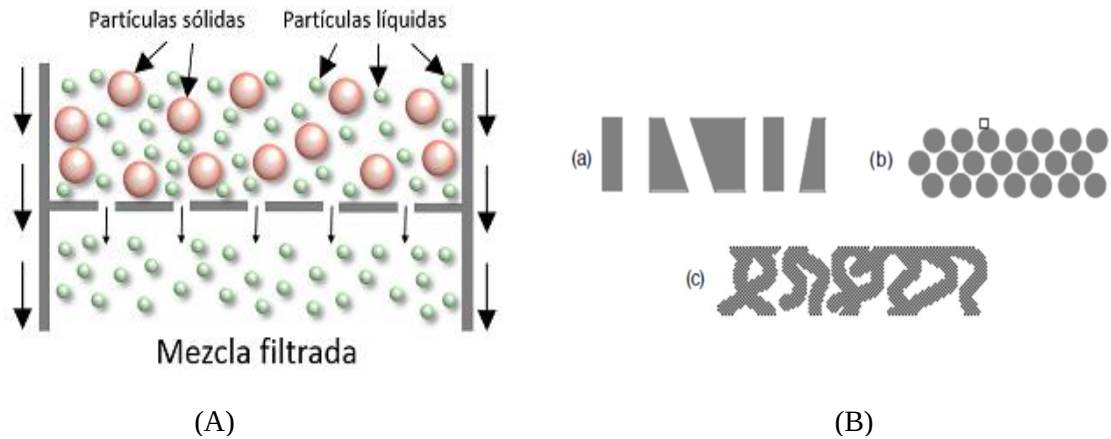


Figura 1. A: Esquema del funcionamiento de filtración por membrana (Imagen extraída de <http://yacumanta.org/docs/all.pdf>), **B: Geometría de poros en función de la estructura de la membrana (b) poros cilíndricos, (a) y (c) poros con geometría compleja** (Imagen extraída de <https://avanceyperspectiva.cinvestav.mx/filtracion-de-agua-por-membranas/>).

Además, esta técnica presenta el inconveniente del bloqueo de las membranas, ya que las partículas de soluto de dimensiones similares a los poros de la membrana pueden estancarse, reduciendo así la permeabilidad, provocando posteriormente que los flujos sean inferiores a los previstos.

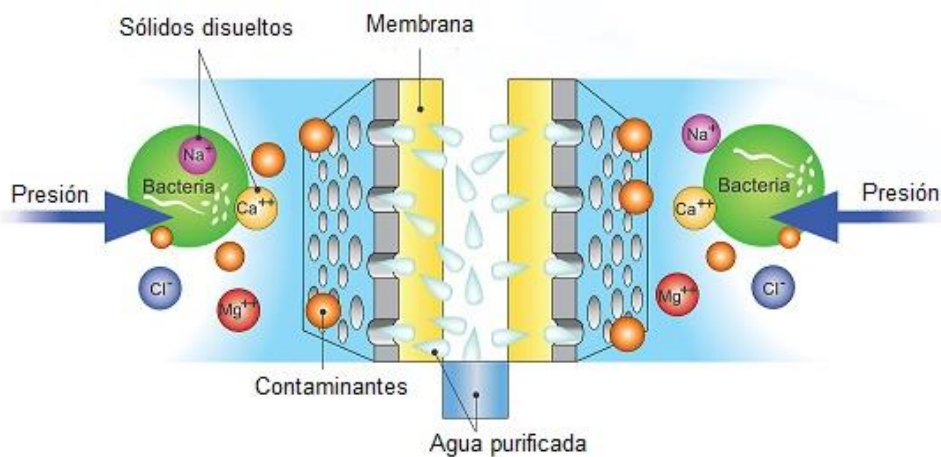


Figura 2. Esquema del funcionamiento de un proceso por ósmosis inversa: La ósmosis inversa funciona mediante el uso de la presión, por medio de la cual, se conduce el agua por una membrana semipermeable, desde una solución menos concentrada a una solución más concentrada para equilibrar las concentraciones. Así, se produce la separación del agua de cualquier contaminante como el plomo, cloro o posibles contaminantes como virus y bacterias. (Imagen extraída de https://www.ews.com.gt/user_files/uploads/DAqua_Aplicaciones_con_Osmosis_inversa.pdf).

- III. **Nanofiltración:** Es una técnica de tratamiento de aguas relativamente reciente que utiliza membranas con poros muy pequeños (<1 nm) y requiere presiones de funcionamiento en el rango de 10-50 bar. Por lo tanto, las membranas empleadas para la nanofiltración son capaces de retener especies neutras con masa molecular <200 -300 g/mol, y también para la repulsión de iones inorgánicos por un mecanismo de exclusión por tamaño en combinación con las interacciones electrostáticas entre los iones y la membrana cargada. Este proceso presenta mayor rechazo de iones divalentes y menor rechazo de iones monovalentes, presión de funcionamiento más baja, mayor flujo y menor consumo de energía en comparación con la ósmosis inversa. Estas características recomiendan la nanofiltración como una tecnología prometedora e innovadora que puede ser ampliamente aplicada en el agua potable y el tratamiento de efluentes industriales. Las aplicaciones de esta técnica son varias como: recubrimiento de poliamida aromática en sustrato de polisulfona con poros 0,262 nm, purificación del ácido fosfórico, recuperación de litio en alta relación de salmuera, etc. (Caviedes Rubio et al. 2015).
- IV. **Ultrafiltración:** La ultrafiltración es un proceso de fraccionamiento selectivo utilizando presiones de hasta 145 psi (10 bares) (Ver **Figura 3** y **Figura 4**). Ésta técnica se utiliza ampliamente en el fraccionamiento de leche y suero, y en fraccionamiento proteico, en la separación de Cd y Cu de aguas ricas en fósforo por ultrafiltración micelar mejorada (Orozco et al. 2019).

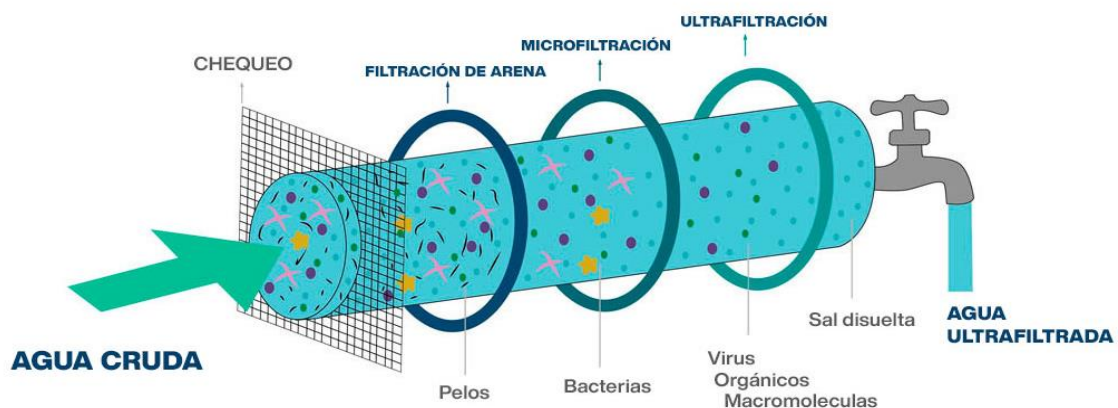


Figura 3. Esquema de capacidad de separación según las diferentes técnicas de filtrado (Imagen extraída de <http://aguatratamiento.com.mx/productos/>).

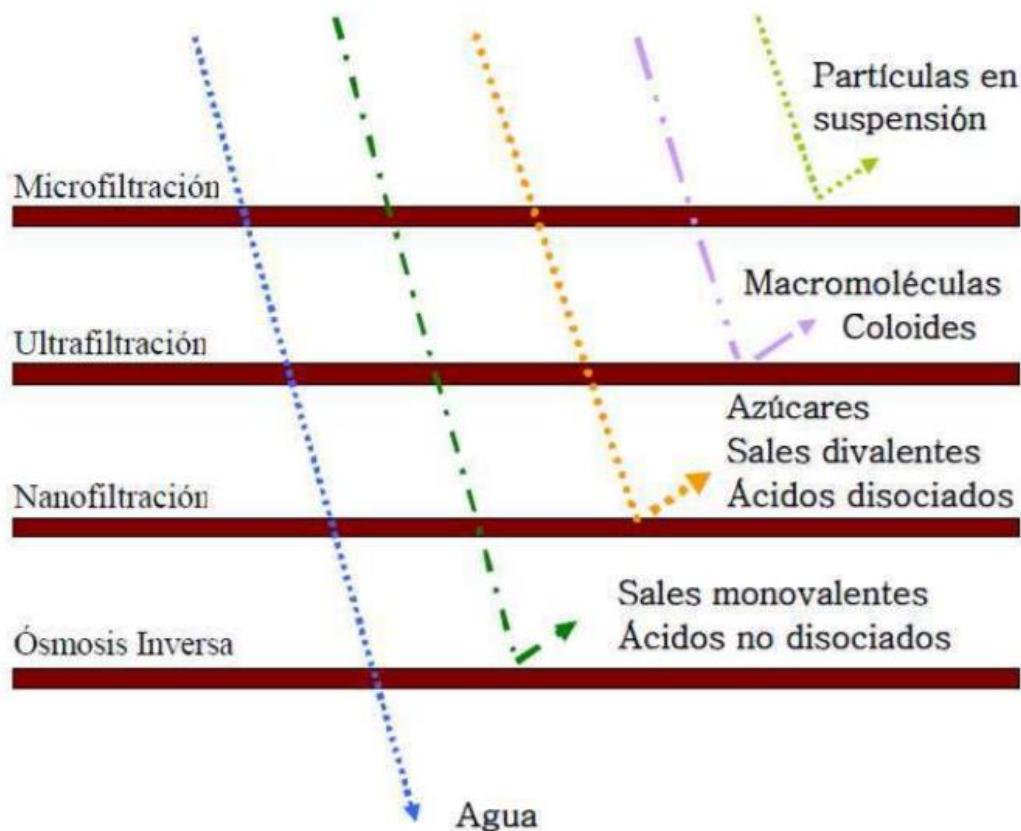


Figura 4. Tamaño de poros según las diferentes técnicas de filtrado (Imagen extraída de http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/mlci/filtracion_por_membrana.pdf).

- V. **Precipitación química:** Es la técnica más utilizada en los procesos industriales ya que es relativamente sencilla de operar, económica y selectiva (Ver **Figura 5**), aunque su mantenimiento si es costoso debido a la alta generación de lodos. Ésta técnica se basa en la precipitación de los iones metálicos en forma de hidróxidos, es una técnica de bajo costo, fácil control del pH y eliminación por floculación y sedimentación. Igualmente se emplea la precipitación por sulfuros aunque con solubilidades bajas y precipitados no anfóteros, por lo que puede lograr altos rendimientos; también se han empleado sustancias quelantes aunque presentan desventajas considerables como la carencia de uniones necesarias y demasiados riesgos ambientales. Ésta técnica de pre-tratamiento es una de las más habituales para la reducción de la concentración de metales tóxicos en las aguas residuales a valores que no causen preocupación. Para ello, se deben considerar diversos factores como: la capacidad demostrada del sistema para ajustarse a los límites de descarga, el costo de capital necesario (costos de

operación y de mantención), la capacidad para ampliar o mejorar el sistema para cumplir con requerimientos futuros, el volumen de contaminante y la cantidad hidráulica permitida en el presente y las que se propongan para el futuro, la frecuencia, el volumen y las características de las descargas del proceso industrial, la conservación del agua y las posibilidades de su recuperación, los resultados de los estudios de tratabilidad de aguas residuales representativas, usando la tecnología de tratamiento que se propone, etc.(Rodríguez Fernández-Alba et al. 2006)



Figura 5. Instalaciones donde se lleva a cabo la precipitación química: Ésta técnica se basa en la precipitación de los iones metálicos en forma de hidróxidos (Imagen extraída de <https://www.ceupe.com/blog/que-es-la-precipitacion-quimica.html>).

- VI. **Electrodiálisis:** Es una técnica de descontaminación que puede remover componentes iónicos de soluciones acuosas empleando membranas permeables selectivas en un campo eléctrico constante (Ver **Figura 6**). Esta técnica tiene la capacidad de remover iones contaminantes cargados de hasta $0,0001 \mu\text{m}$, mediante hojas o laminas porosas de resinas de intercambio iónico con una baja permeabilidad relativa para el agua. La desventaja de esta técnica es la cantidad de energía que se necesita durante la operación, la cual aumenta a medida que se incrementa el volumen de efluente a tratar (Lopez García 2005).

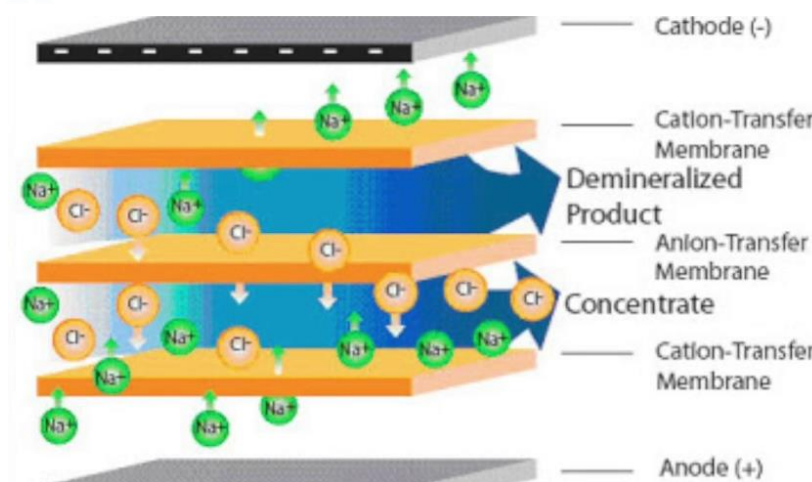


Figura 6. Esquema del funcionamiento de un proceso de descontaminación por electrodiálisis: Es una técnica de descontaminación que puede remover componentes iónicos de soluciones acuosas empleando membranas permeables selectivas en un campo eléctrico constante (Imagen extraída de <https://blog.fibrasynormasdecolombia.com/tipos-de-procesos-de-desalinizacion-del-agua-de-mar/>).

- VII.** Intercambio Iónico: Es el proceso a través del cual los iones en solución se transfieren a una matriz sólida que, a su vez liberan iones de un tipo diferente, pero de la misma carga (ver **Figura 7**). El intercambio iónico es un proceso de separación física en la que los iones intercambiados no se modifiquen químicamente. Las principales ventajas de intercambio iónico son la recuperación del valor del metal, la selectividad, menor volumen de lodos producidos y la reunión de las especificaciones de descarga estrictas (Granados Correa, Serrano Gómez, and Bonifacio Martínez 2010).
- VIII.** Adsorción química: Es una técnica utilizada ampliamente en la industria química, y en los sistemas de tratamiento terciario de aguas residuales. La adsorción química consiste en la separación y concentración de uno o más componentes de un sistema sobre una superficie sólida o líquida (Ver **Figura 8**). Los distintos sistemas heterogéneos que puede tener lugar la adsorción son: sólido-líquido, sólido-gas, en el que los componentes se distribuyen selectivamente entre ambas fases. La técnica presenta remoción de una amplia variedad de contaminantes, alta capacidad, cinética rápida y posiblemente selectiva, dependiendo del adsorbente, de lo cual también depende su rendimiento, debido a la estructura física del mismo.

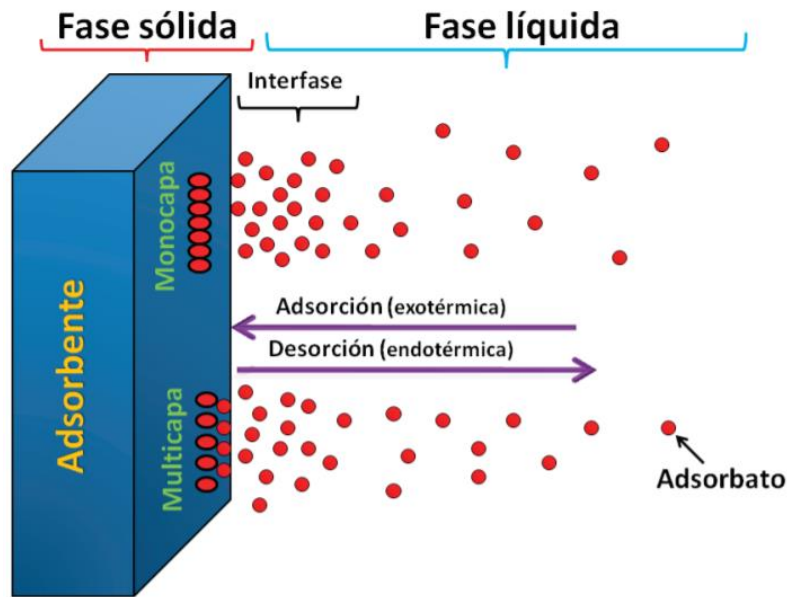


Figura 7. Esquema del funcionamiento de un proceso de intercambio iónico: Es el proceso a través del cual los iones en solución se transfieren a una matriz sólida que, a su vez liberan iones de un tipo diferente, pero de la misma carga (Imagen extraída de <https://www.inin.gob.mx/documentos/publicaciones/contridelinin/Cap%C3%ADtulo%2012.pdf>).

Los carbones activados, arcillas, biopolímeros, zeolitas, perlas de sílice y plantas o desechos lignocelulósicos son algunos de los adsorbentes, generalmente con procesos variados de modificación química, comúnmente empleados para remover colorantes iónicos, MRA, materiales radioactivos entre otros contaminantes orgánicos e inorgánicos generados por diferentes tipos de industrias (Caviedes Rubio et al. 2015).

- IX. Carbón Activado:** El carbón activado es un término general que denomina a toda una gama de productos derivados de materiales preparados artificialmente a través de un proceso de carbonización, para que exhiban un elevado grado de porosidad y una alta superficie interna. Es un producto obtenido a partir del carbón amorfo, el cual se ha sometido a un tratamiento de activación con el fin de incrementar su área superficial hasta 300 veces debido a la formación de poros internos, pudiendo alcanzarse áreas de 1200 -1500 m²/g de carbón (Sevilla and Politécnica 2011).
- El carbón activado ha demostrado ser un adsorbente eficiente para la eliminación de una amplia variedad de contaminantes de gases y vapores de mezclas gaseosas o sustancias orgánicas e inorgánicas dispersas en líquidos.

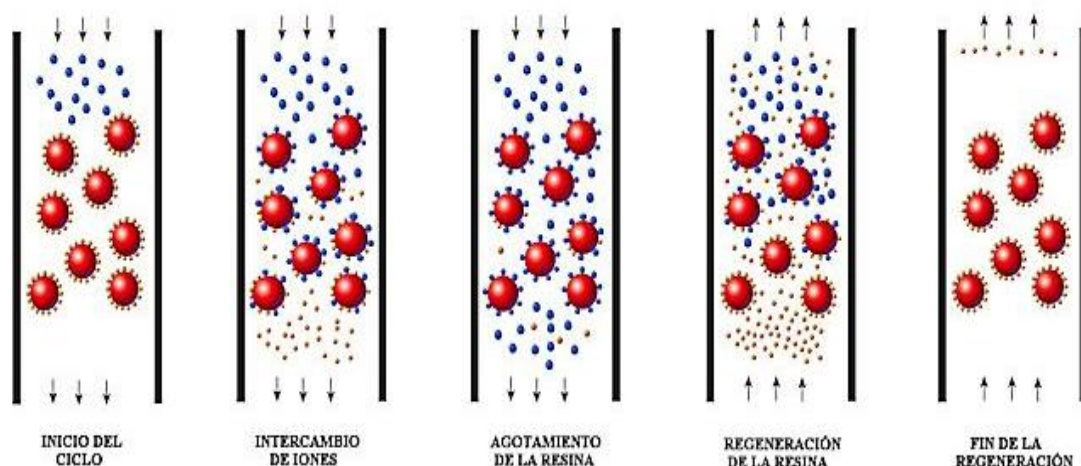


Figura 8. Esquema del funcionamiento de un proceso de adsorción química (Imagen extraída de <https://www.studocu.com/ca-es/document/universitat-de-barcelona/quimica/apunts/intercambio-ionico/8030831/view>).

Esto se debe a sus áreas superficiales porosas que van desde 500 hasta 1.500 m²/g, así como la presencia de un amplio espectro de superficie funcional que la hace accesible a diferentes reactivos. Se utiliza principalmente en el tratamiento terciario de aguas (Ver **Figura 9. (A)**). La diferencia fundamental entre uno y otro tipo de carbón radica en la estructura, o arreglo de sus átomos. En el caso del carbón activado, éstos se encuentran combinados en forma de placas graníticas (Ver **Figura 9.(B)**).

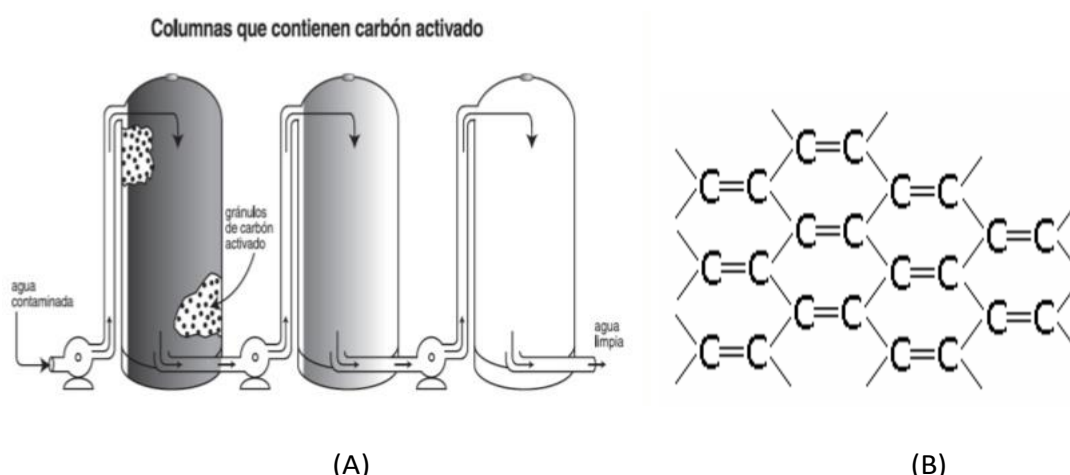


Figura 9. A: Esquema del funcionamiento de un proceso de filtración por carbón activado, B: arreglo de los átomos de carbono activado (Imagen extraída de

<https://es.slideshare.net/renzodaviddelacruz/carbn-activado-45867315> y (Sevilla and Politécnica 2011).

- X. **Nanotubos de carbono:** Los nanotubos de carbono son alótopos del carbono, como el diamante, grafito, etc. Su estructura puede ser procedente de una lámina de grafeno enrollada sobre sí misma. Debido al grado de enrollamiento y la manera como se conforma la lámina original, muestran distinto diámetro y geometría interna. Existen diferentes tipos de nanotubos de carbono en función de las capas de grafito que los forman. Estos, pueden ser de pared sencilla (SWCNT's por sus siglas en inglés) o de pared múltiple (MWCNT's) (Ver **Figura 10**). Los nanotubos de carbono muestran una interesante combinación de propiedades debido a su estructura, las dimensiones que presenta, estabilidad química, mecánica y eléctrica. Sin embargo, uno de los mayores problemas es su poca dispersión. Este inconveniente se puede superar por modificación química de los nanotubos. Un ejemplo de esto lo constituye la oxidación química de los nanotubos de carbono por medio de la cual se pueden agregar diversos grupos funcionales como ácidos carboxílicos, aminas y amidas. Esto les provee una capacidad excepcional para la eliminación de diversos contaminantes inorgánicos y orgánicos, y radionucleidos a partir de grandes volúmenes de aguas residuales (Andrade Guel, López López, and Sáenz Galindo 2012).

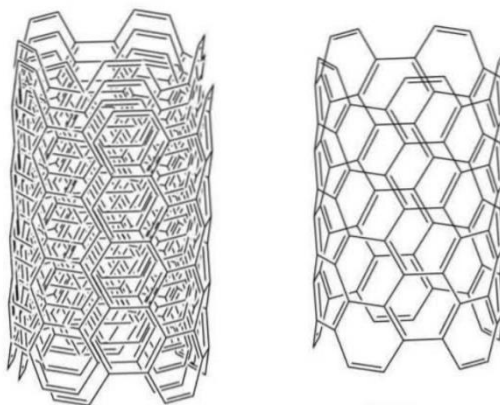


Figura 10. Esquema un nanotubo de pared sencilla (Derecha) y pared múltiple (Izquierda)
(Imagen extraída de (Andrade Guel, López López, and Sáenz Galindo 2012).

- XI. **Electrocoagulación:** Es un proceso que aplica los principios de la coagulación-floculación en un reactor electrolítico. Éste es un recipiente que se compone de una fuente de corriente y de varios electrodos encargados de aportar los iones desestabilizadores de partículas coloidales que reemplazan las funciones de los compuestos químicos que se utilizan en el tratamiento convencional, induciendo la corriente eléctrica en el agua a través de placas metálicas paralelas de hierro o

aluminio (Ver **Figura 11**). Ésta técnica se basa en un proceso que promueve la desestabilización de los sistemas coloidales utilizando un agente coagulante generado *in situ* vía electroquímica (Pabón, Sarria, and Gallo 2020; Caviedes Rubio et al. 2015).

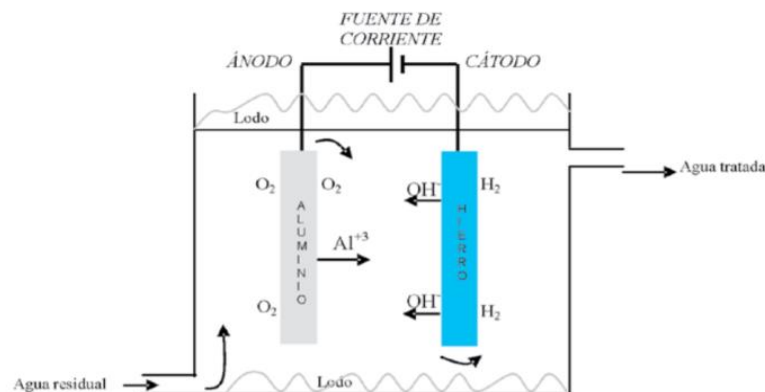


Figura 11. Esquema del funcionamiento de un proceso de tratamiento por electrocoagulación:

Ésta técnica se basa en un proceso que promueve la desestabilización de los sistemas coloidales utilizando un agente coagulante generado *in situ* vía electroquímica (Imagen extraída de http://repository.lasallista.edu.co/dspace/bitstream/10567/514/1/pl_v1n2_58-77_electrocoagulacion.pdf).

- XII. **Coagulación-Floculación:** Es el método mediante el cual se logra desestabilizar el coloide y aglomerarlo posteriormente. En la primera etapa la coagulación elimina la doble capa eléctrica que caracteriza a los coloides y con la floculación se produce una aglomeración y sedimentación consecuencia de la atracción de las partículas.
- Los factores más importantes que se deben tener en cuenta para esta técnica son la dosis química apropiada, el efecto energético de la mezcla y el tiempo de la mezcla (Ver **Figura 12**). Los coagulantes químicos que se utilizan comúnmente en el tratamiento de aguas residuales incluyen alumbre ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$), cloruro férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), sulfato férrico ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$), sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) y cal ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) (Pabón, Sarria, and Gallo 2020).

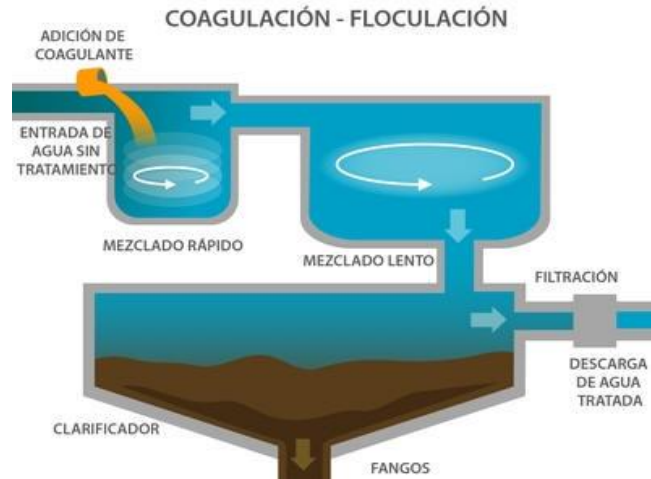


Figura 12. Esquema del funcionamiento de un proceso de coagulación-floculación: Es el método mediante el cual se logra desestabilizar el coloide y aglomerarlo posteriormente (Imagen extraída de https://pirhua.udep.edu.pe/bitstream/handle/11042/1712/_Informe_Final___PMTAR.pdf?sequence=1)

- XIII. Electrofloculación: Es un proceso químico que se basa en ánodos de aluminio o de acero, éstos son ionizados por electrólisis formando una variedad de especies coagulantes e hidróxidos metálicos que desestabilizan y promueven la agregación de las partículas suspendidas o adsorben los contaminantes disueltos en la corriente residual. Es decir, la corriente eléctrica es la fuerza electromotriz que provoca las reacciones que desestabilizan los complejos sistemas coloidales por diversos mecanismos. Su eficiencia en la remoción de los contaminantes se debe a que son arrastrados por las burbujas de gas (H_2 y O_2) que se producen en el sistema por lo que salen a flote en la superficie (Ver **Figura 13**). Este método es usado principalmente para tratar corrientes residuales provenientes de las industrias de la galvanoplastia, metal mecánica y para purificar cuerpos de agua (Pabón, Sarria, and Gallo 2020).

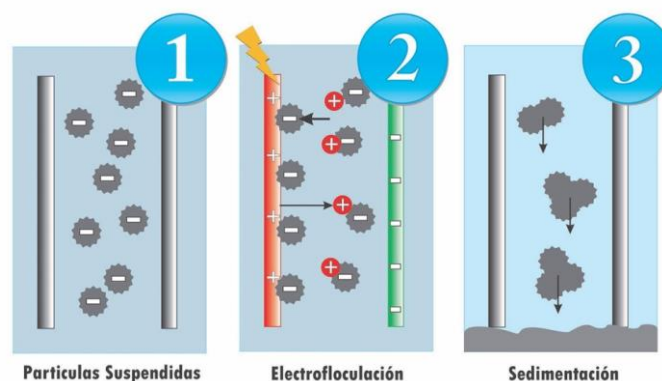


Figura 13. Esquema del funcionamiento de un proceso de Electrofloculación: Se basa en ánodos de aluminio o de acero, éstos son ionizados por electrólisis formando una variedad de especies coagulantes e hidróxidos metálicos que desestabilizan y promueven la agregación de las partículas suspendidas o adsorben los contaminantes disueltos en la corriente residual. (Imagen extraída de <http://industrialwater.com.mx/portfolio-item1.html>).

- XIV. **Flotación:** El proceso de flotación-ion se basa en impartir las especies iónicas de metal en las aguas residuales hidrófobas mediante el uso de agentes activos de superficie (tensioactivos) y la posterior eliminación de estas especies hidrófobas por la generación de burbujas de aire (Ver **Figura 14**) (Pabón, Sarria, and Gallo 2020). Esto se debe a que una molécula de tensioactivo típica consta de una cabeza iónica polar y una cadena de hidrocarburo apolar. La unión del grupo de cabeza polar a un ion metálico expone la sección hidrófoba no polar del tensioactivo en la solución. Cuando se introducen burbujas de aire en la celda de flotación, estas recogen los conjuntos de iones metálicos y tensioactivo debido a las interacciones favorecidas entre las cadenas de hidrocarburos expuestas y las burbujas de aire. Así, estas burbujas de aire cargadas con iones metálicos flotan hacia la superficie y se eliminan como una espuma rica en contenido metálico. El tamaño de las burbujas de aire en una celda de flotación debe ser del orden de unos pocos cientos de micrómetros para presentar una superficie suficiente para la recolección. Los reactivos que controlan el tamaño de las burbujas al reducir la interfase aire/agua se llaman espumadores. Algunos espumadores de flotación comunes son MIBC (metil isobutil carbinol), etanol, éteres metálicos (por ejemplo, Dowfroth 250), polipropilenglicol (Polat and Erdogan 2007).

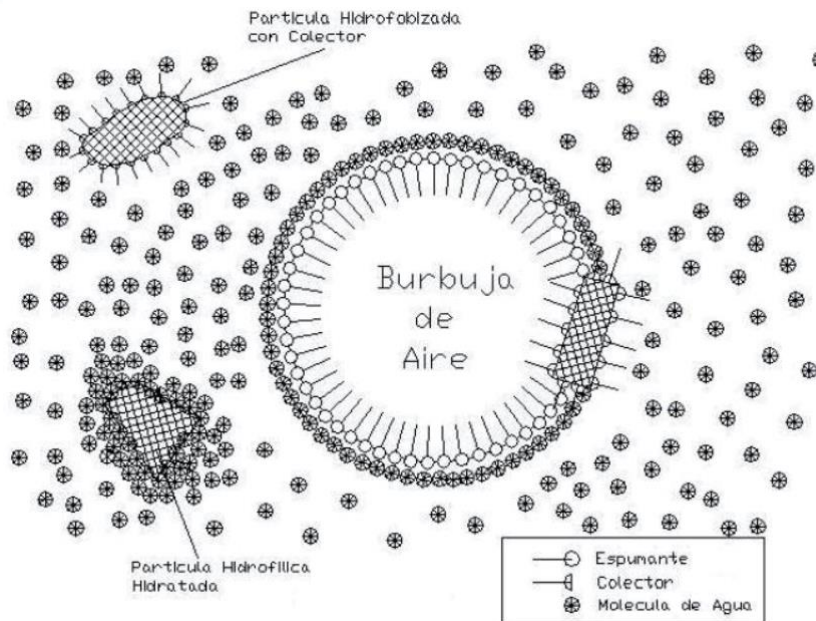


Figura 14. Esquema del funcionamiento de un proceso de flotación: El proceso de flotación-ion se basa en impartir las especies iónicas de metal en las aguas residuales hidrófobas mediante el uso de agentes activos de superficie (tensioactivos) y la posterior eliminación de estas especies hidrófobas por la generación de burbujas de aire (Imagen extraída de <https://docplayer.es/49811542-Modificaciones-del-proceso-de-flotacion-inversa-de-hierro-en-celdas-neumaticas-de-planta-magnetita.html>).

- XV. Fotocatálisis en la degradación de metales pesados: Se basa en la transferencia de carga a través de la interfase entre el semiconductor y la solución acuosa contaminada. La conductividad aumenta con la temperatura, y se genera un par electrón-hueco, ocurriendo la adsorción de los fotones y la distribución de diferentes estados electrónicos en la superficie, removiendo moléculas orgánicas, colorantes y MRA del efluente (Ver **Figura 15**) (Giraldo Garcés, Fernando, Mejía franco, and Santamaría Arango 2004).

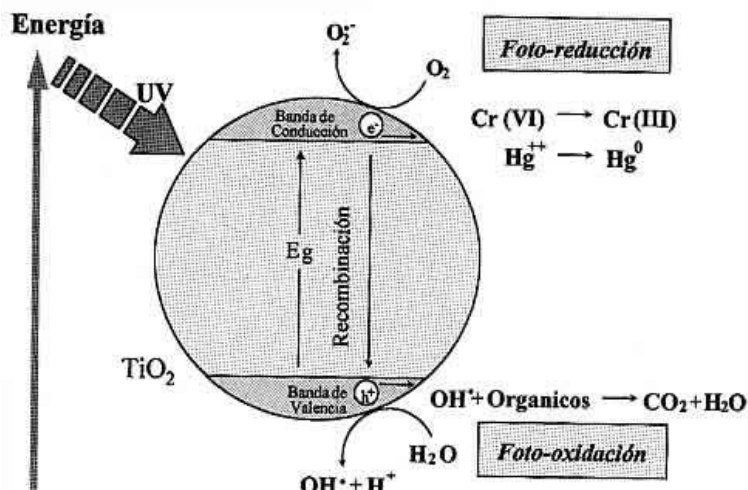


Figura 15. Esquema del funcionamiento de un proceso de fotocatalisis: Se basa en la transferencia de carga a través de la interfase entre el semiconductor y la solución acuosa contaminada. La conductividad aumenta con la temperatura, y se genera un par electrón-hueco, ocurriendo la adsorción de los fotones y la distribución de diferentes estados electrónicos en la superficie, removiendo moléculas orgánicas, colorantes y MRA del efluente (Imagen extraída de Giraldo Garcés et al. (2004)).

A modo de resumen, los tratamientos físicos van desde procesos tan sencillos como la sedimentación de partículas o separación por filtración, hasta otros tan complejos y específicos como las resinas de intercambio iónico para concentrar o recoger un residuo, o la utilización de la luz ultravioleta que destruye contaminantes como las dioxinas. Los tratamientos químicos transforman las sustancias nocivas o tóxicas en otras menos peligrosas (detoxificación), ejemplo de esto lo constituye el sustituir el Cl de los policloruros de benceno por otro átomo menos agresivo. Entre los procesos más comunes están la precipitación de sales y compuestos metálicos o de halógenos, la neutralización (reacciones ácido-base), la oxidación (reacciones de óxido-reducción) y mecanismos de precipitación que permiten transformar a los materiales disueltos en sólidos insolubles, y así facilitar su eliminación por filtración o sedimentación. Sin embargo, estas técnicas tienen inconvenientes, como la eliminación lenta e ineficiente, la generación de lodos tóxicos que requieren una eliminación cuidadosa, el elevado costo de operación, mantenimiento y energía involucrados en los procesos, el bloqueo de las membranas y por último, la poca rentabilidad cuando las concentraciones de metales en efluentes son menores a 100 mg/L (Leong and

Chang 2020; Kiran Marella, Saxena, and Tiwari 2020; Saldarriaga-Hernandez et al. 2020; Ayangbenro and Babalola 2017).

De manera de contrarrestar las desventajas de las técnicas físicas/químicas convencionales surgen los tratamientos biológicos, que usan la capacidad de muchos organismos como ser vegetales o microorganismos tales como hongos y bacterias, para concentrar o metabolizar los compuestos tóxicos. Ha habido un interés creciente en el uso de agentes biológicos para la eliminación de MRA como métodos alternativos de tratamientos debido a que son técnicas amigables con el ambiente y económicas cuando son comparadas con las técnicas físicas y químicas (Ayangbenro and Babalola 2017; Saldarriaga-Hernandez et al. 2020; Azubuike, Chikere, and Okpokwasili 2016). Como consecuencia, el conocimiento sobre los mecanismos de resistencia a MRA y especialmente su regulación, ha constituido un impulso para la investigación en el campo de la Ecología Microbiana y en la Biotecnología Ambiental (Marrero-coto and Coto-pérez 2010).

Biorremediación

La biorremediación se define como un proceso que se basa en mecanismos biológicos para reducir (degradar, desintoxicar, mineralizar o transformar) la concentración de contaminantes a un estado inocuo en un ecosistema. Estos mecanismos incluyen reacciones de óxido-reducción que involucran transformaciones de contaminantes peligrosos en componentes inocuos o menos tóxicos que son más estables, con una menor movilidad o inertes y, a menudo involucran un cambio de la solubilidad en el medio por modificaciones del pH (Ayangbenro and Babalola 2017). La mayoría de los metales/metaloideos, tienden a estar más disponibles a pH ácido porque son menos fuertemente adsorbidos, excepto arsénico (As), molibdeno (Mo), selenio (Se) y cromo (Cr). Los microorganismos tienen diversos mecanismos para remover MRA de ambientes contaminados tales como adsorción, complejación por interacción con exopolisacáridos, acumulación intracelular, biosíntesis de metalotioneínas y otros productos que secuestran metales y los transforman en especies volátiles (Verma and Jaiswal 2016).

Factores que afectan un proceso de biorremediación

Los investigadores han desarrollado y modelado diferentes técnicas de biorremediación, sin embargo, debido a la naturaleza y tipo de contaminante no hay una única técnica que sea efectiva para restaurar cualquier tipo de ambiente contaminado. Existen criterios de selección que se consideran a la hora de elegir el proceso adecuado de biorremediación, entre ellos: naturaleza del contaminante, profundidad y grado de contaminación, tipo de ambiente, ubicación, costo y políticas ambientales, si la aplicación será *ex situ* o *in situ* (Frutos et al. 2012; Smith et al. 2015). Además de los criterios de selección, otros factores a tener en cuenta para un proceso de biotratamiento exitoso son: concentración de nutrientes y oxígeno, temperatura, pH, agitación y otros factores abióticos.

Los microorganismos autóctonos (indígenas) presentes en ambientes contaminados son la clave para resolver la mayoría de los desafíos asociados a la biodegradación y biorremoción de contaminantes (Verma and Jaiswal 2016). Un gran número de estudios han examinado diversas técnicas de biorremediación incluyendo algas, bacterias y hongos como biosorbentes con el objetivo final de restaurar eficazmente los ambientes contaminados con un enfoque ecológico y a un costo muy bajo (Kapahi and Sachdeva 2019).

En esencia, la biorremediación se basa en un mecanismo dirigido a incrementar la estabilidad del metal (especiación) lo que reduce su biodisponibilidad. La especiación se define como la identificación y cuantificación de las diferentes especies, formas o fases definidas en las que puede encontrarse un metal, mientras que la biodisponibilidad es la porción de la cantidad total de un metal en un entorno, dentro de un marco de tiempo, que está disponible o puesto a disposición para su absorción directa por organismos vivos (Ayangbenro and Babalola 2017). Como se mencionó anteriormente, los mecanismos de toxicidad de los MRA en los seres vivos ocurre a través del bloqueo de las actividades biológicas, es decir, la inactivación enzimática por la formación de enlaces entre el metal y los grupos -SH (sulfhidrilos) de las proteínas, causando daños irreversibles en los diferentes organismos. Para que los MRA puedan ejercer su toxicidad sobre un ser vivo, éstos deben encontrarse disponibles para ser captados por organismos, es decir que el metal debe estar biodisponible. El concepto de biodisponibilidad se encuentra íntimamente relacionado con las condiciones fisicoquímicas del ambiente que determinan la especiación, y por lo tanto, la concentración de metal libre y lábil que posteriormente, serán responsables de los efectos fisiológicos y tóxicos de un metal en los organismos vivos (Ver especiación del cobre **Figura 16**) (Vullo 2003; Ayangbenro and Babalola 2017).

La movilidad de un metal depende no sólo de su especiación química, sino de una serie de parámetros de la matriz en la que se encuentra, por ejemplo, en un suelo el pH, materia orgánica, carbonatos, minerales de la arcilla, etc. La materia orgánica reacciona con los metales formando complejos o quelatos. La adsorción puede ser tan fuerte que queden estabilizados, como el caso del Cu, o formen quelatos también muy estables, como es el caso del Pb y Zn. En muchos casos se forman complejos órgano-metálicos lo que facilita la solubilidad del metal, la disponibilidad y dispersión al ser degradados por los organismos del suelo conduciendo a una persistencia de la toxicidad. Otro parámetro a considerar es el poder de intercambio catiónico, que depende del tipo de minerales de la arcilla, de la materia orgánica, del estado de oxidación y del radio iónico hidratado del metal. A mayor tamaño y menor estado de oxidación, menos frecuentemente quedan retenidos. Respecto a los minerales de la arcilla, la retención es mínima para los minerales del grupo del caolín, baja para las illitas, alta para las esmectitas y máxima para las vermiculitas. Además, el potencial de óxido-reducción es responsable de que el metal se encuentre en estado oxidado o reducido. Los diagramas de Pourbaix (Eh-pH) se utilizan para mostrar la estabilidad de los compuestos metálicos y proporcionan un método fácil para predecir el comportamiento de los MRA frente a un cambio de las condiciones ambientales.

Cobre

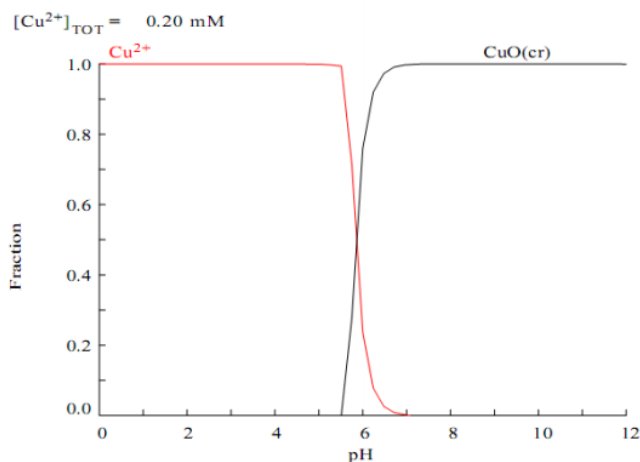


Figura 16. Diagrama de distribución de especies del cobre (Imagen extraída de https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/12248/Anexo_B-C.pdf?sequence=3&isAllowed=y).

Otra cuestión a considerar para un proceso de biorremediación es la presencia en el ambiente de carbonatos y óxidos e hidróxidos de Fe y Mn, ya que la presencia de carbonatos garantiza el mantenimiento de los altos pH, y en estas condiciones tienden a precipitar los MRA como por ejemplo el Cd. Los óxidos e hidróxidos de Fe y Mn juegan un importante papel en la retención de MRA y en su inmovilización. Se encuentran finamente diseminados en la masa de suelo por lo que son muy activos. Por su baja cristalinidad y pequeño tamaño de partícula, tienen una alta capacidad adsorptiva para metales divalentes, especialmente Cu y Pb, y en menor extensión Zn, Co, Cr, Mo, Ni y también As. Otro factor a considerar es la salinidad del suelo, ya que puede incrementar la movilización de metales y su retención por dos mecanismos. Primeramente, los cationes sodio (Na^+) y potasio (K^+) pueden reemplazar a MRA en lugares de intercambio catiónico. En una segunda fase, los aniones cloruro y sulfato pueden formar compuestos más estables con metales tales como Pb, Zn, Cu, Cd y Hg.

A modo de conclusión podemos decir que las aguas residuales derivadas de la actividad industrial y de los residuos domésticos, por cuestiones de salud pública no pueden ser vertidas a los cursos de agua corriente. A lo largo de toda la introducción se evidenció las consecuencias que llevan consigo los MRA en la salud de los seres humanos, plantas y animales debido a la ingesta directa o indirecta de los mismos. Por tal motivo, se resalta la importancia de tratar estos efluentes antes de su descarga en cuerpos de aguas receptoras.

Inspirados en lo anteriormente mencionado se llevó a cabo este trabajo de tesis y en él se pretende explicar con hechos científicos diversos cuestionamientos:

¿Es posible la implementación de un biotratamiento sostenible² que elimine cobre de un efluente líquido, utilizando bacterias autóctonas de zonas contaminadas con MRA?

A principio de la introducción se estableció las consecuencias que lleva consigo la ingesta de altas concentraciones de Cu(II) halladas en aguas. Siendo éste metal uno de los principales contaminantes que se encuentran en efluentes de la industria galvanoplástica entre otras fuentes, y conociendo los enormes caudales que esta genera ¿Será posible escalar el sistema o ajustarlo para operar con volúmenes creciente de efluentes?

Uno de los grandes desafíos que enfrenta una industria a la hora de diseñar un tratamiento de efluente es el enorme costo de operación que se requiere, por lo que en este trabajo se pretende diseñar un biotratamiento económico. Para ello, es necesario responder la siguiente pregunta ¿qué parámetro se deberían tener en cuenta para la reducción de los costos de operación y mantenimiento?

Por último, es de conocimiento mundial la implementación de tecnologías que permiten remover los MRA de los efluentes industriales, sin embargo muchas de ellas acarrear graves consecuencias al medioambiente. Teniendo en cuenta lo anteriormente mencionado, sería conveniente evaluar el impacto ambiental del biotratamiento desarrollado en esta tesis.

² Sostenible: Etimológicamente hace referencia a “sostener”, que implica en el fondo, que alguien o algo externo o ajeno “sostenga”. Por ello, lo sostenible se halla en el ámbito externo o exógeno a un sistema. Dentro del ámbito externo se hallan las políticas de gobierno, el clima, los tratados, la competencia, el mercado, el medio ambiente, entre otros. Por lo tanto si hablamos de una organización “sostenible”, tiene que ver con las oportunidades y las amenazas que puedan existir en el exterior de un sistema para mantenerse en el tiempo.

OBJETIVOS DE LA TESIS

Objetivo General:

El objetivo general del trabajo es la puesta a punto e implementación de sistemas de tratamiento biológico de un sistema acuoso con contenido de Cu(II) a través del diseño y funcionamiento de biorreactores a escala laboratorio. En tal sentido, se estudia la interacción de células enteras o productos bacterianos en estado soluble o inmovilizado sobre algún soporte, con la finalidad de optimizar y desarrollar métodos de remediación potencialmente aplicables a efluentes de procesos de galvanoplastia.

Objetivos específicos:

- I. Estudiar la capacidad de biosorción por parte de células enteras de *Pseudomonas veronii* 2E con Cu(II) obtenidas bajo diferentes condiciones experimentales:
 - Medios de cultivo: Medio enriquecido (PYG) y Medio mínimo salino (M9).
 - Temperaturas: 25 °C y 32 °C.
 - Concentraciones iniciales de Cu(II): 0,5 mM y 1 mM.

- II. Evaluar un método de desorción de Cu(II) por células enteras de *Pseudomonas veronii* 2E:
 - Concentración de desorbente.
 - Volumen de desorción.
 - Ciclos de desorción.

- III. Evaluar métodos de inmovilización de *P. veronii* 2E sobre diferentes matrices.
 - Esponja de *luffa* (EV).
 - Diatomitas (PS).
 - Piedra Pómez (PP).

- IV. Optimizar la capacidad de biosorción de Cu(II) por parte de células enteras de *Pseudomonas veronii* 2E inmovilizadas en el soporte, para la construcción de biorreactores (*batch* y continuo) a escala laboratorio.
- V. Diseñar un proceso de eliminación de Cu(II) con el sistema *P. veronii* 2E inmovilizado.
- VI. Diseñar un proceso de recuperación de Cu(II) retenido por el sistema inmovilizado en el reactor *batch* y continuo.
- VII. Estudiar la extracción e Inmovilización de las sustancias poliméricas extracelulares solubles (EPS).
- VIII. Estudiar la interacción de las sustancias poliméricas extracelulares solubles con Cu(II) 1 mM.
- IX. Estudiar procesos de desorción de Cu(II) de las sustancias poliméricas extracelulares solubles.



Capítulo I

*Estudio de la interacción de la bacterias en
estado planctónico con Cobre*





INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos juegan un rol vital en la transformación de elementos traza, incluidos los MRA ya que influyen su biodisponibilidad y remediación, pueden alterar la toxicidad, solubilidad en agua y la movilidad del elemento. Los microorganismos modifican la concentración de MRA en el ecosistema, pues estos cuentan con mecanismos enzimáticos y no enzimáticos para remover metales en solución. La capacidad de remoción de metales por bacterias, microalgas y hongos es superior a la reportada con métodos fisicoquímicos convencionales, también se conoce que la adquisición y remoción de los metales tóxicos puede ser selectiva teniendo en cuenta la capacidad metabólica de cada especie biorremediadora y el tipo de metal (Beltrán-Pineda and Gómez-Rodríguez 2016).

Biorremediación

Las diferentes técnicas de biorremediación surgen de las estrategias desarrolladas por los microorganismos como un mecanismo de supervivencia a ambientes contaminados mediante los cuales pueden inmovilizar, movilizar o transformar los metales, reduciendo de esta manera la toxicidad de los iones. Las diferentes tecnologías aprovechan estos mecanismos para el desarrollo de biotratamientos para la remediación del ambiente.

Como se mencionó en reiteradas ocasiones, los MRA no pueden ser degradados, como ocurre con los compuestos orgánicos tóxicos. Éstos pueden unirse a la superficie externa de la célula a través de mecanismos que incluyen interacciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals, unión covalente, con los grupos cargados negativamente (carboxilos, hidroxilos, aminos, fosfatos, etc.), quedando retenidos en la pared celular.

Dentro de la amplia diversidad microbiana, existen microorganismos resistentes y microorganismos tolerantes a metales. Los resistentes se caracterizan por poseer mecanismos de detoxificación codificados genéticamente, inducidos por la presencia del metal. En cambio, los tolerantes son indiferentes a la presencia o ausencia de metal. Tanto los microorganismos resistentes como tolerantes son de particular interés como captadores de metales en sitios contaminados, debido a que ambos pueden extraer los

contaminantes. La resistencia o tolerancia experimentada por microorganismos es posible gracias a la acción de diferentes mecanismos (Vullo 2003). Existen sólo tres mecanismos a través de los cuales un sistema puede conferir resistencia a MRA: (I) disminución de la acumulación de un determinado ion mediante su transporte activo (eflujo) fuera de la célula; (II) acumulación citoplasmática de cationes por interacción con ligandos intracelulares; (III) reducción de algunos iones metálicos de relevancia ambiental a un estado de oxidación menos tóxico. Sin embargo, (II) y (III) no pueden funcionar como mecanismos de detoxificación únicos en una célula. Por consiguiente, la detoxificación de los MRA es llevada a cabo fundamentalmente por un proceso de transporte o en última instancia por una combinación de mecanismos de movilidad del metal (Marrero-Coto and Coto-Pérez 2010).

En la **Figura 17** se muestra un esquema de los diferentes mecanismos bacterianos potencialmente aprovechables en procesos de biorremediación.

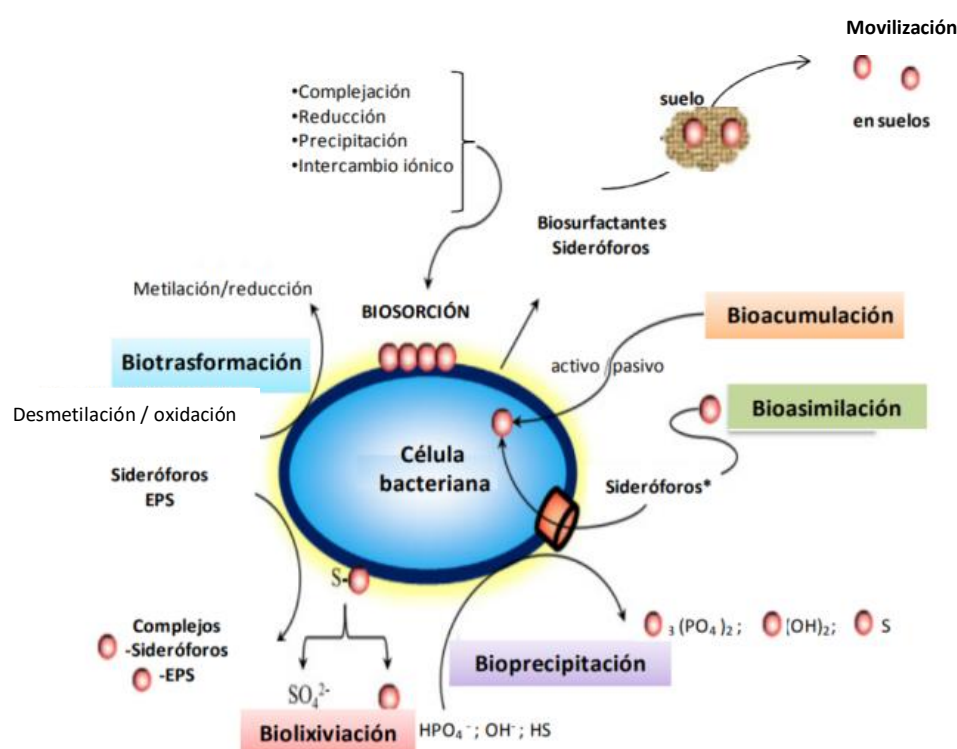


Figura 17. Esquema de los diferentes mecanismos de interacción de la célula bacteriana con metales de relevancia ambiental (Imagen extraída de Ferreira (2016)).

- I. **Biosorción:** Es un proceso que consiste en el uso de biomasa activa o inactiva para la inmovilización de cationes en solución. Cualquier organismo tiene afinidad por los contaminantes orgánicos e inorgánicos, lo que significa que existe un enorme potencial de biosorción en numerosos organismos. La biosorción implica varios procesos, entre los que se incluyen la complejación, la interacción electrostática, el intercambio iónico, la adsorción física y química, la adsorción en la superficie, la difusión, la quelación y la microprecipitación. Este proceso ocurre principalmente en la estructura externa de la célula, que es la primera barrera que bloquea la entrada de contaminantes al interior celular. Así, los contaminantes pueden ser retenidos en la superficie o dentro de la estructura de la célula, debido a la interacción con los numerosos grupos funcionales que presenta (Beltrán-Pineda and Gómez-Rodríguez 2016; H. Zhang et al. 2020). Los microorganismos utilizados como biosorbentes, aislados a partir de ecosistemas contaminados, retienen los MRA a intervalos de tiempo relativamente cortos al entrar en contacto con las soluciones de dichos metales. Además, no presentan una alta dependencia con la temperatura y en muchos casos puede estudiarse en detalle mediante la construcción de los modelos de isothermas de Langmuir y Freundlich. Esto, minimiza los costos en un proceso de remediación, ya que no requiere el agregado de nutrientes al sistema, al no requerir un metabolismo microbiano activo (Vullo 2003). La biomasa capaz de participar en estos procesos es fácilmente extraíble de sistemas acuosos como cursos de aguas o efluentes de diversos orígenes, por lo que el proceso global de biorremediación sería rentable. Es por ello que la búsqueda de este tipo de microorganismos se encuentra en crecimiento constante, junto con el estudio de sistemas biosorbentes como, por ejemplo, la utilización de consorcios microbianos, o sistemas mixtos formados por microorganismos y macromoléculas (polímeros) sorbentes, que incrementarían los rendimientos en la captación de mezclas de MRA. En conclusión, los microorganismos y/o sus productos pueden ser muy eficientes reteniendo iones metálicos. No obstante, la utilización de células vivas está limitada a la toxicidad de la especie metálica.

- II. **Bioacumulación:** Este mecanismo celular involucra un sistema de transporte de membrana que internaliza el MRA presente, mediante la formación de un complejo al entorno celular con gasto de energía. Este consumo energético se

genera a través del sistema H^+ -ATPasa. Una vez incorporado el metal al citoplasma, éste es secuestrado por la presencia de proteínas ricas en grupos sulfhidrilos llamadas metalotioneínas, fitoquelatinas, algunos péptidos de unión a metales o también puede ser compartimentalizado dentro de una vacuola, como ocurre en hongos (Beltrán-Pineda and Gómez-Rodríguez 2016). Uno de los metabolitos secretados por microorganismos más conocidos son los sideróforos. Éstos son selectivos para Fe(III), lo complejan y lo transportan al interior de la célula para su utilización. Sin embargo, se ha reportado que ciertos iones metálicos, como por ejemplo el Ni(II), Cu(II), Co(II), Al(III) y Ga(III), se unen a dichas moléculas y luego son transportadas al interior de la célula llevando consigo al ion metálico unido (Ferreira, Ramirez, and Vullo 2018). Otros ejemplos de este proceso son muy interesantes, como el caso de acumulación de uranio por la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, el cual fue detectado íntegramente en el citoplasma, al igual que en la levadura *Saccaromyces cerevisiae* (Vullo 2003).

- III. **Biomineralización o Bioprecipitación:** Es un proceso mediante el cual los organismos vivos propician la precipitación de minerales, ya sean cristalinos o amorfos. Las estructuras formadas se componen en un 80% de biominerales cristalinos y un 20% de amorfos. La biomineralización o bioprecipitación se produce a través de reacciones químicas entre iones específicos o compuestos, como resultado de la actividad metabólica bacteriana bajo ciertas condiciones ambientales. La "carbonatogénesis" es un buen ejemplo de biomineralización, en el que se produce la precipitación de carbonato de calcio (Arrieta-Rodríguez, Valencia-González, and Echeverri-Ramírez 2012). Los microorganismos son capaces de precipitar metales (como carbonatos e hidróxidos), mediante un mecanismo de resistencia codificado en plásmidos. Este mecanismo aparece por el funcionamiento de una bomba que expulsa el MRA presente en el citoplasma hacia el exterior celular en contracorriente a un flujo de H^+ hacia el interior celular. Esto produce una alcalinización localizada sobre la superficie celular externa y por lo tanto la precipitación del metal. Otra forma de precipitar los metales es a través de la formación de sulfuros o fosfatos, como resultado de alguna actividad metabólica celular (Sosa et al. 2017). Un ejemplo de ello, es la precipitación de sulfuros metálicos en reactores con cultivos mixtos de bacterias

reductoras de sulfato o la acumulación de sulfuro de cadmio (CdS) en la pared celular de las bacterias *Klebsiella planticola* y *Pseudomonas aeruginosa* (Zurita 2010; Rana et al. 2020).

- IV. **Biotransformación:** Este es un proceso que involucra un cambio químico sobre el metal, como puede ser el cambio del estado de oxidación o la metilación. Por ejemplo, se ha reportado el aislamiento de diferentes bacterias (*Bacillus* sp, *Pseudomonas* sp, *Desulfovibrio* sp., *E.coli* sp., *Serratia* sp) y hongos (*Saccharomyces cerevisiae* o *Aspergillus flavus*) capaces de reducir Cr(VI) a Cr(III) (Ferreira 2016). Esta transformación biológica de los metales que resultan tóxicos mediada por enzimas microbianas puede dar como resultado compuestos poco solubles en agua o bien compuestos volátiles (Del Carpio Jiménez 2017). El ejemplo más claro es el ciclo del Hg en la naturaleza (Ver **Figura 18**), donde la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* puede reducir el catión Hg^{2+} a Hg^0 , y otros organismos pueden luego metilarlo dando como producto el CH_3Hg^+ y $(CH_3)_2Hg$, que son volátiles y aún más tóxicos que el propio Hg (Vullo 2003)

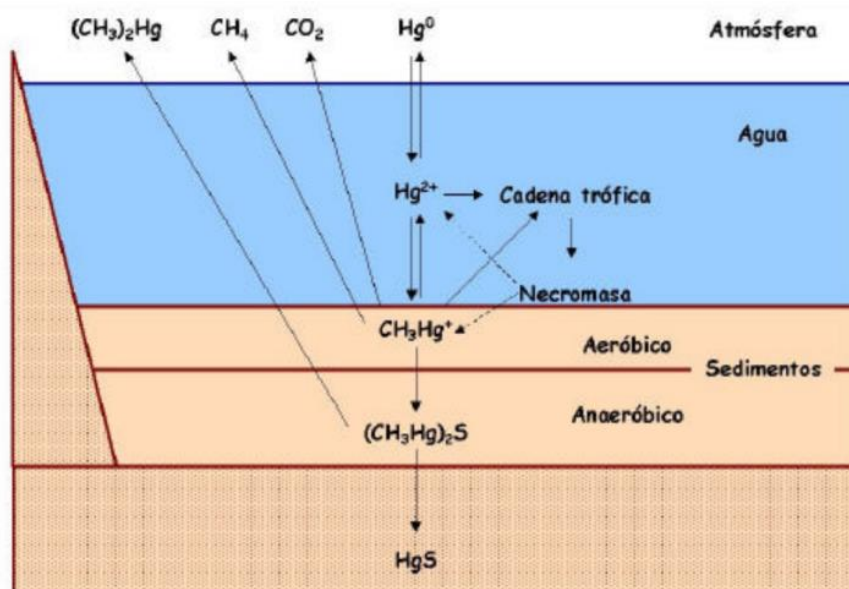


Figura 18. Ciclo biogeoquímico del Hg (Imagen extraída de (Vullo 2003).

Las reducciones de vanadio (V) de V(V) a V(III), oro (Au) de Au(III) a Au(0) y cromo (Cr) de Cr(VI) a Cr(III), conducen a la precipitación del metal bajo condiciones fisiológicas. Entre estos últimos el Cr es el metal más ampliamente

utilizado en la industria de aceros, automóviles, equipamiento de hospitales y curtiembres, entre otras. El Cr(VI) es un contaminante de prioridad 1 catalogado por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA: www.epa.gov), ya que es estable en solución acuosa y por lo tanto de alta movilidad en diferentes ambientes, con un alto potencial mutagénico y carcinogénico. El pasaje a Cr(III) produce la inmovilización por precipitación de hidróxidos y la disminución en la mutagenicidad. La utilización de microorganismos resistentes a Cr con capacidad de bioconversión Cr(VI) en Cr(III) es de fundamental importancia en el tratamiento biológico de efluentes industriales.

- V. Quimiosorción: Es mediada por microorganismos, dentro de este término se pueden describir aquella clase de reacciones en donde los microorganismos biomineralizan un metal, formando un depósito primario. Este depósito primario funciona como núcleo de cristalización, con la subsecuente deposición del metal de interés, promoviendo y acelerando así el mecanismo de mineralización. Un ejemplo de este proceso es el agregado de Hierro (Fe) en un efluente a tratar, en presencia de bacterias reductoras del sulfato. Estos microorganismos producen sulfuros que precipitan en forma de FeS, sobre la superficie celular. Los otros metales contaminantes utilizan el FeS formado como soporte y cristalizan sobre sus cristales. Luego, aprovechando las propiedades magnéticas del Fe, pueden separarse fácilmente de la fase soluble.
- VI. Biolixiviación: Es el mecanismo por el cual un metal es movilizado generalmente desde un mineral por la acción microbiana. Un ejemplo muy estudiado y utilizado en la industria minera es la extracción en fase acuosa de Cu por la oxidación de las menas de Cu₂S a CuSO₄ por la acción de las bacterias *Acidithiobacillus ferrooxidans* y *Acidithiobacillus thiooxidans* (Ferreira 2016). El proceso de biolixiviación se ha logrado con éxito en la solubilización de numerosos metales valiosos de minerales sulfídicos, incluidos cobre, níquel, cobalto y zinc. Como la biolixiviación ahora se aplica a varias formas de minerales/desechos, podría referirse simplemente a la solubilización de metales de sus minerales/desechos correspondientes utilizando microorganismos especializados disponibles naturalmente. La biooxidación en biolixiviación se

define como la solubilización de los sulfuros de metal interferentes presentes en el mineral que deja el metal deseado como tal, por ejemplo, el mineral aurífero (arsenopirita) que contiene sulfuro de hierro y arsénico se disuelve en medio líquido dejando el oro como la fracción insoluble que luego se recupera mediante cianuración (Srichandan et al. 2020).

Antecedentes de *Pseudomonas veronii* 2E

El microorganismo utilizado en el presente trabajo de tesis fue *Pseudomonas veronii* 2E. Esta bacteria Gram-negativa fue aislada de sedimentos extraídos de la cuenca del Río Reconquista (6provincia de Buenos Aires; 34° 25'S, 58°34'O) (Ver **Figura 19**), que recibe las descargas de efluentes de la mayoría de las actividades industriales y agropecuarias que se practican en las zonas aledañas (Ver **Figura 20**).

La bacteria fue identificada por secuenciación del 16S r-RNA (MIDI Labs, USA) como *P. veronii* 2E (99,9% alineamiento con GenBank).

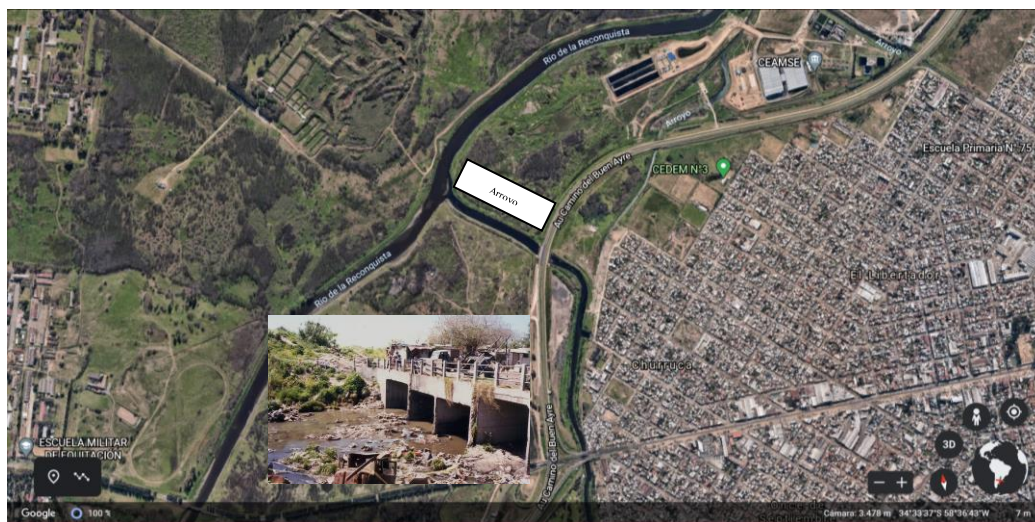


Figura 19. Imagen satelital de la ubicación donde la bacteria fue aislada.

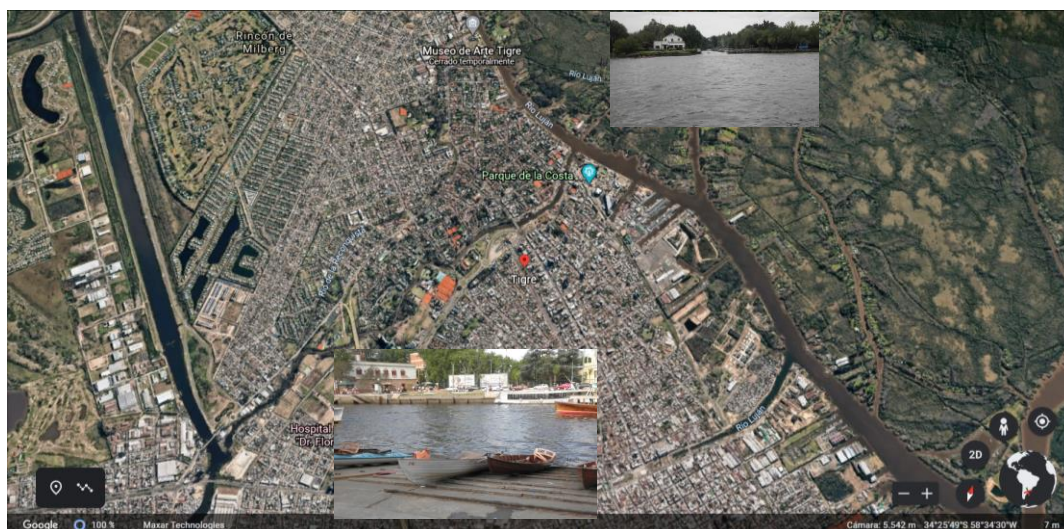


Figura 20. Imagen satelital donde se observan algunas de los numerosos cuerpos de agua que desembocan en el Río Reconquista

Trabajos realizados por el grupo de investigación con *P. veronii* 2E:

En el laboratorio de Microbiología de la Universidad Nacional de General Sarmiento (UNGS), el grupo de investigación ha llevado a cabo numerosos estudios de la bacteria en el área de la Química Ambiental. A continuación, se detallarán brevemente los trabajos más relevantes. Por un lado, *P. veronii* 2E fue testeada como catalizador para la transformación de Cr(VI) a Cr(III) para biotratamiento de aguas residuales con contenido de Cr(VI). La biotransformación de Cr(VI) fue ensayada durante el crecimiento bacteriano y utilizando un cultivo de células quiescentes. Se comprobó la poca eficiencia de un biotratamiento basado en la reducción de Cr(VI) durante el crecimiento bacteriano: la tasa de reducción y la concentración máxima de Cr(VI) que se podía reducir eran demasiado bajas. Por otro lado, las suspensiones de alta densidad de células quiescentes presentaron tasas de reducción más altas, especialmente en presencia de un dador de electrones. En este contexto, *Pseudomonas veronii* 2E fue la cepa más eficaz para la remoción de Cr(VI). El pH y la temperatura óptima para el proceso de biotransformación resultaron 7 y 32 °C respectivamente con una tasa de reducción inicial máxima de 0,49 mg de Cr(VI) h⁻¹ g de peso seco celular⁻¹ (9,4 μmol de Cr (VI) h⁻¹ g de peso seco celular⁻¹). La prueba de la viabilidad y eficiencia de esta tecnología se obtuvo utilizando células *P. veronii* 2E inmovilizadas en alginato de calcio para el tratamiento de aguas residuales industriales reales con contenido en Cr(VI) (Alessandrello and Vullo 2018). Por otro lado, se diseñó un biosensor electroquímico basado en *P. veronii* 2E autoalimentado portátil que permite la monitorización en línea de Cr(VI). El biosensor emplea un sistema de mediación redox para permitir la transferencia de electrones extracelulares entre el microorganismo y el electrodo, proporcionando una respuesta clara a la presencia de Cr(VI). El biosensor mostró una buena linealidad ($R^2=0.983$) y un límite de detección de 2,4 mg L⁻¹ Cr(VI), con una sensibilidad de 0,31±0,02 μA cm⁻² mg Cr(VI)⁻¹ L. La arquitectura de bioanodo microbiano presentada mejoró el rendimiento del biosensor gracias al mejor "cableado eléctrico" entre las entidades biológicas y la superficie del electrodo abiótico. Este enfoque podría implementarse fácilmente en superficies de electrodos diseñados, como ánodos múltiples basados en papel que maximizan la colonización bacteriana, mejorando aún más la respuesta del biosensor (Lazzarini Behrmann et al. 2020).

Se testeó la capacidad de biosorción de la biomasa bacteriana para la remoción de Cd(II) de efluentes líquidos. Las condiciones experimentales (pH, masa celular,

volumen, concentración de metal) fueron estudiadas para desarrollar un proceso de biosorción eficiente con células libres o inmovilizadas de *Pseudomonas veronii* 2E. Se estudió la inmovilización bacteriana en diferentes soportes como membranas de teflón, caucho de silicona y espuma de poliuretano. Los experimentos de biosorción fueron llevados a cabo a 32 °C y pH controlado, la capacidad máxima de retención de Cd(II) fue observada a pH 7,5. La isoterma siguió el modelo de Langmuir ($K_d = 0,17$ mM y $q_{max} = 0,48$ mmol/g peso seco de células). Además, se observó la biosorción del 40% Cu(II) (pH 5 y 6,2), 50% Zn(II) y 50% Cd(II) (pH 7,5) para mezclas de Cu(II), Zn(II) y Cd(II) 0,5 mM cada uno (Vullo et al. 2008; Daniel 2018).

Se estudió el proceso de biosorción para Zn(II) y mezclas de Zn(II)-Cd(II) por *P. veronii* 2E. Un 82% de biosorción de Zn(II) fue alcanzada en 30 h a 32 °C y el resultado de la isoterma se ajustaba mejor al modelo de Freundlich. La biosorción simultánea de Cd(II) and Zn(II) mostró que todos los sitios de adsorción estaban disponibles para Cd(II), pero solo una fracción de ellos lo estaban para Zn(II). Además, las propiedades eléctricas de la superficie bacteriana fueron estudiadas por determinación del punto isoeléctrico y variaciones de la movilidad electroforética, determinadas a diferentes estados de crecimiento. La capacidad de biosorción de Zn(II) y Cd(II) de *Pseudomonas veronii* 2E hace posible su aplicación como un biosorbente eficiente en tratamiento de aguas residuales (Méndez et al. 2011).

En otros trabajos, se estudió la producción, aislamiento, purificación y caracterización de Sustancias Poliméricas Extracelulares (EPS) solubles secretadas por la bacteria. Los EPS son productos bacterianos asociados a la pared celular o secretados a los medios líquidos. La producción óptima se obtuvo en medio M9-14 g L⁻¹ de glicerol, 25 °C. Estudios estructurales mostraron que EPS estaba conformado por DNA extracelular, proteínas y polisacáridos como componentes principales. Los tratamientos con DNasa I, Proteinasa K y otros tratamientos con desoxicolato de sodio produjeron proporciones similares de lipopolisacáridos (LPS) y exopolisacáridos (ExP). El ExP se sometió a hidrólisis ácida total y luego se analizó mediante cromatografía de intercambio aniónico de alto rendimiento con detección amperométrica pulsada (HPAEC-PAD), que mostró la presencia de fucosa, galactosamina, glucosamina, galactosa, glucosa, manosa y ácido glucurónico. El tratamiento posterior con ácido oxálico confirmó la presencia de un azúcar piruvilado. La capacidad de los productos secretados para interactuar con Cd(II) se estudió mediante voltamperometría de preconcentración anódica (ASV). La fracción de LPS contenía la concentración de

ligando más alta (279 ± 10 μmoles de sitios de unión de Cd(II) g LPS^{-1}). Esta información es una herramienta valiosa para la aplicación de EPS en el tratamiento de aguas residuales industriales (Ferreira et al. 2017). Estos EPS, como se mencionó anteriormente, contienen grupos funcionales como carboxilo, amino, hidroxilo, fosfato y sulfhidrilo, capaces de interactuar con cationes. Por lo tanto, los EPS pueden considerarse compuestos desintoxicantes naturales de aguas y aguas residuales contaminadas con metales. En otras investigaciones se estudió la interacción de Cd(II) , Cu(II) y Zn(II) con células de *P. veronii* 2E, incluyendo EPS unido y pared celular, y sus diferentes fracciones de EPS soluble, previamente caracterizadas como ligandos de Cd(II) de fuerza moderada. Los grupos amino presentes en la fracción de exopolisacáridos fueron responsables de la complejación de Zn(II) y Cu(II) , mientras que los carboxilatos quelaban el Cd(II) . En la fracción de lipopolisacáridos, los sitios fosforilo y carboxilo participaron en la unión de Cd(II) y Cu(II) , mientras que el Zn(II) interactuó con los grupos amino. Se obtuvieron resultados similares a partir de células. Estos estudios confirmaron que FTIR-PCA es una herramienta analítica rápida para proporcionar información valiosa sobre los grupos funcionales en biomoléculas relacionadas con la interacción de metales. Además, se demostró una discriminación e identificación de grupos funcionales presentes tanto en EPS como en células que interactuaban con Cd(II) , Zn(II) y Cu(II) (Ferreira et al. 2020). Además, en otros trabajos, se aislaron cuatro polisacáridos del EPS de *P. veronii* 2E. El ácido llamado EPO2 se purificó y su estructura se dilucidó mediante desorción/ionización láser asistida por matriz y espectrometría de masas de ionización por electropulverización, espectroscopia infrarroja, espectroscopia de resonancia magnética nuclear y tratamientos químicos. Se evaluó la capacidad de biosorción de EPO2 y del exopolisacárido completo a Pb(II) , Zn(II) , Cu(II) y Fe(II) . EPO2 mostró una notable capacidad de sorción para Fe(II) con una eficiencia del 70% y para Zn(II) 39% mientras que la del exopolímero completo presentó una adsorción de metal significativamente más baja que EPO2 (Cavallero et al. 2020). Otros productos microbianos estudiados de esta bacteria fueron sus sideróforos, ligandos de bajo peso molecular, secretados por la bacteria como una estrategia de supervivencia en ambientes con ausencia de Fe(III) . La unión no es solo a Fe(III) , sino también a Co(II) , Zn(II) , Mn(II) , Ni(II) , Ga(III) como una alternativa de detoxificación. La producción óptima fue obtenida en M9-succinato libre de Fe(III) a 25 °C, 40 h y pH 6,9. Los sideróforos fueron químicamente caracterizados como hidroxamatos y un tipo de mezcla de catecoles comportándose

como ligandos a Cd(II), Zn(II), Cu(II), Ni(II) y Cr(III). La complejación de Cd(II)-sideróforos fue estudiado por titulación electroquímica revelando una familia de sitios de unión de fuerza moderada, convirtiéndolos en una alternativa segura para la aplicación concreta de tecnologías ambientales y procedimientos clínicos (Ferreira, Ramirez, and Vullo 2018).

Por otro lado, se ha demostrado que ciertos biosurfactantes pueden emplearse en procesos de biorremediación por poseer además la capacidad de complejar MRA y pueden reemplazar a los actuales surfactantes sintéticos comerciales. Por lo tanto, se realizó un relevamiento de su producción en *Pseudomonas veronii* 2E, entre otras bacterias, en busca de nuevos biosurfactantes. Se midió la tensión superficial (TS) de los cultivos y la respuesta en agar sangre y agar para detección de surfactantes aniónicos (MBA). *P. veronii* 2E resultó ser potencial candidata para la producción de biosurfactantes y de ella se logró el aislamiento de cinco posibles compuestos con propiedades tensioactivas. Estos fueron analizados por cromatografía líquida para comprobar su grado de pureza y sometidos a ensayos químicos para tratar de elucidar su estructura. Además, se generaron mutantes carentes de producción de tensioactivos. De las doce mutantes seleccionadas se conservó la denominada 2E01 por ser deficiente en dos características asociadas a la producción de biosurfactantes: la formación de *biofilms* y la movilidad tipo *swarming*. Se probó restaurar el fenotipo de movilidad de 2E01 y se demostró que dos de los compuestos obtenidos de *P. veronii* 2E (Sc1 - Sc2) era capaz de revertir el fenotipo mutante tal como los resultados obtenidos con el surfactante sintético de referencia Tritón X-100. En conclusión, este trabajo permitió obtener nuevas herramientas para el estudio de *Pseudomonas veronii* 2E y su aplicación en biorreactores. La generación de su mutante permitió estudiar sustancias naturales y sintéticas implicadas en la formación de *biofilms* y su movilidad tipo *swarming*. Los compuestos obtenidos resultaron relevantes en cuanto a su efecto sobre estos procesos con potencial aplicación como reemplazo de surfactantes sintéticos (Barrionuevo 2017).

A modo de conclusión, basados en las diferentes aplicaciones y características que demostró poseer *Pseudomonas veronii* 2E, se intenta aprovecharlas para el diseño de un biorreactor que sea eficiente, ecológicamente amigable y principalmente económico para la remoción de cobre de efluentes industriales. Para ello, es necesario conocer las condiciones óptimas de trabajo en las cuales la bacteria puede remover la mayor cantidad del metal de un efluente. Debido a que esta tesis representa un primer paso para el diseño del biotratamiento, el efluente que se utilizó fue una solución madre de

nitrate de cobre ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$) 0,5 M. Además, en la introducción general de esta tesis se nombraron algunas de las muchas aplicaciones que tiene este metal en la industria, lo cual hace que el cobre sea altamente deseado. Por tal motivo, en este primer capítulo se estudia además la capacidad de desorción de $\text{Cu}(\text{II})$ de la biomasa para hacer posible la recuperación del metal una vez separado del efluente.

The background of the slide is a collage of various textures and patterns. It includes a light blue marbled paper, a large piece of pinkish-red fabric with a subtle floral pattern, and several circular and oval shapes with a blue and white floral pattern. On the right side, there is a vertical green bar with a white decorative scrollwork pattern.

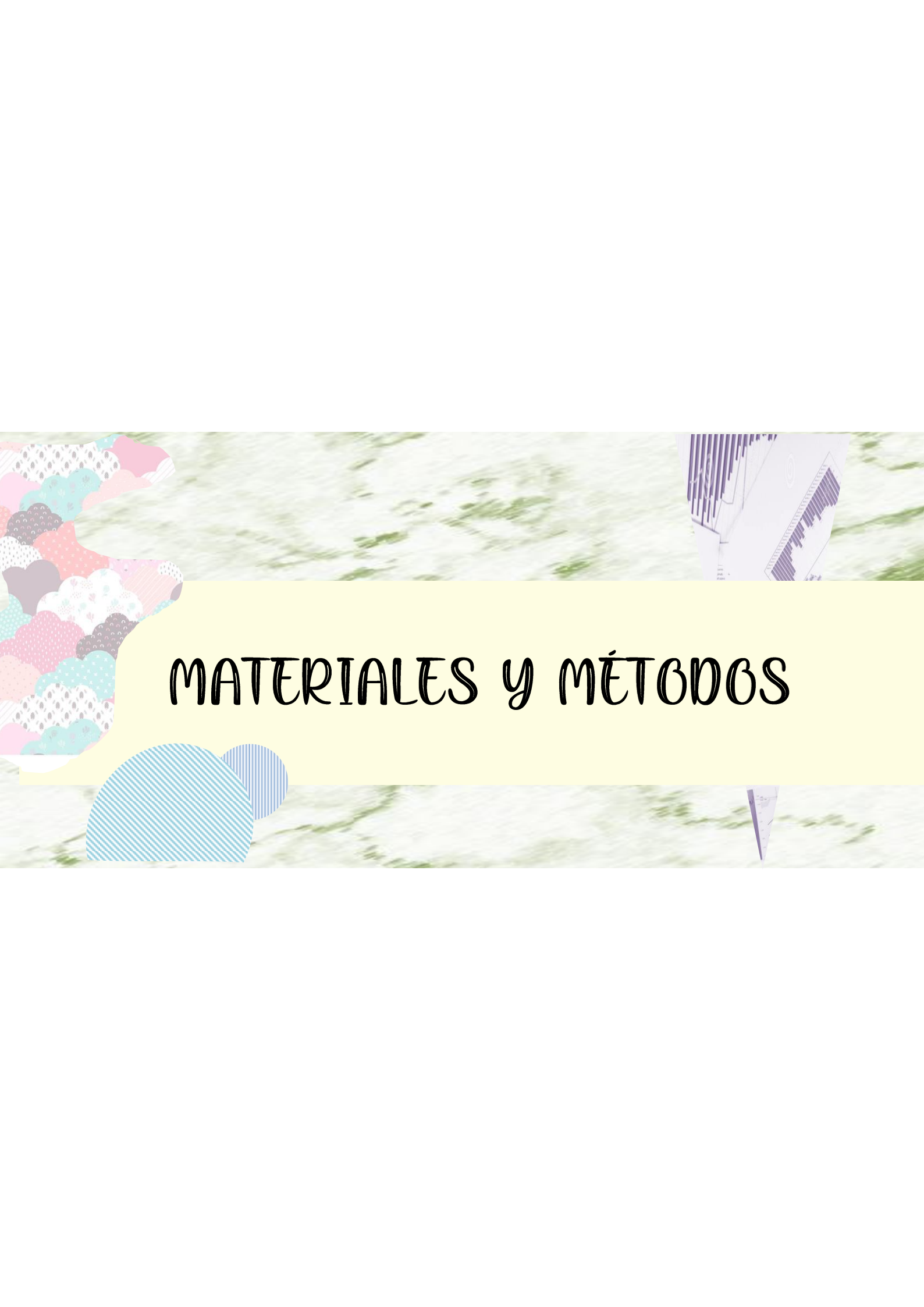
OBJETIVOS

OBJETIVOS

Objetivos específicos:

- I. Estudiar la capacidad de biosorción de Cu(II) mediada por células enteras de *Pseudomonas veronii* 2E cosechadas bajo diferentes condiciones:
 - Medios de cultivo: Medio enriquecido (PYG) y Medio mínimo salino (M9).
 - Temperaturas: 25 °C y 32 °C.
 - Concentraciones iniciales de Cu(II): 0,5 mM y 1 mM.

- II. Evaluar un método de desorción de Cu(II), retenido por células enteras de *Pseudomonas veronii* 2E:
 - Concentración de desorbente.
 - Volumen de desorción.
 - Ciclos de desorción.



MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Utilización de la cepa bacteriana

Para todos los ensayos se utilizó la bacteria Gram-negativa *Pseudomonas veronii* 2E aislada de los sedimentos extraídos de la cuenca del Río Reconquista (Vullo et al. 2008). Este Río recibe descargas de efluentes de la mayoría de las actividades industriales y agropecuarias que se practican en zonas aledañas, su elección se justifica debido a los antecedentes que posee, detallados previamente en la Introducción.

Activación de la cepa

La cepa se mantuvo almacenada en tubos eppendorf con glicerol 25% (v/v) a -70 °C. Para activarla, se tomó 100 µL de la suspensión y se la diseminó en una placa de agar nutritivo con una espátula de Drigalsky. En una primera evaluación, se observaron las unidades formadoras de colonias (UFC) en las placas. Se adoptaron criterios de aspectos morfológicos, como forma, tamaño, color para verificar la pureza de la cepa. De ser homogéneo el crecimiento en todos estos aspectos, la misma se la inoculara a partir de las placas en 50 mL de medio líquido en Erlenmeyer de 150 mL de capacidad. Luego de incubar a 32 °C con agitación durante 24 h hasta fase estacionaria temprana de crecimiento, se obtuvo el denominado preinóculo.

Cuantificación de Cobre

Para todos los ensayos llevados a cabo en esta tesis, se determinó Cu(II) por espectrofotetría UV-Visible por el Método del Ácido Bicinonínico (BCA). Este método consiste en la reducción del Cu(II) a Cu(I), generando con dos moléculas del BCA un complejo coloreado estable, que puede apreciarse rápidamente por la formación de un color violeta. Se muestran así, dos bandas de absorbancia, a 562 nm y 354,5 nm, mientras que en ausencia de Cu no se observan bandas de absorción (Ver **Figura 21**) (Brenner and Harris 1995).



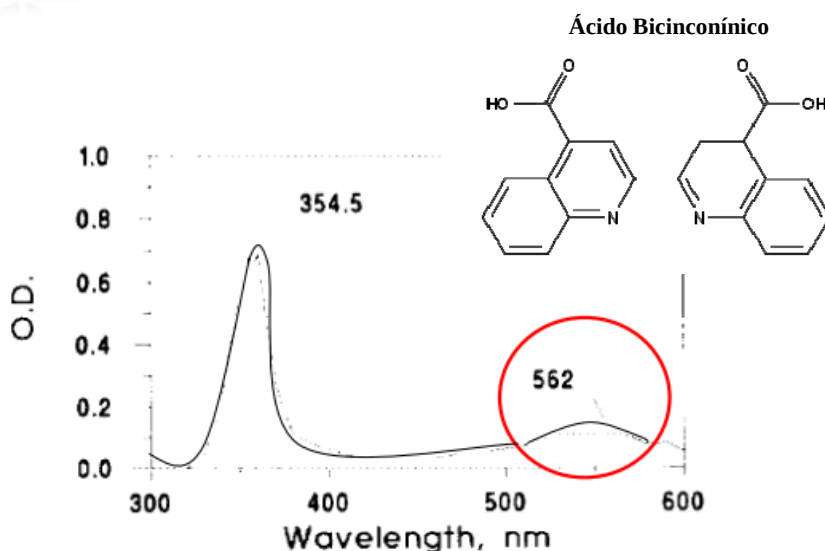


Figura 21. Espectro ultravioleta-visible del complejo Cu(I)-BCA. El espectro de absorción se registró en buffer fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,0. La solución contenía 30 μ M Cu(II) en 60 μ M BCA con ascorbato como agente reductor (Brenner and Harris 1995).

La curva de calibración se llevó a cabo con una solución patrón de cobre 1 mM. El reactivo se preparó mezclando 1:1 el Reactivo A (6 mg de la sal sódica del BCA, 3,6 g de NaOH, 15,6 g de sal sódica de HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico), 90 mL de agua ultrapura - 18 M Ω cm Millipore -, calentar hasta disolver, SIGMA B-9643) con el Reactivo B (N,N-dimetilformamida). Se preparó una serie de 9 tubos, a los cuales se les agregó 0, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200 y 300 μ L de la solución patrón de Cu(II) 1 mM y luego de completar a 0,5 mL con agua ultrapura - 18 M Ω cm Millipore - a los tubos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 respectivamente. A cada tubo se le agregó 0,5 mL del reactivo, se incubó 2 minutos a temperatura ambiente y se midió absorbancia a 550 nm. Este procedimiento se resume en la **Tabla 2**

Cinética de Biosorción de Cobre

Los ensayos de cinética de biosorción de Cu(II) por bacterias en estado planctónico (BL) se llevaron a cabo bajo diferentes condiciones experimentales de trabajo, como ser temperatura (25 °C y 32 °C), medios de cultivo (PYG y M9) (ver composición en Anexo) y concentraciones iniciales de cobre (0,5 y 1 mM).

Para llevar a cabo los ensayos de la cinética de biosorción de Cu(II), se inocularon dos Erlenmeyer de 500 mL de capacidad a modo de reactores en *batch*, cada uno

conteniendo 90 mL de medio fresco, con 10 mL del preinóculo preparado como se mencionó en la sección Activación de la cepa. Se incubó bajo las diferentes condiciones experimentales mencionadas previamente, con agitación orbital durante 24 h para asegurar que la cepa alcance la fase estacionaria temprana de crecimiento. Finalizado este tiempo, se juntaron los tres cultivos y se tomó una alícuota de 1 mL para medir la densidad óptica (DO). Luego, la suspensión final se centrifugó a 3000 g durante 15 min, el pellet se lavó 3 veces con agua ultrapura - 18 MΩcm Millipore - y se lo resuspendió en un volumen de agua ultrapura - 18 MΩcm Millipore - apropiado para tener una concentración final de 3 g peso seco biomasa/L (biomasa [$\mu\text{g/mL}$] = $405,34 \cdot \text{DO}_{600\text{nm}} + 277,48$; Vullo et al. 2008). La suspensión resultante fue expuesta a diferentes concentraciones iniciales de cobre (0,5 mM y 1 mM) y el pH fue ajustado a 5,5 con 0,5 mL de buffer ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES) 1M, para asegurar que la especie de Cu(II) se encontrase biodisponible en solución. Esto se incubó durante 24 - 30 h, finalizado este tiempo se determinó la concentración de metal remanente en el sobrenadante para evaluar Cu(II) removido por la biomasa libre (BL).

Tabla 2. Preparación de la curva de calibrado.

Tubos	V solución Cu 1 mM (μL)	Cu (mM)	V (mL) H ₂ O	V reactivo (mL)
1	0	0	0,5	0,5
2	10	0,01	0,49	0,5
3	25	0,025	0,475	0,5
4	50	0,05	0,45	0,5
5	75	0,075	0,425	0,5
6	100	0,1	0,4	0,5
7	150	0,15	0,35	0,5
8	200	0,2	0,3	0,5
9	300	0,3	0,2	0,5

Isotermas de Biosorción de Cobre

Para construir las isotermas de biosorción de cobre, se trabajó con la suspensión bacteriana preparada como se describió en la metodología para el estudio de la cinética de biosorción (3 g peso seco biomasa/L). Luego se agregó a una serie de Erlenmeyer de

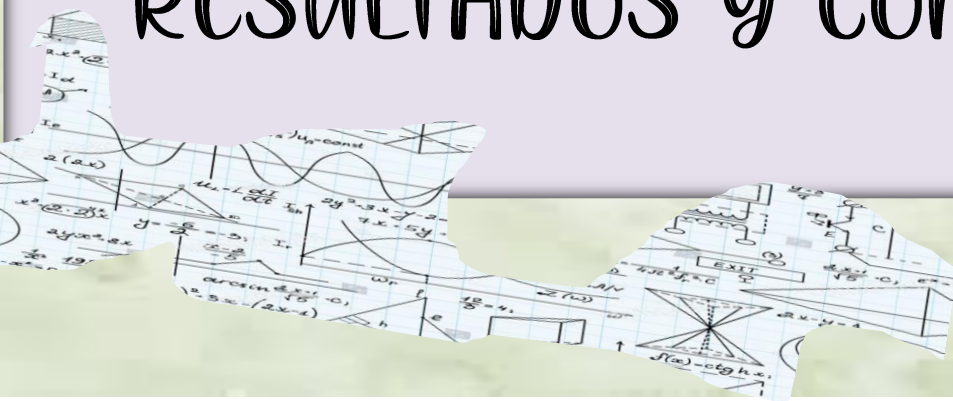
125 mL de capacidad, 5 mL de la suspensión bacteriana en agua ultrapura - 18 MΩcm Millipore - 0,1 mL de la solución buffer MES 1M para ajustar el pH a 5,5 y un volumen de la solución de Cu(II) 10 mM suficiente para tener concentraciones iniciales desde 0 a 2 mM, por último, se completó hasta un volumen final de 10 mL con agua ultrapura - 18 MΩcm Millipore -. Cada ensayo se trabajó por duplicado y se dejó incubar en baño termostatzado con agitación orbital a 150 rpm a 32 °C durante 24 h, tiempo suficiente para permitir llegar al estado de equilibrio. Finalizado este tiempo, se descartaron las células por centrifugación a 3000 *g* durante 15 min y se cuantificó la cantidad de metal remanente en el sobrenadante por el método del BCA antes mencionado.

Desorción de Cobre por las células planctónicas

Para llevar a cabo el proceso de desorción de Cu(II) retenido en la BL en un reactor *batch*, la búsqueda del desorbente más apropiado se basó en revisión bibliográfica, proceso que llevó a la utilización de HCl. El HCl presentó elevada eficiencia en la desorción de metal, no forma complejos y presenta la ventaja de ser una alternativa más económica (Akhtar, Iqbal, and Iqbal 2004). A continuación, se probaron concentraciones de HCl en un rango desde 0,075 M a 1,5 M. Para esto, se realizó primero un ciclo de biosorción de cobre en un reactor *batch*, usando una suspensión bacteriana crecida en medio M9, cuya concentración era aproximadamente de 3 g de peso seco/L. Las células se separaron por centrifugación a 3000 *g* durante 15 min, se lavaron 3 veces con agua ultrapura - 18 MΩcm Millipore - y se resuspendieron en 10 mL de una solución de Cu(II) 1 mM, a 32 °C durante 24 h. Al finalizar este tiempo, la suspensión se centrifugó y se determinó la cantidad de cobre remanente en el sobrenadante. A continuación, se llevaron a cabo los ciclos de desorción del metal. Para evaluar el método de desorción más apropiado, el pellet fue resuspendido en 2,5 mL de HCl en un rango de concentraciones desde 0,075 M a 1,5 M. Luego, para recuperar el metal en el menor volumen posible, se utilizó aquella concentración de ácido en la cual se desorbió la mayor cantidad de metal en diferentes volúmenes finales de 1 mL, 2 mL y 2,5 mL del ácido. Además, para evaluar en qué instancia se desorbe enteramente el cobre, se llevaron a cabo 3 ciclos de 30 min cada uno bajo las mismas condiciones antes mencionadas y por duplicado.



RESULTADOS Y CONCLUSIONES



RESULTADOS Y DISCUSIONES

Todos los ensayos llevados a cabo en esta tesis se realizaron por duplicado y fueron repetidos aleatoriamente para asegurar su reproducibilidad, se expresan por su promedio $\pm$ su desvío estándar.

Cinéticas de Biosorción de Cobre

Pseudomonas veronii 2E presenta la habilidad de formar *biofilm*, el cual está compuesto de una matriz con una amplia variedad de sustancias con diferentes estructuras químicas y diversos grupos funcionales que son liberados como exopolímeros. Estos grupos pueden ser: carboxilatos, hidroxilos, tioles, fosfatos, aminas y grupos sulfatos, los cuales al estar expuestos al microambiente celular y se encuentran disponibles para interactuar, por ejemplo, con iones metálicos. La capacidad de unión de estos grupos funcionales permite a la superficie bacteriana ser considerada como un conjunto de ligandos, los cuales pueden disminuir la biodisponibilidad del metal, el Cu(II) en este caso, y consecuentemente reduce los efectos tóxicos en las células. La capacidad complejante de estos grupos funcionales depende del pH del medio, por lo que es fundamental ajustar el pH a un valor óptimo y mantenerlo constante. Esto representa la base del mecanismo que contribuye para la biosorción, un término que se refiere al proceso de retención de metal por una matriz biológica como fue explicado anteriormente en la Introducción de este capítulo. Ambas, la regulación del pH y las unidades de expresión de la concentración son esenciales para una correcta interpretación de los resultados obtenidos.

Los resultados de las cinéticas de biosorción de Cu(II) por la biomasa celular libre (BL), obtenida bajo diferentes condiciones de trabajo, se muestran representadas por la capacidad de retención específica (q) en función del tiempo graficadas en **Figura 22**, **Figura 23**, **Figura 24** y **Figura 25**. Se puede observar que, por un lado, para un efluente modelo conteniendo 0,5 mM de Cu(II), la capacidad máxima de retención específica (q_{max}) se obtuvo a 25 °C, siendo los mayores valores ($0,208 \pm 0,003$) mmol/g y ($0,201 \pm 0,005$) mmol/g para las células tomadas en medio M9 y PYG respectivamente. Por otro lado, para un efluente modelo conteniendo 1 mM de Cu(II), a

32 °C se registraron valores máximos de q_{max} ($0,35 \pm 0,03$) mmol/g y ($0,32 \pm 0,02$) mmol/g para las células tomadas de medio M9 y PYG respectivamente.

Los porcentajes de biosorción, para un efluente modelo de Cu(II) 0,5 mM, fueron de ($88,7 \pm 0,9$)% (25 °C); (84 ± 6)% (32 °C) y (90 ± 2)% (25 °C), ($87,75 \pm 0,02$)% (32 °C) para las células cosechadas en medio M9 y PYG respectivamente. Mientras que para un efluente modelo conteniendo 1 mM de Cu(II), los valores máximos fueron de (79 ± 6)% (25 °C), (88 ± 1)% (32 °C) y (77 ± 2)% (25 °C), (83 ± 1)% (32 °C) para las células tomadas de medio M9 y PYG respectivamente.

La mayor biosorción obtenida en este trabajo es aún más elevada que los reportados con otros metales en estudios previos realizados con *Pseudomonas veronii* 2E (82.00% y 76.80% para Zn(II) y Cd(II), respectivamente) (Vullo et al. 2008; Sosa et al. 2016). La biosorción de Cu(II) por *P. veronii* 2E fue incluso más alta que el 60 - 70% observado al mismo pH por Tsekova et al. (2010)

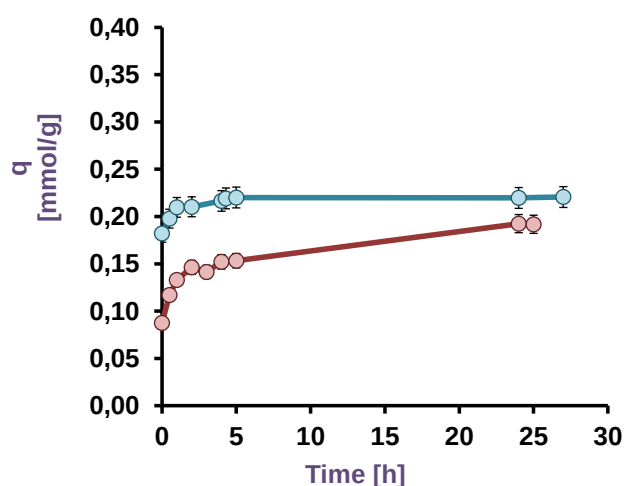


Figura 22. Biosorción de Cu(II) en un reactor *batch* conteniendo un efluente modelo con 0,5 mM del metal: BL cosechada de medio PYG (en azul) y medio M9 (en rojo) a 32 °C.

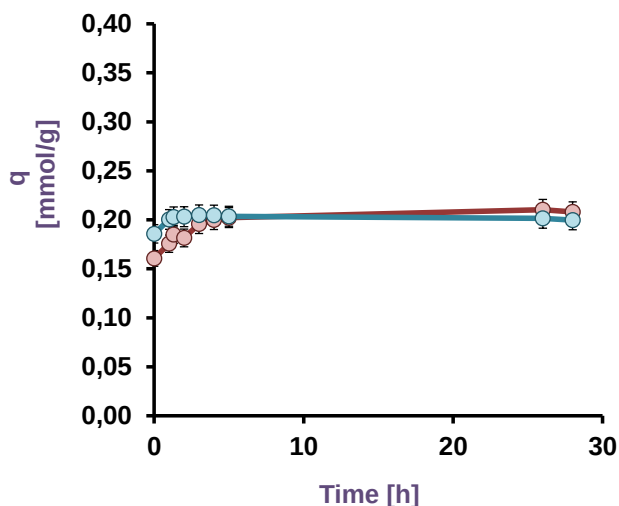


Figura 23. Biosorción de Cu(II) en un reactor *batch* conteniendo un efluente modelo con 0,5 mM del metal: BL cosechada de medio PYG (en azul) y medio M9 (en rojo) a 25 °C.

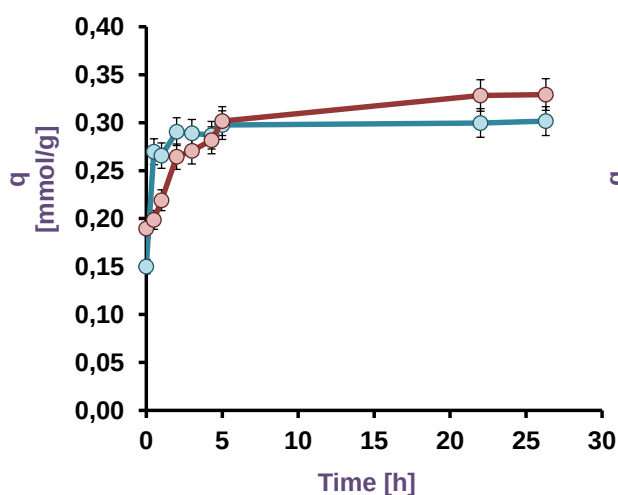


Figura 24. Biosorción de Cu(II) en un reactor *batch* conteniendo un efluente modelo con 1 mM del metal: BL cosechada de medio PYG (en azul) y medio M9 (en rojo) a 32 °C.

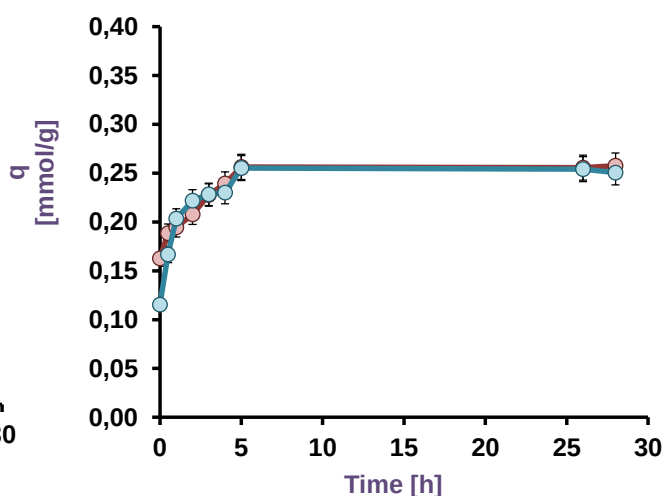


Figura 25. Biosorción de Cu(II) en un reactor *batch* conteniendo un efluente modelo con 1 mM del metal: BL cosechada de medio PYG (azul) y medio M9 (en rojo) a 25 °C.

En **Tabla 3** y **Tabla 4** se resumen los resultados de la biosorción de Cu(II) por la BL, a las 24–30 h, para todas las condiciones ensayadas. Los valores se muestran representados por su promedio $\pm$ desvío estándar.

Tabla 3. Resultados de cinéticas de biosorción de Cu(II) 0,5 mM por la BL a las 24 – 30 h.

Magnitud	25 °C / 0,5 mM	25 °C / 0,5 mM	25 °C / 0,5 mM	32 °C / 0,5 mM	32 °C / 0,5 mM	32 °C / 0,5 mM
	Control	M9	PYG	Control	M9	PYG
mM	0,633 $\pm$ 0,003	0,07 $\pm$ 0,01	0,07 $\pm$ 0,01	0,58 $\pm$ 0,09	0,09 $\pm$ 0,02	0,07 $\pm$ 0,01
q (mmol/g)	-	0,208 $\pm$ 3 $\times$ 10 ⁻³	0,201 $\pm$ 5 $\times$ 10 ⁻³	-	0,17 $\pm$ 0,04	0,20 $\pm$ 0,03
mmol residual	0,0423 $\pm$ 0,0002(M9) 0,0208 $\pm$ 0,0001(PYG)	4,8 $\times$ 10 ⁻³ $\pm$ 4 $\times$ 10 ⁻⁴	2,2 $\times$ 10 ⁻³ $\pm$ 4 $\times$ 10 ⁻⁴	0,029 $\pm$ 5 $\times$ 10 ⁻³	0,004 $\pm$ 1 $\times$ 10 ⁻³	0,004 $\pm$ 1 $\times$ 10 ⁻³
% Biosorción	-	88,7 $\pm$ 0,9	90 $\pm$ 2	-	84 $\pm$ 6	87,75 $\pm$ 0,02

Tabla 4. Resultados de cinéticas de biosorción de Cu(II) 1 mM por la BL a las 24 –30 h.

Magnitud	25 °C / 1 mM	25 °C / 1 mM	25 °C / 1 mM	32 °C / 1 mM	32 °C / 1 mM	32 °C / 1 mM
	Control	M9	PYG	Control	M9	PYG
mM	0,92 $\pm$ 0,01	0,19 $\pm$ 0,06	0,21 $\pm$ 0,02	1,17 $\pm$ 0,09	0,145 $\pm$ 1 $\times$ 10 ⁻³	0,20 $\pm$ 0,03
q (mmol/g)	-	0,246 $\pm$ 9 $\times$ 10 ⁻³	0,241 $\pm$ 6 $\times$ 10 ⁻³	-	0,35 $\pm$ 0,03	0,32 $\pm$ 0,02
mmol residual	0,029 $\pm$ 0,002(PYG) 0,045 $\pm$ 0,003(M9)	9 $\times$ 10 ⁻³ $\pm$ 3 $\times$ 10 ⁻³	6,8 $\times$ 10 ⁻³ $\pm$ 0,0007	0,039 $\pm$ 0,003(PYG) 0,059 $\pm$ 0,005(M9)	7,26 $\times$ 10 ⁻³ $\pm$ 3 $\times$ 10 ⁻⁵	7 $\times$ 10 ⁻³ $\pm$ 1 $\times$ 10 ⁻³
% Biosorción	-	79 $\pm$ 6	77 $\pm$ 2	-	88 $\pm$ 1	83 $\pm$ 1

Los resultados revelan que la biosorción de Cu(II) 1 mM, usando células cosechadas del medio M9, fue mayor a 32 °C ($q = 0,35 \pm 0,03$ mmol/g) que a 25 °C ($0,17 \pm 0,04$ mmol/g). También se observó que las bacterias cosechadas en medio M9, evidenciaron una saturación a concentraciones más altas del metal ($0,35 \pm 0,03$ mmol Cu(II)/g peso seco de biomasa) que las bacterias tomadas del medio PYG ($0,32 \pm 0,02$ mmol Cu(II)/g peso seco de biomasa) bajo las mismas condiciones de trabajo. Si bien se puede observar en **Tabla 3** y **Tabla 4** que los porcentajes de biosorción de cobre son mayores para un efluente más diluido (0,5 mM) y con células cosechadas en medio PYG a 25 °C cuando se lo compara con el efluente más concentrado (1 mM) en el que se obtuvo el mayor porcentaje de retención por las células cosechadas del medio M9 a 32 °C ($90 \pm 2\%$ contra $88 \pm 1\%$). Sin embargo, considerando que la diferencia del porcentaje de biosorción es mínima (2%) y teniendo en cuenta de que el efluente más concentrado contiene el doble de la cantidad de metal se concluye que las mejores condiciones de trabajo fueron: 32 °C, biomasa celular cosechada de medio M9 y concentración de efluente modelo 1 mM.

Isotermas de biosorción de Cu(II)

Para un proceso de biosorción, es importante un análisis de los datos de isotermas debido a que describen relaciones de equilibrio entre biosorbente y adsorbato, generalmente la relación entre la cantidad biosorbida y la que permanece en la solución a una temperatura fija en el equilibrio (Belhachemi and Addoun 2011). Las isotermas de biosorción se usan con frecuencia como modelos experimentales. Se obtienen a partir de datos de medida por medio de análisis de regresión buscando comprender el mecanismo de biosorción. Las dos técnicas más usadas para modelar los procesos de biosorción en equilibrio son: el Modelo de Freundlich y el de Langmuir. Ambos involucran isotermas de biosorción, las cuales describen la relación entre la concentración disuelta de la especie química a sorber (mg/L, mg/L, meq/L o mmol/L) y la cantidad sorbida por el biosorbente; las unidades son de especie sorbida por unidad de masa de sorbente (mg/kg, mg/kg, meq/kg o mmol/kg); se asume que el proceso se da bajo condiciones de temperatura y presión constantes (Mejía Sandoval 2006).

El modelo de Langmuir supone que el proceso de biosorción es una monocapa, todos los sitios de adsorción son idénticos, es decir poseen igual afinidad por el adsorbato y

no hay cambio en la energía libre de adsorción. De acuerdo a esto, cuando un proceso de adsorción sigue este modelo, el número de sitios ocupados (q) está dado por la **Ecuación 1**.

$$q = \frac{q_{max} \times Ceq}{(Kd + Ceq)} \quad (1)$$

$$\frac{Ceq}{q} = \frac{Kd}{q_{max}} + \frac{1}{q_{max}} \times Ceq \quad (2)$$

El modelo de linealización de Langmuir se muestra en la **Ecuación 2**, donde la capacidad máxima de retención específica (q_{max}) está relacionada con el número total de sitios adsorbidos, Ceq es la concentración de Cu(II) en el equilibrio en el sobrenadante, Kd es la constante de equilibrio para la disociación del complejo en la superficie. El número de sitios ocupados (q), puede ser calculado como se indica en la **Ecuación 3**.

$$q = \frac{(Ci - Ceq) \times V}{m} \quad (3)$$

Donde Ci es la concentración inicial de Cu(II), V es el volumen total de la mezcla de biosorción ensayada, m es la masa total de biosorbente en peso seco.

La isoterma de Freundlich se muestra en la **Ecuación 4** y la linealización del modelo en la **Ecuación 5**.

$$q = Kf \times Ceq^{\frac{1}{n}} \quad (4)$$

$$\ln q = \frac{1}{n} \times \ln Ceq + \ln Kf \quad (5)$$

Donde q es capacidad de retención específica y su unidad es mmol Cu(II)/g peso seco de biomasa, Ceq es la concentración medida de Cu(II) en el equilibrio, Kf está relacionada con la capacidad de biosorción y n es un indicador de la intensidad de adsorción. En este modelo empírico, todos los sitios de la superficie no se consideran iguales. La adsorción se vuelve progresivamente más difícil a medida que se acumula mayor cantidad de sorbente. Este modelo asume que una vez que la superficie está cubierta, se pueden seguir adsorbiendo especies, ya que aún se pueden acomodar dejando sin predicción posible una adsorción de monocapa máxima. En otras palabras,

el modelo de Freundlich no considera la existencia de una monocapa ni una capacidad máxima de adsorción como sí lo hace el modelo de Langmuir (Sosa et al. 2017).

Las isothermas de biosorción del metal por la BL, bajo las condiciones de trabajo previamente mencionadas en la metodología se muestra en la **Figura 26**. Allí, se puede observar que para un rango de 0 a 2,00 mM de Cu(II), la biosorción fue entre $(40,0 \pm 10$ y $79 \pm 4)\%$, y $(23 \pm 8$ y $55 \pm 4)\%$ por las células cosechadas en medio M9 y PYG respectivamente. La capacidad máxima de biosorción fue de $(0,52 \pm 0,03)$ mmol/g de peso seco biomasa y $(0,27 \pm 0,02)$ mmol/g peso seco biomasa, para la BL tomada de medio M9 y PYG respectivamente.

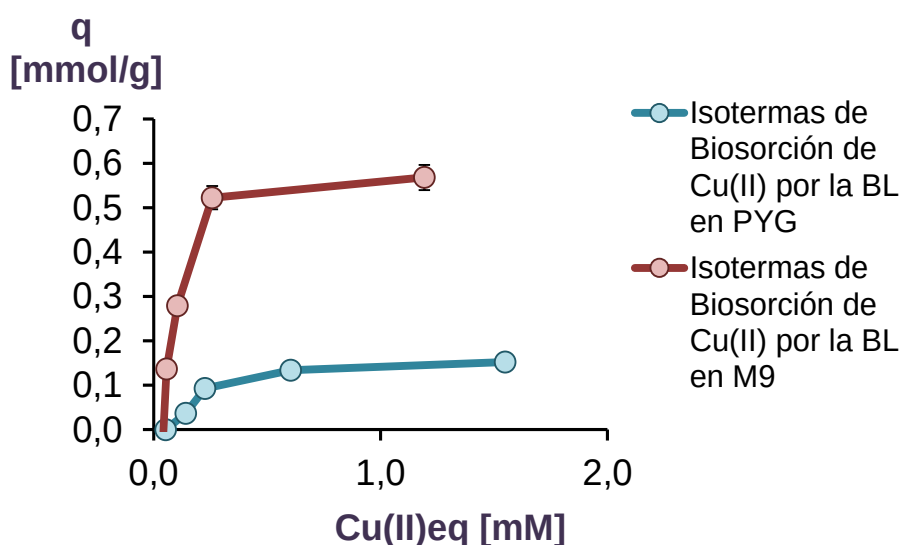


Figura 26. Isothermas de biosorción de Cu(II), en un rango de 0 a 2,00 mM, en un reactor *batch*, para células tomadas de medio M9 (rojo) y PYG (azul).

En la **Figura 27** y **Figura 28** se muestran las linealizaciones para los modelos de Langmuir y Freundlich respectivamente. Como puede observarse de las figuras, la biosorción de Cu(II) se ajusta mayormente al modelo de Langmuir con un R^2 de 0,9868 y 0,9368 contra 0,7741 y 0,7582 para Freundlich por la biomasa cosechada en medio M9 y PYG respectivamente. Además, la constante de Langmuir (K_d) fue 0,139 y 0,398 mM, mientras que la q_{max} fue de 0,641 y 0,196 mmol/g, por la biomasa cosechada en medio M9 y PYG respectivamente.

Para que un sistema sea considerado un buen sorbente, debe tener asociado valores bajos de K_d y altos de q_{max} . Por los resultados obtenidos se podría concluir que las bacterias tomadas del medio M9 se comportan como mejores biosorbentes que aquellas tomadas de medio PYG. Las diferencias observadas en las isothermas de biosorción de

Cu(II) por la BL cosechadas de los diferentes medios puede estar relacionada con la capacidad de *Pseudomonas veronii* 2E para producir exopolímeros cuya composición depende, además de las condiciones físicas, de la composición del medio de cultivo.

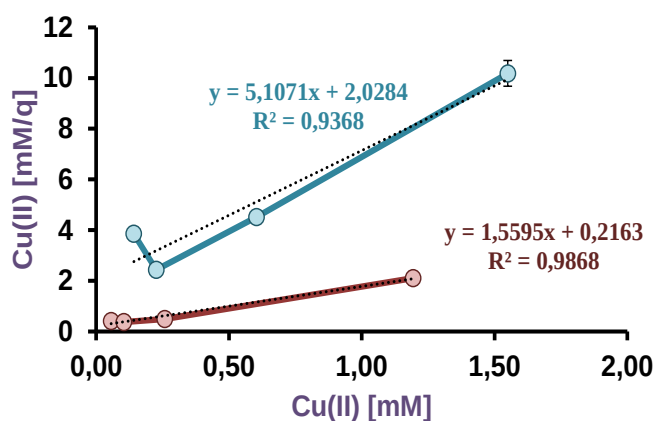


Figura 27. Linealización de las Isotermas de biosorción según el modelo de Langmuir para Cu(II), en un rango de 0 a 2,00 mM, en un reactor *batch*, por células tomadas de medio M9 en rojo y PYG en azul.

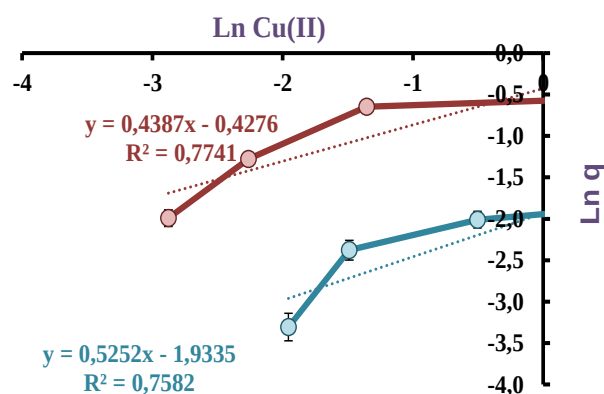


Figura 28. Linealización de las Isotermas de biosorción según el modelo de Freundlich para Cu(II), en un rango de 0 a 2,00 mM, en un reactor *batch*, por células tomadas de medio M9 en rojo y PYG en azul.

Los parámetros de acuerdo al modelo de Langmuir (K_d , q_{max}) fueron determinados por el método de regresión lineal y fueron comparados con otros valores reportados previamente, esto se resume en **Tabla 5**. Los valores de K_d fueron similares a aquellos obtenidos con el mismo microorganismo estudiado con Cd(II) (Méndez et al. 2011) y *Aspergillus niger* con Cu(II) (Tsekova et al. 2010), pero fue mayor que los obtenidos para *P. veronii* 2E con Zn(II) (Sosa et al. 2017), *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas putida* con Cu(II) (Liu et al. 2013), (Ni et al. 2012). Los valores de q_{max} obtenidos en este trabajo fue el segundo valor más alto, evidenciando que *Pseudomonas veronii* 2E podría ser un biosorbente adecuado para Cu(II).

Tabla 5. Comparación de los parámetros de Langmuir reportados para diferentes biomasas.

Referencias			<i>K_d</i>		<i>q_{max}</i>		<i>R</i> ²
	Metal	Microorganismo	mg/L	mM	mg/g	mmol/g	
	Cu(II)	<i>P. veronii</i> 2E	8,833	0,139	40,729	0,641	0,987
(Sosa et al. 2017)	Zn(II)	<i>P. veronii</i> 2E	3,007	0,046	12,945	0,198	0,853
(Méndez et al. 2011)	Cd(II)	<i>P. veronii</i> 2E	11,353	0,101	26,641	0,237	0,907
(Tsekova et al. 2010)	Cu(II)	<i>A. niger</i>	8,19	0,13	17,60	0,28	0,998
(Liu et al. 2013)	Cu(II)	<i>B. subtilis</i>	0,010	0,0002	100,70	1,58	0,994
(Ni et al. 2012)	Cu(II)	<i>P. putida</i>	0,039	0,0006	0,858	0,014	0,995

A continuación se resumen los resultados obtenidos de las isotermas de biosorción de Cu(II) para las células cosechadas en M9 (Ver **Tabla 6**) y en PYG (Ver **Tabla 7**).

Tabla 6. Isotherma de biosorción para células crecidas en medio M9

<i>C_i</i> Cu(II) [mM]	<i>C_f</i> Cu(II) [mM]	<i>q</i> [mmol/g]	mmol Cu(II) residuales	% Biosorción
0	0,04±0,01	0	4x10 ⁻⁴ ±1x10 ⁻⁴	0
0,25	0,06±0,02	0,14±0,02	6x10 ⁻⁴ ±2x10 ⁻⁴	77±9
0,50	0,10±0,02	0,28±0,02	1,0x10 ⁻³ ±2x10 ⁻⁴	79±4
1,00	0,26±0,04	0,52±0,03	2,6 x10 ⁻³ ±4 x10 ⁻⁴	74±4
2,00	1,2±0,2	0,6±0,1	1,2 x10 ⁻² ±2 x10 ⁻³	40±10

Tabla 7. Isotherma de biosorción para células crecidas en medio PYG

<i>C_i</i> Cu(II) [mM]	<i>C_f</i> Cu(II) [mM]	<i>q</i> [mmol/g]	mmol Cu(II) residuales	% Biosorción
0	0,05±0,02	0	5x10 ⁻⁴ ±2x10 ⁻⁴	0
0,25	0,14±0,02	0,07±0,01	1,4x10 ⁻³ ±2x10 ⁻⁴	43±7
0,50	0,23±0,02	0,19±0,01	2,3x10 ⁻³ ±2x10 ⁻⁴	55±4
1,00	0,60±0,03	0,27±0,02	6,0x10 ⁻³ ±3x10 ⁻⁴	40±3
2,00	1,5±0,2	0,3±0,1	1,5x10 ⁻² ±2x10 ⁻³	23±8

Desorción de Cu(II) retenido en la biomasa libre

A continuación se presentan los resultados de la desorción de Cu(II) por la BL bajo las condiciones de trabajo previamente detalladas en Materiales y Métodos. Por un lado, para evaluar el método de desorción más apropiado, se estudió la desorción del metal con diferentes concentraciones de HCl (0,075 M – 1,5 M) en un mismo volumen final (2,5 mL). Los resultados se expresan en los mmol de Cu(II) hallados en el sobrenadante en función del número de ciclos de desorción.

En la **Figura 29** se puede observar que en el primer ciclo se desorbe la mayor cantidad del metal independiente de la concentración de ácido utilizada, siguiendo una cantidad menor desorbida para el ciclo dos y aún menor para el ciclo 3. Los resultados mmol desorbidos fueron $(0,0043 \pm 0,0002)$, $(0,0033 \pm 0,0002)$, $(0,022 \pm 0,0002)$ y $(0,0021 \pm 0,0003)$ para 0,075 M, 0,1 M, 1 M y 1,5 M de HCl. La máxima cantidad de metal desorbida $(0,0043 \pm 0,0002 \text{ mmol})$ se observó utilizando una concentración de 0,075 M de desorbente.

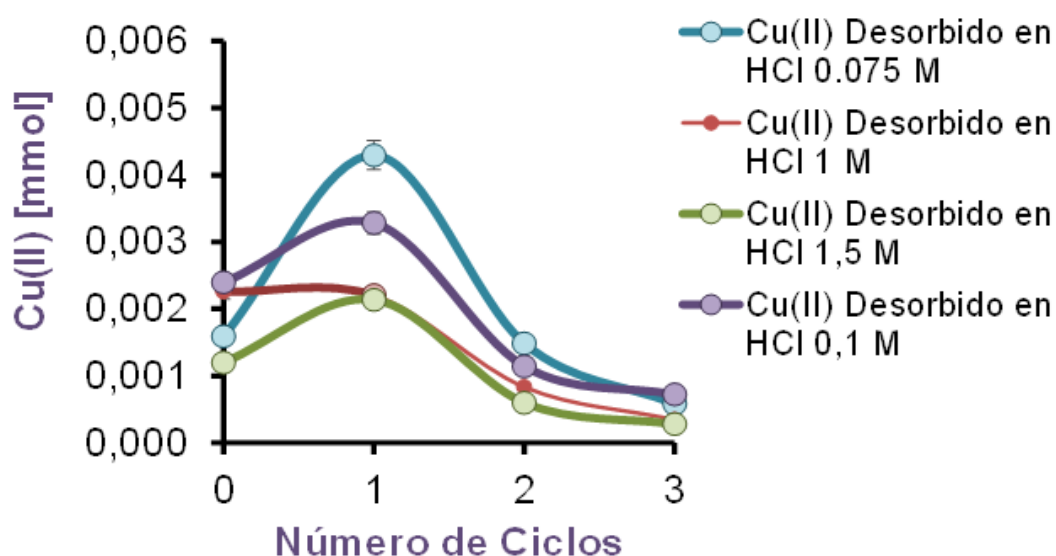


Figura 29. Desorción de Cu(II) por la BL para 0,075, 0,1, 1 y 1,5 M de HCl en un volumen final de 2,5 mL de desorbente.

Para evaluar si la BL podía desorber completamente el metal retenido se probaron dos ciclos más, para cada concentración de HCl, obteniéndose $(0,00150 \pm 0,0002)$, $(0,0011 \pm 0,0001)$, $(0,0008 \pm 0,0002)$ y $(0,000599 \pm 0,000002)$ mmol del metal para el segundo ciclo y $(0,00058 \pm 0,00005)$, $(0,0007 \pm 0,0002)$, $(0,00035 \pm 0,00005)$ y $(0,00028 \pm 0,00002)$ para el tercer ciclo para 0,075 M, 0,1 M, 1 M y 1,5 M de HCl

respectivamente. Estos resultados se corresponden con una desorción del $(21 \pm 3)\%$, $(24 \pm 2)\%$, $(36 \pm 3)\%$ y $(43 \pm 2)\%$ en el primer ciclo y una desorción total de $(30 \pm 3)\%$, $(36 \pm 3)\%$, $(57 \pm 6)\%$ y $(70 \pm 6)\%$ para 1,5 M, 1,0 M, 0,1 M y 0,075 M HCl respectivamente.

Por otro lado, se estudió la máxima desorción en el menor volumen posible. Para ello, se llevó a cabo la desorción en 1,0 mL, 2,0 mL y 2,5 mL de desorbente con la concentración de ácido en la que se obtuvo la mayor desorción del metal (0,075 M). Los resultados obtenidos fueron de $(3,622 \times 10^{-3} \pm 1 \times 10^{-6})$, $(0,0051 \pm 6 \times 10^{-4})$ y $(0,0043 \pm 1 \times 10^{-4})$ mmol de Cu(II) desorbidos en el primer ciclo, $(0,0015 \pm 1 \times 10^{-4})$, $(0,00129 \pm 8 \times 10^{-5})$ y $(0,0015 \pm 2 \times 10^{-4})$ mmol de Cu(II) para el segundo ciclo y $(0,00053 \pm 3 \times 10^{-5})$, $(0,000564 \pm 9 \times 10^{-6})$ y $(0,00058 \pm 5 \times 10^{-5})$ mmol de Cu(II) para el ciclo 3 en 1 mL, 2 mL y 2,5 mL de HCl respectivamente (Ver **Figura 30**). Estos resultados se corresponden con una desorción del $(36,55 \pm 0,01)\%$, $(51 \pm 6)\%$ y $(43 \pm 2)\%$ en el primer ciclo y una desorción total del $(57 \pm 1)\%$, $(70 \pm 7)\%$ y $(64 \pm 4)\%$ para 1 mL, 2 mL y 2,5 mL de desorbente respectivamente.

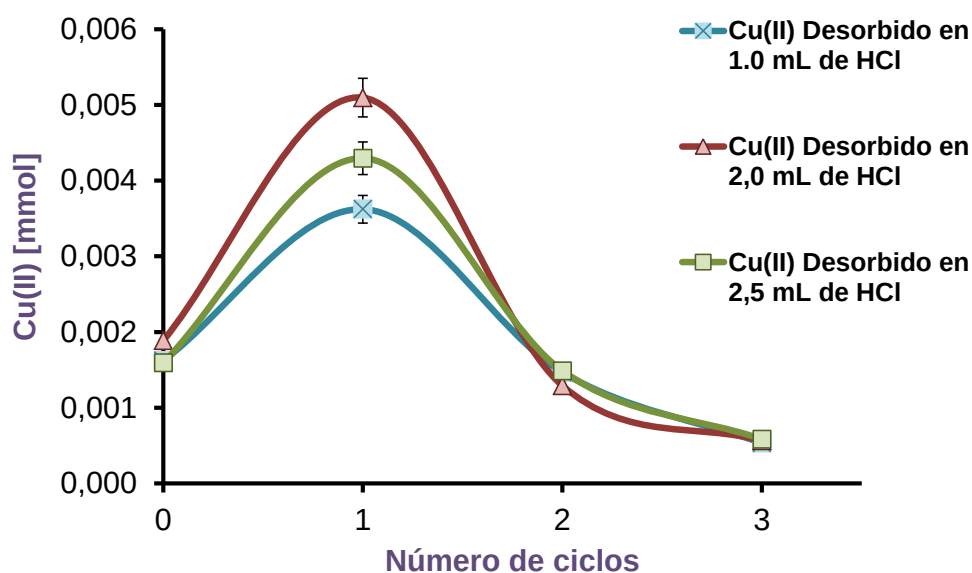


Figura 30 Desorción de Cu(II) por la BL para 1,0, 2,0 y 2,5 mL de volumen final con HCl 0,075 M

Los resultados de desorción del metal en diferentes concentraciones del desorbente se resumen en **Tabla 8** y **Tabla 9**, mientras que la desorción en los diferentes volúmenes del ácido se resumen en **Tabla 10** y **Tabla 11**, en todos los casos los resultados se expresan como el promedio $\pm$ desvío estándar.

Tabla 8. Desorción de Cu(II) 1 mM retenida en la BL con 0,075 M y 0,1 M HCl.

	0,075 M HCl			0,1 M HCl		
	[mM]	mmol Cu(II) sobrenadante	% Desorción	[mM]	mmol Cu(II) sobrenadante	% Desorción
t_f biosorción	0,16 $\pm$ 0,02	0,0016 $\pm$ 0,0002	-	0,24 $\pm$ 0,02	0,0024 $\pm$ 0,0002	-
Ciclo 1	1,72 $\pm$ 0,06	0,0043 $\pm$ 0,0002	43 $\pm$ 2	1,3 $\pm$ 0,1	0,0033 $\pm$ 0,0002	36 $\pm$ 3
Ciclo 2	0,59 $\pm$ 0,09	0,0015 $\pm$ 0,0002	21 $\pm$ 3	0,46 $\pm$ 0,06	0,0011 $\pm$ 0,0001	14 $\pm$ 1
Ciclo 3	0,23 $\pm$ 0,02	$5,8 \times 10^{-4} \pm 5 \times 10^{-5}$	6 $\pm$ 1	0,3 $\pm$ 0,1	0,0007 $\pm$ 0,0002	7 $\pm$ 2

Tabla 9. Desorción de Cu(II) 1 mM retenida en la BL con 1,0 M y 1,5 M HCl.

	1,0 M HCl			1,5 M HCl		
	[mM]	mmol Cu(II) sobrenadante	% Desorción	[mM]	mmol Cu(II) sobrenadante	% Desorción
t_f biosorción	0,2257 $\pm$ 7x10 ⁻⁴	2,257x10 ⁻³ $\pm$ 7x10 ⁻⁶	-	0,1199 $\pm$ 7x10 ⁻⁴	1,199x10 ⁻³ $\pm$ 7x10 ⁻⁶	-
Ciclo 1	0,88 $\pm$ 0,08	2,2 x10 ⁻³ $\pm$ 2x10 ⁻⁴	24 $\pm$ 2	0,9 $\pm$ 0,1	0,0021 $\pm$ 3x10 ⁻⁴	21 $\pm$ 3
Ciclo 2	0,33 $\pm$ 0,06	8 x10 ⁻⁴ $\pm$ 2x10 ⁻⁴	9 $\pm$ 1	0,2397 $\pm$ 7x10 ⁻⁴	5,99x10 ⁻⁴ $\pm$ 2x10 ⁻⁶	6,4 $\pm$ 0,3
Ciclo 3	0,14 $\pm$ 0,02	3,5 x10 ⁻⁴ $\pm$ 5x10 ⁻⁵	3,2 $\pm$ 0,5	0,111 $\pm$ 0,009	2,8x10 ⁻⁴ $\pm$ 2x10 ⁻⁵	2,5 $\pm$ 0,2

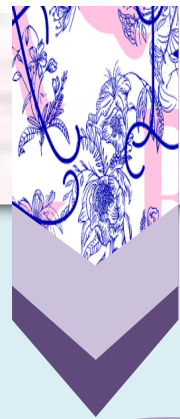
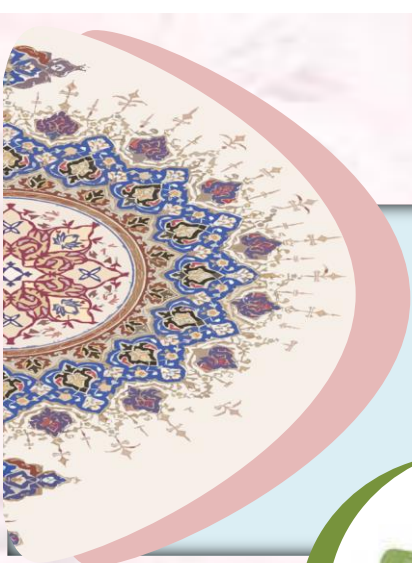
Tabla 10. Desorción de Cu(II) 1 mM retenida en la BL con 1 mL y 2 mL de HCl.

	$V_f = 1 \text{ mL HCl}$			$V_f = 2 \text{ mL HCl}$		
	[mM]	mmol Cu(II) sobrenadante	% Desorción	[mM]	mmol Cu(II) sobrenadante	% Desorción
t_f	$0,16 \pm 0,02$	$1,6 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-4}$	-	$0,19 \pm 0,03$	$1,9 \times 10^{-3} \pm 3 \times 10^{-4}$	-
Ciclo 1	$3,622 \pm 0,001$	$3,622 \times 10^{-3} \pm 1 \times 10^{-6}$	$36,55 \pm 0,01$	$2,5 \pm 0,3$	$5,1 \times 10^{-3} \pm 6 \times 10^{-4}$	51 ± 6
Ciclo 2	$1,5 \pm 0,1$	$1,5 \times 10^{-3} \pm 1 \times 10^{-4}$	15 ± 1	$0,65 \pm 0,04$	$1,29 \times 10^{-3} \pm 8 \times 10^{-5}$	13 ± 1
Ciclo 3	$0,53 \pm 0,03$	$5,3 \times 10^{-4} \pm 3 \times 10^{-5}$	$5,4 \pm 0,3$	$0,282 \pm 0,005$	$5,64 \times 10^{-4} \pm 9 \times 10^{-6}$	$5,7 \pm 0,1$

Tabla 11. Desorción de Cu(II) 1 mM retenida en la BL con 2,5 mL de HCl.

	$V_f = 2,5 \text{ mL HCl}$	[mM]	mmol Cu(II) sobrenadante	% Desorción
t_f biosorción		$0,16 \pm 0,02$	$1,6 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-4}$	-
Ciclo 1		$1,72 \pm 0,06$	$4,3 \times 10^{-3} \pm 1 \times 10^{-4}$	43 ± 2
Ciclo 2		$0,59 \pm 0,09$	$1,5 \times 10^{-3} \pm 2 \times 10^{-4}$	15 ± 2
Ciclo 3		$0,23 \pm 0,02$	$5,8 \times 10^{-4} \pm 5 \times 10^{-5}$	$5,9 \pm 0,5$

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

Los estudios de remoción de Cu(II) mediada por *Pseudomonas veronii* 2E en este trabajo contribuyeron con datos extremadamente valiosos en los que se demostró que los sistemas diseñados eliminaron grandes cantidades de metal de los efluentes modelos en muy poco tiempo (24 h).

En este primer capítulo de tesis se demostró que:

Para un efluente modelo conteniendo 1mM de Cu(II), las células de *P. veronii* 2E crecidas en medio M9 son mejores adsorbentes para el metal a 32 °C ya que retuvieron la máxima cantidad de cobre ($88 \pm 1\%$).

Para un efluente modelo conteniendo 0,5 mM de Cu(II), las células de *P. veronii* 2E crecidas en medio PYG son mejores adsorbentes para el metal a 25 °C ya que retuvieron la máxima cantidad de cobre ($90 \pm 2\%$).

Las isotermas de biosorción de Cu(II) demostraron que las células crecidas en ambos medios (M9 y PYG) se ajustan mejor al modelo de Langmuir. Además, se probó que las células crecidas en medio M9 son mejores biosorbentes de Cu(II) que las crecidas en PYG, debido a que los parámetros de Langmuir mostraron una q_{max} mayor y K_d menor para el primer caso ($q_{max}=0,641$ mmol/g y $K_d= 0,139$ mM vs. $q_{max}=0,196$ mmol/g y $K_d= 0,397$ mM).

Se evidenció la capacidad de *P. veronii* 2E de desorber cobre retenido, la concentración de desorbente (HCl) en la que se obtuvo la mayor recuperación del metal fue 0,075 M ($43 \pm 2\%$ para el primer ciclo y $70 \pm 6\%$ de desorción total). Por otro lado, para 10 mL de efluente modelo la mayor desorción con HCl 0,075 M ($51 \pm 6\%$ para el primer ciclo y $70 \pm 7\%$ de desorción total) se obtuvo concentrando 5 veces el metal ($V_f=2,0$ mL).

Es necesario destacar que las mejores condiciones de trabajo que se establecieron para efluentes modelo con contenido de Cu(II) 1mM son prometedoras desde el punto de vista económico. Esto se debe a que al trabajar con biomasa tomada de medio M9 se pueden abaratar los costos de operación al utilizar glicerol como fuente de carbono para el crecimiento celular, que es un subproducto de la industria del biodiesel lo que impacta directamente en los costos operativos, haciéndolos altamente deseables para un diseño de procesos de biorremediación ambiental.

Las conclusiones de este primer capítulo representan el primer paso necesario para el diseño de un biotratamiento para la remoción y posterior recuperación de cobre. Desafortunadamente, a pesar de que el diseño de reactores con biomasa en suspensión es prometedor en cuanto a retención y recuperación del metal se refiere, presenta la desventaja de que no se puede separar fácilmente del efluente sin un paso previo, como, por ejemplo, una centrifugación. Además, si se piensa a futuro como un biotratamiento de volúmenes a escala industrial, este paso impactaría fuertemente en los costos de operación y mantenimiento del sistema, lo cual se opone directamente a los objetivos planteados en esta tesis.

Es por esto que este capítulo constituye un impulsor del Capítulo 2, en el que se intenta solventar esta desventaja mediante la inmovilización de la biomasa para un diseño de biotratamiento eficiente y económico.



REFERENCIAS



REFERENCIAS

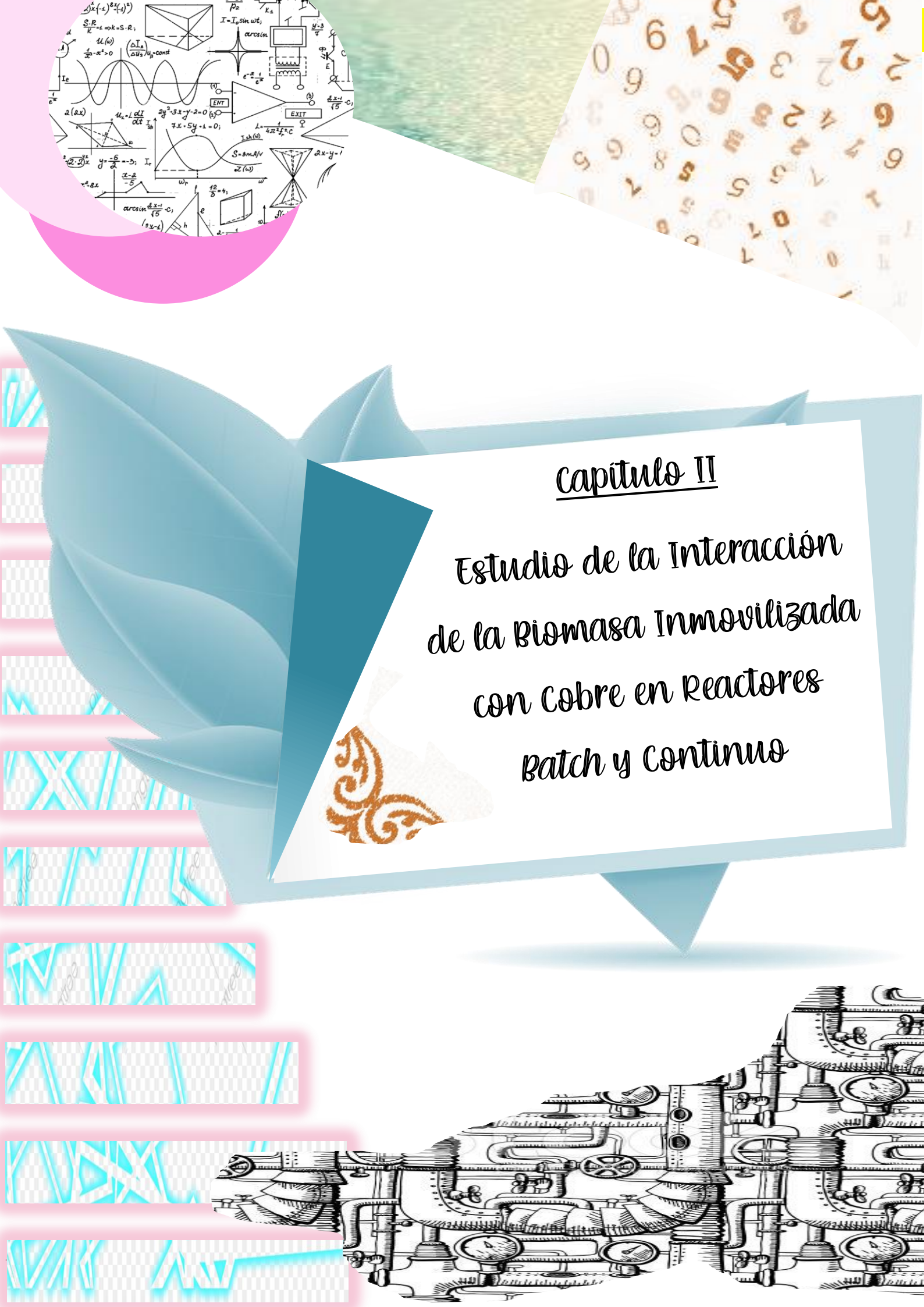
- 1) Akhtar, N., J. Iqbal, and M. Iqbal. "Removal and recovery of Nickel(II) from aqueous solution by *Luffa*-sponge-immobilized biomass of *Chlorella sorokiniana*: Characterization studies." *Journal of Hazardous Materials* 108 (1–2): 85–94, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2004.01.002>
- 2) Alessandrello, Mauricio Javier, and Diana L. Vullo. "Biotreatment of Cr(VI)-containing wastewater mediated by Indigenous Bacteria." *Environmental Engineering and Management Journal* 17 (11): 2685–94, 2018. <https://doi.org/10.30638/eemj.2018.267>
- 3) Arrieta-Rodríguez, Marco, Yamile Valencia-González, and Oscar Echeverri-Ramírez. "Use of biomineralization in soils of the city of Medellín to mitigate erosive processes." *Boletín Ciencias de la Tierra*, no. 32 (2012): 35–46. **ISSN: 0120-3630**
- 4) Barrionuevo, Raúl Matías. "Producción de biosurfactantes bacterianos para su uso en procesos de biotratamiento de efluentes industriales con contenido de metales." Universidad de Buenos Aires, 2017. https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n6463_Barrionuevo.pdf.
- 5) Belhachemi, Meriem, and Fatima Addoun. "Comparative adsorption isotherms and modeling of methylene blue onto activated carbons." *Applied Water Science* 1 (3–4): 111–17, 2011. <https://doi.org/10.1007/s13201-011-0014-1>
- 6) Beltrán-Pineda, Mayra Eleonora, and Alida Marcela Gómez-Rodríguez. "Biorremediación de metales pesados cadmio (Cd), cromo (Cr) y mercurio (Hg), Mecanismos bioquímicos e ingeniería genética: una revisión." *Revista Facultad de Ciencias Básicas* 12 (2): 172–97, 2016. <https://doi.org/10.18359/rfcb.2027>
- 7) Brenner, A. J. and Harris, E. A. "A quantitative test for copper using Bicinchoninic acid." *Analytical Biochemistry* 226: 80–84, 1995.
- 8) Carpio Jiménez, Carla. Del. 2017. "Estudio de la biosorción de Pb(II) y Cd(II) usando como biomasa a *Escherichia coli* aislada de las aguas contaminadas del Rio Huantanay de la ciudad de Cusco." Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa.

<http://repositorio.unsa.edu.pe/bitstream/handle/UNSA/5361/CNDdecajic.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

- 9) Cavallero, Gustavo J., Maria L. Ferreira, Adriana C. Casabueno, Silvana A. Ramírez, Diana L. Vullo, and Alicia S. Couto. “Structural characterization and metal biosorptive activity of the major polysaccharide produced by *Pseudomonas veronii* 2E.” *Carbohydrate Polymers* 245 (April), 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116458>
- 10) Daniel, María Alejandra. “Biotratamiento de efluentes industriales que contengan metales.” Universidad Nacional de General Sarmiento, 2018.
http://abcdnuevo.ungs.edu.ar/bases/cungs/docs/Tesis_Daniel.pdf.
- 11) Diana L. Vullo. “Microorganismos y metales pesados: Una interacción en beneficio del medio ambiente.” *Química Viva*. 2, no. 3: 93–104, 2003.
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86320303>
- 12) Ferreira, Maria L., Adriana C. Casabueno, Sabrina T. Stacchiotti, Alicia S. Couto, Silvana A. Ramirez, and Diana L. Vullo. “Chemical characterization of *Pseudomonas veronii* 2E soluble exopolymer as Cd(II) ligand for the biotreatment of electroplating wastes.” *International Biodeterioration and Biodegradation* 119: 605–13, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.10.013>
- 13) Ferreira, Maria L., Esteban Gerbino, Gustavo J. Cavallero, Adriana C. Casabueno, Alicia S. Couto, Andrea Gomez-Zavaglia, Silvana A.M. Ramirez, and Diana L. Vullo. “Infrared spectroscopy with multivariate analysis to interrogate the interaction of whole cells and secreted Soluble Exopolimeric Substances of *Pseudomonas veronii* 2E with Cd(II), Cu(II) and Zn(II).” *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 228: 117820, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.saa.2019.117820>
- 14) Ferreira, Maria L., Silvana A. Ramirez, and Diana L. Vullo. “Chemical characterization and ligand behaviour of *Pseudomonas veronii* 2E siderophores.” *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 34: 133–45, 2018.
<https://doi.org/10.1007/s11274-018-2519-3>
- 15) Ferreira, Maria Laura. “Estudio de las interacciones entre metales de relevancia ambiental y componentes celulares bacterianos involucrados en procesos de biotratamiento de aguas residuales.” Universidad de Buenos Aires, 2016.
https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n5979_Ferreira.pdf

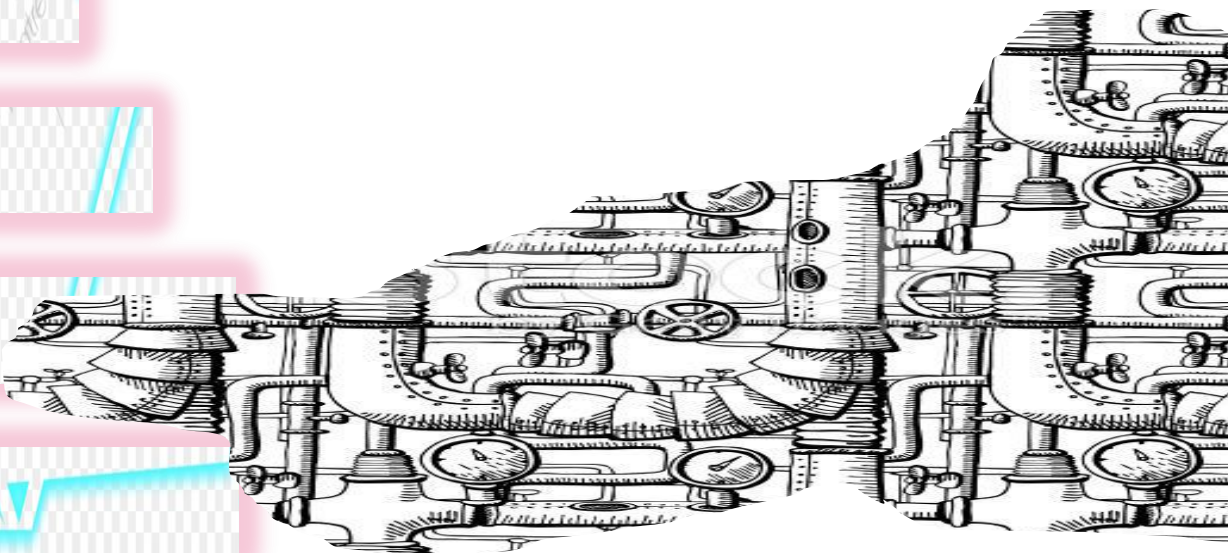
- 16) Lazzarini Behrmann, Irene C., Grattieri Matteo, Minter, Shelley D., Ramirez Silvana A. and Vullo, Diana L. "Online self-powered Cr(VI) monitoring with autochthonous *Pseudomonas* and a bio-inspired redox polymer." *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2020.
<https://doi.org/10.1007/s00216-020-02620-w>
- 17) Liu, Yun Guo, Ting Liao, Zhong Bing He, Ting Ting Li, Hui Wang, Xin Jiang Hu, Yi Ming Guo, and Yuan He. "Biosorption of copper(II) from aqueous solution by *Bacillus subtilis* cells immobilized into chitosan beads." *Transactions of Nonferrous Metals Society of China (English Edition)* 23 (6): 1804–14, 2013.
[https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(13\)62664-3](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(13)62664-3)
- 18) Mejía Sandoval, Gregory. "Theoretical approximation to the biosorption of heavy metals using microorganisms." *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia* 1 (1): 77–99, 2006.
<https://www.redalyc.org/pdf/3214/321428096010.pdf>.
- 19) Méndez, Nerina, Ramírez Silvana A M, Ceretti Helena M, Zalts Anita, Candal Roberto and Vullo Diana L. "*Pseudomonas veronii* 2E surface interactions with Zn(II) and Cd(II)." *Global journal of environmental science and technology*. 1 (3): 1–9, 2011.
<https://www.researchgate.net/publication/281035684>
- 20) Ni, Hong, Zhe Xiong, Ting Ye, Zhen Zhang, Xiaofeng Ma, and Lin Li. "Biosorption of copper(II) from aqueous solutions using volcanic rock matrix-immobilized *Pseudomonas putida* cells with surface-displayed cyanobacterial metallothioneins." *Chemical Engineering Journal* 204–205: 264–71, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.05.029>
- 21) Rana Supriyanka, Puranjan Mishra, Zularisam ab Wahid, Sveta Thakur, Deepak Pant, and Lakhveer Singh. "Microbe-mediated sustainable bio-recovery of gold from low-grade precious solid waste: a microbiological overview." *Journal of Environmental Sciences (China)* 89: 47–64, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.jes.2019.09.023>
- 22) Sosa, Griselda, Daniel María Alejandra, Barrionuevo Matías R, Lazzarini Behrmann Irene C, Ferreira María Laura, Zalts Anita, Ramírez Silvana A, and Vullo Diana L. "Zinc biosorption by microbial species for biotreatment processes." In *Handbook of Metal-Microbe Interactions and Bioremediation*,

- edited by Surajit Das and Hirak Ranjan Dash, 657–72. New York: CRC Press - Taylor and Francis Group, 2017. **ISBN: 9781498762427**
- 23) Srichandan, Haragobinda, Ranjan Kumar Mohapatra, Puneet Kumar Singh, Snehasish Mishra, Pankaj Kumar Parhi, and Kalyani Naik. “Column bioleaching applications, process development, mechanism, parametric effect and modelling: a review.” *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 90 (in press), 2020. **<https://doi.org/10.1016/j.jiec.2020.07.012>**
 - 24) Tsekova, K., D. Todorova, V. Dencheva, and S. Ganeva. “Biosorption of copper(II) and cadmium(II) from aqueous solutions by free and immobilized biomass of *Aspergillus niger*.” *Bioresource Technology* 101 (6): 1727–31, 2010. **<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.012>**
 - 25) Vullo, Diana L., Ceretti Helena M., Daniel María Alejandra, Ramírez Silvana A.M., and Zalts Anita. “Cadmium, Zinc and Copper biosorption mediated by *Pseudomonas veronii* 2E.” *Bioresource Technology* 99 (13): 5574–81, 2008. **<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.10.060>**
 - 26) Zhang, Baoyu, Yaxin Ni, Junwei Liu, Tao Yan, Xiaomin Zhu, Qing X. Li, Rimao Hua, Dandan Pan, and Xiangwei Wu. “Bead-immobilized *Pseudomonas stutzeri* Y2 prolongs functions to degrade s-triazine herbicides in industrial wastewater and maize fields.” *Science of the Total Environment* 731: 139183, 2020. **<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139183>**
 - 27) Zurita, Divia Guardia. “Optimización de las condiciones de cultivo de consorcios bacterianos sulfato reductores en la bioprecipitación de Fe(II) del afluyente antequera, Departamento de Oruro, Bolivia.” Universidad Mayor de San Andrés, 2010. **<http://repositorio.umsa.bo/xmlui/handle/123456789/19427>**



Capítulo II

Estudio de la Interacción
de la Biomasa Inmovilizada
con Cobre en Reactores
Batch y Continuo





INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Importancia de los microorganismos en estado planctónico en los procesos de biorremediación.

El interés por el uso de microorganismos en tratamientos de remediación ambiental se ha visto incrementado en gran medida debido al bajo costo de manufacturación que presentan, alta afinidad y selectividad para MRA, y por ser relativamente simples de reciclar o reutilizar (Dobrowolski et al. 2019; Fajardo-Ochoa et al. 2011). Los principales tratamientos se llevan a cabo vía la utilización de mecanismos tales como biolixiviación, absorción intracelular, reacciones redox, biomineralización y biosorción (Manal and Ashraf 2020).

La biorremediación es un proceso en el que se transforman los contaminantes nocivos en compuestos no tóxicos por acción de organismos vivos. El resultado ideal de biorremediación es que los sitios contaminados pueden ser restaurados a sus condiciones originales sin ningún otro efecto negativo sobre el ambiente. Los organismos, incluyendo actinomicetos, hongos, bacterias y plantas, han demostrado la capacidad de remediar ambientes contaminados con MRA. La biorremediación se puede dividir entonces en remediación microbiana, fitorremediación y remediación combinada, dependiendo del organismo involucrado (Zhang et al. 2020).

El uso de materiales biológicos, incluidos microorganismos vivos y no vivos, en la inmovilización y posible recuperación de metales tóxicos o preciosos presentes en desechos industriales, ha ganado un creciente interés durante los últimos años debido a la eficiencia de estos materiales, minimización de lodos químicos/biológicos y su bajo costo (Wang and Sun 2013).

Factores que influyen en un proceso de biotratamiento.

Como se ha mencionado anteriormente en la Introducción del Capítulo 1, existen diversos factores que se deben tener en cuenta a la hora de diseñar un proceso de biosorción tales como pH, temperatura, fuerza iónica, tiempo de contacto, concentración inicial de metal, y del biosorbente, los cuales definen las diferentes selectividades y

afinidades para los iones metálicos. En una remediación *in situ* hay que considerar, además, otros factores adicionales como tipo de contaminantes, características del ambiente, etc. (Zeraatkar et al. 2016; Zhang et al. 2020).

Ventajas del uso de células en estado inmovilizado

A pesar de la elevada eficacia de remoción de metales que presentan los microorganismos en estado planctónico bajo condiciones de laboratorio, muchos factores limitan su supervivencia durante una remediación *in situ*. Entre estos factores se pueden mencionar: competencia con microbiota indígena, inestabilidad genómica y bajo condiciones ambientales variables (Zhang et al. 2020). Además, la biomasa nativa presenta ciertas desventajas tales como: tamaño no uniforme de las partículas, baja densidad celular y baja resistencia mecánica (Manzoor et al. 2019). Estas desventajas pueden ser minimizadas con la inmovilización de la biomasa sobre una matriz adecuada. El concepto de inmovilizar la biomasa en un tratamiento de aguas residuales se trata de mantener confinadas las células microbianas dentro de una matriz inerte, incrementando el rendimiento de la biosorción a través del uso y reúso mediante ciclos sucesivos de biosorción/desorción del metal por tiempos prolongados.

Se reportaron estudios que demuestran que las células inmovilizadas tienen mayor eficiencia de biosorción del metal comparadas con las células en estado libre (Ahmad, Bhat, and Buang 2018).

Diversos reportes revelan que el proceso de inmovilización de una biomasa ofrece una amplia variedad de beneficios como elevada resistencia mecánica, buena capacidad biosortiva de MRA, mayor posibilidad de reciclaje que las técnicas convencionales (Rangabhashiyam and Vijayaraghavan 2019), fácil de manejar durante el proceso, estabilidad para múltiples ciclos y a un mayor rango de condiciones variantes como salinidad, toxicidad por metales, pH y temperatura.

La tecnología de inmovilización ofrece además, una elevada concentración microbiana. Algunos estudios reportaron que en ecosistemas acuáticos, la concentración de biomasa inmovilizada es superior a la encontrada en un sistema donde se encuentra libre. Esto, posiblemente se deba a que en los sistemas acuáticos, la biomasa puede ser arrastrada impidiendo que se mantenga o que aumente su concentración. Sin embargo, también se menciona que en la inmovilización de levaduras en perlas de alginato de

calcio, la concentración de biomasa adicionada no disminuye, pero tampoco aumenta, debido a que las células se encuentran atrapadas impidiendo su crecimiento y reproducción. En la inmovilización de microalgas en perlas de alginato, la concentración de biomasa también se ve controlada, esto es debido a que el espacio dentro de la perla no permite un aumento en la densidad celular. También explican que la cantidad de luz que sea capaz de pasar a través de la perla será un factor limitante para el incremento de la biomasa, así como la cantidad de nutrientes disponibles para las microalgas (Garzón-Jiménez and Barragán-Huerta 2008).

En otros trabajos se menciona que la inmovilización ofrece una elevada resistencia a compuestos tóxicos, atribuyendo este fenómeno a diferentes razones, entre las cuales se encuentran las diferencias fisiológicas entre los microorganismos inmovilizados y los de crecimiento libre o planctónico. También se asocia a la concentración de nutrientes alrededor de la matriz, lo cual permite que los microorganismos sobrevivan a altas exposiciones frente a compuestos tóxicos. Por último, en un *biofilm*, la matriz de exopolímeros formada por los mismos microorganismos, reduce la difusión de las sustancias tóxicas hacia el interior del mismo, gracias a la carga neutra o polianiónica que posee, protegiendo así a los microorganismos que la componen.

Por otro lado, se ha demostrado que cuando se inmoviliza la biomasa, se produce una baja pérdida celular posibilitando la recuperación de la misma del efluente después del tratamiento sin usar filtración (Ahmad, Bhat, and Buang 2018).

A modo de resumen, estos beneficios traen como consecuencia, por un lado, que la biomasa bacteriana cuando está inmovilizada en una matriz inerte, se torna más resistente frente al estrés provocado por el ambiente, factor importante en la supervivencia, multiplicación, utilización de nutrientes, competencia con la biomasa indígena, y adaptabilidad de células microbianas (Zhang et al. 2020). Por otro lado, el incremento en el área superficial cuando las células se inmovilizan tiende a reducir las limitaciones de transferencias de masa, que a su vez aumenta el acceso al contaminante, elevando de esta manera el rendimiento en la remoción de MRA en un proceso de biorremediación (Przystaś, Zabłocka-Godlewska, and Grabińska-Sota 2018). Además, esta técnica al permitir el uso del sistema repetidas veces hace más fácil la separación biomasa-efluente.

Estrategias de inmovilización

La inmovilización se define como el proceso por el cual se restringe, total o parcialmente, los grados de movimiento de células por asociación a un soporte. Dependiendo de la forma en la que se lleva a cabo la inmovilización, algunos autores la clasifican en dos grandes grupos: naturales y artificiales (Britos 2013).

Inmovilización natural: La adsorción espontánea de células a diferentes tipos de materiales constituyen los sistemas naturales, en los cuales las células se unen por interacciones no específicas débiles. En condiciones ambientales apropiadas, este primer paso de asociación puede conducir a la colonización del soporte y la formación de un *biofilm*. Las células permanecen confinadas en una matriz de polímeros extracelulares que ellas mismas excretan, siendo esta asociación más firme que la esperada por adsorción simple.

Inmovilización artificial: Para células con pobres características adhesivas o de floculación existen numerosas técnicas de inmovilización artificiales. En base a los mecanismos físicos involucrados, pueden dividirse en cuatro grandes categorías: unión o adsorción a una superficie, atrapamiento en una matriz porosa, autoagregación y confinamiento por barreras.

Así, otros autores (Reyes-Reyes et al. 2018) clasifican la inmovilización en reversible o irreversible. Un confinamiento reversible se lleva a cabo induciendo la adhesión de las células a superficies de matrices naturales o sintéticas como la zeolita, el poliuretano, el alcohol de polivinilo, poliacrilamida y polietilenglicol, entre otros. Por otra parte, la estrategia de inmovilización irreversible presenta diversas alternativas. Sin embargo, uno de los métodos irreversibles más estudiados es la encapsulación de células al interior de esferas gelatinosas. Este tipo de inmovilización protege al biocatalizador de condiciones ambientales adversas, pero la velocidad de reacción queda limitada a la difusión de los sustratos a través de la matriz inmovilizadora. Algunas de las matrices más utilizadas en esta metodología son el alginato de calcio, agar, sílice, carragenanos y gelatina, entre otros.

Otros autores, la clasifican en inmovilización pasiva e inmovilización activa (Reyes-Reyes et al. 2018).

- **Inmovilización Pasiva:** Algunos microorganismos, de forma natural, tienden a formar aglomerados o unirse a superficies y crecer en ellas. Esta interacción con superficies puede darse por la presencia de estructuras celulares como la cápsula y las fimbrias en el caso de las bacterias, y en el caso de los hongos sus propias hifas. Durante la inmovilización pasiva puede darse un proceso de formación de *biofilms*, dentro de los cuales el 15–25% corresponde solamente a células vivas. El porcentaje restante está compuesto por agua en su mayoría, exopolisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos; estos 3 últimos compuestos forman las sustancias poliméricas extracelulares (EPS por sus siglas en inglés, para más información ver Capítulo 3). Las biopelículas o *biofilms* son estructuras complejas, con sistemas de canales de agua y aireación, los cuales permiten el transporte de nutrientes, desechos, oxígeno, y agua, entre otros. Gracias a estos canales se generan diferentes gradientes de presión, pH y oxígeno, lo cual permite que se desarrollen micronichos y diversos grupos bacterianos. La formación del *biofilm* se da en 4 pasos principalmente (Ver **Figura 31**). Durante el primer paso, las células perciben una superficie de adherencia y forman una unión activa reversible por medio de fimbrias, apéndices, pilis, o proteínas de superficie. Durante la segunda fase, se produce un incremento de la biomasa celular, formando microcolonias alrededor del área de adherencia, así como la formación de EPS permitiendo que sea una unión irreversible. La composición del exopolisacárido en el EPS puede variar según el tipo de microorganismo o las condiciones ambientales, siendo los principales componentes alginatos, N-acetil-glucosamina, glucosa, y galactosa. Durante el tercer paso, el *biofilm* crece y madura, permitiendo la adhesión de nuevas colonias bacterianas. Luego de la maduración, se da el último paso, en el cual células individuales o conglomerados se desprenden del *biofilm* por erosión, abrasión o separación para formar nuevos conglomerados (Garzón-Jiménez and Barragán-Huerta 2008). Este tipo de inmovilización ha sido usada en muchos ensayos en diferentes tipos de matrices tanto naturales como sintéticas. Se han reportado diversos estudios en los que las matrices orgánicas tienen mayor capacidad de biosorción de la que pueden brindar las matrices sintéticas. Esto se debe a que los materiales orgánicos tienen mayor cantidad de grupos funcionales como aminos, carboxilos, fosfatos, entre otros, lo cual permite una adherencia y crecimiento más eficaz.

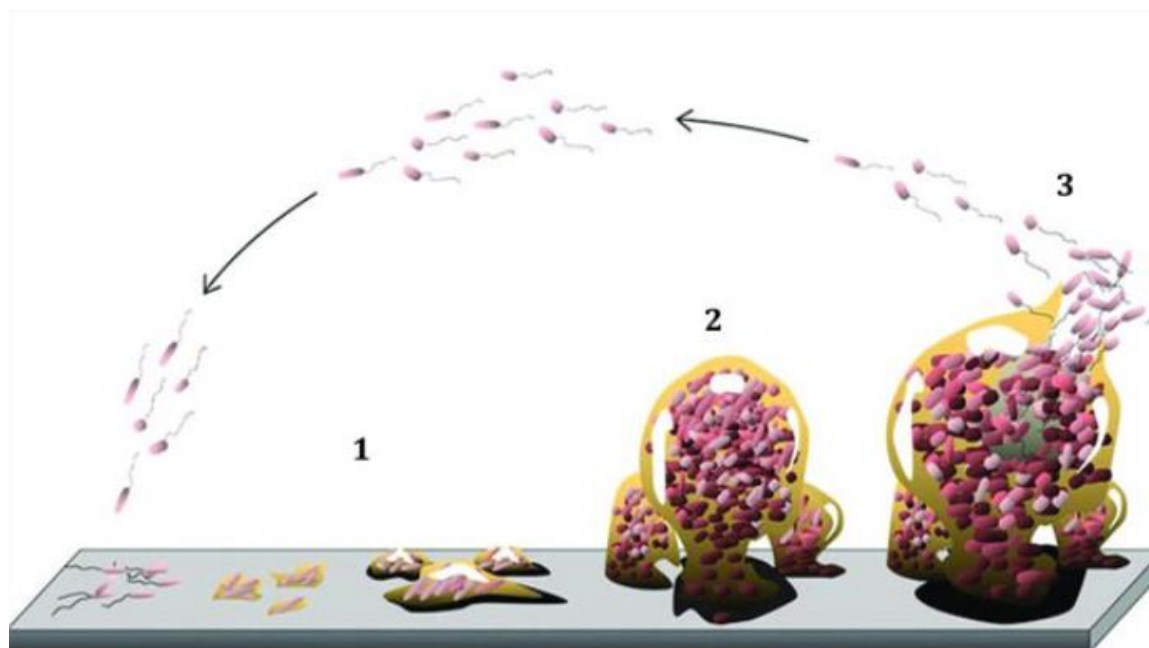


Figura 31. Maduración del biofilm: 1: Las células perciben una superficie de adherencia y forman una unión activa reversible por medio de fimbrias, apéndices, pilis, o proteínas de superficie. 2: Se produce un incremento de la biomasa celular, formando microcolonias alrededor del área de adherencia, así como la formación de EPS permitiendo que sea una unión irreversible. 3: El biofilm crece y madura, permitiendo la adhesión de nuevas colonias bacterianas. Finalmente, las células individuales o conglomerados se desprenden del biofilm por erosión, abrasión o separación para formar nuevos conglomerados. (Imagen extraída de <https://www.aquamx.com.mx/single-post/2016/06/27/biofilms-bacterianos>).

La esponja vegetal o de *luffa*, es una fibra vegetal proveniente del fruto de la *luffa*, la cual es obtenida una vez que se ha secado el fruto y se ha retirado el pericarpio del fruto (Ver Figura 32). Debido a diversas propiedades como no ser tóxica ni reactiva, así como su bajo costo, permite que sea usada ampliamente en la inmovilización de microorganismos como *Chlorella sorokoniana*, *Porphyridium cruentum*, *Penicillium cyclopium*, *Funalia trogii*, entre muchos, para la remoción de diversas sustancias tóxicas como metales, colorantes, sustancias cloradas, entre otras. Diversos estudios como el de Garzón-Jiménez and Barragán-Huerta (2008) reportan que la inmovilización de *Funalia trogii* en esponja de *luffa*, así como la inmovilización de un consorcio bacteriano en este mismo soporte y en fibras de

coco para la degradación de diversas sustancias tóxicas (Garzón-Jiménez and Barragán-Huerta 2008; Shen et al. 2018).



Figura 32. Esponja de luffa (Imagen extraída de (Garzón-Jiménez and Barragán-Huerta 2008).

- Inmovilización activa: Dentro de las técnicas de inmovilización activa, o inmovilización artificial pueden distinguirse el enlace químico, atrapamiento en geles de polímeros naturales o sintéticos, y el uso de agentes floculantes. Los agentes floculantes se usaron inicialmente con el fin de agregar y sedimentar partículas suspendidas, evitando así el uso de técnicas como la centrifugación. Actualmente pueden usarse con el fin de permitir que células que por su naturaleza propia no tienden a aglomerarse, lo hagan, permitiendo así el atrapamiento de otras sustancias suspendidas en el medio. En cuanto a agentes floculantes, el quitosano ha sido, por excelencia, el compuesto más usado. Este polímero es un polisacárido lineal compuesto de cadenas distribuidas aleatoriamente de D-glucosamina y N-acetil-D-glucosamina unida por enlaces β -(1-4), el cual es extraído de la quitina. Posee una carga positiva, y es soluble en medios ácidos. El atrapamiento en una matriz porosa, es uno de los procesos más utilizados. Este puede darse en polímeros sintéticos (resinas, acrilamidas, poliuretanos), proteínas (gelatina, colágeno, albúmina de huevo), o polisacáridos naturales (agares, carragenanos o alginatos). Consiste en la inmovilización de

células dentro de una matriz, la cual impide la difusión de las células en el medio, pero permite el paso de metabolitos y nutrientes. El procedimiento general para el atrapamiento de las moléculas en gotas de polímeros, consiste en suspender el microorganismo a inmovilizar en una solución líquida que contiene el polímero en estado soluble. Para la gelificación de esta mezcla se usan diferentes métodos de acuerdo a la naturaleza del polímero a usar. Entre los métodos comúnmente usados se encuentran la disminución o aumento de temperatura, la gelificación mediada por cationes multivalentes, y otros métodos químicos como la adición de las gotas a un buffer enfriado en hielo o en diferentes soluciones de composiciones varias. Este tipo de inmovilización, puede tener como problema que las células libres del medio se ubiquen sobre la superficie de la esfera y la degraden, permitiendo la liberación de la biomasa inmovilizada. Para solucionar este problema, se ha implementado el uso de esferas de gel con un núcleo interno que contiene las células inmovilizadas (Ver **Figura 33**) y una capa externa protectora que impide su liberación. Algunas de las ventajas que ofrece este método, es que permite la inmovilización de una alta concentración de biomasa y de diferentes especies de microorganismos, separados físicamente unos de otros y ofrece una alta resistencia a sustancias tóxicas presentes en el medio.

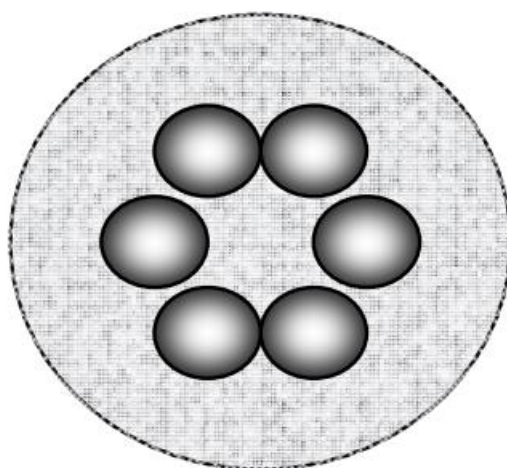


Figura 33. Esquema de inmovilización por atrapamiento en geles: Consiste en la inmovilización de células dentro de una matriz, la cual impide la difusión de las células en el medio, pero permite el paso de metabolitos y nutrientes (Imagen extraída de (Garzón-Jiménez and Barragán-Huerta 2008)).

En vista de los beneficios de la inmovilización surgió una alternativa atractiva para producir biosorbentes eficientes. Se han llevado a cabo un gran número de trabajos para estudiar la inmovilización basados en la capacidad de biosorción, estabilidad, y reciclaje y los resultados fueron mucho más prometedores comparados con la biomasa nativa en estado libre. Hasta la fecha, han sido utilizados como matriz: perlas de alginato, perlas de carragenano, espuma de poliuretano, perlas de agarosa, agar en perlas, geles de poliacrilamida, gel de sílice, fibras de capron, material de cerámica, cellex-T, resina de intercambio aniónico, amberlita, resina de intercambio catiónico, vidrio de poro controlado, esponja cilíndrica *luffa*, nanoesferas de grafeno, nanofibras de quitosano, espumas de polivinilo y papel de filtro (Ver ejemplos de biomasa inmovilizada en diferentes matrices **Figura 34**). Estas matrices se emplean para la eliminación de iones metálicos (Ni, Cu, Cd, Zn, Au, Cr, Hg, U, Pb, Al, Co, Fe, Mn, Pd, Pt, Ag), iones moleculares inorgánicos (amonio, fosfato, nitrato, nitrito, fósforo, etc.) y otros compuestos orgánicos incluyendo tintes (Manzoor et al. 2019).

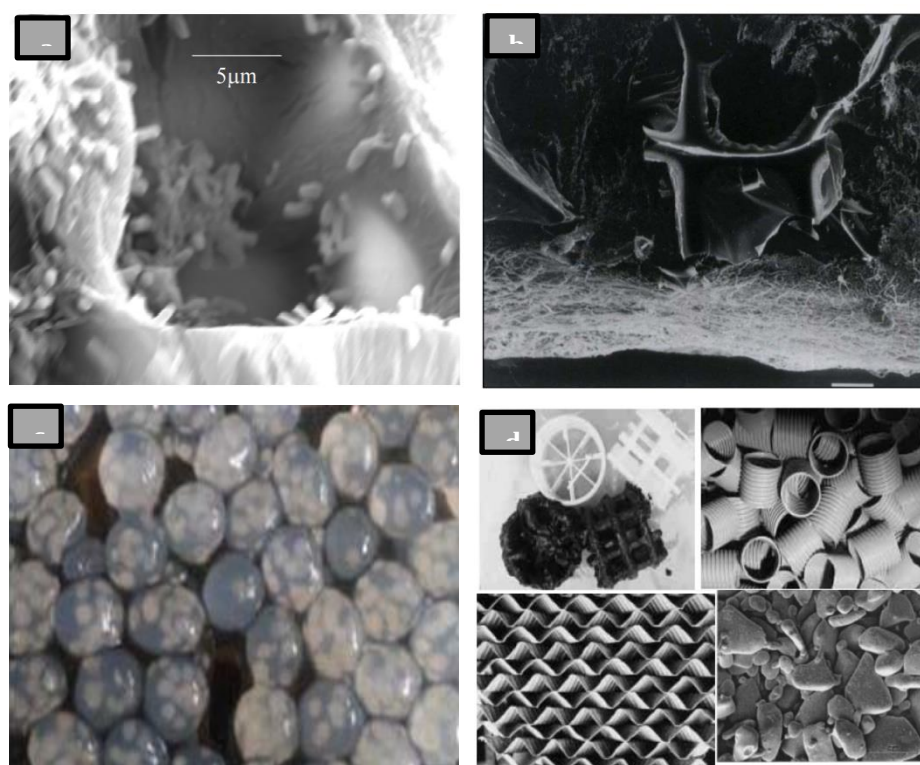


Figura 34. Microfotografías obtenidas por SEM; a: Inmovilización bacteriana en los poros del grano verde de café; b: Inmovilización de la biomasa en espuma de poliuretano; c: biomasa inmovilizada en alginato de calcio; d: otros materiales utilizados para inmovilizar microorganismos (Imágenes extraídas de Garzón-Jiménez and Barragán-Huerta 2008 y (Martínez-Trujillo and García-Rivero 2012).

Parámetros a tener en cuenta en un proceso de biosorción

La biosorción de iones metálicos por diversas matrices biológicas ha sido usada extensamente en la última década debido a su potencial para tratamientos de aguas residuales. La selección de la biomasa como potencial biosorbente es la etapa clave de la biosorción, ya que la mayoría de los materiales biológicos tienen afinidad hacia los iones metálicos. Generalmente, el objetivo es tener aplicaciones a gran escala por lo que los principales factores a tener en cuenta durante la selección son precio y disponibilidad. La biomasa bacteriana ha sido usada exitosamente como biosorbente y pueden ser obtenidas en grandes cantidades provenientes de residuos industriales y a muy bajo costo (Figueroa-Torres et al. 2016).

Según diversos estudios, la biomasa microbiana, tanto la metabólicamente inactiva como la viva/activa, contiene ligandos disponibles para unirse y acumular especies metálicas pudiendo ser usadas como biosorbente. La biomasa inactiva ofrece más ventajas ya que puede ser obtenida por productos provenientes de la fermentación u oxidación química, no requiere la suplementación de nutrientes y puede ser regenerada fácilmente. Es uno de los métodos menos destructivo y en el caso de usar polímeros sintéticos de oclusión, tanto la disolución de partículas del gel, como la liberación de las células inmovilizadas es fácil y rápida.

Otro parámetro importante a tener en cuenta para una remediación de efluentes exitosa, es la matriz de inmovilización. Se debe tener en cuenta que las matrices que se usarán como soporte cumplan con ciertas características tales como: la presencia de una superficie de adherencia amplia, que sea de fácil operación y regeneración; debe tener buena porosidad con el fin de permitir un intercambio constante de sustratos, productos, gases, etc., además, debe tener una buena estabilidad química, biológica, mecánica y térmica (Garzón-Jiménez and Barragán-Huerta 2008; Botello, Ortiz, and Peña 2016; Pérez García 2015). La inmovilización de biosorbentes es fundamental para la aplicación industrial ya que se requieren tratar grandes volúmenes de efluentes. Esto vuelve imperativo que el biosorbente sea fácilmente separado de las aguas residuales para estar disponible para su reúso. El uso de una matriz porosa es un requerimiento importante para la fijación de la biomasa, ya que mejora significativamente la eficacia de la separación (Ramteke and Gogate 2016).

Un soporte adecuado para la inmovilización de microorganismos con aplicación en el área ambiental debe proporcionar condiciones apropiadas para la supervivencia de las

células y su funcionamiento como inóculo, lo cual da como resultado una vida media suficientemente larga. Se requiere que el soporte no sea tóxico, ni contaminante y que tenga una calidad constante, para permitir una disponibilidad óptima de los microorganismos en el sitio de interés y eventualmente evite su dispersión. Es importante aclarar que en la biorremediación de suelos contaminados una lenta liberación de los microorganismos inmovilizados puede ser ventajosa. En contraparte, en los sistemas de tratamiento de aguas subterráneas o residuales contaminadas es importante mantener la estabilidad del soporte para evitar el incremento en la formación de lodos cuya disposición y tratamiento puede incidir en los costos globales del proceso (Martínez-Sánchez et al. 2012).

Comparación de sistemas: Batch vs. Continuo

La mayoría de los trabajos sobre biosorción que aparecen en la literatura han sido llevados a cabo en sistemas *batch*. Sin embargo, los estudios reportados demuestran que el tipo de columna que opera con flujo continuo es más útil en tratamientos de aguas residuales a gran escala y tiene distintas ventajas sobre el sistema en *batch*: es fácil de operar, alcanza altos rendimientos y puede ser fácilmente escalado desde un procedimiento a escala laboratorio. La mayoría de los procesos de separación y purificación que emplean tecnologías de biosorción usan continuamente columnas de lecho fijo, las cuales son eficaces para ciclos de biosorción/desorción. Así, puede ser tratado un gran volumen de aguas residuales con una cantidad definida de biosorbente en la columna, posibilitando el reúso de microorganismos. Luego de cargar el efluente, el contaminante puede ser concentrado en un volumen más pequeño de material sólido o ser desorbido en un eluido para recuperación, eliminación o contención. Desde el punto de vista económico el uso de la columna de lecho fijo es rentable porque permite la recuperación del metal en este caso y regenerar la biomasa con un consumo relativamente menor de reactivos (Kumar et al. 2011).

A modo de resumen, el objetivo de este segundo capítulo es seguir en la línea de búsqueda de una metodología que permita el diseño de un biorreactor que sea eficiente y principalmente económico para remover cobre de efluentes. Para lograr esto, se partió de las mejores condiciones halladas en el Capítulo 1 (temperatura=32 °C, medio de crecimiento M9 y concentración de cobre en el efluente 1mM) y se pretende solventar

sus limitaciones mediante la técnica de inmovilización pasiva de la biomasa para la construcción de biorreactores a escala laboratorio.

Por otro lado, pensando en una aplicación industrial de este biotratamiento, se enfocó el estudio de este capítulo en evaluar diferentes diseños de reactores para lograr optimizar el funcionamiento del proceso, con la intención tanto de remover cobre del efluente como así de recuperarlo por su reúso, a través de métodos que permitan mantener los costos de operación al mínimo.



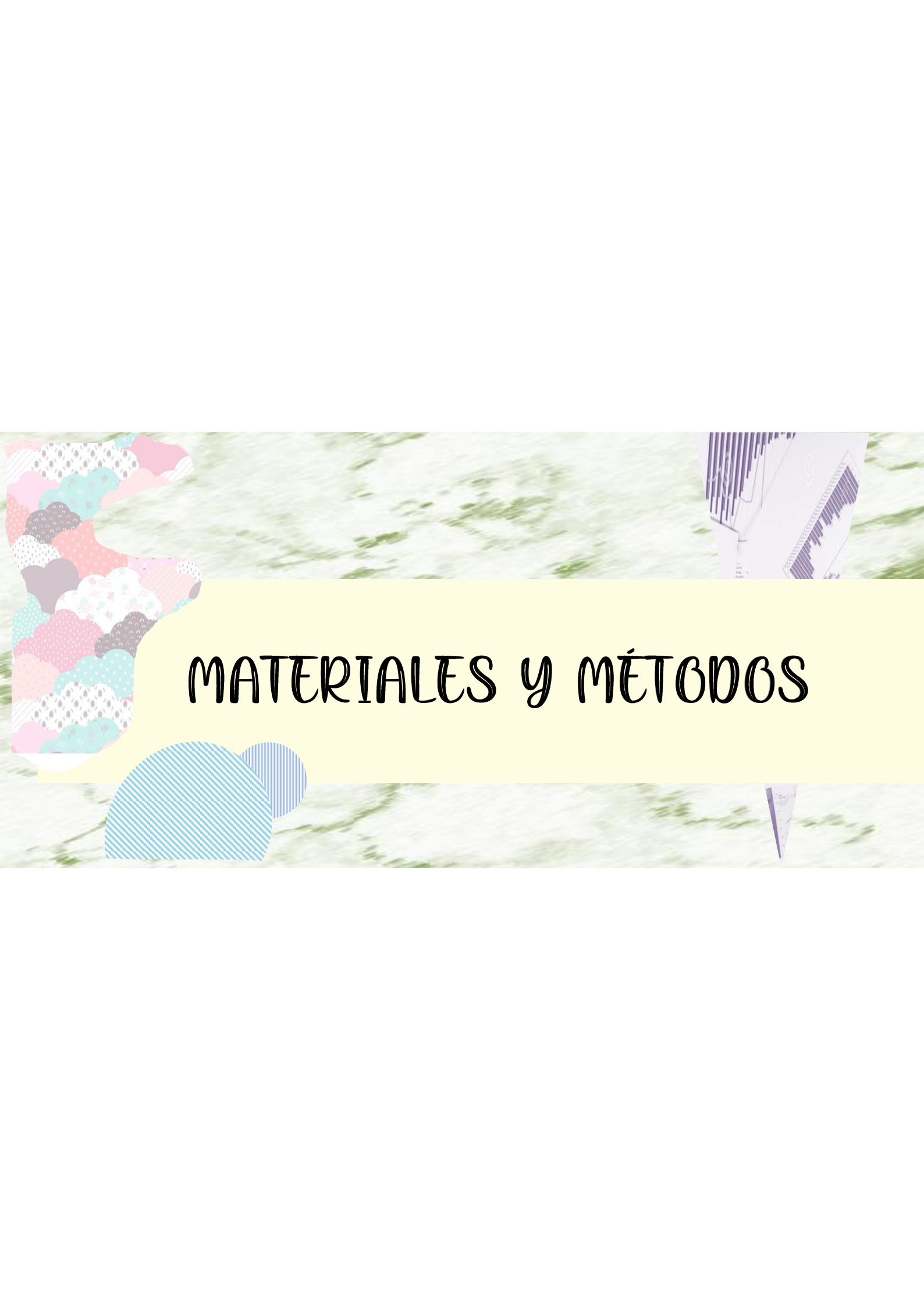
OBJETIVOS



OBJETIVOS

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Evaluar métodos de inmovilización de *P. veronii* 2E sobre diferentes matrices:
 - Esponjas de *luffa*
 - Piedra Pómez
 - Piedra Sanitaria.
- Diseñar un proceso de eliminación de Cu(II) con el sistema *P. veronii* 2E inmovilizado.
- Optimizar la capacidad de biosorción de Cu(II) por parte de células enteras de *Pseudomonas veronii* 2E inmovilizadas en el soporte, para la construcción de biorreactores (*batch* y continuo) a escala laboratorio.
- Diseñar un proceso de recuperación de Cu(II) retenido por el sistema inmovilizado en el reactor *batch* y continuo.



MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Ensayos de inmovilización de la bacteria:

Elección del soporte

Para elegir la matriz más adecuada de inmovilización, se tuvieron en cuenta parámetros tales como: buena adhesión, fácil de operar y manejar, elevada porosidad, alta estabilidad térmica, mecánica biológica y química. Para esto se escogió esponja de *luffa* (EV), diatomitas (PS) y un sintético de piedra pómez (PP) como candidatos para llevar a cabo la inmovilización.

Tratamiento de los soportes:

Para la utilización de la EV, primero se las cortó en cuadrados de 2 cm x 2 cm, luego se las pesó y se ajustó el peso de las mismas a 0,08 g en balanza analítica ($\pm 0,0001$ g). A continuación, se las hirvió en agua destilada durante 30 min, se las dejó en reposo en agua ultrapura - 18 M Ω cm Millipore - durante 24 h renovando el agua 3 o cuatro veces. Al finalizar este tiempo, se las dejó en estufa a 70 °C hasta peso constante, luego se las envolvió por separado en papel aluminio y se las esterilizó en autoclave a 1 atm de sobrepresión, 121 °C durante 20 minutos. Al finalizar este proceso, las EV se ubican en el reactor *batch* en condiciones de esterilidad.

En el caso de PS, conocidas generalmente como piedras sanitarias para mascotas, son esencialmente diatomitas. Las mismas fueron tamizadas para tener un tamaño de piedras promedio. Luego se lavaron con agua destilada 3 veces, se secaron en estufa a 120 °C hasta peso constante, se colocaron en un medio fresco y se esterizaron en autoclave a 1 atm de sobrepresión, 121 °C durante 20 minutos.

Para la inmovilización en PP, se compró un sintético de piedra pómez, primero se probó cortando la barra de PP en cubos de 1 cm x 1 cm y segundo, se probó cortándolas en cubos lo más pequeños posible. A continuación, a ambos procesados, se los hirvió durante 30 min en agua destilada y, se secaron en estufa a 120 °C hasta peso constante.

Se los colocó en medio fresco y se esterilizaron en autoclave a 1 atm de sobrepresión, 121 °C durante 20 minutos.

Inmovilización de la biomasa bacteriana en los diferentes soportes

Para la puesta a punto de la técnica de inmovilización bacteriana, se llevaron a cabo los ensayos de la misma manera para cada soporte. Se introdujo para cada ensayo 0,40 g, 0,57 g y 1,24 g de EV, PP y PS respectivamente en un reactor tipo *batch*, que consistió en un Erlenmeyer de 500 mL de capacidad, con 90 mL de medio de cultivo fresco. Luego, se inoculó con 10 mL de una suspensión bacteriana en fase de crecimiento estacionaria temprana, en una relación al 10% en volumen, obtenido a 32 °C con leve agitación. El tiempo de incubación se fue variando, de manera de determinar en qué momento se obtenía la mayor cantidad de biomasa inmovilizada (BI) por gramo de soporte. El medio de cultivo fue renovando cada 2–3 días en condiciones de asepsia. Al finalizar este tiempo, se lavó el contenido del biorreactor con agua ultrapura - 18 MΩcm Millipore - estéril una vez, y se secó en estufa a 32 °C hasta peso constante, este valor se consideró peso final (P_f). Se determinó la cantidad de biomasa inmovilizada por diferencia del P_f menos el peso de la matriz sin bacterias. Esto se guardó en freezer a -20 °C, sacándolo sólo para llevar a cabo los ensayos.

Para monitorear la colonización de *Pseudomonas veronii* 2E sobre los diferentes soportes, se llevó a cabo un análisis por microscopia de barrido electrónico (SEM) antes de la inmovilización y al finalizar la misma mediante la contratación de un servicio brindado por el Centro Integral de Microscopia Electrónica (CIME) en Tucumán-Argentina y en el Laboratorio de Microscopia en Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Buenos Aires (UBA).

Diseño de los reactores

Para el diseño de un reactor continuo (Ver **Figura 35**), se mantuvieron constantes los parámetros más importantes, tales como temperatura, pH, caudal y agitación.

Para ello, el reactor consistió en una jeringa de 60 mL de capacidad conectada en la base con una manguera a través de la cual ingresaba el efluente. En la parte superior de la jeringa se colocó, a modo de cierre, un tapón de goma perforado por un tubo de

vidrio, de esta manera, al armar el reactor se obtenía un volumen de trabajo de 50 mL. El tubo de vidrio, permitía la salida del efluente a través de una manguera de silicona.

El efluente circulaba mediante la acción de bombas peristálticas que trabajaban en simultáneo con el mismo caudal, reguladas de forma tal que una vez lleno un reactor, la solución de cobre era trasladada a otro reactor y así sucesivamente, teniendo la precaución de evitar pérdida de efluente por la parte superior de cada reactor. Para ello, se procedió al sellado de la parte superior con cinta de teflón y Parafilm®. A su vez, para asegurar que la temperatura se mantenga constante, cada reactor fue envuelto con una camisa de circulación de agua. La misma consistió en envolver las jeringas con mangueras de paredes flexibles, a través de las cuales circulaba agua a 32 ± 2 °C por la acción de un baño termostatzado. Para evitar variaciones de temperatura a lo largo del sistema, se cubrieron las jeringas, con un material aislante similar al utilizado en equipos de aires acondicionados.

Para aumentar el tiempo de contacto cobre-BI y mejorar así el proceso de biosorción, el sistema era continuamente homogeneizado. Esto se logró por un agitador magnético colocado debajo de cada reactor que accionaba una bala magnética dentro de cada jeringa. Este agitador magnético además, tiene un dispositivo de regulación de temperatura que colaboraba para mantener la temperatura de trabajo constante.

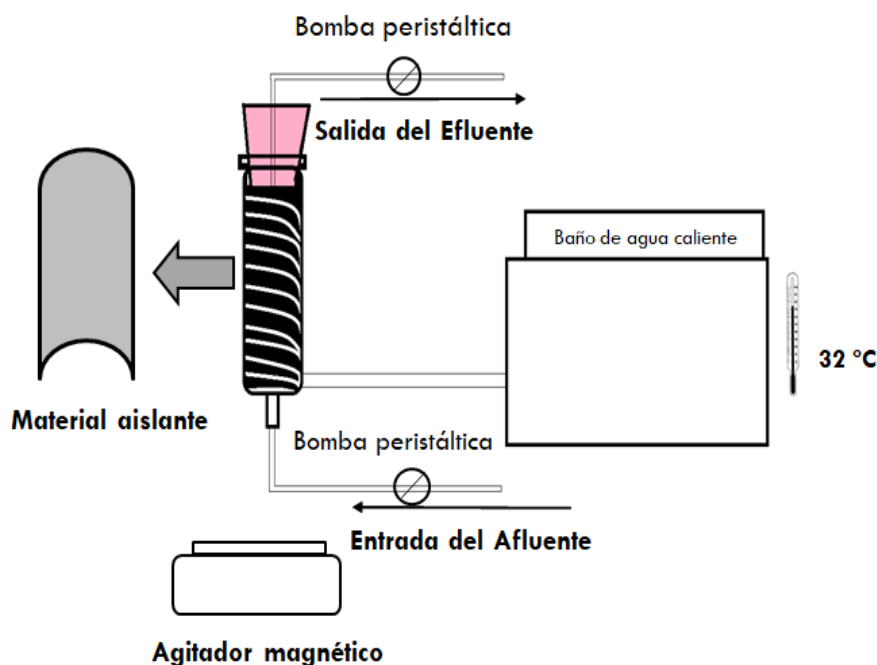


Figura 35. Esquema del diseño de un reactor continuo.

Reactor con recirculación

Para el diseño del reactor con recirculación (Rrc) se basó en el diseño del reactor mencionado anteriormente, con la modificación de que la entrada y salida del efluente provenía de un único reservorio de efluente modelo con contenido de cobre (Ver **Figura 36**).



Figura 36. Biorreactor con recirculación.

En este caso consistió en una sola jeringa, a la cual se le introdujeron 5 EV de 0,08 g cada una, que tenían adherida biomasa inmovilizada ($1\text{g BI g soporte}^{-1}$) y se recirculó 200 mL de una solución 1 mM de cobre. Se tomaron muestras a diferentes tiempos por medio de jeringas de 5 mL conectadas a las mangueras, durante 216 h (9 días). En

simultáneo del ensayo, se medía el control, que consistió en un reactor diseñado de la misma manera pero que contenía 5 EV sin biomasa adherida.

Reactores conectados en serie

Para el diseño de los reactores conectados en serie (Rs) se colocaron tres reactores en secuencia uno seguido del otro, cuyo diseño es el mismo descrito anteriormente. El efluente modelo circulaba del reservorio (afluente) al primer reactor a través de la manguera ubicada debajo del primer reactor. Luego, una vez lleno, el efluente salía de la parte superior del primer reactor y entraba por la parte inferior del segundo reactor y así sucesivamente. Una vez que los tres reactores se llenaban, el efluente se colocaba en un segundo reservorio titulado “efluente tratado” (Ver **Figura 37**).

A la salida de cada reactor se encuentran los puntos de toma de muestras que consistían en jeringas de 5 mL de capacidad.

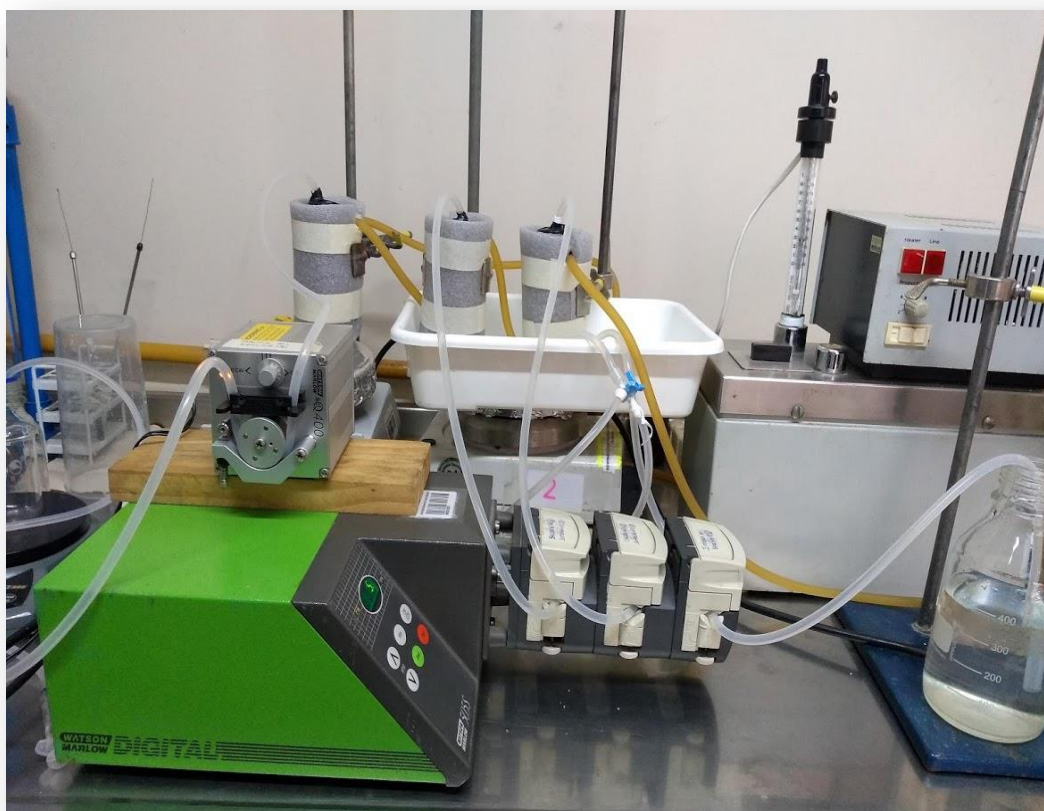


Figura 37. Biorreactores conectados en serie

Retención de metal por la biomasa inmovilizada

Para estudiar la biosorción del metal, se expuso la BI a 50 mL de una solución de Cu(II) 1 mM, el pH fue ajustado a 5,5 con 0,5 mL de una solución de Buffer MES 1M a 32 °C en un reactor tipo *batch*. Se tomaron muestras a diferentes tiempos durante 5 h y una última a las 24 h y se cuantificó cobre en cada sobrenadante. En paralelo se llevó a cabo el control abiótico para cada ensayo que consistió en 50 mL de una solución de Cu(II) (0,5 / 1 mM) con el buffer MES y el soporte sin bacterias.

Además, se construyeron dos tipos de reactores continuos. Por un lado, se diseñó un reactor con recirculación (Rrc) con 50 mL de capacidad en donde se hizo recircular un efluente modelo de cobre. Por otro lado, tres reactores conectados en serie (Rs) que operan de forma continua fueron construidos y, al igual que el modelo de reactor anterior, tienen 50 mL de capacidad. Cada reactor fue revestido con mangueras y cubiertos con un material aislante en donde circulaba agua a 32 °C regulada por un baño térmico conectado a los reactores. Ambos reactores fueron enfrentados a 200 mL de un efluente modelo de Cu(II) 1 mM a pH 5,5 ajustado por 2 mL de una solución de Buffer MES 1 M durante 9 y 1 día respectivamente. En paralelo, se llevaron a cabo los controles abióticos descriptos anteriormente.

Desorción de Cobre por la biomasa inmovilizada

Para evaluar la desorción de Cu retenido por la BI y la matriz, al finalizar el tiempo de biosorción, el biorreactor fue vaciado, luego se introdujo 17 mL de una solución de HCl 75 mM, esto se dejó incubar a 32 °C durante 30 min, se consideró esto como un ciclo. Para evaluar en que instancia el Cu(II) era enteramente desorbido se llevaron a cabo dos ciclos más. Se determinó la cantidad del metal en cada sobrenadante. Para Rrc y Rs debido a que la cantidad de efluente era 200 mL, la desorción se llevó a cabo en 80 mL con HCl 75 mM. Para el Rrc la solución ácida se la recirculó durante 1 hora mientras que al Rs se hizo recircular por cada reactor durante 10 minutos.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Resultados y Discusiones

Estudio de la inmovilización de la biomasa en matrices inertes

Se llevó a cabo el estudio del desarrollo bacteriano sobre la superficie de cada matriz. La **Figura 38. a), b), c), d), e) y f)**, muestran los cambios macroscópicos de la superficie antes y después de la inmovilización bacteriana.

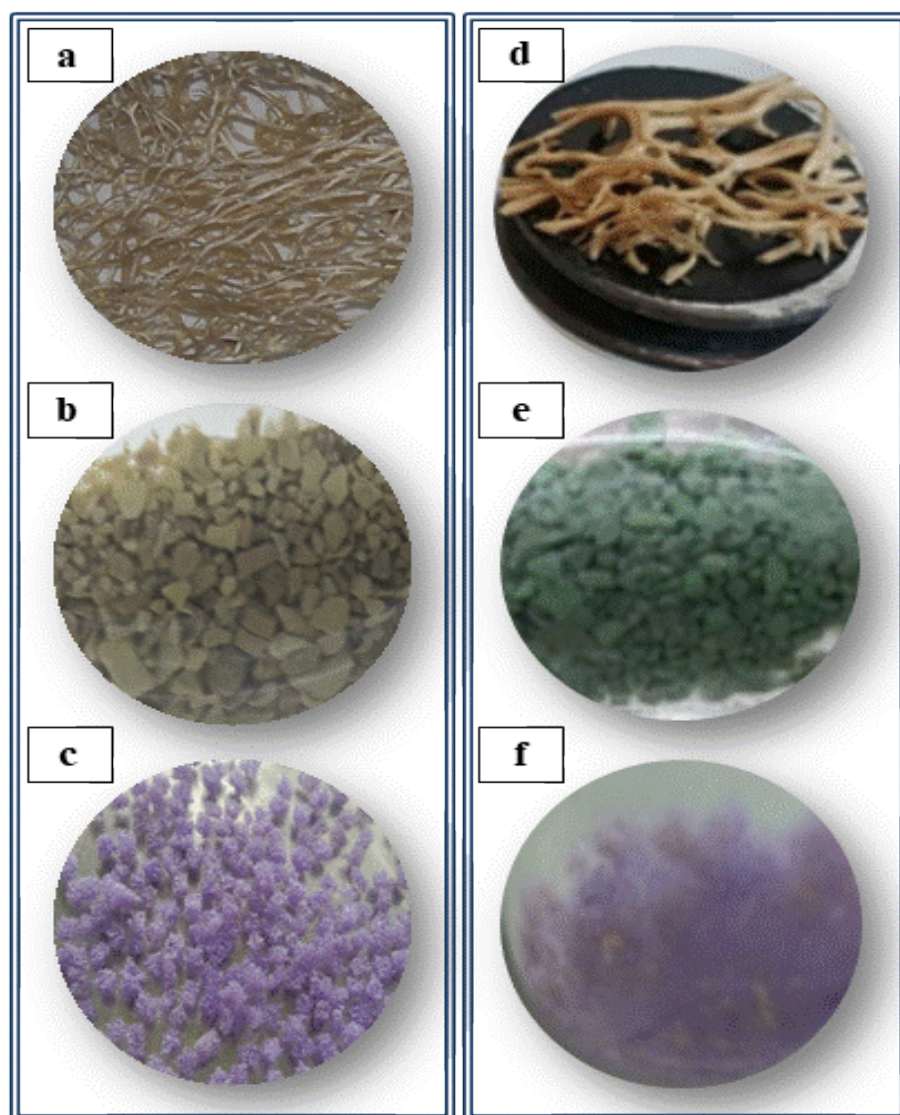


Figura 38. Cambios macroscópicos de la matriz: a: EV, b: PS y c: PP antes de la inmovilización bacteriana y d: EV, e: PS y f: PP con la biomasa inmovilizada

La **Figura 39** muestra las imágenes de la colonización bacteriana sobre las diferentes matrices obtenidas por Microscopía de Barrido Electrónico (SEM). La **Figura 39. d), e)** y **f)**, corresponden a las matrices libres de biomasa y la **Figura 39. a), b)** y **c)**, muestran el desarrollo bacteriano sobre EV, PS y PP respectivamente. Las microfotografías SEM evidenciaron que la bacteria pudo desarrollar un *biofilm* extenso sobre la esponja de *luffa*, mientras que en piedra pómez, parece poder adherirse solo en los pliegues de la superficie. Finalmente, como diatomitas presentó mayor porosidad, el crecimiento bacteriano aparece como una delgada película sobre la superficie.

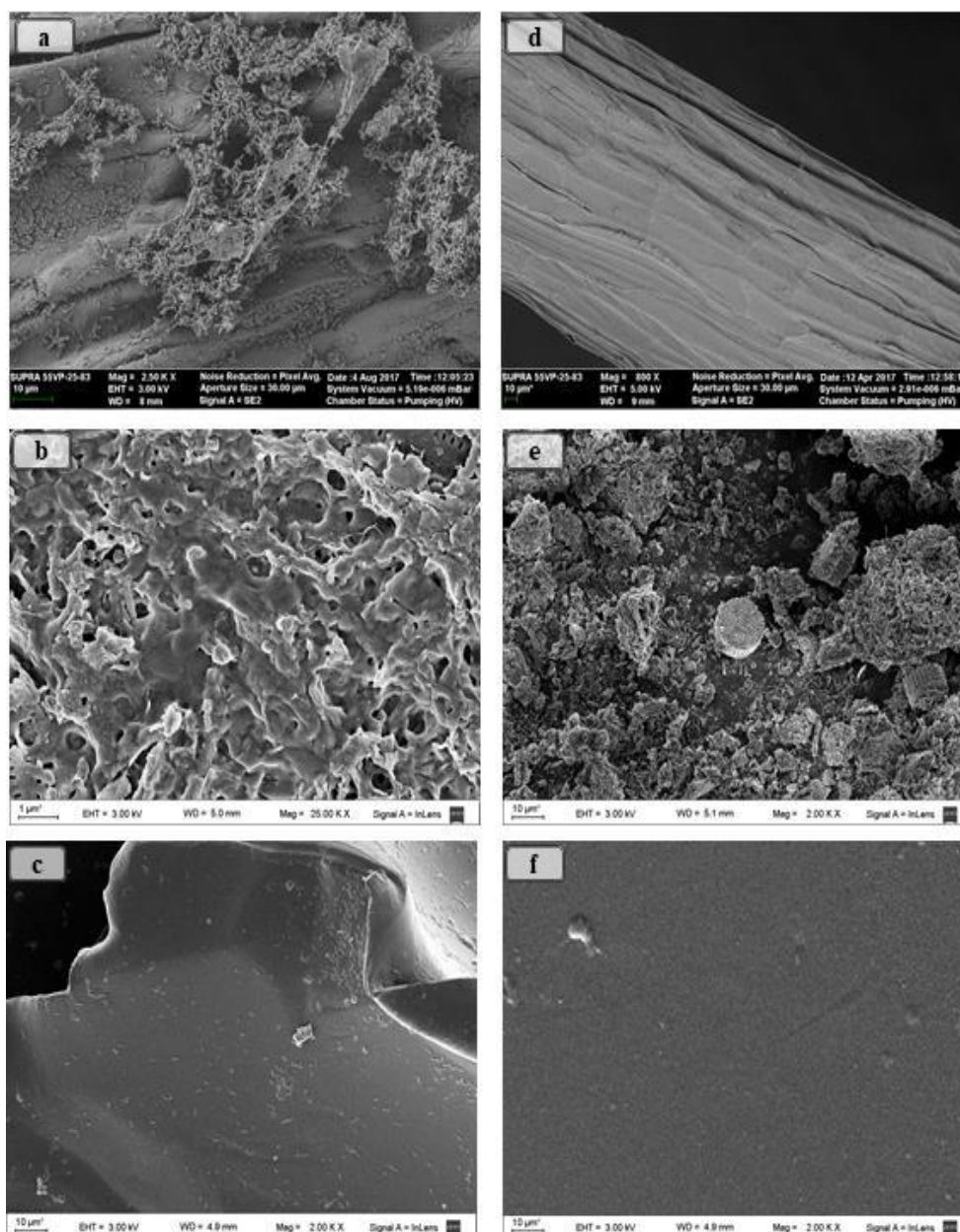


Figura 39. Análisis de la BI por SEM: a: EV, b: PS, c: PP con biomasa inmovilizada y d: EV, e: PS y f: PP sin la biomasa adherida.

Cinéticas de biosorción de Cu(II) por la biomasa inmovilizada en reactores Batch

A continuación se muestran los resultados más relevantes de la retención de Cu(II) por la biomasa inmovilizada (BI). Se puede observar en la **Figura 40**, **Figura 41** y **Figura 42**, el Cu(II) residual en función del tiempo cada ensayo con sus respectivos controles abióticos.

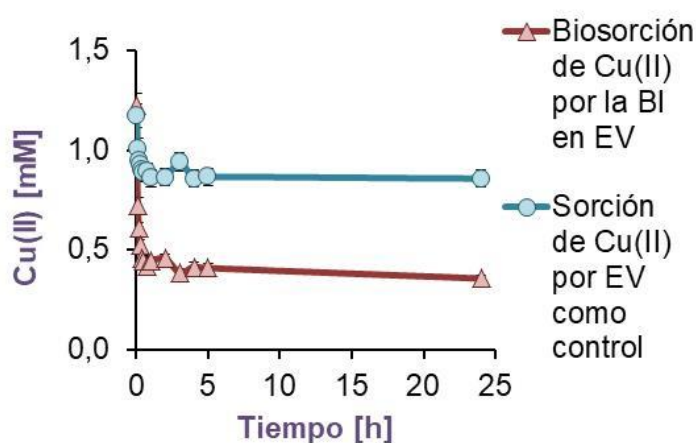


Figura 40. Biosorción de Cu(II) por la BI en EV a 32 °C bajo agitación.

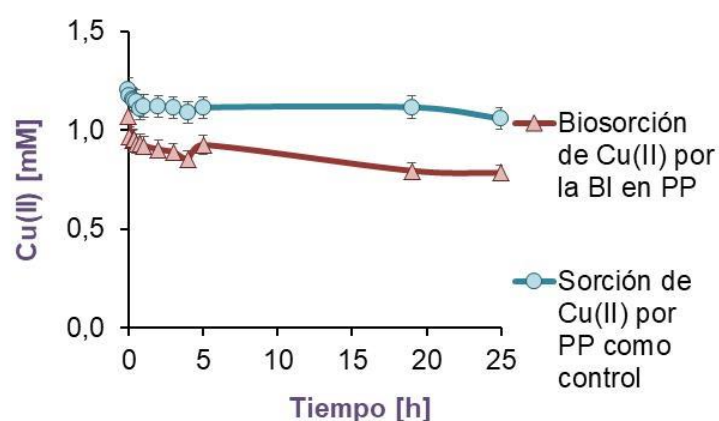


Figura 41. Biosorción de Cu(II) por la BI en PP a 32 °C bajo agitación.

Como puede observarse en la **Figura 40** y **Figura 41**, la concentración de cobre residual obtenida por la BI y la matriz ($(0,36 \pm 0,01)$ mM y $(0,79 \pm 0,01)$ mM) fue menor que la del soporte libre de biomasa siendo de $0,866 \pm 0,004$ mM y $1,12 \pm 0,02$ mM para EV y PP respectivamente. Esto se corresponde con un porcentaje de biosorción de $(71 \pm 2)\%$ y $(33 \pm 1)\%$ para la BI y la matriz vs. $(27 \pm 2)\%$ y $(7 \pm 1)\%$ del soporte sin biomasa, para EV y PP respectivamente, evidenciando la influencia bacteriana sobre la biosorción de cobre. El grupo de investigación de Verma (2013) obtuvo resultados similares estudiando la biosorción de cobre por *Penicillium citrinum* inmovilizado en alginato de calcio. En este estudio, la biosorción evaluada fue 76,2% pero usando una concentración del metal seis veces menor. Los resultados de biosorción obtenidos en la **Figura 40** y **Figura 41** se corresponden con los hallados en el estudio de la biomasa inmovilizada en los diferentes soportes, en donde la bacteria pudo colonizar exitosamente la superficie completa de la esponja de *luffa*, mientras que en PP

sólo creció en los pliegues del mismo. Debido a esto, es esperable que la BI en EV presentara la mayor biosorción y en PP los valores sean notoriamente más bajos.

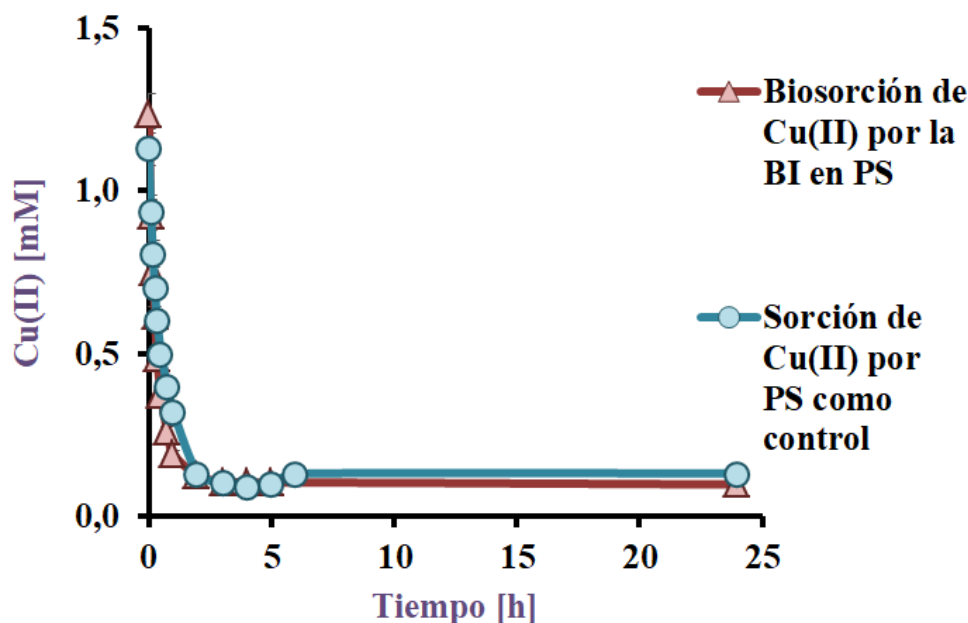


Figura 42. Biosorción de Cu(II) por la BI en PS a 32 °C bajo agitación.

En la **Figura 42** se observa una concentración residual de $(0,10 \pm 0,03)$ mM y $(0,132 \pm 0,004)$ mM. Esto se corresponde con un porcentaje de biosorción del $(92 \pm 2)\%$ y $(91,4 \pm 0,3)\%$ para la BI en PS y por la matriz sin biomasa respectivamente. A pesar de que en este sistema se obtuvo la retención de cobre más alta, prácticamente la totalidad de la retención del metal ocurre por la PS. Además, las partículas de diatomitas se disgregan quedando como un fino polvo en suspensión durante el experimento, haciendo este método inadecuado para el propósito establecido.

A modo de conclusión, se puede decir que efectivamente la EV fue la matriz más apropiada para inmovilizar *P. veronii* 2E, ya que la bacteria pudo colonizar enteramente la superficie de la matriz con una alta retención $(71 \pm 2\%)$. Incluso, estos valores de biosorción son más altos que los obtenidos en otros trabajos como el de Tsekova (2010) que lograron una retención del 34,4% del metal. Por lo tanto, los ensayos siguientes fueron continuados sólo con la BI en esponja de *luffa*. Cabe destacar que en todos los casos, la biosorción ocurre sorprendentemente rápido, obteniendo la mayor cantidad del metal a las 3 h, esto tiene una significancia práctica para un proceso de biorremediación.

Los resultados de la biosorción de la BI en las diferentes matrices se resumen en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Biosorción de cobre por la BI en diferentes matrices.

<i>Matrices</i>	<i>Ci Cu(II) [mM]</i>	<i>Cf Cu(II) [mM]</i>	<i>q [mmol/g]</i>	<i>mmol Cu(II) residuales</i>	<i>% Biosorción</i>
BI en EV	1,25±0,01	0,36±0,001	0,056±0,001	0,018±0,001	71±2
EV (Control)	1,19±0,02	0,866±0,004	0,041±0,004	0,0433±0,0002	27±2
BI en PP	1,186±0,001	0,79±0,01	0,032±0,001	0,040±0,001	33±1
PP (Control)	1,20±0,01	1,12±0,02	0,007±0,001	0,056±0,001	7±1
BI en PS	1,25±0,02	0,10±0,03	0,0458±0,0002	0,005±0,001	92±2
PS (Control)	1,16±0,01	0,132±0,004	0,0417±0,0003	0,0066±0,0002	91,4±0,3

Cinéticas de biosorción de Cu(II) en reactores continuos

Para el estudio de biosorción de cobre en reactores continuo, se diseñó por un lado, un reactor continuo con recirculación (Rrc) y por otro lado tres reactores que operan de manera continua (Rs). Ambos fueron cargados con la biomasa inmovilizada en EV y se las enfrentó a 200 mL de un efluente modelo conteniendo 1 mM de Cu(II) bajo las condiciones anteriormente mencionadas. Los resultados se muestran en la **Figura 43** y **Figura 44**, donde para el Rrc se observa una concentración de cobre residual de $(0,67 \pm 0,04)$ mM y $(0,23 \pm 0,02)$ mM a las 24 y 216 h respectivamente. Esto se corresponde con un $(33 \pm 5)\%$ y $(77 \pm 2)\%$ de biosorción correspondiente a la BI y la EV, de los cuales el 27% y 50% corresponde solamente a la biosorción por parte de la biomasa a 1 y 9 días respectivamente.

Para el Rs, se midió la cantidad de cobre en mmol, a la salida de cada reactor y en el efluente, obteniéndose $(0,04 \pm 0,01)$, $(0,025 \pm 0,003)$, $(0,013 \pm 0,001)$ y $(0,038 \pm 0,001)$ mmol de Cu(II) para el reactor 1, 2, 3 y efluente respectivamente. Se calcularon los mmol de cobre biosorbidos por diferencia entre los mmol iniciales (cantidad de cobre en el afluente) y residuales, obteniéndose un total de 0,154 mmol, cantidad de metal que se corresponde con un porcentaje de biosorción del $(56 \pm 7)\%$ a las 24 h. El grupo de trabajo de Liu (2013), reportó resultados similares con un porcentaje de biosorción del 55,4% pero usando una concentración inicial menor de cobre (0,79 mM).

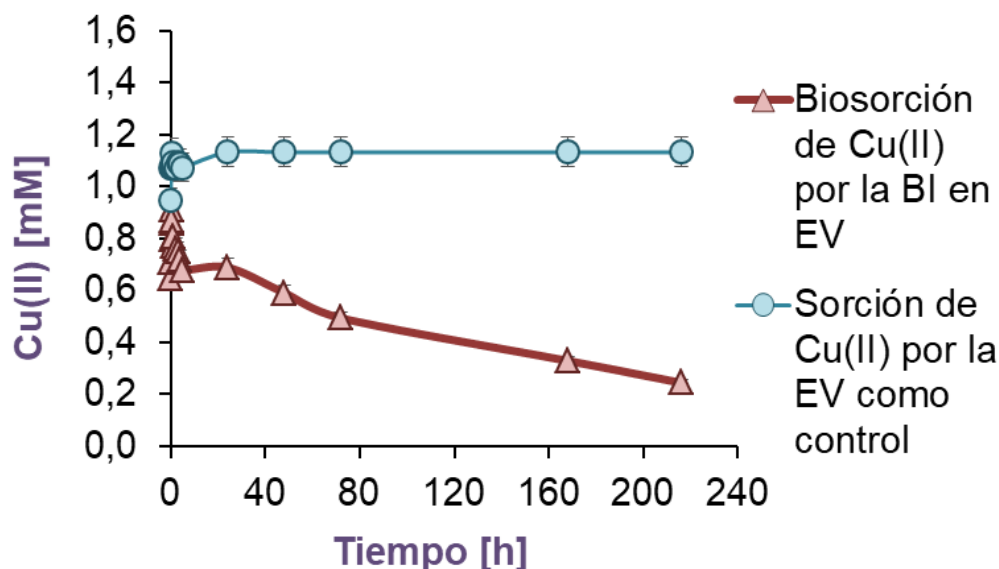


Figura 43 Biosorción de Cu(II) por la BI en EV, a 32 °C en un volumen final de 200 mL por 9 días, en un biorreactor continuo con recirculación. La concentración del metal medida en el sobrenadante se observa en rojo por la BI sobre la matriz y en azul la biosorción correspondiente a la matriz sola como control.

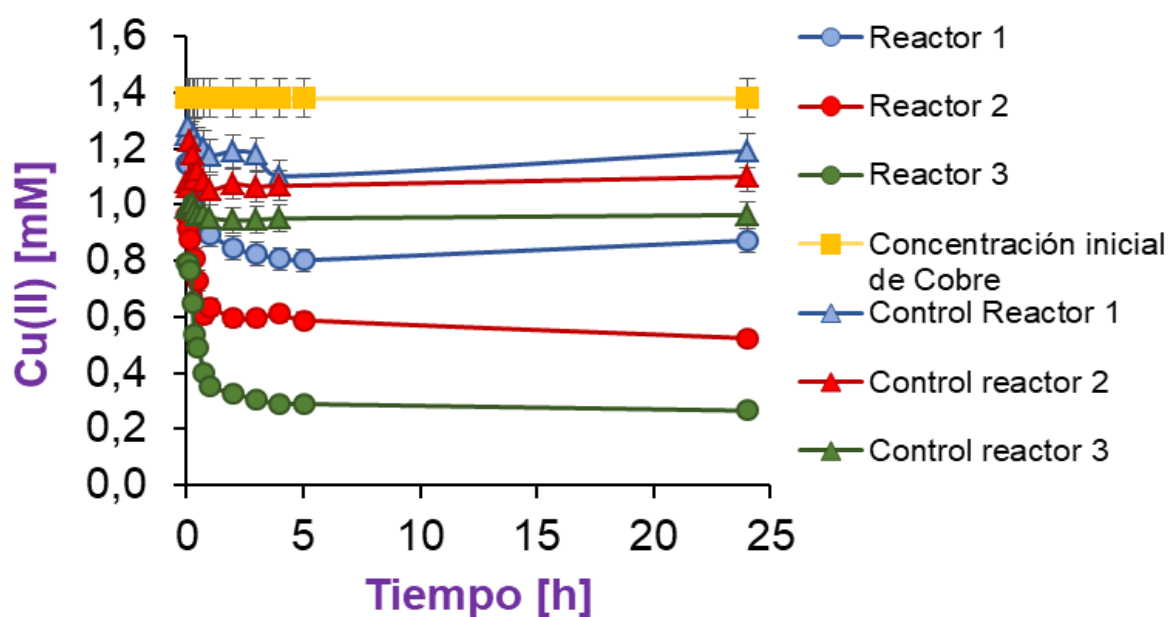


Figura 44. Biosorción de Cu(II) por la BI en EV a 32 °C en un volumen final de 200 mL en tres reactores continuos durante 24 h. En (●) se muestra la concentración residual de metal para el reactor 1 (en azul), para el reactor dos (en rojo) y para el reactor 3 (en verde). Los controles (Δ) con sus respectivos colores y la concentración inicial de metal en amarillo.

A pesar de que los resultados muestran una biosorción de cobre mayor en el Rs comparado con el Rrc a las 24 h ((56 ± 7) % vs. (33 ± 5)), el Rs contenía una mayor biomasa inmovilizada. Para evaluar cuál de los sistemas era el más eficiente, se comparó la capacidad normal de biosorción de un sistema q' en ambos reactores, Rrc y Rs, a las 24 h. Así, q' se calcula de acuerdo con la **Ecuación 6**.

$$q' = \frac{q}{nt} \quad (6)$$

Donde q es el número de sitios ocupados y nt es la cantidad inicial de Cu(II) en mmol.

En este sentido, es posible comparar la capacidad normal de biosorción de Cu(II) de cada sistema, independientemente de la cantidad de biomasa y metal con el que trabaja. Los resultados de q' fueron 0,34 y 0,43 g⁻¹ para Rs y Rrc respectivamente. Para una mayor comprensión sobre el rendimiento de Rs, se evaluó un balance de masa teniendo en cuenta que la cuantificación del metal se centró en Cu(II) residual. Para este propósito, se midió el cobre en el sobrenadante a la salida de cada reactor y en el reservorio del efluente tratado como se mencionó anteriormente. Al integrar el balance de masa con los valores de q' , se podría concluir que el reactor con recirculación es más eficiente que 3 reactores conectados en serie, uno secuencialmente después del otro. Un punto interesante para profundizar en este análisis sería determinar la biosorción de Cu(II) mediada por la BI en los reactores conectados en serie, agregando una recirculación del efluente de 1 a 9 días y compararlo nuevamente con el Rrc. En las **Tabla 13** y **Tabla 14** se resumen los resultados de la biosorción de cobre obtenidos por la BI en EV en ambos reactores.

Tabla 13. Biosorción de cobre mediada por la BI en Rs

BI en EV en Rs				
	[mM]	mmol Cu(II) sobrenadante	q	%Cu residual
Reactor 1	0,9±0,3	0,04±0,01	0,05±0,02	16±4
Reactor 2	0,5±0,1	0,025±0,003	0,08±0,01	10±2
Reactor 3	0,27±0,01	0,013±0,001	0,10±0,01	5±1
Afluente	1,4±0,1	0,28±0,02	-	100
Efluente	0,77±0,02	0,038±0,001	-	13,2±0,3

Tabla 14. Biosorción de cobre mediada por la BI en Rrc.

BI en EV en Rrc				
Tiempo [h]	[mM]	mmol Cu(II) sobrenadante	q	%Biosorción de Cu
24	0,67±0,04	0,133±0,009	0,08±0,01	33±5
48	0,56±0,06	0,11±0,01	0,11±0,02	43±6
72	0,47±0,02	0,095±0,005	0,13±0,05	52±2
168	0,33±0,02	0,065±0,005	0,167±0,003	67±2
216	0,23±0,02	0,046±0,004	0,191±0,004	77±2

Ensayos de desorción de cobre por la biomasa inmovilizada en reactores batch

Para la desorción de cobre por la BI, los ensayos se basaron en los mejores resultados obtenidos en el Capítulo 1 (0,075 M de HCl). Las desorciones de cobre por la BI en cada soporte se expresan en concentración de cobre residual obtenida en función del número de ciclos realizados y se muestran en la **Figura 45**, **Figura 46** y **Figura 47**. En

las mismas, se puede observar un patrón similar de desorción en la cual la cantidad de cobre recuperado desciende desde el primer al tercer ciclo. Este patrón de cobre recuperado en función de los ciclos realizados es idéntico al obtenido para la desorción por la BL en el Capítulo 1.

En la **Figura 45** se visualiza una cantidad de Cu(II) en el sobrenadante de $(0,026 \pm 0,001)$, $(0,0083 \pm 0,0002)$ y $(0,0021 \pm 0,0001)$ mmol, correspondiendo a un porcentaje de recuperación de cobre de $(54 \pm 4)\%$, $(17,5 \pm 0,8)\%$ y $(4,3 \pm 0,4)\%$ para el primer, segundo y tercer ciclo. Mientras que en la **Figura 46** se observa una cantidad de Cu(II) de $(0,0164 \pm 0,0002)$, $(0,00544 \pm 0,00001)$ y $(0,00262 \pm 0,00007)$ mmol, esta cantidad de metal obtenido se corresponde con un porcentaje de recuperación del $(82 \pm 8)\%$, $(27 \pm 2)\%$ y $(13,0 \pm 0,7)\%$ para el primer, segundo y tercer ciclo. Por último, en la **Figura 47** se obtuvo $(0,0270 \pm 0,0002)$, $(0,0113 \pm 0,0002)$ y $(0,00566 \pm 0,00002)$ mmol, siendo los porcentajes de recuperación $(46,8 \pm 0,2)\%$, $(19,6 \pm 0,3)\%$ y $(9,81 \pm 0,01)\%$ para el primer, segundo y tercer ciclo. De esta manera, se obtuvo una recuperación total de cobre de $(76 \pm 5)\%$, $(100 \pm 11)\%$ y $(76,3 \pm 0,5)\%$ para la BI en EV, PP y PS respectivamente.

El grupo de trabajo de Akhtar (2004) obtuvo resultados similares, el 98% de desorción de Ni(II) (10 mg/L) por *Chlorella sorokiniana* inmovilizada en esponja de *luffa*, mientras que con la misma matriz mostraron un $(76 \pm 5)\%$ de desorción de Cu(II). Aunque el porcentaje de recuperación de metal obtenido en este estudio es menor al que reporta Akhtar, es válido mencionar que la concentración de metal inicial usada en este ensayo fue seis veces mayor que la de su grupo de investigación, lo que confirma que el agente de desorción usado es adecuado para este sistema. Desafortunadamente, si bien en la literatura Ni et al. (2012) se registran experimentos de desorción de metales, sus datos son insuficientes para comparar y asegurar la viabilidad del método desarrollado en este trabajo para Cu(II).

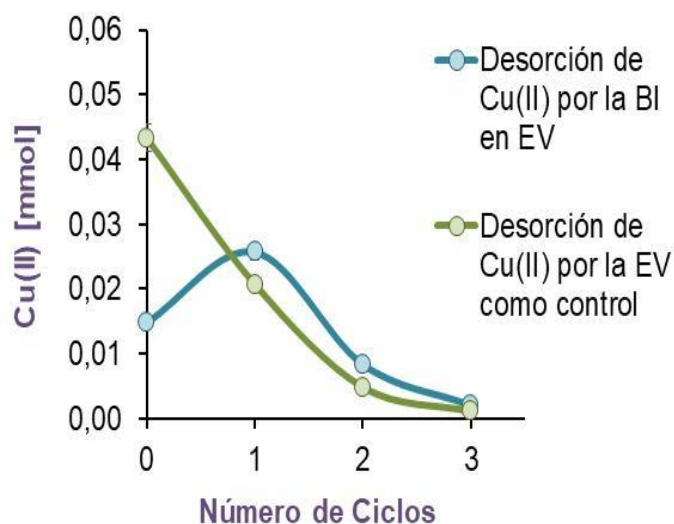


Figura 45. Desorción de Cu(II) retenida en la BI en EV en azul y su correspondiente control (EV) en verde a 32 °C, bajo agitación.

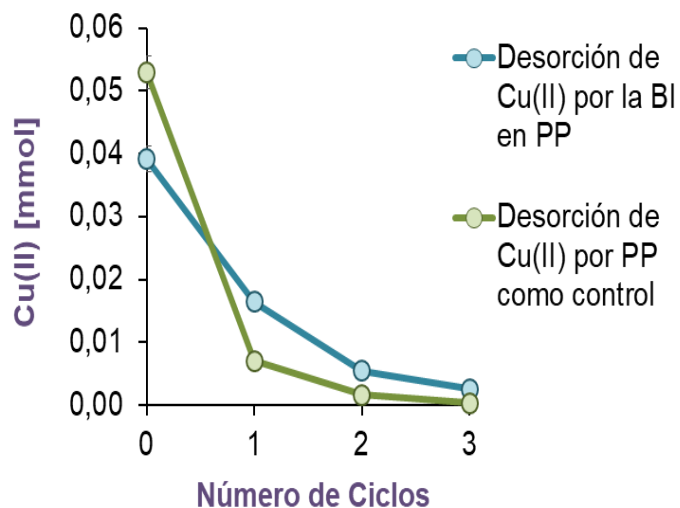


Figura 46. Desorción de Cu(II) retenida en la BI en PP en azul y su correspondiente control (PP) en verde a 32 °C, bajo agitación.

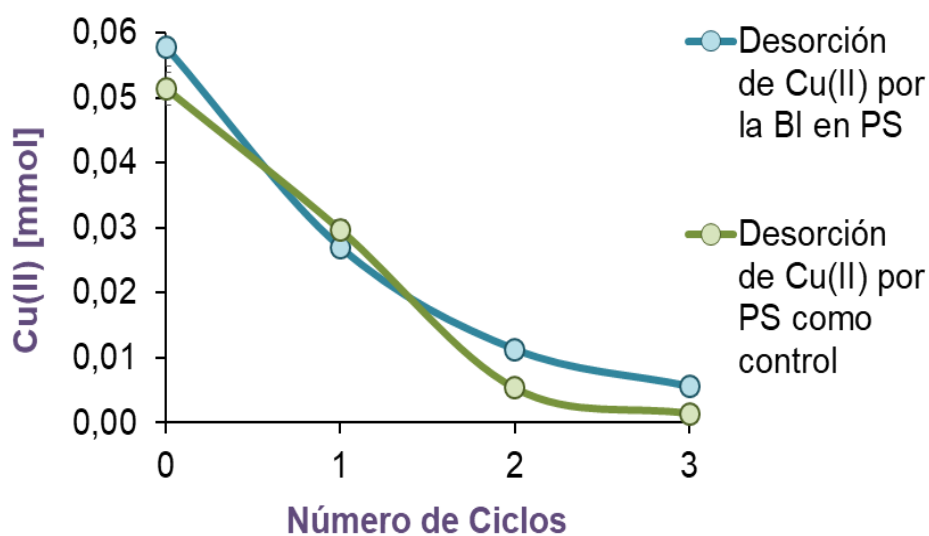


Figura 47. Desorción de Cu(II) retenida en la BI en PS en azul y su correspondiente control (PS) en verde a 32 °C, bajo agitación.

Los resultados de desorción de Cu(II) retenida en la BI en los diferentes soportes se resumen en **Tabla 15**, **Tabla 16** y **Tabla 17**.

Tabla 15. Desorción de cobre retenida en la BI en EV y su control en reactor *batch*.

	BI en EV			EV (Control)		
	[mM]	mmol Cu(II) sobrenadante	% Desorción	[mM]	mmol Cu(II) sobrenadante	% Desorción
Ciclo 1	1,51±0,08	0,026±0,001	54±4	1,25±0,01	0,016±0,001	100±11
Ciclo 2	0,49±0,01	0,0083±0,0002	17,5±0,8	-	-	-
Ciclo 3	0,12±0,01	0,0021±0,0001	4,3±0,4	-	-	-

Tabla 16. Desorción de cobre retenida en la BI en PP y su control en reactor *batch*.

	BI en PP			PP (Control)		
	[mM]	mmol Cu(II) sobrenadante	% Desorción	[mM]	mmol Cu(II) sobrenadante	% Desorción
Ciclo 1	0,97±0,01	0,0164±0,0002	82±8	0,414±0,001	0,00704±0,00002	100,0±0,2
Ciclo 2	0,320±0,001	0,00544±0,00001	15±2	-	-	-
Ciclo 3	0,154±0,004	0,00262±0,00007	3,0±0,7	-	-	-

Tabla 17. Desorción de cobre retenida en la BI en PS y su control en reactor *batch*.

	BI en PS			PS (Control)		
	[mM]	mmol Cu(II) sobrenadante	% Desorción	[mM]	mmol Cu(II) sobrenadante	% Desorción
Ciclo 1	2,16±0,01	0,0270±0,0002	46,8±0,2	2,12±0,01	0,0265±0,0003	51,5±0,9
Ciclo 2	0,91±0,02	0,0113±0,0002	19,6±0,3	0,894±0,001	0,01117±0,00001	21,7±0,1
Ciclo 3	0,453±0,001	0,00566±0,00002	9,81±0,01	0,445±0,006	0,00556±0,00007	10,8±0,2

Desorción de Cobre por la biomasa inmovilizada en reactores continuos

Para el Rrc y Rs, como el volumen del efluente modelo fue de 200 mL, la desorción se llevó a cabo en un volumen final de 80 mL de desorbente 0,075 M, discriminando la desorción de la matriz libre de biomasa. Los resultados de desorción para el Rrc se muestran en la **Figura 48**, donde se puede observar la máxima concentración desorbida a los 60 minutos, siendo una desorción caso total (96 ± 2 %).

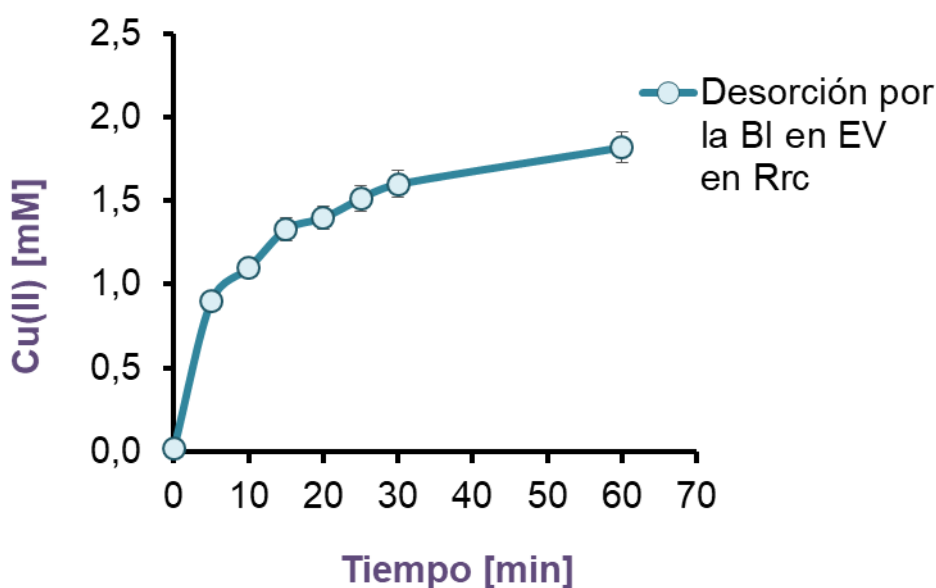


Figura 48. Desorción de Cu(II) retenida en la BI en EV en un reactor con recirculación a 32 °C.

En la **Tabla 18** se muestra un resumen de los resultados de desorción obtenidos por la BI en EV en Rrc hasta los 60 min completando la desorción a los 90 min. Estos porcentajes de recuperación son mayores al obtenido con BL en 30 min ($54 \pm 4\%$). Para Rs, los resultados se compilaron en la **Tabla 19**, en donde se muestra la desorción de cobre obtenida por la BI y la EV fue del ($48 \pm 1\%$).

Tabla 18. Desorción de cobre retenida en la BI en EV en Rrc.

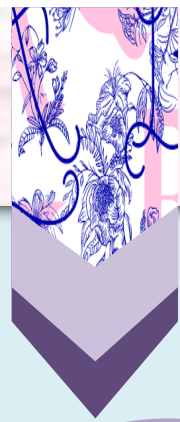
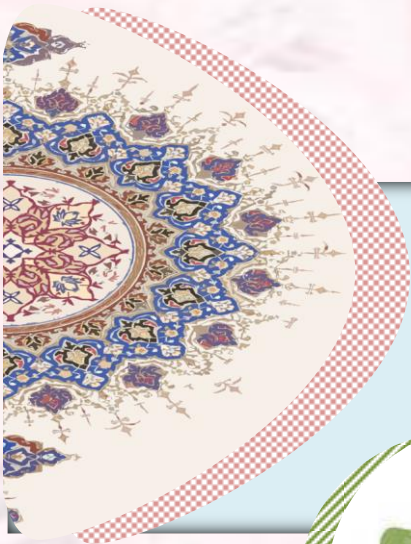
BI en EV en Rrc			
Tiempo [min]	[mM]	mmol Cu(II) residual	% Desorción
5	0,85±0,07	0,07±0,01	45±4
10	1,10±0,08	0,09±0,01	58±6
15	1,33±0,05	0,106±0,004	71±4
20	1,4±0,1	0,11±0,01	74±8
25	1,51±0,09	0,12±0,01	80±7
30	1,60±0,05	0,128±0,004	85±5
60	1,82±0,07	0,15±0,01	96±2

Tabla 19. Biosorción / Desorción de cobre por la BI en EV en Rs.

	Cu Inicial [mmol]	Cu adsorbido [mmol]	Cu desorbido [mmol]	Cu(II) porcentaje adsorbido	Cu(II) porcentaje desorbido
BI + EV	0,28±0,02	0,15±0,02	0,074±0,002	56±7	48±1

Evidentemente, los porcentajes bajos de desorción en Rs podrían estar asociados a un tiempo de contacto insuficiente entre el sistema y el desorbente. Esta conclusión se basa en los resultados obtenidos en Rcr, donde BI en EV pudo desorber casi todo el Cu(II) retenido (96 ± 2) %.

CONCLUSIONES



Conclusiones

En este segundo capítulo de tesis, se estudió la inmovilización de *Pseudomonas veronii* 2E en diferentes soportes: esponja de *luffa* (EV), piedra pómez (PP) y piedras sanitarias (PS), en las cuales la bacteria pudo adherirse exitosamente.

Una vez inmovilizada la biomasa, se evaluó el soporte más adecuado para un biotratamiento de remediación de cobre de un efluente modelo. A través de estudios de Microscopía de Barrido Electrónico (SEM), se pudo estudiar el crecimiento de la biomasa sobre cada superficie, y se halló que *P. veronii* 2E pudo colonizar mejor la superficie de la esponja de *luffa*. Estos resultados se correspondieron con las diferencias de biosorción obtenidas por la BI en cada matriz, en donde la mayor retención de cobre se obtuvo para este sistema alcanzando un porcentaje de biosorción del $(71 \pm 2)\%$ en 24 h. Además de la cantidad de BI, la esponja de *luffa* presentó mayor resistencia mecánica, a diferencia de las PS que se disgregaron en medio acuoso a las 24 h. Otro criterio que se tuvo en cuenta para su elección, es la mayor porosidad de esta matriz cuando se la compara por ejemplo con PP en la que la biomasa sólo pudo crecer en los pliegues de la superficie a diferencia de lo que ocurrió con EV en donde la trama de la matriz permitió el desarrollo del *biofilm* en la totalidad de su superficie. Así, se determinó que la matriz más adecuada para el crecimiento de *Pseudomonas veronii* 2E fue la esponja de *luffa*, soporte que se utilizó para el resto de los ensayos.

Por otro lado, se evidenció la capacidad tanto de la bacteria como de cada matriz de desorber cobre, usando la concentración de desorbente en la que se obtuvo la mayor recuperación del metal en el Capítulo 1. Así, se concluyó que el HCl es un desorbente eficaz para los sistemas ensayados ya que se obtuvieron buenos porcentajes de desorción de cobre por la BI en cada matriz, obteniendo una recuperación de metal del $(54 \pm 4)\%$, $(82 \pm 8)\%$ y $(46,8 \pm 0,5)\%$ para la BI en EV, PP y PS respectivamente.

Uno de los objetivos que se plantean en la introducción general, es poder utilizar este tipo de biotratamiento a escala industrial. Si bien previamente se necesitan los ensayos a escala laboratorio, es imperativo que haya un proceso con continuidad para facilitar la remediación del efluente. Esto se debe a que si se opera en *batch* implicaría un llenado del reactor a volúmenes muy grandes, seguido de un vaciado del reactor al finalizar cada etapa lo que incrementaría enormemente los tiempos de tratamiento, costos energéticos, mano de obra, etc. Por ello, para lograr un óptimo diseño del

biotratamiento, se construyeron dos reactores que operan de manera continua. Por un lado, se construyó un reactor continuo con recirculación del efluente (Rrc) y, por otro lado, se construyeron tres reactores continuos conectados en serie (Rs). A pesar de que los resultados obtenidos mostraron una biosorción de cobre del $(33 \pm 5)\%$ y $(55,8\%)$ para Rrc y Rs respectivamente, se demostró que un reactor con recirculación es un diseño más eficiente tanto para el proceso de biosorción como para la recuperación del metal, siendo la capacidad normal de biosorción de Cu(II) de cada sistema (q') de $0,34$ y $0,43 \text{ g}^{-1}$ para Rs y Rrc respectivamente. También, en este tipo de diseño (Rrc), el tiempo de contacto entre el sobrenadante y la BI en EV es mayor, permitiendo una desorción casi completa del metal. Este objetivo no se pudo alcanzar con este mismo sistema en Rs, obteniéndose una recuperación de cobre del $(34)\%$ y $(96 \pm 2) \%$ para Rs y Rrc respectivamente.

Al comparar los resultados de biosorción obtenidos por la BI en EV en Rrc y reactor *batch*, es interesante destacar que, aunque la retención de cobre fue mayor en el reactor *batch* que en continuo $(71 \pm 2)\%$ vs. $(33 \pm 5)\%$ a las 24 h, este último tiene más de 3 veces la cantidad de metal que el primero, y, si observamos el resultado de retención de cobre a los 9 días en el Rrc, se obtuvo un porcentaje de biosorción del $(78,2 \pm 0,6)\%$ usando la misma cantidad de biomasa en ambos reactores. Esta conclusión es extremadamente valiosa, ya que implica mayores retenciones del metal sin ningún tipo de modificación del sistema.

Así, al inmovilizar la biomasa, se mantuvo una elevada biosorción de metal, pero con la ventaja de una mayor facilidad de la separación biomasa–efluente tratado, sin pasos posteriores como por ejemplo una centrifugación, minimizando los costos y abriendo la posibilidad de reutilizar el sistema.

A pesar de las numerosas ventajas presentadas a lo largo de este capítulo, hay que mencionar que este tipo de biotratamiento tiene sus limitaciones como tasas más lentas en la remoción de metales de los efluentes en comparación con los métodos físicos y químicos. Sin embargo, no se debe descartar la ventaja de este proceso al ser más económica, ya que no hay dependencia de un metabolismo bacteriano activo respaldado por una matriz económica, y la posibilidad de reutilización. Además, este proceso no genera efluentes secundarios como si lo hacen los procedimientos fisicoquímicos, convirtiéndose en una alternativa ecológica y, por lo tanto, una tecnología sostenible para eliminar el cobre de manera eficiente.

Es necesario mencionar que, a la hora de remediar efluentes reales, hay que tener en cuenta la elevada posibilidad de hallar presencia de ligandos metálicos, por lo que se esperaría que la capacidad complejante disminuya la disponibilidad de metales entre otras interferencias. Es por este motivo, no se debe ignorar la enorme complejidad que un efluente real representa, por lo que se vuelve imperativo un estudio más profundo, a través del análisis y su caracterización posterior.

Este capítulo constituye un paso necesario y fundamental para el diseño de un biotratamiento eficiente y económico, ya que además de las ventajas explicadas en el Capítulo 1, se solventa la limitación del uso de biomasa libre mediante la inmovilización de la misma.



REFERENCIAS



Referencias

- 1) Ahmad Ashfaq, Bhat A. H., and Buang Azizul. “Biosorption of transition metals by freely suspended and Ca-alginate immobilised with *Chlorella vulgaris*: kinetic and equilibrium modeling.” *Journal of Cleaner Production* 171: 1361–75, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.09.252>
- 2) Akhtar N, Iqbal J., and Iqbal M. “Removal and recovery of nickel(II) from aqueous solution by *Luffa*-sponge-immobilized biomass of *Chlorella sorokiniana*: Characterization studies.” *Journal of Hazardous Materials* 108 (1–2): 85–94, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2004.01.002>
- 3) Botello Suárez Wilmar Alirio, Ortiz Varón Juan Camilo, and Peña Perea Sergio Andrés. “Inmovilización microbiana en polímeros sintéticos para el tratamiento de aguas residuales.” *Nova* 14, no. 26: 93, 2016. <https://doi.org/10.22490/24629448.1755>
- 4) Britos Claudia. “Bioprocesos con microorganismos inmovilizados en polímeros macroporosos.” Universidad Nacional de Quilmes, 2013. <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/789>.
- 5) Dobrowolski Ryszard, Krzyszczak Agnieszka, Dobrzyńska Joanna, Podkościelna Beata, Zięba Emil, Czemińska Magdalena, Jarosz-Wilkołazka Anna, and Stefaniak Elżbieta Anna. “Extracellular Polymeric Substances immobilized on microspheres for removal of heavy metals from aqueous environment.” *Biochemical Engineering Journal*. 143: 202–11, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.01.004>
- 6) Fajardo-Ochoa Raúl, Osuna-Castro Juan Alberto, VillaVelázquez-Mendoza Carlos, Escalante-Minakata Pilar and Ibarra-Junquera Vrani. “Inmovilización de células y enzimas.” *Revista Científica de La Universidad Autónoma de Coahuila*. 3, no. 6: 42–56, 2011. <http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/divulgacionAQM.html>.
- 7) Figueroa-Torres G. M., Certucha-Barragán M. T., Acedo-Félix E., Monge-Amaya O., Almendariz-Tapia F. J., and Gasca-Estefanía L. A. “Kinetic studies of heavy metals biosorption by acidogenic biomass immobilized in clinoptilolite.” *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 61: 241–46, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jtice.2015.12.018>.

- 8) Garzón-Jiménez Catherine, and Barragán-Huerta Blanca Estela. “Inmovilización microbiana: Técnicas y usos en el tratamiento de residuos tóxicos.” 2 (1): 23–34, 2008.
https://virtual.unju.edu.ar/pluginfile.php/252460/mod_resource/content/1/Inmovilizacion_microbiana.pdf
- 9) Kumar Rajender, Bhatia Divya, Singh Rajesh, Rani Suman, and Bishnoi Narsi R. “Sorption of heavy metals from electroplating effluent using immobilized biomass *Trichoderma viride* in a continuous packed-bed column.” *International Biodeterioration and Biodegradation* 65 (8): 1133–39, 2011.
<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.09.003>
- 10) Liu Yun Guo, Liao Ting, He Zhong Bing, Li Ting Ting, Wang Hui, Hu Xin Jiang, Guo Yi Ming, and He Yuan. “Biosorption of copper(II) from aqueous solution by *Bacillus subtilis* cells immobilized into chitosan beads.” *Transactions of Nonferrous Metals Society of China (English Edition)* 23 (6): 1804–14, 2013.
[https://doi.org/10.1016/S1003-6326\(13\)62664-3](https://doi.org/10.1016/S1003-6326(13)62664-3)
- 11) Manal T., and Ashraf S.A. “Bioremediation and tolerance of zinc ions using *fusarium solani*.” *Heliyon* 6 (9): e05048 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05048>
- 12) Manzoor Qaisar, Sajid Arfaa, Hussain Tariq, Iqbal Munawar, Abbas Mazhar, and Nisar Jan. “Efficiency of immobilized zeo mays biomass for the adsorption of chromium from simulated media and tannery wastewater.” *Journal of Materials Research and Technology* 8 (1): 75–86, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2017.05.016>
- 13) Martínez-Sánchez Carolina, Torres-Rodríguez Luz María, Velázquez-Jiménez Litza Halla, Sustaita-Martínez Jesús Israel, and García-de la Cruz Ramón Fernando. “Use of carbon paste electrode modified with biomass for studying the equilibria, kinetics, and proton exchange processes associated with bioaccumulation.” *Electroanalysis* 24 (5): 1121–28, 2012.
<https://doi.org/10.1002/elan.201200052>
- 14) Ni, Hong, Xiong Zhe, Ye Ting, Zhang Zhen, Ma Xiaofeng, and Li Lin. “Biosorption of copper(II) from aqueous solutions using volcanic rock matrix-immobilized *Pseudomonas Putida* cells with surface-displayed cyanobacterial metallothioneins.” *Chemical Engineering Journal* 204–205: 264–71, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.05.029>

- 15) Pérez García Cristian Camilo. “Materiales usados como matrices de inmovilización para microorganismo de interés ambiental.”, 2015
<http://hdl.handle.net/1992/17305>
- 16) Przysaś, Wioletta, Zabłocka-Godlewska Ewa, and Grabińska-Sota Elżbieta. “Efficiency of decolorization of different dyes using fungal biomass immobilized on different solid supports.” *Brazilian Journal of Microbiology* 49 (2): 285–95, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2017.06.010>
- 17) Ramteke Lokeshkumar P., and Gogate Parag R. “Treatment of water containing heavy metals using a novel approach of immobilized modified sludge biomass based adsorbents.” *Separation and Purification Technology* 163: 215–27, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2016.02.047>
- 18) Rangabhashiyam, S., and Vijayaraghavan K. “Biosorption of Tm(III) by free and polysulfone-immobilized turbinaria conoides biomass.” *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 80: 318–24, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.jiec.2019.08.010>
- 19) Reyes-Reyes, María Andrea, Puentes-Cala Edinson Andrés, Casanova-Montes Eder Leonardo, López-Deluque Freddy, Panqueva-Álvarez Jorge Hernando, and Castillo-Villamizar Genis Andrés. “Immobilization of potentially crude oil degrading bacteria in synthetic and natural organic matrices.” *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental* 34 (4): 597–609, 2018.
<https://doi.org/10.20937/RICA.2018.34.04.04>
- 20) Tsekova K., Todorova D., Dencheva V., and Ganeva S.. “Biosorption of copper(II) and cadmium(II) from aqueous solutions by free and immobilized biomass of *Aspergillus niger*.” *Bioresource Technology* 101 (6): 1727–31, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.012>
- 21) Verma Anamika, Shalu, Anita Singh, Bishnoi Narsi R., and Gupta Asha. “Biosorption of Cu(II) using free and immobilized biomass of *Penicillium citrinum*.” *Ecological Engineering* 61: 486–90, 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.10.008>
- 22) Wang, Ting, and Sun Hongwen. “Biosorption of heavy metals from aqueous solution by UV-mutant *Bacillus subtilis*.” *Environmental Science and Pollution Research* 20 (10): 7450–63, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-1767-x>
- 23) Zhang, Baoyu, Ni Yaxin, Liu Junwei, Yan Tao, Zhu Xiaomin, Li Qing X., Hua Rimao, Pan Dandan, and Wu Xiangwei. “Bead-immobilized *Pseudomonas*

stutzeri Y2 prolongs functions to degrade s-triazine herbicides in industrial wastewater and maize fields.” *Science of the Total Environment* 731: 139183, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139183>



Capítulo III
Estudio de la
Interacción del
EPS bacteriano
con Cobre





INTRODUCCIÓN

Introducción

Las crecientes y continuas descargas de grandes cantidades de metales de relevancia ambiental (MRA) en el ecosistema y la necesidad de métodos de remoción ambientalmente amigables y sostenibles, ha impulsado la búsqueda de nuevos procedimientos para la remoción de estos compuestos. Desde este punto de vista, los procesos de biotratamientos biológicos basados en la biosorción y bioacumulación de MRA se presentan como tecnologías innovadoras más eficientes y ecológicamente amigables. Las sustancias poliméricas extracelulares (EPS) son un ejemplo del desarrollo de estrategias de supervivencia por las bacterias en ambientes contaminados con metales, por lo que las nuevas tecnologías buscan aprovechar este tipo de respuesta microbiana para su implementación en el desarrollo de biotratamiento de aguas residuales (Ferreira et al. 2017).

Definición de EPS

Algunos autores usan la abreviatura EPS como un término más general para representar diferentes tipos de macromoléculas tales como polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y otros componentes poliméricos presentes en el interior de varios agregados microbianos. Otros autores, proponen que todos los polímeros fuera de la superficie externa de la célula, que no están anclados directamente a ella, son EPS. Sin embargo, la gran mayoría de los reportes bibliográficos establecen que los EPS son principalmente secreciones de microorganismos de elevada masa molar y productos de lisis celular e hidrólisis de macromoléculas localizadas tanto en el exterior de las células como en el interior de agregados microbianos (Sheng, Yu, and Li 2010), que constituyen la forma de vida de la mayoría de los microorganismos, como los *biofilms* o bioflóculos (Cordoba Velandia 2011). Ésta última definición es la que se adoptará en esta tesis, denominando las sustancias poliméricas extracelulares como EPS.

Esta mezcla compleja de biopolímeros es producida tanto por agregados microbianos como los *biofilms*, bioflóculos y biogránulos como por una gran variedad de bacterias en estado planctónico incluyendo procariotas y eucariotas.

Tipos de sustancias poliméricas extracelulares

Existen diferentes criterios de clasificación de los exopolímeros microbianos; (Ferreira 2016) establece que independientemente de su origen, los EPS se pueden clasificar en:

EPS unido (EPSu): Si se encuentran unidos a la superficie de la célula.

EPS soluble (EPSs): Si se hallan suspendidos en el medio líquido circundante.

A esta definición, Sheng (2010) agrega que la estructura del EPSu generalmente se representa mediante un modelo de dos capas. La capa interna, que consiste de EPS fuertemente unido (FU-EPS o TB-EPS por sus siglas en inglés), tiene una forma determinada, está unida firmemente y de forma estable con la superficie de la célula. La capa exterior, por otro lado, consiste en EPS débilmente unido (DU-EPS o LB-EPS por sus siglas en inglés), una capa mucosa suelta y dispersable (Ver **Figura 49**). Además, Sheng (2010) establece que el DU-EPS en agregados microbianos es siempre menor que el de FU-EPS, y por lo tanto puede tener cierta influencia en las características de los agregados microbianos.

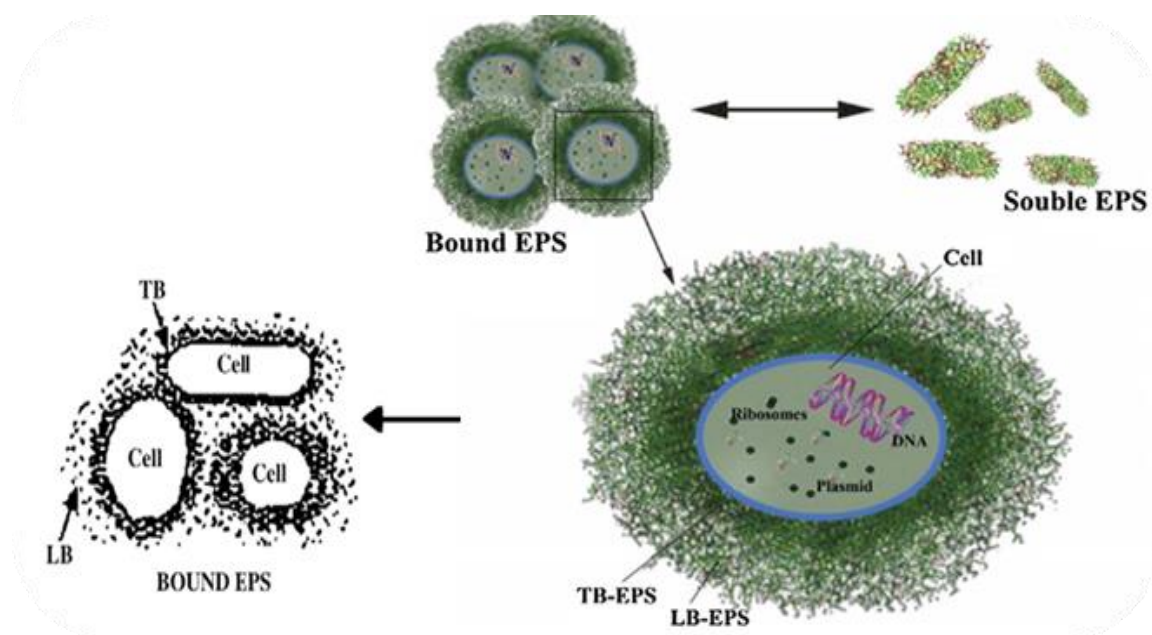


Figura 49. Esquema de los diferentes tipos de EPS bacteriano: EPS soluble, EPS fuertemente unido (TB) y débilmente unido (LB). (Imágenes extraídas de Alaba et al. 2018 y Sheng et al 2010).

Otros autores, como Cordoba Velandia (2011), clasifican los EPS en:

EPS extraíbles: Son aquellos que constituyen la fracción que se encuentran íntimamente ligada a la superficie de la célula. Aquí se incluyen macromoléculas solubles, coloides y las mucosas.

EPS solubles: Es la fracción que tiene la capacidad de moverse libremente entre los flóculos. Estos incluyen los polímeros capsulares, geles condensados, polímeros débilmente unidos y material orgánico adjunto (Cordoba Velandia 2011).

A lo largo de esta tesis se enfocará en las sustancias poliméricas extracelulares que no se encuentran unidas a las células y se referirán hacia ellas como EPSs o simplemente EPS.

Función de las sustancias poliméricas extracelulares

Los EPS cumplen funciones vitales dentro de los aglomerados microbianos, entre muchas de ellas, se puede mencionar: permiten la formación de una matriz tridimensional que mantiene a los microorganismos unidos, también intervienen en la adhesión del *biofilm* a la superficie o, ayudan a la retención de agua en casos de escasez (Cordoba Velandia 2011). Otra función importante es la acumulación de enzimas activas, como las involucradas en la digestión de macromoléculas exógenas, para adquisición de nutrientes cuando las condiciones del medio son hostiles, aumentando la posibilidad de supervivencia. Asimismo, estabilizan la estructura del *biofilm*, como es el caso del DNA extracelular, el cual demostró ser un componente fundamental ya que media la interacción célula-célula. De hecho, se ha demostrado que la remoción del DNA extracelular por un tratamiento con DNasa a etapas iniciales interfiere con la maduración del *biofilm*. Pero, en *biofilms* maduros, el mismo tratamiento mostró un leve impacto sobre la arquitectura del mismo (Ghafoor, Hay, and Rehm 2011). El EPS forma también, una barrera protectora que brinda resistencia a biocidas y otros agentes nocivos (Laspidou and Rittmann 2002). Por otro lado, permite a los microorganismos vivir continuamente en altas densidades celulares en comunidades estables de poblaciones mixtas. En otras palabras, la matriz del EPS es un medio que permite la cooperación y comunicación entre células en agregados microbianos. La adhesión y cohesión ocurre entre el EPS y la biomasa, entre otros sólidos suspendidos, por formación de complejos

originados por diferentes interacciones como fuerzas de London, interacciones electrostáticas y puente hidrógeno, las cuales llevan a la formación de bioflóculos. Estas propiedades de los exopolímeros los hacen adecuados para muchas aplicaciones tales como floculación, sedimentación, deshidratación, unión a metales y remoción de compuestos orgánicos tóxicos. Además, la biosíntesis de los EPS promueve la fijación de las células a un soporte sólido, esto ayuda en el establecimiento y continuación de colonias microbianas para la estructura de un *biofilm* maduro y protector del estrés del entorno (Nouha et al. 2018).

Diversos artículos estudian la biosíntesis de los EPS, como Rehm (2015) que estudió la biosíntesis crítica y las rutas metabólicas de la biosíntesis dependiente del tipo de EPS por ejemplo, homopolisacáridos o heteropolisacáridos. Las tres etapas principales de los EPS involucradas en la síntesis son: asimilación del sustrato de carbono, síntesis intracelular del polisacárido y exudación de EPS fuera de la célula. Sin embargo estos pasos dependen de múltiples factores como ser: la especie microbiana (genes involucrados en la síntesis de EPS), la composición del medio (fuente de carbono y nitrógeno y relación C/N) y las condiciones de trabajo (pH, temperatura, oxígeno disuelto) entre otros.

Composición de las sustancias poliméricas extracelulares

Los EPS están compuestos de polisacáridos, proteínas, sustancias húmicas, ácidos nucleicos, etc. Estos exopolímeros presentan diversos grupos funcionales cargados en la superficie como carboxilos, aminos, fosfatos, carbonilos, grupos hidroxilos que podrían interactuar con contaminantes disueltos a través de intercambio iónico y formación de complejos. Como la mayoría de los exopolímeros producidos por bacterias, tienen una polaridad, por lo que pueden existir en diferentes configuraciones dependiendo del pH, temperatura, fuerza iónica, electrolitos en soluciones, etc. Estos factores pueden cambiar la conformación completa y la orientación de grupos funcionales afectando la carga efectiva, y por lo tanto, las propiedades de adsorción a cationes metálicos (Mao, Hu, and Yan 2011).

Algunos estudios han reportado que la cantidad de EPS liberada en procesos anaeróbicos de tratamiento de aguas residuales es menor que las que se libera en un proceso aeróbico. Esto puede ser debido a que la producción de EPS en un proceso

anaeróbico está restringida por las bacterias metanogénicas o que los biopolímeros son degradados a CO_2 y CH_4 . Sin embargo, en cuanto a la composición, la fracción de proteínas que se producen en un proceso anaeróbico es mayor que para un proceso aeróbico (Cordoba Velandia 2011).

En otros estudios, se muestra que la extracción de EPS en los procesos anaeróbicos es más difícil que en procesos de lodos activados aeróbicos, debido a la fracción mineral presente en los lodos granulares y a la conformación compacta de los gránulos anaeróbicos.

La importancia de los EPS en los sistemas de tratamiento biológico de aguas residuales radica en gran medida en su relevancia de diferentes aspectos para los agregados de microorganismos, así como en su relación con la sedimentación del lodo (Cordoba Velandia 2011).

Factores que influyen en la producción de los EPS

La estructura química de las sustancias poliméricas secretadas por células microbianas dependientes de las diferentes condiciones ambientales es diversa (Kuang et al. 2019).

Los polisacáridos y proteínas son los componentes principales del EPS (comprenden entre un 75%-90% de su masa) y en menor medida se encuentran los ácidos nucleicos, lípidos, ácido urónicos, glicoproteínas y algunos compuestos inorgánicos. En el EPS de los lodos de tratamiento de aguas residuales, casi el 20% en peso lo componen sustancias húmicas, mientras que en cultivos celulares de *Pseudomonas* NCIMB 2021 la composición del EPS solubles y capsular es un copolímero de carbohidratos y proteínas. Para el exopolímero extraído del *biofilm* de *Pseudomonas putida* las proteínas fueron el componente principal (75%) seguido de los polisacáridos y DNA. La fracción proteica de la matriz del EPS no se ve fuertemente afectada por el tipo de fuente de carbono del medio de cultivo. Esto se corresponde con las observaciones de algunos trabajos, donde se reportaba un contenido persistente de proteínas (del EPS de los lodos activados), cuando los microorganismos eran suplementados con diferentes tipos de fuentes de carbono como glucosa o acetato de sodio. Por otro lado, la adición de diferentes fuentes de nitrógeno afecta el contenido proteico. Por ejemplo, en situaciones

limitación de NH_4Cl , se reportó que el contenido proteico del EPS se vio incrementado (Ferreira 2016).

Otro de los polímeros que constituyen el EPS es el DNA, componente intracelular que se libera cuando la célula se lisa, que puede ser absorbido por la matriz polimérica. Las sustancias húmicas son componentes que están presentes naturalmente en los lodos activados proveniente de la hidrólisis de residuos orgánicos. Las mismas pueden quedar adsorbidas a la matriz polimérica (*biofilm*) por diferentes grupos funcionales como grupos carboxílicos y fenólicos. El DNA y las sustancias húmicas han sido reportadas como influyentes en las propiedades serológicas y la estabilidad de los *biofilms*. Un ejemplo de esto lo constituye un estudio que demuestra que el DNA extracelular es requerido para el establecimiento inicial del *biofilm* en *Pseudomonas aeruginosa* debido a que ayuda a la adhesión bacteria-superficie por modulación de las cargas e hidrofobicidad de las interacciones entre el microorganismo y la superficie abiótica (Ghafoor, Hay, and Rehm 2011). En forma similar, el *biofilm* formado por muchas otras bacterias libera específicamente DNA en condiciones de estrés o debido a la lisis celular.

Métodos de extracción de EPS

El proceso de extracción es un paso fundamental para la caracterización y el estudio de los EPS. Un buen método de extracción es aquel que es efectivo en la liberación de EPS, generando la menor lisis celular y no produce alteración de las características de los exopolímeros (Cordoba Velandia 2011). Sin embargo, debido a que no existe un método universal para este procedimiento, es importante que el que se seleccione para utilizar sea determinado para cada caso dependiendo de las necesidades y limitaciones específicas. De hecho, algunos autores aseguran que los EPS extraídos por un solo método no son representativos de la cantidad total.

Existen una gran variedad de procesos que se han implementado en las últimas décadas con el fin de extraer los EPS, dentro de los cuales se encuentran métodos que involucran procesos físicos, químicos o una mezcla de ambos.

Métodos físicos: Se basan únicamente en fuerzas mecánicas (a excepción del método por vapor).

- Centrifugación: Se usa comúnmente para separar los EPS solubles de la biomasa basándose en las diferencias de densidades de los compuestos. Sin embargo, este método no provee una extracción significativa de los EPS presentes en los agregados de microorganismos, debido a que usualmente en estos aglomerados, los componentes se encuentran íntimamente ligados. Este método es comúnmente utilizado como control, ya que emplea una técnica menos destructiva.
- Ultrasonido: se basa en la obtención de una fuerza cortante a partir de la aplicación de sonido de alta frecuencia.
- Vapor o calentamiento: En este método la extracción de los EPS se logra mediante la disrupción de los flóculos al someter las muestras a altas temperaturas. Varios autores aseguran que este procedimiento causa desnaturalización de las proteínas y lisis celular. Sin embargo, hay trabajos en los que se evidencia que una temperatura de 80 °C no desnaturaliza a las proteínas (Tapia Quezada 2010).

Métodos químicos: Se basan en la adición de ciertos compuestos químicos a la muestra con el fin de romper los enlaces existentes en la matriz y facilitar su liberación.

- Tratamientos alcalinos: Se basan en la adición de bases para crear condiciones alcalinas en el medio y generar cargas que ayudan a disociar los EPS de los flóculos. El NaOH es una de las bases más usadas para este propósito.
- EDTA: El ácido dietilaminotetracético es un agente quelante que compleja los iones de calcio de los lodos activados, reduciendo la fuerza de los flóculos y liberando los EPS. Sin embargo, hay estudios que afirman que este método causa lisis celular y contaminación de los EPS con el EDTA utilizado en la extracción.
- Formaldehído: Este compuesto se une a las estructuras celulares reaccionando con algunos grupos funcionales como los carbonilos, amino e hidroxilo y adicionalmente previene la lisis celular.

Otras sustancias que son utilizadas para la extracción de los EPS son; etanol, fenol y glutaraldehído.

Métodos combinados: Es la combinación de métodos físicos y químicos con el objeto de mejorar la eficiencia y hacer reproducibles los experimentos.

- Resinas de intercambio iónico: Se basa en la remoción de cationes multivalentes de la matriz del lodo que participan en la unión de los EPS, llevando a un rompimiento de estos aglomerados y a la posterior liberación de los EPS. El principal mecanismo de intercambio ocurre entre los cationes divalentes y el Na^+ de la resina. Debido a que dicho intercambio es controlado por difusión es importante estandarizar las condiciones de agitación, tiempo y temperatura de extracción. Se considera un método combinado dado a que durante el proceso de extracción se utiliza la agitación para optimizar el contacto de la mezcla con la resina.
- Formaldehído + NaOH + ultrasonido: El formaldehído se fija en la matriz de las células reaccionando con diferentes grupos funcionales, previniendo la lisis celular, la adición del NaOH aumenta el pH en la matriz lo que desestabiliza la estructura y la aplicación del ultrasonido provee una fuerza mecánica que permite la disrupción de los flóculos.

A modo de resumen se puede decir que no existe un consenso acerca del mejor método de extracción para la obtención de los EPS. No obstante, existe una tendencia general que indica que los métodos químicos presentan una mayor eficiencia de extracción. Sin embargo, algunos autores reportan que este tipo de métodos genera contaminación de las muestras, afectando el proceso de caracterización de los EPS. Esto quedó demostrado por las diferencias de absorción de las bandas en el análisis de espectrometría infrarroja de los métodos de glutaraldehído, formaldehído + NaOH, etanol y EDTA con respecto al control (Tapia Quezada 2010).

En cuanto a los métodos físicos, se reporta una mejor eficiencia para las técnicas de vapor y resinas de intercambio iónico. Sin embargo, en el caso de las resinas de intercambio iónico, la cantidad de EPS extraído dependía fuertemente del tiempo de extracción, intensidad de agitación y el equipo utilizado.

A la hora de evaluar un método de extracción de EPS, uno de los factores más importantes a tener en cuenta es tratar de reducir al mínimo la generación de lisis.

En conclusión, teniendo en cuenta los datos encontrados en la bibliografía especializada, la composición bioquímica del EPS es afectada por muchos factores tales como el método de extracción utilizado, la suplementación de nutrientes, el origen del EPS, el tipo de lodo analizado, la fase de crecimiento, el microorganismo, etc.

La composición molecular del EPS es muy importante ya que define las propiedades biosorbentes gracias a los grupos funcionales presentes. La composición química del EPS así producido, puede determinar su adecuación para diversos tipos de usos. Entre las aplicaciones más novedosas, una de las más importantes es la remoción de MRA (Nouha et al. 2018).

Continuando con la búsqueda de diseños de biotratamientos que sean económicos y sustentables para eliminar metales tóxicos, se aprovecha la capacidad de *Pseudomonas veronii* 2E de producir EPS, ligandos de metales, para cumplir este objetivo. Así, a lo largo de este capítulo se estudiará la posibilidad de implementar el EPS bacteriano para el desarrollo de un biotratamiento eficaz para la remoción de cobre de efluentes industriales. Para ello, se procederá a una extracción y purificación de los exopolímeros bacterianos y se analizará su interacción con cobre, principal especie hallada en efluentes de la industria de galvanoplastia, a través de sucesivos ciclos de biosorción y desorción.



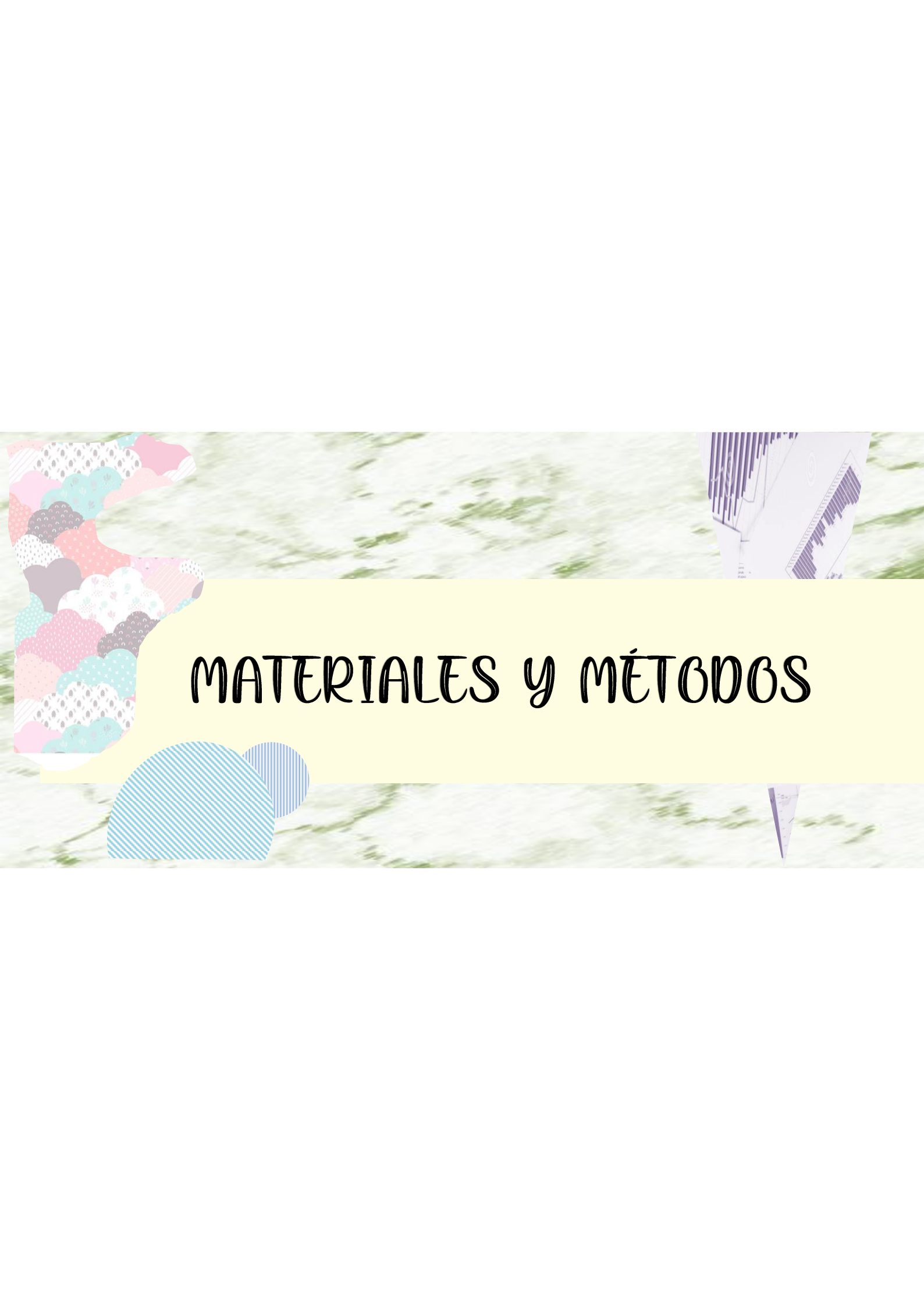
OBJETIVOS



Objetivos

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Estudiar la extracción e inmovilización de las sustancias poliméricas extracelulares solubles.
- ❖ Estudiar la interacción de las sustancias poliméricas extracelulares solubles (EPSs) inmovilizadas con Cu(II) 1 mM.
- ❖ Estudiar un método eficaz de desorción de cobre por las sustancias poliméricas extracelulares solubles.



MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales y Métodos

Extracción y Purificación del EPS soluble

Para la extracción y purificación del EPS soluble bacteriano, las células crecidas en 1,2 L de medio se separaron por centrifugación (7000 g, 15 min) y el EPS presente en el sobrenadante se precipitó con el agregado de 2,2 volúmenes de etanol 96% (v/v), quedando en reposo *overnight* a -20 °C. Posteriormente, el EPS precipitado se separó por centrifugación (7000 g, 20 min, 4 °C), repitiendo los pasos de centrifugación y precipitación tres veces. El medio de cultivo seleccionado para la producción de EPS fue M9 suplementado con Glicerol 2% basados en los resultados de Ferreira (2016) quien estudió las condiciones óptimas de producción del EPS soluble de *Pseudomonas veronii* 2E y fue éste medio el que registró su mayor producción. Se agregó un paso más de purificación, en donde a la fracción precipitada con etanol, se la resuspendió en un mínimo de agua ultrapura - 18 MΩcm Millipore -y se la dializó utilizando membrana de celulosa (Sigma Aldrich, MW>12400 Da) contra agua ultrapura (18 MΩcm Millipore) por 48 h para remover especies de baja masa molecular (impurezas, sales, polímeros pequeños, etc.) y se tomó a esta fracción como EPS soluble, de aquí en más EPS. A continuación, el EPS fue sometido a evaporación al vacío hasta sequedad y llevado a peso constante en estufa a 32 °C obteniendo como resultado 1,04 g de EPS.

Estudio de la interacción EPS con Cobre

El EPS obtenido como se indicó previamente, se resuspendió en 12 mL de agua ultrapura - 18 MΩcm Millipore - y se lo introdujo en una nueva bolsa de diálisis dentro reactor *batch* que consistió en un Erlenmeyer de 250 mL de capacidad, al cual se le agregó 50 mL de una solución de Cu(II) 1 mM ajustando el pH a 5,5 por el agregado de 500 µL de buffer MES 1 M. Se dejó incubando durante 96 h a 25 °C, tomando muestras a diferentes tiempos para estudiar la cinética de biosorción. La concentración de Cu(II) en el sobrenadante fue medida espectrofotométricamente usando el Método del Ácido

Bicinconínico (Ver Capítulo 1, pág. 47). La capacidad de biosorción del metal mediada por el EPS fue expresada de acuerdo a la **Ecuación 7**.

$$q = \frac{V \times (Ci - Cf)}{m} \quad (7)$$

Donde Ci es la concentración inicial, Cf es la concentración final, V es el volumen total de la mezcla de sorción ensayada y m es la masa del biosorbente en peso seco.

Desorción de cobre retenido en los exopolímeros

Al finalizar la etapa de biosorción, se llevó a cabo la desorción del metal utilizando una solución de HCl 0,075 M como desorbente, siendo el volumen final de trabajo de 17 mL. Esto se repitió 2 veces más, resultando en un total de 3 ciclos de desorción, todo llevados a cabo en el mismo reactor *batch* que se utilizó en la biosorción. Los resultados de la desorción del metal fueron calculados de acuerdo a la **Ecuación 8**.

$$\% \text{ de desorción de Cu(II)} = \frac{\text{mmol Cu(II) desorbidos}}{\text{mmol Cu(II) adsorbidos}} \times 100 \quad (8)$$

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Resultados y Discusiones

Todos los ensayos llevados a cabo en esta tesis se realizaron por duplicado y fueron repetidos aleatoriamente para asegurar su reproducibilidad, se representan por su promedio $\pm$ su desvío estándar.

Se llevó a cabo la extracción y purificación del EPS de acuerdo a la metodología previamente mencionada en Materiales y Métodos. Para una mejor comprensión, en la **Figura 50** se esquematiza un breve resumen de la metodología empleada, obteniéndose al final del proceso 1,04 g de EPS. Esto se enfrentó a 50 mL de una solución de Cu(II) 1mM durante 96 h a 32 °C bajo agitación a pH 5,5 ajustado con 500 μ L de buffer MES 1M.

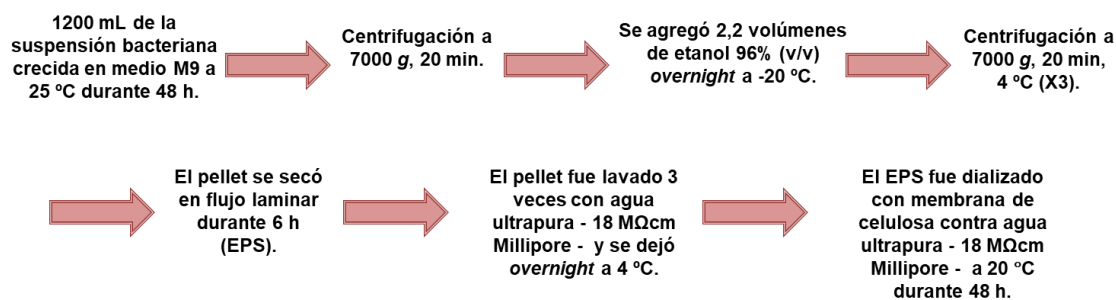


Figura 50. Esquema de Producción y extracción del EPS.

Composición del EPS utilizado.

El EPS de *Pseudomonas veronii* 2E estudiado en esta tesis, se obtuvo por reproducción de los mejores resultados de Ferreira (2016) y utilizando por consiguiente el mismo método de extracción. Los mismos, muestran que el EPS contenía de azúcares neutros, proteínas, ácido urónicos (azúcares ácidos) y fósforo total. Los resultados que se observan en la **Tabla 20** están expresados en % mg componente (g EPS)⁻¹.

Este EPS bacteriano, está principalmente compuesto de carbohidratos (48% m/m), proteínas (37% m/m), fósforo total (14% m/m) y ácidos urónicos (1% m/m). Se obtuvieron resultados similares en el grupo de investigación de Ajao (2020) quienes recuperaron un 62-77% peso seco de EPS proveniente de aguas residuales, de los cuales

el 44% correspondía a carbohidratos. Esto confirma que el EPS es una matriz compleja de biopolímeros que contienen carbohidratos como componente principal.

Tabla 20. Composición del EPS de *P. veronii* 2E (extraída de Ferreira (2016)).

Componente	Método Colorimétrico	%
Polisacáridos neutros	Antrona	48
Ácidos Urónicos	m-hidroxidifenil / H ₂ SO ₄ / ácido sulfámico	1
Proteínas Totales	Bradford	37
Fósforo Total	Azul de Molibdeno	14

En este trabajo se obtuvo 1,04 g de peso seco de EPS luego de 48 h de incubación. El grupo de Parmar (2020) obtuvo resultados similares donde se extrajo 1,34 g % (m/v) pero después de las 72 h de incubación a la misma temperatura (25 °C). Además, el grupo de trabajo de Parmar (2020) concluyó que un aumento en la temperatura o un tiempo de incubación mayor a 72 h disminuyen el rendimiento de EPS obtenido. Por lo tanto, sería interesante llevar a cabo ensayos de obtención de EPS extendiendo el tiempo de incubación de 48 h a 72 h para evaluar si incrementa la cantidad de EPS extraído.

Ferreira (2016) establece con respecto a la fracción proteica, que las proteínas atrapadas en el EPS no necesariamente se encuentran relacionadas a actividad enzimática, algunas son estabilizadoras, actuando de nexo entre la superficie de las células y los polisacáridos presentes en la matriz polimérica. Por otro lado, muchas de las exoenzimas pueden estar relacionadas con la degradación del biopolímero. El sustrato para estas enzimas extracelulares son polímeros solubles como los polisacáridos, proteínas o DNA, que como se mencionó previamente en la introducción, resultan en la producción de nutrientes para el *biofilm*.

Respecto de la determinación de fósforo, el método utilizado cuantifica el fósforo total, sin dar información de su origen, y podría estar asociado a DNA extracelular (DNAe) y/o a lipoproteínas, o lipopolisacáridos (LPS) atrapados en el polímero.

Inicialmente se creía que el DNAe era producto de la lisis celular causada por el método de extracción; cada vez más investigaciones están comprobando que estos compuestos son liberados a la matriz del polímero para cumplir con funciones específicas. Recordemos que el DNAe tiene un rol importante en la formación y estabilidad de los *biofilms*. A su vez, los lipopolisacáridos (LPSs) además de polisacáridos, también contienen fósforo en su estructura y podrían formar parte del EPS. Estos compuestos podrían aportar al carácter hidrofóbico en la matriz del biopolímero. Sin embargo, no hay muchos estudios enfocados en la presencia y estructura de LPSs dentro de los EPS (Ferreira 2016).

Por otro lado, a pesar de que Daniel (2016) probó que *Pseudomonas veronii* 2E tuvo un desarrollo de *biofilm* óptimo en medio rico PY a las 55 h, Ferreira (2017) demostró que la mayor producción de EPS se obtenía en un medio mínimo salino con glicerol como única fuente de carbono a las 48 h. Además, Ferreira (2017) mostró que, tanto la fuente de carbono como la de nitrógeno, son factores que afectan la producción de EPS entre otros parámetros tales como la temperatura y esto se corresponde con lo establecido en el trabajo de Ajao (2020). La mayor producción de EPS por *P. veronii* fue observada en medio M9 con glicerol a 25 °C. Esto tiene una relevancia significativa para un proceso de biotratamiento de aguas residuales debido a que el glicerol es un producto de la industria del biodiesel, por lo que contribuiría a un proceso de producción sostenible de EPS. Por otro lado, trabajar a 25 °C implica bajos requerimientos de energía lo cual impacta directamente en los costos de operación, haciéndolo altamente deseable para un diseño de biorremediación ambiental.

Además, el método de extracción utilizado tiene un efecto significativo en la composición del EPS. En este caso, se utilizó etanol con sucesivas centrifugaciones y, en estas condiciones, los carbohidratos neutros son principalmente precipitados lo cual se corresponde con los resultados obtenidos. Más aún, en el trabajo de Ajao (2020), se usó un método de recuperación similar pero la proporción de ácidos urónicos obtenida fue mayor. Se cree que esto se debió al hecho de que ellos no precipitaron el EPS con etanol lo cual se corresponde con la conclusión previamente mencionada.

Diseño del proceso de biosorción de Cobre por el EPS

En la **Figura 51** se muestra el esquema del reactor *batch* en el cual el experimento se llevó a cabo, tanto para los ciclos de biosorción como los de desorción del metal.

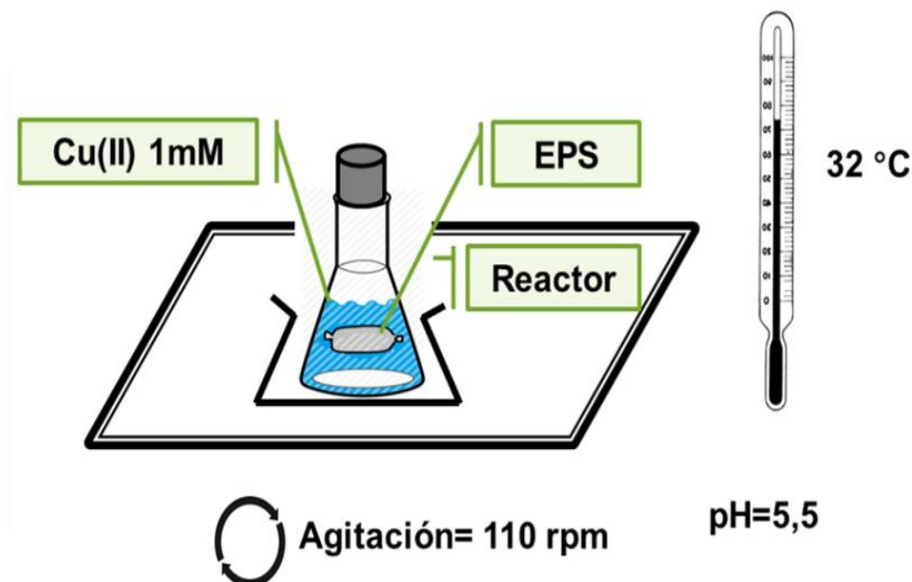


Figura 51. Esquema del proceso de biosorción de Cu(II) mediada por el EPS en un reactor *batch*.

Los resultados obtenidos por la interacción EPS- Cu(II) se muestran en la **Figura 52**, donde puede observarse que a las 24 h el proceso de biosorción casi alcanza el equilibrio, obteniendo una q_{max} de $0,064 \pm 0,001$ mmol/g de EPS. Sin embargo, se puede observar que el EPS puede biosorber una pequeña cantidad adicional de metal, alcanzando la mayor biosorción a las 96 h, con una q_{max} de $0,066 \pm 0,001$ mmol/g de EPS. Estos resultados muestran que el EPS tiene una elevada capacidad de retención de cobre ($81 \pm 2\%$) y ($85 \pm 2\%$) a las 24 h y 96 h respectivamente.

El EPS es una matriz compleja que tiene asociado diferentes grupos tales como ácidos carboxílicos, grupos fosfato diéster y monoéster, grupos amino, los cuales están involucrados en un equilibrio ácido-base y pueden tener asociadas diversas cargas dependiendo del pH. A pH de trabajo (5,5) estos polímeros tienen un carácter aniónico lo que constituye una propiedad interesante desde un punto de vista biotecnológico por su aplicabilidad potencial en el tratamiento de efluentes conteniendo MRA (como Cd, Zn, Cr, Hg, Cu, etc.).

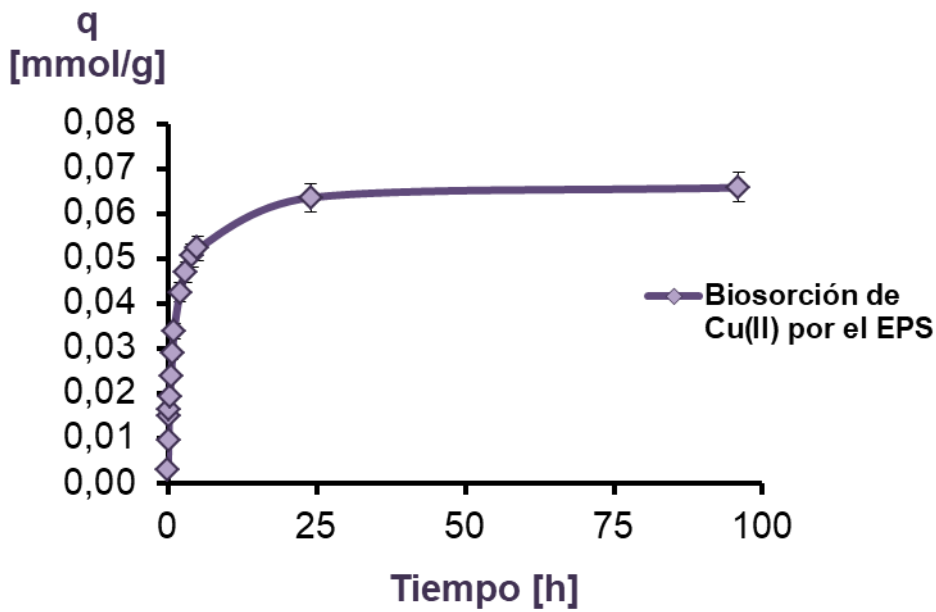


Figura 52. Biosorción de Cu(II) mediada por el EPS en un reactor *batch*.

A continuación, en **Tabla 21** se muestra un resumen de los resultados obtenidos de la cinética de biosorción de cobre mediada por el EPS bacteriano.

Tabla 21. Cinética de biosorción de Cu(II) mediada por el EPS

t_f [h]	C_f Cu(II) [mM]	q [mmol/g]	mmol Cu(II) residuales	% Biosorción
24	$0,212 \pm 0,001$	$0,064 \pm 0,001$	$0,01080 \pm 4 \times 10^{-5}$	81 ± 2
96	$0,174 \pm 0,001$	$0,066 \pm 0,001$	$0,01312 \pm 4 \times 10^{-5}$	85 ± 2

Como se puede observar de los resultados obtenidos, el EPS biosorbió un $(85 \pm 2)\%$ del metal a las 96 h, de los cuales desorbió el $(72,9 \pm 0,8)\%$ del Cu(II) retenido, siendo una cualidad atractiva cuando se busca reciclar el metal. Estos resultados son similares a los hallados para la BL en el Capítulo 1, donde se obtuvo una retención de cobre del (88 ± 1) y una desorción del $(70 \pm 6)\%$ para el mismo tipo de efluente modelo (50 mL de una solución de Cu(II) 1 mM). Sin embargo, teniendo en cuenta las q_{max} halladas para ambos casos, la capacidad de retención de la BL es un poco mayor a 5 veces la capacidad de retención del EPS soluble ($(0,35 \pm 0,03)$ mmol Cu/g vs, $(0,066 \pm 0,001)$ mmol Cu/g). Esto es esperable, ya que en el proceso de biosorción por la BL, existe la probabilidad de una interacción del metal con las bacterias como con el EPS unido, el cual, según el grupo de Sheng (2010) se encuentra en mayor cantidad que el EPS

débilmente unido. El grupo de Ajao (2020) obtuvo resultados comparables en relación a la biosorción al enfrentar al EPS proveniente de aguas residuales contra 100 mL de una solución de cobre de 50 mg/L con una retención del 99,9% y una desorción del 86%. Esto podría significar que el EPS producido por *Pseudomonas veronii* 2E tiene diversas propiedades que lo convierte en un biosorbente apropiado para cobre y un candidato potencial para un proceso de biotratamiento tanto para eliminar cobre del efluente como para su posterior reciclado.

Desorción de cobre retenido por el EPS

Los ensayos de desorción de Cu(II) retenido por el EPS fueron llevados a cabo de acuerdo a la metodología mencionada en Materiales y Métodos. Los resultados se pueden observar en la **Figura 53**, donde se observa una recuperación de $(0,733 \pm 0,008)$ mM, $(0,3848 \pm 0,0007)$ mM y $(0,236 \pm 0,007)$ mM de cobre para el primero, segundo y tercer ciclo respectivamente. Además, se puede visualizar un patrón de desorción idéntico a los hallados para la desorción de la biomasa libre (BL) e inmovilizada (BI), obteniéndose una recuperación de metal descendente desde el primer al tercer ciclo. Para una mejor comprensión, estos resultados se traducen en una recuperación de $(39,5 \pm 0,4)\%$, $(20,73 \pm 0,04)\%$ y $(12,7 \pm 0,4)\%$ para el primero, segundo y tercer ciclo respectivamente, siendo una desorción total de $(72,9 \pm 0,8)\%$ del metal retenido por el EPS.

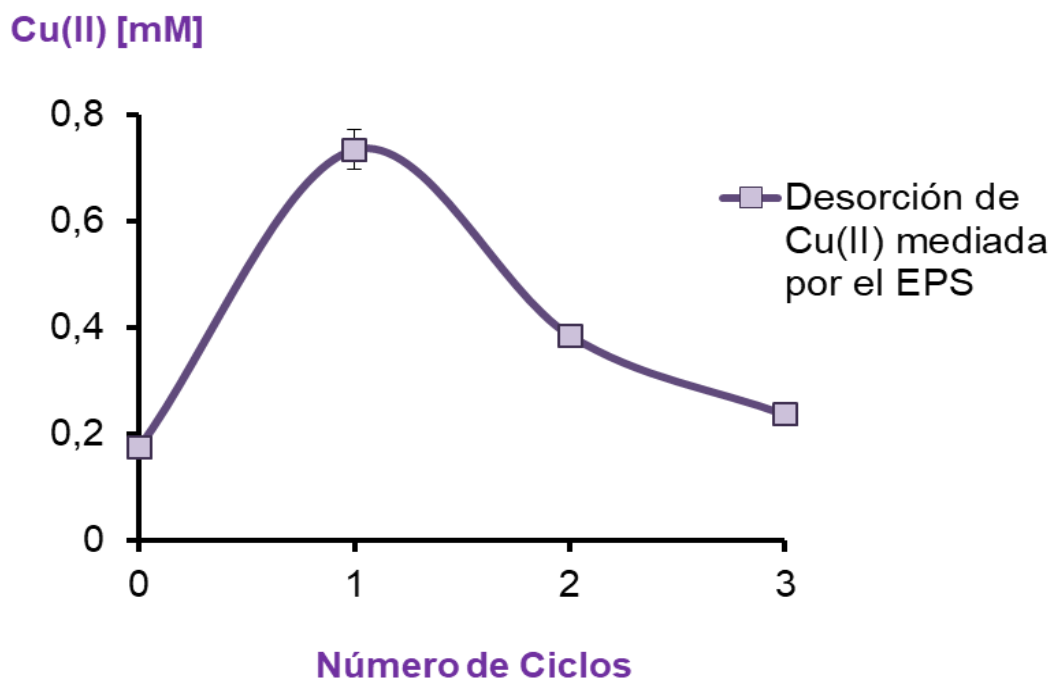


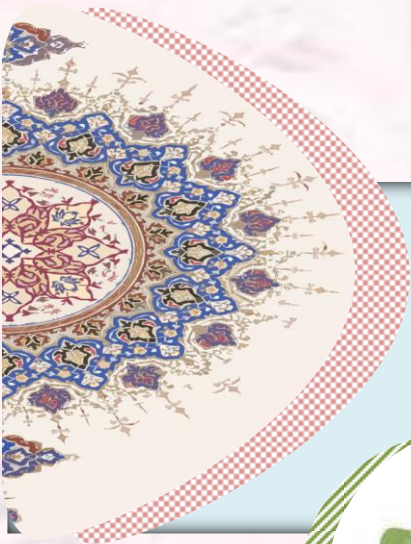
Figura 53. Desorción de Cu(II) mediada por el EPS en un reactor *batch*.

En la **Tabla 22**, se presenta en forma resumida los resultados de la desorción de Cu(II) retenidos por el EPS bacteriano.

Tabla 22. Desorción de Cu(II) mediada por el EPS en un reactor *batch*

0,075 M HCl			
	[mM]	mmol Cu(II) sobrenadante	% Desorción
t_f biosorción	0,16±0,02	0,0016±0,0002	-
Ciclo 1	0,733±0,008	0,0213±0,0002	39,5±0,4
Ciclo 2	0,3848±0,0007	0,01116±0,00002	20,73±0,04
Ciclo 3	0,236±0,007	0,0068±0,0002	12,7±0,4

CONCLUSIONES



Conclusiones

En este tercer capítulo de tesis, se estudió la capacidad de retención de Cu(II) que presentan las sustancias poliméricas extracelulares solubles (EPS) producidas por *Pseudomonas veronii* 2E, obteniéndose las siguientes conclusiones particulares:

Para un efluente modelo conteniendo 1 mM de Cu(II), las sustancias poliméricas extracelulares solubles de *P. veronii* 2E crecida en medio M9 son buenos adsorbentes para cobre a 32 °C, ya que 1,04 g del EPS tuvo una capacidad máxima de retención de $0,066 \pm 0,001$ mmol/g, esto se traduce en una remoción del $(85 \pm 2\%)$ de cobre.

Para la etapa de recuperación de cobre, se utilizaron las mejores condiciones de desorción halladas en el Capítulo 1, lo que probó la capacidad del EPS de desorber el cobre retenido, obteniéndose una recuperación del metal del $39,5 \pm 0,4$ en el primer ciclo y una desorción total del $(72,9 \pm 0,8)\%$. En otras palabras, se logró concentrar el metal del efluente modelo 3 veces con 0,075 M de HCl como desorbente.

Las conclusiones de este tercer capítulo contribuyen al diseño del biotratamiento para la remoción y posterior recuperación de cobre. Esto se debe a que se trabaja manteniendo aquellas condiciones que ofrecían ventajas al diseño llevadas a cabo en el Capítulo 1, como la utilización del glicerol como fuente de carbono de la bacteria, sumado a la ventaja que representa la producción del EPS al obtenerse en condiciones de temperatura ambiente (25°C). Esto implica la reducción de los costos al no requerir por ejemplo sistemas refrigerantes y agregando la ventaja de la inmovilización del biosorbente que lo convierte en un sistema mucho más sencillo de manejar y económico sin pasos posteriores de separación del biosorbente - efluente tratado. Aunque, es necesario mencionar que el uso de este tipo de biosorbente conlleva un aumento en los costos de operación debido a la extracción y purificación del EPS que requiere. Sin embargo, sería conveniente hacer un balance costo-beneficio debido a que, a sencillos cálculos, se necesitó 1,04 g del EPS para remover más del 80% del metal en 24 h.



REFERENCIAS



Referencias

- 1) Ajao, Victor, Nam Kang, Chatzopoulos Paraschos, Spruijt Evan, Bruning Harry, Rijnaarts Huub, and Temmink Hardy. “Regeneration and reuse of microbial extracellular polymers immobilised on a bed column for heavy metal recovery.” *Water Research* 171: 115472, 2020
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115472>
- 2) Alaba, Peter Adeniyi, Abiola Oladoja Nurudeen, Mohammad Sani Yahaya, Bolarinwa Ayodele Olumide, Yakub Mohammed Isah , Olupinla Sunday Felix, and Mohd Wan Daud Wan. “Insight into wastewater decontamination using polymeric adsorbents.” *Journal of Environmental Chemical Engineering* 6, no. 2: 1651–72, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.02.019>
- 3) Cordoba Velandia, Diana Carolina. “Caracterización de EPS y SMP como proteínas Y Carbohidratos durante la operación de un BAnMI.” Universidad de los Andes, 2011. <http://hdl.handle.net/1992/24615>
- 4) Ferreira Maria L., Casabueno Adriana C., Stacchiotti Sabrina T., Couto Alicia S., Ramirez Silvana A., and Vullo Diana L. “Chemical characterization of *Pseudomonas veronii* 2E Soluble Exopolymer as Cd(II) ligand for the biotreatment of electroplating wastes.” *International Biodeterioration and Biodegradation* 119: 605–13, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.10.013>
- 5) Ferreira, Maria Laura. “Estudio de las interacciones entre metales de relevancia ambiental y componentes celulares bacterianos involucrados en procesos de biotratamiento de aguas residuales.” Universidad de Buenos Aires, 2016.
https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n5979_Ferreira.pdf
- 6) Ghafoor, Aamir, Hay Iain D., and. Rehm Bernd H.A. “Role of exopolysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and architecture.” *Applied and Environmental Microbiology* 77 (15): 5238–46, 2011.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00637-11>
- 7) Kuang Xiaolin, Peng Liang, Chen Anwei, Zeng Qingru, Luo Si, and Shao Jihai. “Enhancement mechanisms of copper(II) adsorption onto kaolinite by Extracellular Polymeric Substances of *Microcystis aeruginosa*

- (Cyanobacterium).” *International Biodeterioration and Biodegradation* 138: 8–14, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2018.12.009>
- 8) Laspidou, Chrysi S., and Rittmann Bruce E. “Continuous dual resetting of the immune repertoire as a basic principle of the immune system function.” *Journal of Immunology Research* 36: 2711–20, 2002.
<https://doi.org/10.1155/2017/3760238>
 - 9) Mao, Yanli, Hu Hongwei, and Yan Yongsheng. “Biosorption of cesium(I) from aqueous solution by a novel exopolymers secreted from *Pseudomonas fluorescens* C-2: Equilibrium and kinetic studies.” *Journal of Environmental Sciences* 23 (7): 1104–12, 2011[https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(10\)60522-0](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(10)60522-0)
 - 10) Nouha Klai, Kumar Ram Saurabh, Balasubramanian Sellamuthu, and Tyagi Rajeshwar Dayal. “Critical review of EPS production, synthesis and composition for sludge flocculation.” *Journal of Environmental Sciences (China)* 66: 225–45, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2017.05.020>
 - 11) Parmar Paritosh, Shukla Arpit, Goswami Dweipayan, Gaur Shailendra, Patel Baldev, and Saraf Meenu. “Comprehensive Depiction of Novel Heavy Metal Tolerant and EPS Producing Bioluminescent *Vibrio alginolyticus* PBR1 and *V. rotiferianus* PBL1 Confined from Marine Organisms.” *Microbiological Research* 238 (June): 126526, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126526>
 - 12) Rehm, Bernd H A. *Alginate: Biology and Applications*. Edited by Alexander Steinbüchel. *Microbiology Monographs*. Vol. 13. Münster, Germany, 2015.
ISBN: 9783540926788
 - 13) Sheng, Guo Ping, Yu Han Qing, and Li Xiao Yan. “Extracellular Polymeric Substances (EPS) of microbial aggregates in biological wastewater treatment systems: A review.” *Biotechnology Advances* 28 (6): 882–94, 2010.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.08.001>.
 - 14) Sosa, Griselda, Daniel María Alejandra, Barrionuevo Matías R, Lazzarini Behrmann Irene C, Ferreira María Laura, Zalts Anita, Ramírez Silvana A, and Vullo Diana L. “Zinc biosorption by microbial species for biotreatment processes.” In *Handbook of Metal-Microbe Interactions and Bioremediation*, edited by Surajit Das and Hirak Ranjan Dash, 657–72. New York: CRC Press - Taylor and Francis Group, 2017. **ISBN: 9781498762427**

Conclusiones Generales

A modo de conclusión final, se pueden extraer las siguientes consideraciones en esta tesis:

Para un efluente modelo conteniendo 1mM de Cu(II), las células de *P. veronii* 2E crecidas en medio mínimo salino M9 son mejores adsorbentes para el metal que las crecidas en medio nutricionalmente rico como PYG a 32 °C, ya que retuvieron la máxima cantidad de cobre ($88 \pm 1\%$).

Para un efluente modelo conteniendo 0,5 mM de Cu(II), las células de *P. veronii* 2E crecidas en medio PYG son mejores adsorbentes que las crecidas en M9 para el metal a 25 °C, ya que retuvieron la máxima cantidad de cobre ($90 \pm 2\%$).

Las isotermas de biosorción de Cu(II) demostraron que las células crecidas en ambos medios (M9 y PYG) se ajustan mejor al modelo de Langmuir. También, se reafirma por los parámetros cinéticos que *Pseudomonas veronii* 2E crecida en medio M9 es mejor biosorbente de Cu(II) que la crecida en PYG mostrando una capacidad máxima de remoción de ($0.52 \pm 0,03$) mmol/g de biosorbente.

Para un efluente modelo conteniendo 1 mM de Cu(II), las sustancias poliméricas extracelulares solubles *P. veronii* 2E crecida en medio M9 son buenos adsorbentes para cobre alcanzando una remoción del 85% y desorbiendo un 73% de metal retenido.

Se demostró que la matriz más adecuada tanto para el desarrollo de *P. veronii* 2E como para su implementación en el biotratamiento fue la esponja vegetal de *luffa*.

Se evidenció la capacidad, tanto de *P. veronii* 2E como de cada matriz estudiada, de desorber el cobre retenido.

Se diseñaron diferentes modelos de reactores continuos, y se demostró que un reactor con recirculación es más efectivo que tres reactores continuos conectados en serie, uno secuencialmente después del otro. Además, en este tipo de diseños, se logró mantener una biosorción elevada de cobre y se alcanzó una desorción completa del metal retenido en un período corto de tiempo.

A modo de resumen podemos confirmar que esta tesis ofrece una posible solución ante la problemática establecida, debido a que se demostró que es posible la implementación de un biotratamiento sostenible que elimine cobre de efluentes líquidos por el uso de bacterias autóctonas de zonas contaminadas con MRA. Además, el diseño

de reactores propuesto en este trabajo estableció que es posible el escalado del biotratamiento, en este caso se probó un escalado de 10-200 mL de efluente modelo.

A lo largo de esta tesis se hallaron resultados interesantes desde un punto de vista económico, que impactarían directamente en los costos globales del biotratamiento. Entre ellos, se puede mencionar el uso de glicerol como fuente de carbono, al ser un subproducto de la industria del biodiesel representa materia prima económica. Por otro lado, el proceso de biosorción, como se mencionó en reiteradas ocasiones, no depende de un sistema metabólico activo, por lo que no sería necesario el agregado constante de nutrientes, y, sumado a la ventaja de inmovilizar esta biomasa, ofrece un sistema sencillo de manejar y económico al facilitar la separación efluente tratado-biomasa y posibilitar su reúso. Otra alternativa es el uso del EPS, que demostró tener elevada afinidad por cobre, por lo que representa un biosorbente eficaz y es un polímero que se encuentra disponible en solución para ser utilizado. Todos estos resultados, contribuyen a una disminución en los costos de operación del proceso que es uno de los grandes desafíos de las industrias a la hora de implementar un sistema de tratamiento de efluentes. Por último, se debe mencionar que este tipo de biotratamiento no produjo desechos secundarios, por lo que su implementación no impactaría negativamente en el ambiente.

Aunque las conclusiones de esta tesis son prometedoras, aún representan el primer paso para un diseño de un biotratamiento eficiente y económico en la remoción y recuperación de cobre a escala industrial con efluentes reales.

Perspectivas a futuro

Los pasos a continuar serían:

Estudiar la BI en EV en tres reactores conectados en serie pero con una recirculación del efluente durante 9 días para evaluar si mejora la eficiencia de retención de cobre y volver a compararlo con la retención obtenida en el reactor con recirculación.

Prolongar el tiempo de contacto de BI cargadas con metal con HCl, en los ensayos de desorción en los reactores en serie, para evaluar si aumenta el porcentaje de recuperación del metal.

Como se mencionó en reiteradas ocasiones en el Capítulo 3, es ampliamente conocido el uso de las sustancias poliméricas extracelulares en la aplicación como biosorbentes de MRA en efluentes industriales. Por ello, otra de los pasos a seguir es evaluar diferentes métodos de producción y recuperación del EPS unido, inmovilizarlo con la misma técnica descrita para el EPS soluble (Ver Capítulo 3) y estudiar su interacción con Cu(II) como otra potencial alternativa de biotratamiento de efluentes con contenido en metales.

Teniendo en cuenta que el objetivo final del biotratamiento desarrollado en esta tesis es la implementación a escala industrial, es indispensable hacer un escalado del reactor a volúmenes crecientes, evaluando los parámetros en cada escalado de manera independiente como: temperatura, tiempo de retención hidráulico, pH, tipo de agitación, cantidad de biosorbente, concentración inicial de cobre, etc. Se vió de los resultados obtenidos en el Capítulo 1, un efluente con concentraciones variadas de cobre conlleva tratamientos diferentes, por lo que en una primera instancia es necesario cuantificar la cantidad de metal a tratar.

Una vez que se puso a punto la técnica de remoción, el paso a continuar sería la utilización de un efluente real de galvanoplastia para ver el comportamiento del sistema. Para ello, es imprescindible una caracterización previa del tipo de efluente a tratar por medio de estudios físicos y químicos adecuados.

Referencias Generales

- 1) ACUMAR, Autoridad de Cuenca Matanza Riachuelo. 2017. “Anexo I. Tabla Consolidada de Límites Admisibles de Vertido de Efluentes Líquidos,” 1–6. <http://servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/270000-274999/273042/res46.pdf>.
- 2) Andrade Guel, Marlene Lariza, Lluvia Itzel López López, and Aidé Sáenz Galindo. 2012. “Carbon Nanotubes: Funcionalization and Biological Applications.” *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas* 43 (3): 9–18.
- 3) Ayangbenro, Ayansina Segun, and Olubukola Oluranti Babalola. 2017. “A New Strategy for Heavy Metal Polluted Environments: A Review of Microbial Biosorbents.” *International Journal of Environmental Research and Public Health* 14 (1). <https://doi.org/10.3390/ijerph14010094>.
- 4) Azubuike, Christopher Chibueze, Chioma Blaise Chikere, and Gideon Chijioke Okpokwasili. 2016. “Bioremediation Techniques–Classification Based on Site of Application: Principles, Advantages, Limitations and Prospects.” *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32 (11): 1–18. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2137-x>.
- 5) Barrionuevo, Matías, María Alejandra Daniel, Luciana Garavaglia, Nerina Méndez, Griselda Sosa, Roberto Candal, Silvia Cerdeira, Helena Ceretti, and Silvana Ramírez. 2009. “Tratamiento Biológico de Efluentes Industriales Con Contenido En Metales: Factores a Tener En Cuenta Para Un Diseño Eficiente.” *Química Viva* 8 (2): 106–24.
- 6) Beltrán-Pineda, Mayra Eleonora, and Alida Marcela Gómez-Rodríguez. 2016. “Biorremediación de Metales Pesados Cadmio (Cd), Cromo (Cr) y Mercurio (Hg), Mecanismos Bioquímicos e Ingeniería Genética: Una Revisión.” *Revista Facultad de Ciencias Básicas* 12 (2): 172–97. <https://doi.org/10.18359/rfcb.2027>.
- 7) Caviedes Rubio, Diego Ivan, Ramiro Adolfo Muñoz Calderón, Alexandra Perdomo Gualtero, Daniel Rodríguez Acosta, and Ivan Javier Sandoval Rojas. 2015. “Tratamientos Para La Remoción de Metales Pesados Comúnmente Presentes En Aguas Residuales Industriales. Una Revisión.” *Ingeniería y Región* 13 (1): 73. <https://doi.org/10.25054/22161325.710>.

- 8) Fernando, Luis, Garcés Giraldo, Edwin Alejandro, Mejía Franco, Jorge Julián, and Santamaría Arango. 2004. “La Fotocatálisis Como Alternativa Para El Tratamiento de Aguas Residuales.” *Revista Lasallista de Investigación* 1 (1): 83–92.
- 9) Ferrer, Ana. 2003. “Intoxicación Por Metales.” *Anales Del Sistema Sanitario de Navarra* 26 (SUPPL. 1): 141–53. <https://doi.org/10.4321/s1137-66272003000200008>.
- 10) Galán Huertos, Emilio, and Antonio Romero Baena. 2008. “Contaminación de Suelos Por Metales Pesados.” *Macla* 10: 48–60.
- 11) García, Rab, and As Reyes. 2009. “Fitorremediación de Metales Pesados y Microorganismos.” *Ama.Redciencia.Cu*, no. 16: 1–6. <http://ama.redciencia.cu/articulos/16.02.pdf>.
- 12) Granados Correa, Francisco, Juan Serrano Gómez, and Juan Bonifacio Martínez. 2010. “Síntesis y Caracterización de Materiales Inorgánicos Para Ser Empleados Como Adsorbentes de Metales Tóxicos y de Interés Nuclear.” *Contibuciones Del Intituto Nacional de Investigaciones Nucleares Al Avance de La Ciencia y La Tecnología En México*, 194–210.
- 13) Hegde, Raveendra M., Richelle M. Rego, Krishna Murthy Potla, Mahaveer D. Kurkuri, and Madhuprasad Kigga. 2020. “Bio-Inspired Materials for Defluoridation of Water: A Review.” *Chemosphere* 253: 126657. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126657>.
- 14) Kapahi, Meena, and Sarita Sachdeva. 2019. “Bioremediation Options for Heavy Metal Pollution.” *Journal of Health and Pollution* 9 (24). <https://doi.org/10.5696/2156-9614-9.24.191203>.
- 15) Kiran Marella, Thomas, Abhishek Saxena, and Archana Tiwari. 2020. “Diatom Mediated Heavy Metal Remediation: A Review.” *Bioresource Technology* 305 (December 2019): 123068. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123068>.
- 16) Leong, Yoong Kit, and Jo Shu Chang. 2020. “Bioremediation of Heavy Metals Using Microalgae: Recent Advances and Mechanisms.” *Bioresource Technology* 303 (January): 122886. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122886>.
- 17) Londoño Franco, Luis Fernando, Paula Tatiana Londoño Muñoz, and Fabián Gerardo Muñoz Garcia. 2016. “Los Riesgos De Los Metales Pesados En La Salud Humana Y Animal.” *Bioteecnología En El Sector Agropecuario y Agroindustrial* 14 (2): 145. [https://doi.org/10.18684/bsaa\(14\)145-153](https://doi.org/10.18684/bsaa(14)145-153).

- 18) Lopez García, Ulises. 2005. “Aplicación de La Electrodialisis a La Eliminación de Nitrato En Agua,” 169.
[https://cideteq.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1021/157/1/Aplicación de la electrodialisis en agua.pdf](https://cideteq.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1021/157/1/Aplicación%20de%20la%20electrodialisis%20en%20agua.pdf).
- 19) Marrero-coto, Jeannette, and Arelys Díaz-valdivia Orquídea Coto-pérez. 2010. “Mecanismos Moleculares de Resistencia a Metales Pesados En Las Bacterias y Sus Aplicaciones En La Biorremediación.” *Revista CENIC: Ciencias Biológicas* 41 (1): 67–78.
- 20) Ministerio del Ambiente. 2015. “Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria. Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes : Recurso Agua, Libro 6, Anexo 1 ‘Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes : Recurso Agua,’. 1–40.
[http://www.cip.org.ec/attachments/article/1579/PROPUESTA ANEXO 1.pdf](http://www.cip.org.ec/attachments/article/1579/PROPUESTA%20ANEXO%201.pdf).
- 21) Montenegro, Sandra, Sandra Pulido, and Luisa Calderón. 2019. “Prácticas de Biorremediación En Suelos y Aguas.” *Editorial UNAD* 1: 49.
- 22) Nguyen, Thien Q., Verena Sesin, Anna Kisiala, and R. J.Neil Emery. 2020. “The Role of Phytohormones in Enhancing Metal Remediation Capacity of Algae.” *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, no. 0123456789.
<https://doi.org/10.1007/s00128-020-02880-3>.
- 23) Orozco, Lilia, Pedro Nava, Cesia Guarneros, and Felipe Caballero. 2019. “Filtración de Agua Por Membranas.” *Revista Avance y Perspectiva*, no. 4.
<https://avanceyperspectiva.cinvestav.mx/filtracion-de-agua-por-membranas/>.
- 24) Pabón, S, A Sarria, and J Gallo. 2020. “Contaminación Del Agua Por Metales Pesados, Métodos de Análisis y Tecnologías de Remoción. Una Revisión 1 Water Contamination by Heavy Metals, Analysis Methods and Removal Technologies. A Review.” *Entre Ciencia e Ingeniería* 14 (27): 9–18.
- 25) Polat, H., and D. Erdogan. 2007. “Heavy Metal Removal from Waste Waters by Ion Flotation.” *Journal of Hazardous Materials* 148 (1–2): 267–73.
<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.02.013>.
- 26) Rahman, Zeeshanur, and Ved Pal Singh. 2020. “Bioremediation of Toxic Heavy Metals (THMs) Contaminated Sites: Concepts, Applications and Challenges.” *Environmental Science and Pollution Research*, no. i.
<https://doi.org/10.1007/s11356-020-08903-0>.

- 27) Rodríguez Fernández-Alba, Antonio, Pedro Letón García, Roberto Rosal García, Miriam Dorado Valiño, Susana Villar Fernández, and Juana M. Sanz García. 2006. "Tratamientos Avanzados De Aguas Residuales Industriales." *Citme*, 6,8. 13, 30, 34.
- 28) Saldarriaga-Hernandez, Sara, Gustavo Hernandez-Vargas, Hafiz M.N. Iqbal, Damiá Barceló, and Roberto Parra-Saldívar. 2020. "Bioremediation Potential of *Sargassum* sp. Biomass to Tackle Pollution in Coastal Ecosystems: Circular Economy Approach." *Science of the Total Environment* 715. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136978>.
- 29) Sevilla, U., and E. U. Politécnica. 2011. "Manual Del Carbón Activo." *Aula.Aguapedia.Org*, 1–89.
http://aula.aguapedia.org/pluginfile.php/10339/mod_resource/content/1/CARBoN ACTIVO DEFINITIVO tar.pdf.
- 30) Tapia Quezada, Jaime Mauricio. 2010. "Departamento de Ciencia de Los Materiales e Ingeniería." Universidad Complutense de Madrid.
- 31) U.S. Epa. 2007. "Aquatic Life Ambient Freshwater Quality Criteria-Copper. 2007 Revision. EPA/822/R/07/001." *Environmental Protection*, no. February: 204.
- 32) Vera Cabezas, Luisa, María Uguña, Nancy García Alvear, Marittza Flores, and Verónica Vázquez Freire. 2016. "Eliminación de Los Metales Pesados de Las Aguas Residuales Mineras Utilizando El Bagazo de Caña Como Biosorbente." *Afinidad: Revista de Química Teórica y Aplicada* 73 (573): 43–49.

Anexo I

Medio de cultivo mínimo M9:

K ₂ HPO ₄ -----	6 g
KH ₂ PO ₄ -----	3 g
NH ₄ Cl -----	1 g
NaCl -----	0,5 g
2% extracto de levadura -----	2,50 mL
1 M CaCl ₂ -----	1 mL
1 M MgSO ₄ -----	2,2 mL

Aditivado con 2% glicerol por litro de agua destilada.

Se autoclavó a 1 atm de sobrepresión, 121 °C durante 20 minutos, las soluciones de CaCl₂ y MgSO₄ se esterilizaron por filtración y se agregaron en condiciones asépticas en campana de flujo laminar.

Medio de cultivo PYG:

Peptona -----	5 g.
Extracto de levadura -----	2,5 g
Glucosa -----	1 g

Por litro de agua destilada.

Se autoclavó a 1 atm de sobrepresión, 121 °C durante 20 minutos.

Curva de Calibración

Siguiendo el procedimiento especificado en materiales y métodos, se muestra a continuación, en la **Figura 54**, la curva de calibración para la determinación del cobre residual en cada ensayo.

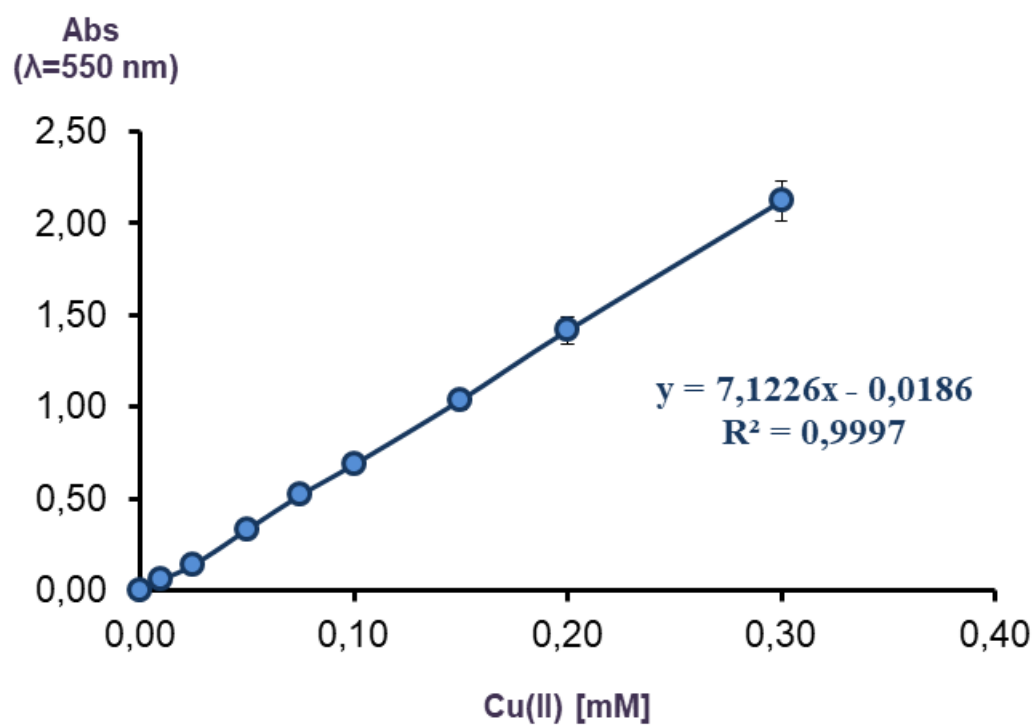


Figura 54. Curva de Calibración de Cu(II)