

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL  
CUSCO  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**BIOSORCIÓN DE PLOMO POR BIOMASA INACTIVA DE BACTERIAS  
AISLADAS EN SEDIMENTOS DE LIXIVIADOS DEL BOTADERO DE  
HAQUIRA – CUSCO**

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO**

**PRESENTADO POR:**

Br. JAVIER SANGA FLORES

**ASESORA:**

M.Sc. LUZ MARINA PONCE ARANIBAR

**CO-ASESORES:**

Mgt. ESTHER ÁLVAREZ MOSCOSO

Ing. Químico CORINA F. ÁLVAREZ NÚÑEZ

**CUSCO - PERÚ  
2016**

**TESIS FINANCIADA POR LA UNSAAC**

## Contenido

	Pag.
Resumen .....	I
Introducción.....	II
Planteamiento del problema .....	III
Justificación.....	IV
Objetivos.....	V
1.    Objetivo general .....	V
2.    Objetivos específicos.....	V
Hipótesis.....	VI
Capítulo I: Marco teórico .....	1
1.1 Antecedentes .....	1
1.2 Marco legal.....	8
1.2.1 Estándares de calidad ambiental para plomo. ....	8
1.3 Marco conceptual .....	10
1.3.1 Metales pesados. ....	10
Oligoelementos.....	10
Metales pesados sin función biológica conocida.....	10
1.3.2 Efectos en el ambiente de los metales pesados. ....	11
1.3.3 Plomo. ....	12
1.3.2.1 Características físicas y químicas.....	12
1.3.2.2 Fuentes y producción de plomo.....	12
1.3.2.3 Usos del plomo.....	14
1.3.2.4 El plomo en la salud humana.....	15
1.3.2.5 El plomo en el ambiente.....	20
1.3.4 Lixiviados y Sedimentos.....	22
1.3.5 Resistencia bacteriana a metales pesados.....	24
1.3.5.1 Mecanismos moleculares bacterianos para la resistencia a metales pesados.....	24
1.3.5.2. Localización genética de los determinantes de resistencia a metales pesados.....	28
1.3.5.3 Resistencia de bacterias al plomo.....	29
1.3.6 Estrategias para la remoción de metales pesados.....	30
1.3.6.1 Métodos físico – químicos.....	30
1.3.6.2 Biorremediación por medio de microorganismos.....	31
1.3.7 Biosorción .....	34
1.3.7.1 Mecanismos de biosorción.....	34
1.3.7.2 Estudio de Equilibrio.....	36
1.3.7.3 Modelos de equilibrio basados en sistemas ideales.....	38
1.3.7.4 Parámetros a considerar durante el proceso de biosorción.....	40
1.3.8 Biosorción de metales pesados por microorganismos.....	43
1.3.9 Biomasa bacteriana como biosorbente.....	46
1.3.9.1 Biomasa de bacterias Gram positivas.....	49
1.3.9.2 Biomasa de bacterias Gram Negativas.....	51
1.3.9.3 Biomasa de bacterias inactivas y activas.....	53
1.3.10 Botadero de Haquira.....	55
Capítulo II: Material y Métodos .....	59
2.1 Material .....	59
2.1.1. Materiales varios .....	59

2.1.2. Material de vidrio.....	59
2.1.3 Equipos y aparatos.....	60
2.1.4 Reactivos y medios de cultivo.....	60
2.2 Métodos.....	61
2.2.1 Lugar de ejecución de la investigación.....	62
2.2.2 Toma de muestra.....	62
2.2.3 Determinación del potencial de hidrogeniones (pH) en sedimentos de.....	64
2.2.4 Determinación de la concentración de plomo en sedimentos de lixiviados... 64	64
2.2.5 Aislamiento de cepas resistentes a plomo.....	64
2.2.6 Caracterización macroscópica y microscópica de las cepas resistentes al Plomo 65	65
2.2.7 Prueba de resistencia a Pb en medio de cultivo líquido.....	66
2.2.8 Identificación molecular de la cepa con mayor resistencia a Pb.....	67
2.2.9 Obtención de la biomasa bacteriana inactiva.....	67
2.2.10 Determinación de la biosorción de plomo por la biomasa inactiva.....	68
2.2.11 Análisis estadístico.....	74
Capítulo III: Resultados y Discusión.....	75
3.1. Contenido de plomo y pH en los sedimentos de lixiviados.....	75
3.2. Características de las cepas resistentes a plomo.....	76
3.3. Resistencia a plomo de las cepas pre-seleccionadas.....	77
3.3.1 Resistencia a Pb de la cepa BMA-01.....	78
3.3.2. Resistencia a Pb de la cepa BMA-02.....	80
3.3.3. Resistencia a Pb de la cepa BMA-03.....	82
3.3.4. Resistencia a Pb de la cepa BMA-04.....	84
3.3.5 Resistencia a Pb de la cepa BMA-05.....	86
3.4. Identificación molecular de la cepa BMA-04.....	90
3.5. Obtención de biomasa de la cepa BMA-04 <i>Proteus sp.</i> .....	92
3.5.1. Cinética de crecimiento.....	92
3.5.2. Producción de biomasa inactiva de la cepa BMA-04 <i>Proteus sp.</i> .....	93
3.6. Evaluación del proceso de biosorción por la cepa BMA-04 <i>Proteus sp.</i> .....	93
3.6.1. Optimización de parámetros para el proceso de biosorción.....	93
a). pH.....	93
b). Tiempo de contacto.....	96
c). Concentración de biomasa.....	98
3.6.2. Evaluación de la capacidad de biosorción de plomo por biomasa inactiva de BMA-04 <i>Proteus sp.</i> .....	100
3.6.3. Correlación de los valores experimentales con modelos de isothermas.....	102
3.6.4 Valoración de los posibles sitios de unión del Pb en la biomasa bacteriana.....	104
Conclusiones.....	107
Recomendaciones.....	108
Literatura consultada.....	109
Anexos.....	121

## Resumen

El presente trabajo de investigación se desarrolló entre los meses de agosto 2015 a marzo 2016. Tuvo como objetivo optimizar parámetros y evaluar el proceso de biosorción de plomo en agua simulada por medio de biomasa inactiva bacteriana como sorbente, obtenida a partir de la cepa con mayor resistencia a este metal, aislada de sedimentos de lixiviados del botadero de Haqaira de Cusco. Del proceso de enriquecimiento se aislaron cinco cepas resistentes a una concentración  $> 93,8$  mg/L de Pb (BMA-01, BMA-02, BMA-03, BMA-04 y BMA-05) todas Gram negativas, de las cuales la primera correspondía a cocabacilos y las cuatro restantes a bacilos. Las cinco cepas fueron sometidas a concentraciones crecientes de Pb (0; 62,56; 187,7; 375,35; 500,47; 625,59; 688,15; 750,71; 813,36; 875,82 mg/L) para evaluar su resistencia a este metal. Se seleccionó la cepa BMA-04, por su mayor resistencia (crecimiento a  $> 875,82$  mg/L Pb). La identificación molecular indica que se trataría de una posible mutación o nueva especie de *Proteus sp.*, enterobacteria de la que no se encuentra reportes de estudios en biosorción. La fase estacionaria de crecimiento de la cepa se registró a partir de las 26 horas, por lo que se obtuvo la biomasa a partir de un cultivo con 30 horas de incubación en caldo nutritivo a 30°C; la misma que fue inactivada a 121°C x 15 minutos, recuperada por centrifugación y secada a 60°C por cuatro 4 h y 105°C por 6 h. Se produjo 0,565 g de biomasa seca/L, el cual constituyó el biosorbente.

Las pruebas de biosorción se desarrollaron a escala de laboratorio instalando sistemas en frascos conteniendo soluciones acuosas de Pb con el biosorbente bacteriano, bajo condiciones de agitación (130 rpm) y 18°C. El plomo residual se determinó por espectrofotometría de absorción atómica (EAA). Los parámetros optimizados fueron: pH 5, biomasa 1g/L y tiempo de contacto 180 minutos. Dichos parámetros se establecieron en pruebas para la elaboración de una isoterma de adsorción, cuyos resultados ajustados al modelo de Langmuir determinó que la capacidad máxima de biosorción ( $Q_{max}$ ) es 80,64 mg de Pb/gramo de biomasa bacteriana inactiva, que implica la formación de una monocapa molecular de unión entre el metal y la biomasa, además sugiere que se lleva a cabo una quimiosorción, la cual se corroboró con espectroscopía por transformada de Fourier (FTIR) de la biomasa, la cual revela intercambios iónicos entre el plomo y los grupos hidroxilos, aminas y carboxilatos de la pared bacteriana.

## Introducción

En las últimas décadas, con el acelerado desarrollo industrial y crecimiento de las poblaciones, se han generado serios problemas de contaminación por metales pesados. Estos constituyen agentes persistentes en el ambiente, y los organismos expuestos a ellos tienden a acumularlos en sus tejidos, incluso en concentraciones más altas de las que normalmente se encuentran en el ambiente, por lo que a través de las cadenas tróficas pueden pasar al hombre, pudiendo provocar síntomas de intoxicación (Pineda, 2004).

Los métodos químicos para el tratamiento de estos agentes contaminantes suelen ser costosos e inefectivos ante bajas concentraciones. Por otro lado, encontramos en la naturaleza una gama de microorganismos con una diversidad metabólica para tolerar y acumular metales pesados, ello constituye una herramienta para adaptarse a medios altamente contaminados. Estas interacciones metal - microorganismo se han ido estudiando en el contexto de la biotecnología ambiental, con el objetivo de implementar métodos de remoción, recuperación o detoxificación de metales pesados y radionúclidos (Zhou & Kiff, 1991; Gadd, 2009; Lovley, 2000).

La biorremediación es un proceso biológico, espontáneo o controlado, que busca mitigar la contaminación ambiental. En la actualidad se destaca el empleo de métodos basados en la biosorción. Entre los biosorbentes más novedosos empleados, se encuentra la biomasa microbiana de hongos, algas, bacterias y levaduras. Además de otros productos como hojas, raíces, corteza y componentes de frutos de diferentes especies de plantas. Estos materiales tienen la capacidad de concentrar y acumular metales a partir de interacciones entre soluciones acuosas diluidas y ciertos constituyentes estructurales (Glazer y Nikaido, 1998; Cañizares, 2000).

En el presente trabajo se seleccionaron cepas bacterianas, por su resistencia al plomo, que fueron aisladas de sedimentos contenidos en las pozas de lixiviados del botadero de Haqira que viene funcionando desde el año 2001 bajo la dirección de la Municipalidad del Cusco. Se asume que desde entonces las sucesivas generaciones de la población bacteriana fueron sometidas al efecto de diversos contaminantes entre ellos el plomo. Los estudios de biosorción demuestran que los microorganismos aislados de ambientes contaminados con metales pesados, que ofrecen resistencia ante la presencia de estos, suelen poseer gran eficiencia para la remoción de este tipo de contaminantes. En tal sentido, se evaluó el proceso de biosorción de plomo por la biomasa bacteriana obtenida de estas cepas.

## **Planteamiento del problema**

La contaminación del agua por plomo, es un problema ambiental severo que afecta a nuestro país desde hace muchos años, si bien, está presente en forma natural, la mayor parte de la contaminación ha sido generada por el hombre, resultado del empleo de prácticas agrícolas inadecuadas, explotación minera y su amplia utilización en procesos industriales (Rojas, 2010).

En sus formas orgánicas e inorgánicas el plomo suele ser absorbido por las plantas y organismos acuáticos, causando diversas alteraciones en su metabolismo. Ya sea al consumir estos, ingerir agua contaminada o exponerse directamente, este metal pesado ingresa al hombre causando afecciones en la salud (Kiely, 1999; Ferguson, 1990)

El plomo como metal pesado no puede degradarse, solo transformarse y/o retirarse del medio acuático. Por esto, las soluciones actuales de remediación de este y otros iones metálicos requieren de altos costos y un gran avance tecnológico (Llobet *et al.*, 2000; Glazer y Nikaido, 1998).

Frente a los riesgos del plomo en la salud humana y el impacto que ocasiona principalmente en ecosistemas acuáticos, se planteó la presente investigación formulando la siguiente interrogante:

¿Es un eficaz biosorbente la biomasa inactiva de cepas resistentes a plomo, aisladas en los sedimentos de las pozas de lixiviados del botadero de Haquira?

## **Justificación**

La problemática ambiental generada por la presencia del plomo en el recurso hídrico, su propagación, bioacumulación, biomagnificación en las cadenas tróficas y consecuentemente el ingreso al hombre, viene generando daños al ambiente y a la salud. Para la remoción de este y otros metales pesados en efluentes líquidos, existen diferentes métodos físicos y químicos como: precipitación, intercambio iónico y ósmosis inversa. Pero estos demandan gran consumo de energía y productos químicos, además son poco efectivos al aplicarlos en soluciones metálicas diluidas.

Para biorremediar plomo y otros iones metálicos en el agua, la Biotecnología ofrece la biosorción por bacterias y microorganismos, que tienen la capacidad de captar cationes eficientemente a concentraciones metálicas menores a 100 mg/L, siendo su aplicación de bajo coste. Es por ello que se encuentra en crecimiento constante la búsqueda de este tipo de microorganismos que generalmente son aislados de ambientes contaminados. En la presente investigación los sedimentos de lixiviados del botadero Haqira de Cusco sirvió como fuente para obtener cepas bacterianas y su correspondiente biomasa con las cualidades requeridas para la remoción de plomo de soluciones acuosas.

## **Objetivos**

### **1. Objetivo general**

La biosorción de plomo, por biomasa inactiva de bacterias aisladas en sedimentos de lixiviados del botadero de Haqira.

### **2. Objetivos específicos**

- a.** Determinar la concentración de plomo en sedimentos de lixiviados del botadero de Haqira.
- b.** Seleccionar una cepa bacteriana aislada de los sedimentos de lixiviados del botadero de Haqira que muestre mayor resistencia a plomo.
- c.** Obtener biomasa inactiva de la cepa con mayor resistencia a plomo.
- d.** Evaluar el proceso de biosorción de plomo por la biomasa bacteriana inactiva obtenida.

## **Hipótesis**

La biomasa inactiva de bacterias aisladas en sedimentos de lixiviados del botadero de Haqira-Cusco tiene la capacidad de biosorber plomo.

## Capítulo I: Marco teórico

### 1.1 Antecedentes

#### 1.1.1 Internacionales.

**Ruíz, A. y Col. (Distrito federal de México, 1998).** Evaluaron el potencial de *Thiobacillus ferrooxidans* como biosorbente para tratar corrientes de aguas contaminadas con cobre y níquel. Como primer paso determinaron las condiciones con las que se obtenía menor tamaño de partícula, utilizando células metabólicamente inactivas con y sin tratamiento en NaOH y células sin tratamiento en NaOH con solución disgregante (sacarosa 0.5 M, tritón 100X al 0.1% y formalina al 0.2%), en los tres casos se obtuvo que el tamaño de partícula del biosorbente en un 80 y 90% fue 15 $\mu$ . Para la evaluación de la biosorción utilizaron la biomasa bacteriana tratada con NaOH, basándose en la literatura consultada que afirma que el tratamiento sugiere una mejora de los sitios de unión y por ende un efecto positivo en la capacidad de biosorción.

La cinética de biosorción demuestra que la mayoría del proceso se llevó a cabo en los primeros 15 minutos y que la biomasa de *Thiobacillus ferrooxidans* tratada, posee alta capacidad para biosorber cobre cuando el proceso se opera a 25°C y pH 6, obteniendo un  $Q_{max} = 119,54 \text{ mg/g}$ , esto mismo se aplica para el caso del níquel cuando el sistema se opera a pH 2, con un  $Q_{max} = 49.68 \text{ mg/g}$ .

**Garza, M. (La Habana – Cuba, 2005).** Investigó la interacción microorganismos-ambientes contaminados con metales pesados. Se aislaron 72 microorganismos, entre bacterias, hongos filamentosos, levaduras y algas. Los mayores valores de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para Pb(II), Cr(II), Cu(II), Zn(II) y Ni(II) oscilaron entre: 200 - 3700 mg/L de Pb (II), 200 - 3400 mg/L de Cr (VI), 200 - 2400 mg/L de Cd (II), 200 - 3700 mg/L de Cu (II), 200 - 3200 mg/L de Zn (II), y Ni (II) 200 - 3200 mg/L. En los aislados bacterianos se identificaron los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus* y *Corynebacterium*. Entre los hongos se encontraron los géneros *Fusarium*, *Paecilomyces*, *Acremonium*, *Rhizopus*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Alternaria* y *Rhodotorula* y el aislado de algas se ubicó en el género *Chlorella*. Se demostró la capacidad de remoción de los metales mencionados con

empleo de biomasa de *Bacillus brevis* cepa 5, *Rhodotorula mucilaginosa* cepa A, *Acremonium falciforme* cepa A-3 y *Chlorella pyrenoidosa* cepa G; estas dos últimas se destacaron por sus capacidades de remoción de Pb (II) y Cr (VI) ( $Q_{\max}$  por encima de 80 mg/g de biomasa). Se seleccionó a *Chlorella pyrenoidosa* cepa G. para continuar los estudios de biosorción. Se definió que la remoción de los cationes metálicos se llevó a cabo en tiempos cortos, de 1 a 5 minutos, determinando que las concentraciones entre 0,5 a 1 g/L de biomasa son suficientes para lograr buenos resultados y que por lo general se liberan  $H^+$  en el proceso de biosorción. Se evidenció que los elementos metálicos pueden unirse en forma iónica a los grupos carboxilos y en forma covalente a los grupos amino de la pared celular del alga. La biomasa seleccionada resultó ser eficiente para la remoción de Pb en disoluciones mono, di y polimetálicas, tanto en forma libre como inmovilizada.

**Rodríguez, M. y Col. (Nuevo León – México, 2008).** Estudiaron los efectos de las variables: pH, concentración de iones, presencia de electrólitos, concentración y tratamiento de biomasa sobre la biosorción de iones  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  y  $Cr^{3+}$  en soluciones mediante el uso de *Saccharomyces cerevisiae* no-viva.

El pH, la concentración de biomasa y el tratamiento previo tuvieron un efecto significativo sobre la biosorción de  $Pb^{2+}$ . Para la biosorción del  $Cr^{3+}$  solo fueron significativos los efectos del pH y la concentración de biomasa, mientras que para la biosorción del  $Cd^{2+}$  fueron significativos los efectos de la concentración de biomasa, el pH y la presencia de todos los co-iones presentes en solución.

A pH 5,0 los porcentajes de extracción de  $Cr^{3+}$  y  $Pb^{2+}$  fueron del 47% y 56% respectivamente. A pH 3,0 el porcentaje de retención fue menor para todos los metales. El porcentaje de extracción del  $Pb^{2+}$  fue mayor que el de  $Cr^{3+}$  y  $Cd^{2+}$ , lo cual muestra fuertes indicios de la afinidad entre este ión metálico y la levadura.

En el caso del  $Cd^{2+}$  no se observó adsorción significativa a las condiciones en que se trabajó, por lo que se siguieron investigando las condiciones óptimas para la adsorción de cadmio.

**Galicia, J. (Oaxaca – México, 2010).** Evaluó el efecto de la exposición de Pb en bacterias aisladas de efluentes contaminados, con el objetivo de comprobar la idea que las proteínas de los cuerpos de inclusión forma parte de una posible respuesta

al estrés ocasionado por la exposición a Pb. Para lo cual aisló tres cepas provenientes de un ambiente contaminado con metales pesados y fueron identificadas como *Hafnia alvei*, *Bacillus pumillus* (Cepa Eco) y *Bacillus pumillus* (Cepa playa de Mono). Llegando a demostrar que *Hafnia alvei* aislada de un medio contaminado con Pb 1,2 ppm y cromo 2,3 ppm, constituyo la cepa que presento mayor tolerancia a la exposición a concentraciones crecientes de Pb en medio de cultivo liquido hasta una concentración de 6.59 mM, mientras que *Bacillus pumillus* (Cepa playa de Mono) presento un crecimiento a una concentración máxima de 5.66 mM y *Bacillus pumillus* (Cepa Eco), 1,95 mM. Por otra parte se establece la relación entre exposición al metal y la presencia de bandas de proteínas de inclusión.

**Guevara, D. (Sangolqui – Ecuador, 2010).** Utilizó dos consorcios bacterianos nativos compuestos, denominados I5, obtenidos por exposición del medio de cultivo con colorantes al ambiente y M3 aislado de una muestra de suelo contaminado con agua textil de esta ciudad, con la finalidad de evaluar la remoción de Cr (VI) con biomasa viva y muerta, utilizando como fuente de Cr al cromato de potasio ( $K_2CrO_4$ ). Para los ensayos con células vivas se utilizó un pH 6 a 35°C y concentraciones iniciales de 10, 50 y 100 mg/L de Cr (VI), obteniendo un porcentaje de remoción de 98% para la concentración de 10 mg/L con los dos consorcios, mientras que en las dos concentraciones restantes, el crecimiento bacteriano se vió afectado, resultando inhibitorias. Con respecto a la biomasa muerta se utilizaron los mismos consorcios previamente autoclavados a 121°C por 15 min los cuales fueron adicionados a concentraciones iniciales de 2, 10, 20, 35 y 50 mg/L a pH 2, en cantidad de 1g/L de peso seco a 35°C, 150 rpm por 2 horas, obteniéndose porcentajes de remoción entre 40 a 70% para la biomasa muerta de I5 y entre un 20 a 40 % para M3. El inoculo más adecuado para la remoción de cromo fue el inoculo I5 tanto para biomasa viva y muerta.

**Suazo, E. y Col. (La Habana – Cuba, 2010).** Emplearon la biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* sin pretratamiento y pretratada con HCl 1 N (levadura protonada) para estudiar la influencia del pH sobre la biosorción de Ni(II). Los experimentos se realizaron a diferentes pH, desde 3,5 a 7,5 con una concentración inicial 1 mM de Ni(II) y 1 g/L de biomasa a 25°C. La

biosorción se incrementó a medida que el pH también lo hacía, y fue más alta a pH 7,5.

La capacidad de biosorción de Ni(II) fue 11,55 mg/g de biomasa de levadura protonada, que fue capaz de remover 74,2% más Ni(II) que la levadura sin pretratamiento. Asimismo, la velocidad volumétrica de biosorción de Ni(II) de la biomasa protonada fue mayor que la levadura no pretratada.

**Dimas, G. (Monterrey – México, 2011).** Evaluó exitosamente las capacidades de adsorción de cada ion metálico por las biomásas de levadura residual de cerveza, levadura de panadería y el alga *Caulerpa sp.*, encontrándose que el Pb (II) y Cr (III) se adsorben en mayor proporción que el Cd (II) y Zn (II). El orden de capacidad de adsorción de las biomásas es el siguiente: levadura residual de cervecería > *Caulerpa sp.* > levadura de panadería. Obteniendo  $Q_{max}$  de Pb a pH 5: 86,59 mg/g; 69,36 mg/g; 51,85 mg/g respectivamente para cada uno de los microorganismos. Los grupos funcionales que participan el proceso de biosorción de la levadura residual de cerveza y de la levadura de panadería son los grupos carboxílicos, aminos y fosfatos, para *Caulerpa sp.* son los carboxilos, aminos, sulfonatos y silicatos. El mecanismo que predomina en el proceso de biosorción para las tres biomásas es el intercambio iónico.

**Muñoz, A. y Col. (Jaén – España, 2012).** Seleccionaron microorganismos autóctonos que pueden ser capaces de biosorber metales pesados en sistemas acuosos. 48 cepas, incluidos hongos, levaduras y bacterias, fueron aislados de muestras de agua y fango de aguas residuales urbanas y plantas industriales de tratamiento en la provincia de Jaén. Los aislados purificados fueron seleccionados en base a su resistencia a Pb (II), el Zn (II) y Ag (I). Diez cepas fueron seleccionadas e identificadas por técnicas moleculares. El índice de tolerancia y concentración mínima inhibitoria (CMI) para los tres metales fueron también determinados. Puede ser notable que la tolerancia de las cepas parece estar asociada con los sitios de su aislamiento. Los mejores resultados fueron obtenidos para el hongo *Trichosporon sp.* 4S3 que mostró las siguientes CMI: 32-35 mM para Pb, 16 - 18 mM para Zn y 3 - 5mM para Ag. El uso de cepas nativas puede ser una interesante alternativa para los procesos de biorremediación de metales pesados. Este estudio incrementa el número de cepas microbianas que tienen la

habilidad para resistir relativamente las más altas concentraciones de metales, los cuales pueden hacerlas recomendables como potenciales biosorbentes de bajo costo.

**Tur, E. y Col. (Santiago de Cuba – Cuba 2012).** Valoró las potencialidades de la biomasa seca de *Bacillus subtilis* CCEBI 1032, *Pseudomonas aeruginosa* CCEBI 1044 y *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 para la biosorción de Pb (II) en soluciones acuosas, teniendo en cuenta tres niveles de pH. Los mejores resultados de remoción de Pb se obtuvieron a 60 min de exposición y a valores de pH: 4,2 para *Bacillus subtilis* CCEBI 1032; 5,2 para *Pseudomonas aeruginosa* CCEBI 1044 y *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011 con 6,2. Las eficiencias de remoción fueron: 83,1%, 97,4% y 97,2% respectivamente.

### 1.1.2 Nacionales.

**Villanueva, C. (Lima, 2006).** Investigó la biosorción de Cu (II) por las biomasas pretratadas de cáscara de *Citrus sinensis* (naranja), *Citrus limonium*, (limón) y *Opuntia ficus* (palmeta de nopal). Las biomasas fueron tratadas con cloruro de calcio, el cual les proporciona una mayor estabilidad mecánica. Los experimentos sobre el efecto del pH en el proceso de biosorción de Cu (II) mostraron que el rango óptimo de pH se encuentra entre 4,5 - 5,0. Los datos experimentales obtenidos se procesaron usando las ecuaciones adsorción de Langmuir y Freundlich. La máxima capacidad de biosorción ( $Q_{max}$ ) de Cu (II) por las biomasas fueron: 36,1011 mg Cu/g de cáscara de *Citrus sinensis*; 47,0436 mg Cu/g de cáscara de *Citrus limonium* y 44,2567 mg Cu/g de *Opuntia ficus*.

**Muñoz, J. (Lima, 2007).** Investigó la biosorción de Pb(II) usando como biosorbente la cáscara de naranja "*Citrus cinensis*". El pretratamiento del material biosorbente se llevó a cabo mediante la reticulación con una solución 0,2M de  $CaCl_2$ , el pH de esta solución se ajustó a 5 usando una solución 0.05 M de HCl. El tamaño de partícula fue de 180 – 250  $\mu m$ . Los experimentos sobre el efecto del pH en el proceso de biosorción de Pb(II) por cáscara de naranja pretratada mostraron que el rango óptimo de pH se encontraba entre 4,5 – 5,0.

Del estudio de la cinética de la biosorción, se determinó que el equilibrio se alcanzó a las 4 horas de inicio del proceso, logrando un porcentaje de remoción de Pb(II) del 40%.

Los resultados de los experimentos en batch se procesaron con la ayuda de las ecuaciones de Langmuir y Freundlich. La máxima capacidad de adsorción ( $Q_{max}$ ) de Pb(II) por la cáscara de naranja pretratada fue de 141,05 mg/g.

**Pauro, J. y Col. (Puno, 2009).** Evaluaron la influencia de dos niveles de pH en la biosorción de Pb por *Sacharmyces cereviceae*. Se ensayaron dos concentraciones de *S. cereviceae* (cel/mL), las cuales fueron cuantificadas por un hemocitómetro y luego traspasadas a una solución con concentraciones conocidas de Pb (5 y 25 mg/L). Se realizaron lecturas de las concentraciones de Pb a los 5, 60 y 120 minutos. El mayor porcentaje de biosorción resultó cuando *S. cereviceae* estuvo a una concentración de  $5 \times 10^6$  cel/mL con pH óptimo 5,14. La eficiencia de biosorción fue entre el 50,68 y 90,16% en un tiempo de contacto de 5 y 120 min respectivamente. Se concluye que *S. cereviceae* constituye una buena alternativa para la biosorción de Pb.

**Gutiérrez, S. (Lima, 2015).** Seleccionó una cepa bacteriana que pueda servir como biosorbente microbiano a partir de 122 cepas aisladas de un ambiente minero, se probó la resistencia a metales pesados, velocidad de crecimiento y capacidad de producción de biomasa. En base a estos parámetros se seleccionó la cepa *Serratia marcescens* M8A-2T que fue identificada empleando el gen del RNAr 16S, se determinó su naturaleza física y genética de resistencia a metales pesados. Se optimizó los parámetros físico-químicos de remoción de cadmio y plomo.

Se obtuvieron 27 cepas bacterianas resistentes a metales pesados: 2 cepas resistieron hasta 80 000 ppm de zinc, 20 cepas a 16 000 ppm de níquel, 1 cepa a 36 000 ppm de cromo, 23 cepas a 800 ppm de cadmio y 80 cepas a 32 000 ppm de plomo. *S. marcescens* no presentó plásmidos en la electroforesis en gel de agarosa. En la microscopía electrónica de transmisión se pudo observar que el metal se adhería a la superficie bacteriana, por lo tanto el proceso de remoción es de biosorción.

La biomasa logró remover 99,97 % de cadmio a pH 3 y 96 % de plomo a pH 7 después de 60 minutos de enfrentamiento con 100 ppm de cada uno de los metales. La remoción fue independiente de la concentración inicial de metal y operó muy bien a 1 mg/ml de concentración de biomasa con granulometría menor a 50  $\mu\text{m}$ .

Las isotermas de Langmuir indican que la biomasa de la cepa en estudio tiene un  $Q_{\text{max}} = 417$  mg de cadmio/g de biosorbente y de 357 mg de plomo/g de biosorbente, ambos resultados, en 15 minutos de exposición al metal, las cuales se ajustaron en 98,3 % a este modelo matemático.

Estos resultados indican que la cepa es apta para ser empleada en procesos de biosorción de cadmio y plomo, además que, el proceso está optimizado para su escalamiento a nivel piloto.

### 1.1.3 Locales.

**Delgado, L. y Huamán, L. (2010).** Evaluaron la capacidad remediadora de *Elodea potamogeton* (Bertero) en aguas contaminadas con plomo bajo condiciones controladas, los individuos de esta especie fueron colectados en la laguna Huacarpay – Cusco. Las condiciones óptimas para su desarrollo en agua de clorada fueron: 18°C, 12 horas de luz, pH 7 – 9. Utilizando acetato de plomo  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  como contaminante. Se realizaron análisis de espectroscopía de absorción atómica (EAA) determinando que *Elodea potamogeton* posee una capacidad de absorción: 11.95 mg Pb/g de planta seca de una concentración de 40 ppm del contaminante y además concluyen que a mayores concentraciones la capacidad remediadora de *Elodea potamogeton* decrece.

**Maldonado, A., Luque C. y Urquizo, D. (2012).** Investigaron la remoción de plomo de un agua simulada con 30 ppm Pb (II), utilizando como biosorbente *Pennisetum clandestinum Hochst* (Kikuyo) preparado mediante un proceso de hidrólisis ácida seguido de una hidrólisis básica. En el proceso de adsorción se estudiaron las variables independientes: dosis del biosorbente, velocidad de agitación y pH, y como variable respuesta la capacidad de adsorción (Q). Se logró una capacidad máxima de adsorción ( $Q_{\text{max}}$ ) de 139,35 mg/g con 0,06 g de dosis de biosorbente (kikuyo), 100 rpm de agitación y pH 6. Se determinó el modelo matemático que relaciona Q con la variable más significativa, dosis del biosorbente ( $D_0$ ). La cinética de adsorción, obedece a un modelo de primer orden

( $R^2 = 0,9445$ ); donde el valor de  $k = 0,0089 \text{ t}^{-1}$ . El modelo de Langmuir es el que representa el proceso de adsorción ( $R^2 = 0,9955$ ).

## 1.2 Marco legal

### 1.2.1 Estándares de calidad ambiental para plomo.

Considerando que, el artículo 31° de la Ley N° 28611, define a “*Estándar de Calidad Ambiental (ECA) como la medida que establece el nivel de concentración o del grado de elementos, sustancias o parámetros físicos, químicos y biológicos, presentes en el aire, agua o suelo en su condición de cuerpo receptor, que no representa riesgo significativo para la salud de las personas ni al ambiente. El ECA es obligatorio en el diseño de las normas legales y las políticas públicas; así como referente obligatorio en el diseño y aplicación de todos los instrumentos de gestión ambiental*”.

Los estándares nacionales de calidad ambiental de acuerdo al uso del agua y suelo, se muestran en la tabla 01, especificándose el parámetro plomo.

**Tabla 1***Estándares de calidad ambiental para plomo en agua y suelo*

	Categoría	Clasificación	Sub clasificación	Concentración de Plomo	
<b>Agua</b>	Categoría 1: Poblacional y recreacional.	Aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable	Aguas que pueden ser potabilizadas por desinfección	A1	0,01 mg/L
			Aguas que pueden ser potabilizadas por tratamiento convencional	A2	0,05 mg/L
			Agua que puede ser potabilizada con tratamiento avanzado	A3	0,05 mg/L
		Aguas superficiales destinadas al uso recreacional	Contacto primario	B1	0,01 mg/L
			Contacto secundario	B2	**
			Categoría 2: Actividades marino costeras.	Extracción y cultivo de moluscos bivalvos	C1
	Extracción y cultivo de otras especies hidrobiológicas	C2		0,081 mg/L	
	Otras actividades	C3		0,081 mg/L	
	Categoría 3: Riego de vegetales y bebidas de animales.	Parámetros para riego de vegetales de tallo bajo y tallo alto			0,05 mg/L
					0,05 mg/L
		Lagunas y lagos			0,001 mg/L
	Categoría 4: Conservación del ambiente acuático.	Ríos	Ríos de costa y sierra	01	0,001 mg/L
			Ríos de la selva	02	0,001 mg/L
Estuarios				0,0081 mg/L	
Marinos				0,0081 mg/L	
<b>Suelo</b>	Suelo agrícola			70 mg/Kg MS	
	Suelo Residencial/ Parques			140 mg/Kg MS	
	Suelo comercial/ industrial/ Extractivos			1200 mg/Kg MS	

*Nota:* \*\* Se entenderá que para esta subcategoría el parámetro no es relevante salvo casos específicos que la autoridad competente determine.

Fuente: (MINAM, 2008; MINAM, 2013).

## 1.3 Marco conceptual

### 1.3.1 Metales pesados.

Se considera metal pesado al elemento metálico que tiene una densidad igual o superior a  $6 \text{ g/cm}^3$  cuando está en forma elemental, o cuyo número atómico es superior a 20 (excluyendo los metales alcalinos o alcalinotérreos). Su presencia en la corteza terrestre es inferior al 0,1% y casi siempre menor del 0,01%. Junto a estos metales pesados hay otros elementos químicos, arsénico, boro, bario y selenio que se suelen englobar con ellos por presentar orígenes y comportamientos asociados. (Kabata & Pendías, 1992).

Dentro de los metales pesados se distinguen dos grupos:

#### *Oligoelementos.*

Necesarios para el desarrollo de la vida de determinados organismos, son requeridos en pequeñas cantidades o cantidades en trazas y pasado cierto umbral se vuelven tóxicos. Dentro de este grupo se encuentran: As, B, Cr, Cu, Mo; Mn, Ni; Se y Zn. (Arce, 2000).

#### *Metales pesados sin función biológica conocida.*

Metales cuya presencia en determinadas cantidades en los seres vivos, provocan disfunciones en sus organismos. Resultan altamente tóxicos y presentan la propiedad de acumularse en los organismos vivos. Son principalmente: Cd, Hg, Pb, Cu, Ni, Sb, Bi (Arce, 2000).

Los metales pesados han sido objeto de atención por sus características contaminantes peculiares:

- Poseen carácter acumulativo, su concentración no disminuye con el tiempo.
- Son necesarios y beneficiosos para las plantas y otros organismos a determinados niveles, pero también son tóxicos cuando exceden los niveles de concentración.
- Están siempre presentes en los suelos a unos niveles de concentración denominados niveles fondo, cuyo origen no es externo, sino que proviene del material parental originario de las rocas y su transformación.

- Con frecuencia se encuentran como cationes que interactúan fuertemente con la matriz del suelo, lo que en ocasiones se traduce en que incluso a altas concentraciones pueden encontrarse en forma química no dañina o inerte. Sin embargo estos metales pueden movilizarse y cambiar de forma química debido a cambios en las condiciones medioambientales, cambios en el uso del suelo o por saturación de la capacidad de tamponamiento del suelo (Fachinelli *et al.*, 2001).

### **1.3.2 Efectos en el ambiente de los metales pesados.**

La peligrosidad de los metales pesados es mayor al no ser química ni biológicamente degradables. Una vez emitidos, pueden permanecer en el ambiente durante cientos de años. Además, su concentración en los seres vivos aumenta a medida que son ingeridos por otros, por lo que la ingesta de plantas o animales contaminados puede provocar síntomas de intoxicación (Arce, 2000). Dicho fenómeno se da con los metales mercurio y aluminio, en mamíferos consumidores de pescado y en pájaros insectívoros respectivamente.

Se sabe muy poco sobre los efectos de los metales en los ecosistemas. En cursos de agua dulce donde fluyen relaves mineros se producen con frecuencia efectos ecológicos evidentes como, por ejemplo, una gran reducción de la fauna invertebrada y la ausencia de peces.

Los metales disueltos en el medio acuoso son fácilmente absorbidos por la biota acuática; es decir, tienen una alta biodisponibilidad en este medio (capacidad de interacción de un contaminante en el sistema biológico). Los metales que se bioconcentran (concentración del contaminante en los tejidos de la biota con la concentración de ese mismo contaminante en el medio) en las algas marinas son el Aluminio (Al), Cobre (Cu), Mercurio (Hg), Manganeso (Mn), Níquel (Ni), Plomo (Pb) y Zinc (Zn). En la biota acuática se acumulan principalmente el Cadmio (Cd) y el Mercurio (Hg); el Manganeso (Mn) en el esqueleto de los peces. Esta acumulación depende de la acidez del medio acuoso y de la disminución de la concentración acuática del calcio.

Una vez alcanzadas concentraciones tóxicas, puede necesitarse mucho tiempo para reducirlos a niveles no tóxicos. Ningún contaminante actúa en forma aislada sobre un receptor. La capacidad de absorción de metales por las plantas varía

con la acidez, el contenido orgánico y otras características del suelo (Vega y Reynaga, 1990).

### **1.3.3 Plomo.**

El plomo es un metal pesado, de baja temperatura de fusión, de color gris-azulado que se encuentra naturalmente en la corteza terrestre. Sin embargo, raramente está en la naturaleza en la forma de metal, generalmente se encuentra combinado con otros dos o más elementos formando compuestos de plomo. (ATSDR, 2005).

#### ***1.3.2.1 Características físicas y químicas.***

El plomo tiene una densidad relativa o gravedad específica 11,34 g/cm<sup>3</sup> a 20°C. Físicamente el plomo es de color azulado, se empaña para adquirir un color gris mate, es flexible, inelástico y se funde con facilidad. Su punto de fusión es 327,4°C y el de ebullición es 1725°C. Las valencias químicas normales son 2<sup>+</sup> y 4<sup>+</sup>. Químicamente, combinado con otros elementos forma compuestos con características únicas y altamente útiles, tiene la capacidad de formar sales plúmbicas y plumbosas, óxidos y compuestos. Es relativamente resistente al ataque de ácido sulfúrico y ácido clorhídrico, aunque se disuelve con lentitud en ácido nítrico y ante la presencia de bases nitrogenadas. (Petrucci *et al.*, 2003, Orozco, 2006).

#### ***1.3.2.2 Fuentes y producción de plomo.***

Se encuentra en tres posibles estados:

- Plomo metálico: Es tóxico al fundirse a 5000°C, emitiendo vapores que alcanzan fácilmente los alveolos. Estos vapores se oxidan rápidamente, haciéndose poco solubles y cayendo al suelo. Es la forma fundamental de contaminación ambiental (WHO, 1977; Villanueva, 1991).
- Derivados inorgánicos: Son los óxidos de plomo como el minio (Pb<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) también conocido como plomo rojo, el litargirio (PbO) de color amarillo y

la plattnerita ( $\text{PbO}_2$ ) de color marrón rojizo, los cromatos entre los que se encuentra la crocoita ( $\text{PbCrO}_4$ ), los sulfatos y sulfuros como la anglosita (Sulfato de plomo II,  $\text{PbSO}_4$ ) y la galena (Sulfuro de plomo,  $\text{PbS}$ ), el arseniato de plomo y los carbonatos como la cerusita (Carbonato de plomo,  $\text{PbCO}_3$ ).

Uno de los pocos compuestos solubles es el nitrato de plomo (II) ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ) que se forma de la reacción del  $\text{PbO}_2$  con el ácido nítrico (Petruchi *et al.*, 2003) según la siguiente reacción:



- Derivados orgánicos: Son derivados orgánicos, el acetato de plomo (azúcar del plomo) que es soluble en agua y una de las formas más biodisponibles de este elemento con propiedades abortivas, el tetraetilo de plomo, antidetonante, el estearato de plomo, que da consistencia al plástico y el naftenato de plomo, componente de los aceites y grasas de uso industrial (WHO, 1977; Villanueva, 1991).

En el mundo se produce aproximadamente 3.3 millones de toneladas de concentrados de plomo por año, producto de operaciones mineras. Los 5 productores más importantes suman alrededor del 81% de toda la producción, siendo el más importante de ellos, China con alrededor de 1 millón de toneladas. Le siguen Australia, Estados Unidos, Perú y México (Figura 01) (SNMPE, 2015).

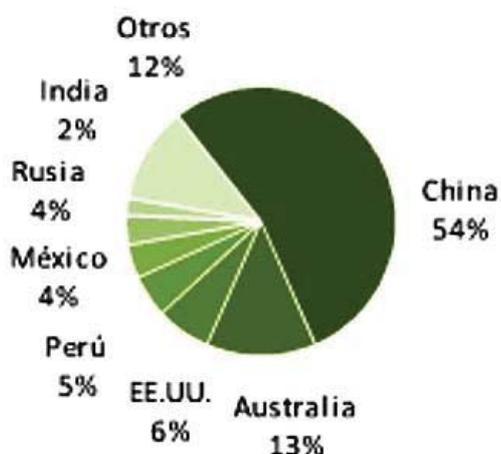


Figura 01. Principales países productores de plomo en el 2014.  
Fuente: (SNMPE, 2015).

El Perú es el cuarto productor mundial de plomo, en el 2014 produjo 278 mil toneladas, volumen que fue resultado de operaciones empresariales como: Volcán Compañía Minera, Compañía Minera Milpo, Sociedad Minera Corona, Compañía de minas Buenaventura y Empresa Minera los Quenuales, las cuales en conjunto representan el 52% de la producción nacional. Durante el mismo año, las principales regiones productoras de plomo en el Perú fueron: Pasco con el 29% del total, Lima (22%) y Junín 16%, estas tres regiones explicaron el 67% de la producción peruana de plomo para el 2014 (SNMPE, 2015).

### ***1.3.2.3 Usos del plomo.***

Actualmente los usos del plomo son innumerables, un 40 % del plomo se utiliza en forma metálica, un 25 % en aleaciones y un 35 % en compuestos químicos. El mayor uso, son los óxidos de plomo como el  $PbO$  y  $Pb_3O_4$  en la fabricación de placas de baterías para autos. La primera batería de plomo fue creada por Gaston Plante en 1859, y desde entonces la demanda de plomo para este fin se ha incrementado.

Debido a su elevada densidad el plomo es usado como protector contra la radiación producida por máquinas de Rayos X en la medicina. No obstante, el plomo también posee propiedades como elemento protector contra la radiación generada por otros tipos de energía atómica. El plomo metálico se utiliza en forma de planchas o tubos cuando se requiere gran maleabilidad y resistencia a la corrosión en la industria de la construcción. Debido a su resistencia a determinados ácidos se convierte en un elemento ideal para la fabricación y manejo de compuestos como el ácido sulfúrico y el ácido nítrico. Otros usos son como material de soldadura, empaste en la industria automovilística, municiones y en la fabricación de forros protectores para cables.

Acorde con las nuevas tecnologías se ha venido desarrollando compuestos órgano-plúmbicos para ser usados como por ejemplo: catalizadores en la fabricación de espuma de poliuretano, para pinturas navales que evitan la incrustación en los cascos de barcos, en la protección de la madera contra el ataque de hongos marinos, como preservador del algodón contra la

descomposición y el moho, inhibidor de la corrosión del acero, etc (SNMPE, 2015).

Finalmente, al combinar el plomo con otros metales como el estaño, cobre, arsénico, antimonio, bismuto, entre otros, se obtienen los denominados compuestos del plomo. Dentro de esta gama tenemos, por ejemplo, el azuro de plomo que sirve como detonador de explosivos, los silicatos de plomo que se emplean en la fabricación de cerámicas y vidrios, etc. Las sales de plomo constituyen la base de muchas pinturas y pigmentos: el carbonato y el sulfato de plomo se utilizan como pigmentos blancos y los cromatos de plomo sirven para obtener amarillo, naranja, rojo y verde. El arsenato de plomo es un insecticida para la protección de cultivos; el sulfato de plomo se utiliza en mezclas de caucho; el acetato de plomo tiene usos importantes en la industria química; el naftenato de plomo es un agente secante muy utilizado el tetraetilo de plomo se utiliza como agente antidetonante para la gasolina en aquellos países que la legislación aún lo permite (SNMPE, 2015).

#### ***1.3.2.4 El plomo en la salud humana.***

El plomo ingresa al organismo humano mayormente por inhalación e ingestión, el ingreso por la piel sucede en un pequeño porcentaje y es causa de la exposición a sus compuestos orgánicos.

El plomo inorgánico no se metaboliza, solo se absorbe, se distribuye y puede ser excretado directamente. La velocidad a la que es absorbida dependerá de su forma química y el estado fisiológico de la persona expuesta (edad y estado nutricional). El plomo cuando es inhalado es depositado en las vías respiratorias bajas donde se absorbe por completo, el plomo que es ingerido se absorbe de 10 a 15 %. En niños, mujeres embarazadas, personas con estado fisiológico de ayuno, déficit de hierro o calcio, el plomo puede llegar a absorberse hasta un 50%, una vez absorbido sigue la misma ruta metabólica del calcio.

Una vez que el plomo ingresa al torrente sanguíneo (plombemia), cerca del 99% se une a la hemoglobina de los eritrocitos formando el complejo

plomo-hemoglobina, el restante 1% del plasma se distribuye a los riñones, medula ósea, hígado, cerebro huesos y dientes. Estos dos últimos contienen aproximadamente el 95% del plomo almacenado en el organismo de adultos.

El plomo en la sangre tiene una semivida de 25 días, la porción que no se retiene se excreta a través de los riñones por la orina, del tracto gastrointestinal a las heces y por la piel a través del sudor. En los tejidos blandos puede estar presente hasta 40 días y en los huesos más de 25 años. Es por ello que la aparición de líneas densas en la metafisis de huesos largos en las placas de rayos X vendría a ser indicio de una exposición crónica (OIT, 1998; Caballero, A., 2008). La figura 02 ilustra el metabolismo del plomo en el organismo humano

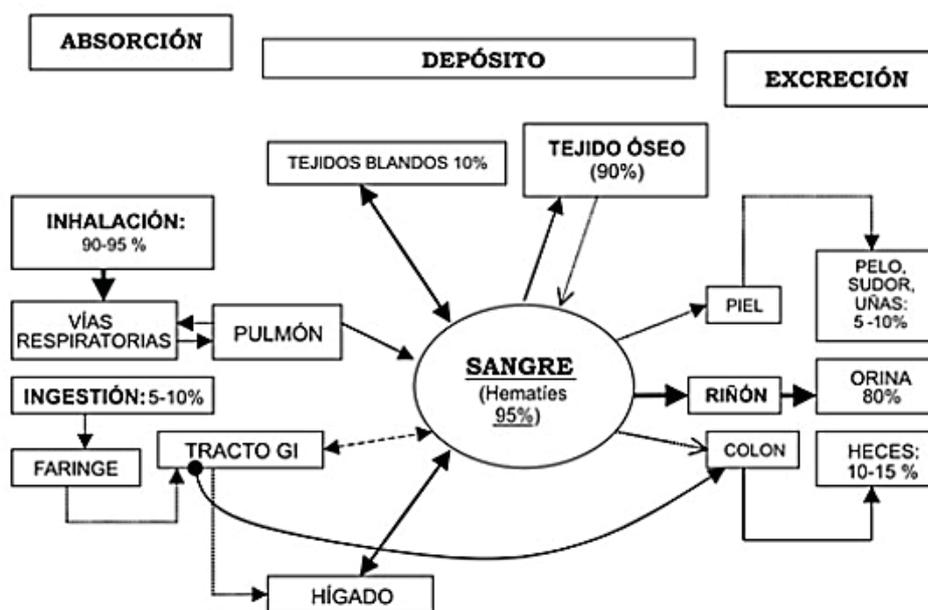


Figura 02. Modelo metabólico del plomo en el ser humano

Fuente: (DIGESA., 2016).

El plomo en el tejido óseo puede movilizarse a la sangre en casos de embarazo, inmovilidad, hipertiroidismo y edad avanzada, llegando a convertirse en una fuente endógena de plomo (reservorio inerte), incrementando nuevamente los niveles del metal en la sangre. Por ello que es posible desarrollar una intoxicación por plomo sin necesidad de una exposición aguda importante, ya que el organismo acumula este metal

durante toda la vida y lo libera lentamente, incluso dosis pequeñas pueden producir con el transcurso del tiempo, una intoxicación por plomo, el riesgo de efectos adversos depende de la carga corporal total de plomo. Se podría lograr la disminución de un 50% de plomo en sangre pero en el transcurso de varios años al eliminar totalmente la fuente de exposición (OIT, 1998; Caballero, A., 2008).

La intoxicación por plomo llamada saturnismo interfiere con la fisiología normal de las células. Se presentan los mismos efectos que a continuación se mencionan sin importar que el ingreso al organismo haya sido por inhalación o ingestión (OIT, 1998; Caballero, A., 2008).

- *Efectos neurológicos.* El sistema nervioso es el más sensible a la intoxicación por plomo. En niños se ha percibido deficiencias neurológicas con incluso, efectos permanentes. En menores a 2 años causa daño al sistema nervioso central (SNC) produciendo una deficiencia continua en el desarrollo neurológico, manifestado como un bajo coeficiente intelectual. En niños de 5 años una deficiencia en el coeficiente. Los casos que se presentaron en edades de hasta 11 años fueron los siguientes: déficit en el procesamiento verbal y del lenguaje, bajo rendimiento y atención en las clases, dificultades para leer, problemas de psicomotricidad fina, descoordinación mano – ojos y disminución en la agudeza auditiva para altas frecuencias sonoras por incremento de los niveles de plomo en sangre. Todo ello puede contribuir a problemas de aprendizaje o al mal comportamiento del niño en clase, por último si el nivel del plomo en sangre es suficientemente alto, el niño puede morir.

La intoxicación por plomo en adultos es producido incluso por niveles bajos en sangre, el efecto en el sistema nervioso central (SNC) se manifiesta en cambios de conducta sutiles, fatiga y problemas de concentración. En el sistema nervioso periférico las lesiones son en su mayoría motrices. Se ha descrito neuropatía periférica y una disminución en la velocidad de conducción nerviosa debido a que las neuronas motrices del asta anterior de la médula espinal sufren una degeneración

de sus terminales axónicas y va avanzando hacia el cuerpo neuronal. La parálisis evidente, con caída de la muñeca, sólo se manifiesta como un signo tardío de la intoxicación por plomo (OIT, 1998; Caballero, A., 2008).

- *Efectos hematológicos.* La toxicidad de plomo disminuye la producción de la hemoglobina en el organismo, interfiriendo en varios pasos enzimáticos de la vía metabólica del grupo hemo. El plomo puede inducir dos tipos de anemia: un cuadro agudo como la anemia hemolítica que es producido por niveles elevados de plomo y uno crónico cuando la anemia es causada por la interferencia en la eritropoyesis y la disminución de la supervivencia de los eritrocitos. Cualquiera de estos cuadros anémicos será un indicio de una concentración significativamente elevada y prolongada de plomo en la sangre (OIT, 1998; Caballero, A., 2008).
- *Efectos endocrinos.* Dado que en el sistema endocrino la vitamina D es responsable en gran parte del mantenimiento de la homeostasis de calcio intra y extracelular, el déficit de esta vitamina incrementara el impedimento del crecimiento, la maduración celular y el desarrollo de huesos y dientes por parte del plomo, existiría entonces una correlación inversa entre los niveles de plomo en sangre y los niveles de vitamina D (OIT, 1998; Caballero, A., 2008).
- *Efectos renales.* La nefropatía como efecto directo de la exposición prolongada a plomo es causada por la alteración de la función de los túbulos proximales manifestada como aminoaciduria, glicosuria e hiperfosfaturia (OIT, 1998; Caballero, A., 2008).
- *Efectos sobre la reproducción y el desarrollo.* Durante el embarazo el feto puede estar en riesgo si los depósitos maternos de plomo atraviesan la barrera placentaria. Se sostiene que los abortos y la muerte fetal en el siglo XIX fueron causados por exposiciones muy superiores a plomo de las que actualmente se registran. Se han recaudado pruebas que demuestran que el plomo no sólo afecta a la viabilidad del feto, sino

también a su desarrollo (aun en exposiciones bajas), causando un menor peso del recién nacido y mayor número de nacimientos prematuros.

La mayoría de los estudios de teratogenicidad no han podido demostrar que el plomo es causante de malformaciones en el humano pero si en animales.

No está bien claro los efectos del plomo en el aparato reproductor masculino humano pero los datos disponibles indican que podría causar reducción del recuento y calidad espermática en caso de exposiciones crónicas (OIT, 1998; Caballero, A., 2008).

- *Efectos cancerígenos.* Tanto los compuestos orgánicos e inorgánicos del plomo han sido clasificados dentro del grupo 2B (posibles causantes de cáncer) según La Agencia Internacional sobre el Cáncer (IARC). Los informes de casos indican que el plomo es un posible cancerígeno para el hombre, pero la asociación aún no está claramente definida. Se ha descrito que las sales solubles, como el acetato y el fosfato de plomo, producen tumores renales en ratas.

En la figura 03 se muestra las concentraciones de plomo en sangre y sus manifestaciones clínicas (OIT, 1998; Caballero, A., 2008).

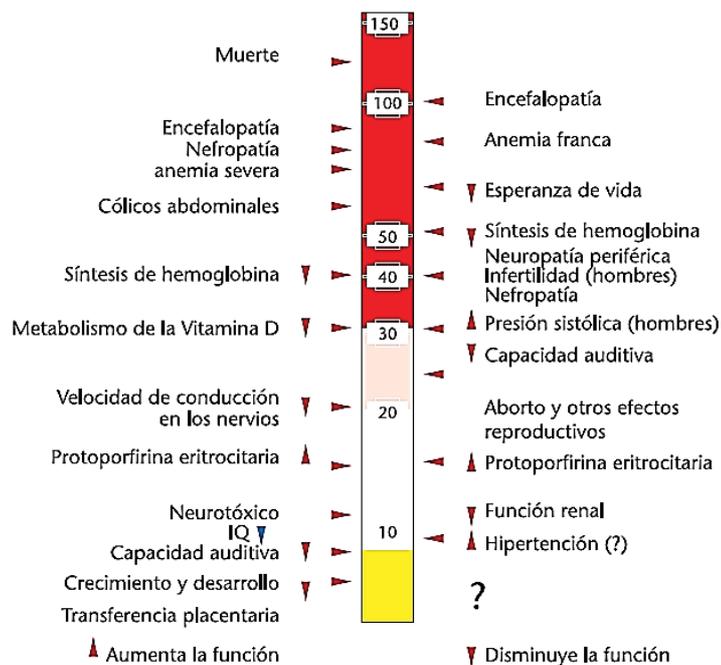


Figura 3. Plombemia y manifestaciones clínicas  
Fuente: (ATSDR., 2006 citado en Valdivia, M., 2005).

### 1.3.2.5 *El plomo en el ambiente.*

El Pb que entra al medio ambiente no se degrada pero los compuestos que forma son transformados por la luz del sol, el agua y aire. A través de este último, el plomo se moviliza largas distancias antes de ser depositado en el suelo y adherirse a sus partículas, las características de este medio y el tipo de compuesto de Pb definirán si dicho contaminante puede pasar a las aguas subterráneas. (ATSDR, 2005).

Los compuestos orgánicos e inorgánicos del plomo son considerados contaminantes tóxicos y dañinos, desde el punto vista ambiental. Entre los más contaminantes presentes en aguas residuales se encuentran especialmente los derivados alquílicos de plomo (IV), tetraetilo, dietilo, tetrametilo y dimetilo que son los que fácilmente se incorporan a las cadenas alimenticias. Entre los inorgánicos se tiene a las oxosales, óxidos de plomo (PbO, PbO<sub>2</sub> y Pb<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), haluros de plomo (como el PbCl<sub>2</sub>) (Doadrio, 2006).

La incorporación del plomo a las cadenas tróficas puede ocurrir de la manera siguiente:

- En un medio acuático el plomo disuelto es asimilado por un organismo y se acumula en determinados órganos o tejidos, la máxima concentración se alcanza en los huesos, que actúan como lugares de almacenamiento, los órganos en los que aparece en mayor medida son el hígado, los riñones y el sistema nervioso central. El peligro de la persistencia y bioacumulación del plomo en organismos se deriva de la dificultad de excreción del mismo, esto induce una vía de intoxicación a través de la cadena trófica (ASTM, 2005, Becares *et al.*, 2004).
- En las plantas el plomo limita la síntesis de clorofila, no obstante las plantas pueden absorber del suelo altos niveles de plomo, hasta 500 ppm. Consecuentemente, la aplicación de pesticidas de plomo está prohibida en la mayor parte de los países (Wright, 2003).

➤ *El plomo en disolución.*

En condiciones normales el plomo metálico no reacciona con el agua. Sin embargo, cuando se pone en contacto con el aire húmedo, la reactividad con el agua aumenta. En la superficie del metal se forma una pequeña capa de óxido de plomo (PbO): en presencia de oxígeno y agua, el plomo metálico se convierte en hidróxido de plomo (Pb(OH)<sub>2</sub>) así como muestra la siguiente reacción:



Lo que hace que este pueda entrar en el agua potable a través de la corrosión de las tuberías de plomo, muy usadas a nivel doméstico hasta el año 1980.

En sistemas acuáticos contaminados el plomo presente tiende casi en su totalidad a sedimentar y acumularse en el fondo en forma de sulfuro, carbonato y fosfato. Sin embargo, en ocasiones una fracción menor del elemento permanece disuelta en el agua, esto viene marcado por el pH del medio tal como muestra la figura 04.

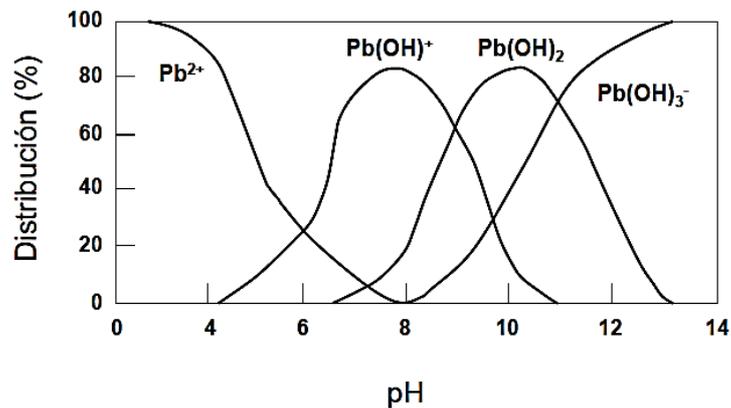


Figura 04. Especiación del plomo en disolución en función del pH

Fuente: (Sánchez, 2011).

➤ *Dispersión de plomo en el agua.*

La minería, la fundición y la refinación, así como la producción de compuestos y artículos que contienen plomo, pueden dar lugar a emisiones de plomo (OMS, 1979). La atmósfera es la vía principal para el transporte

y distribución de Pb desde fuentes estacionarias o móviles a otros medios ambientales. Es probable que las partículas transportadas por el aire se dispersen, ya que su permanencia en la atmósfera es prolongada. También puede haber descargas en cuerpos de agua y en suelos, pero en la gran mayoría de los casos, el Pb tiende a localizarse cerca de los puntos de descarga, debido a la baja solubilidad de los compuestos que se forman al contacto con el suelo y el agua.

En los sistemas acuáticos la concentración de Pb aumenta de la siguiente manera:

Agua < presas de los peces < peces < sedimentos.

El Pb antropogénico llega al ambiente acuático a través de la precipitación pluvial que arrastra el Pb emitido en la combustión de gasolinas y descargas de aguas residuales de las industrias (Maya y Hansen, 1995). La cantidad de dicho metal en aguas superficiales depende del pH y de las sales disueltas contenidas en el agua.

El Pb es eliminado del agua cuando atraviesa el suelo y los sedimentos inferiores, esto se debe a la gran capacidad de las sustancias orgánicas para establecer uniones firmes con el Pb. Es importante tomar en cuenta la posibilidad de la transferencia de Pb precipitado en ciudades donde pasa a los sistemas de aguas residuales por arrastre (OMS, 1979).

En los componentes orgánicos de un sedimento, el Pb puede entrar a éste a partir de dos maneras: A partir de los restos de plantas y animales que suministran compuestos orgánicos y también por el agua que esté en contacto con el sedimento.

#### **1.3.4 Lixiviados y Sedimentos.**

Los lixiviados son líquidos con alto contenido de materia orgánica y sales minerales que son resultado de la degradación de los residuos sólidos y percolación de agua de lluvia, estos son altamente contaminantes y alteran la calidad de aguas superficiales y subterráneas si no son manejados adecuadamente (Ley N° 27314). La tabla 02 muestra una clasificación de los lixiviados.

**Tabla 02***Clasificación de lixiviados*

	Jovenes	Intermedios	Viejos
<b>Edad</b>	< 1	1-5	> 5
<b>pH</b>	< 6,5	6,5-7,5	> 7,5
<b>DQO (g/L)</b>	> 15	3-15	< 3
<b>DBO/DQO</b>	0,5 – 1	0,1 – 0,5	< 0,1
<b>Metales pesados mg/L</b>	> 2	< 2	< 2
<b>Compuestos organicos</b>	80% AGV	5 – 30% AGV +AH +AF	AH + AF
<b>Tipo</b>	S/D	P	E

*Nota:* AGV= Ácidos grasos volátiles; AH= ácidos húmicos; AF= ácidos fulvicos; S/D sin degradar; P=parcialmente degradados o estabilizados; E= estabilizados. Fuente: Renou *et al.* (2008).

La presencia de ácidos húmico y fúlvico en el lixiviado es muy importante no sólo por su resistencia a la biodegradabilidad, sino también por su afinidad por los contaminantes. Son los responsables del transporte y del comportamiento de los contaminantes como metales pesados y contaminantes hidrofóbicos en el ambiente (Kang *et al.*, 2002).

Al filtrar el agua a través de los residuos sólidos en descomposición, se lixivian en solución materiales biológicos y constituyentes químicos. Los lixiviados contienen contaminantes que pueden ser clasificados en cuatro grupos: materia orgánica disuelta, sustancias inorgánicas, metales pesados y compuestos orgánicos xenobióticos (Selberg *et al.*, 2005).

De manera general, los metales pesados son removidos mediante reacciones de intercambio iónico que se producen mientras los lixiviados viajan a través del suelo. La capacidad de un suelo para retener los metales pesados encontrados en los lixiviados está en función de la capacidad de intercambio de cationes que tiene el suelo (Tchobanoglous *et al.*, 1994).

Los contaminantes bacteriológicos de los lixiviados están presentes debido a que se pueden filtrar después de varios metros de viaje a través del suelo (Röling *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2002). El metabolismo de las bacterias se ve dificultada por el incremento de los ácidos húmicos y fulvicos en un lixiviado (Kang *et al.*, 2002).

Los sedimentos constituyen la acumulación de materiales arrastrados (aloctonos), o bien producidos en la misma masa de agua (autoctonos), minerales (evaporitas, arcillas, fragmentos de rocas o materiales clásticos, minerales formados en la propia agua) y orgánicos (organismos enteros que mueren en el sedimento, organismos muertos y fragmentos de los mismos, excrementos, materia orgánica floculada, material detrítico aloctonos) (Margalef, 1983).

### **1.3.5 Resistencia bacteriana a metales pesados.**

La contaminación ambiental por metales pesados constituye un problema mundial creciente. Estos elementos químicos representan una amenaza biológica, pues no son biodegradables. Solo los microorganismos que portan sistemas genéticos que contrarrestan los efectos tóxicos de los metales son capaces de sobrevivir en ambientes con elevadas concentraciones de esos elementos. Los microorganismos resistentes a metales pesados presentan potencialidades para el diseño de tecnologías aplicables en el campo de la biorremediación de ambientes contaminados. Este tema es de gran importancia para países que poseen una gran industria de metales y que generan grandes volúmenes de residuos contaminantes. (Nies, 2003; Silver y Phung, 2005; Cervantes, 2006.; Mendoza y Sanchez, 2005 citado en Marrero y Col., 2010).

#### ***1.3.5.1 Mecanismos moleculares bacterianos para la resistencia a metales pesados.***

*“La resistencia a metales pesados es el resultado de la intervención de múltiples sistemas con especificidad de sustratos diferentes, pero que comparten las mismas funciones. Algunos de estos sistemas están ampliamente distribuidos y contribuyen en la defensa elemental de la célula frente a metales dañinos” (Brown et al., 2006 citado en Marrero, 2010). “Otros están muy especializados y se encuentran solo en algunas especies bacterianas, confiriéndoles la capacidad de resistencia a metales pesados” (Nies 2003; Monchy et al., 2007 citado en Marrero, 2010).*

*“Muchas células contienen dos tipos de sistemas de captura de cationes de metales pesados. Uno es rápido e inespecífico, expresado*

*constitutivamente y utilizado por una variedad de sustratos. Estos sistemas rápidos son generalmente dependientes del gradiente quimiosmótico existente a través de la membrana citoplasmática bacteriana. El segundo tipo de sistema de captura posee una gran especificidad de sustrato, es más lento y generalmente utiliza la hidrólisis de ATP como fuente de energía en adición al gradiente quimiosmótico. Este sistema consumidor de energía solo se induce en la célula cuando esta lo necesita, en condiciones nutricionales desfavorables o en alguna situación metabólica especial” (Nies, 2003 citado en Marrero, 2010).*

*“Cuando una célula se enfrenta a grandes concentraciones de algún metal pesado que es acumulado por el sistema inespecífico, el catión del metal pesado es transportado al citoplasma, a pesar de su elevada concentración, porque estos transportadores inespecíficos son expresados constitutivamente. Por consiguiente, esta entrada no puede cerrarse. Esta “puerta abierta” es la primera razón del porqué los iones metálicos pesados son tóxicos” (Nies, 1995 citado en Marrero, 2010). “Cuando el gen que codifica este sistema transportador rápido e inespecífico se muta, entonces se obtienen mutantes que son tolerantes a metales. Por ejemplo, los mutantes CorA resultaron tolerantes a Co(II) (Bui et al., 1999; Pfeiffer et al., 2002 citado en Marrero, 2010) y los mutantes Pit resultaron tolerantes a arsenato” (Rosen, 1996 citado en Marrero, 2010).*

*“La acumulación gradual de cationes metálicos tanto en sitios antropogénicos como en ecosistemas naturales, en adición a su toxicidad potencial y a la situación de “puerta abierta”, han conducido durante la evolución de la vida al desarrollo de la homeostasis de metales pesados. Este fenómeno se debe a un proceso de adaptación espontánea al medio, debido al desarrollo o adquisición de sistemas genéticos que contrarrestan los efectos de las elevadas concentraciones de iones metálicos para la célula” (Trajanovska et al., 1997 citado en Marrero, 2010).*

*“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, constitutivos o inducidos por la presencia del metal*

*(Zegers et al. 2001; Trajanovska et al., 1997 citado en Marrero, 2010), mientras que los tolerantes son indiferentes a la presencia o ausencia del elemento. Tanto los microorganismos resistentes como los tolerantes son de particular interés como captadores de metales en sitios contaminados, debido a que ambos pueden presentar la capacidad de extraer estos contaminantes”.*

*“Los sistemas desarrollados por las bacterias para tolerar los efectos nocivos de los metales tóxicos son diversos” (Silver y Phung, 2005 citado en Marrero, 2010). Entre ellos, se encuentran principalmente:*

**a. Captura de iones en la célula bacteriana.**

*“La acumulación y compartimentación de iones metálicos en la célula bacteriana puede ocurrir en la membrana, el espacio periplasmático y el interior celular. En ella intervienen polímeros estructurales y extracelulares que interactúan con los metales atrapándolos dentro de su estructura (bioabsorción) (Demirbas, 2008 citado en Marrero, 2010) o proteínas que se unen a los iones metálicos por los que poseen una gran afinidad, evitando sus interacciones con otras proteínas esenciales para el microorganismo” (Kasan, 1993 citado en Marrero, 2010). “Entre las proteínas periplasmáticas que capturan metales se han descrito a las metalotioneínas” (Klaassen et al., 2005; Silver y Phung, 2005 citado en Marrero, 2010) “que funcionan como captoras de metales en el citoplasma celular.”*

**b. Transformaciones mediadas por enzimas.**

*“Entre las transformaciones enzimáticas de los metales se incluyen la oxidación, reducción, metilación y demetilación (Silver y Phung, 2005 citado en Marrero, 2010) y estas pueden dar como resultado compuestos poco solubles en agua o bien compuestos volátiles”.*

**c. Expulsión de iones metálicos.**

*“La mayoría de los sistemas de resistencia a metales se basan en el eflujo activo de iones tóxicos tales como los que expulsan iones derivados del*

*cadmio, cobalto, cobre, níquel, plata, plomo y zinc*” (Nies, 2000 citado en Marrero, 2010). *En este proceso intervienen fundamentalmente tres sistemas diferentes.*

➤ *“ATPasas tipo P. Son la defensa básica contra cationes de metales pesados. Estas ATPasas constituyen una familia de proteínas de transporte que son dirigidas por la hidrólisis del ATP”* (Cervantes y Col., 2006 citado en Marrero, 2010). *“Sus sustratos son cationes inorgánicos tales como el H(I), Na(I), K(I), Mg(II), Ca(II), Cu(I), Ag(I), Zn(II) y Cd(II)”* (Saier, 2003 citado en Marrero, 2010). *“Una ATPasa tipo P individual importa su sustrato desde el exterior o desde el periplasma al citoplasma (ATPasa tipo P importadora) o lo exporta desde el citoplasma al periplasma (ATPasa tipo P exportadora).”*(Marrero, 2010)”

➤ *Transportadores de la familia RND (resistance, nodulation, cell división). “En bacterias y arqueas, los miembros de esta familia están involucrados en el transporte de metales pesados, compuestos hidrofóbicos, anfífilicos y factores de nodulación y en la excreción de proteínas (SecDF).*

*Las proteínas RND conjuntamente con proteínas MFP (membrane fusión protein) y OMF (outer membrane factor) (Johnson y Church, 1999; Paulsen, 1997 citado en Marrero, 2010) forman un complejo que puede exportar sus sustratos desde el citoplasma, la membrana citoplasmática o el periplasma a través de la membrana externa directamente al exterior; a diferencia de los sistemas de expulsión anteriores, que solo translocan su sustrato al espacio periplasmático. Esta característica hace que sea considerado como el sistema de resistencia a metales de mayor importancia y complejidad en bacterias (Zgurskaya y Nikaido, 2000 citado en Marrero, 2010).*

➤ *Facilitadores de difusión de cationes (CDF). “La familia de CDF funciona como un filtro secundario de cationes en bacterias. (Saier, 2000 citado en Marrero, 2010) que están presentes en los tres reinos*

del árbol de la vida” (Paulsen y Saier, 1997 citado en Marrero, 2010). “El sustrato primario de las proteínas CDF es el ion  $Zn(II)$  que también pudieran transportar los iones  $Co(II)$ ,  $Ni(II)$ ,  $Fe(II)$  y  $Cd(II)$ ” (Haney et al., 2005 citado en Marrero, 2010). “El transporte mediado por los CDF es dirigido por un gradiente de concentración quimiosmótico,  $\Delta\psi$ , de pH o de potasio” (Bloss et al., 2002; Anton et al., 1999 citado en Marrero, 2010).

“Usualmente las bacterias contienen muy pocos genes que codifican CDF. En eucariontes, el número de genes que codifican CDF aumenta en paralelo con la evolución desde levaduras a plantas y animales” (Nies, 2003 citado en Marrero, 2010).

La figura 05 muestra gráficamente los 3 sistemas de expulsión de metales.

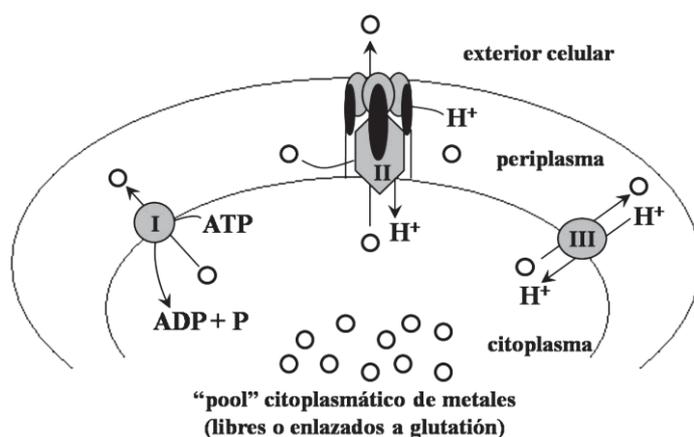


Figura 05: Prototipos de los principales sistemas de eflujo de iones metálicos. I) ATPasas tipo P, II) sistemas RND y III) facilitadores de difusión (CDF).

Fuente: (Legazki, et al. 2003 citado en Marrero, 2010).

### 1.3.5.2. Localización genética de los determinantes de resistencia a metales pesados.

“Los determinantes genéticos que codifican las proteínas involucradas en los mecanismos de resistencia a metales, se encuentran generalmente localizados en el cromosoma bacteriano, en elementos móviles como

*plasmidios o transposones o en ambos” (Von Rozycki y Nies, 2008; Amoroso y Col., 2000 citado en Marrero, 2010).*

*“Los determinantes plasmídicos que confieren resistencia a metales, poseen una gran especificidad, comparable con la que presentan los productos codificados por otros genes que intervienen en el metabolismo celular (Silver y Phung, 1996 citado en Marrero, 2010) y constituyen sistemas inducibles en la mayoría de los casos” (Nies y Silver, 1999; Collard et al., 1993 citado en Marrero, 2010). “Hasta el momento, se han descrito genes de resistencia a plata, arsénico, cadmio, cromo, cobre, mercurio, níquel, plomo, antimonio y cinc localizados en plasmidios” (Silver y Phung, 1996; Silver, 1994; Shukla et al., 2006 citado en Marrero, 2010).*

*“Estos hallazgos son de vital importancia ya que los plasmidos generalmente confieren resistencia a elevadas concentraciones de metales (Mergeay, 1991 citado en Marrero, 2010) y pueden moverse fácilmente de una célula a otra por transmisión horizontal de material genético, de modo que contribuyen considerablemente en la adaptación a corto plazo de las comunidades microbianas en ambientes contaminados” (Nies, 1999; Blattner et al., 1997 citado en Marrero, 2010).*

*“La existencia de genes de resistencia a metales en el cromosoma, soporta la hipótesis de que este carácter se ha convertido en vital para algunas bacterias. Este fenómeno es muy frecuente en aislamientos realizados en zonas muy contaminadas por largos períodos de tiempo. En contraste, la resistencia a metales codificada en plasmidios se ha encontrado en bacterias que habitan ecosistemas ocasionalmente contaminados con el metal, por lo que dicho carácter en esos casos, pudiera no ser esencial para los microorganismos sino que se le otorga un importante valor adaptativo (Barzanti et al. 2007 citado en Marrero, 2010).*

### **1.3.5.3 Resistencia de bacterias al plomo.**

El plomo al encontrarse presente en los ecosistemas en forma de soluciones salinas que es absorbida por comunidades microbianas y de esta

manera el plomo puede encontrarse en el medio ambiente cambiando las condiciones normales del ecosistema.

*Pseudomonas marginalis* presenta un mecanismo extracelular de exclusión el cual se cree puede ser la excreción de un exopolímero. Otros mecanismos de resistencia envuelven la acumulación celular en gránulos densos en el citoplasma, los que han sido observados en *Bacillus megaterium* (Beveridge y Doyle, 1989 citado en Galicia, 2010) (esta acumulación intracelular no es observada comúnmente en mecanismos de resistencia a metales). No han sido aislados plásmidos que confieran resistencia al plomo en estas bacterias pero si se han observado que bajo estrés por el metal, estos microorganismos pueden desarrollar resistencia al utilizar mecanismos directos, mismos que incluyen bombas de eflujo dependientes de ATP y secuestro celular del metal (Roane, 1998 citado en Galicia, 2010).

### **1.3.6 Estrategias para la remoción de metales pesados.**

Los métodos utilizados en la remediación de metales pesados son de dos tipos principalmente:

#### ***1.3.6.1 Métodos físico – químicos.***

En el presente, los efluentes industriales contaminados con metales pesados son tratados principalmente por métodos químicos, tales como: oxidación, reducción, intercambio iónico, filtración, precipitación química, tratamiento electroquímico o tecnologías de membrana y recuperación por evaporación. Estos métodos son parcialmente efectivos y su implementación muy costosa, especialmente, cuando las concentraciones de metales son bajas (Tsezos, 1990; Volesky, 1990).

##### **➤ *Remoción por carbono activado***

Los carbones activados presentan una considerable capacidad de adsorción de diversos compuestos, tanto en fase gaseosa como líquida, principalmente gracias a su estructura porosa altamente desarrollada

que les confiere una gran superficie específica. (Cortuelo y Col., 1999; Förstner, 1983).

### ***1.3.6.2 Biorremediación por medio de microorganismos.***

La biorremediación es el uso de microorganismos para eliminar contaminantes. Para que la biorremediación se considere una tecnología aplicable para eliminar un contaminante específico, es necesario demostrar que dicha sustancia o mezcla que la contenga, es biodegradable y que el proceso de biorremediación no tendrá efectos colaterales adversos sobre el ecosistema (Atlas y Bartha, 2002).

- *Biorremediación in situ*: Se refiere al tratamiento de compuestos tóxicos en el lugar donde se ha producido la contaminación. A su vez hay dos tipos de técnicas de biorremediación *in situ*:
  - ❖ Biomagnificación: Adición de microorganismos naturales o manipulados genéticamente al medio (Castillo y Col., 2005.).
  - ❖ Bioestimulación: Modificación del medio para reforzar el crecimiento de los microorganismos. Normalmente se adicionan nutrientes, oxígeno, entre otros. (Castillo, 2005).
  
- *Biorremediación ex situ*: El tratamiento de residuos tóxicos se realiza en biorreactores. Normalmente se optimiza la biorrecuperación añadiendo nutrientes, controlando el pH y la temperatura (Castillo, 2005).

Las propiedades de los microorganismos resistentes, tolerantes o ambos pueden ser empleados en mecanismos de movilización (biolixiviación) e inmovilización de metales pesados que incluyen: biosorción, bioacumulación, biomineralización, biotransformación y quimiosorción que a continuación se detallan.

#### ***a. Movilización de los metales pesados o biolixiviación.***

Es el pasaje de un estado insoluble inicial (metales asociados a suelos, sulfuros u óxidos metálicos, por ejemplo) correspondiente a una fase

sólida, a un estado soluble final, en fase acuosa. Tal es el caso de la obtención de Cu por la oxidación de las menas de Cu<sub>2</sub>S (calcocita) a CuSO<sub>4</sub> por intermedio de la acción de las bacterias *Thiobacillus ferroxidans* y *Thiobacillus thiooxidans*. (Madigan *et al.* 2003).

*b. Inmovilización de metales pesados.*

Viene a ser el pasaje de un estado soluble inicial en fase acuosa a uno insoluble final en fase sólida. A su vez existen en la naturaleza diferentes mecanismos por los cuales la inmovilización del metal puede llegar a ocurrir (Vullo, 2003).

➤ **Biom mineralización.**

Este mecanismo aparece por el funcionamiento de una bomba que expulsa el metal tóxico presente en el citoplasma hacia el exterior celular en contracorriente a un flujo de H<sup>+</sup> hacia el interior celular. Esto produce una alcalinización localizada sobre la superficie celular externa y por lo tanto la precipitación del metal pesado.

Otra forma de precipitar los metales es a través de la formación de sulfuros o fosfatos, como resultado de alguna actividad enzimática celular. Un ejemplo de ello es la precipitación de sulfuros metálicos en reactores con cultivos mixtos de bacterias reductoras de sulfato o la acumulación de CdS en la pared celular de las bacterias *Klebsiella planticola* y *Pseudomonas aeruginosa* (Gadd, 2000. Lovley, 2000; Sharma *et al.*, 2000. Wang *et al.*, 1997 citado en Vullo, 2003).

➤ **Biotransformación.**

Este es un proceso que involucra un cambio químico sobre el metal pesado, como por ejemplo en el estado de oxidación o metilación. Esta transformación biológica de los metales pesados que resultan tóxicos mediada por enzimas microbianas puede dar como resultado compuestos poco solubles en agua o bien compuestos volátiles (Lovley, 2000; Srinath *et al.*, 2002).

➤ Quimiosorción.

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 (Lovley, 2000).

➤ Bioacumulación.

Este proceso posee como primera etapa a la absorción que es rápida, e implica la interacción con la superficie celular (Kasan, 1993; Brady y Duncan, 1994 citado en Suarez y Reyes, 2002). La acumulación es un proceso mucho más lento y dependiente del metabolismo celular que involucra un sistema de transporte de membrana que internaliza al metal pesado presente en el entorno celular con gasto de energía. Este consumo energético se genera a través del sistema  $H^+$ -ATPasa. Una vez incorporado el metal pesado al citoplasma, éste es secuestrado por la presencia de proteínas ricas en grupos sulfhidrilos llamadas metalotioneínas (Lovley, 2000).

➤ Biosorción.

La biosorción es un fenómeno ampliamente estudiado en la biorremediación de diversos metales pesados como el cadmio, cromo, plomo, níquel, zinc y cobre (Jianlong *et al.* 2001; Liu *et al.*, 2003; Srinath *et al.*, 2002; Tangaromsuk *et al.*, 2002 citado en Vullo, 2003). Los microorganismos utilizados como biosorbentes, son aislados a partir de ecosistemas contaminados.

Los mecanismos de interacción entre metales pesados y microorganismos se muestran esquemáticamente en la figura 06.

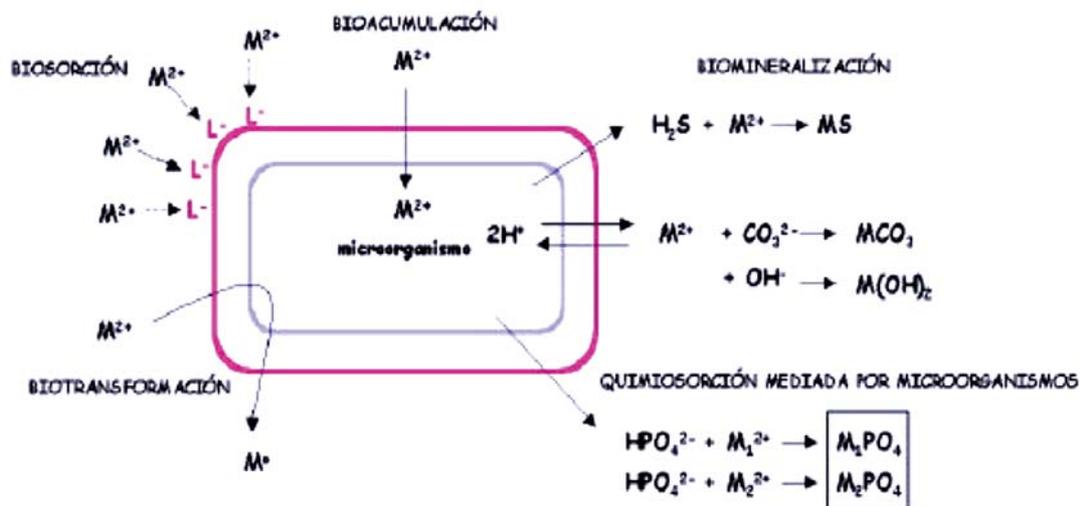


Figura 06. Mecanismos de interacción entre metales pesados y microorganismo  
Fuente: Lovley (2000) citado en Vullo, 2003.

### 1.3.7 Biosorción

La biosorción es la propiedad de ciertos tipos de biomasa inactiva o muerta para la captación pasiva de iones metálicos, el enlazamiento y acumulación de estos contaminantes se puede dar por diferentes mecanismos como: la adsorción física, complejación, intercambio iónico, entre otros. Estos fenómenos no implican un control metabólico como en la bioacumulación, el cual describe a un proceso activo de un organismo vivo (Vegliò y Beolchini, 1997; Zouboulis *et al.*, 1999; Volesky, 2001; Davis *et al.*, 2003; Gavrilesco, 2004; Baytak, y Turker, 2005; Zhang y Banks, 2006; Davis *et al.*, 2003 citado en Martin, 2008).

#### 1.3.7.1 Mecanismos de biosorción.

Existen diferentes formas por las que el metal puede ser capturado por la pared celular del biosorbente, pero esto dependerá de la complejidad que presente y de la especie metálica a biosorber. El o los mecanismos que se llevan a cabo en el proceso de biosorción de metales pesados, en muchas ocasiones son difíciles de explicar porque puede tener lugar simultáneamente más de uno (Ho *et al.*, 2001 citado en Martin, 2008).

A continuación se detallan estos mecanismos:

a. *Microprecipitación*

*“La microprecipitación de metales pesados tiene lugar cuando la solubilidad del metal alcanza su límite. Esto puede ocurrir debido a las condiciones locales (superficialmente o en el interior del biosorbente), que se originan gracias a desviaciones locales de determinados parámetros como el pH” (Volesky, 2003 citado en Martin, 2008). “Pero la microprecipitación se puede producir también por una interacción entre el metal y la superficie celular a través de la formación de un complejo, seguida de su hidrolización y la precipitación del metal en forma de una especie hidrolizada en la pared celular” (Vegliò y Beolchini 1997 citado en Martin, 2008).*

b. *Complejación*

*“La retirada de metales de una disolución puede tener lugar a través de un mecanismo de formación de complejos en la pared celular, después de haberse llevado a cabo la interacción entre el metal y los centros activos. El metal se puede unir a estos centros a través de ligaduras simples o a través de quelación” (Martin, 2008).*

c. *Adsorción física*

*“En esta categoría se incluyen los fenómenos asociados con la presencia de fuerzas de Van der Waals, por lo que las fuerzas de atracción de los metales a la superficie del sólido son relativamente débiles” (Martin, 2008).*

d. *Intercambio iónico*

*“Las paredes celulares de la biomasa en general, se componen de polisacáridos como estructura básica de constitución. Las propiedades para el intercambio iónico de los polisacáridos naturales han sido estudiadas con detalle, y se ha establecido fielmente la propiedad de que los iones metálicos divalentes se intercambian con ciertos iones ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ ) de los polisacáridos” (Martin, 2008). La figura 07 muestra los mecanismos de biosorción mencionados anteriormente.*

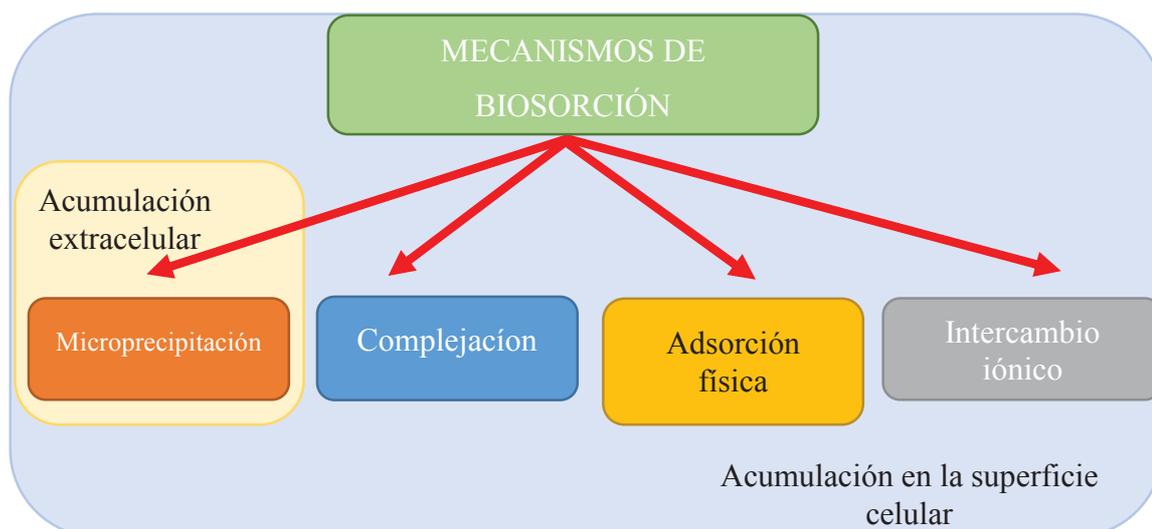


Figura 07: Mecanismos ligados a la biosorción

Fuente: Martín (2008).

### 1.3.7.2 Estudio de Equilibrio.

*“El proceso de biosorción tiene lugar entre una fase sólida (sorbente) y una fase líquida (solvente), que generalmente es agua que contiene las especies disueltas que van a ser sorbidas (sorbato), en este caso iones metálicos. Si existe una afinidad del sorbente por el sorbato, éste último es atraído hacia el sólido y enlazado por diferentes mecanismos, continuando el proceso hasta que se establece un equilibrio entre el sorbato disuelto y el sorbato enlazado al sólido a una determinada concentración final o residual en la fase líquida. Ese equilibrio es descrito por modelos matemáticos (isotermas de adsorción) que relacionan la cantidad retenida de sorbato y la que permanece en disolución cuando se alcanza el equilibrio, a una temperatura constante” (Ho, et al., 2002 citado en Martín, 2008). “Los parámetros de las ecuaciones y las consideraciones termodinámicas de estos modelos de equilibrio proporcionan, a menudo una interpretación sobre el mecanismo de adsorción, las características superficiales y la afinidad del sorbente por el sorbato. Resulta de especial interés obtener la isoterma que mejor reproduce los resultados experimentales, ya que se requieren cada vez modelos más exactos y detallados para el diseño de los sistemas de biosorción”.*

*“Aunque son numerosos los modelos que aparecen en bibliografía para el estudio del equilibrio en los sistemas de biosorción” (Volesky, 2003 citado en Martin, 2008), “los más utilizados son el de Langmuir y el de Freundlich. Sin embargo, para encontrar el modelo que mejor reproduce los resultados experimentales obtenidos, hay que tener en cuenta la forma que presenta la isoterma del sistema sólido-disolución estudiado” (Martin, 2008)*

De acuerdo con la teoría de la adsorción existen básicamente cinco tipos de isothermas, tal y como se muestra en la Figura 08.

*“La isoterma tipo I es una de las más comunes y es la que muestran los sólidos microporosos se caracteriza por un aumento inicial rápido de la cantidad adsorbida a medida que aumenta la concentración del adsorbato en equilibrio hasta alcanzar un valor límite. Se le conoce con el nombre de isoterma de Langmuir, y está restringido a una monocapa. Las isothermas de quimiosorción son aproximadamente de esta forma” (Shaw, 1977 citado en Barragan, 2003).*

*“La isoterma tipo II son isothermas bastante frecuentes y representa una adsorción física en multicapas, es característica de sólidos micro y mesoporosos” (Shaw, 1977 citado en Barragan, 2003).*

*“La isoterma tipo III ocurre cuando la interacción adsorbato-adsorbente es baja y se dice que el proceso de adsorción no es favorable. Son poco frecuentes, la adsorción inicialmente son poco intensas, a medida que aumenta el área ocupada, aumenta la adsorción con la formación de multicapas” (Rabockai, 1981 citado en Barragan, 2003).*

*“La isoterma tipo IV, característica de sólidos mesoporosos, presenta un incremento importante de la cantidad adsorbida a concentraciones de equilibrio del sorbato en la disolución intermedias y ocurre mediante un mecanismo de llenado en multicapas” (Barragan, 2003).*

“La isoterma tipo V, al igual que la isoterma tipo III es característica de interacciones débiles, pero se diferencia de la anterior en que el tramo final no es asintótico” (Brunauer *et al.*, 1940; Giles *et al.*, 1974; Rouquerol *et al.*, 1999 citado en Martin, 2008).

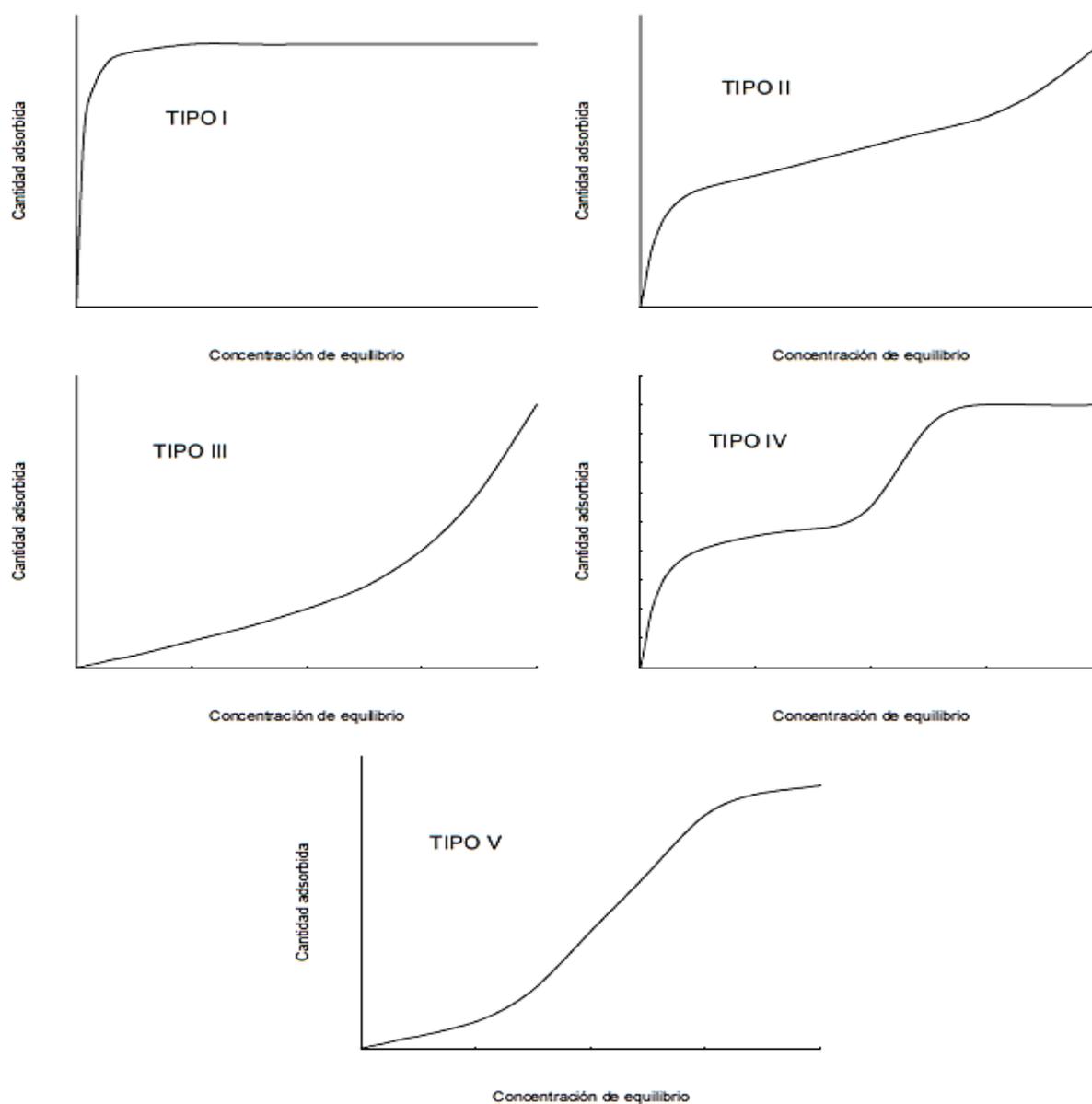


Figura 08: Representación de los posibles tipos de isothermas de adsorción  
Fuente: Martin (2008).

### 1.3.7.3 Modelos de equilibrio basados en sistemas ideales.

“Generalmente, la biosorción del metal pesado ha sido evaluada mediante la utilización de modelos ideales que describen el equilibrio del proceso: Modelo de Langmuir, Modelo de Freundlich, Modelo de Redlich-Peterson,

*Modelo de Sips, Modelo de Toth, Modelo de Dubinin-Radushkevich, etc.* (Volesky, 2003 citado en Martin, 2008). *Los modelos de Langmuir (1918) y Freundlich (1926) han sido posiblemente los más utilizados para describir con éxito el equilibrio de biosorción*” (Tsezos y Volesky, 1981; Prasetyo, 1992; Holan y Volesky, 1994 citado en Martin, 2008).

**a.** *Modelo de Adsorción de Langmuir.*

Es el modelo más simple y el más antiguo formulado por Langmuir en 1918. Supone que las moléculas se adsorben sobre la superficie hasta formar una monocapa completa (saturación) en cuyo momento cesa la adsorción, y que la superficie es homogénea.

La adsorción es frecuentemente descrita en términos de isoterma el cual muestra una relación entre la actividad de la fase acuosa (concentración) de adsorbato y cantidad adsorbida a temperatura constante, asumimos que los sitios de adsorción **S**, en la superficie de un sólido (adsorbente) son ocupados por el adsorbato **A** de la solución. Podemos derivar la ecuación de Langmuir de la aplicación de la ley de masa (Schiewer y Wong, 1999)



Esto implica que las actividades de las especies superficiales son proporcionales para sus concentraciones. La ecuación del modelo de Langmuir es como sigue:

$$q = \frac{Q_{\max} b C_{eq}}{(1 + b C_{eq})}$$

El modelo de Langmuir fue originalmente desarrollado para sistemas en que la adsorción de plomo es realizada sobre una capa simple de soluto en la superficie de un adsorbente. A bajas superficies cubiertas, la isoterma de Langmuir se reduce a una relación lineal de calibración del modelo de una serie de datos experimentales que pueden ser realizados por una simple regresión de la forma linealizada del modelo (Atkins, 1991) o en su forma lineal:

$$\frac{C_{eq}}{q} = \frac{1}{Q_{max} \times b} + \frac{C_{eq}}{Q_{max}}$$

Nomenclatura:

q = Cantidad de adsorbato retenida en dependencia de la concentración inicial.

Q<sub>max</sub> = Máxima cantidad de adsorbato retenida por 1g de bioadsorbente.

C<sub>eq</sub> = Concentración de adsorbato cuando el sistema de adsorción alcanza el estado de equilibrio termodinámico.

b = Constante de equilibrio correspondiente al proceso de adsorción.

**b. Modelo de Adsorción de Freundlich.**

La Isoterma de Freundlich fue una de las primeras ecuaciones propuestas para relacionar la cantidad adsorbida con la concentración del material en la solución (Castellan, 1987).

Este modelo muestra una relación empírica que no permite determinar con exactitud la capacidad de adsorción, solo es aplicado a rangos de concentración bajos e intermedios (Brierley, J. y Brierley, C. 1987).

La ecuación de Freundlich se expresa a través de la ecuación:

$$q = KC_{eq}^{1/n}$$

o en su forma lineal:

$$\text{Log } q = \text{Log } K_f + \frac{1}{n} \text{Log } C_{eq}$$

Nomenclatura:

q = representa los gramos adsorbidos por gramo de adsorbente.

C<sub>eq</sub> = en g/L.

K y n = son constantes que dependen de la temperatura, naturaleza del adsorbente y adsorbato.

**1.3.7.4 Parámetros a considerar durante el proceso de biosorción.**

*La remoción de plomo, cadmio, zinc y níquel por una biomasa de bacterias* (Pardo y Col., 2003; Chojnacka, et al., 2005; Lu et al., 2006 citado en

Gerbino, 2013) es un proceso rápido en el que el grueso de la eliminación ocurre durante los primeros minutos de contacto entre el metal y la solución de biomasa.

“El **pH** es el parámetro más importante que influye en la capacidad de adsorción de un adsorbato sobre la superficie de la biomasa, ya que influye grandemente en las interacciones electrostáticas superficiales entre la biomasa y las diferentes especies químicas del metal, puestas en contacto” (Tasar, 2014 citado en Oré Lavado y Bendejú, 2015). “Así, la biosorción de metales a pH menores de 2-3 es muy baja, observándose la mayor eficiencia en medios ligeramente ácidos (pH entre 4 y 6). El efecto del pH es el resultado de la competencia de los cationes metálicos con los protones por sitios de unión cargados negativamente (grupo carboxilo y otros grupos funcionales ácidos) a través de diversos mecanismos. A pHs altos, la formación de hidróxidos de metal y otros complejos metal-ligando reduce significativamente la cantidad de iones metálicos adsorbidos” (Vijayaraghavan y Yun, 2008 citado en Gerbino, 2013).

“Otro parámetro importante en la biosorción es la **fuerza iónica**, que influye en la adsorción del soluto a la biomasa superficial (Daughney y Fein, 1998; Borrok y Fein, 2005 citado en Gerbino, 2013). El efecto de la fuerza iónica puede ser atribuido a la competencia entre los iones, los cambios en la actividad de metal, o en las propiedades de la doble capa eléctrica. Cuando dos fases, por ejemplo, la superficie de la biomasa y el soluto en solución acuosa están en contacto, están obligados a estar rodeados por una doble capa eléctrica, debido a la interacción electrostática. Por lo tanto, la adsorción de cationes metálicos disminuye con el aumento de la fuerza iónica” (Dönmez y Aksu, 2002 citado en Gerbino, 2013). “Algunos iones inorgánicos, tales como cloruro, pueden formar complejos con algunos iones metálicos y, por lo tanto, afectar el proceso de biosorción” (Borowitzka, 1988 citado en Gerbino, 2013).

“La **dosis** de biosorbente influye en gran medida en el grado de biosorción. En muchos casos, dosis más bajas de biosorbente producen mayores captaciones y bajas eficiencias de remoción porcentuales” (Aksu y Cagatay, 2006; Vijayaraghavan et al., 2006 citado en Gerbino, 2013).

“Un aumento en la concentración de biomasa en general, aumenta la

*cantidad de soluto biosorbido, debido a la mayor área superficial del biosorbente, que a su vez aumenta el número de sitios de unión” (Esposito et al., 2001 citado en Gerbino, 2013). “A la inversa, la cantidad de soluto adsorbido por unidad de peso de biosorbente decrece con el incremento de la de la dosis de biosorbente, lo cual puede ser el resultado de la compleja interacción de varios factores. Un factor importante a altas dosis de adsorbente es que el soluto disponible sea insuficiente para cubrir completamente los sitios intercambiables en el biosorbente, lo que usualmente resulta en la baja captación de solutos” (Tangaromsuk et al., 2002 citado en Gerbino, 2013). También, como sugirió Gadd et al. (1988), la interferencia entre sitios de unión debido a un aumento de dosis biosorbente no puede ser descartada, ya que esto dará lugar a una adsorción específica baja.*

*“La **temperatura** no parece afectar en gran medida la biosorción dentro del intervalo de 20 a 35 °C” (Vegliò y Beolchini, 1997 citado en Gerbino, 2013). “Las temperaturas más altas generalmente mejoran la adsorción debido al aumento de la actividad superficial y la energía cinética del soluto” (Sağ, et al., 2000; Vijayaraghavan y Yun, 2007 citado en Gerbino, 2013). “Sin embargo, puede esperarse daño físico del biosorbente a altas temperaturas. Debido a la naturaleza exotérmica de algunos procesos de adsorción, se ha encontrado que un aumento en la temperatura reduce la capacidad de biosorción de la biomasa” (Mameri, et al., 1999.; Suhasini, et al, 1999 citado en Gerbino, 2013).*

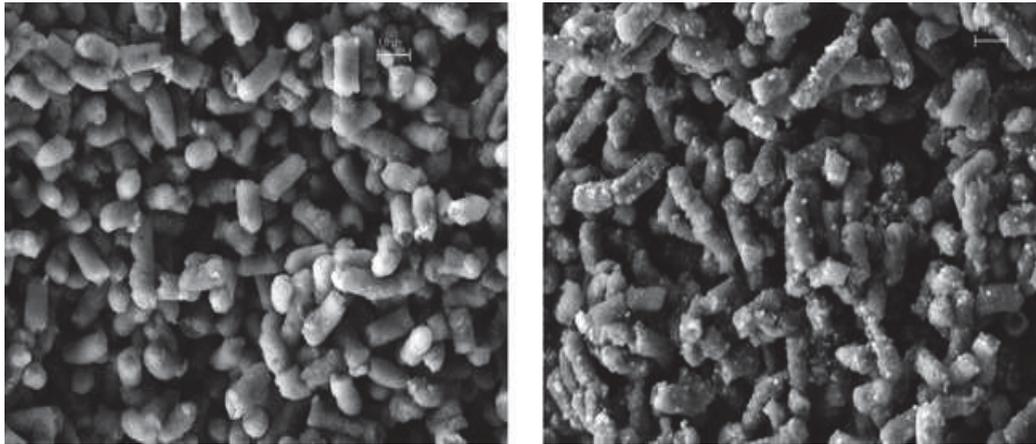
*“La **concentración inicial de soluto** tiene un efecto importante en la biosorción. Una concentración inicial alta resulta en una adsorción alta de soluto por unidad de peso de biosorbente, a pesar de que la eficiencia de remoción decrece. Esto es debido a que a una concentración inicial baja de soluto, la relación de los moles iniciales de soluto y el área de superficie disponible es baja; posteriormente, la fracción de adsorción se hace independiente de la concentración inicial. Sin embargo, a concentraciones más altas, los sitios disponibles para adsorción son cada vez menores en comparación con los moles de soluto presente. De ahí que la eliminación de soluto es fuertemente dependiente de la concentración de soluto inicial” (Vijayaraghavan, y Yun, 2008 citado en Gerbino, 2013).*

*“El tamaño del biosorbente también juega un papel vital en la biosorción. Las partículas de tamaño más pequeñas tienen un área de superficie mayor, que a su vez favorece biosorción y resulta en un tiempo de equilibrado más corto”* (Vijayaraghavan y Yun 2008 citado en Gerbino, 2013).

### **1.3.8 Biosorción de metales pesados por microorganismos.**

La biosorción es un fenómeno ampliamente estudiado en la biorremediación de diversos metales pesados como el cadmio, cromo, plomo, níquel, zinc y cobre (Jianlong *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2003; Srinath *et al.*, 2002; Tangaromsuk *et al.* 2002 citado en Vullo, 2003). Los microorganismos utilizados como biosorbentes, son aislados a partir de ecosistemas contaminados (Vullo, 2003). La alternativa del empleo de biosorbentes microbianos para la remoción y recuperación de metales tóxicos a partir de efluentes industriales resulta un método eficiente y menos costoso, que puede actuar como suplemento o sistema de pulimento para los procesos existentes (Quintelas y Col., 2008; Zheng *et al.*, 2008 citado en Marrero, 2010).

La capacidad de remoción de metales de los microorganismos que incluyen bacterias (Figura 09), microalgas y hongos, es superior a la de los métodos convencionales y la adquisición, remoción de los metales puede ser selectiva (Li *et al.*, 2008; Dens & Ting, 2005; Tan, *et al.*, 2002 citado en Marrero, 2010). En las últimas décadas, la resistencia bacteriana a metales pesados, sus mecanismos y determinantes genéticos, han recibido especial atención debido a que las cepas resistentes pueden utilizarse como una alternativa en la detoxificación de ecosistemas contaminados por estos agentes. Existen tres áreas fundamentales de aplicación de los determinantes genéticos de resistencia a metales pesados en la Biotecnología: 1) incorporación de los determinantes de resistencia desde un organismo a otro que sería utilizado en bioprocesos relacionados con metales pesados, 2) bioextracción de metales estratégicos, preciosos o radiactivos, directamente desde los minerales o por recobrado de metales desde efluentes de procesos industriales y 3) restauración de ambientes contaminados con metales ( Nies, 1999 citado en Marrero, 2010).



*Figura 09:* Fotografía obtenida por microscopía electrónica de transmisión de *Klebsiella sp. 3S1* antes (izquierda) y después (derecha) de la biosorción de Pb.

Fuente: <http://www.interempresas.net>

La biosorción involucra una fase sólida (biosorbente, como las membranas o paredes celulares) y una fase líquida (solvente que generalmente es agua) en el cual están la(s) especie(s) metálica(s) a ser biosorbida(s) (sorbato), este último es atraído hacia el sólido siendo atrapado por diversos mecanismos, como las interacciones con los diferentes grupos funcionales que se encuentran en las superficies celulares de los microorganismos (no necesariamente requiere actividad biológica, biomasa muerta).

Los potenciales sitios de unión en las superficies celulares son las hidroxilos, sulfhidrilos, aminas, amidas, grupos imidazol, carboxilos, fosfatos, y tioesteres, entre otros (Cañizares, 2000; Greene, 1986; Kapoor y Viraghavan, 1998; Urrutia y Col., 1992; Valls y De Lorenzo, 2002; Volesky & Holan, 1995 citado en Mejia, 2006). Igualmente se debe proporcionar un pH adecuado, que permita la desprotonación de los grupos funcionales ionizables y poder llevarse a cabo las interacciones iónicas.

El proceso de biosorción es continuo, hasta que se establece un equilibrio entre el sorbato disuelto y el sorbato biosorbido por la biomasa. El tipo y la calidad del biosorbente (biomasa viva o muerta) están dadas por la cantidad de sorbato que puede atraer y retener en un instante determinado.

En un proceso biotecnológico de recuperación y descontaminación de un medio acuoso contaminado con metales pesados, los microorganismos que actúan como biosorbentes son puestos en contacto con el agua contaminada y una vez que la biomasa ha removido los iones metálicos del medio acuoso, se

tiene la opción de recuperar la biomasa viva e introducirla en un nuevo ciclo de biorrecuperación o biorremediación (se utilizan químicos suaves para bajar el pH y retirar los metales, sin destruir las células bacterianas). En caso de que no importe la integridad funcional de la biomasa o se trabaje con biomasa muerta, el o los metales se pueden retirar por métodos más drásticos como la incineración (Figura 10).

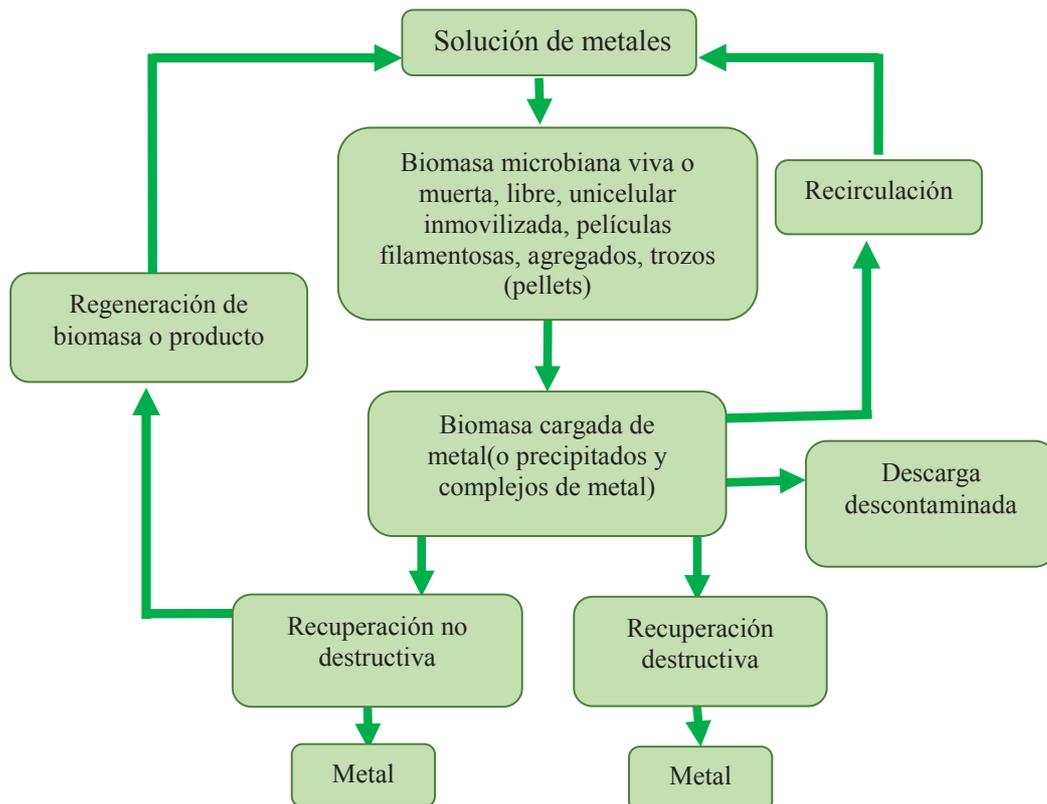


Figura 10. Principios básicos involucrados en la eliminación o recuperación de metales de soluciones acuosas por biomasa microbiana o productos derivados. Fuente Gadd (1988).

➤ *Microorganismos como biosorbentes disponibles en el mercado y sus aplicaciones industriales.*

Los biosorbentes tienen un mercado donde circulan productos como ALGASORBTM, BIOCLAIMTM y BIOFIXTM.

ALGASORBTM se compone principalmente del alga *Chlorella vulgaris* que puede remover y reducir las concentraciones de cadmio y mercurio a niveles por debajo de los estándares requeridos para agua de bebida.

BIOCLAIMTM está elaborado a partir de biomasa bacteriana del género *Bacillus*, es capaz de adsorber oro, cadmio, zinc de soluciones cianhídricas con una eficiencia del más del 99%. No es selectivo, y los metales pueden recuperarse usando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Na(OH) y agentes complejantes, permitiendo que los gránulos del biosorbente pueden ser regenerados y reusados nuevamente en otro ciclo de adsorción.

Tanto ALGASORBTM y BIOCLAIMTM son biosorbentes que pueden remover eficientemente iones metálicos de soluciones diluidas (10 a 100 mg/L) reduciendo su concentración a valores menores de 1mg/L, además el proceso no se ve afectado por la presencia de iones como calcio y magnesio (Hutchins *et al.*, 1997; Kuyucak, 1997, Basha; Murthy, 2007 citado en Plaza, 2012).

BIOFIXTM, es una mezcla de biomasa de musgos, algas, levaduras, cianobacteria *Spirulina sp.* y plantas como *Lemna sp.* y *Sphagnum sp.* La adsorción de zinc por este biosorbente es cuatro veces más alta que las resinas de intercambio iónico sintéticas. Su afinidad por los diferentes metales es según el siguiente orden: Al(III)>Cd(II)>Zn(II)>Mn(II)>(Mg(II) y Ca(II)) (Basha y Murthy, 2007 citado en Plaza, J. 2012).

Además existen otros biosorbentes como MetaGeneR y RAHCO Bio-beads que son efectivos para la remoción de metales pesados aplicados a los efluentes industriales de galvanoplastia y de la minería. Es escasa la información que se tiene acerca de sus aplicaciones (Atkinson *et al.*, 1998 citado en Plaza, 2012).

### **1.3.9 Biomasa bacteriana como biosorbente.**

En términos microbiológicos biomasa se define como la masa celular o peso total del material vivo (Scragg, 1999), la biomasa bacteriana se obtiene mediante procedimientos microbiológicos.

La biomasa de microorganismos que presentan pared celular son muy eficientes en los procesos de biosorción, debido a que esta pared es una estructura muy compleja, conformada por péptidos y carbohidratos, que a su vez forman un polímero orgánico llamado peptidoglicano (De Lorenzo & Valls, 2002; Kotrba, 1999; Valls, *et al.*, 2000 citado en Mejia, 2006).

El peptidoglicano es muy similar en bacterias Gram negativas y en Gram Positivas (Figura 11) y está formado por finas laminas compuesta por dos derivados de azucres, N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico, y un pequeño grupo de aminoácidos que incluyen L-alanina, D-alanina, D-glutámico y o bien lisina o ácido diaminopimelico (DAP). Estos componentes se unen entre sí para formar una estructura repetitiva que se denomina tetrapeptido de glicano (Figura 12). La estructura básica del peptidoglicano está constituida por una lámina en la que las cadenas de derivados de azucres se conectan entre sí por puentes péptidicos a través de los aminoácidos (Figura 13 y 14) (Madigan, 2003).

El peptidoglicano está conformado por una alta densidad de grupos funcionales ionizables, los cuales al protonarse a un pH determinado unen mediante atracciones electrostáticas los metales pesados (cationes). Además, algunas bacterias tienen la capacidad de segregar exopolisacáridos y proteínas, denominadas en conjunto glucocalix, acumulándose en el exterior de la pared celular, teniendo grupos funcionales ionizables, potenciales para la unión de iones metálicos. Algunas de estas proteínas son, LamB, OmpA, y PAL (De Lorenzo & Valls, 2002; Kotrba, 1999; Valls, *et al.*, 2000 citado en Mejia, 2006).

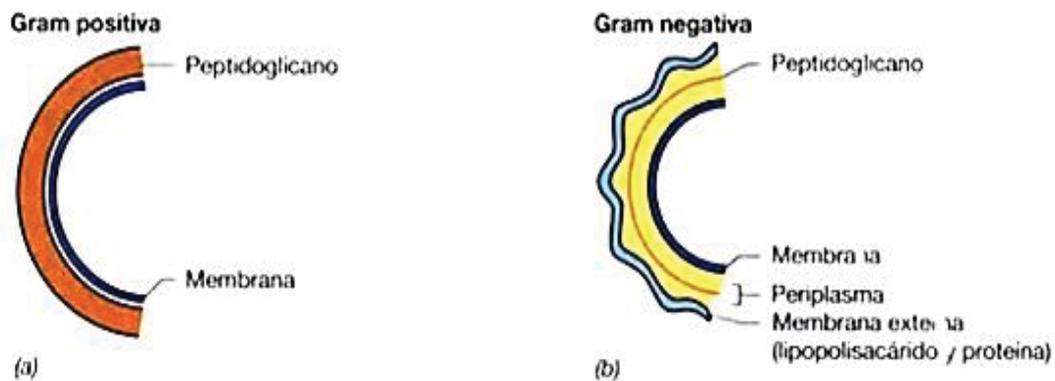


Figura 11. Paredes celulares de Bacteria (a,b) diagramas esquemáticos de paredes celulares de Gram positivas y Gram negativas  
Fuente: (Madigan, 2003).



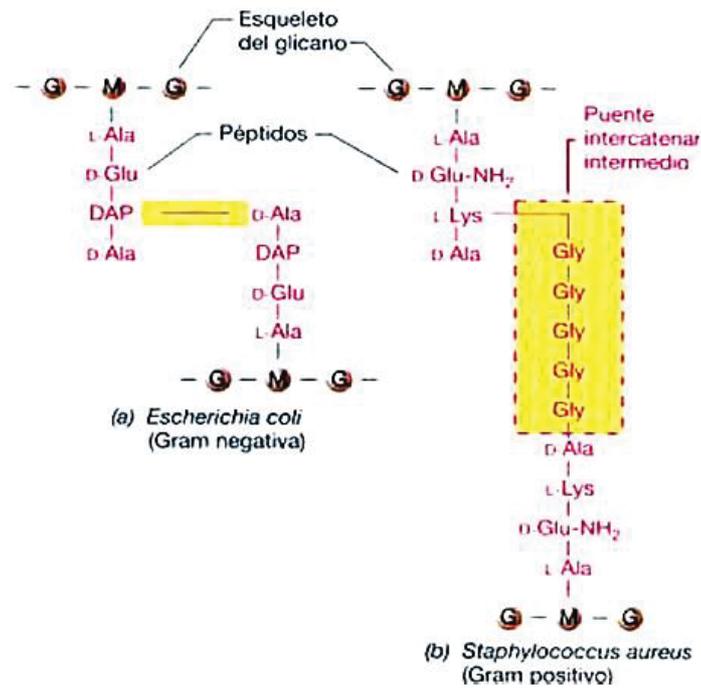


Figura 14. Conexión entre las unidades peptídicas y las de glicano en formación de una lámina de peptidoglicano (a) sin puente intermedio de las bacterias Gram negativas (b) con un puente intermedio de pentaglicina en la Gram positiva *Staphylococcus aureus*.

Fuente: (Madigan, 2003).

### 1.3.9.1 Biomasa de bacterias Gram positivas.

En las bacterias Gram-positivas la pared celular constituye el primer frente de interacción con las moléculas presentes en el ambiente (Madigan *et al.*, 2003). En los medios de cultivo apropiados para el crecimiento bacteriano, las especies Gram-positivas presentan una pared celular cargada negativamente, aunque también contiene cargas positivas en menor número. Los sitios aniónicos son el carboxilato del peptidoglicano y el fosfato del ácido teicoico, mientras que los sitios catiónicos son los grupos amonio de la D-alanina (ácido teicoico), los grupos amino de los azúcares (glicano) y del ácido diaminopimélico (porción peptídica del peptidoglicano). Estos grupos son las porciones iónicas que sirven de mediadoras entre la pared celular y los iones metálicos (Doyle *et al.*, 1980; Doyle, 1989). Los cationes necesarios para las funciones proteicas o la actividad enzimática deben atravesar la pared celular de las bacterias Gram-positivas para alcanzar sus sitios de unión cerca de la membrana o

en el citoplasma. El transporte de iones metálicos al citoplasma bacteriano, presenta diferentes niveles de complejidad.

➤ *Pared celular de las bacterias Gram positivas*

En bacterias Gram positivas, el peptidoglicano representa hasta el 90% de la pared y hace que esta sea más ancha, aunque otra clase de componentes, los ácidos teicoicos, también suele estar presentes en pequeñas cantidades (Figura 15). Sin embargo algunas bacterias poseen solo una capa de peptidoglicano rodeando a la célula, muchas otras, presentan varias capas (hasta 25 en algunos casos).

En el peptidoglicano de estas bacterias, los enlaces entre la N-acetilglucosamina y el ácido N-acetilmurámico se establecen con frecuencia a modo de puente interpeptídico mediante varios aminoácidos, cuyo número y tipo depende de los distintos organismos. En *Staphylococcus aureus*, una de las bacterias Gram positivas mejor conocidas, cada puente está formado por cinco glicinas conectadas por enlaces peptídicos.

Muchas bacterias Gram positivas presentan embebidos en su pared polisacáridos ácidos denominados ácidos teicoicos. El termino se refiere a los polímeros de la pared, de la membrana o de la capsula que contiene unidades de gliserolfosfato o de ribitolfosfato. Estos polialcoholes están unidos por ésteres fosfato y a menudo presentan unidos otros azúcares y D-alanina. Debido a su carga negativa, los ácidos teicoicos son en parte responsables de la carga negativa neta de la superficie de las células y puede intervenir en el paso de iones a través de la pared celular. Algunos de estos ácidos que contienen glicerol están unidos a los lípidos de la membrana de la bacteria y debido a esta íntima asociación con lípidos, tales ácidos teicoidos se denominan también ácidos lipoteicoicos (Madigan, 2003).

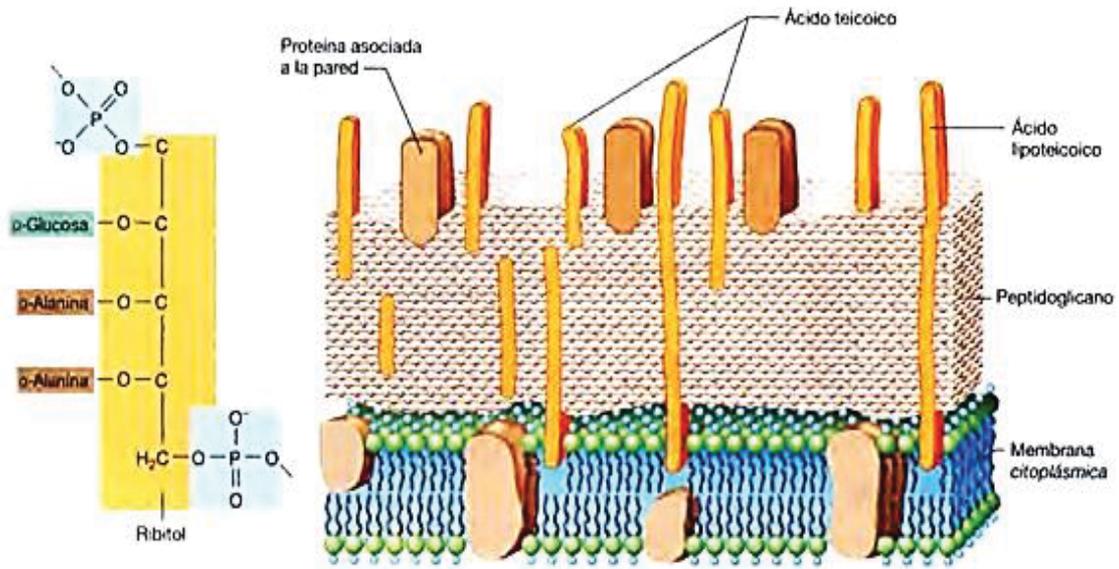


Figura 15: (a) Estructura del ácido ribitolteicoico de *Bacillus subtilis*. (b) diagrama general de la pared celular Gram positiva.  
Fuente: Madigan (2003).

### 1.3.9.2 Biomasa de bacterias Gram Negativas

En las bacterias Gramnegativas, la membrana externa es capaz de unir un amplio rango de iones metálicos. Los cationes al parecer son accesorios importantes que estabilizan la arquitectura molecular de la membrana. También se supone que la unión a iones metálicos reduce las cargas repulsivas entre los constituyentes aniónicos de moléculas de lipopolisacáridos y proteínas adyacentes (Ferris, 1989 citado en Suárez y Reyes, 2001); Beveridge y Murray (1980); Beveridge y Koval (1981) y Beveridge (1986) han demostrado que los grupos fosforilo de los lipopolisacáridos, son los constituyentes de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas que primero se unen a los iones metálicos, y algunos grupos carboxilo también están disponibles para interactuar con los metales. Sin embargo, es el peptidoglicano quien se une fuertemente a los iones metálicos por los grupos carboxilo, al igual que ocurre en las bacterias Gram-positivas, pero en menor escala. (Suárez y Reyes., 2001).

➤ *Pared celular de las bacterias Gram negativas*

En bacterias Gram negativas el peptidoglicano constituye solo alrededor del 10% de pared, los puentes entre N-acteilglucosamina y el ácido N-acetilmuramico se establecen, por lo general, mediante enlace peptídico directo del grupo amino del diaminopimelico al grupo carboxilo de la D-alanina terminal. Además del peptidoglicano, la bacteria Gram negativa posee en su pared una capa adicional que está compuesta de lipopolisacaridos. De hecho esta capa presenta una segunda capa lipídica, si bien hay que destacar que no consta solamente de fosfolípidos como la membrana citoplasmática, sino que contiene polisacáridos y proteínas. Los lípidos y polisacáridos están estrechamente unidos en la capa externa formando estructuras lipopolisacaridicas específicas. La presencia del lipopolisacaridos justifica que la membrana externa se denomine frecuentemente capa lipopolisacarido o simplemente utilizado para esta estructura es el de la membrana externa (Madigan, 2003).

La estructura del lipopolisacarido consta de dos porciones: el núcleo del polisacárido y el polisacárido O. En salmonella, donde se ha estudiado con cierto detalle, el núcleo del polisacárido está compuesto por cetodexioctonato (KDO), azucares de siete carbonos (heptosas), glucosa, galactosa y *N*-acetilglucosamina. El polisacárido O está unido al núcleo y consta generalmente de galactosa, glucosa, ramnosa y manosa (azucares de 6 carbonos) así como uno o más dideoxiazucares poco frecuentes como abecuesa, colitosa, paratosa o tivelosa. Estos azucares se unen entre si formando secuencias de cuatro o cinco unidades que a menudo se hallan ramificadas. La repetición de estas secuencias de azucares da lugar a la formación de un largo polisacárido O.

En la relación del polisacárido O con el resto del LPS, la parte lipídica del polisacárido conocida como lípido A, no es un lípido de glicerol sino que los ácidos grasos se unen por la unión amino éster a un disacárido con compuesto de *N*-acetilglucosamina-fosfato. El disacárido se une al núcleo del polisacárido a través del KDO. Los ácidos grasos que normalmente se encuentran en el lípido A son el ácido caproico, laurico, mirístico, palmítico y esteárico. En la membrana externa, el LPS se asocia con varias



embargo la interacción de la biomasa inactiva con el metal será llevada a cabo netamente por la biosorción.

A continuación la tabla 03 muestra la comparación de remoción de metales pesados por biomasa inactiva y activa en las cuales se desarrollan respectivamente los procesos de biosorción y bioacumulación, términos que describen dos fenómenos que es necesario diferenciarlos.

**Tabla 03**

*Ventajas y desventajas de biosorción por biomasa inactiva y activa*

<b>Biosorción por biomasa inactiva</b>	<b>Bioacumulación (Incorporación por células vivas inmovilizadas)</b>
<b>Ventajas</b>	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Independiente del crecimiento (biomasa muerta o inactiva), no sujeto a las limitaciones de toxicidad. No necesita de nutrientes en la solución de alimentación, de disposición de nutrientes, ni productos metabólicos.</li> <li>2. Los procesos no están gobernados por limitaciones biológicas</li> <li>3. La selección de la técnica de inmovilización no está gobernada por limitaciones de toxicidad o inactivación térmica.</li> <li>4. Son muy rápidos y eficientes en la remoción de metales; la biomasa se comporta como un intercambiador de iones.</li> <li>5. Los metales pueden ser liberados fácilmente y recuperados.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Aunque cada célula puede llegar a saturarse, el sistema se auto-restablece debido al crecimiento.</li> <li>2. Los metales se depositan en un estado químico alterado y menos sensible a la desorción espontánea.</li> <li>3. La actividad metabólica puede ser la única forma económica de lograr cambios en estado de valencia o degradar compuestos organometálicos; se pueden utilizar sistemas multienzimáticos.</li> <li>4. Se pueden mejorar las cepas por medio del aislamiento de mutantes o la manipulación genética, debido a que ésta es una propiedad microbiana más que un producto bajo explotación.</li> <li>5. Se pueden emplear dos o más organismos de una manera sinérgica.</li> </ol>
<b>Desventajas</b>	
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Rápida saturación: cuando los sitios de interacción con el metal están ocupados, es necesario remover el metal antes de utilizarse nuevamente, sin importar su valor.</li> <li>2. El secuestro por adsorción es sensible al pH.</li> <li>3. El estado de valencia del metal no puede ser alterado biológicamente (como por ejemplo, para dar formas menos solubles).</li> <li>4. Las especies organometálicas no son susceptibles de degradación.</li> <li>5. El mejoramiento de estos procesos biológicos es limitado ya que las células no efectúan un metabolismo; la producción de agentes adsorbentes ocurre durante la etapa de precrecimiento.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. La toxicidad; sólo se pueden tratar los metales a bajas concentraciones, sin embargo se han utilizado cepas resistentes a los metales.</li> <li>2. Es necesario alimentar los flujos bajo condiciones fisiológicamente permisibles.</li> <li>3. Se necesitan nutrientes para el crecimiento.</li> <li>4. La disposición de los productos metabólicos y los nutrientes del crecimiento no consumidos.</li> <li>5. Los productos metabólicos pueden formar complejos con los metales, impidiendo la precipitación.</li> <li>6. El modelamiento de un sistema no definido representa grandes dificultades matemáticas.</li> </ol>

Fuente: Macaskie (1990).

### **1.3.10 Botadero de Haqira.**

Este botadero empezó a operar en junio del año 2001 y se le calcula una vida útil hasta el año 2015. Actualmente se vienen realizando trabajos de contingencia para ampliar el periodo funcionamiento (4 años más a partir del 2015). La administración del botadero es realizada por el SELIP y la operación es realizada por la Gerencia de Medio Ambiente de la Municipalidad Provincial del Cusco (PIGARS CUSCO, 2010; Municipalidad Provincial del Cusco, 2015).

#### ***a. Ubicación política.***

**Departamento:** Cusco  
**Provincia:** Cusco  
**Distrito:** Santiago  
**Localidad:** Comunidad campesina de Haqira (figura 17).  
Fuente: (PIGARS CUSCO, 2010).

#### ***b. Localización.***

El “Botadero de Haqira” está ubicada en la comunidad campesina Haqira, en cabeceras de la microcuenca del río Huatanay, a 7,5 Km al sur-oeste de la ciudad del Cusco, y a 3 Km de la población urbana.

Coordenadas UTM WGS18 zona 18L y 19L

Coordenada X: 8 499 938 m, 8 500 500 m E

Coordenada Y: 823 000 m, 823 300 m N

Altitud: 3910 m - 3930 m.

(Fuente: Municipalidad Provincial del Cusco, 2005).

#### ***c. Accesibilidad.***

El acceso al botadero es limitado debido a que la carretera, en varios tramos, tiene pendiente superior al 15% y en su desarrollo presenta curvas cerradas que limitan una adecuada maniobrabilidad de los vehículos (PIGARS-CUSCO, 2010).

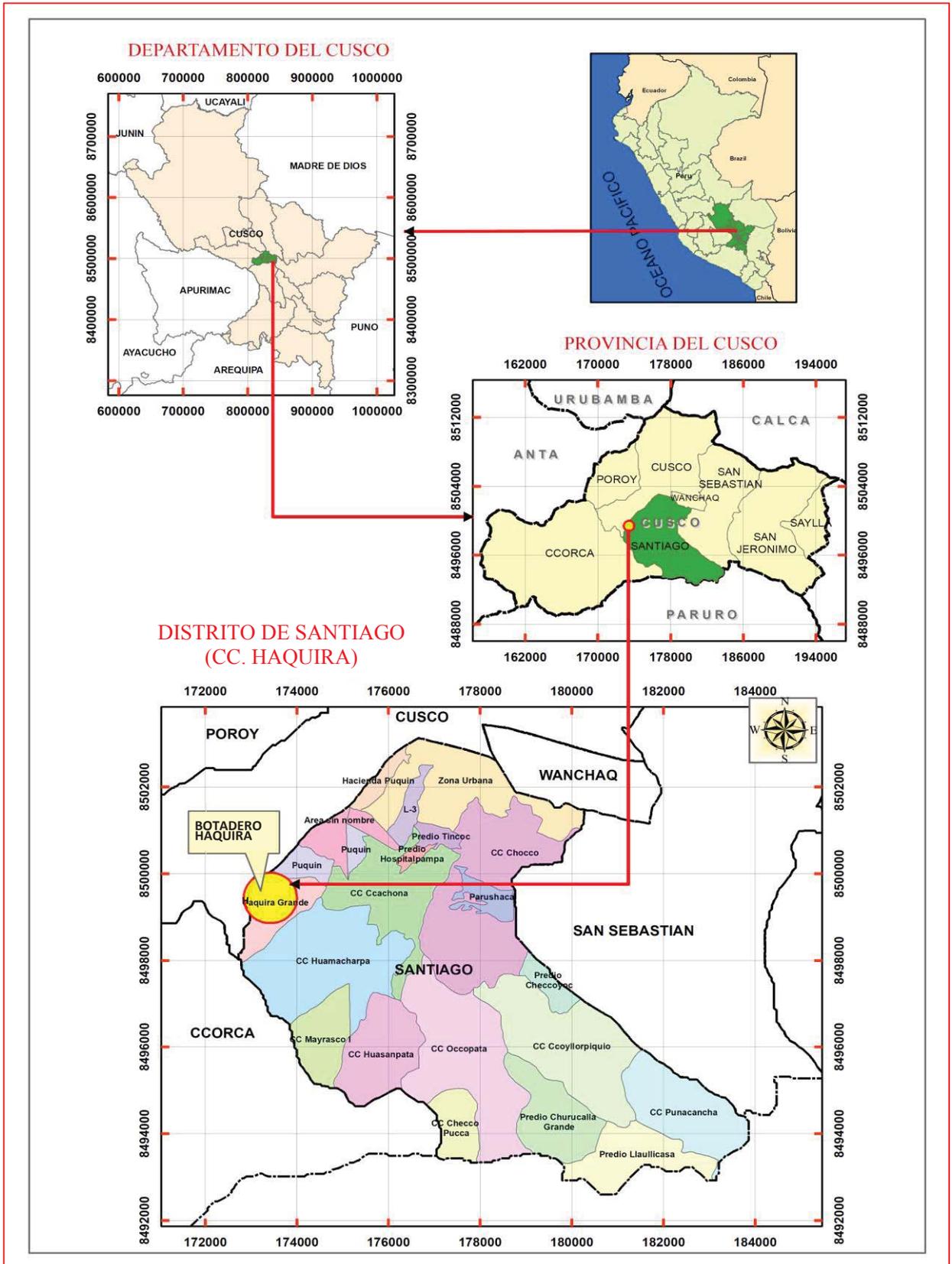


Figura 17: Mapa de ubicación política del Botadero de Haqira.

Fuente: (Elaboración propia).

**d. Disposición de residuos sólidos y tratamiento de lixiviados en el botadero de Haquira**

En el botadero de Haquira se viene manejando un método de trinchera para la disposición de los residuos sólidos y procesos de evaporación y recirculación para los lixiviados provenientes de estos. El botadero, para su soterrado, presenta 4 plataformas de las cuales 3 están soterradas y una está en proceso de soterramiento; cada plataforma contiene 15 m de altura de residuos sólidos y 5 m de material de recubrimiento y adicional a ello existe una geomembrana que se coloca entre plataformas; además en la base y hacia la parte externa de cada plataforma se encuentra una canaleta de recolección común, que lleva los lixiviados hacia una poza (P<sub>2</sub>) de 337,5 m<sup>3</sup> de capacidad, es de recolección, ubicada en la zona sur, parte baja del botadero y demora 4 días para llenarse en temporada seca y un periodo más corto en temporada de lluvias; de aquí, una vez llenada, los lixiviados pasan a una poza adyacente más pequeña (P<sub>3</sub>) de 35m<sup>3</sup> de capacidad por donde son bombeados hacia la poza (P<sub>1</sub>) de 180 m<sup>3</sup> (parte alta) llenada esta, el lixiviado es vertido de nuevo hacia las plataformas y comienza de nuevo el ciclo de recirculación de lixiviados (Figura 18), esperando que se evaporen en el ambiente. El sedimento que se va formando a partir de los lixiviados tienen un tiempo de permanencia de 1 a 2 años, cumplido dicho periodo es retirado de las pozas (Evidencias propias en campo Mayo, 2015).

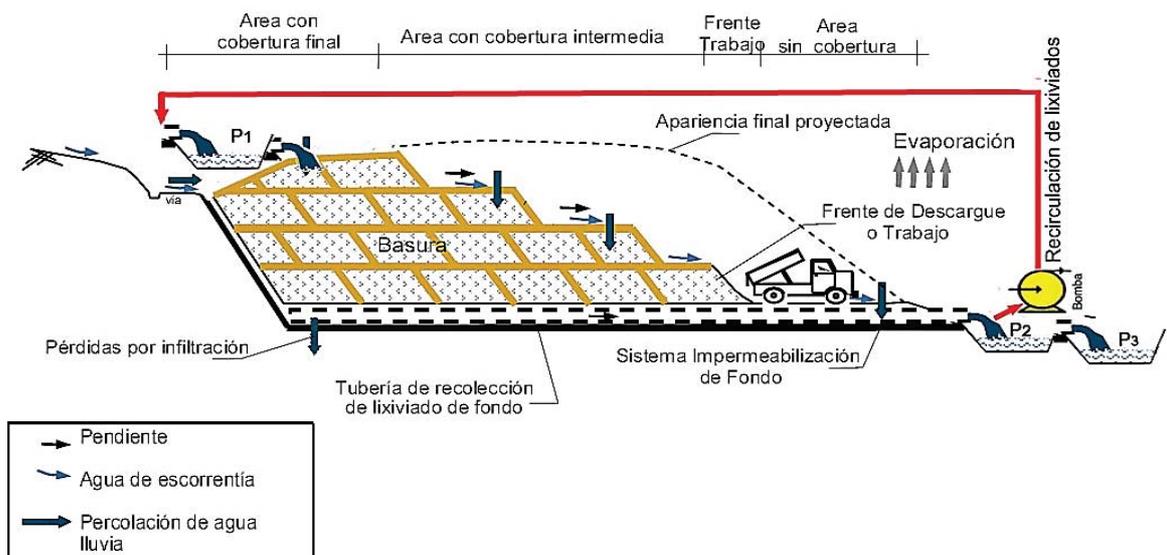


Figura 18. Operación del botadero de Haquira.

Fuente: (Adaptado de Jaramillo, 2001, evidencias en campo, 2015).

*e. Metales pesados en el suelo del botadero de Haquira.*

En agosto del 2014 el organismo de Evaluación y Fiscalización Ambiental (OEFA) realizó un monitoreo ambiental en el botadero de Haquira, teniendo dentro de ello resultados como la concentración de contaminantes orgánicos e inorgánico, a continuación se muestra un cuadro de la concentración promedio de metales pesados en el suelo de los residuos sólidos.

**Tabla 04**

*Concentración promedio de metales pesados en el suelo de los residuos sólidos*

<b>Metal pesado</b>	<b>Concentración promedio mg/Kg</b>
<b>Antimonio Total</b>	<0,07
<b>Arsénico Total</b>	<0,06
<b>Bismuto Total</b>	<2,6
<b>Boro Total</b>	<5,0
<b>Cadmio Total</b>	<0,2
<b>Cobalto Total</b>	45,85
<b>Cobre Total</b>	12,0
<b>Cromo Total</b>	11,64
<b>Manganeso Total</b>	425,75
<b>Mercurio Total</b>	<0,03
<b>Molibdeno Total</b>	35,85
<b>Niquel Total</b>	7,25
<b>Plomo Total</b>	5,68
<b>Selenio Total</b>	<0,14
<b>Zinc Total</b>	20,8

Fuente: (OEFA, 2014).

## Capítulo II: Material y Métodos

### 2.1 Material

#### 2.1.1. Materiales varios

- Agua destilada
- Alcohol al 70%.
- Algodón.
- Asa y aguja de siembra.
- Bandejas
- Bolsas transparentes de polipropileno
- Cámara digital
- Cintas pH-métricas
- Cooler refrigerado
- Cuaderno de campo
- Cucharas y cucharillas de acero inoxidable
- Dispositivo de toma de muestra de sedimentos (Diseño propio)
- Envases de plástico con capacidad de 3000 mL
- Escala Mcfarland
- Filtros de nitrato de celulosa de 0,45  $\mu\text{m}$
- Frascos estériles de 100 mL de capacidad con tapa rosca
- Implementos de bioseguridad: botas, mascarillas, barbijo, gorra
- guantes, mamelucos, gafas y casco
- Jeringas x 20 mL
- Lápices, lapiceros, cinta de embalaje y marcador indeleble
- Mechero Bunsen
- Mortero y pistilo de mármol
- Mortero y pistilo de porcelana
- Muestras de sedimentos de lixiviados (Lodos)
- Paños para limpieza
- Papel aluminio
- Pinzas de acero inoxidable.
- Pipetas Pasteur descartables
- Refrigerantes (Gelpacks)
- Solución desinfectante de lejía al 5%
- Termómetro
- Termómetro ambiental.
- Tips de micropipeta
- Tubos de centrifuga de plástico x 14mL
- Tubos Falcón x 50 mL
- Papel Kraft

#### 2.1.2. Material de vidrio.

- Desecador
- Erlenmeyers x 50mL, 100mL, 250mL y 500mL
- Frasco de vidrio de 3L de capacidad con boca ancha

- Frascos de vidrio x 100 mL
- Laminas porta y cubreobjetos
- Matraz aforado x 50, 100, 250, 500 y 1000 mL.
- Pipetas graduadas x 1mL, 5mL y 10mL
- Placas Petri de vidrio de 100mm x 15mm
- Placas Petri de vidrio de 60mm x 12mm
- Tubos de ensayo con y sin tapa rosca

### **2.1.3 Equipos y aparatos**

- Agitador Magnético termostatzado J.P. SELECTA, s.a
- Autoclave PHOENNIX
- Balanza analítica CHYO BALANCE CORP JAPAN
- Baño maría con agitación VIBROTHERM
- Centrifuga EBA 200
- Cronometro
- Espectrofotómetro de absorción atómica PERKIN ELMER *ANALIST 100*
- Espectrofotómetro de IR por Transformada de Fourier (FTIR) THERMO *NICOLET 380*
- Espectrofotómetro UV-VIS, T80+PG
- Horno Pasteur
- Incubadora con agitación JEIO TECH LAB COMPANION SI-600
- Incubadora H.W. KESSEL *JP SELECTA*
- Microscopio óptico LEYCA
- Potenciómetro JENWAY 3510

### **2.1.4 Reactivos y medios de cultivo**

- Ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) 0.1 N
- Ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) concentrado
- Agar nutritivo
- Agua desionizada
- Agua destilada
- Agua peptonada
- Bateria para tinción Gram
- Bromuro de potasio al 99.6%

- Caldo BHI
- Caldo Nutritivo
- Hidróxido de sodio (NaOH) 0.1 N
- Nitrato de plomo  $Pb(NO_3)_2$  99.8 % de pureza
- Solución estándar de Pb (1000 mg/L).
- Tiras reactivas para determinación de citocromo-oxidasa

## 2.2 Métodos

A continuación en el diagrama siguiente se muestra las etapas que se establecieron en la investigación.

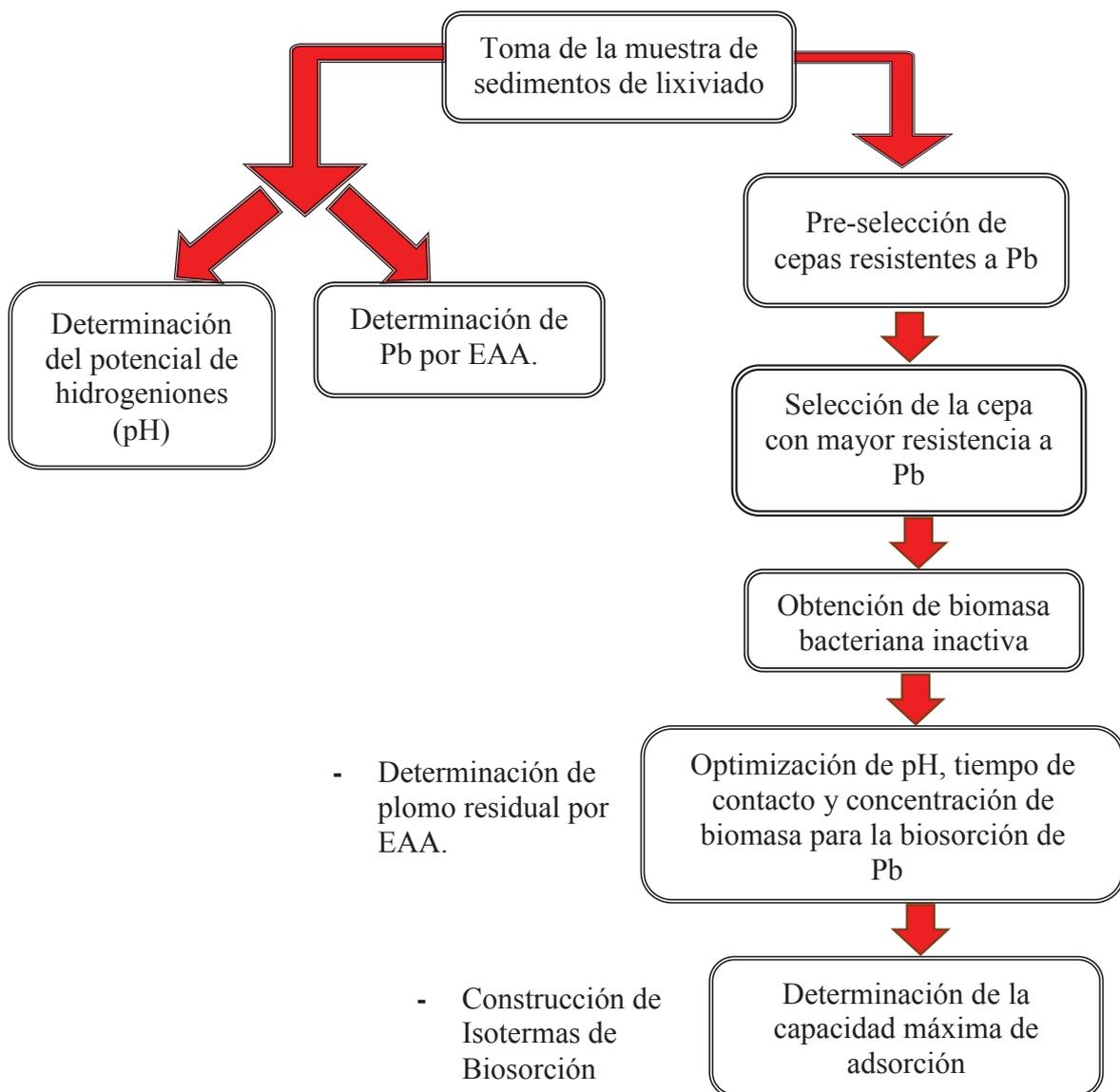


Figura 19: Diagrama de flujo de la investigación

Fuente: (Elaboración propia).

### **2.2.1 Lugar de ejecución de la investigación**

La investigación se desarrolló en laboratorios de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco (UNSAAC) y laboratorios externos, según se detalla a continuación:

- La toma de muestras de sedimento se realizó en dos pozas operativas de lixiviados del botadero de Haqira – Cusco
- Los procedimientos microbiológicos se llevaron a cabo en el laboratorio de Biotecnología de la Escuela Profesional de Biología, las lecturas de densidad óptica de crecimiento microbiano, en el laboratorio de Industria Farmacéutica de la escuela profesional de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.
- Los procedimientos físico-químicos se realizaron en el laboratorio de Biotecnología y Ecología de la Escuela Profesional de Biología de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.
- La identificación molecular de la cepa bacteriana con mayor resistencia a plomo se realizó en el Instituto de Biotecnología del ADN Uchumayo – Arequipa.
- La determinación de plomo en sedimentos de lixiviados por EAA se realizó en la Unidad de Servicios de Análisis Químicos de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos - Lima.
- La determinación de plomo por EAA en soluciones acuosas se realizó en Laboratorios Analíticos del Sur – Arequipa.
- La determinación del espectro IR de la biomasa bacteriana fue realizada en el laboratorio de Química Orgánica del Departamento Académico de Química de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

### **2.2.2 Toma de muestra**

#### ***a. Medición de la temperatura.***

- Sujetado por un cordón de nylon, se sumergió el termómetro en las pozas de lixiviado hasta hacer contacto con el sedimento que estuvo situado aproximadamente de 1.10 a 1.30 metros, profundidad a la que se obtuvieron las muestras.

- Se extrajo el termómetro luego de 10 minutos de contacto y se realizó la lectura de la temperatura.

### ***b. Consideraciones previas.***

La toma de muestra se realizó el 5 de agosto del 2015 entre las 9:00 y 11:30 de la mañana con el consentimiento y supervisión del ingeniero residente del botadero controlado de Haquira.

Se obtuvo una muestra representativa de sedimentos de las pozas de lixiviados operativas, teniendo en cuenta que su recirculación es prácticamente constante, el tiempo de residencia en las pozas es corto.

Se obtuvo una muestra total de 1000 mL de sedimento, a partir de la homogenización de 10 muestras parciales de 100 mL (5 muestras por cada poza de lixiviados) la misma que fue sometida a la determinación de plomo, pH y procedimientos bacteriológicos.

### ***c. Procedimiento.***

- Para la obtención de las muestras parciales se rotularon frascos estériles con tapa de plástico con el número de muestra, poza y fecha.
- Se acopló un frasco a un dispositivo provisto de un mecanismo que le permite la apertura y cierre del frasco cuando está sumergido en la poza de lixiviado y hace contacto con el sedimento que está depositado en el fondo.
- Se sumergió el dispositivo con el frasco acoplado y se acciono el mecanismo de toma de muestra de sedimento.
- Se retiró el dispositivo de la poza, se procedió a asegurar herméticamente el frasco y se desacoplo del dispositivo para ser colocado en una bolsa de polipropileno y depositado en un cooler.
- Se desinfectó el dispositivo con una solución de lejía al 5 % y se colocó otro frasco estéril para tomar una nueva muestra.
- Las muestras fueron transportadas en cooler al laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias de la UNSAAC.

#### ***d. Obtención de la muestra representativa.***

Una vez en el laboratorio se procedió a trasvasar el contenido de los 10 frascos a un recipiente de 3000 mL de capacidad y se homogenizó para obtener una muestra representativa.

#### **2.2.3 Determinación del potencial de hidrogeniones (pH) en sedimentos de lixiviado.**

A partir de una porción de la muestra representativa se preparó una suspensión de lodo con agua en una proporción muestra: agua de 1:2,5 y en el sobrenadante se determinó el pH según el método propuesto por Zagal y Sadzawka (2007).

#### **2.2.4 Determinación de la concentración de plomo en sedimentos de lixiviados.**

Se tomó dos muestras de 200 g a partir de la muestra representativa de sedimento, fueron secadas a 40°C y se enviaron al Servicio de Análisis Químicos de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos - Lima para la determinación de Pb por espectrofotometría de absorción atómica.

#### **2.2.5 Aislamiento de cepas resistentes a plomo**

##### ***a. Enriquecimiento***

En un matraz erlenmeyer con 100 mL de medio infusión de Cerebro Corazón (BHI) suplementado con una solución de 50 mg/L de nitrato de plomo ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ) correspondiente a 31.28 mg/L de Pb (II) (concentración de disolución óptima del nitrato de plomo). Se colocó 50 g de muestra. Se incubó a 30°C (temperatura media para crecimiento de bacterias mesofílicas ambientales) con agitación (100 rpm) durante 7 días (Adaptado de Gómez, Coto, Abín, y Hernández, 2002).

##### ***b. Pre-selección de cepas resistentes al Pb***

Con el objetivo de hacer una pre-selección de bacterias capaces de crecer en presencia de Pb (II), la colección de cepas se obtuvo a partir de los microorganismos aislados tras un proceso de presión selectiva, para lo que se efectuó un trasvase a un erlenmeyer conteniendo 45 mL de medio BHI con

100mg/L de  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  correspondiente a 62,56 mg/L de Pb(II), al cual se inoculó 5 mL del cultivo precedente y se incubó durante 7 días, a 30 °C y 100 rpm. Seguidamente se realizó diluciones sucesivas hasta  $10^{-7}$  en agua peptonada para luego sembrarlas por diseminación en agar nutritivo adicionado con 150 mg/L  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  correspondiente a 93,8 mg/L de Pb (II), cada siembra se realizó por duplicado a 30°C por 48 horas.

Se seleccionó aquellas placas que presentaron crecimiento entre 30 y 300 unidades formadoras de colonias (UFC), suficientemente aisladas para caracterizarlas por tinción Gram. Se eligieron aquellas colonias que por su morfología fueron predominantes en el medio y se le realizó un repique a tubos conteniendo agar nutritivo para la obtención de cepas bacterianas (Adaptado de Lopez, 2011).

### ***c. Colección de cepas***

Para asegurar la obtención de cepas axénicas, se realizó 5 repiques sucesivos de cada cepa mediante agotamiento de superficie en agar nutritivo. Se repicó cada cepa a tubos con agar nutritivo inclinado que fueron incubados a 30°C por 48 horas, y luego mantenidos en refrigeración a 4 °C.

## **2.2.6 Caracterización macroscópica y microscópica de las cepas resistentes al Plomo**

### **a. Caracterización macroscópica**

Las cepas bacterianas elegidas fueron sembradas en placas con agar nutritivo y se incubaron durante 48 h a 30°C, en seguida se determinó las características de la morfología colonial (Madigan *et al.*, 2003).

### **b. Caracterización microscópica**

Se realizó mediante frotis y tinción Gram siguiendo el protocolo establecido (Madigan *et al.*, 2003) que consistió en fijar el frotiz al calor seguido por adición de solución de cristal violeta en cantidad suficiente para cubrir el portaobjeto, luego se adicionó una solución fijadora de lugol y en seguida se realizó la extracción del colorante con alcohol-acetona, finalmente se adicionó

safranina como colorante de contraste, entre cada adición de reactivo se hizo un enjuague con agua. Las preparaciones fueron observadas al microscopio óptico con objetivo de inmersión (100X), evaluándose tanto la forma como el color.

### 2.2.7 Prueba de resistencia a Pb en medio de cultivo líquido

Se prepararon baterías de tubos conteniendo 7mL de caldo nutritivo suplementados con concentraciones crecientes de plomo (II) que corresponden a soluciones de nitrato de plomo calculados a partir de la fórmula consignada en el ítem 2.2.10(a) que se muestra en la tabla 05.

**Tabla 05**

*Concentraciones de plomo correspondientes a soluciones de nitrato de plomo en caldo nutritivo*

<b>Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> mg/L</b>	<b>Pb (II) mg/L</b>
0	0 (tratamiento testigo)
100	62,56
300	187,70
600	375,35
800	500,47
1000	625,59
1100	688,15
1200	750,71
1300	813,26
1400	875,82

Cada tubo fue inoculado con 50µL de una suspensión de  $1 \times 10^8$  células/mL (escala 0,5 Mcfarland) con la cepa correspondiente y se incubaron a 30°C y 120 rpm por 216 horas. La determinación de crecimiento se realizó evaluando la absorbancia de una muestra del cultivo medida a 620 nm en espectrofotómetro cada 48 h (como indica la metodología). Las lecturas de absorbancias se expresaron en densidades ópticas normalizadas en función del tiempo cero aplicando la formula siguiente:

$$D. O_N = \frac{X_{t_n}}{X_{t_0}}$$

donde:

$D. O_N$ : Densidad óptica normalizada  
 $X_{t_n}$ : Absorbancia en el tiempo “n”  
 $X_{t_0}$ : Absorbancia en el tiempo cero “0”

Fuente: (Iturbe y Col, 2015)

Adicionalmente al cabo de este periodo se determinó la concentración celular por el método de conteo de células viables por siembra por extensión en placa conteniendo agar nutritivo a partir de la dilución  $10^{-2}$  de cada concentración de plomo incubados a 30°C por 48 horas.

Se seleccionó la cepa con mayor resistencia a plomo. (Adaptado de Garza, 2005 - Gómez y Col., 2002).

### **2.2.8 Identificación molecular de la cepa con mayor resistencia a Pb**

La identificación molecular que fue llevada a cabo en el instituto de biotecnología del ADN Uchumayo en la ciudad de Arequipa consistió en la extracción de ADN de la muestra usando el Kit “The MasterPure™ DNA Purification” que provee todos los reactivos necesarios para la recuperación de ADN utilizado para amplificación de la región 16S RNAr del fragmento de RNA de la subunidad 30S de los ribosomas procariontes, mediante PCR.

La amplificación correspondiente a la región del gen 16S RNAr se llevó a cabo usando los primer universales 27F y 1492R.

27F, 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'

1492R 5'-TACCTTGTTACGACTT-3'

Las condiciones de PCR fueron:

95°C por 30 segundos.

50°C por 30 segundos.

72°C por 45 segundos.

Los productos de PCR fueron purificados usando el kit Qiagen PCR purification, y se siguió las instrucciones de la compañía, los productos purificados fueron secuenciados usando la técnica de Sanger que utiliza colorantes Big Dye V3.1 y leídos en un equipo ABI 3730xl (Anexo 4).

### **2.2.9 Obtención de la biomasa bacteriana inactiva**

Se obtuvo la biomasa a partir de la cepa bacteriana con mayor resistencia a Pb, para lo cual, se determinó el tiempo en que la cepa se habría establecido completamente en la fase estacionaria, el mismo que fue adoptado para la obtención de la biomasa a utilizar en el estudio.

### ***a. Monitoreo del crecimiento bacteriano***

Se realizó inoculando 0,714mL de una suspensión bacteriana de  $1 \times 10^8$  células/mL a un matraz erlenmeyer que contenía 100 mL de caldo nutritivo; se incubó a 30°C y 80 rpm. Se monitoreo el crecimiento durante 98 horas tomando muestras periódicas del cultivo, periodos que se estableció según la velocidad de crecimiento de la cepa bacteriana a partir de ensayos pilotos, las mismas que fueron evaluadas midiendo la absorbancia a 620 nm (Cruz, 2008; Madigan *et al.*, 2003).

### ***b. Producción de biomasa***

Se preparó 7,14 mL de una suspensión bacteriana de  $1 \times 10^8$  células/mL, la cual fue inoculada distribuyendo equitativamente a matraces erlenmeyer que en conjunto contenían 1,0 L de caldo nutritivo. Se incubaron a 30°C y 80 rpm por 30 horas (Ferrari y Col., 2004).

### ***c. Obtención de biomasa bacteriana inactiva***

El cultivo precedente se autoclavó a 121°C por 15 minutos. Se recolectó en tubos de centrifuga que luego se sometieron a 5000 rpm de centrifugación por un periodo de 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y el sedimento se sometió a dos lavados sucesivos con agua desionizada repitiendo las mismas condiciones anteriores de centrifugación (Ferrari y Col., 2004). Se recuperó el sedimento que vendría a ser la biomasa purificada y se procedió al secado a 60°C por 4 horas y luego 105°C durante 6 horas. Se determinó el peso seco y se conservó en frasco herméticamente cerrado a 4°C hasta la realización de las pruebas de biosorción de plomo (Adaptado de Tur y Col, 2012).

## **2.2.10 Determinación de la biosorción de plomo por la biomasa inactiva**

### ***a. Preparación de soluciones de Pb***

Las soluciones de Pb (II) se prepararon a partir de nitrato de plomo ( $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ ) al 99.8% (Tur. y Col. 2012).

Teniendo en cuenta que el solvente es agua (densidad 1 g/cm<sup>3</sup>), las soluciones de Pb en mg/L requeridas, se prepararon mediante la siguiente fórmula:

$$X \text{ mg Pb(NO}_3)_2 = \frac{331,208 \text{ mg Pb(NO}_3)_2 * Y \text{ mg Pb}}{207,2 \text{ mg Pb}}$$

donde:

**X**=mg/L Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>: miligramos de Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> requeridos para disolver en un litro de agua.

**Y**=mg/L Pb: miligramos de plomo que se desea obtener al pesar **X** miligramos de Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>.

### ***b. Determinación de la eficiencia de Biosorción de Plomo***

Para la construcción de las curvas de eficiencia, se definió el porcentaje de biosorción de acuerdo a la ecuación:

$$\% \text{ de biosorción} = \frac{(C_i - C_f) * 100}{C_i}$$

donde:

**C<sub>i</sub>**: Concentración inicial de plomo (II) en la solución.

**C<sub>f</sub>**: Concentración final de plomo (II) en la solución.

### ***c. Determinación de la capacidad de biosorción (q)***

La capacidad de biosorción de la biomasa inactiva fue utilizada para la determinación del tipo de isoterma con que se lleva a cabo el proceso de biosorción. Está es medida en miligramos de metal adsorbido por gramo de biomasa seca:

$$q(\text{mg/g}) = \frac{(C_f - C_i)V}{m}$$

Donde C<sub>i</sub> y C<sub>f</sub> son respectivamente las concentraciones inicial y final de Pb (II) en las disoluciones (mg/L), V es el volumen de disolución (L) y m es la biomasa seca de la cepa bacteriana (g) (Cheung, Porter, y McKay, 2001).

#### ***d. Determinación del pH óptimo para la biosorción***

Con la finalidad de determinar el pH óptimo para la biosorción del plomo, se simularon sistemas de biosorción preparando 30 mL de solución con 26,75 mg/L de plomo en diferentes frascos de vidrio, cada uno se ajustó a valores de pH: 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 y 7,5, utilizando NaOH 0,1N y HNO<sub>3</sub> 0,1N. La concentración de la biomasa fue 1g/L, temperatura de reacción: 18°C, velocidad de agitación: 130 rpm y tiempo de reacción 360 minutos (velocidad y tiempo referencial). Se separó la biomasa por centrifugación a 4500 rpm por 10 minutos y luego por filtración en membranas de nitrato de celulosa de 0,45 µm, el filtrado se acidificó con HNO<sub>3</sub> concentrado a pH <2 y almacenado en tubos Falcón de primer uso a 4°C hasta la determinación de Pb por espectrofotometría de absorción atómica (EAA). Cada experimento se realizó por duplicado y se hizo un análisis de datos de la eficiencia de remoción frente al pH (Adaptado de Tur y Col., 2012).

#### ***e. Determinación del tiempo óptimo de contacto en la biosorción***

El tiempo optimo, es aquel en que el sistema alcanza el equilibrio, es decir que la biomasa bacteriana no sea capaz de seguir biosorbiendo el metal. Para ello se preparó 350 mL de solución de Pb a una concentración de 29.10 mg/L; las condiciones fueron: pH óptimo determinado, concentración de biomasa 1g/L, temperatura: 18°C y agitación de 130 rpm. Los tiempos al que el sistema fue sometido fueron: 0, 10, 20, 30, 40, 60, 120, 180, 240, 360 minutos. Cada experimento se realizó por duplicado. Se separó la biomasa por centrifugación a 4500 rpm por 10 minutos y luego por filtración en membranas de nitrato de celulosa de 0,45 µm, el filtrado se acidificó con HNO<sub>3</sub> concentrado a un pH<2 y almacenado en tubos Falcón de primer uso a 4°C hasta la determinación de Pb por EAA. Finalmente se realizó un análisis de datos de la eficiencia de remoción frente al tiempo (Adaptado de Volesky, 1990; Dimas, 2011).

#### ***f. Determinación de la concentración de biomasa inactiva óptima en la biosorción***

Con la finalidad de determinar la concentración de la biomasa bacteriana adecuada para el proceso de biosorción del plomo, se prepararon 30 mL de solución a 24.78 mg/L del metal en frascos de vidrio, todos fueron ajustados al valor de pH óptimo y tiempo óptimo. Las concentraciones de la biomasa al que fue sometido la solución plomo fue: 0,1; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 g/L a temperatura de reacción 18°C y 130 rpm. Cada prueba se realizó por duplicado. Se separó la biomasa por centrifugación a 4500 rpm por 10 minutos y luego por filtración en membranas de nitrato de celulosa de 0,45  $\mu\text{m}$ , el filtrado se acidificó con  $\text{HNO}_3$  concentrado a un  $\text{pH} < 2$ , fue almacenado en tubos Falcón de primer uso a 4°C hasta la determinación de Pb por EAA. Se hizo un análisis de la eficiencia de remoción frente a la concentración de biomasa. Cada experimento se realizó por duplicado (Garza, 2005).

#### ***g. Pruebas para la construcción de Isotermas de biosorción***

Se prepararon 30 mL de soluciones de plomo a concentraciones: 0, 15,40; 44,40; 95,00; 186,20; 283,00 mg/L, luego se ajustaron a pH óptimo, se agregó la biomasa en concentración óptima, por un tiempo óptimo a 130 rpm y 18°C, se mantuvo constantes las condiciones durante todo el procedimiento. Se realizó cada prueba por duplicado

Se separó la biomasa por centrifugación a 4500 rpm por 10 minutos y luego por filtración en membranas de nitrato de celulosa de 0,45  $\mu\text{m}$ , el filtrado se acidificó con  $\text{HNO}_3$  concentrado a un  $\text{pH} < 2$ , fue almacenado en tubos Falcón de primer uso a 4°C hasta la determinación de Pb por EAA. Se determinó la capacidad de biosorción ( $q = \text{mg/g}$ ) de la biomasa bacteriana a las diferentes concentraciones estudiadas. (Adaptado de Dimas, 2011 y Garza, 2005).

#### ***h. Espectrofotometría de absorción atómica por llama aire-acetileno para soluciones de Pb***

Las pruebas de absorción atómica se realizaron en los Laboratorios Analíticos del Sur, en la ciudad de Arequipa, en el espectrofotómetro de absorción atómica PERKIN ELMER *ANALIST 100*.

##### **❖ Fundamento**

La espectrofotometría de absorción atómica consiste en que la muestra previamente tratada es aspirada y atomizada, seguidamente un rayo luminoso se dirige a través de la llama a un monocromador y un detector que mide la cantidad de luz emitida por el elemento atomizado en la llama. Como cada metal tiene su propia longitud de onda de absorción característica, se utiliza como fuente luminosa una lámpara (Cátodo hueco) compuesta de dicho elemento; esto proporciona un método relativamente libre de interferencias espectrales o de radiación. La cantidad de energía absorbida en la llama a una longitud de onda característica es proporcional a la concentración del elemento en la muestra en un intervalo de concentraciones limitado. La mayor parte de los instrumentos de absorción atómica están equipados también para funcionar en la forma de emisión. (APHA- AWWA- WPCF., 2005).

##### **❖ Procedimiento**

Se siguió el protocolo de trabajo siguiente:

- Se instaló la lámpara de cátodo hueco de plomo y se estableció un dial aproximado de longitud de onda, luego se encendió el equipo, y se dejó calentar y estabilizar por unos 20 minutos.
- Se instaló la cabeza del quemador y se ajustó su posición, se conectó el aire y se ajustó su velocidad de flujo, lo mismo para el acetileno, luego se dejó estabilizar la llama por unos minutos.
- Se realizó ajustes del nebulizador con aspirados de agua des ionizada y patrones para obtener una máxima sensibilidad.
- Se hizo registros de las absorbancias de los patrones.

- Se Inyectó la muestra y atomizar. Cuando la concentración fue mayor a la del estándar más alto, se diluyó en la misma matriz ácida y se volvió a analizar.
- Se verificó la ausencia de interferencias realizando la prueba de la dilución.
- Se leyó un estándar aproximadamente cada 10 inyecciones de muestras.

***i. Valoración de los posibles sitios de unión del Pb a la biomasa bacteriana mediante Espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier FTIR***

Las muestras para la espectroscopia de infrarrojos se procesaron y se corrieron en el laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

La biomasa bacteriana fue sometida a esta prueba antes y después de la biosorción.

➤ **Fundamento**

La técnica de espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) es una herramienta útil que puede ser aplicada para determinar la identidad y estados de protonación de grupos funcionales superficiales orgánicos presentes en un sólido, lo que permite conocer la estructura química del biosorbente y que resulta de especial importancia para comprender el proceso de biosorción de los iones metálicos (Yee *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2005; Srivastava *et al.*, 2006 citado en Martin, 2008).

➤ **Procedimiento**

- Se trituró 6 mg de la biomasa bacteriana con aproximadamente 60 mg de bromuro de potasio KBr y se colocó en un molde.
- Se prensó la mezcla sólida con aproximadamente 4 KPa (bajo estas condiciones, el KBr muestra las propiedades de un “fluido congelado”, es decir envuelve y dispersa perfectamente las

partículas de muestra y se produce finalmente una pastilla muy transparente).

- La pastilla que se obtuvo se analizó con el espectrofotómetro en el rango de 4000- 400  $\text{cm}^{-1}$  con una resolución de 2  $\text{cm}^{-1}$ . (Adaptado de Martin, 2008).

### **2.2.11 Análisis estadístico**

Siempre y cuando los datos lo permitieron, fueron analizados con el programa estadístico SPSS 22,0, se determinó la influencia de los distintos parámetros en estudio mediante la realización del Análisis Factorial de Varianza (ANOVA) y la prueba post Hoc de Tukey y se comprobó la existencia de diferencias significativas entre los distintos ensayos de cada parámetro.

### Capítulo III: Resultados y Discusión

#### 3.1. Contenido de plomo y pH en los sedimentos de lixiviados

La concentración de plomo y el pH de sedimentos en las 2 pozas operativas del sistema de recirculación de lixiviados, se muestran en la tabla 06.

**Tabla 06**

*Concentración de plomo y pH en los sedimentos de los lixiviados del botadero de Haqira*

Muestra	Concentración de plomo (ppm)	pH
POZA N° 2	<0,5	8,408
POZA N° 3	<0,5	8,318
PROMEDIO	<0,5	8,363

Fuente: elaboración en base a resultados consignados en los anexos 1. A y 1. B.

El contenido de plomo en el sedimento de ambas pozas es <0,5 ppm, que al parecer se debería por que el plomo estaría siendo retenido en el suelo mediante uniones firmes con el material orgánico, tal como reporta la OMS (1979) para el plomo y otros metales pesados. Esto explicaría la disminución de la concentración del metal, desde 5,68 ppm en el suelo de los residuos sólidos (OEFA, 2014) a <0,5 ppm en el sedimento de lixiviado. Cabe mencionar que tanto el lixiviado y sedimento provienen del suelo de los residuos sólidos y la percolación del agua de lluvia.

Por otro lado, el pH promedio de 8,3 en la muestra indica alcalinidad en el medio, y no habiendo reportes de evaluaciones de este parámetro en sedimentos, se optó por comparar los valores con la Clasificación de lixiviados según Renou *et al.* (2008) que se muestra en la tabla 02, ya que los lixiviados están en contacto directo con el sedimento. Por tanto en base a los valores obtenidos en este estudio, el sedimento se podría clasificar como proveniente de lixiviados de tipo viejo, con una formación mayor a 5 años. Dentro de esta misma clasificación se menciona a los lixiviados jóvenes que poseen una concentración de metales pesados >2 ppm. Se trataría entonces de un incremento de plomo a media que se retrocede en los años. Esto se

puede demostrar con los estudios de Camargo y Noguera (2007) quienes determinaron 1 ppm de plomo en los lixiviados, mientras que Quispe y Huamán (2013) determinaron 0,03 ppm de plomo.

Si se toma como referencia el pH alcalino del sedimento obtenido en el presente estudio (pH=8,6), y se compara con el resultado de Huamán y Jordán del año 2013 (pH=7,5) se puede apreciar un incremento de pH en el medio a medida que transcurre el tiempo, lo cual interviene en la disminución de la concentración del plomo y otros metales pesados.

Con estos fundamentos se podría asumir que en los primeros años de formación del botadero de Haquira habría existido valores >2 ppm de plomo en el medio, de manera que, a través del tiempo y el espacio, el botadero actuaría como un medio de interacción entre metales pesados y microorganismos.

### 3.2. Características de las cepas resistentes a plomo

Del proceso de enriquecimiento y cultivo en medio adicionado con plomo se logró aislar 5 cepas resistentes a 93,8 mg/L de plomo, en medio sólido. A continuación se describe las características macroscópicas y microscópicas en las tablas 07 y 08 respectivamente.

**Tabla 07**

*Características macroscópicas de colonias bacterianas predominantes resistentes a plomo*

CEPA	FORMA	BORDE	ELEVACIÓN	COLOR	DIÁMETRO (mm)	ASPECTO
BMA-01	Circular	Ondulado	Plana	Translucido	9	Cre moso
BMA-02	Irregular	Ondulado	Elevada	Amarillo semitranslucido	6	Cre moso
BMA-03	Circular	Entero	Convexo	Crema	2	Cre moso
BMA-04	Circular	Entero	Convexo	Crema semitranslucido	2	Cre moso
BMA-05	Circular	Ondulado	Elevado	Crema semitranslucido	7	Cre moso

Fuente: (Elaboración en base a la observación y descripción en laboratorio).

**Tabla 08**

*Características microscópicas y reacción de citocromo oxidasa de las cepas seleccionadas*

CEPA	GRAM	FORMA	AGRUPACIÓN	OXIDASA
BMA-01	Negativo	Cocobacilar	Aislados y en pares	Negativo
BMA-02	Negativo	Bacilar	Aislados y en pares	Negativo
BMA-03	Negativo	Bacilar	En pares	Positivo
BMA-04	Negativo	Bacilar	En pares	Negativo
BMA-05	Negativo	Bacilar	En pares	Negativo

Fuente: (Elaboración en base a observaciones microscópicas).

Las 5 cepas aisladas corresponden a bacterias Gram negativas, de las cuales 4 son bacilos y 1 cocobacilos.

La reacción de la oxidasa indica que la cepa BMA-03 es citocromo oxidasa positiva mientras que las demás son negativas. Se puede sospechar que se trataría de dos grandes grupos metabólicos: las bacterias fermentadoras y las no fermentadoras, siendo este último grupo oxidasa positiva; pero existe el inconveniente que no todas las bacterias oxidasa positivas son no fermentadoras, así que se podría estar frente a un grupo bastante heterogéneo, debido a que las cepas obtenidas provienen de un ambiente muy complejo.

El crecimiento de las bacterias en el medio con 150 mg/L  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  correspondiente a 93,8 mg/L de Pb (II) hace suponer que estas bacterias ejercerían algún tipo de resistencia a la toxicidad del metal. El hecho que las cepas procedentes del sedimento con <0,5 ppm de plomo, crezcan a concentraciones mayores a este valor, se debería a que dicha resistencia habría sido transmitida por sus antecesores cuando estos fueron sometidos a concentraciones elevadas del metal.

### **3.3. Resistencia a plomo de las cepas pre-seleccionadas**

El crecimiento de las cepas en caldo nutritivo adicionado con plomo a diferentes concentraciones, se muestra en absorbancias ópticas normalizadas en función al

tiempo cero (tablas: 09, 11, 13, 15 y 17), en base a las cuales se construyeron los gráficos correspondientes (figuras: 20, 21, 22, 23, 24). La corroboración de los resultados a 216 horas de crecimiento fue efectuada mediante el recuento de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) para determinar el crecimiento en agar nutritivo, y se presentan en las tablas: 10, 12, 14, 16, 18.

### 3.3.1 Resistencia a Pb de la cepa BMA-01.

**Tabla 09**

*Crecimiento de la cepa BMA-01 en caldo nutritivo adicionado con plomo a concentraciones crecientes, expresado en densidad óptica normalizada en función al tiempo cero, medida a 620nm*

Concentración Pb mg/L	Tiempo (h)				
	0	48	96	168	216
0	1,00	67,20	92,88	95,12	79,76
62,56	1,00	38,31	44,23	80,89	65,89
187,70	1,00	9,69	16,67	22,69	16,70
375,35	1,00	1,87	3,81	2,18	3,33
500,47	1,00	1,38	1,68	2,72	1,55
625,59	1,00	1,00	1,16	1,36	2,07
688,15	1,00	1,00	1,00	1,35	1,06
750,71	1,00	1,00	1,00	1,01	1,03
813,26	1,00	1,02	1,00	1,00	1,04
875,82	1,00	1,00	1,00	1,01	1,02

Fuente: Elaboración en base a resultados consignados en el Anexo 3.A.

En base a los datos de la tabla precedente, se ha construido el gráfico que se muestra a continuación.

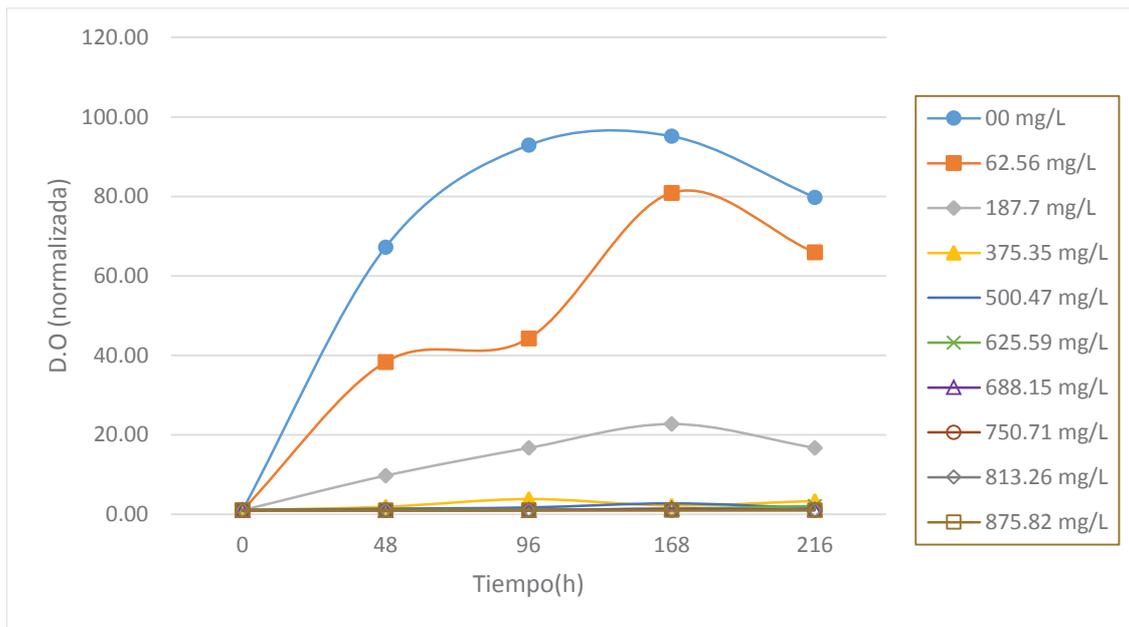


Figura 20: Crecimiento de la cepa BMA-01 en caldo nutritivo adicionado con plomo a concentraciones crecientes

**Tabla 10**

*Determinación del crecimiento de la cepa BMA-01 en agar nutritivo a partir de caldo nutritivo-Pb con 216 horas de crecimiento a 30°C*

Concentración de Pb mg/L	Crecimiento
0	++
62,56	++
187,70	++
375,35	++
500,47	++
625,59	++
688,15	++
750,71	++
813,26	+
875,82	-

Nota:

++: Crecimiento > 300 000 UFC/mL

+: Crecimiento < 300 000 UFC/mL

-: Sin crecimiento (< 1 UFC/mL)

Fuente: (Elaboración en base a resultados consignados en el anexo 3.B).

La tabla 09 y la figura 20 muestran que a la concentración de 62,56 mg/L de Pb empezó una disminución de la concentración celular lo que se manifestó en una disminución en la densidad óptica con respecto al tratamiento testigo (0 mg/L de Pb), que se debería al inhibitorio del metal sobre las células bacterianas. A 187,7 mg/L del metal se percibió una disminución importante de la concentración celular. A las concentraciones 375,5 y 500,47 mg/L de Pb el crecimiento bacteriano fue mínimo, comportamiento que indicaría que a medida que aumenta la concentración del metal se incrementa la inhibición bacteriana, así a las concentraciones  $\geq 625,59$  mg/L de Pb el crecimiento fue imperceptible al espectrofotómetro pero se descartó una inhibición total del crecimiento mediante cultivos en placa (tabla 10), los cuales muestran un crecimiento evidente hasta una concentración de 813,26 mg/L de Pb, en cambio a una concentración de 875,82 mg/L de Pb no se observó crecimiento alguno ( $<1$  UFC/ml), se asumió entonces que la cepa bacteriana ofrece resistencia hasta una concentración de 813.26 mg/L Pb en medio líquido.

### 3.3.2. Resistencia a Pb de la cepa BMA-02.

**Tabla 11**

*Crecimiento de la cepa BMA-02 en caldo nutritivo adicionado con plomo a concentraciones crecientes, expresado en densidad óptica normalizada en función al tiempo cero, medida a 620nm*

Concentración Pb mg/L	Tiempo (h)				
	0	48	96	168	216
0	1,00	41,04	68,80	132,32	107,52
62,56	1,00	38,35	36,53	40,52	38,51
187,70	1,00	9,35	9,57	6,76	2,55
375,35	1,00	1,31	1,21	1,53	2,26
500,47	1,00	1,27	1,11	1,06	1,02
625,59	1,00	1,00	1,02	1,07	1,00
688,15	1,00	1,00	1,00	1,00	1,05
750,71	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
813,26	1,00	1,00	1,02	1,00	1,04
875,82	1,00	1,00	1,00	1,02	1,00

Fuente: (Elaboración en base a resultados consignados en el anexo 3.C).

En base a los datos de la tabla precedente, se ha construido el gráfico que se muestra a continuación.

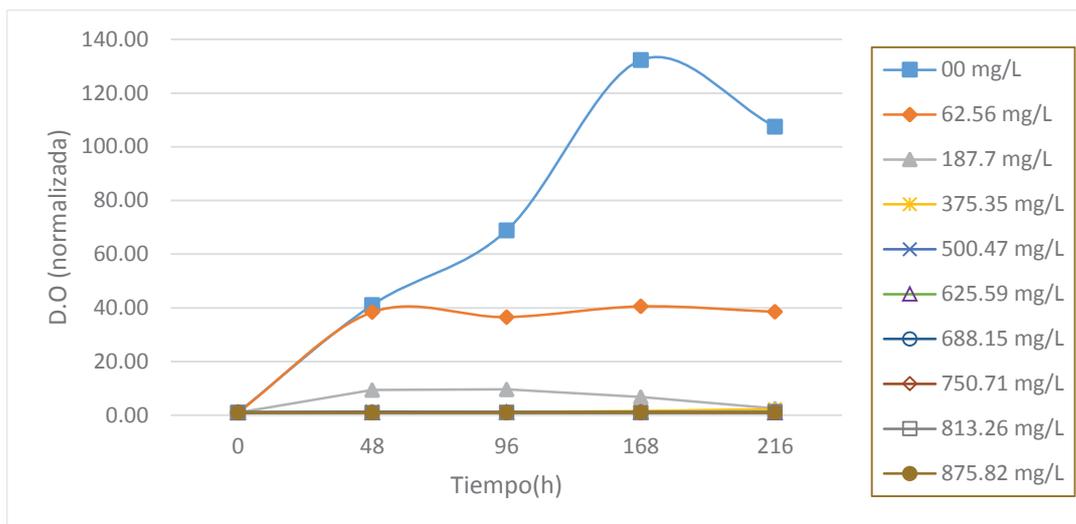


Figura 21: Crecimiento de la cepa BMA-02 en caldo nutritivo adicionado con plomo a diferentes concentraciones.

**Tabla 12**

Determinación del crecimiento de la cepa BMA-02 en agar nutritivo a partir de caldo nutritivo-Pb con 216 horas de crecimiento a 30°C

Concentración Pb (mg/L)	Crecimiento
0	++
62,56	++
187,70	++
375,35	++
500,47	++
625,59	-
688,15	-
750,71	-
813,26	-
875,82	-

Nota:

++: Crecimiento > 300 000 UFC/mL

+: Crecimiento < 300 000 UFC/mL

-: Sin crecimiento (< 1 UFC)

Fuente: (Elaboración en base a resultados consignados del anexo 3.D).

La tabla 11 y la figura 21 muestran que a la concentración de 62,56 mg/L de Pb se evidenció una disminución en la concentración celular, lo que se manifestó en una disminución de la densidad óptica con respecto al tratamiento testigo (0 mg/L de Pb), que se debería al efecto inhibitorio del plomo sobre las células bacterianas. A 187,7 mg/L del metal el crecimiento bacteriano fue mínimo producido por el incremento de la inhibición del metal, así a concentraciones  $\geq 375$  mg/L de Pb el crecimiento fue imperceptible al espectrofotómetro. El cultivo en placa (tabla 12) mostró un crecimiento evidente hasta 500,47 mg/L de Pb, en cambio a las concentraciones  $\geq 625,59$  mg/L de Pb no se evidenció crecimiento alguno ( $<1$  UFC/ml). Se asumió entonces que la cepa bacteriana ofrece resistencia hasta una concentración de 500.47 mg/L Pb en medio líquido.

### 3.3.3. Resistencia a Pb de la cepa BMA-03.

**Tabla 13**

*Crecimiento de la cepa BMA-03 en caldo nutritivo adicionado con plomo a concentraciones crecientes, expresado en densidad óptica normalizada en función al tiempo cero, medida a 620nm*

Concentración de Pb mg/L	Tiempo (h)				
	0	48	120	168	216
0	1,00	85,36	83,36	74,08	61,76
62,56	1,00	30,69	35,44	55,48	79,96
187,7	1,00	1,35	1,92	12,37	10,02
375,35	1,00	1,00	1,04	1,01	1,02
500,47	1,00	1,14	1,00	1,03	1,04
625,59	1,00	1,00	1,03	1,01	1,04
688,15	1,00	1,03	1,02	1,05	1,00
750,71	1,00	1,00	1,23	1,04	1,02
813,26	1,00	1,03	1,05	1,00	1,02
875,82	1,00	1,00	1,03	1,01	1,01

Fuente: (Elaboración en base a resultados consignados en el anexo 3.E).

En base a los datos de la tabla precedente, se ha construido el gráfico que se muestra a continuación.

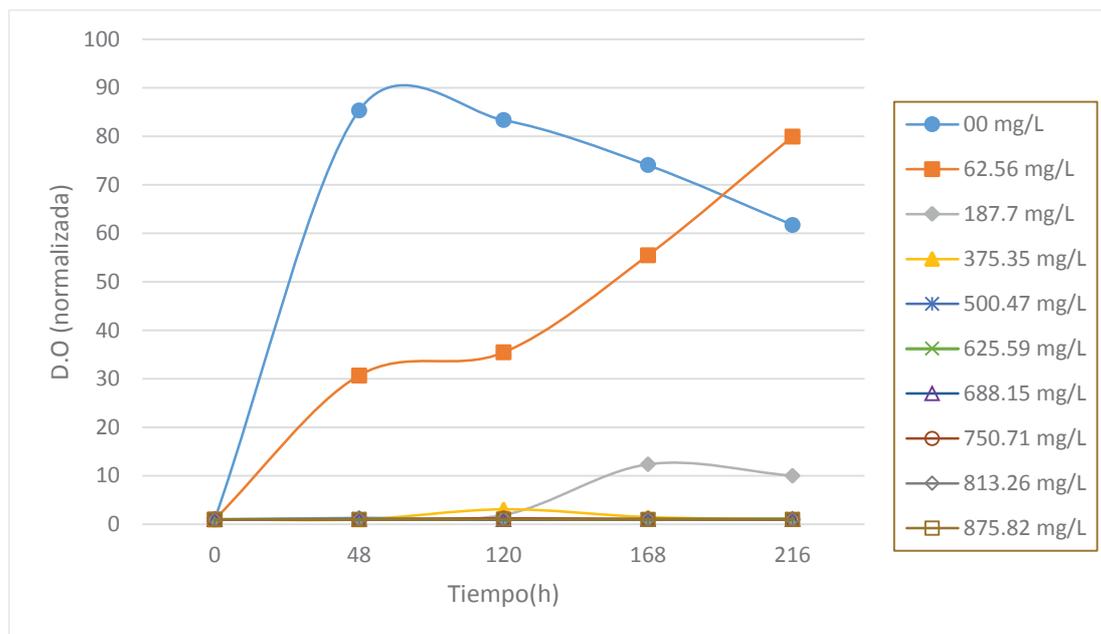


Figura 22: Crecimiento de la cepa BMA-03 en caldo nutritivo adicionado con Pb a diferentes concentraciones

**Tabla 14**

Determinación del crecimiento de la cepa BMA-03 en agar nutritivo a partir de caldo nutritivo-Pb con 216 horas de crecimiento a 30°C

Concentración de Pb (mg/L)	Recuento de UFC/mL
0	++
62,56	++
187,70	++
375,35	-
500,47	-
625,59	-
688,15	-
750,71	-
813,26	-
875,82	-

Nota:

++: Crecimiento > 300 000 UFC/mL

+: Crecimiento < 300 000 UFC/mL

-: Sin crecimiento (< 1 UFC/mL)

Fuente: (Elaboración en base a resultados consignados en el anexo 3.F).

La tabla 13 y la figura 22 muestran que a la concentración 62,56 mg/L de Pb se evidenció una disminución de la concentración celular lo que se manifestó en una disminución de la densidad óptica con respecto al tratamiento testigo (0 mg/L de Pb), que se debería al efecto inhibitorio del plomo sobre las células bacterianas. A 187,7 mg/L de plomo se percibió un crecimiento mínimo. A 375,35 mg/L de Pb el crecimiento fue imperceptible al espectrofotómetro. El cultivo en placa (tabla 14) mostró crecimiento bacteriano evidente hasta la concentración de 187,70 mg/L de Pb, en cambio a 375,35 mg/L de Pb no se observó crecimiento bacteriano alguno (<1 UFC/ml), se asumió entonces que la cepa BMA-03 es resistente hasta una concentración de 187.70 mg/L de Pb.

### 3.3.4. Resistencia a Pb de la cepa BMA-04.

**Tabla 15**

*Crecimiento de la cepa BMA-04 en caldo nutritivo adicionado con plomo a concentraciones crecientes, expresado en densidad óptica normalizada en función al tiempo cero medida a 620nm*

Concentración de Pb mg/L	Tiempo (h)				
	00	48	120	168	216
0	1,00	67,52	95,20	110,64	128,56
62,56	1,00	43,19	63,43	72,62	85,65
187,70	1,00	13,69	24,26	24,95	25,71
375,35	1,00	1,99	3,25	3,41	1,07
500,47	1,00	1,41	1,77	2,28	2,59
625,59	1,00	1,00	1,10	1,42	1,61
688,15	1,00	1,00	1,13	1,09	1,19
750,71	1,00	1,00	1,25	1,03	1,07
813,26	1,00	1,02	1,05	1,01	1,06
875,82	1,00	1,00	1,04	1,00	1,04

Fuente: (Elaboración en base a resultados consignados en el anexo 3.G).

En base a los datos de la tabla precedente, se ha construido el gráfico que se muestra a continuación.

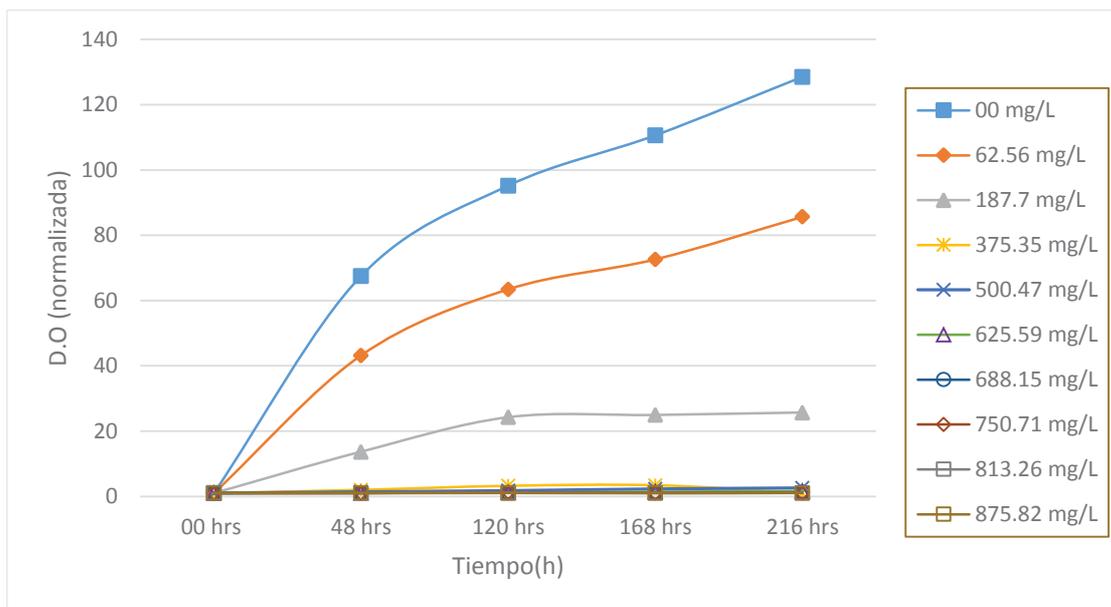


Figura 23: Crecimiento de la cepa BMA-04 en caldo nutritivo adicionado con Pb a diferentes concentraciones

**Tabla 16**

Determinación del crecimiento de la cepa BMA-04 en agar nutritivo a partir de caldo nutritivo-Pb con 216 horas de crecimiento a 30°C

Concentración de Pb	Recuento de UFC/mL
0	++
62,56	++
187,70	++
375,35	++
500,47	++
625,59	++
688,15	++
750,71	++
813,26	+
875,82	+

Nota:

++: Crecimiento > 300 000 UFC/mL

+: Crecimiento < 300 000 UFC/mL

Fuente: (Elaboración en base a resultados propios del anexo 3.H).

La tabla 15 y la figura 23 muestran que a concentraciones de 62,56 y 187,70 mg/L de Pb se evidenció una disminución en la concentración celular lo que se manifestó en una disminución de la densidad óptica con respecto al tratamiento testigo (0 mg/L de Pb), lo cual se debería al efecto inhibitorio del plomo. A 375,35 y 500,47 mg/L del metal, el crecimiento bacteriano fue mínimo. A concentraciones  $\geq 625,59$  mg/L de Pb el crecimiento fue imperceptible al espectrofotómetro. El cultivo en placa (Tabla 16) mostró un crecimiento evidente hasta la máxima concentración de Pb sometida (875,82 mg/L) presentando un recuento de 18 000 UFC/mL (Anexo 3. H) asumiendo que esta cepa vendría a ser resistente hasta una concentración  $>875,82$  mg/L de plomo.

### 3.3.5 Resistencia a Pb de la cepa BMA-05.

**Tabla 17**

*Crecimiento de la cepa BMA-05 en caldo nutritivo adicionado con plomo a concentraciones crecientes, expresado en densidad óptica normalizada en función al tiempo cero, medida a 620nm*

Concentración de Pb mg/L	Tiempo (h)				
	00	48	120	168	216
<b>0</b>	1,00	62,16	78,96	87,92	100,08
<b>62,56</b>	1,00	43,67	46,85	72,10	76,13
<b>187,70</b>	1,00	9,54	22,69	22,33	20,68
<b>375,35</b>	1,00	2,73	1,00	3,35	3,60
<b>500,47</b>	1,00	1,36	2,11	2,22	2,50
<b>625,59</b>	1,00	1,00	1,02	1,00	1,10
<b>688,15</b>	1,00	1,06	1,00	1,05	1,17
<b>750,71</b>	1,00	1,02	1,06	1,00	1,10
<b>813,26</b>	1,00	1,03	1,05	1,00	1,01
<b>875,82</b>	1,00	1,00	1,01	1,00	1,00

Fuente: (Elaboración en base a resultados propios del anexo 5.I).

En base a los datos de la tabla precedente, se ha construido el gráfico que se muestra a continuación.

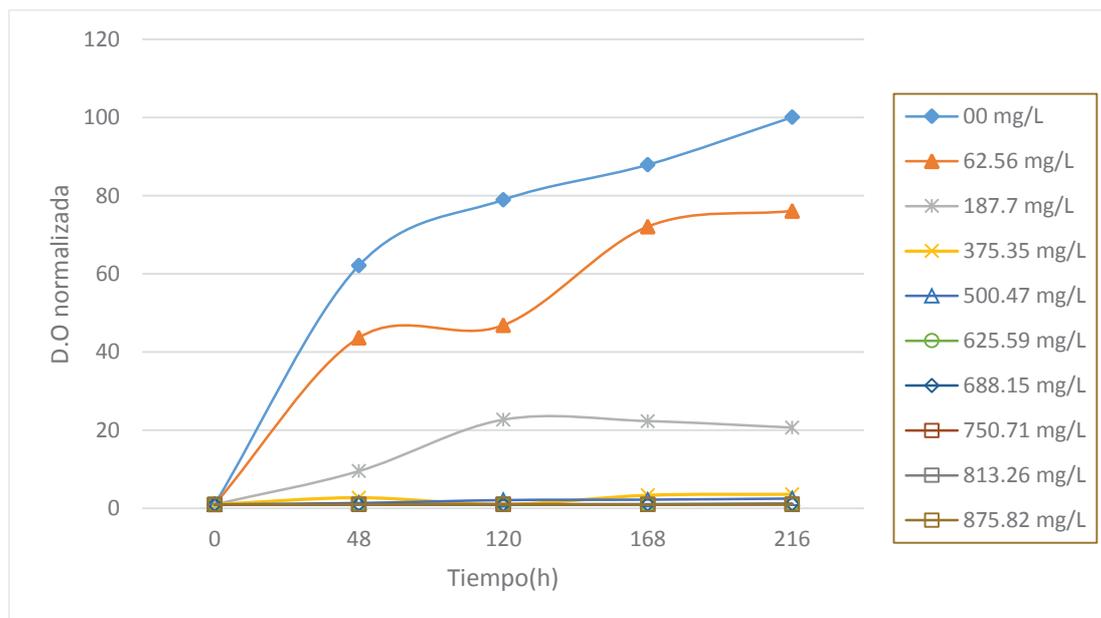


Figura 24: Crecimiento de la cepa BMA-05 en caldo nutritivo adicionado con Pb a diferentes concentraciones

**Tabla 18**

Determinación del crecimiento de la cepa BMA-05 en agar nutritivo a partir de caldo nutritivo-Pb con 216 horas de crecimiento a 30°C

Concentración de Pb	Recuento de UFC/ml
0	++
62,56	++
187,70	++
375,35	++
500,47	++
625,59	++
688,15	++
750,71	+
813,26	+
875,82	+

Nota:

++: Crecimiento > 300 000 UFC/mL

+: Crecimiento < 300 000 UFC/mL

Fuente: (Elaboración en base a resultados consignados en el anexo 3.J).

La tabla 17 y la figura 24 muestran que a concentraciones de 62,56 y 187,70 mg/L de Pb se evidenció una disminución en la concentración celular lo que se manifestó en una disminución de la densidad óptica con respecto al tratamiento testigo (00 mg/L de Pb), que se debería al efecto inhibitorio del plomo. A 375,35 y 500.47 mg/L del metal el crecimiento fue mínimo. A las concentraciones  $\geq 625,59$  mg/L el crecimiento fue imperceptible al espectrofotómetro. El cultivo en placa (Tabla 18) mostró un crecimiento evidente hasta la máxima concentración de Pb sometida (875,82 mg/L) con un recuento de 4000 UFC/mL (Anexo 3.J) con lo que se asumiría que esta cepa bacteriana es resistente hasta una concentración  $>875,82$  mg/L de Pb.

A continuación se muestra un cuadro que compila el análisis de los resultados de resistencia a Pb en caldo nutritivo y cultivo en placas de las 5 cepas pre-seleccionadas.

**Tabla 19**

*Cuadro resumen de resistencia a plomo de las cepas pre-seleccionadas aisladas de sedimentos de lixiviados del botadero de Haquira*

Cepa	Concentración de Pb (mg/L)									
	0	62,56	187,70	375,35	500,47	625,59	688,15	750,71	813,26	875,82
BMA-01	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
BMA-02	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
BMA-03	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
BMA-04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
BMA-05	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*Nota:*

+: Se evidenció crecimiento

-: No se evidenció crecimiento

Fuente: Elaboración en base al análisis de los resultados consignados en las tablas 10 al 19 y los gráficos 20 al 24.

La tabla 19 muestra que todas las cepas en este estudio presentan un crecimiento evidente a la concentración de 187,7 mg/L de plomo, se asume entonces que todas poseerían un mecanismo de resistencia al a la inhibición del metal. Cabe mencionar que 4 de las 5 cepas mostraron crecimiento a una concentración  $\geq 500.47$  mg/L de Pb por lo que se puede demostrar que el método de aislamiento por enriquecimiento y presión selectiva fue efectivo para obtener cepas bacterianas resistentes a Pb. Sin embargo, las cepas que ofrecieron mayor resistencia a plomo fueron BMA-01 (Crecimiento hasta 813.26 mg/L Pb), BMA-04 y BMA-05 con crecimiento hasta 875,82 mg/L Pb. La cepa BMA-04 en comparación con la cepa BMA-05, además de poseer mayor resistencia al metal, fue la que presentó mayor crecimiento en cultivo en placa (Anexos 3.H y 3.J) razón por la cual fue seleccionada para las pruebas posteriores e identificación correspondiente. Numerosas investigaciones se basan en la selección de cepas bacterianas por su alta resistencia a metales pesados, la búsqueda de este tipo de cepas es de suma importancia porque dicha cualidad las califica como potenciales removedores eficientes de metales pesados, ya sea en su forma activa e inactiva; dicha cualidad habría sido adquirida por provenir de ambientes contaminados. Según sea la especie bacteriana o el grupo al que pertenece surgirá una variación en los mecanismos de biosorción, así como en la especificidad de elemento metálico a remover.

Por otro lado, se sustenta que la prueba de resistencia en medio líquido realizada a las 5 cepas haya sido más certera que alguna en medio sólido. Así, Garza (2005) quien determinó la resistencia a plomo en medio líquido mediante la prueba de CMI para *Pseudomona flourescens* aislada de un medio altamente contaminado con hidrocarburos y obtuvo un valor  $>1000$  mg/L; señala que al realizar dicha prueba en un medio líquido aumenta la disposición del metal a las células bacterianas, obteniendo valores mucho más aproximados que con cultivo en un medio sólido, ya que la formación de quelatos y la difusión heterogénea del metal en un agar interferiría en el efecto inhibitorio que ejerce, también, Galicia (2010), evaluó el crecimiento en medio líquido con diferentes concentraciones de Pb de 3 cepas bacterianas, obteniendo que la más resistente al plomo fue la enterobacteria *Hafnia alvei* la cual creció hasta una

concentración de 1353 mg/L de Pb y fue aislada de un medio con 1.2 ppm de Pb.

Por otro lado, Dueñas y Quispe (2011) reportan que la mayoría de las cepas de *Pseudomona spp.* aisladas de un medio con un promedio de concentración de Pb <0,025 mg/L, poseían una CMI de 3200 mg/L para plomo. Gutiérrez (2015), determinó que la cepa *Serratia marcescens* M8A-2T aislada de un ambiente minero es resistente hasta una concentración 16 000 ppm de plomo. Tanto este último, como el anterior reporte, realizaron pruebas de resistencia al metal en un medio sólido, es notoria la elevada concentración de metal que se utilizó para lograr un efecto inhibitorio, es por ello que el resultado obtenido en la presente investigación que muestra a la cepa BMA-04 como la más resistente a plomo, tendría más significancia y cierta proximidad al compararse con las de Galicia (2010) y Garza (2005), ya que evaluaron la resistencia bacteriana en un medio líquido; además que reafirmando las ventajas mencionadas de usar medio líquido, los resultados de la presente, representarían valores más reales.

### 3.4. Identificación molecular de la cepa BMA-04.

La secuencia obtenida en el análisis bioinformático de ADN del gen 16S RNAr del fragmento de RNA de la subunidad 30S de los ribosomas de la cepa bacteriana BMA-04 fue:

```
>BCusco_27F TRIM QUALITY: 20
GCAGTCGAGCGGTAACAGGAGAAAGCTTGCTTTCTTGCTGACGAGCGGCG
GACGGGTGAGTAATGTATGGGGATCTGCCGATAGAGGGGGATAACTACT
GGAAACGGTGGCTAATACCGCATAATGTCTACGGACCAAAGCAGGGGCTC
TTCGGACCTTGCACTATCGGATGAACCCATATGGGATTAGCTAGTAGGTG
GGGTAAAGGCTCACCTAGGCGACGATCTCTAGCTGGTCTGAGAGGATGAT
CAGCCCACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAG
TGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGT
ATGAAGAAGGCCTTAGGGTTGTAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGTGA
TAAGGTTAATACCCTTATCAATTGACGTTACCCGAGAAAGAAGCACCGGC
TAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCG
GAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCAATTAAGTCAGATGTGA
AAGCCCCGAGCTTAACCTGGGAATTGCATCTGAACTGGTTGGCTAGAGT
CTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGAT
GTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACAAAGACTGACGCT
CAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCA
CGCTGTAAACGATGTCGATTTAGAGTTGTGGTCTTGAACCGTGGCTTCT
GGAGCTAACGCGTTAAATCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTAA
AACTCAAATGAATTGAC
```

La secuencia del gen 16s fue comparada con la base de datos del NCBI usando la herramienta BLAST para buscar secuencias homologas, es así que existe un 100% de similitud con *Proteus sp.* La figura a continuación muestra el análisis filogenético, mediante la construcción de un árbol filogenético.

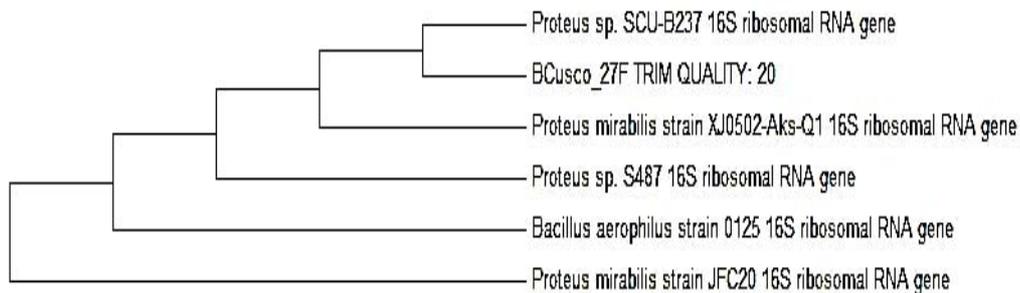


Figura 25: Arbol filogenético para la secuencia >BCusco\_27F TRIM QUALITY: 20

Fuente: Informe de resultados de la identificación molecular de la cepa BMA-04 llevada a cabo por el Instituto de biotecnología del ADN Uchumayo E.I.R.L, consignados en el anexo 4.

El análisis filogenético usando secuencias de las especies más homologas dio como resultado una similitud con *Proteus sp.* Pero el hecho que aparezca en un clade aparte nos sugiere que se pueda tratar de una nueva especie de *Proteus sp.* ó quizás alguna mutación. La especie en mención pertenece al grupo de las enterobacterias. A este mismo grupo pertenece la biomasa de la cepa utilizada en las investigaciones de Muñoz, A. y Col. (2012) quien trabajó con a *Klebsiella sp.* Y Gutiérrez, S. que en el 2015 trabajó con *Serratia marcescens* ambas cepas bacterianas pertenecientes al grupo de las enterobacterias y poseían valores elevados de resistencia a metales pesados que fue adquirida por provenir de ambientes contaminados con estos elementos, además proponen a este tipo de bacterias como una buena alternativa para la elaboración de biosorbentes eficaces para la remoción de metales pesados. Según los reportes revisados en el presente trabajo no existiría aun pruebas de resistencia y biosorción de plomo reportados con *Proteus sp.*

### 3.5. Obtención de biomasa de la cepa BMA-04 *Proteus sp.*

#### 3.5.1. Cinética de crecimiento

El crecimiento expresado como logaritmo de células/mL en función al tiempo se muestran en la tabla 20 y la figura 26.

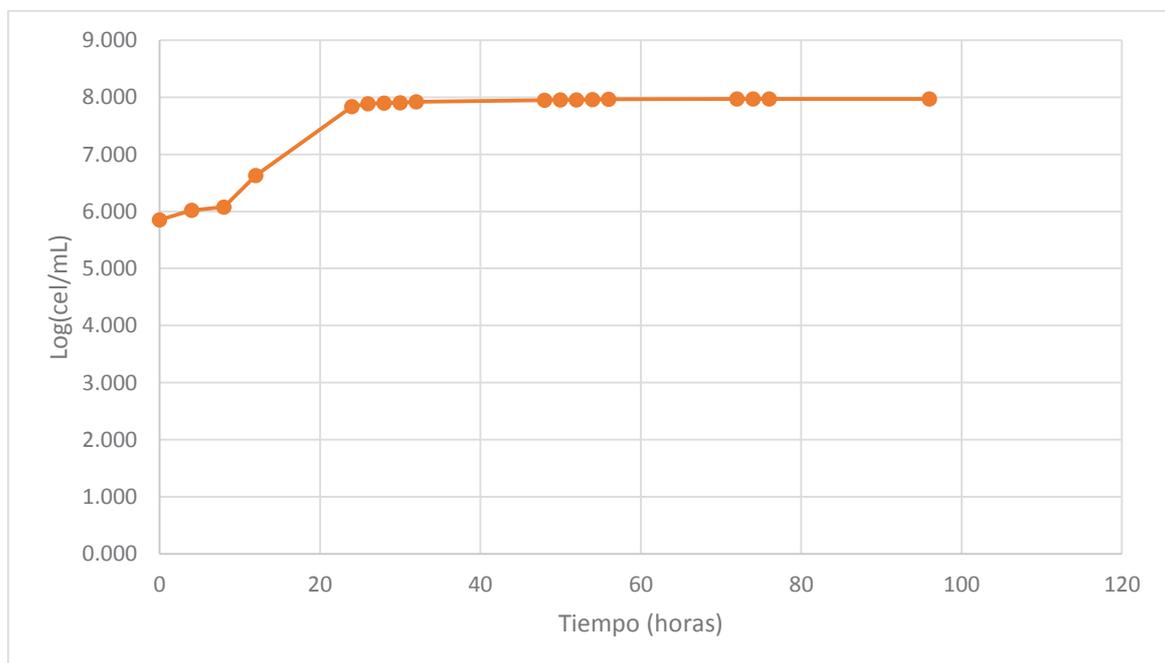
**Tabla 20**

*Crecimiento de la cepa BMA-04 Proteus sp. En caldo nutritivo a 30°C*

Tiempo(h)	0	4	8	12	24	26	28	30	32	48	50	52	54	56	72	74	76	96
Log (Cel/mL)	5,85	6,02	6,08	6,63	7,84	7,89	7,90	7,91	7,92	7,95	7,95	7,95	7,954	7,967	7,971	7,971	7,971	7,973

Fuente: (Elaboración en base a resultados consignados en el anexo 3.K).

En base a la tabla precedente se ha realizado el grafico siguiente.



*Figura 26: Curva de crecimiento de la cepa BMA-04 Proteus sp. en caldo nutritivo*

Fuente: (Elaboración en base a resultados consignados en la tabla 21).

Los resultados muestran a un periodo de latencia durante las primeras 8 horas de crecimiento, que fue evidente porque no existió un incremento significativo en el crecimiento ya que la cepa bacteriana estaría atravesando por un periodo de

adaptación. A partir de las 12 horas se observó un incremento significativo en el número de células, que se interpretó como el inicio de una fase logarítmica y que duró aproximadamente hasta las 24 horas. A partir de ese punto se produjo una desaceleración del crecimiento bacteriano. Se pudo asumir que alrededor de las 26 horas, la cepa BMA-04 *proteus sp.* habría alcanzado la fase estacionaria, pero fue que a partir de las 30 horas que se establecería completamente en este periodo de crecimiento, la misma que se evidenció hasta el final del monitoreo realizado. Este periodo de 30 horas fue adoptado en cultivos posteriores para la producción de biomasa.

La fase estacionaria se caracteriza porque el incremento del número de células no es significativo, esta, además implica un cese en el crecimiento producido por la muerte de las células sensibles y la permanencia de células bien adaptadas y resistentes en el cultivo, lo cual es favorable para la calidad de la biomasa bacteriana a obtener.

Perez; Niño; Hernandez y Hernandez (2007) reportaron una curva de crecimiento para *Proteus mirabilis* donde se denota que alrededor de las 32 horas la cepa habría alcanzado la fase estacionaria unas 6 horas después que la cepa BMA-04 *Proteus sp.* reportada en la presente investigación.

### **3.5.2. Producción de biomasa inactiva de la cepa BMA-04 *Proteus sp.***

Del cultivo de la cepa bacteriana en 1000 mL de caldo nutritivo a 30 horas de incubación, se obtuvo 0,565 gramos de biomasa seca a 60°C por 4 horas y 105°C por 6 horas.

## **3.6. Evaluación del proceso de biosorción por la cepa BMA-04 *Proteus sp.***

### **3.6.1. Optimización de parámetros para el proceso de biosorción**

#### ***a). pH***

Los resultados de las pruebas de biosorción (porcentaje de biosorción en función al pH) se muestran en la tabla 21 y la figura 27.

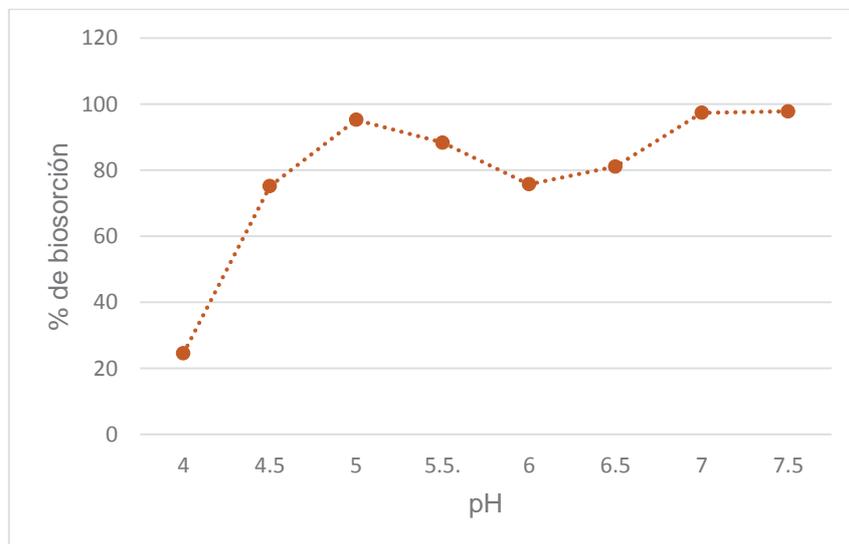
**Tabla 21**

*Biosorción de plomo por biomasa inactiva de la cepa BMA-04 Proteus sp. en función al pH*

pH	Plomo residual promedio (mg/L)	Porcentaje de biosorción (%)
4,0	20,19	24,54
4,5	13,29	75,16
5,0	1,27	95,27
5,5	3,12	88,34
6,0	6,49	75,76
6,5	5,06	81,10
7,0	0,70	97,40
7,5	0,58	97,83

Fuente: Elaboración en base a resultados consignados en el anexo 5.A.

En base a los resultados de la tabla precedente se elaboró el gráfico siguiente.



*Figura 27: Porcentaje de biosorción de la biomasa inactiva de la cepa BMA-04 Proteus sp. en función del pH*

Fuente: (Elaboración en base a resultados consignados en la tabla 21).

Los resultados muestran que a pH 4 existe 24,54% de adsorción, valor que representa una mínima adsorción con respecto a los demás pHs. Este comportamiento se produciría por la existencia en mayor cantidad de iones  $H^+$  en el medio, los cuales estarían compitiendo con los iones de  $Pb^{2+}$  por los sitios de intercambio en el sistema, que son los grupos hidroxilo y carboxilato en el caso de la pared de las bacterias Gram Negativas, creando fuerzas de repulsión ya que la superficie del biosorbente se encontraría cargada positivamente.

A pH 4,5 la remoción fue 75,16%, esto indica que a medida que se incrementa el pH también lo hace el porcentaje de biosorción, pero es a pH 5 y 5,5 que se llevó a cabo un máximo de biosorción (95,27 y 88,34% de biosorción respectivamente), y se debería a que los cationes desarrollaron un medio ácido propicio para una protonación ideal de la superficie del biosorbente, que además permitió la unión con los iones de  $Pb^{2+}$ , por lo tanto ambos pHs corresponderían a los óptimos para la biosorción, pues las pruebas estadísticas (Anexo 5.C) indican que no existe diferencia significativa entre los porcentajes de ambos pHs, pero para términos prácticos se consideró 5 como pH óptimo. A pH 6 y 6,5 la biosorción descendió (75,86 y 81,10% respectivamente) que habría sido causado por una escasa protonación de los sitios activos y el inicio de la precipitación del metal.

A pH 7 y 7.5 el porcentaje de biosorción vuelve a incrementarse (97,40% y 97,83% respectivamente); pero esto no se debería únicamente a un proceso de biosorción sino que adicionalmente ocurriría una precipitación del metal, es decir que  $Pb(OH)_2OH$  sería la especie dominante en el medio que produciría dicho fenómeno.

Gutiérrez (2015) quien trabajó a un pH 3 logró un 92,46% de biosorción de plomo con biomasa seca de *Serratia marcescens*, Tur (2012) obtuvo una biosorción de plomo del 83,1% con biomasa de *Kluyveromyces marxianus* a pH 4,2, con *Pseudomonas aeruginosa* 97,4% a un pH 5,2 y con biomasa de *Bacillus Subtilis* 97,4 % a un pH de 6,2.

Rodríguez (2008) utilizando la biomasa seca de *Saccharomyces cerevisiae* logra una alta capacidad de biosorción a pH 5 para la remoción de  $Pb^{2+}$  y  $Cr^{3+}$ . Todos ellos afirman que el proceso de biosorción es muy sensible al parámetro pH, además se puede deducir que cada biosorbente posee un valor de pH

óptimo que varía según su naturaleza, carga neta de la superficie del biosorbente y el comportamiento del elemento metálico en disolución. En este trabajo se logró corroborar dicha afirmación y se estableció pH 5 como óptimo para las pruebas posteriores de biosorción.

**b). Tiempo de contacto**

Los resultados de las pruebas de biosorción (porcentaje de biosorción en función al tiempo) se muestran en la tabla 22 y la figura 28.

**Tabla 22**

*Biosorción de plomo por biomasa inactiva de la cepa BMA-04 Proteus sp. en función del tiempo*

<b>Tiempo de contacto (minutos)</b>	<b>Plomo residual Promedio (mg/L)</b>	<b>Porcentaje de biosorción (%)</b>
0	29,10	0,00
10	7,75	73,37
15	5,57	80,86
20	5,01	82,78
30	4,41	84,87
40	4,43	84,80
60	4,69	83,91
120	4,08	86,00
180	3,00	89,71
240	2,56	91,94
360	2,21	92,41

Fuente: Elaboración en base a resultados consignados en el anexo 5.D.

En base a los resultados de la tabla precedente se elaboró el gráfico siguiente.

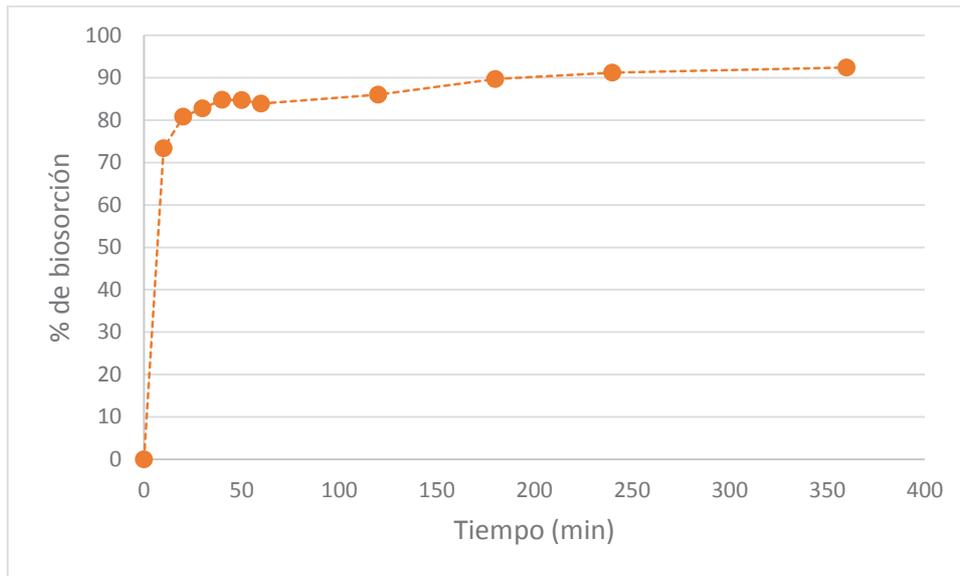


Figura 28: Biosorción de plomo por biomasa inactiva de la cepa BMA-04 *Proteus sp.* en función del tiempo

Fuente: (Elaboración en base a resultados consignados en la tabla 22).

Los resultados muestran que a los primeros 10 minutos de contacto del plomo con la biomasa bacteriana se llevó a cabo un 73,37% de biosorción, describiendo a la biosorción como un proceso rápido, que estaría causado por la gran disponibilidad de los sitios activos para la unión del metal. A partir de ese punto y hasta los 180 minutos (89,71% de adsorción) no existió gran incremento en la remoción, haciendo lenta a la biosorción debido a que se hacen más escasos los sitios activos, estableciendo cierta dificultad para la unión del metal.

A partir de los 180 hasta los 360 minutos se llevó a cabo un proceso constante, que se explicaría porque los sitios activos habrían alcanzado su máxima saturación, esto es evidente por que las pruebas estadísticas nos indican que no existe diferencia significativa entre los valores de los porcentajes de biosorción (Anexo 5.F.), es por esto, que para términos prácticos se podría considerar como tiempo óptimo 180 minutos.

De la misma manera, a continuación se muestran investigaciones en las cuales se determinó el tiempo en que diferentes tipos de biosorbentes alcanzan el máximo porcentaje de biosorción, así como Gutiérrez, S. (2015) demuestra que

en la biosorción de plomo con biomasa seca de *Serratia marcescens* se logra obtener 77,58% de biosorción a los 15 minutos de enfrentamiento con plomo.

Dimas (2011) utilizando biomasa de levadura de cerveza, levadura de pan y *Caulerpa sp* afirma que obtiene el 90% de remoción de plomo durante los primeros 30 minutos y que el equilibrio entre los sitios de enlace de la biomasa y los iones  $Pb^{2+}$  se efectuó después de las 2 horas de contacto.

El porcentaje de biosorción 80,86% correspondiente a 15 minutos de enfrentamiento biomasa bacteriana y metal del presente estudio superan al obtenido por Gutiérrez (2015), pero es un tanto disminuida (84,87 % a 30 minutos de enfrentamiento) en comparación con el obtenido por Dimas (2011). Estos resultados pueden mejorarse si se trabajaría a condiciones de rotación mayores a 130 rpm. pero cabe recalcar que el tiempo óptimo establecido de 180 minutos aun es ideal para cualquier proceso de remoción de iones metálicos pese a las condiciones a la que se sometió las pruebas.

### c). *Concentración de biomasa*

Los resultados de las pruebas de biosorción (Porcentaje de biosorción en función al tiempo) se muestran en la tabla 23 y la figura 29.

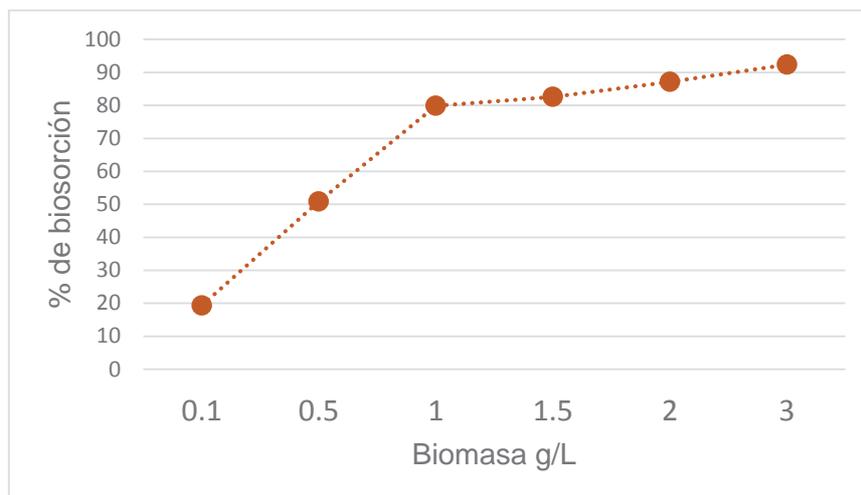
**Tabla 23**

*Biosorción de plomo por biomasa inactiva de la cepa BMA-04 Proteus sp. en función a la concentración de la biomasa*

<b>Concentración de biomasa (g/L)</b>	<b>Porcentaje de adsorción (%)</b>
0.1	19,35
0.5	50,89
1	79,92
1.5	82,63
2	87,15
3	92,39

Fuente: Elaboración en base a resultados consignados en el anexo 5.G.

En base a los resultados de la tabla precedente se elaboró el gráfico siguiente.



*Figura 29:* Biosorción de plomo por biomasa inactiva de la cepa BMA-04 *Proteus sp.* porcentaje de biosorción en función a la concentración de la biomasa  
Fuente: (Elaboración en base a resultados consignados en la tabla 23).

Los resultados muestran que existe menor biosorción con 0,1 g/L de biomasa (19,35% de adsorción) que estaría causada por la escases de sitios activos para la unión al metal, con 0,5 y 1,0 g/L de biomasa ocurrió un 50,89% y 79,92% de biosorción respectivamente, esto demostraría que a medida que aumenta la concentración de biomasa también lo hace la biosorción, este incremento estaría relacionado al aumento del área y sitios activos de biosorción disponibles para la unión del plomo a la biomasa bacteriana.

A las concentraciones de 1,5; 2,0 y 3,0 g/L se obtuvieron 82,63%, 87,15 % y 92,39% de biosorción respectivamente, valores que tienden a ser constantes. La prueba de Tukey realizada entre estos valores (Anexo 5.I) demuestra que no poseen diferencia significativa, es decir se estaría llegando a un punto que el incremento de biomasa en el medio no necesariamente significaría el incremento de la remoción del metal, esto se explicaría porque las partículas de la biomasa tenderían a aglomerarse produciendo una interferencia entre los sitios de unión.

Este análisis llevaría a deducir que la concentración de biomasa óptima sería 1,5 g/L pero con el fin de determinar la mínima cantidad de biosorbente necesario para alcanzar la máxima eliminación de plomo y por términos prácticos se consideró a 1 g/L como óptima, ya que la diferencia significativa de la biosorción a este valor y la concentraciones de 1,5; 2,0 y 3,0 g/L es casi

nula, por lo tanto en este punto no existiría una aglomeración ni una escases de los sitios de unión para el metal.

De esta manera, se podría concordar con el resultado que obtiene Gutiérrez (2015) quien reporta que 1g/L de biomasa bacteriana es la concentración óptima necesaria para la biosorción de Pb y Cd con *Serratia marcescens* M8A-2T; y además señala que este valor es debido a la naturaleza química de la superficie del biosorbente; pues por otro lado Muñoz (2007) utilizó 4 g/L como concentración optima de biosorbente a base de cascara de naranja, de la misma manera que Oré, Lavado y Bendezú (2015) utilizando marlo de maíz. Por lo tanto se podría mencionar que se necesitaría una pequeña cantidad de biosorbente de la cepa BMA-04 *Proteus sp.* para obtener resultados satisfactorios en la remoción de plomo, y esto se debería por la complejidad de la superficie de la pared bacteriana que interactuaron con el  $Pb^{2+}$ .

### 3.6.2. Evaluación de la capacidad de biosorción de plomo por biomasa inactiva de BMA-04 *Proteus sp.*

Los parámetros que fueron optimizados (pH 5, tiempo de contacto 180 minutos y biomasa inactiva 1 g/L) fueron aplicados en pruebas para la construcción de la isoterma de biosorción determinando las capacidades de biosorción a diferentes concentraciones de Pb.

Los resultados de la construcción de la isoterma se muestran en la tabla 24 y la figura 30.

**Tabla 24**

*Capacidad de biosorción en relación a la concentración de plomo en equilibrio por biomasa inactiva de la cepa BMA-04 Proteus sp., a pH: 5, 180 minutos, 18°C y 130 rpm*

Capacidad de adsorción (mg/g)	Concentración en equilibrio $C_{eq}$ (mg/L)
11,51	3,89
35,98	8,42
56,5	38,50
60,4	125,80
77,9	205,10

Fuente: Elaboración en base a resultados consignados en el anexo 5.J.

En base a los resultados de la tabla precedente se elaboró el grafico siguiente.

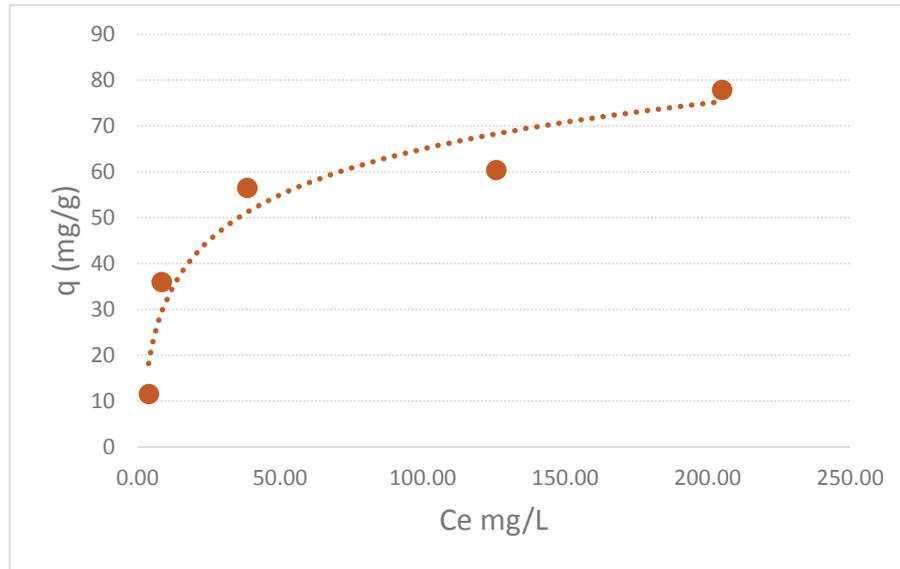


Figura 30. Isotherma de adsorción por biomasa inactiva de la cepa BMA-04 *Proteus sp.* modelo de biosorción en equilibrio a pH: 5, 180 minutos, 18°C y 130 rpm

Fuente: (Elaboración en base a resultados consignados en la tabla 24).

La figura nos muestra que la capacidad de biosorción con respecto a concentraciones bajas de plomo ( $C_{eq} = 3,89; 8,42; 38,5 \text{ mg/L}$ ) forma una curvatura inicial, pero a medida que se incrementa la  $C_{eq}$  (125, 80 y 205,10 mg/L) tiende a formar una meseta, que indicaría una saturación de los sitios activos con la formación de una capa mono molecular lo que correspondería al llenado de los microporos, la gráfica sugiere una isoterma Langmuir (tipo I) es decir la biosorción se estaría llevando a cabo por una quimiosorción del plomo el cual califica a la biomasa bacteriana de BMA-04 *Proteus sp.* como un biosorbente del tipo microporoso con una gran afinidad al metal, ante esto cabe mencionar que una isoterma solo describe a grandes rasgos un proceso de biosorción.

### 3.6.3. Correlación de los valores experimentales con modelos de isotermas

#### a. Linealización de la isoterma de adsorción según modelo de Langmuir

Los datos consignados en la tabla 24 fueron modelados según la ecuación de Langmuir y se muestran en la Figura 31 y la tabla 25.

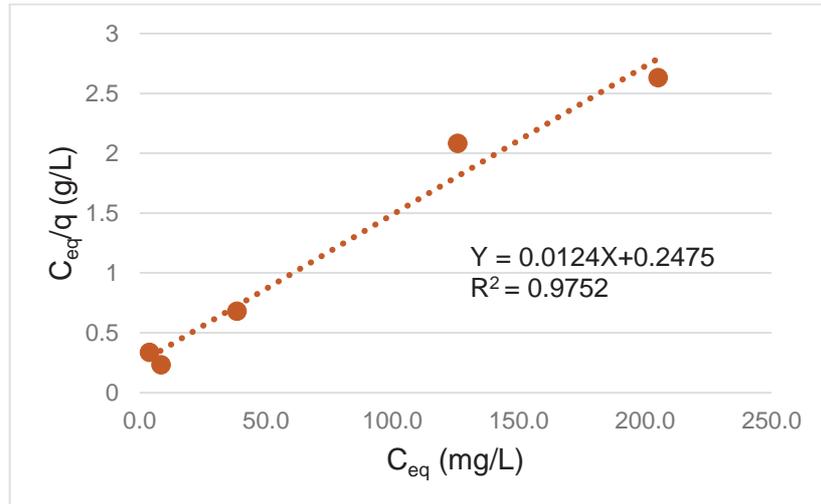


Figura 31: Linealización de la isoterma de biosorción de Langmuir por biomasa inactiva de la cepa BMA-04 *Proteus sp.*

Fuente: Elaboración en base a resultados consignados en el anexo 5.J.

**Tabla 25**

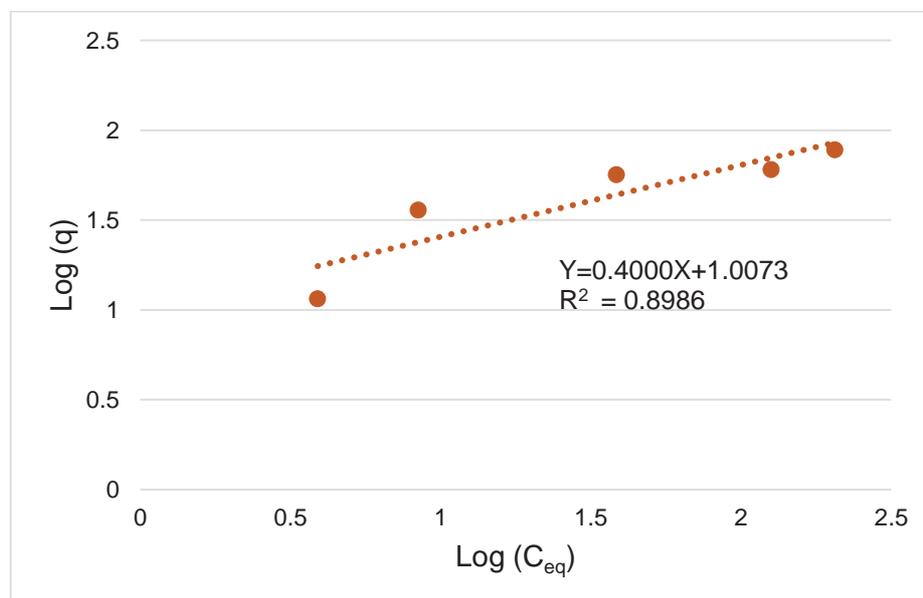
Proceso de linealización de la isoterma de Langmuir para la biosorción de plomo por biomasa inactiva de la cepa BMA-04 *Proteus sp.*

Ecuación de la isoterma	$C_{eq}/q = 0,0124C_{eq} + 0,2475$
$R^2$	0,9752
Pendiente ( $1/Q_{max}$ )	0,0124
Intercepto ( $1/Q_{max}b$ )	0,2475
$Q_{max}$	80,6452
<b>b</b>	0,0501

Fuente: Elaboración en base a resultados propios del anexo 5.J.

**b. Linealización de la isoterma de adsorción según modelo de Freundlich**

Los datos consignados en la tabla 24 fueron modelados según la ecuación de Freundlich y se muestran en la Figura 32 y la tabla 26.



*Figura 32:* Linealización de la isoterma de biosorción de Freundlich por biomasa inactiva de la cepa BMA-04 *Proteus sp.*

Fuente: Elaboración en base a resultados consignados en el anexo 5.J.

**Tabla 26**

*Linealización de la isoterma de biosorción de Freundlich por biomasa inactiva de la cepa BMA-04 Proteus sp.*

Ecuación de la isoterma	$\text{Log } q = 0,4000\text{Log}C_{\text{eq}}+1,0073$
<b>R<sup>2</sup></b>	0,8986
<b>Pendiente (1/n)</b>	0,4000
<b>Intercepto (Log K<sub>f</sub>)</b>	1,0073
<b>K<sub>f</sub></b>	10,1695
<b>n</b>	2,5

Fuente: Elaboración en base a resultados consignados en el anexo 5.J.

De los procesos de linealización se obtiene que el coeficiente de determinación  $R^2$  demuestra que el modelo de Langmuir ( $R^2=97,52\%$ ) describe mejor el proceso de biosorción, en comparación al modelo de Freundlich ( $R^2=89,86\%$ ), lo que indica una uniformidad energética y sitios activos homogéneos en la superficie del biosorbente. Además el modelo de Langmuir indica que existe una capacidad de biosorción máxima ( $Q_{max}$ ) de 80,64 mg de plomo por gramo de biomasa inactiva de la cepa BMA-04 *Proteus sp.*, además el valor de  $b=0,0501$  demuestra que existe una gran afinidad hacia el metal, de esta manera se puede calificar a la biomasa de la cepa bacteriana BMA-04 *Proteus sp.* como un biosorbente con buenas cualidades para la remoción de plomo a partir de medios acuosos. En el anexo 6 se presenta la capacidad máxima de biosorción de otros biosorbentes obtenidos por diferentes autores.

### 3.6.4 Valoración de los posibles sitios de unión del Pb en la biomasa bacteriana.

A continuación los espectros obtenidos por espectroscopia por transformada de Fourier (FTIR) de la biomasa antes y después de la biosorción se muestran en las figuras 33 y 34 respectivamente.

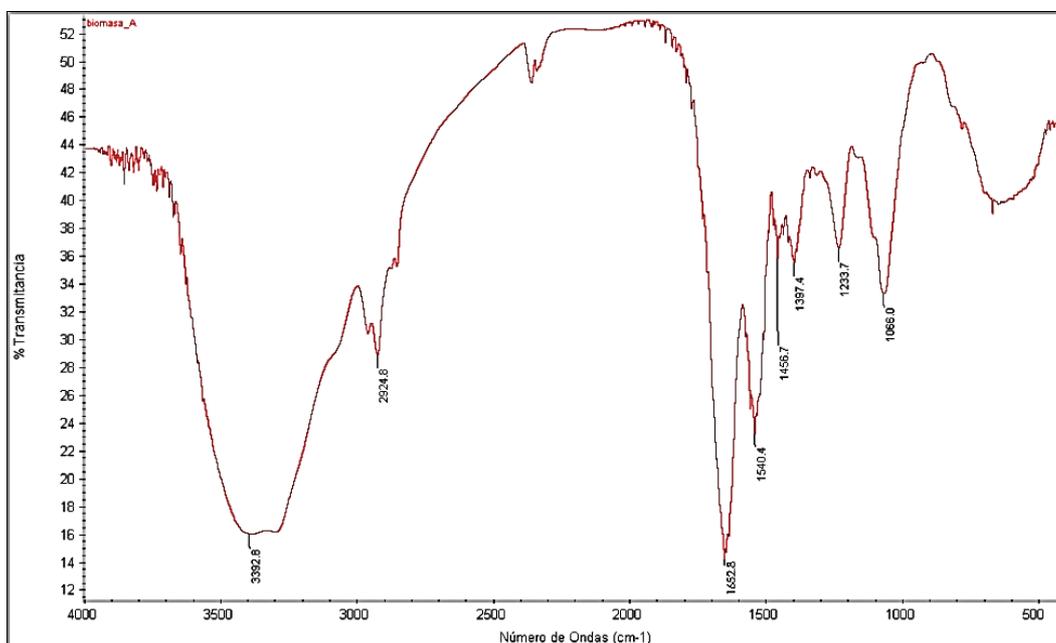


Figura 33: Espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) para la biomasa de BMA-04 *Proteus sp.* antes del proceso de biosorción de plomo

Fuente: Interpretación propia del espectro

Laboratorio de Química Orgánica del departamento de Química-UNSAAC

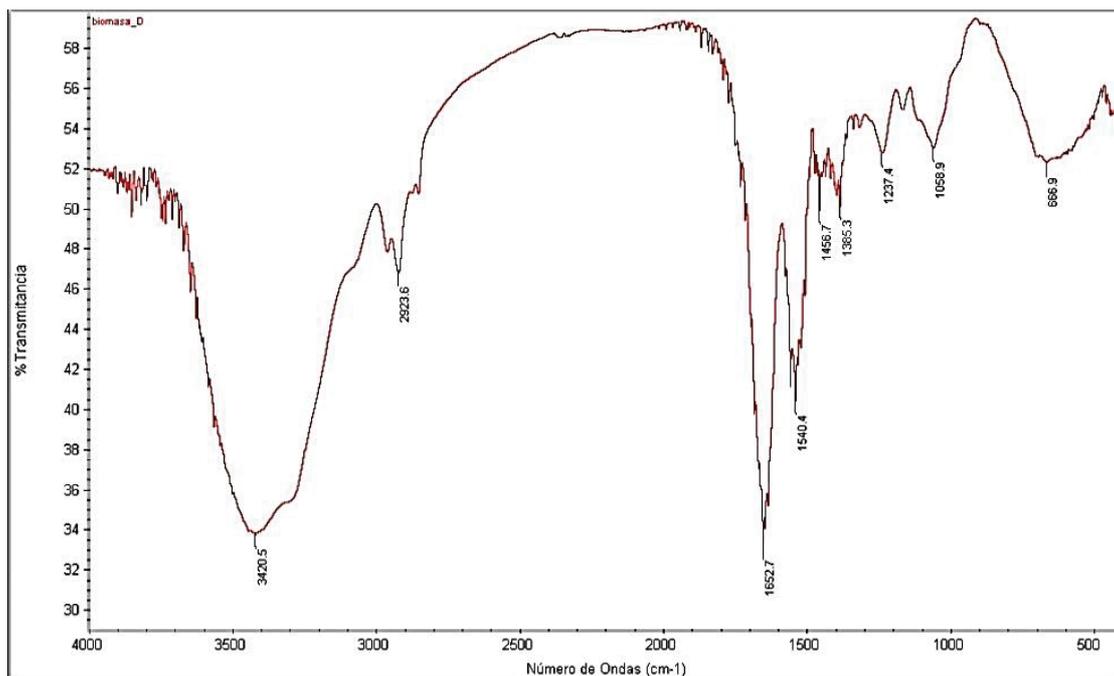


Figura 34: Espectroscopia de infrarrojos transformada de Fourier (FTIR) para la biomasa de la cepa BMA-04 *Proteus sp.* después del proceso de biosorción de plomo.

Fuente: Interpretación propia del espectro

Laboratorio de Química Orgánica del departamento de Química-UNSAAC

La figura 33 muestra los principales grupos funcionales que conforman la biomasa bacteriana de BMA-04 *Proteus sp.* El valor ubicado en  $3392,8\text{ cm}^{-1}$ , es atribuido al estiramiento vibracional de los grupos hidroxilos (-OH) y amins (N-H) el cual se percibe como una banda ancha. La banda a  $2924,8\text{ cm}^{-1}$  fue asignada a los alcanos (-CH<sub>2</sub>-). La banda a  $1652,8\text{ cm}^{-1}$  es característico de los alquenos (C=C). La banda a  $1540,4$  es asignado al grupo de las amins (-NH-). El pico a  $1456,7\text{ cm}^{-1}$  corresponde al ácido carboxílico (CO-OH); a partir de este punto hasta  $500\text{ cm}^{-1}$  correspondería la zona de la huella dactilar y se puede mencionar una importante banda que corresponde al carboxilato (COO<sup>-</sup>) con un pico de  $1397,4\text{ cm}^{-1}$ .

El espectro IR en la figura 34 muestra que la intensidad de los picos (de  $4000$  a  $500\text{ cm}^{-1}$ ) en la estructura bacteriana después del proceso de biosorción disminuye. Además se denota que la banda que representa a los grupos hidróxilo y amina manifiesta un desplazamiento de  $3392,8\text{ cm}^{-1}$  a  $3420,5\text{ cm}^{-1}$ , el pico que representa a los alcanos se desplaza de  $2924,8$  a  $2923,6\text{ cm}^{-1}$ , el pico que

representa a los alquenos sufrió un desplazamiento de 1652,8 a 1652,7  $\text{cm}^{-1}$ , la banda de las aminas y el ácido carboxílico no sufrieron desplazamiento alguno, el pico que corresponde al carboxilato sufrió un desplazamiento de 1397,4 a 1385,3  $\text{cm}^{-1}$ . La disminución de intensidad y los desplazamientos se producirían por la interacción del plomo con estos grupos funcionales.

Se podría deducir que la biosorción del plomo por biomasa inactiva de la cepa BMA-04 *Proteus sp.* es llevada a cabo principalmente por sus grupos hidroxilo, amina y carboxilato, por haber presentado un desplazamiento significativo de sus bandas a través del espectro. Dicho desplazamiento indicaría también la formación de enlaces iónicos entre estos grupos y el catión  $\text{Pb}^{2+}$  que conllevaría a clasificar a la biosorción como un tipo de quimiosorción en corroboración a la isoterma de Langmuir obtenida.

## Conclusiones

1. La concentración de plomo en los sedimentos de lixiviados del botadero de Haqira fue <0,5 ppm.
2. Se aisló las cepas BMA-01, BMA-02, BMA-03, BMA-04, BMA-05, de los sedimentos de lixiviados del botadero Haqira, las cuales presentaron resistencia a: 813,26; 500,47; 187,70; 875,82 y 875,82 mg/L de plomo respectivamente. Se seleccionó la cepa BMA-04, siendo identificada molecularmente como *Proteus sp.*
3. Se obtuvo 0,565 g/L de biomasa seca de la cepa BMA-04 *Proteus sp.* mediante un cultivo a 30°C por 30 horas.
4. Fue posible la remoción de plomo en agua simulada mediante el proceso de biosorción usando biomasa inactiva de la cepa BMA-04 *Proteus sp.*, bajo los parámetros óptimos: pH 5, tiempo de contacto 180 minutos y 1 g/L de biomasa inactiva, con los que se obtuvieron 95,27% 89,71% 79,92% de biosorción respectivamente.
5. La capacidad máxima de adsorción ( $Q_{max}$ ) fue 80,64 miligramos de plomo por gramo de biomasa bacteriana, descrita por una isoterma Langmuir, que hace suponer que el proceso se llevó a cabo por una quimiosorción del plomo por medio de intercambio iónico entre este y los grupos hidroxilos, aminas y carboxilatos de la pared bacteriana. Demostrando de esta manera que la remoción de plomo es posible mediante el proceso de biosorción

## Recomendaciones

- Realizar un estudio de la textura del suelo de Haqira para tener mayores alcances sobre la interacción suelo-metales pesados.
- Evaluar el proceso de biosorción con biomasa inmovilizada para incrementar la superficie de adsorción.
- Evaluar la bioacumulación de plomo con cepas resistentes a este metal.
- Para realizar una identificación de cepas bacterianas ambientales se sugiere la aplicación de sistemas de identificación, métodos automatizados o moleculares para una identificación certera.
- Optimizar la producción de biomasa para la cepa en estudio, identificada como BMA-04 *Proteus sp.*

### Literatura consultada

- APHA (American Public Health Association), AWWA (American Water Works Association) and WPCF (Water Environmental Federation). (2005). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*: Washington DC, Ed. Washington, DC.
- Arce O. (2000). *Metales pesados presentes en el agua*. Manual de prácticas. Universidad Mayor de San Simón. Bolivia.  
Recuperado de <http://www.fcyt.umss.edu.bo/docentes/29/practicas/practica4.pdf>
- ASTM (American Society for Testing and Materials) (2005). ASTM D422-63 Standard Test Method for Particle-Size Analysis of Soils. *Annual book of ASTM standards*, 04 (08).  
Recuperado de <https://fenix.tecnico.ulisboa.pt/downloadFile/3779573890036/D422-particle%20size.pdf>
- Atkins, P. (1991). *Fisicoquímica*. 3ra Edición. USA: Editorial Addison Wesley Iberoamericana.
- Atlas, R. y Bartha, R. (2002). *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*. Madrid, Pearson Educación S.A.
- ATSDR. (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (2005). Public Health Statement for Lead. CAS # 12709-98-7. Toxicological profile for lead.  
Recuperado de: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp13.pdf>
- Barragan, M. (2003). *Síntesis, caracterización y actividad catalítica del catalizador ZnO-SiO<sub>2</sub>, para deshidrogenar metanol a formaldehído* (Tesis de pregrado para optar el título de Químico). Universidad Nacional San Antonio Abad Del Cusco, Cusco.
- Becares, E., Conty, A., Rodríguez V., Blanco, S. (2004). Funcionamiento de los lagos someros mediterráneos. *Ecosistemas, revista científica y técnica de ecología y medio ambiente*, 13 (2), 2-16.
- Brierley, J. & Brierley, C. (1987). Treatment of Microorganisms with Alkaline solution to Enhance Metal Uptake Properties. *U.S. Patent* 4, 690, 874.  
Recuperado de <http://www.google.ch/patents/US4690894>
- Caballero, A. (2008). *Temas de Higiene de los alimentos*. La Habana: Editorial Ciencias Médicas.  
Recuperado de [http://es.slideshare.net/Quimio\\_Farma/temas-de-higiene-de-los-alimentos](http://es.slideshare.net/Quimio_Farma/temas-de-higiene-de-los-alimentos).

- Camargo, A., & Noguera, G. (2007). *Contaminación de los recursos agua y suelo por lixiviados producto del relleno sanitario de Jaquira*. (Seminario de Investigación). Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco, Cusco - Perú.
  
- Cañizares, R. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 42, 131-141.  
Recuperada de <http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2000/mi003f.pdf>
  
- Castellan, G. 3ra Edición. (1987). *Fisicoquímica*. USA: Editorial Addison Wesley Iberoamericana.  
Recuperada de <http://www.lectura-online.net/libro/fisicoquimica-castellan-3-edicion-doc.html>
  
- Castillo, F. (2005). *Bioteología Ambiental*, Madrid: Ed. Tebar.
  
- Cheung, C. W., Porter, J. F., McKay, G. (2001). Sorption kinetic analysis for the removal of cadmium ions from effluents using bone char. *Water Research*, 35(3), 605-612.  
Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11228955>
  
- Cortuelo, L., y Marqués, M. (1999). Los metales pesados en las aguas (I), su origen. Acción de agentes biológicos. *Ingeniería Química*, 31 (356), 263-266.  
Recuperado de <http://www.tdr.cesca.es/bitstream/handle/10803/6978/02INTRODUCCION.pdf?sequence=2>
  
- Cruz D. (2008) Remoción de metales por microorganismos productores de polisacáridos (Tesis para obtener el grado de maestría en tecnología avanzada). Instituto Politécnico Nacional, Santiago de Queretaro.
  
- D.S N° 002- 2008 – MINAM. Estándares nacionales de calidad ambiental para agua. Lima, Perú. (2008).
  
- D.S N° 002-2013-MINAM. Estándares de Calidad Ambiental (ECA) para suelo Lima, Perú. (2013).
  
- Delgado, L. y Huamán L. (2010). *Evaluación de la capacidad remediadora de *Elodea potamogeton** (Bertero) Espinoza. En aguas contaminadas con Pb (Tesis para optar título profesional de biólogo). Universidad Nacional De San Antonio Abad Del Cusco, Cusco - Perú.

- DIGESA. (Dirección General de Salud) (2016). Trípticos de salud ocupacional: Exposición a plomo en el ambiente de trabajo.
- Dimas, G. (2011). *Estudio de la interacción de metales pesados (Pb, Cd, Zn y Cr) En solución, en el proceso de biosorción por tres tipos de Biomasa* (Como requisito parcial para obtener el Grado de maestro en Ciencias, Universidad Autónoma de Nuevo León). Recuperado de <http://eprints.uanl.mx/5682/1/1080221572.PDF>
- Doadrio, L. (2006). *Anuales de la Real Academia Nacional de Farmacia*, 72, 409-422.  
Recuperado de <https://www.analesranf.com/index.php/aranf>
- Doyle, R. (1989) How cell walls of Gram-positive bacteria interact with metal ions. En Beveridge T, Doyle R (Eds) *Metal Ions and Bacteria*. John Wiley & Sons. USA. pp. 412-437. Recuperado de [https://books.google.com.pe/books/about/Metal\\_Ions\\_and\\_Bacteria.html?id=AEtRAAAAMAAJ&redir\\_esc=y](https://books.google.com.pe/books/about/Metal_Ions_and_Bacteria.html?id=AEtRAAAAMAAJ&redir_esc=y)
- Doyle, R.; Matthews. T.; Streips, U. (1980). Chemical basis for selectivity of metal ions by the *Bacillus subtilis* cell wall. *J. Bacteriol.* 143: 471-480.  
Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC294273/pdf/jbacter00568-0487.pdf>
- Dueñas, C. y Quispe, F. (2011). *Resistencia a metales pesados y antibióticos de Pseudomonas spp. Aisladas de los ríos salados y Cañipia, Espinar-Cusco* (Tesis para optar el grado de Biólogo) Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, Cusco – Perú.
- Facchinelli, A., Sacchi, E., Mallen, L. (2001). Multivariate statistical and GIS based approach to identify heavy metal source in soils. *Environmental Pollution*, 114, 313-324. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11584630>
- Fergusson, E. (1990). The heavy elements: Chemistry, environmental impact and health effects. Recuperado de <http://www.iberlibro.com/buscar-libro/titulo/the-heavy-elements-chemistry-environmental-impact-and-health-effects/>
- Ferrari, S.; Guzmán, G.; Silva, P.; Alcaráz, L.; Silva, H. y González, D. (2004). Captación de Cadmio por biomasa libre o inmovilizada de *Nostoc minutum* (Cianobacteria filamentosa); *Acta toxicologica Argentina*, 12 (1); 19-22.  
Recuperado de <http://www.toxicologia.org.ar/wp-content/uploads/2016/05/Volumen-12-Nro.-1-Julio-2004.pdf>.

- Förstner, U. & Wittmann, W. (1983). *Metal pollution in the aquatic environment*. Recuperado de [https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=9PLuCAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=Förstner,+U.+%26,+Wittmann,+W.+\(1983\).+Metal+pollution+in+the+aquatic+environment.&ots=4QXb3Id22J&sig=211pVbCbXQHJnc-7p3GQbH3U0Wg#v=onep](https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=9PLuCAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA1&dq=Förstner,+U.+%26,+Wittmann,+W.+(1983).+Metal+pollution+in+the+aquatic+environment.&ots=4QXb3Id22J&sig=211pVbCbXQHJnc-7p3GQbH3U0Wg#v=onep)
- Gadd, M. (1988). Accumulation of metals by microorganisms and algae. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 46(8):834-840  
Recuperado de [https://www.researchgate.net/publication/226046837\\_Heavy\\_metal\\_accumulation\\_by\\_bacteria\\_and\\_other\\_microorganisms](https://www.researchgate.net/publication/226046837_Heavy_metal_accumulation_by_bacteria_and_other_microorganisms)
- Gadd, M. (2009). Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84, 13-28.  
Recuperado de <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jctb.1999/abstract>
- Galicia, J. (2010). Efecto de la exposición de plomo a bacterias aisladas de efluentes contaminados. (Tesis para botar el título profesional de licenciada en Ciencias Químicas). Universidad de Papaloapan, Oaxaca. Recuperado de [http://unpa.edu.mx/tesis\\_Tux/index.html](http://unpa.edu.mx/tesis_Tux/index.html)
- Garza, M. (2005). Aislamiento de microorganismos con alta capacidad de tolerar y remover Pb(II), Cr(VI), Cd(II), Cu(II), Zn(II) y Ni(II) (Tesis para optar al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas, Universidad de La Habana). Recuperado de <http://scielo.sld.cu/scieloOrg/php/reflinks.php?refpid=S1024-9435200900010000300024&lng=es&pid=S1024-94352009000100003>
- Gerbino, O. (2013). Interacción de *Lactobacillus kefir* con plomo, cadmio, níquel y zinc: Análisis estructural y estudio de la capacidad secuestrante a nivel molecular. (Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata). Recuperado de <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/26281>
- Glazer, A. y Nikaido, H. (1998) *Microbial Biotechnology*. Ed. W.H. Freeman and Company. 2da ed. New York, 582 – 590.  
[https://books.google.ie/books/about/Microbial\\_Biotechnology.html?id=o3HnX18eU3AC&hl=es](https://books.google.ie/books/about/Microbial_Biotechnology.html?id=o3HnX18eU3AC&hl=es)
- Gómez, Y., Coto, O, .Abín, C. Hernández. (2002). Método efectivo para el aislamiento de bacterias resistentes a níquel y cobalto. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 33 (1), 27-31.  
<http://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/sites/default/files/articulos/CB-2002-1-027-031.pdf>

- Guevara, D. (2010). Biorremoción de Cromo (Cromo total y Cromo VI) en agua sintética por dos inóculos bacterianos nativos compuestos, a escala de laboratorio (Tesis previa a la obtención del grado académico Ingeniero en Biotecnología, Escuela politécnica del ejército, Sangolqui - Ecuador). Recuperado de <http://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2611/1/T-ESPE-030039.pdf>
- Gutierrez, S. (2015). Estudio de Bioadsorción de Cadmio y Plomo con Biomasa de *Serratia marcescens* M8a-2T, a nivel de Laboratorio (Tesis para optar el grado académico de Doctor en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima - Perú). Recuperado de [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/4126/1/Guti%C3%A9rrez\\_ms.pdf](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/4126/1/Guti%C3%A9rrez_ms.pdf)
- <http://www.interempresas.net/Quimica/Articulos/118219-Biosorcion-de-metales-pesados-para-el-tratamiento-de-aguas-residuales-industriales.html>
- Huamán, S. y Jordán, J. (2013). Tratamiento de los lixiviados de Jaquira con coagulantes naturales (Tesis para la obtención del título profesional de Ingeniero Químico). Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, Cusco - Perú.
- Iturbe, P., Gil S., Lin W., Calatayud S., Palacios O, Capdevila M. & Atrian, S. (2015). The Fungus *Tremella mesenterica* Encodes the Longest Metallothionein Currently Known: Gene, Protein and Metal Binding Characterization. *Plos One*. 11(2). Recuperado de <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371%2Fjournal.pone.0148651>
- Jaramillo, D. (2001). Guía para el diseño, construcción y operación de rellenos sanitarios manuales. Universidad de Antioquia, Colombia. [http://www.bvsde.paho.org/bvsacg/guia/calde/3residuos/d3/061\\_Guia\\_rellenos\\_manuales/Guia%20rellenos%20manuales.pdf](http://www.bvsde.paho.org/bvsacg/guia/calde/3residuos/d3/061_Guia_rellenos_manuales/Guia%20rellenos%20manuales.pdf)
- Kabata A. & Pendías, H. 2nd Edition, (1992): *Trace Elements in Soils and Plants*. Recuperado de <http://base.dnsgb.com.ua/files/book/Agriculture/Soil/Trace-Elements-in-Soils-and-Plants.pdf>
- Kang, K., Shin, H.S., Park, H., (2002). Characterization of humic substances present in landfill leachate with different landfills ages and its implications. *Water Research*, 36, 4043-4032. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12405411>
- Kiely, G. (1999). Ingeniería ambiental. Fundamentos, entornos, tecnologías y sistemas de gestión. Madrid: Mc- Graw Hill.

Recuperado de <http://www.lectura-online.net/libro/kiely-ingenieria-ambiental-pdf.html>

- Ley N° 27314, del 20 de julio del 2000. Ley General de Residuos Sólidos. El Peruano. Lima, Perú. (2000).
- Ley N° 28611, del 15 de octubre de 2005. Ley General del Ambiente. El Peruano. Lima, Perú. (2005).
- Llobet, J. M.; Schuhmacher. M.; Domingo J. L. (2000). Evaluating the environmental impact of an old municipal waste incinerator: PCDD/F levels in soil and vegetation samples. *Toxicological and environment chemistry*, 77,119-129. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10863010>
- Lopez, M. (2011). Biorremediación de metales pesados con aislados microbianos procedentes de procesos de compostaje (Trabajo fin de Máster en Biotecnología Industrial y Agroalimentaria, Universidad de Almeria – España Recuperado de <http://repositorio.ual.es:8080/jspui/bitstream/>
- Lovley, D.R. (2000). *Environmental Microbe -Metal Interactions*. Recuperado de <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555818098>
- Madigan, M; Martinko M. y Parker J. (2003). *Brock Biología de los microorganismos*. Madrid: Ed. Pearson.
- Macaskie, E. (1990). An immobilized cell bioprocess for the removal of heavy metals from aqueous flows. *J. Chem. Technol. Biotechnol*, 49, 357. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1366967#>
- Maldonado, A., Luque C., Urquizo D. (2012). Biosorción de plomo de aguas contaminadas utilizando *Pennisetum clandestinum Hochst* (Kikuyo). *Rev. LatinAm. Metal. Mat.*; S4, 52-57. Recuperado de <http://www.rlmm.org/ojs/index.php/rlmm/article/view/347>
- Margalef, R. (1983). *Limnologia*. Barcelona: Ed. Omega S.A. Recuperado de <https://books.google.com.pe/books/about/Limnolog%C3%ADa.html?id=VlfwAAAMAAJ>.
- Marrero, J., Díaz A. y Coto O. M (2010) Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 41 (1), pp. 67-78. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181221644010.pdf>

- Martín, A. (2008). *Caracterización y aplicación de biomasa residual a la eliminación de metales pesados* (Tesis doctoral, Universidad de Granada – España) Recuperado de <http://hera.ugr.es/tesisugr/17514629.pdf>
- Maya, P. y Hansen, A. M. (1995). Competencia de iones mayores en la migración química de cadmio y plomo en sedimentos del lago de Chapala, México. *Ingeniería Hidráulica en México*, 10 (1), 35–42. Recuperado de [http://repositorio.imta.mx:8080/cenca-repositorio/bitstream/123456789/1196/1/RIH\\_010.pdf](http://repositorio.imta.mx:8080/cenca-repositorio/bitstream/123456789/1196/1/RIH_010.pdf)
- Mejía, G. (2006). Aproximación teórica a la biosorción de metales pesados por medio de microorganismos. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 1 (1), 77-99. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/3214/321428096010.pdf>
- Municipalidad Provincial del Cusco, 2005.
- Municipalidad Provincial del Cusco, 2015.
- Muñoz, A.J., Ruiz, E., Abriouel, H., Gálvez, A., Ezzouhri, L., Lairini, K., Espínola, F. (2012). Heavy metal tolerance of microorganisms isolated from wastewaters. Identification and evaluation of its potential for biosorption. *Chem. Eng. J*, 210, 325-332. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385894712011849>
- Muñoz, J. (2007). *Biosorción de plomo (II) por cáscara de naranja *citrus cinensis* pretratada* (tesis para optar el título profesional de Químico, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima – Perú). Recuperado de [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/391/1/Mu%C3%B1oz\\_cj.pdf](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/391/1/Mu%C3%B1oz_cj.pdf)
- OEFA (Organismo de Evaluación y Fiscalización Ambiental) (2014). Monitoreo Ambiental en el botadero de Haquira-Cusco.
- OIT. (Organización internacional del trabajo), (1998). *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo*. Recuperado de <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo2/63.pdf>
- OMS. (Organización Mundial de la Salud) (1979). Criterios de Salud Ambiental 3 Plomo. *Organización Panamericana de la Salud y OMS*, 11-44. Recuperado de [https://books.google.com.pe/books/about/Criterios\\_de\\_salud\\_ambiental\\_3.html?id=2nhgAAAAMAAJ&redir\\_esc=y](https://books.google.com.pe/books/about/Criterios_de_salud_ambiental_3.html?id=2nhgAAAAMAAJ&redir_esc=y)
- Oré, F., Lavado C., Bendezú, S. (2015). Biosorción de Pb (II) de aguas residuales de mina usando el marlo de Maíz (*Zea mays*). *Rev. Sociedad de Química del Perú*,

81(2). Recuperado de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810-634X2015000200005&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1810-634X2015000200005&script=sci_arttext)

- Orozco, J. (2006). *Sustitución de subacetato de plomo como clarificante en los análisis de laboratorio en un ingenio azucarero* (Tesis para la obtención de grado de Ingeniero Químico, Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala) Recuperado de [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08\\_1005\\_Q.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/08/08_1005_Q.pdf)
- Pauro, J., Choque, M. Poccohuanca, R., Mamani, A. (2009). *Estudios de bioadsorción de Pb por Saccharomyces cereviceae en soluciones acuosas*. *Rev. Colombiana de Biotecnología*, 11(1), 33-39. Recuperado de <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/10319/38376>
- Perez, A.; Niño, Z.; Hernandez, V. y Hernandez, C. (2007). Uso de Enzimas de Tipo Ureasa en el Tratamiento de Aguas Residuales con Alto Contenido en Nitrógeno Orgánico. *Información Tecnológica*, 18 (5), 41-48.
- Petruchi, R. Harwood, W. Herring G. (2003). *Química general*. Madrid: Pearson Educacion S.A.
- PIGARS - Cusco (Plan integral de gestión de residuos sólidos). (2010). Municipalidad Provincial del Cusco.
- Pineda, H.R. (2004). *Presencia de hongos micorrízicos arbusculares y contribución de Glomus intraradices en la absorción y traslocación de zinc y cobre en girasol (Helianthus annuus L.) crecido en un suelo contaminado con residuos de mina*. (Tesis doctoral, Universidad de Colima - México). Recuperado de [http://digeset.ucol.mx/tesis\\_posgrado/Pdf/Rosario%20Pineda%20Hernandez%20doctorado.pdf](http://digeset.ucol.mx/tesis_posgrado/Pdf/Rosario%20Pineda%20Hernandez%20doctorado.pdf)
- Plaza, J. (2012). Remoción de metales pesados empleando algas marinas (Tesis Doctoral, Universidad Nacional de la Plata, La Plata – Argentina). Recuperado de [http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2770/Documento\\_completo\\_\\_pdf?sequence=17](http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2770/Documento_completo__pdf?sequence=17)
- Quispe, L. y Huamán D. (2014). *Evaluación del efecto citotóxico y genotóxico de las aguas del río Haqaira mediante bioensayos de Eisenia foetida, Daphnia sp. y Vicia faba* (Seminario de investigación para optar grado de bachiller en ciencias biológicas) Universidad Nacional San Antonio Abad Del Cusco, Cusco-Perú.
- Renou, S., Poulain, S., Givaudan, J. G., Moulin, P. (2008). Treatment process adapted to stabilized leachates: Lime precipitation-prefiltration-reverse osmosis. *Journal of membrane science*, 313(1-2), 9-22. Recuperado de <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0376738807008137>

- Rodríguez, M. (2008). Efectos de las condiciones de operación sobre la biosorción de  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  y  $Cr^{3+}$  en solución por *Saccharomyces cerevisiae* Residual. *Información Tecnológica*, 19 (6), 47-55.  
Recuperado de [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-07642008000600006](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-07642008000600006)
  
- Rojas, C. (2010). *Efecto de la interacción hongo - Dodonaea viscosa L.* (Tesis de Maestría en Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa – Mexico). Recuperado de [http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/cfmc/Toxicologia/EXPOSICION\\_TOXICOLOGIA.pdf](http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/cfmc/Toxicologia/EXPOSICION_TOXICOLOGIA.pdf)
  
- Röling, W., Breukelen, B.M., Braster, M., Lin, B. & Verseveld, H.W. (2001). Relationships between microbial community structure and hydrochemistry in a landfill leachate-polluted aquifer. *Applied and environmental microbiology*, 67 (10), 4619-4629. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC93212/>
  
- Ruíz, A., Noriega, J., Yeomans, J., Ortega, L., Magaña, P. (1998) Biosorción de Metales Pesados por *Thiobacillus ferrooxidans*. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 42 (5), 228-233. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=47542506>
  
- Schiewer, S. & Wong, H. (1999). Metal binding Stoichiometry and Isotherm choice in biosorption. *Environmental Science and Technology*, 33, 3821-3828. Recuperado de <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es981288j>
  
- Schlegel, H. y Zaborosch, C. (1997). *Microbiología general*. Barcelona, Ediciones Omega, S.A.
  
- Scragg, A. (1999). *Biotecnología Ambiental*. Zaragoza: Ed. Acribia, S.A.
  
- Selberg, A.; Viik, M. y Tenno, T. (2005). Characteristics and natural attenuation of the Pääsküla landfill leachate. *Proceedings of the Estonian Academy of Sciences*, 54, 1:35-44.  
Recuperado de <http://www.freepatentsonline.com/article/Estonian-Academy-Sciences-Chemistry/198705953.html>
  
- SNMPE. (Sociedad Nacional de Minería Petróleo y Energía). (2015). Informe quincenal de la SNMPE, Recuperado de <http://www.snmpe.org.pe/informes-y-publicaciones/informes-quincenales/sector-minero/1839-el-plomo-actualizado-julio-de-2015.html>

- Srinath, T., Verma, T., Ramteke, P.W., Garg, S.K. (2002). Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. *Chemosphere*, 48, 427- 435. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12152745>
- Suarez, P. y Reyes, R. (2002). La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia para el ambiente. *Rev. Interciencia*, 27(4),160-164. Recuperado de [http://www.interciencia.org/v27\\_04/suarez.pdf](http://www.interciencia.org/v27_04/suarez.pdf)
- Suazo, E., Morales, L., Cristiani, M., Cristiani, E. (2010) Efecto del pH sobre la biosorción de níquel (II) por *Saccharomyces cerevisiae* var. *Ellipsoideus*. *Revista CENIC*, 41, 1-12. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/1816/181620500024.pdf>
- Tchobonoglous, G., Theisen, H y Vigil, S. (1994). Gestión integral de residuos sólidos. España: Mc Graw Hill. Recuperado de [http://www.cosaslibres.com/libros/leeronline/www.arborea.com.ve%2Fgestion\\_desechos.pdf](http://www.cosaslibres.com/libros/leeronline/www.arborea.com.ve%2Fgestion_desechos.pdf)
- Tsezos, M. 1990. Engineering aspects of metal binding by biomass. En Ehrlich, H. L. & Brierley C. L. (eds.). *Microbial Mineral Recovery* (pp. 325-340). New York: McGraw-Hill. Recuperado de [https://books.google.com.pe/books?id=xlTBhuYbkC0C&pg=PA112&lpg=PA112&dq=engineer+aspects+of+metal+binding+by+biomass+tsezos+microbial+mineral&source=bl&ots=zAY8hNxwdw&sig=uWQMj7qgfV0QxHnA32IG5d6w4v4&hl=es&sa=X&ved=0ahUKewiI\\_Njh1OzOAhWBQSYKHck2DNEQ6AEIGjAA](https://books.google.com.pe/books?id=xlTBhuYbkC0C&pg=PA112&lpg=PA112&dq=engineer+aspects+of+metal+binding+by+biomass+tsezos+microbial+mineral&source=bl&ots=zAY8hNxwdw&sig=uWQMj7qgfV0QxHnA32IG5d6w4v4&hl=es&sa=X&ved=0ahUKewiI_Njh1OzOAhWBQSYKHck2DNEQ6AEIGjAA)
- Tur, E.; Orberá, T.; Romagosa, Y.; Pérez, R. (2012). Bioadsorción de plomo (II) por biomasa microbiana seca: Efecto del pH. *Revista Cubana de Química*, 25(1), 75-81. Recuperado de <http://www.redalyc.org/pdf/4435/443543730010.pdf>
- Valdivia, M. (2005). Intoxicación por plomo. *Sociedad Peruana de Medicina Interna*, 18(1). Recuperado de [http://medicinainterna.org.pe/revista/revista\\_18\\_1\\_2005/Intoxicacion.pdf](http://medicinainterna.org.pe/revista/revista_18_1_2005/Intoxicacion.pdf)
- Vega, S. y Reynaga, J., (1990). *Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales*. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud.
- Villanueva, C. (2006). Biosorción de Cobre (II) por biomasa pretratada de cáscara de *Citrus Sinensis* (naranja), *Citrus Limonium* (limón) y *Opuntia Ficus* (palmeta de

nopal) (Tesis para optar el título profesional de químico). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima. Recuperado de [http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/2112&ved=0ahUKEwj7oPP12zOAhXHeCYKHdUFDssQFggcMAA&usg=AFQjCNHKLtYwm7SzQwVX7S42cyBYI53LkA&sig2=zGj\\_VCISiiLYKf7PQYauig](http://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/cybertesis/2112&ved=0ahUKEwj7oPP12zOAhXHeCYKHdUFDssQFggcMAA&usg=AFQjCNHKLtYwm7SzQwVX7S42cyBYI53LkA&sig2=zGj_VCISiiLYKf7PQYauig)

- Villanueva, E. (1991). Plomo. Medicina legal y toxicología. Barcelona: Salvat.
- Volesky, B. (1990). Removal and recovery of heavy metals by biosorption. En Volesky, B. (ed.). *Biosorption of Heavy Metals* (pp. 7-44). CRC Press. Boca Raton, FL. Recuperado de <https://books.google.com.pe/books?id=doFlZsR2LQEC&pg=PA3&lpg=PA3&dq=removal+and+recovery+of+heavy+metal+by+biosorption+volesky&source=bl&ots=UugwGrmrc2&sig=BZ1oSPT7mJgz5GrKB8HC9Bun8o&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiFqu-W3ezOAhWCdSYKHcIBA9QQ6AEILTAE>
- Vullo, D. (2003). Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Química Viva*, 3(2), 93-104. Recuperado de [http://www.redalyc.org/articulo.oa%3Fid%3D86320303&ved=0ahUKEwj3OjD3ezOAhWD7CYKHbgBAT4QFggfMAE&usg=AFQjCNEjGi3gZjNLuLpZLY5Way5ZT\\_Uimw&sig2=vpr8MTesQxkaN3FIMqdk4g](http://www.redalyc.org/articulo.oa%3Fid%3D86320303&ved=0ahUKEwj3OjD3ezOAhWD7CYKHbgBAT4QFggfMAE&usg=AFQjCNEjGi3gZjNLuLpZLY5Way5ZT_Uimw&sig2=vpr8MTesQxkaN3FIMqdk4g)
- Watanabe, T. Santo, D. & Amura, T. (2002). Risk evaluation for pathogenic and viruses in sewage sludge compost. *Water Science and Technology*, 48 (11), 325-330. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12523773>
- WHO (World Health Organization) (1977). Environmental Health Criteria: 3. Lead. *World Health Organization*, 10, 39, 47, 55, 74, 77. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1008339/>
- Wright, J. 2003. *A study of lead and some of its compounds*. Environmental Chemistry. London: Routledge. Recuperado de [https://books.google.com.pe/books?id=eSNMCQ\\_8kFQC&pg=PA208&lpg=PA208&dq=a+study+of+lead+and+some+of+its+compounds+wright&source=bl&ots=ioGRxxbmxL&sig=pleGVo-AMwlmgcZDrGM3rxCLkMU&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjpraV4OzOAhXKqx4KHdJtBFgQ6AEIHzAA#v=onepage&q=a%20study%20of%20lead%20and%20some%20of%20its%20compounds%20wright&f=false](https://books.google.com.pe/books?id=eSNMCQ_8kFQC&pg=PA208&lpg=PA208&dq=a+study+of+lead+and+some+of+its+compounds+wright&source=bl&ots=ioGRxxbmxL&sig=pleGVo-AMwlmgcZDrGM3rxCLkMU&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjpraV4OzOAhXKqx4KHdJtBFgQ6AEIHzAA#v=onepage&q=a%20study%20of%20lead%20and%20some%20of%20its%20compounds%20wright&f=false)
- Zagal, E. y Sadzawka, A. (2007). *Protocolo de métodos de análisis para Suelos y Lodos*. Chillán: Universidad de Concepción, Facultad de Agronomía. Recuperado de [https://www.google.com.pe/url?sa=t&source=web&rct=j&url=http://www.cofes.org.ar/descargas/relas/4\\_jornada/Protocolos\\_suelos%2520y\\_lodos\\_Sadzawka.pdf&ved=0ahUKEwjco-](https://www.google.com.pe/url?sa=t&source=web&rct=j&url=http://www.cofes.org.ar/descargas/relas/4_jornada/Protocolos_suelos%2520y_lodos_Sadzawka.pdf&ved=0ahUKEwjco-)

jb4OzOAhWL1x4KHe4lBJEQFggdMAA&usg=AFQjCNGp4bnLNQPtqCX4Spcp3t9  
J8OPBWA&sig2=Xops1aZcxOrSQgD2uE21Cw

- Zhou, J. & Kiff, R. (1991). J. Chem. Technol. Biotechnol, 52, 317. Recuperado de  
Recuperado de  
[https://www.researchgate.net/publication/229809926\\_The\\_uptake\\_of\\_copper\\_fro  
m\\_aqueous\\_solution\\_by\\_immobilized\\_fungal\\_biomass](https://www.researchgate.net/publication/229809926_The_uptake_of_copper_from_aqueous_solution_by_immobilized_fungal_biomass)

## **Anexos**