

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y
BIOTECNOLÓGICAS
PROGRAMA PROFESIONAL DE INGENIERÍA BIOTECNOLÓGICA



**“DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE UN SISTEMA PARA LA REMOCIÓN DE PLOMO (II) Y
CADMIO (II), MEDIANTE LA INMOVILIZACIÓN DE MICROORGANISMOS NATIVOS DE
LA POZA DE RELAVES DEL LABORATORIO DE CONCENTRACION DE MINERALES DE
LA UNSA –AREQUIPA”**

Presentado por: Hugo Apaza Aquino

Para optar el título profesional de Ingeniero Biotecnólogo

Asesora: María Rosario Valderrama Valencia

AREQUIPA, 2014

Lista de símbolos y abreviaturas

T°	:	Temperatura
pH	:	valor de pH
EAA	:	Espectrofotometría de Absorción Atómica
Pb (II)	:	Plomo
Cd (II)	:	Cadmio
%R	:	Porcentaje de remoción
%R Cd	:	Porcentaje de remoción de Cadmio
%R Pb	:	Porcentaje de remoción de Plomo
nm	:	Nanómetro
BHI	:	Infusión Cerebro – Corazón
LIA	:	Lisina Hierro
TSI	:	Hierro- triple azúcar
L	:	Litro
°C	:	Grados Celsius
g	:	Gramos
ppm	:	Partes por millón
Asp	:	<i>Aspergillus</i>
Rhi	:	<i>Rhizopus</i>
Asp-Rhi	:	Consortio <i>Aspergillus – Rhizopus</i>
1M	:	1 Micelio
2M	:	2 Micelios
3M	:	3 Micelios

Índice de contenido

Lista de símbolos y abreviaturas	ii
Índice de figuras	¡Error! Marcador no definido.
Resumen	xi
Abstract	xiii
Capítulo I: Introducción	1
Objetivos	3
Capítulo II: Marco teórico	4
2.1. Contaminación del agua	4
2.1.1. Origen de la contaminación de las aguas	4
2.2. Metales pesados	4
2.2.1. Fuentes de metales pesados	5
2.2.2. Cadmio	6
2.2.3. Plomo	10
2.3. Marco legal	13
2.4. Biorremediación de metales pesados	15
2.4.1. Bioacumulación y bioadsorción	19
2.5. Columnas de adsorción	23
2.6. Microorganismos	25
2.6.1. <i>Rhizopus spp.</i>	25
2.6.2. <i>Aspergillus spp.</i>	27
2.7. Espectrofotometría de absorción atómica	30
2.7.1. Componentes de un espectrofotómetro de absorción atómica	31
2.7.2. Descripción de la técnica de EAA	32
Capítulo III: Materiales y métodos	33
3.1. Lugar de ejecución	33
3.2. Materiales	33
3.2.1. Reactivos	33

3.2.2. Medios de cultivo	33
3.2.3. Material de laboratorio	34
3.2.4. Equipos	34
3.2.5. Otros materiales	35
3.3. Métodos	36
3.3.1. Recolección de muestra	36
3.3.2. Análisis fisicoquímico de la muestra	36
3.3.3. Aislamiento de microorganismos	37
3.3.4. Caracterización de los microorganismos	39
3.3.5. Acondicionamiento a Plomo (II) y Cadmio (II)	42
3.3.6. Evaluación de la influencia de Plomo (II) y Cadmio (II) en la cinetica de crecimiento	42
3.3.7. Obtención de biomasa para los procesos de bioadsorción	43
3.3.8. Capacidad de remoción de Plomo (II) y Cadmio(II)	44
3.3.9. Ensayos de remoción de Plomo (II) y Cadmio (II) usando el micelio fungal más eficiente	45
3.3.10. Determinación de la concentración de los metales	49
3.3.11. Sistema de remoción de Plomo (II) Y Cadmio (II)	50
3.3.12. Diagrama de flujo de actividades	52
Capítulo IV: Resultados y discusión	53
4.1. Análisis de muestra	53
4.2. Aislamiento de microorganismos	54
4.2.1. Cultivo de microorganismos	54
4.2.2 Purificación de las colonias aisladas	56
4.3. Caracterización de los microorganismos	56
4.3.1. Caracterización de las cepas bacterianas	56
4.3.2. Caracterización de las cepas fúngicas	61
4.4. Acondicionamiento a distintas concentraciones de Plomo (II) y Cadmio (II)	69
4.5. Determinación de la cinética de desarrollo sin y con metales	70
4.6. Cultivo de micelio para los procesos de adsorción	74

4.6.1. Determinación del medio más adecuado para el cultivo de hongos <i>Aspergillus niger</i> y <i>Rhizopus spp.</i>	75
4.7. Ensayos preliminares de remoción de Plomo (II) y Cadmio (II).....	76
4.7.1. Remoción por parte de <i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus spp</i> y consorcio.	76
4.7.2. Selección del micelio fungal más eficiente.....	82
4.8. Ensayos de remoción de los metales Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla.	84
4.8.1. Efecto pH	84
4.8.2. Efecto temperatura.....	92
4.8.3. Efecto biomasa.....	99
4.8.4. Efecto concentración inicial de metal.....	108
4.9. Sistema de remoción de Plomo (II) y Cadmio (II).....	115
4.9.1. Construcción del sistema.....	115
4.9.2. Evaluación de eficiencia de la capacidad de remoción.....	117
4.9.3. Análisis microbiológico.....	118
Capítulo V: Conclusiones	121
Recomendaciones.....	122
Referencias.....	123
Apéndices.....	129

Índice de tablas

Tabla 1. <i>Fuentes de elementos tóxicos. Extraído de Peterle 1991.</i>	6
Tabla 2. <i>Límites máximos permisibles para la descarga de efluentes líquidos de actividades minero-metalúrgicas. Extraído de decreto supremo N° 010-2010-MINAM.</i>	14
Tabla 3. <i>Parámetros para riego de vegetales de tallo bajo y tallo alto. Extraído de decreto supremo N° 002-2008-MINAM.</i>	15
Tabla 4. <i>Evaluación de la presencia de los microorganismos.</i>	39
Tabla 5. <i>Características morfológicas de las colonias bacterianas.</i>	41
Tabla 6. <i>Características morfológicas de las colonias fúngicas.</i>	41
Tabla 7. <i>Caracterización fisicoquímica del agua de la poza de relaves del laboratorio de concentración de minerales.</i>	53
Tabla 8. <i>Crecimiento de los microorganismos sembrado en distintos medios.</i>	55
Tabla 9. <i>Características de las cepas 1B y 2B.</i>	58
Tabla 10. <i>Resultado de las pruebas bioquímicas aplicadas a la cepa 1B.</i>	60
Tabla 11. <i>Pruebas bioquímicas aplicadas a la cepa 2B.</i>	60
Tabla 12. <i>Características de las cepas 1H y 2H.</i>	62
Tabla 13. <i>Crecimiento de Aspergillus y Rhizopus en distintos medios de cultivo.</i>	75
Tabla 14. <i>Remoción de Plomo, Cadmio y mezcla por parte de las cepas.</i>	77
Tabla 15. <i>Resultados del proceso de adsorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla en biomasa de Rhizopus spp, obtenidos en el modelo matemático de primer orden a diferentes valores de pH (3, 4 y 5).</i>	88
Tabla 16. <i>Resultados del proceso de adsorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla en biomasa de Rhizopus spp, obtenidos en el modelo matemático de segundo orden a diferentes valores de pH (3, 4 y 5).</i>	90
Tabla 17. <i>Resultados del proceso de adsorción de Plomo(II), Cadmio(II) y mezcla en biomasa de Rhizopus spp, obtenidos en el modelo matemático de primer orden a diferentes valores de temperaturas (10, 25 y 40°C).</i>	95
Tabla N°18. <i>Resultados del proceso de adsorción de Plomo(II), Cadmio(II) y mezcla en biomasa de Rhizopus spp, obtenidos en el modelo matemático de segundo orden a diferentes valores de temperatura (10, 25 y 40°C).</i>	97
Tabla 19. <i>Resultados del proceso de adsorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla en biomasa de Rhizopus spp, obtenidos en el modelo matemático de primer orden a diferentes cantidades de biomasa (1Micelio, 2Micelios Y 3Micelios).</i>	104
Tabla 20. <i>Resultados del proceso de adsorción de Plomo(II), Cadmio(II) y mezcla en biomasa de Rhizopus spp, obtenidos en el modelo matemático de segundo orden a distintas cantidades de biomasa (1Micelio, 2Micelios y 3Micelios).</i>	106
Tabla 21. <i>Resultados del proceso de adsorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla en biomasa de Rhizopus spp, obtenidos en el modelo matemático de primer orden a distintas concentraciones (10, 50 y 90ppm).</i>	113
Tabla 22. <i>Resultados del proceso de adsorción de Plomo (II), Cadmio(II) y mezcla en biomasa de Rhizopus spp, obtenidos en el modelo matemático de segundo orden a distintas concentraciones de metal (10, 50 y 90ppm).</i>	114
Tabla 23. <i>Porcentaje de remoción sin el micelio de Rhizopus spp.</i>	117
Tabla 24. <i>Porcentaje de remoción con el micelio de Rhizopus spp.</i>	118
Tabla 25. <i>Revisión de las placas del análisis microbiológico.</i>	119

Índice de figuras

<i>Figura 1.</i> Bioacumulación de metales pesados. Extraído de Reyes et-al, 2006.....	20
<i>Figura 2.</i> Bioacumulación de metales pesados. Extraído de Reyes et-al, 2006.....	21
<i>Figura 3.</i> Evolución de la concentración del contaminante en una columna de Adsorción. Extraído de Gilarranz, 2007.....	24
<i>Figura 4.</i> Diagrama esquemático de <i>Rhizopus spp</i>	25
<i>Figura 5.</i> <i>Rhizopus</i> cultivado en Agar Sabouraud dextrosa. Extraído de Universidad de Antioquia.....	27
<i>Figura 6.</i> Morfología microscópica de un cultivo de <i>Rhizopus spp</i> . Extraído de Universidad De Antioquia.....	27
<i>Figura 7.</i> Conidióforos de <i>Aspergillus</i>	28
<i>Figura 8.</i> Cultivo de <i>Aspergillus niger</i> en Agar Sabouraud. Extraído de Universidad de Antioquia.....	29
<i>Figura 9.</i> Morfología microscópica a partir de cultivo de <i>Aspergillus niger</i> . Extraído de Universidad de Antioquia.....	29
<i>Figura 10.</i> Componentes de un espectrofotómetro de absorción atómica.....	30
<i>Figura 11.</i> Elementos susceptibles de determinarse por EAA, así como las líneas de absorción más intensas y las flamas recomendadas.....	32
<i>Figura 12.</i> Poza de relaves del laboratorio de concentración de minerales de la Universidad Nacional San Agustín-Arequipa.....	36
<i>Figura 13.</i> Incubación de los medios de cultivo utilizados en la etapa de aislamiento....	38
<i>Figura 14.</i> Cámara de flujo laminar donde se trabajó la inoculación en las placas Petri..	39
<i>Figura 15.</i> Flujograma del proceso de identificación de los microorganismos.....	40
<i>Figura 16.</i> Izquierda: laminas portaobjetos en pleno proceso de tinción Gram, derecha: laminas portaobjetos con azul de lactofenol realizado a las cepas fúngicas.....	42
<i>Figura 17.</i> Muestras recolectadas de los frascos de cultivos para el desarrollo de las cinéticas.....	43
<i>Figura 18.</i> Determinación de glucosa mediante el método enzimático.....	43
<i>Figura 19.</i> Proceso llevado para el desarrollo de la cinética de las cepas fúngicas.....	43
<i>Figura 20.</i> Cultivo de las cepas fúngicas.....	44
<i>Figura 21.</i> Muestras obtenidas a distintos tiempos.....	45
<i>Figura 22.</i> Esquema general de la metodología.....	52
<i>Figura 23.</i> Medios de enriquecimiento tras el periodo de incubación.....	55
<i>Figura 24.</i> Colonias aisladas en Placas con medio BHI.....	56
<i>Figura 25.</i> Observación microscópica de una de las colonias de la placa 2 – BHI con un aumento de 100X.....	57
<i>Figura 26.</i> Observación microscópica de las bacterias aisladas a 100X, (a) cepa 2B (b) la cepa 1B.....	57
<i>Figura 27.</i> Tinción de Wirtz-Conklin de las colonias perteneciente a la cepa 2B.....	58
<i>Figura 28.</i> Placas de las colonias perteneciente a la cepa 2B, lado derecho fotografía de la parte delante de la placa, lado izquierdo la parte posterior.....	58
<i>Figura 29.</i> Placas de las colonias puras, lado izquierdo perteneciente a la cepa 2B y en el lado derecho perteneciente a la cepa 1B.....	59
<i>Figura 30.</i> Observación microscópica a 100X de las cepas 1B, donde se muestra a	

cocobacilos Gram negativo.....	60
<i>Figura 31.</i> Observación microscópica a 100X de las cepas 2B, donde se muestra cadena de bacilos Gram positivo, con presencia de esporas.....	60
<i>Figura 32.</i> Tubos con caldo Sabouraud inoculados con las cepas fúngicas.....	62
<i>Figura 33.</i> Placas de los hongos aislados, A se aprecia a la cepa 1Hy 2H en su mayoría, B se aprecia a la cepa 1Hen la parte baja, C se aprecia la cepa 2H en su mayoría y en D se aprecia 2H y 3H.....	64
<i>Figura 34.</i> Placas de la cepa purificada 2H cultivada en medio PDA.....	65
<i>Figura 35.</i> Placas de la cepa purificada 1H cultivada en medio Sabouraud.....	65
<i>Figura 36.</i> Observación microscópica a 40X de <i>Rhizopus spp</i>	66
<i>Figura 37.</i> Observación microscópica a 40 X, se aprecia la presencia de esporas alrededor del esporangio de <i>Rhizopus spp</i>	67
<i>Figura 38.</i> Observación microscópica a 40X, lado izquierdo se aprecia las esporas y lado derecho (con acercamiento de la cámara) la forma típica de <i>Aspergillus niger</i>	67
<i>Figura 39.</i> Observación microscópica a 40X, lado izquierdo se aprecia las esporas y lado derecho la forma típica de la fialide de <i>Penicillium</i>	67
<i>Figura 40.</i> Cultivo de micelios, lado izquierdo el micelio de <i>Aspergillus niger</i> y en el lado derecho el micelio de <i>Rhizopus spp</i>	69
<i>Figura 41.</i> Desarrollo de las cepas fúngicas <i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus spp</i> y el consorcio Asp-Rhi.....	70
<i>Figura 42.</i> Cinética correspondiente al pH con respecto al tiempo de las cepas de <i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus spp</i> y en consorcio.....	72
<i>Figura 43.</i> Cinética correspondiente al peso seco con respecto al tiempo de las cepas de <i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus spp</i> y en consorcio.....	72
<i>Figura 44.</i> Cinética correspondiente a la glucosa con respecto al tiempo de las cepas de <i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus spp</i> y en consorcio.....	73
<i>Figura 45.</i> Cinética de pH respecto al tiempo de las cepas de <i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus spp</i> y consorcio, suplementados con Plomo (II) y Cadmio(II).....	73
<i>Figura 46.</i> Cinética del peso con respecto al tiempo de las cepas de <i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus spp</i> y consorcio, suplementados con Plomo(II) y Cadmio(II).....	74
<i>Figura 47.</i> Cinética correspondiente a la Glucosa con respecto al tiempo de las cepas de <i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus spp</i> y consorcio, suplementados con Plomo (II) y Cadmio (II).....	74
<i>Figura 48.</i> Cepas de <i>Rhizopus spp</i> (Izq.) y <i>Aspergillus niger</i> (Der.), se aprecia gran cantidad de esporas por parte de estos hongos.....	75
<i>Figura 49.</i> Micelio de <i>Aspergillus niger</i> cultivado en distintos medios de cultivo.....	76
<i>Figura 50.</i> Micelio de <i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus spp</i> y el consorcio (<i>Aspergillus niger</i> y <i>Rhizopus spp</i>) respectivamente.....	77
<i>Figura 51.</i> Micelios de <i>Aspergillus niger</i> (Izq.), <i>Rhizopus spp</i> (medio) y consorcio Asp-Rhi (Der.).....	78
<i>Figura 52.</i> Cinética de remoción de Plomo (II) para <i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus spp</i> y consorcio Asp- Rhi.....	80
<i>Figura 53.</i> Cinética de remoción de Cadmio (II) para <i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus spp</i> y consorcio.....	80
<i>Figura 54.</i> Cinética de remoción de Plomo(II) y Cadmio(II) para <i>Aspergillus niger</i> , <i>Rhizopus spp</i> y consorcio.....	81
<i>Figura 55.</i> Capacidad de bioadsorción de Plomo (II), Cadmio(II) y mezcla por <i>Aspergillus</i>	

<i>niger</i>	82
<i>Figura 56.</i> Capacidad de bioadsorción de Plomo (II), Cadmio(II) y mezcla por <i>Rhizopus spp</i>	82
<i>Figura 57.</i> Capacidad de bioadsorción de Plomo (II), Cadmio(II) y mezcla por consorcio <i>Aspergillus niger – Rhizopus spp</i>	83
<i>Figura 58.</i> Cultivo del micelio de <i>Rhizopus spp</i>	84
<i>Figura 59.</i> Micelio desarrollado de <i>Rhizopus spp</i>	84
<i>Figura 60.</i> Micelio de <i>Rhizopus spp</i> empleados en los ensayos de remoción.....	85
<i>Figura 61.</i> Porcentaje de remoción de Plomo (II), Cadmio(II) y mezcla a distintos valores de pH.....	86
<i>Figura 62.</i> Capacidad de bioadsorción de Plomo (II) por <i>Rhizopus spp</i> a distintos valores de pH.....	87
<i>Figura 63.</i> Capacidad de bioadsorción de Cadmio (II) por <i>Rhizopus spp</i> a distintos valores de pH.....	88
<i>Figura 64.</i> Capacidad de bioadsorción de la mezcla (Plomo (II) y Cadmio (II)) por <i>Rhizopus spp</i> a distintos valores de pH.....	88
<i>Figura 65.</i> Proceso de bioadsorción de Plomo (II), Cadmio(II) y mezcla (Plomo(II) y Cadmio(II)) por <i>Rhizopus spp</i> a distintos valores de pH, aplicando el modelo de primer orden.....	90
<i>Figura 66.</i> Proceso de bioadsorción de Plomo(II), Cadmio(II) y mezcla (Plomo(II) y Cadmio(II)) por <i>Rhizopus spp</i> a distintos valores de pH, aplicando el modelo de segundo orden.....	92
<i>Figura 67.</i> Porcentaje de remoción de Plomo (II), Cadmio(II) y mezcla a distintas temperaturas.....	93
<i>Figura 68.</i> Capacidad de bioadsorción de Plomo(II) por <i>Rhizopus spp</i> a distintas temperaturas (10,25 y 40°C).....	94
<i>Figura 69.</i> Capacidad de bioadsorción de Cadmio (II) por <i>Rhizopus spp</i> a distintas temperaturas (10, 25 y 40°C).....	95
<i>Figura 70.</i> Capacidad de bioadsorción de la mezcla (Plomo (II) y Cadmio (II)) por <i>Rhizopus spp</i> a distintas temperaturas (10, 25 y 40°C).....	95
<i>Figura 71.</i> Proceso de bioadsorción de Plomo(II), Cadmio(II) y mezcla (Plomo(II) y Cadmio(II)) por <i>Rhizopus spp</i> a distintas temperaturas, aplicando el modelo de primer orden.....	97
<i>Figura 72.</i> Proceso de bioadsorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla (Plomo (II) y Cadmio (II)) por <i>Rhizopus spp</i> a distintas temperaturas, aplicando el modelo de segundo orden.....	99
<i>Figura 73.</i> Porcentaje de remoción de Plomo (II), Cadmio(II) y mezcla a distintas cantidades de biomasa.....	101
<i>Figura 74.</i> Micelio de <i>Rhizopus spp</i>	101
<i>Figura 75.</i> Capacidad de bioadsorción de Plomo (II) por <i>Rhizopus spp</i> a distintas cantidades de biomasa.....	103
<i>Figura 76.</i> Capacidad de bioadsorción de Cadmio (II) por <i>Rhizopus spp</i> a distintas cantidades de biomasa.....	103
<i>Figura 77.</i> Capacidad de bioadsorción de la mezcla (Plomo(II) y Cadmio(II)) por <i>Rhizopus spp</i> a distintas cantidades de biomasa.....	104
<i>Figura 78.</i> Proceso de bioadsorción de Plomo (II), Cadmio(II) y mezcla (Plomo(II) y Cadmio(II))por <i>Rhizopus spp</i> a distintos cantidades de biomasa, aplicando el modelo de primer orden.....	106

<i>Figura 79.</i> Proceso de bioadsorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla (Plomo (II) y Cadmio (II)) por <i>Rhizopus spp</i> a distintas cantidades de biomasa, aplicando el modelo de segundo orden.....	108
<i>Figura 80.</i> Micelio de <i>Rhizopus spp</i> , como se aprecia tiene un aspecto filamentosos.....	109
<i>Figura 81.</i> Porcentaje de remoción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla a distintas concentraciones de metal.....	110
<i>Figura 82.</i> Capacidad de bioadsorción de Plomo (II) por <i>Rhizopus spp</i> a distintas concentraciones.....	112
<i>Figura 83.</i> Capacidad de bioadsorción de Cadmio (II) por <i>Rhizopus spp</i> a distintas concentraciones.....	112
<i>Figura 84.</i> Capacidad de bioadsorción de la mezcla (Plomo (II) y Cadmio(II)) por <i>Rhizopus spp</i> a distintas concentraciones.....	113
<i>Figura 85.</i> Proceso de bioadsorción de Plomo (II), Cadmio(II) y mezcla (Plomo(II) y Cadmio(II)) por <i>Rhizopus spp</i> a distintas concentraciones de metal aplicando el modelo de primer orden.....	114
<i>Figura 86.</i> Proceso de bioadsorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla (Plomo(II) y Cadmio(II)) por <i>Rhizopus spp</i> a distintas concentraciones de metal, aplicando el modelo de segundo orden.....	116
<i>Figura 87.</i> Sistema de remoción de Plomo (II) y Cadmio (II).....	117
<i>Figura 88.</i> Columna inmovilizada con micelio de <i>Rhizopus spp</i>	118
<i>Figura 89.</i> Placas con medio Sabouraud para el análisis microbiológico.....	119



Resumen

En el presente trabajo de investigación se estudio la capacidad de remoción de Plomo (II) y Cadmio (II), mediante el empleo de un sistema de inmovilización de los microorganismos nativos aislados de la poza de oxidación del laboratorio metalúrgico de la UNSA.

Se logró aislar e identificar 4 cepas siendo: *Acinetobacter spp*, *Bacillus spp*, *Rhizopus spp* y *Aspergillus niger*. Se cultivó *Aspergillus niger* y *Rhizopus spp*, para realizar los ensayos de remoción de Plomo (II) y Cadmio (II). Para evaluar se trabajo en sistema Batch y se evaluó el porcentaje de remoción. Posteriormente se evaluó la influencia del pH, temperatura, biomasa y concentración de metal, determinándose los valores más adecuados para obtener la mayor eficiencia de remoción de dichos metales. Luego se ensayó en un sistema de sorción elaborado en base a la biomasa del hongo *Rhizopus spp* y se aplicaron modelos de primer y segundo orden.

Se determinó que *Rhizopus spp* fue la cepa que mas removió el metal Plomo (II) con 86.39%, Cadmio (II) 69.23% y la mezcla en 74.82%. Por otra parte *Aspergillus niger* remueve Plomo (II) en 74.19%, Cadmio (II) 44.72%, y la mezcla en 66.90%. Y para el consorcio *Aspergillus niger - Rhizopus spp* remueve Plomo (II) en 84.17%, Cadmio (II) 43.42%, y la mezcla en 53.43%. Por otra parte se logró determinar que la mayor

remoción se dio al trabajar a un pH 5, a una temperatura de 25°C, una biomasa de 3 Micelios y concentración de 10 ppm, se determinó que el modelo de segundo orden fue el modelo que más se ajustó.

Se logró construir el sistema, teniendo como principal componente la inmovilización de *Rhizopus spp*, trabajando a un flujo de 1.05 L/hora se llegó a tener un máximo de remoción de 99.4% y 99.8 % para Plomo (II) y Cadmio (II) respectivamente. Existen distintos métodos y técnicas que permiten la remoción de metales pesados de soluciones contaminadas con estas, pero la aplicación de biomasa fungal podría ser una alternativa, ya que estas al ser bien manejadas presentan múltiples beneficios.

Palabras clave: *Rhizopus spp*, *Aspergillus niger*, remoción, Plomo (II), Cadmio (II).



Abstract

In this research study is the ability to lead (II) and cadmium (II) removal by the use of a locking system of native microorganisms isolated from the oxidation pond UNSA metallurgical laboratory.

It was possible to isolate and identify 4 strains being : *Acinetobacter spp* , *Bacillus spp* , *Rhizopus spp* and *Aspergillus niger*. *Aspergillus niger* and *Rhizopus spp* culture assays for removal of lead (II) and cadmium (II). To assess system is working in batch and the percentage of removal was evaluated. Subsequently the influence of pH, temperature, biomass and metal concentration, determining the most suitable values for the highest removal efficiency of these metals was evaluated. Then I test sorption system developed based on the biomass of the fungus *Rhizopus spp* and models of first and second order were applied.

Rhizopus spp determined that the strain was more removed the metal lead (II) with 86.39%, cadmium (II) 69.23% and 74.82% mixture. *Aspergillus niger* Moreover out lead (II) at 74.19%, cadmium (II) 44.72% and 66.90% mixture. And for the consortium *Aspergillus niger* - *Rhizopus spp* removes Lead (II) 84.17%, Cadmium (II) 43.42%, and 53.43% in the mixture. Furthermore it was determined that the higher adsorption occurred when working at pH 5, at a temperature of 25 ° C, a biomass 3 mycelia and 10 ppm concentration, it was determined that the second order model was the model I adjust more.

Was achieved to build the system, with the main component immobilization *Rhizopus spp*, working at a flow of 1.05 L / hour I get to have a maximum clearance of 99.4 % and 99.8 % for lead (II) and Cadmium (II) respectively. There are different methods and techniques for the removal of heavy metals from contaminated with these solutions, but the application of fungal biomass could be an alternative, as these to be well managed have multiple benefits.

Keywords: *Rhizopus spp*, *Aspergillus niger*, removal, Lead (II), Cadmium (II).

Capítulo I: Introducción

El incremento de la actividad industrial ha intensificado los problemas de contaminación ambiental y el deterioro de diversos ecosistemas con la acumulación de muchos contaminantes, tales como metales pesados entre otros. Estos contaminantes son vertidos en el sistema acuático de una manera significativa como resultados de operaciones industriales. Generalmente, la polución por metales pesados proviene de los desechos de industrias dedicadas a manufactura de plásticos, fertilizantes, pigmentos, minería, metalurgia y curtiembre. La comunidad científica ha avocado ya muchos años y esfuerzos para el tratamiento y eliminación de metales pesados con el fin de combatir este problema. ⁽¹⁾

Las industrias metalúrgicas de Arequipa, generan efluentes con Plomo y Cadmio, con valores superiores a 0.1 mg/L y 0.049 mg/L respectivamente. ⁽²⁾ Estos efluentes están siendo vertidos en el curso del río Chili. Entre los tramos comprendidos entre puente San Martín y fundo Mococho se encuentran las empresas del parque industrial. Estas industrias vierten gran cantidad de sus efluentes al río Chili. Estos metales pesados debido a su toxicidad a bajas concentraciones, son bioacumulables y no biodegradables. ⁽³⁾

El Cadmio, el Plomo y el mercurio han sido identificados como los metales pesados más tóxicos para los humanos y el ambiente. Diversos metales que son micronutrientes esenciales, como el cobre y el zinc, resultan tóxicos en concentraciones elevadas, mientras que otros como Cadmio, Plomo mercurio y arsénico, son tóxicos a dosis mínimas ^(4, 5). El Cadmio, en particular, ha sido reconocido como altamente nocivo por sus efectos en el ambiente, debido a su capacidad de bioacumularse en la cadena alimenticia. Actualmente, existen diversos métodos convencionales como resinas de intercambio iónico, electrodeposición, precipitación, floculación, etc. para eliminar metales pesados de aguas residuales pero que se encuentran a altas concentraciones.

Lamentablemente, estas técnicas resultan caras e ineficientes a bajas concentraciones, donde el problema se hace más latente.

En respuesta a este problema, durante la década pasada, la biorremediación ha sido vista como una solución tentativa, debido a su bajo costo y selectividad por metales pesados a bajas concentraciones. La eliminación de metales por biomasa muerta (Biosorción) es más atractiva comparada al uso de células vivas (bioacumulación) debido a varias razones: el crecimiento y propagación de la biomasa pueden ser alteradas debido a la misma toxicidad del contaminante, a los cuidados que el crecimiento celular requiere y a la multiplicidad de mecanismos posibles. Es por ello que la biosorción constituye una vía tecnológica útil para la biorremoción de metales tóxicos de aguas de desechos. ⁽¹⁾

Sin embargo, algunos microorganismos son capaces de resistir y reproducirse en ambientes con elevados contenidos de metales pesados. Esta capacidad puede ser aprovechada por el hombre para el desarrollo de procesos biotecnológicos y constituyen en la actualidad un reto para la comunidad científica, en su intento de mitigar al máximo el impacto ambiental que ocasionan los metales pesados. ⁽⁵⁾

Debido a que existe evidencia científica que demuestra que se logró aislar microorganismos en efluentes ricos con metales pesados y a su vez demuestran la capacidad de remoción de metales pesados de aguas contaminadas, es probable aislar microorganismos nativos de la poza de relaves del laboratorio de concentración de minerales de la UNSA, para su posterior uso como biorremediadores de los metales Plomo (II) y Cadmio (II).

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo diseñar y construir un sistema para la remoción de Plomo (II) y Cadmio (II) mediante el uso de microorganismos nativos aislados de la poza de relaves del laboratorio metalúrgico de la UNSA – Arequipa, con esto se pretende ofrecer una alternativa tecnológica de tratamiento de estos metales.

Objetivos

Objetivo general

Desarrollar y evaluar un sistema para la remoción de Plomo (II) y Cadmio (II), mediante la inmovilización de microorganismos nativos de la poza de relaves del laboratorio de concentración de minerales de la Universidad Nacional San Agustín - Arequipa.

Objetivos específicos

1. Recolectar y realizar un análisis fisicoquímico de la muestra obtenida de la poza de relaves del laboratorio de concentración de minerales de la UNSA.
2. Aislar y caracterizar microorganismos nativos de la poza de relaves del laboratorio de concentración de minerales de la UNSA.
3. Evaluar la cinética de crecimiento de las cepas fúngicas, aislados de la poza de relaves del laboratorio de concentración de minerales de la UNSA.
4. Seleccionar los microorganismos por la capacidad de remoción de Plomo (II) y Cadmio (II).
5. Evaluar la influencia de los parámetros de pH, temperatura, biomasa y concentración de metal en el proceso de remoción de Plomo (II) y Cadmio (II).
6. Diseñar y construir un sistema de remoción para los metales Plomo (II) y Cadmio (II) a nivel laboratorio.
7. Evaluar la eficiencia del sistema de remoción.

Capítulo II: Marco teórico

2.1. Contaminación del agua

El agua es la base de la vida en nuestro planeta por lo que si esta se ve dañada causa diversas enfermedades e incluso la muerte de personas y diversas especies que habitan en este medio. El concepto de contaminación del agua indica un estado cualitativo de impureza o suciedad de las aguas hidrológicas de una cierta región, tal como cuenca hidrográfica. Ello es consecuencia de una situación o un proceso que reduce la utilidad de las aguas de nuestro planeta, especialmente por sus efectos en la salud humana y el medio ambiente. ⁽⁶⁾

2.1.1. Origen de la contaminación de las aguas

Tantas actividades humanas como naturales pueden cambiar las características físicas, químicas, y biológicas del agua. La calidad de agua es afectada por cambios en las sustancias nutritivas, sedimentación, temperatura, pH, metales pesados, toxinas, pesticidas y factores biológicos, entre muchos otros factores.

Algunas fuentes de contaminación del agua son naturales. Por ejemplo, el mercurio que se encuentra naturalmente en la corteza de la tierra y en los océanos contamina la biosfera mucho más que los contaminantes procedentes de la actividad humana. Algo similar pasa con los hidrocarburos y con muchos otros productos. Normalmente las fuentes de contaminación natural son muy dispersas y no provocan concentraciones altas de polución, excepto en algunos lugares muy concretos. La contaminación de origen humano, se concentra en zonas concretas y para la mayor parte de los contaminantes, es mucho más peligrosa que la natural. ⁽⁷⁾

2.2. Metales pesados

Los metales pesados son un grupo de elementos de alta prioridad, debido a su alta toxicidad sobre la mayoría de los organismos, a su ubicuidad y a que se pueden bioacumular a través de las cadenas tróficas en ecosistemas acuáticos y terrestres. Los metales pesados tienen una densidad superior a 4,5 g/cm³, y aunque algunos son

esenciales en el metabolismo de los seres vivos, como el cobalto, cobre, hierro, manganeso, molibdeno, vanadio, estroncio, y zinc, en concentraciones muy elevadas éstos son demasiado tóxicos y pueden ocasionar daños irreversibles. Algunos otros como el Cadmio y el mercurio son muy tóxicos inclusive a concentraciones muy bajas. Los metales pesados además tienden a persistir en el ambiente, dada su resistencia a la degradación química o biológica ⁽⁸⁾. Uno de los mecanismos mediante el cual los metales llegan al ser humano se debe a que las plantas absorben el metal a través de la raíz y a su vez las especies animales lo hacen al alimentarse de aquellas ⁽⁹⁾

En cuerpos receptores de agua, los metales pueden originarse de fuentes naturales y/o antropogénicas. De los 59 elementos metálicos, 13 han sido incluidos en la lista de contaminantes prioritarios por la Environmental Protection Agency ⁽¹⁰⁾.

El aumento de la contaminación en las aguas superficiales y marinas se está convirtiendo en una amenaza de altas proporciones por la presencia de elevadas concentraciones de metales pesados como el Plomo, Cadmio, cromo y níquel ⁽¹¹⁾. Esta problemática se ha acrecentado debido al mal manejo de las descargas industriales y al ineficiente tratamiento que se les da a las mismas. Las enfermedades relacionadas con el agua contaminada son una tragedia humana que cada año cobra la vida de más de 5 millones de personas, de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud.

2.2.1. Fuentes de metales pesados

Los metales son algunos de los elementos abundantes en la corteza de la Tierra. Las fuentes de metales urbanas e industriales han sido identificadas como la causa principal de contaminación por metales tóxicos. Los orígenes de estos compuestos tóxicos son muy diversos. Las más obvias son las operaciones industriales como son las fundiciones, fábricas de acero, placas de metal, la elaboración y fabricación de metales, y de plantas mineras. Algunas de las industrias que generan aguas residuales contaminadas por metales pesados entre otros contaminantes son: azucarera, petrolera, cervecera, textil, celulosa y papel, acabados metálicos, cobre y sus aleaciones, curtiduría, alimenticias, hierro y acero. Estas fuentes son legalmente clasificadas como focos puntuales de

contaminación, aunque el escurrimiento de estos complejos es considerado como una fuente difusa. ⁽¹²⁾

Tabla 1.

Fuentes de elementos tóxicos. Extraído de Peterle 1991.

Elemento / Compuesto	Fuente
Arsénico	Minería, fundidoras, pesticidas.
Asbestos	Industria, cartón de yeso, aislamiento, talco.
Bario	Pruebas clínicas, pruebas de radiación.
Berilio	Industria, naturaleza, drenajes ácidos de minería.
Cadmio	Industria, minería, pesticidas.
Cromo	Industria.
Cobre	Industria.
Plomo	Minería, industria automovilística, pesticidas.
Manganeso	Minería.
Mercurio	Minería, fuentes naturales, preparación de semillas.
Níquel	Minería, polvo de óxido, sulfuros.
Selenio	Descargas agrícolas, minería.
Zinc	Industria.
Arsenicales	Arsenatos de Plomo.

2.2.2. Cadmio

Elemento químico cuyo símbolo es Cd, número atómico 48; tiene relación estrecha con el Zinc, con el que se encuentra asociado en la naturaleza. Es un metal dúctil, de color blanco argentino con un ligero matiz azulado. Es más blando y maleable que el Zinc, pero poco más duro que el Estaño. Peso atómico de 112.40 y densidad relativa de 8.65 a 20°C (68°F). Su punto de fusión de 320.9°C (610°F) y de ebullición de 765°C (1410°F) son inferiores a los del Zinc. Hay ocho isótopos estables en la naturaleza y se han descrito once radioisótopos inestables de tipo artificial. El Cadmio es miembro del grupo II b (Zinc, Cadmio y Mercurio) en la tabla periódica, y presenta propiedades químicas intermedias entre las del Zinc metálico en soluciones ácidas de sulfato. El Cadmio es divalente en todos sus compuestos estables y su ion es incoloro. ⁽¹⁸⁾ El Cadmio es uno de los metales más tóxicos encontrados en los efluentes vertidos de las industrias

metalúrgicas, galvanoplastia, minería y otras actividades industriales. Es no biodegradable y tiende a acumularse en los organismos vivos causando amenazas significativas para el medio ambiente y la salud. ⁽¹⁴⁾

Este metal no se encuentra fácilmente en la naturaleza como metal, pero sí en combinaciones minerales con otros elementos como oxígeno (óxido de Cadmio), cloruro (cloruro de Cadmio), sulfuro (sulfato de Cadmio), estos son solubles en agua. ⁽¹⁵⁾

El Cadmio se utiliza principalmente en la manufactura de pigmentos, baterías e industrias de plástico, así como derretidoras de Zinc, Plomo y Cobre. Generalmente se encuentra en depósitos de Zinc asociado a este metal. ⁽¹⁰⁾

En el año de 1947, en Japón, se encontraron 44 casos de enfermedades reumáticas, las cuales posteriormente desarrollaron deformaciones esqueléticas dolorosas, que estaban relacionadas con exposiciones continuas a altas concentraciones de Cadmio encontrado en el ambiente. El Cadmio afecta a los huesos provocando un dolor intenso. Está asociado con huesos débiles y puede causar malformaciones, especialmente en la espina. ⁽¹⁶⁾

Las personas fumadoras tienen un alto riesgo de exposición al Cadmio, tienen aproximadamente el doble de concentración de Cadmio en el cuerpo que las personas no fumadoras. ⁽¹⁷⁾

Se sabe que el Cadmio no es muy bien absorbido por el cuerpo, así como no es bien eliminado, es generalmente excretado por los riñones. Se ha encontrado una concentración de hasta 40 mg de Cadmio en el cuerpo humano, y se ha considerado un rango normal entre 2 ppm en pelo y 0.015 ppm en sangre. ⁽¹⁷⁾

No solamente el ser humano está en peligro de contaminación con metales pesados; existe un sin fin de organismos que están en contacto continuo con estos metales, lo que provoca un daño a estas especies que de uno u otro modo lo introducen en su organismo. Dichas especies van desde mamíferos, insectos, aves, plantas, peces, invertebrados marinos, líquenes, musgos, etc.

a. Efectos del Cadmio sobre la salud

El Cadmio puede ser encontrado mayoritariamente en la corteza terrestre. Este siempre ocurre en combinación con el Zinc. En las industrias como inevitable subproducto de las extracciones de Zinc, Plomo y Cobre. Después de ser aplicado este entra en el ambiente mayormente a través del suelo, porque es encontrado en abonos y pesticidas. ⁽¹⁸⁾

La toma por los humanos de Cadmio tiene lugar mayormente a través de la comida. Los alimentos que son ricos en Cadmio pueden en gran medida incrementar la concentración de Cadmio en los humanos. Ejemplos son patés, champiñones, mariscos, mejillones, cacao y algas secas. ⁽¹⁸⁾

Una exposición a niveles significativamente altas ocurren cuando la gente fuma. El humo del tabaco transporta el Cadmio a los pulmones. La sangre transportará el Cadmio al resto del cuerpo donde puede incrementar los efectos por potenciación del Cadmio que está ya presente por comer comida rico en Cadmio. Otra alta exposición puede ocurrir con gente que vive cerca de los vertederos de residuos peligrosos o fábricas que liberan Cadmio en el aire y gente que trabaja en las industrias de refinerías del metal. Cuando la gente respira el Cadmio este puede dañar severamente los pulmones. Esto puede incluso causar la muerte. El Cadmio primero es transportado hacia el hígado por la sangre. Allí es unido a proteínas para formar complejos que son transportados hacia los riñones. El Cadmio se acumula en los riñones, donde causa un daño en el mecanismo de filtración. Esto causa la excreción de proteínas esenciales y azúcares del cuerpo y el consecuente daño de los riñones. Lleva bastante tiempo para que el Cadmio acumulado en los riñones sea excretado del cuerpo humano. ⁽¹⁸⁾

Otros efectos sobre la salud que pueden ser causados por el Cadmio son:

- Diarreas, dolor de estómago y vómitos severos
- Fractura de huesos
- Fallos en la reproducción y posibilidad incluso de infertilidad

- Daño al sistema nervioso central
- Daño al sistema inmune
- Desordenes psicológicos
- Posible daño en el ADN o desarrollo de cáncer.⁽¹⁸⁾

b. Efectos ambientales del Cadmio

De forma natural grandes cantidades de Cadmio son liberadas al ambiente, sobre 25.000 toneladas al año. La mitad de este Cadmio es liberado en los ríos a través de la descomposición de rocas y algún Cadmio es liberado al aire a través de fuegos forestales y volcanes. El resto del Cadmio es liberado por las actividades humanas, como es la manufacturación.

Las aguas residuales con Cadmio procedentes de las industrias mayoritariamente terminan en suelos. Las causas de estas corrientes de residuos son por ejemplo la producción de Zinc, minerales de fosfato y las bioindustrias del estiércol. El Cadmio de las corrientes residuales puede también entrar en el aire a través de la quema de residuos urbanos y de la quema de combustibles fósiles. Debido a las regulaciones sólo una pequeña cantidad de Cadmio entra ahora en el agua a través del vertido de aguas residuales de casas o industrias. Otra fuente importante de emisión de Cadmio es la producción de fertilizantes fosfatados artificiales. Parte del Cadmio terminará en el suelo después de que el fertilizante es aplicado en las granjas y el resto del Cadmio terminará en las aguas superficiales cuando los residuos del fertilizante es vertido por las compañías productoras. ⁽¹⁸⁾

El Cadmio puede ser transportado a grandes distancias cuando es absorbido por el lodo. Este lodo rico en Cadmio puede contaminar las aguas superficiales y los suelos.

El Cadmio es fuertemente adsorbido por la materia orgánica del suelo. Cuando el Cadmio está presente en el suelo este puede ser extremadamente peligroso, y la toma a través del alimento puede incrementar. Los suelos que son ácidos aumentan la toma de

Cadmio por las plantas. Esto es un daño potencial para los animales que dependen de las plantas para sobrevivir. El Cadmio puede acumularse en sus cuerpos, especialmente cuando estos comen muchas plantas diferentes. Las vacas pueden tener grandes cantidades de Cadmio en sus riñones debido a esto. Las lombrices y otros animales esenciales para el suelo son extremadamente sensibles al envenenamiento por Cadmio. Pueden morir a muy bajas concentraciones y esto tiene consecuencias en la estructura del suelo. Cuando las concentraciones de Cadmio en el suelo son altas esto puede influir en los procesos del suelo de microorganismos y amenazar a todo el ecosistema del suelo. (18)

En ecosistemas acuáticos el Cadmio puede bioacumularse en mejillones, ostras, gambas, langostas y peces. La susceptibilidad al Cadmio puede variar ampliamente entre organismos acuáticos. Organismos de agua salada se sabe que son más resistentes al envenenamiento por Cadmio que organismos de agua dulce. Animales que comen o beben Cadmio algunas veces tienen la presión sanguínea alta, daños del hígado y daños en nervios y el cerebro (18). Por otro lado, la toxicidad de Cadmio es ampliamente conocida por la destrucción de sitios enzimáticos activos y alteraciones del sistema nervioso en seres humanos, incluso a bajas concentraciones (19)

2.2.3. Plomo

Elemento químico cuyo símbolo es Pb, número atómico 82 y peso atómico 207.19. El Plomo es un metal pesado (densidad relativa, o gravedad específica, de 11.4 a 16°C (61°F)), de color azulado, que se empaña para adquirir un color gris mate. Es flexible, inelástico, se funde con facilidad, se funde a 327.4°C (621.3°F) y hierve a 1725°C (3164°F). Las valencias químicas normales son 2 y 4. Es relativamente resistente al ataque de los ácidos sulfúrico y clorhídrico. Pero se disuelve con lentitud en ácido nítrico. El Plomo es anfótero, ya que forma sales de Plomo de los ácidos, así como sales metálicas del ácido plúmbico. El Plomo forma muchas sales, óxidos y compuestos organometálicos. (13)

Industrialmente, sus compuestos más importantes son los óxidos de Plomo y el tetraetilo de Plomo. El Plomo forma aleaciones con muchos metales y, en general, se emplea en esta forma en la mayor parte de sus aplicaciones. Todas las aleaciones formadas con Estaño, Cobre, Arsénico, Antimonio, Bismuto, Cadmio y Sodio tienen importancia industrial. Los compuestos del Plomo son tóxicos y han producido envenenamiento de trabajadores por su uso inadecuado y por una exposición excesiva a los mismos. Sin embargo, en la actualidad el envenenamiento por Plomo es raro en virtud a la aplicación industrial de controles modernos, tanto de higiene como relacionados con la ingeniería. El mayor peligro proviene de la inhalación de vapor o de polvo. En el caso de los compuestos organoplúmbicos, la absorción a través de la piel puede llegar a ser significativa. Algunos de los síntomas de envenenamiento por Plomo son dolores de cabeza, vértigo e insomnio. En los casos agudos, por lo común se presenta estupor, el cual progresa hasta el coma y termina en la muerte. El control médico de los empleados que se encuentren relacionados con el uso de Plomo comprende pruebas clínicas de los niveles de este elemento en la sangre y en la orina. Con un control de este tipo y la aplicación apropiada de control de ingeniería, el envenenamiento industrial causado por el Plomo puede evitarse por completo.⁽¹³⁾

a. Efectos del Plomo sobre la salud

El Plomo es un metal blando que ha sido conocido a través de los años por muchas aplicaciones. Este ha sido usado ampliamente desde el 5000 antes de Cristo para aplicaciones en productos metálicos, cables y tuberías, pero también en pinturas y pesticidas. El Plomo es uno de los cuatro metales que tienen un mayor efecto dañino sobre la salud humana. Este puede entrar en el cuerpo humano a través de los alimentos (65%), agua (20%) y aire (15%). Los alimentos como frutas, vegetales, carnes, granos, mariscos, refrescos y vino pueden contener cantidades significantes de Plomo. El humo de los cigarrillos también contiene pequeñas cantidades de Plomo.

El Plomo puede entrar en el agua potable a través de la corrosión de las tuberías. Esto es más común que ocurra cuando el agua es ligeramente ácida. El Plomo no cumple

ninguna función esencial en el cuerpo humano, este puede principalmente hacer daño después de ser tomado en la comida, aire o agua. ⁽¹³⁾

El Plomo puede causar varios efectos no deseados, como son:

- Perturbación de la biosíntesis de hemoglobina y anemia
- Incremento de la presión sanguínea
- Daño a los riñones
- Abortos y abortos sutiles
- Perturbación del sistema nervioso
- Daño al cerebro
- Disminución de la fertilidad del hombre a través del daño en el espermatozoides
- Disminución de las habilidades de aprendizaje de los niños
- Perturbación en el comportamiento de los niños, como es agresión, comportamiento impulsivo e hipersensibilidad.

El Plomo puede entrar en el feto a través de la placenta de la madre. Debido a esto puede causar serios daños al sistema nervioso y al cerebro de los niños por nacer. ⁽¹³⁾

b. Efectos ambientales del Plomo

El Plomo ocurre de forma natural en el ambiente, pero las mayores concentraciones que son encontradas en el ambiente son el resultado de las actividades humanas. Debido a la adición del Plomo en gasolinas un ciclo no natural del Plomo tiene lugar, en los motores de los coches el Plomo es quemado, eso genera sales de Plomo (cloruros, bromuros, óxidos). Estas sales de Plomo entran en el ambiente a través de los tubos de escape de los coches. Las partículas grandes precipitarán en el suelo o la superficie de aguas, las pequeñas partículas viajarán largas distancias a través del aire y permanecerán en la atmósfera. Parte de este Plomo caerá de nuevo sobre la tierra cuando llueva. Este ciclo

del Plomo causado por la producción humana está mucho más extendido que el ciclo natural del Plomo. Este ha causado contaminación por Plomo haciéndolo en un tema mundial no sólo la gasolina con Plomo causa concentración de Plomo en el ambiente. Otras actividades humanas, como la combustión del petróleo, procesos industriales, combustión de residuos sólidos, también contribuyen. ⁽¹³⁾

El Plomo puede terminar en el agua y suelos a través de la corrosión de las tuberías de Plomo en los sistemas de transportes y a través de la corrosión de pinturas que contienen Plomo. No puede ser roto, pero puede convertirse en otros compuestos.

El Plomo se acumula en los cuerpos de los organismos acuáticos y organismos del suelo. Estos experimentarán efectos en su salud por envenenamiento por Plomo. Los efectos sobre la salud de los crustáceos pueden tener lugar incluso cuando sólo hay pequeñas concentraciones de Plomo presente.

Las funciones en el fitoplancton pueden ser perturbados cuando interfiere con el Plomo. El fitoplancton es una fuente importante de producción de oxígeno en mares y grandes animales marinos lo comen. Este es el porqué usted ahora empezara a preguntarse si la contaminación por Plomo puede influir en los balances globales. Las funciones del suelo son perturbadas por la intervención del Plomo, especialmente cerca de las autopistas y tierras de cultivos, donde concentraciones extremas pueden estar presentes. Los organismos del suelo también sufren envenenamiento por Plomo. El Plomo es un elemento químico particularmente peligroso, y se puede acumular en organismos individuales, pero también entrar en las cadenas alimenticias. ⁽¹³⁾

2.3.Marco legal

Existen decretos supremos del estado, donde dan a conocer los límites máximos permisibles (LMP), tanto para descargas de aguas residuales, mineras etc.

En la siguiente tabla se da conocer los Límites Máximos Permisibles para la descarga de efluentes líquidos de actividades Minero – Metalúrgico según el decreto supremo N° 010 -2010-MINAM ⁽²⁰⁾

Tabla 2.

Límites máximos permisibles para la descarga de efluentes líquidos de actividades minero-metalúrgicas. Extraído de decreto supremo N° 010-2010-MINAM.

Parámetro	Unidad	Límite en cualquier momento	Límite para el promedio anual
pH		6-9	6-9
Sólidos totales en suspensión	mg/L	50	25
Aceites y grasas	mg/L	20	16
Cianuro total	mg/L	1	0.8
Arsénico total	mg/L	0.1	0.08
Cadmio total	mg/L	0.05	0.04
Cromo hexavalente*	mg/L	0.1	0.08
Cobre total	mg/L	0.5	0.4
Hierro (Disuelto)	mg/L	2	1.6
Plomo total	mg/L	0.2	0.16
Mercurio total	mg/L	0.002	0.0016
Zinc total	mg/L	1.5	1.2

*En muestra no filtrada

Los estándares nacionales de calidad ambiental para agua según el decreto supremo N° 002-2008-MINAM, con el objetivo de establecer el nivel de concentración o le grado de elementos, sustancias o parámetros físicos, químicos y biológicos presentes en el agua, en su condición de cuerpo receptor y componente básico de los ecosistemas acuáticos, que no representa riesgo significativo para la salud de las personas ni para el ambiente ⁽²⁾. En la categoría 3 que corresponde a riego de vegetales y bebidas de animales refiere en cuanto a inorgánicos.

Dado que en muchas ciudades el agua de riego de los cultivos es con agua de río, de ahí la importancia de conocer los niveles de aceptación, ya que estos podrían acumularse en los cultivos.

Tabla 3.

Parámetros para riego de vegetales de tallo bajo y tallo alto. Extraído de decreto supremo N° 002-2008-MINAM.

Parámetros	Unidad	Valor
Aluminio	mg/L	5
Arsénico	mg/L	0.05
Bario total	mg/L	0.7
Boro	mg/L	0.5-6
Cadmio	mg/L	0.005
Cianuro Wad	mg/L	0.1
Cobalto	mg/L	0.05
Cobre	mg/L	0.2
Cromo(+6)	mg/L	0.1
Hierro	mg/L	1
Litio	mg/L	2.5
Magnesio	mg/L	150
Manganeso	mg/L	0.2
Mercurio	mg/L	0.001
Níquel	mg/L	0.2
Plata	mg/L	0.05
Plomo	mg/L	0.05
Selenio	mg/L	0.05
Zinc	mg/L	2

2.4. Biorremediación de metales pesados

Biorremediación es el proceso por el cual los organismos vivos son empleados para la descontaminación efectiva de un sistema contaminado. Dicho proceso explota la diversidad genética y la versatilidad metabólica de los microorganismos para transformar contaminantes en productos finales menos tóxicos, los cuales son integrados en los ciclos biogeoquímicos naturales o de acumularlos en su biomasa reduciendo la concentración del contaminante en el medio ⁽²¹⁾.

Uno de los mayores problemas ambientales es la acumulación de metales pesados en los ecosistemas producto de desechos industriales mal tratados y su tratamiento a través de técnicas de biorremediación es una alternativa eficiente y rentable ^(22, 23).

A diferencia de otras tecnologías convencionales, como por ejemplo la incineración, la biorremediación se puede llevar a cabo en el lugar mismo del problema y aunque el número de compuestos tóxicos que esta tecnología puede manejar es limitado, es costo-efectiva cuando aplica, además según la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), la biorremediación y la fitorremediación son las técnicas de control de contaminación más económicas disponibles hoy día ⁽²⁴⁾. El rol de los microorganismos es fundamental en los ciclos biogeoquímicos de los metales y su utilización en los procesos de biorremediación de desechos sólidos y líquidos es esencial para el cuidado del medio ambiente. Dentro de la amplia diversidad microbiana, existen microorganismos resistentes y/o tolerantes que son de particular interés como captores de metales en sitios contaminados, debido a que ambos pueden extraer los contaminantes y participar en el proceso de biorremediación ⁽²⁵⁾.

Los microorganismos pueden transformar los metales de dos formas, una es la movilización del metal en la que se hace pasar de un estado insoluble inicial a otro soluble final, proceso conocido también como lixiviación microbiana. La otra forma de transformación es la inmovilización del metal, es decir, el paso de un estado soluble inicial a uno insoluble final en fase sólida, y existen diferentes mecanismos que utilizan los microorganismos para lograr la inmovilización del metal, como la biosorción, bioacumulación, biomineralización, biotransformación y quimiosorción ⁽²⁶⁾.

En estudios extensivos acerca de la utilización de biomasa microbiana como bioabsorbentes para la remoción de metales pesados, se han investigado las capacidades de remoción de varias especies de bacterias, algas, hongos y levaduras ⁽²⁷⁾ y se ha visto que los mecanismos como intercambio de ion, quelación, adsorción y difusión que son los que participan en este tipo de procesos, difieren de las especies utilizadas, el origen y el procesamiento de la biomasa y solución química.

La biosorción es un fenómeno ampliamente estudiado en la biorremediación de diversos metales pesados como el Cadmio, cromo, Plomo, níquel, zinc y cobre^(28,29). Consiste en la incorporación del metal a las células de manera pasiva (independiente de energía), mediante interacción química con componentes de la pared celular⁽³⁰⁾.

La biomasa capaz de participar en estos procesos puede ser fácilmente extraíble de sistemas acuosos como cursos de aguas o efluentes de diversos orígenes, por lo que el proceso global de biorremediación sería rentable. Es por ello que la búsqueda de este tipo de microorganismos se encuentra en crecimiento constante, junto con el estudio de sistemas biosorbentes como por ejemplo la utilización de consorcios microbianos, o sistemas mixtos formados por microorganismos y macromoléculas (polímeros) sorbentes, que incrementarían los rendimientos en la captación de mezclas de metales pesados.⁽³¹⁾

La bioacumulación es otro mecanismo conocido que involucra un sistema de transporte de membrana que internaliza al metal pesado presente en el entorno celular con gasto de energía. Una vez incorporado el metal pesado al citoplasma, éste es secuestrado por la presencia de proteínas ricas en grupos sulfhidrilos llamadas metalotioneínas o también puede ser compartimentalizado dentro de una vacuola, como ocurre en hongos. La biotransformación es un proceso que involucra un cambio químico sobre el metal pesado, como por ejemplo en el estado de oxidación o metilación mediada por enzimas microbianas, puede dar como resultado compuestos poco solubles en agua o bien compuestos volátiles⁽²⁶⁾.

Una especie de *Pseudomona sp.* tiene la capacidad de reducir cromato en su forma tóxica (Cr IV) a su forma insoluble Cr (III), en concentraciones de hasta 520 mg de Cr (IV), bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas y en presencia de cobre y arsenato. Además bajo condiciones anaeróbicas es capaz de reducir Cobre (III) y Uranio (VI)⁽⁶⁸⁾.

Cuando en un sistema biológico existe contaminación con metales pesados, las alternativas de biorremediación se reducen a movilización e inmovilización. Ello depende de las características hidrogeológicas del sitio, las propiedades químicas del

metal contaminante, la geoquímica del suelo, así como el uso actual y futuro del suelo contaminado. ⁽³²⁾

Generalmente es más fácil inmovilizar un metal que movilizarlo y posteriormente recuperarlo. Sin embargo, un metal inmovilizado puede ser posteriormente una fuente de contaminación si las condiciones del suelo llegaran a cambiar. El proceso de movilización de un metal generalmente se utiliza para condiciones extremas y posterior al tratamiento se requiere una biorremediación in situ para degradar las concentraciones residuales de los componentes restantes. Una técnica es la metilación utilizando microorganismos como metanobacterias. Aunque las formas metiladas de algunos metales, como arsénico, selenio y telurio son extremadamente tóxicas. ⁽³³⁾

Los metales, a diferencia de los compuestos orgánicos, no pueden ser degradados, y por tanto la mayor parte de la remediación biológica de estos, consiste en la detoxificación e inmovilización del metal, reduciendo de este modo su toxicidad biológica y retardando el transporte de estos en el ambiente ⁽³³⁾.

Existen distintas técnicas de inmovilización de metales pesados ⁽³²⁾, entre los que se encuentran:

- a. **Activas.-** Este tipo de mecanismos opera directamente con el metal.
 - Precipitación.- Como ejemplo, puede haber formación de sulfuros insolubles de ciertos metales, a partir de metales solubles, precipitando dichos sulfuros.
 - Acumulación intracelular.- En este proceso ocurren dos pasos: primero existe una unión pasiva de los iones metálicos a la superficie de la pared celular por procesos físicos o químicos. Posteriormente estos iones son transportados al interior de la célula por sistemas energéticos microbianos.
 - Oxidación y reducción.- Existen distintas reacciones redox de metales que son mediadas por microorganismos.

b. Pasivas

- Formación de quelatos extracelulares.- La formación de quelatos ocurre a partir de interacciones de metales con polímeros extracelulares, como pueden ser proteínas y ácidos nucleicos, que son excretados por las bacterias o bien de materia orgánica acumulada a partir de microorganismos muertos. Las bacterias autóctonas pueden ser estimuladas para producción de polisacáridos extracelulares.
- Biosorción a la superficie celular.- Uno de los mecanismos se lleva a cabo por reacciones de intercambio iónico con peptidoglicanos y ácido teicoicos, que son componentes bioquímicos importantes en la pared celular. Las bacterias Gram +, especialmente especies del género *Bacillus*, tienen una alta capacidad de adsorción debido a la concentración tan alta de péptido glicano y ácido teicoicos existente en su pared celular. Debido a su bajo contenido de estos componentes en las paredes celulares de las bacterias Gram -, exhiben poca capacidad de adsorción metálica.
- Destrucción de complejos ligandos.- Algunos metales que están asociados con procesos de minería e industrias nucleares, son secretados al medio como complejos con ligandos orgánicos. Estos pueden ser biodegradados, destruyendo los ligandos e inmovilizando el metal.

2.4.1. Bioacumulación y bioadsorción

A partir de la década de los ochentas se empezaron a demostrar las capacidades que tienen varios microorganismos para remover grandes cantidades de metales pesados de efluentes líquidos. Estas capacidades han sido estudiadas con la finalidad de desarrollar nuevos sistemas de tratamiento que puedan reemplazar de una manera eficiente a los métodos de tratamiento convencionales.

El proceso de biosorción puede ser definido como la captación de contaminantes (metales pesados en este caso) desde una solución acuosa por un material biológico a

través de mecanismos fisicoquímicos o metabólicos ⁽³⁴⁾. Como los metales pesados pueden llegar a tener efectos letales en la biomasa viva, ésta tiene la capacidad de poner en funcionamiento ciertos mecanismos para contrarrestar los efectos tóxicos de los metales. Los dos mecanismos diferenciados para la captación de los metales pesados por parte de la biomasa son:

a. Bioacumulación

Basada en la absorción de las especies metálicas mediante los mecanismos de acumulación al interior de las células de biomasa vivas

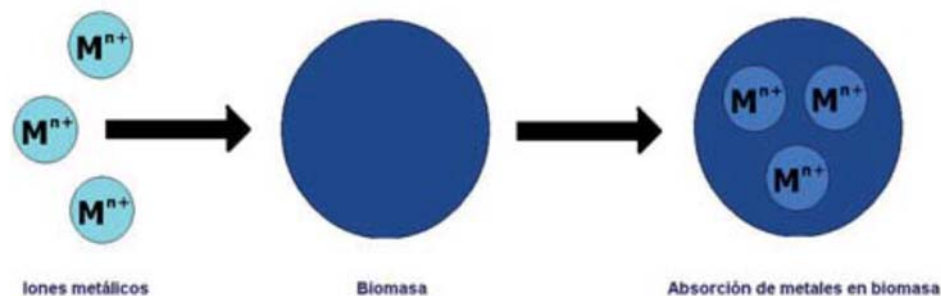


Figura 1. Bioacumulación de metales pesados. Extraído de Reyes et-al, 2006.

b. Bioadsorción

Basada en la adsorción de los iones en la superficie de la célula. El fenómeno puede ocurrir por intercambio iónico, precipitación, complejación o atracción electrostática. La Bioadsorción es un proceso en el que las biomasa, vivas o muertas, secuestran o enlazan sobre la superficie celular iones metálicos que se encuentran en soluciones; inmovilizándolos mediante procesos fisicoquímicos como la adsorción y el intercambio iónico. Este proceso se fundamenta, principalmente, en que los iones metálicos se enlazan por interacciones iónicas a los distintos grupos funcionales, que se encuentran en las paredes celulares de las biomasa, formando compuestos estables.

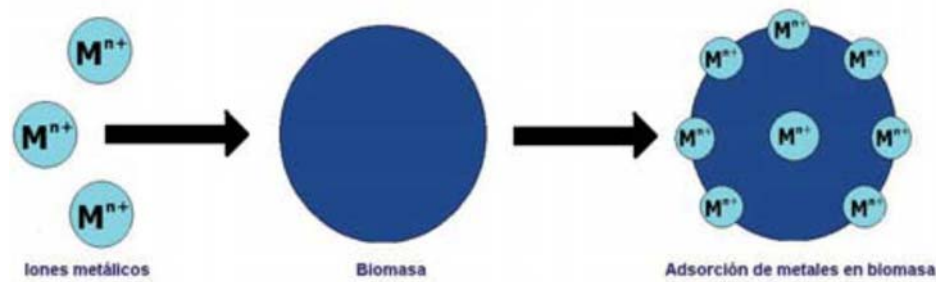


Figura 2. Bioadsorción de metales pesados. Extraído de Reyes et-al, 2006.

Los microorganismos asimilan y concentran nutrientes catiónicos presentes en medios acuosos y emplean estos mismos mecanismos para la concentración de metales y radionucleidos. El proceso de bioacumulación tiene lugar cuando la energía metabólica se emplea para la asimilación de los componentes inorgánicos. La asimilación que no requiere esta energía se refiere al proceso conocido como bioadsorción, proceso que generalmente requiere de la complejación de los elementos inorgánicos, por ligandos o grupos funcionales, de la pared exterior de la célula. Cuando por el contrario, los microorganismos retienen internamente estos metales es por complejación con diversos ligandos citoplasmáticos como los polifosfatos o las proteínas.

Las posibilidades de este tipo de procesos sobre un gran número de cationes y radionucleidos utilizando bacterias, hongos y algas se han puesto de manifiesto frecuentemente. Los microorganismos también pueden ser selectivos con distintos contaminantes inorgánicos y en algunos casos esta selectividad puede ser aún mayor que la presentada por compuestos químicos sintéticos.

Los mecanismos de bioacumulación o Bioadsorción suelen estar controlados por la preferencia de los metales por las distintas posiciones de enlace con los ligandos, por ejemplo el Cd^{2+} puede ser complejado por polifosfatos o por proteínas, presentes en el citoplasma, que contienen azufre, el metal puede precipitarse en el exterior de la célula como un fosfato de Cadmio o como un sulfuro de Cadmio. Esta precipitación tiene lugar porque el fósforo y el azufre son ligandos afines por el Cd^{2+} que es un ácido débil ⁽³⁵⁾. Además de las paredes celulares, otros materiales extracelulares pueden dar lugar a la Bioadsorción de metales, algunos microorganismos producen polímeros en el exterior de

la célula. Estos exopolímeros pueden adsorber metales o radionucleidos de distintos medios y tienen una naturaleza ácida con distintos grupos funcionales que son los responsables de la coordinación con la especie inorgánica. La producción de los exopolímeros puede ser controlada con las condiciones de cultivo, incluyendo la fuente de obtención de carbono y nitrógeno y la presencia o ausencia de iones nutrientes o contaminantes.

Como se ha mencionado, los metales se pueden inmovilizar mediante la precipitación en la pared celular de determinados compuestos. Además del caso del Cd; otro elemento altamente tóxico, como el uranio, puede ser precipitado como un fosfato de uranio mediante el empleo de estos biosistemas generadores de fosfato, los cuales se han usado también en el tratamiento de efluentes que contienen otros metales pesados. ⁽³⁵⁾

Las biomásas utilizadas en los procesos de biosorción son: microorganismos (bacterias, microalgas y hongos), vegetales macroscópicos (algas, Gramíneas) y partes o tejidos específicos de vegetales (cáscaras, bagazos, semillas) encontrados en residuos de la agricultura y procesos de fermentación de larga escala. Una gran variedad de biomásas, tienen mecanismos específicos de resistencias al efecto de metales tóxicos, lo que les concede la capacidad de sobrevivir y crecer en ambientes contaminados.

Cabe mencionar, que la temperatura, el pH, la fuerza iónica, la presencia de otros metales y los sitios de unión, son los principales factores que afectan la operatividad de dicho proceso. ^(34,36)

Para la fijación de metales pesados en la bioadsorción se ha sugerido una serie de mecanismos que explica la retención o secuestro del metal en diferentes partes del biosorbente. Así, puede ocurrir vía:

c. Complejación o quelación

El metal se une a los centros activos de la pared celular mediante enlaces químicos formando determinados complejos.

d. Adsorción física

Se incluyen aquí los fenómenos asociados a fuerzas de Van der Waals. En este caso la biosorción es rápida y reversible.

e. Intercambio iónico

Propio de los iones metálicos divalentes que se intercambian con iones propios de los polisacáridos presentes en la biomasa. El proceso también es rápido y reversible.

f. Precipitación

El mecanismo está asociado a la formación de un complejo en la pared celular que posteriormente es hidrolizado. ⁽³⁶⁾

Generalmente, se considera que en la biosorción de metales pesados puede aparecer simultáneamente más de uno de los mecanismos señalados, siendo, en algunos casos, muy difícil de explicar el o los mecanismos que tienen lugar en un proceso de biosorción determinado. Los iones metálicos pueden reaccionar con las células para formar un precipitado estable o bien formar un coloide que es fijado por los polímeros extracelulares. ⁽³⁶⁾

2.5. Columnas de adsorción

En general, si bien es cierto que las experiencias realizadas bajo sistemas batch entregan información importante respecto a las características de equilibrio y a la cinética de adsorción, este tipo de operación no es económica ni viable de llevar a la práctica a escala industrial. Es por esta razón que los datos obtenidos en sistemas de columnas son considerados como esenciales para el diseño de adsorbedores industriales.

En la adsorción en columnas de lecho fijo las concentraciones en la fase fluida y en la fase sólida varían con el tiempo y con la posición en el lecho. Cuando el agua residual fluye a través de la columna el contaminante, en este caso el metal pesado, se separa gradualmente a medida que el agua residual desciende a través de la columna.

Al inicio de la operación de una columna, la mayor parte de la transferencia de materia tiene lugar cerca de la entrada de la columna, donde el fluido se pone en contacto con el adsorbente fresco. A medida que transcurre el tiempo, el sólido próximo a la entrada se encuentra prácticamente saturado y la mayor parte de la transferencia de materia tiene lugar lejos de la entrada. La región donde ocurre la mayor parte del cambio de concentración es la llamada zona de transferencia de materia, esta zona separa la zona virgen del adsorbente de la zona de saturación. A medida que transcurre el tiempo de operación de la columna, la zona de transferencia de materia se traslada en el lecho hasta alcanzar su extremo inferior.

El tiempo transcurrido desde el comienzo de la operación en el lecho hasta que el contaminante aparece en la corriente de salida o más concretamente, cuando se alcanza la máxima concentración permisible en el efluente, se denomina tiempo de ruptura. La curva que representa la evolución de la concentración del efluente que abandona el lecho recibe el nombre de curva de ruptura. ⁽³⁷⁾

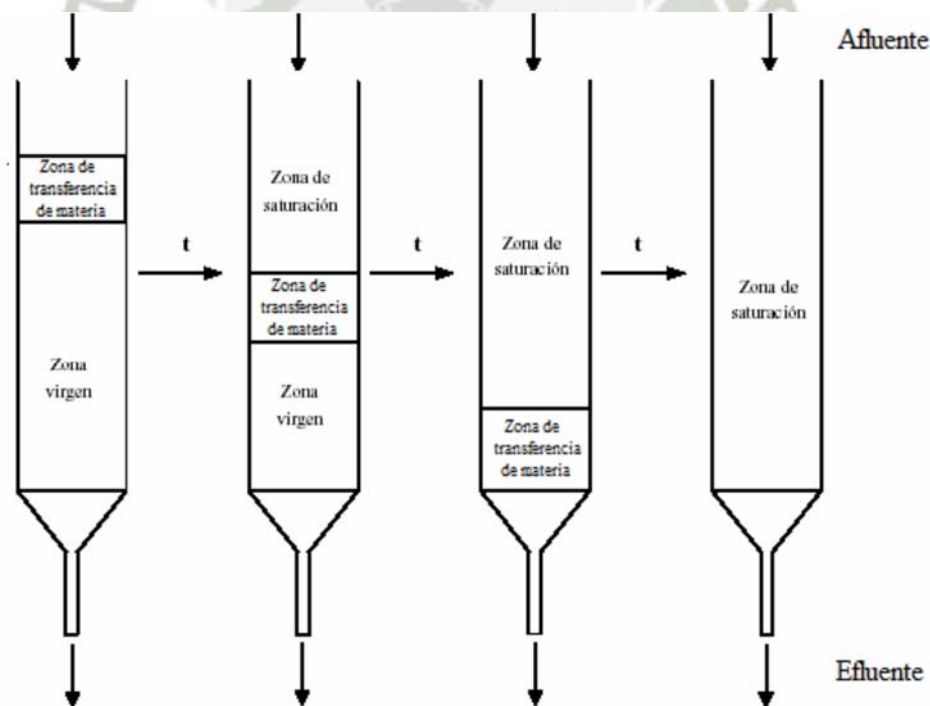


Figura 3. Evolución de la concentración del contaminante en una columna de Adsorción. .
Extraído de Gilarranz, 2007.

Las columnas de adsorción es uno de los procesos más comunes usados en la remoción de metales.

2.6. Microorganismos

Dentro de los microorganismos que tienen la capacidad de remover metales están los hongos.

2.6.1. *Rhizopus spp.*

Rhizopus es un género de mohos que incluyen especies cosmopolitas de hongos filamentosos hallados en el suelo, degradando frutos y vegetales, heces animales, y residuos.

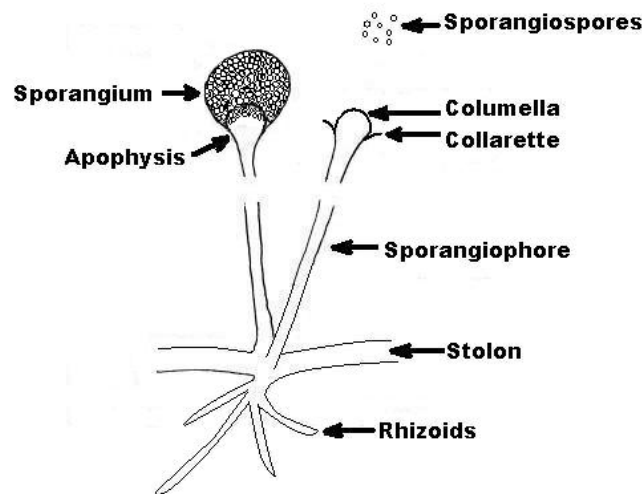


Figura 4. Diagrama esquemático de *Rhizopus spp.*

Las especies de *Rhizopus* producen esporas asexuales y sexuales. Las esporangiosporas asexuales se producen dentro de una estructura aguzada, el esporangium, y son genéticamente idénticas a su padre. En *Rhizopus*, el esporangio es soportado por una gran columela apofisada, y el esporangióforo asoma entre rizpodes distintos. Zigosporas negras se producen después de dos fusiones compatibles de micelios durante

la reproducción sexual. Y hacen colonias que pueden ser genéticamente diferentes de sus padres.

Algunas *spp.* de *Rhizopus* son agentes oportunistas de zigomicosis humana. Pueden causar serias (y con frecuencia mortales) infecciones en humanos y en animales debido a su rápido crecimiento a relativamente altas temperaturas. Algunas especies son patógenos vegetales. Dos son usados en fermentación: *Rhizopus oligosporus*, en la producción de tempeh, un alimento fermentado derivado de grano de soja; *R. oryzae* se usa en la producción de bebidas alcohólicas, en partes de Asia y de África. Hongo filamentoso que presenta esporangióforos sin ramificar (de hasta 2 mm x 20 µm), de color pardo oscuro que nacen de un gran nudo de rizoides bien desarrollados. Esporangios esféricos negros (de hasta 275 µm de diámetro) con columela. Esporangiosporas negras de 8 a 15 µm. Abundantes rizoides y zigosporas esféricas de pared gruesa, desnuda (de hasta 200 µm de diámetro). Clamidosporas ausentes. Colonias de crecimiento rápido (cubren prácticamente toda la superficie de la placa en tres días a 25 °C) de aspecto consistente, con denso micelio aéreo, algodonosas, al principio blancas, después gris oscuras (micelio rojizo, grisáceo o marrón). Se reconoce fácilmente por sus esporos hialinos o parduzcos, sus rizoides numerosos y pardos y sus esporangios negros y lustrosos (brillantes).

Las especies de *Rhizopus* son contaminantes comunes, pero son causales de infecciones oportunistas en los humanos. Algunas especies son patógenos de las plantas. Las especies más frecuentes son *Rhizopus oryzae*, *R. rizopodimorfis*, *R. stolonifer*, *R. microsporas* y *R. nigricans*.⁽³⁸⁾

En la figura 5, se aprecian colonias algodonosas laxas, que cubre completamente la caja de Petri y logra empujar la tapa hacia arriba. Inicia de color blanco y se torna gris con puntos negros que corresponden a las esporangias.



Figura 5. *Rhizopus* cultivado en Agar Sabouraud dextrosa. Extraído de Universidad de Antioquia.



Figura 6. Morfología microscópica de un cultivo de *Rhizopus spp.* Extraído de Universidad de Antioquia.

En la figura 6, se aprecia hifas gruesas y aseptadas. Esporangia destruida que permite la liberación de las esporangiosporas. Al romperse la columnela colapsa y adquiere una forma similar a un sombrero chino o una sombrilla.

2.6.2. *Aspergillus spp*

Los mohos del género *Aspergillus* causan el deterioro de muchos productos alimenticios. Los productos metabólicos de la invasión fúngica suelen ser muy tóxicos, tanto para el hombre como para otros animales. También producen la inhibición de la germinación junto con cambios de color, calentamiento, amohosado, apelmazado y finalmente

podredumbre de las semillas. Algunas especies, por ejemplo *A. niger* o *A. oryzae*, son de interés industrial o se emplean en la fermentación de alimentos en ciertas regiones

a. Morfología

El color es la principal característica macroscópica para la identificación de los grupos de aspergilos. Poseen distintos tonos de verde, pardo, amarillo, blanco, gris y negro. Las cabezas conidiales presentan bajo el microscopio cuatro formas básicas: globosa, radiada, columnar o claviforme y a simple vista las más grandes suelen parecer diminutas alfileres sobre el substrato.

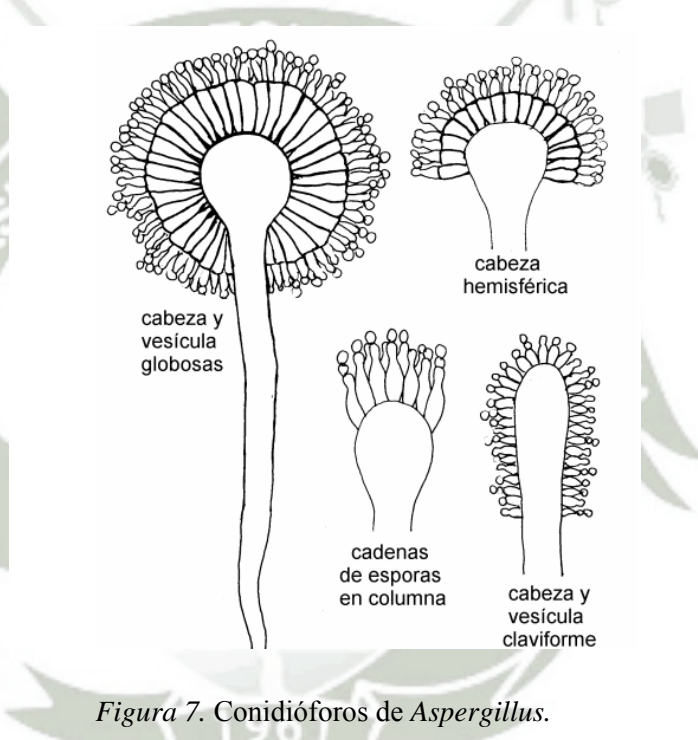


Figura 7. Conidióforos de *Aspergillus*.

En los aspergilos, los conidios constituyen cadenas que se originan en la célula conidiógena o fiálide. En algunos aspergilos hay células adyacentes a las fiálides denominadas métulas o células de soporte. Los *Aspergillus* poseen una o dos series de células sobre la vesícula, o bien presentan simultáneamente cabezas de ambos tipos.

Los teleomorfos poseen meiosporos en ascos que pueden producirse en racimos desnudos o dentro de ascomas. Éstos tienen una pared formada por hifas sueltas, un plecténquima o un tejido estromático. La ornamentación superficial de las ascosporas

que se observa con el microscopio electrónico de barrido, es una de las características más fidedignas para la identificación de las especies. ⁽³⁹⁾



Figura 8. Cultivo de *Aspergillus niger* en Agar Sabouraud. Extraído de Universidad de Antioquia.

Descripción: Colonias blancas con micelio aéreo de color negro.



Figura 9. Morfología microscópica a partir de cultivo de *Aspergillus niger*. Extraído de Universidad de Antioquia

Descripción: Conidióforo de pared delgada, pigmentado. Vesícula subsférica. Cabezuelas radiadas, biseriadas. Conidias cafés, esféricas. ⁽⁴⁰⁾

2.7. Espectrofotometría de absorción atómica

La espectroscopia de absorción atómica (EAA), tiene como fundamento la absorción de radiación de una longitud de onda determinada. Esta radiación es absorbida selectivamente por átomos que tengan niveles energéticos cuya diferencia en energía corresponda en valor a la energía de los fotones incidentes. La cantidad de fotones absorbidos, está determinada por la ley de Beer, que relaciona ésta pérdida de poder radiante, con la concentración de la especie absorbente y con el espesor de la celda o recipiente que contiene los átomos absorbedores.

Los componentes instrumentales de un equipo de espectrofotometría de absorción atómica son los similares a los de un fotómetro o espectrofotómetro de flama, excepto que en EAA se requiere de una fuente de radiación necesaria para excitar los átomos del analito. Estos componentes se representan en la Figura N°10.

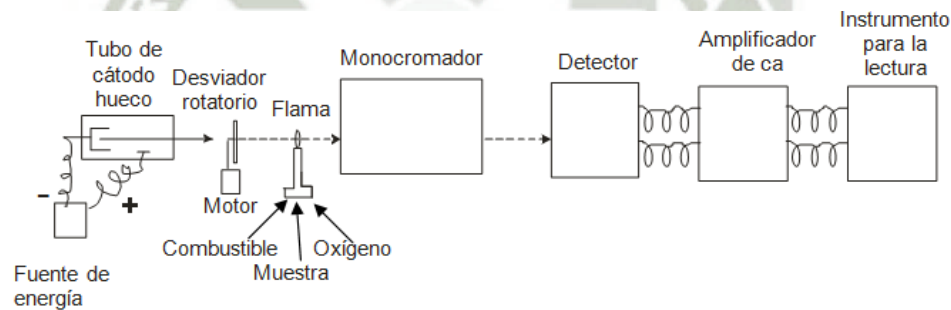


Figura 10. Componentes de un espectrofotómetro de absorción atómica.

La instrumentación de un Espectrómetro de Absorción Atómica se puede resumir en las siguientes partes:

- 1.- Sistema de excitación
- 2.- Sistema de nebulización y atomización
- 3.- Sistema de aislamiento espectral
- 4.- Sistema de detección

2.7.1. Componentes de un espectrofotómetro de absorción atómica

- 1) Una fuente de radiación que emita una línea específica correspondiente a la necesaria para efectuar una transición en los átomos del elemento analizado.
- 2) Un nebulizador, que por aspiración de la muestra líquida, forme pequeñas gotas para una atomización más eficiente.
- 3) Un Quemador, en el cual por efecto de la temperatura alcanzada en la combustión y por la reacción de combustión misma, se favorezca la formación de átomos a partir de los componentes en solución.
- 4) Un sistema óptico que separe la radiación de longitud de onda de interés, de todas las demás radiaciones que entran a dicho sistema.
- 5) Un detector o transductor, que sea capaz de transformar, en relación proporcional, las señales de intensidad de radiación electromagnética, en señales eléctricas o de intensidad de corriente.
- 6) Un amplificador o sistema electrónico, que como su nombre lo indica amplifica la señal eléctrica producida, para que en el siguiente paso pueda ser procesada con circuitos y sistemas electrónicos comunes.
- 7) Por último, se requiere de un sistema de lectura en el cual la señal de intensidad de corriente, sea convertida a una señal que el operario pueda interpretar (ejemplo: transmitancia o absorbancia). Este sistema de lectura, puede ser una escala de aguja, una escala de dígitos, un graficador, una serie de datos que pueden ser procesados a su vez por una computadora, etc.

La EAA en flama es a la fecha la técnica más ampliamente utilizada (aunque cada vez más competida por la EEP) para determinar elementos metálicos y metaloides. Esta técnica tienen grandes convenientes y es de costo relativamente bajo, pudiéndose aplicar tal técnica a una gran variedad de muestras. ^(41,42)

Capítulo III: Materiales y métodos

3.1. Lugar de ejecución

El trabajo experimental se ejecuto en los laboratorios H-403, H-402 y H-301, del pabellón H de la Universidad Católica de Santa María– Arequipa.

3.2. Materiales

3.2.1. Reactivos

- Nitrato de Cadmio $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$
- Nitrato de Plomo $Pb(NO_3)_2$
- Acido Nítrico (H_2NO_3)
- Acido Sulfúrico (H_2SO_4)
- Acido Clorhídrico (HCl)
- Hidróxido de Sodio (NaOH)
- Alcohol (95%, 70%)
- Hipoclorito de sodio
- Batería De Tinción Gram
- Verde de Malaquita.
- Azul De Lactofenol

3.2.2. Medios de cultivo

Medios caldos

- Medio caldo Sabouraud dextrosa (Difco) 30 g/L
- Medio caldo infusión cerebro-corazón (Merck) 37g/L
- Medio caldo 9K -1L. (K_2HPO_4 , 0.50g; $(NH_4)_2SO_4$, 3.00g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.50g.; KCl, 0.10g.; $Ca(NO_3)_2$, 0.01g.; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 44.2g.)

Medios sólidos

- Medio agar extracto de malta al 2%-1L. (Extracto de malta, 20.00g.; Glucosa, 20.00g.; Peptona, 1.00g.; Agar-Agar, 16.00g.)
- Medio agar Sabouraud (Merck) 65 g/L
- Medio agar base sangre (Criterion) 40 g/L
- Medio agar infusión cerebro-corazón (Merck) 52 g/L
- Medio Mac Conkey (Merck) 50 g/L

3.2.3. Material de laboratorio

- Tubos de ensayo
- Papel filtro
- Pipetas de 2, 5 y 10 mL
- Fiolas de 250, 500 y 1000 mL
- Micropipetas de 50, 1000 μ L
- Probetas de 50, 100, 500 mL
- Gradilla de tubos
- Placas Petri
- Pinzas
- Mortero
- Matraces de 100, 250, 500 y 1000 mL
- Beakers de 100, 250, 500 y 1000 mL
- Espátula
- Asa de Kolle
- Papel pH
- Cubreobjetos
- Láminas
- Cámara De Neubauer
- Tubos centrifuga de 15mL de plástico.
- Envases de plástico
- Bandejas de plástico
- Bagueta

3.2.4. Equipos

- Agitador Magnético JENWAY modelo 1000
- pH-metro JENWAY modelo 3510
- Autoclave TUTTNAVER 1730 M
- Estufa P. SELECTA.
- Microscopio BELTEC SCIENTIFICA BK 3200
- Incubadora P. SELECTA

- Termómetro digital JENWAY modelo 3510
- Baño Termostato VICKING MODELO MASSON
- Termómetro ambiental BOHECO
- Balanza analítica ADVENTURER OHVS
- Centrífuga PLC series.
- Multiparámetro HANNA
- Shaker
- Bombas
- Cocina eléctrica
- Espectrofotómetro de absorción atómica con flama SHIMADZU
- Cámara de flujo laminar
- Refrigerador
- Estereoscopio

3.2.5. Otros materiales

- Frascos de plástico
- Guantes
- Barbijos
- Hielera
- Bolsas de polipropileno
- Frascos de vidrio
- Algodón
- Encendedor
- Marcador
- Papel Craft
- Agua destilada
- Jeringa
- Parafilm
- Pabilo
- Puradisc
- Papel Aluminio

3.3. Métodos

El trabajo experimental se ejecuto en los laboratorios H-403, H-402 y H-301, del pabellón H de la Universidad Católica de Santa María– Arequipa.

3.3.1. Recolección de muestra

Se extrajo muestras de la poza de relaves del laboratorio de concentración de minerales de la Universidad Nacional San Agustín-Arequipa.



Figura 12. Poza de relaves del laboratorio de concentración de minerales de la Universidad Nacional San Agustín-Arequipa.

La ubicación del punto de muestreo fue en las Coordenadas latitud de -16.40 y longitud de -71.52, altitud de 2335 msnm. Para la recolección de muestra se siguió el protocolo descrito por DIGESA (2012). Se empleo como recipiente botellas de plástico estériles de capacidad de 1 litro con tapa de plástico, previamente lavadas y enjuagadas con ácido Nítrico. Se recolectó 1 litro de muestra, elegidas al azar de 3 puntos distintos, para la determinación de Plomo y Cadmio se tomó una muestra adicional de 1 litro, a esta muestra se agregó 3 ml de HNO_3 diluido (1+1) y todas estas muestras se mantuvieron a un valor promedio mayor a 4 °C dentro de la conservadora, hasta su transporte al laboratorio. La recolección se realizó en el mes de Mayo 2011.

3.3.2. Análisis fisicoquímico de la muestra

a. Caracterización física de la muestra

Para la determinación del pH, temperatura y conductividad, se utilizó el equipo de Multiparámetro HANNA, también se determinaron los aspectos físicos como la

densidad (método del picnómetro), color y olor (organolépticamente).

b. Caracterización de la concentración inicial de Plomo y Cadmio de la muestra.

Para la cuantificación inicial de Plomo y Cadmio se realizó previamente un tratamiento (filtración), posteriormente para su determinación se usó el método de espectrofotometría de absorción atómica. ⁽⁴¹⁾

3.3.3. Aislamiento de microorganismos.

Se realizó siguiendo el procedimiento de Núñez 2007. Se homogenizó bien la muestra, posteriormente se dejó sedimentar por 2 minutos, luego se tomó 5 ml de alícuota la cual se inoculó en matraces conteniendo medios de enriquecimiento. ⁽⁴³⁾

a. Cultivo de microorganismos. ⁽⁴⁴⁾

Para aislar la mayor variabilidad de microorganismos según Gómez 2002, se debe emplear medios de enriquecimiento, para lo cual se trabajó en matraces Erlenmeyer de 250mL conteniendo 100 mL de medio caldo Sabouraud Dextrosa (Difco, 30g/1L) para aislar hongos, para bacterias el caldo infusión de Cerebro Corazón (Merck, 37g/1L). Todos estos suplementados con soluciones de 3 ppm de cada catión metálico, se prepararon a partir de una solución stock concentrada de 100 ppm de Plomo (II) y 100 ppm de Cadmio (II). Preparadas a partir de las siguientes sales portadoras: $Pb(NO_3)_2$, $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$. Las concentraciones deseadas fueron preparadas a partir de la solución stock concentrado utilizando la ecuación:

$$V_1C_1 = V_2C_2$$

Donde: V = Volumen; C = Concentración. ⁽⁴⁵⁾

Adicionalmente en caso de que hubiese bacterias sulfato reductoras, se decidió emplear el medio caldo K9; Todos los medios se realizaron por duplicado cada uno con un control respectivo y a cada medio se inoculó 5ml de muestra inicial. Se incubó a 37°C por un periodo de 24 a 48 horas y en agitación a 40 rpm. El caldo Sabouraud Dextrosa se

dejo a temperatura ambiente. El caldo 9K fue incubado a 30 °C con aireación, se marco los volúmenes de cada frasco para reponer agua que se evapora.

Los medios de cultivo fueron autoclavados a 121°C, 15 libras/pulg² por un periodo de 15 min. El valor del pH fue regulado con la adición de ácido Clorhídrico y/o Hidróxido de Sodio.



Figura 13. Incubación de los medios de cultivo utilizados en la etapa de aislamiento.

Después de cultivar, se procedió a aislar los microorganismos de este, empleando los siguientes medios de cultivo: Agar Infusión Cerebro-Corazón (Merck, 52g/L), Agar Sabouraud (Merck, 65g/L) y Agar Mac Conkey (Merck, 50g/L). Se trabajó por duplicado con su respectivo control. Estos medios fueron suplementados con 3 ppm de Plomo y 3 ppm de Cadmio. Se realizó un sembrado en superficie por agotamiento en estría en el medio BHI, Mac Conkey y en el medio Sabouraud el sembrado se realizó por punción.

Todas las placas se incubaron a 37°C durante 60 horas excepto el medio Sabouraud que se incubó a temperatura ambiente, durante 6 días.



Figura 14. Cámara de flujo laminar donde se trabajó la inoculación en las placas Petri.

Para evaluar el crecimiento de los microorganismos se realizó según la tabla 4.

Tabla 4.
Evaluación de la presencia de los microorganismos.

CRECIMIENTO DE COLONIAS	INTERPRETACION
Ausencia	-
1-5	+
5-10	++
10-20	+++
20 a mas	++++

b. Purificación de las colonias aisladas.

Las colonias que crecieron en las placas se purificaron por resiembras sucesivas hasta tener colonias puras, en total se realizó 4 repiques en Agar BHI para bacterias y en medio Agar Sabouraud para hongos, estas placas fueron suplementadas con las soluciones de Plomo (II) y Cadmio (II) en una concentración de 3ppm.

3.3.4. Caracterización de los microorganismos.

Se separó en dos grupos: bacterias y hongos, posteriormente la caracterización de las cepas se realizó mediante evaluación macroscópica, microscópica, tinciones y la aplicación de pruebas bioquímicas.

Procesos descritos en el siguiente flujograma

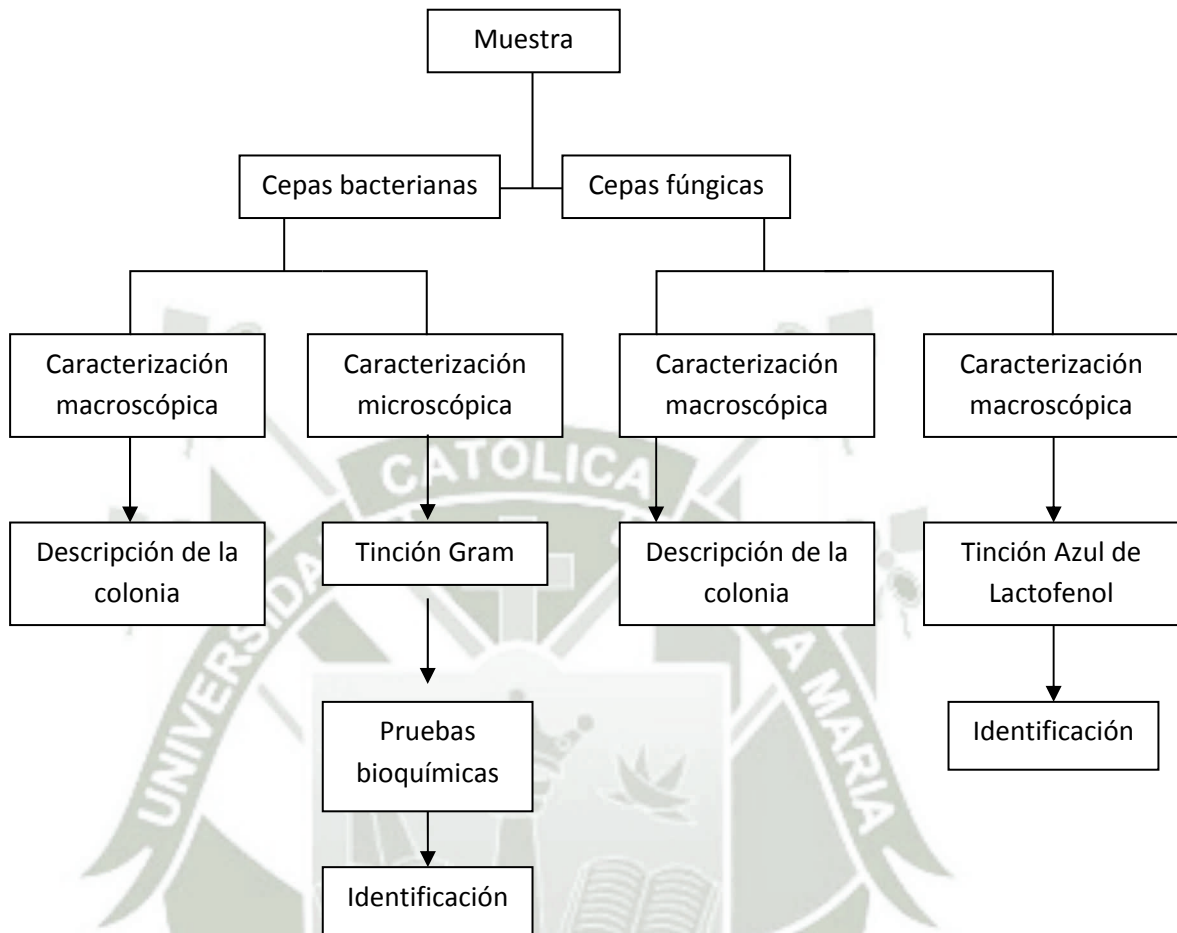


Figura 15. Flujograma del proceso de identificación de los microorganismos.

a. Caracterización de las cepas bacterianas

- Caracterización morfológica

Para describir las características morfológicas macroscópicas de las colonias de las cepas bacterianas aisladas y purificadas, se tomo en cuenta la tabla 5.

- Caracterización bioquímica

La identificación se llevó a cabo guiándose por el Manual de Bergey's ^(46,47). Primero se realizó la tinción Gram, luego se aplicó pruebas bioquímicas como: Citrato de Simmons,

Urea, SIM, TSI, LIA, prueba Catalasa, prueba Oxidasa, Nitrato, prueba MRVP, Agar Mac Conkey), para determinar género y la especie a la cual pertenecen.

Tabla 5.

Características morfológicas de las colonias bacterianas.

Parámetro	Característica
Color	Amarillo , blanquecino , naranja, rojiza, Plomo
Elevación	Convexa, plana ,elevada, pulvinada, acuminado
Aspecto	Liso, mucoide, rugoso
Borde	Regular, irregular

b. Caracterización de las cepas fúngicas

- Caracterización morfológica

Para caracterizar las cepas fúngicas aisladas y purificadas, se realizó la descripción de sus características morfológicas macroscópicas y culturales de las colonias (Tabla 6).

Tabla 6.

Características morfológicas de las colonias fúngicas.

Parámetro	Característica
Color	Amarillo , blanquecino , plomo, negro
Tiempo de crecimiento	Rápido(4 días), moderado(1-2semana), lento (3 semanas)
Aspecto	Granuloso, algodonoso, lanosa
Textura	Afelpada, pulverulenta, vellosa, aterciopelada, granular

- Caracterización microscópica

Para observaciones microscópicas se prepararon montajes con azul de Lactofenol. Para la identificación de las cepas fúngicas se realizó según el manual de identificación de hongos oportunistas⁽⁴⁸⁾

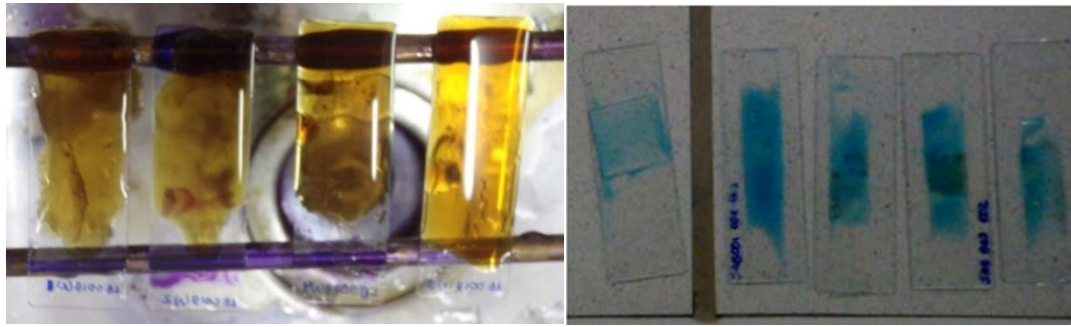


Figura 16. Izquierda: laminas portaobjetos en pleno proceso de tinción Gram, derecha: laminas portaobjetos con azul de lactofenol realizado a las cepas fúngicas.

3.3.5. Acondicionamiento a Plomo (II) y Cadmio (II).

Para evaluar la capacidad de resistencia de las cepas fúngicas frente a Plomo (II) y Cadmio (II), se trabajó en medios líquidos partiendo de una concentración inicial de 3 ppm de Plomo (II) y 3 ppm de Cadmio (II), posteriormente a partir de estas colonias se procedió realizar el acondicionamiento a distintas concentraciones (10ppm, 25ppm, 50ppm, 75ppm y 100ppm) con una agitación de 50 rpm en un Shaker modelo sk 300. Las evaluaciones se realizaron a las 168 horas de crecimiento.

3.3.6. Evaluación de la influencia de Plomo (II) y Cadmio (II) en la cinética de crecimiento.

Para la determinación de la cinética sin la presencia de los metales Plomo (II) y Cadmio (II), se trabajo con frascos de capacidad de 100 ml, en la cual se depositaron 65 ml de medio Sabouraud y se inoculó con las cepas fúngicas, se incubaron a temperatura ambiente con agitación de 50 rpm, se recolectaron alícuotas cada 24 horas; para la determinación de la cinética de biomasa fungal se realizó mediante el método de peso seco, para lo cual se filtro la biomasa y se depositó en papel aluminio previamente pesado y se llevó a la estufa a 80 °C, por 18 horas y se pesó hasta que este sea constante. Además se monitoreo el pH con un pH-metro y se cuantificó el consumo de glucosa aplicando el método enzimático, repitiendo por triplicado cada ensayo. El mismo proceso se realizó para el desarrollo de la cinética con la presencia de los metales Plomo (II) y Cadmio (II).



Figura 17. Muestras recolectadas de los frascos de cultivos para el desarrollo de las cinéticas.



Figura 18. Determinación de glucosa mediante el método enzimático.



Figura 19. Proceso llevado para el desarrollo de la cinética de las cepas fúngicas.

3.3.7. Obtención de biomasa para los procesos de bioadsorción.

Primero se determinó el medio adecuado para el cultivo de las cepas fúngicas.

a. Determinación del medio óptimo para el cultivo de hongos

Se evaluó distintos medios de cultivo, con la finalidad de determinar cual medio era el más adecuado para obtener la mayor biomasa, para evitar la mayor cantidad de

producción de esporas y que este a su vez sea barato. Se sembró en los siguientes cultivos: medio caldo papa Dextrosa, medio caldo Sabouraud, medio caldo Extracto de malta, medio caldo BHI y medio caldo Nutritivo.

El medio de cultivo seleccionado se emplea para generar la biomasa en frascos conteniendo 65 ml de medio, sin agitación y se incubó a temperatura ambiente.

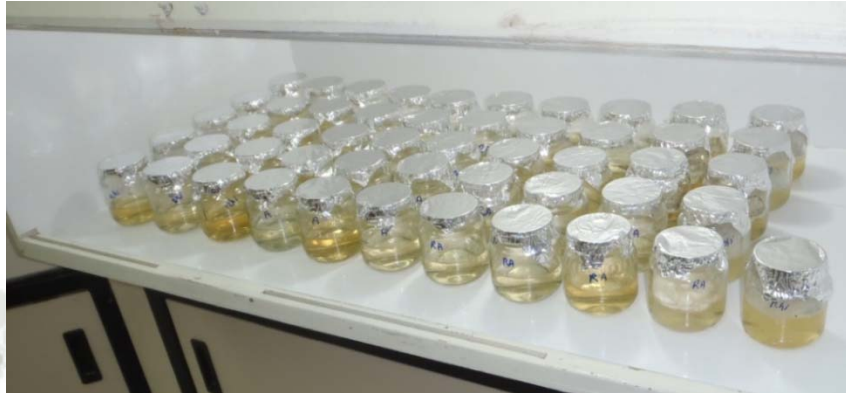


Figura 20. Cultivo de las cepas fúngicas.

3.3.8. Capacidad de remoción de Plomo (II) y Cadmio (II).

a. Determinación de la capacidad de remoción de Plomo (II) y Cadmio(II)

Para conocer la capacidad de remoción de los metales Plomo (II) y Cadmio (II) a distintos tiempos empleando los hongos aislados; se trabajó en condiciones Batch, con frascos de plástico estériles en los que se depositó 300 ml de cada solución de metal a una concentración de 100ppm y en mezcla de 50 ppm de Plomo (II) y 50 ppm de Cadmio (II). Todos los frascos tuvieron un volumen final de 300ml, luego se añadió los micelios fúngicos (lavados) y se mantuvo con agitación en un shaker modelo sk 300 a 90 rpm, a un pH de 5 a temperatura ambiente, se sacaron alícuotas con una jeringa acondicionada con un filtro a distintos tiempos (4, 8, 20, 24 horas). Para posteriormente realizar la lectura en el espectrofotómetro de absorción atómica, repitiendo por triplicado cada ensayo.



Figura 21. Muestras obtenidas a distintos tiempos.

b. Selección del micelio fungal más eficiente

Con los resultados del experimento anterior se determinaron, cuál de los micelios fúngicos era el más eficiente para la remoción de Plomo (II) y Cadmio (II) y de ahora en adelante todos los ensayos se realizarán trabajando con el micelio elegido.

La cepa fúngica fue cultivada en frascos de 5.2 cm de diámetro, con capacidad de 100ml, para realizar los ensayos de remoción la biomasa fungal previamente fue lavada con agua destilada estéril, luego se depositó en frascos de plástico de capacidad de 1 litro conteniendo agua destilada estéril la cual se mantuvo en agitación a 100 rpm en un shaker se lavó tres veces, cada lavado por 15 min, con la finalidad de retirar los residuos de ácidos, medio u otros. La biomasa empleada tenía un peso húmedo de 1.6 g.

3.3.9. Ensayos de remoción de Plomo (II) y Cadmio (II) usando el micelio fungal más eficiente.

Los ensayos de remoción se realizaron a distintos valores de pH, temperatura, biomasa y concentración de metal, esto con la finalidad de encontrar los valores más adecuados que permitan una mayor remoción de los metales Plomo (II) y Cadmio (II).

a. Efecto pH

La finalidad de este ensayo fue determinar el valor de pH más adecuado para la remoción de Plomo (II). Se colocó en frascos de plástico de capacidad de 1 litro, 300 ml

de la solución de Plomo (II) a una concentración de 100ppm y a pH 3, 4, y 5. Posteriormente se depositó el micelio fungal y se mantuvo en agitación a 90 rpm, se sacaron alícuotas con una jeringa acondicionada con un filtro a distintos tiempos (0, 4, 8, 20, 24 horas), para posteriormente realizar la lectura en el espectrofotómetro de absorción atómica, repitiendo por triplicado cada ensayo. El mismo procedimiento se repitió para el metal Cadmio (II) y para el consorcio Plomo (II) y Cadmio (II) (teniendo una concentración de 50ppm para Plomo (II) y 50ppm para Cadmio (II)). Para elegir el pH más adecuado en la remoción de los metales Plomo (II) y Cadmio (II), se usó la prueba estadística de Tukey.

b. Efecto temperatura

Para determinar la temperatura más adecuada para la remoción de Plomo (II) se empleo frascos de plástico de capacidad de 1 litro, conteniendo 300 ml de la solución de Plomo(II) a una concentración de 100ppm, se trabajó con el pH óptimo determinado en el experimento anterior, se trabajó a temperaturas de 10°C, 25°C y 40°C, posteriormente se depositó el micelio fungal y se mantuvo con agitación en un shaker a 90 rpm, se sacaron alícuotas con una jeringa acondicionada con un filtro a distintos tiempos (0, 4, 8, 20, 24 horas). Para posteriormente realizar la lectura en el espectrofotómetro de absorción atómica, repitiendo por triplicado cada ensayo. El mismo procedimiento se repitió para el metal Cadmio (II) y para la mezcla de metales Plomo (II) y Cadmio (II). Para determinar cuál fue la temperatura más adecuada en la remoción de los metales Plomo (II) y Cadmio (II), se determinó mediante análisis estadístico de Tukey.

c. Efecto biomasa

Con la finalidad de determinar la cantidad de biomasa más adecuada para la remoción de Plomo (II). En frascos de plástico de capacidad de 1 litro, conteniendo 300 ml de la solución de Plomo a una concentración de 100ppm, se trabajó con el pH optimo, la temperatura optima determinados en los experimentos anteriores, se trabajó con 1 micelio, 2 micelios y 3 micelios fungales (el peso de cada uno se reportó, trabajándose con pesos iguales) y se mantuvo con agitación en un shaker a 90 rpm, se sacaron alícuotas con una jeringa acondicionada con un filtro a distintos tiempos a 0, 4, 8, 20, 24

horas. Para posteriormente realizar la lectura en el espectrofotómetro de absorción atómica, repitiendo por triplicado cada ensayo. El mismo procedimiento se repitió para el metal Cadmio (II) y para el consorcio Plomo (II) y Cadmio (II). Para determinar cuál fue la biomasa más adecuada en la remoción de los metales Plomo (II) y Cadmio (II), se determinó mediante el la prueba de Tukey.

d. Efecto concentración de metal

En frascos de plástico de capacidad de 1 litro, conteniendo 300 ml de la solución de Plomo (II), se trabajó a 3 concentraciones distintas (10ppm, 50ppm y 90ppm), y con el pH óptimo, la temperatura óptima, la biomasa óptima determinados en los experimentos anteriores, se depositó el micelio fungal y se mantuvo con agitación de 90 rpm. Se sacaron alícuotas con una jeringa acondicionada con un filtro a distintos tiempos (0, 4, 8, 20, 24 horas). Para realizar la lectura en el espectrofotómetro de absorción atómica, haciendo triplicados por cada ensayo. El mismo procedimiento se repitió para el metal Cadmio (II) y para la mezcla de metales Plomo (II) y Cadmio (II). Para determinar cuál fue la concentración más adecuada en la remoción de los metales Plomo (II) y Cadmio (II), se usó la prueba estadística de Tukey.

- Cálculo del porcentaje de remoción

Se expresaron los resultados en porcentajes de remoción (%R) y se determinó mediante la ecuación:

$$\%R = \left(\frac{C_0 - C_t}{C_0} \right) \times 100$$

Donde:

%R: Porcentaje de remoción

C₀: Concentración inicial (mg/L)

C_t: Concentración final (mg/L)

- **Cantidad de metal removido fue calculado mediante:**

$$q = \left(\frac{C_i - C_f}{m} \right) V$$

Donde:

q: es la capacidad de sorción (mg de metal/ g de biosorbente)

V: es el volumen de la muestra (mL)

C_i: es la concentración inicial de metal en solución (mg.L-1)

C_f: es la concentración en el equilibrio de la solución (mg.L-1)

m: es la cantidad de biosorbente

Si los resultados obtenidos de la cinética de biosorción, obedecen a ecuaciones de primer y segundo orden su resolución se hará mediante la técnica de mínimos cuadrados, para determinar los valores de las constantes, se usó del software Statistica 7.0 y Microsoft office Excel 2007.

- **Modelo matemático de Primer orden**

Con el modelo de Primer orden, se determinó la cantidad de sustancia adsorbida (q₁) y la constante de adsorción (k₁).

$$\frac{C_t}{C_0} = 1 - \frac{mq_{-1}}{C_0V} (1 - e^{-k_1t})$$

Donde:

q₁: Cantidad de sustancia adsorbida en el equilibrio, mg/g

k₁: Constante de adsorción de primer orden, min⁻¹

V: Volumen, L

m: Cantidad de adsorbente, g

t: Tiempo de contacto, min

- Modelo matemático de Segundo orden

Con el modelo de segundo orden se halla la sustancia adsorbida y las constantes de adsorción (K_2 , β_2).

$$\frac{C_t}{C_o} = 1 - \frac{mq_{-2}}{CoV} \left(1 - \frac{1}{\beta_2 + K_{-2}t}\right)$$

Donde:

q_{-2} : Cantidad de sustancia adsorbida en el equilibrio, mg/g

k_{-2} : Constante de adsorción de segundo orden, min^{-1}

V: Volumen, L

B_2 : Constante

m: Cantidad de adsorbente, g

t: Tiempo de contacto, min

3.3.10. Determinación de la concentración de los metales.

Para determinar la concentración de los metales Plomo (II) y Cadmio (II) se usó el espectrofotómetro de absorción atómica Shimadzu AA - 6170IF, realizando las curvas de calibración para Plomo (II) y Cadmio (II), para comparar estas con las lecturas de las muestras, usando para Cadmio la longitud de onda de 228.8nm y para Plomo a 217nm, es importante que la muestra no tenga impurezas, las muestras deben ser líquidas y estas fueron preservadas con ácido Nítrico. Antes de realizar la lectura en el equipo, se preparó las muestras con las diluciones necesarias, para realizar la lectura de las muestras se colocó el capilar en la muestra, el capilar succiona la muestra para realizar la medición, una vez succionado se retira el capilar y para seguir con la medición de la siguiente muestra se lavo el capilar con agua destilada. En el monitor del equipo se puede apreciar las lecturas realizadas con sus respectivas concentraciones en unidades de ppm.

3.3.11. Sistema de remoción de Plomo (II) Y Cadmio (II).

a. Construcción del sistema

Tratándose de un proceso de sorción de metales, se decidió realizar sistema de columnas empacadas con la biomasa fungal, distribuidos en 3 columnas estériles, antes de empacar se esterilizó la piedra pómez y la arena fina. La configuración del sistema fue de la siguiente manera: la primera columna empacada con piedra pómez (columna a), la segunda columna empacada con biomasa fungal (20 micelios) inmovilizada en piedra pómez (columna b) y la tercera columna llena con arena fina (columna c). Las dimensiones de las columnas se especifican en el apéndice 5.

Una vez armado el sistema con el micelio fungal, se hizo funcionar teniendo una bomba que alimentaba a las columnas con Plomo (II) y Cadmio (II) a una concentración de 5ppm de cada metal, teniéndose un flujo de salida de 1.05 litros por hora, se tomaron alícuotas a los 5, 60, 1440, 4320 minutos. Para cambiar de ensayo se vació toda la columna, se lavó con abundante agua destilada, se esterilizó y luego ya se disponía para otro nuevo empacamiento y uso. Posteriormente se trabajo bajo las mismas condiciones el control sin la biomasa fungal. Repitiendo por triplicado cada ensayo.

b. Evaluación de eficiencia de la capacidad de remoción de Plomo (II) y Cadmio (II).

La eficiencia del sistema se determinó mediante la medición de condiciones iniciales y las condiciones finales en la salida de cada columna determinándose las concentraciones de ambos metales.

La eficiencia de biosorción se determinó con la siguiente ecuación:

$$%E = \left(\frac{C_0 - C_t}{C_0} \right) \times 100$$

Donde:

%E : Eficiencia de remoción

C_0 : Concentración inicial en la solución acuosa (mg/L)

C_t : Concentración final en la solución acuosa (mg/L) ⁽⁴⁵⁾

c. Análisis microbiológico

Para evaluar que el sistema funciona bien y no arrastra restos de biomasa fungal, se realizó el análisis microbiológico, para lo cual se tomó alícuotas a distintos tiempos (1er día, 2do día, y 3er día) las cuales fueron inoculadas en medios de cultivo Sabouraud, estas se incubaron a temperatura ambiente.



3.3.12. Diagrama de flujo de actividades.

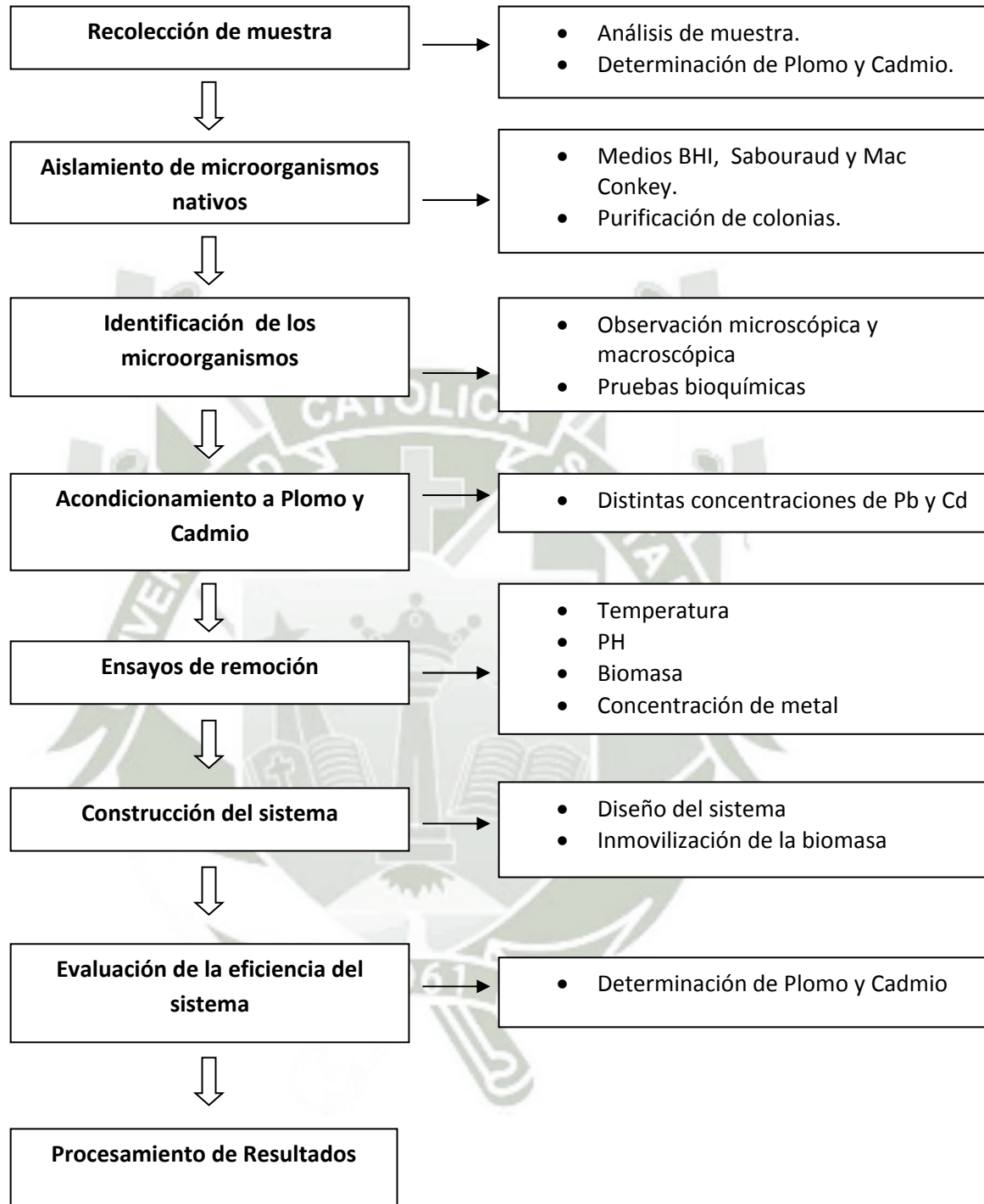


Figura 22. Esquema general de la metodología

Capítulo IV: Resultados y discusión

A continuación se muestra los resultados obtenidos de uso de microorganismos nativos aislados a partir de la poza de concentración de minerales del laboratorio metalúrgico de la UNSA. Para la remoción de los metales Plomo (II) y Cadmio (II).

Díaz M. et-al. 2002, aislaron microorganismos a partir de desechos mineros, donde la presencia de metales está por encima de lo permisible y que estos a su vez son evaluados como potenciales remediadores de estos metales.

4.1. Análisis de muestra

La muestra de agua de la poza de relaves del laboratorio de concentración de minerales era opaca y gris oscuro con impurezas, de olor ligeramente fétido. Los resultados del análisis fisicoquímico se muestran en la tabla 7.

Tabla 7.

Caracterización fisicoquímica del agua de la poza de relaves del laboratorio de concentración de minerales.

Parámetro	Valor
Valor de pH	6.12
Temperatura (°C)	18.5°C
Conductividad(μS/cm)	730
Densidad	1.09
Cd (mg/L)	2.14
Pb (mg/L)	2.58

En la poza de relaves se concentra diversos metales producto de las diversas prácticas que realizan en dicho laboratorio. En el análisis inicial de la muestra se tiene un valor de 2.14 ppm para Cadmio y 2.58 para Plomo, estos valores sobrepasan a lo establecido por el Ministerio del Ambiente. Los Límites Máximos Permisibles para la descarga de efluentes líquidos de actividades Minero – Metalúrgico según el decreto supremo n° 010 -2010-MINAM ⁽²⁰⁾, menciona para Cadmio 0.05 ppm y 0.2 ppm para Plomo. Estas aguas

contaminadas al ser expuestas a cielo abierto muchos de los contaminantes se volatilizan y de ahí la importancia de tratar estas aguas.

4.2. Aislamiento de microorganismos.

4.2.1. Cultivo de microorganismos.



Figura 23. Medios de enriquecimiento tras el periodo de incubación.

Los microorganismos cultivados en los caldos de enriquecimiento BHI tuvieron crecimiento a las 24 horas como se puede apreciar en la figura 24, en cambio en el medio Sabouraud hubo poco crecimiento a las 24 y mayor crecimiento a las 96 horas. Las cepas bacterianas y fúngicas no presentaron ninguna dificultad para desarrollarse en presencia de Plomo (II) y Cadmio (II). En cambio en el medio mineral 9K aún pasadas 2 semanas en incubación no hubo ningún desarrollo de biomasa ni bacteriana, ni fúngica. Como indicaron D. E. Rawlings et-al., (1994), en medios de pH ácido es muy frecuente encontrar la mayoría de veces a bacterias como los *Thiobacillus ferrooxidans*; sin embargo el pH de la poza es de 6.12 por lo que no se dan las condiciones para su desarrollo.

Díaz M. et-al., 2002, aislaron 7 hongos (5 *Aspergillus flavus* y 2 *Aspergillus fumigatus*), donde reportan que crecen bien a 200 y 500 ppm de Pb y Zn, y a 200 ppm de Cu y Ag.

Tabla 8.
Crecimiento de los microorganismos sembrado en distintos medios.

MEDIO	N° placa	Crecimiento en Horas		COLONIAS Y GRAM
		24 H.	60 H.	
BHI	1	+++	++++	Bacilos (+), cocobacilos (-), cocos (+). Predomina bacilos
	2	+++	++++	<i>Rhizopus</i> , bacilos (+), cocobacilos (-), levaduras. Predomina bacilos
	3	-	-	-
SABOURAUD	4	+	++	<i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Rhizopus</i> , Bacilos(+)
	5	-	++	<i>Aspergillus</i> , <i>Rhizopus</i>
	6	-	-	-
MAC CONKEY	7	++++	++++	Bacilos (+), bacilos (-). Predomina bacilos
	8	++++	++++	cocobacilos (-), bacilos (+)
	9	-	-	-

Luego de la etapa de enriquecimiento, se sembraron en medios sólidos. En la primera evaluación a las 24 horas las placas de BHI ya presentaban un buen desarrollo de colonias bacterianas y en las placas de Sabouraud no había un desarrollo notorio. Según la tabla 4 se tiene los resultados que se pueden apreciar en la tabla 8. Se realizó una tinción Gram a las colonias con crecimiento de 48 horas. Para evaluar el crecimiento se realizó según la tabla 4.

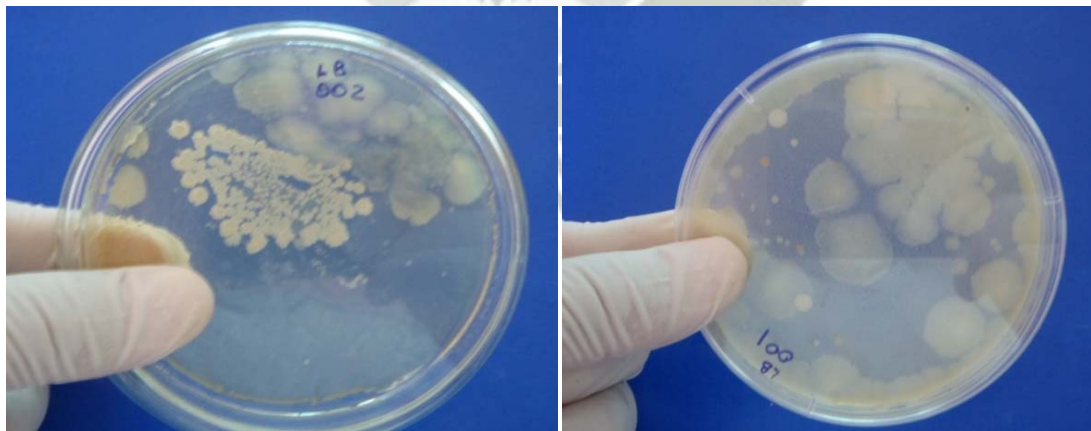


Figura 24. Colonias aisladas en Placas con medio BHI.

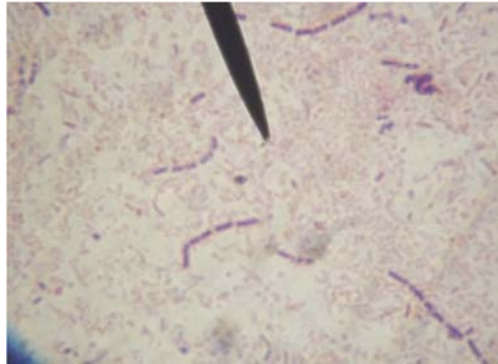


Figura 25. Observación microscópica de una de las colonias de la placa 2 – BHI con un aumento de 100X.

En la figura 25, se aprecia la presencia de bacilos en abundancia.

4.2.2 Purificación de las colonias aisladas.

Las colonias resultantes se purificaron por resiembras sucesivas, en total se realizó 4 repiques en Agar BHI para bacterias y en medio Agar Sabouraud para hongos. De todas las cepas purificadas en total se logró tener una colección de 4 cepas, estas se presentaban casi en todas las placas, 2 pertenecientes a bacterias y las otras 2 a hongos.

4.3. Caracterización de los microorganismos.

4.3.1. Caracterización de las cepas bacterianas.

De las bacterias aisladas, se seleccionaron las cepas que estaban en mayor abundancia; trabajando con 2 cepas representativas. Se cogió muestras representativas y se inoculó en caldo nutritivo y en caldo BHI; las cuales se codificaron como cepa 1B y cepa 2B.

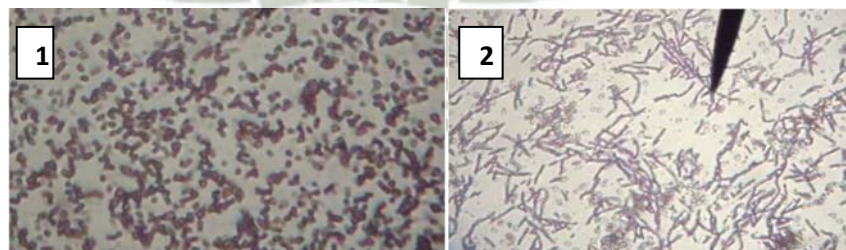


Figura 26. Observación microscópica de las bacterias aisladas a 100X, (1) la cepa 1B, (2) cepa 2B

Al tener estas colonias mencionadas, se purificó por separado, lográndose obtener una placa pura de la cepa 1B y otra de la cepa 2B. La 1B eran colonias ovaladas definidas, Gram-, las que se sembraron en BHI. La cepa 2B, es bacilo Gram+, que forman cadena. Para ver si forman esporas se sembró en caldo BHI incubado a 80°C y se sometió a la coloración de Wirtz-Conklin en donde se observó bacilos de color rojo y la presencia de esporas en color verde. Una vez purificado ambas colonias se les sometió a tinción Gram y posteriormente a una batería de pruebas bioquímicas.

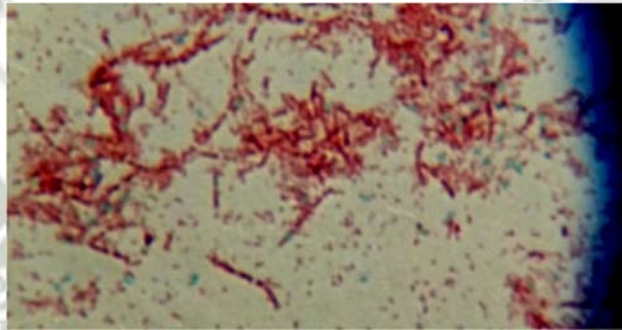


Figura 27. Tinción de Wirtz-Conklin de las colonias perteneciente a la cepa 2B.

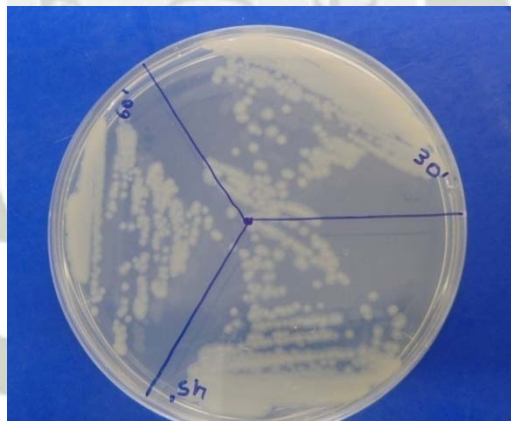


Figura 28. Placa de las colonias perteneciente a la cepa 2B.

Como se puede apreciar en la figura 28, se observa colonias blanquecinas, rugosas, según estas descripciones tiende a probablemente se trate de *Bacillus* pues este aspecto físico nos indicaría que estaría en fase de esporulación por la presencia de sus bordes irregulares. En la figura 29, se muestra a las cepas totalmente puras, la cepa 1B se sembró en el medio BHI y el 2B en el medio Sangre.



Figura 29. Placas de las colonias puras, lado izquierdo perteneciente a la cepa 2B y en el lado derecho perteneciente a la cepa 1B.

En la tabla 9, se aprecia las características de las cepas 1B y 2B

Tabla 9.
Características de las cepas 1B y 2B.

	1B	2B
Forma de colonia	ovaladas	Irregular
Color	Amarillento	Amarillento
Colonias	Lisa	rugosa
Gram	Cocobacilos -	Bacilos +
Esporas	No	si

Las cepas 1B y 2B, presentaban un crecimiento rápido, cuando se realizó una observación microscópica a la cepa 1B, no se observaba la presencia de esporas caso contrario se apreció en la cepa 2B.

a. Caracterización bioquímica

Con la finalidad de identificar plenamente las cepas 1B y 2B se sometieron a las pruebas de identificación bioquímica, para la cepa 2B se aplicó la prueba Catalasa, Oxidasa, Urea, MRVP, Citrato, Nitrato, SIM, TSI y a la cepa 1B la prueba Catalasa, Oxidasa, TSI, Urea, MRVP, Nitrato, SIM, LIA.

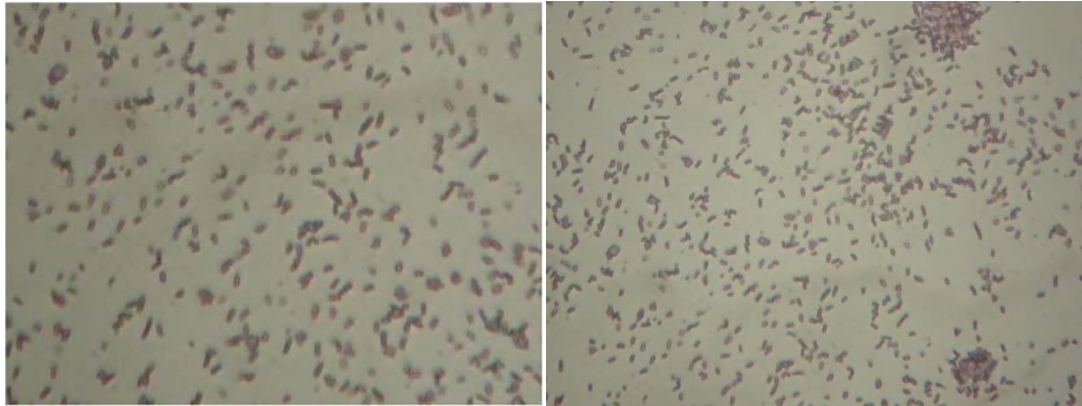


Figura 30. Observación microscópica a 100X de las cepas 1B, donde se muestra a cocobacilos Gram negativo.



Figura 31. Observación microscópica a 100X de las cepas 2B, donde se muestra cadena de bacilos Gram positivo, con presencia de esporas.

Como se puede apreciar en la figura 30 se aprecia cocobacilos y al realizar la coloración gram resultaron ser negativas. En la figura 31, se aprecia cadenas de bacilos y al realizar la tinción gram resultaron ser gram positivas.

Los resultados de las pruebas bioquímicas aplicadas a las cepas 1B y 2B se observa en las tablas 10 y 11. De acuerdo a la tabla 10, para determinar a qué género pertenece, se partió desde la tinción Gram, como la cepa 1B es Gram -, se clasificó en dicho grupo, posteriormente en la prueba TSI, este nos da como resultado K/K, que indica que no fermentó lo cual nos indica que pertenecería a la orden Pseudomonadacea, en la prueba Oxidasa es -, por lo que se descarta a *Moraxella*, *Pseudomonas A.*, *Flavobacterium*, quedándonos como posible candidato a *Acinetobacter*. Entre otras de las características

que presenta *Acinetobacter* es que no reducen los Nitratos, son Catalasa + y son inmóvil, y de acuerdo a lo observado en los resultados de la tabla N°9, se confirma esto al obtener dichos resultados y revisando las características macroscópicas, microscópicas y a las pruebas que son positivas, según el Manual of Systematic Bacteriology Bergey's (2005), podemos concluir diciendo que la cepa 1B es *Acinetobacter*.

Tabla 10.

Resultado de las pruebas bioquímicas aplicadas a la cepa 1B.

PLACA	CEPAS	GRAM	CATALASA	OXIDASA	UREA	MRVP-ROJO DE METILO	MRVP-VOGES PROSKAUER	NITRATO	SIM			LIA		TSI				
									H2S	MOVILIDAD	INDOL	LDC	H2S	CO2	H2S	LACTOSA	GLUCOSA	RESUMEN
Nutritivo 1B	1B-1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	K/K -
	1B-2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	K/K -

Tabla 11.

Pruebas bioquímicas aplicadas a la cepa 2B.

PLACA	CEPAS	GRAM	CATALASA	OXIDASA	UREA	MRVP-ROJO DE METILO	MRVP-VOGES PROSKAUER	CITRATO SIMOM	NITRATO	SIM			TSI				
										H2S	MOVILIDAD	INDOL	CO2	H2S	LACTOSA	GLUCOSA	SIMBOLO
SANGRE 1B	2B-1	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	K/A
SANGRE 2B	2B-2	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	K/A

De acuerdo a los resultados obtenidos en la Tabla 11 empezando con el Gram, es un bacilo Gram+, Oxidasa -, Catalasa+, fermentación de la glucosa +, Urea-, Citrato+,

Nitrato + y la prueba de Voges – Proskauer +, y según los resultados obtenidos en la tabla N°11 y formadora de esporas implica ser del género *Bacillus*. Por lo que la cepa 2B corresponde a *Bacillus*.

Pereira D. et-al., (2001), indican que las bacterias Gram +, especialmente especies del género *Bacillus*, tienen una alta capacidad de adsorción debido a la concentración tan alta de péptidoglicano y ácido teicoicos existente en su pared celular. Debido al bajo contenido de estos componentes en las paredes celulares de las bacterias Gram -, exhiben poca capacidad de adsorción metálica. Indican también que el género *Bacillus* tienen capacidad de bioacumulación de Plomo, encontrándose que la máxima bioacumulación de Plomo fue de 0,7 mol / g de biomasa de *B. sphaericus*, 1,1 mol / g de biomasa para *B. cereus*, 1,4 mol / g de biomasa para *Bacillus sp.* y 1,8 mol / g de biomasa de *B. subtilis*. Diferentes cepas de *Bacillus* presentan capacidades de absorción distintas y los mejores resultados se obtuvieron para *B. subtilis* y *B. cereus*.

4.3.2. Caracterización de las cepas fúngicas.

En el medio sólido de Sabouraud crecieron dos cepas de hongos (1H y 2H) provenientes de la poza de relave pero no tuvieron un buen crecimiento, por lo que se optó por realizar un cultivo en caldo Sabouraud a fin de favorecer su desarrollo, como se puede apreciar en la figura 32.



Figura 32. Tubos con caldo Sabouraud inoculados con las cepas fúngicas.

Posteriormente se realizó la caracterización morfológica macroscópica de las cepas purificadas 1H y 2H, los resultados se puede apreciar en la tabla N°12, ambas cepas eran de crecimiento rápido.

Tabla 12.
Características de las cepas 1H y 2H.

	1H	2H
Aspecto	Granuloso	Algodonoso
Color	Amarillento-negro	Blanquecino-negro
Textura	granular	Lanosa
Tiempo de crecimiento	Rápido	Rápido
Esporas	si	si

La cepa 1H, son colonias que presentaron un crecimiento rápido, al principio era de un color amarillento pero con el transcurrir de los días se puso negro, esto por la presencia de mayor cantidad de esporas.

La cepa 2H presentaba un desarrollo de crecimiento rápido, el micelio en medio sólido abarcó toda la placa Petri en pocos días, al principio era de un color blanco muy semejante al algodón y con el transcurrir de los días esta se torno gris y además el micelio carecía de septos.



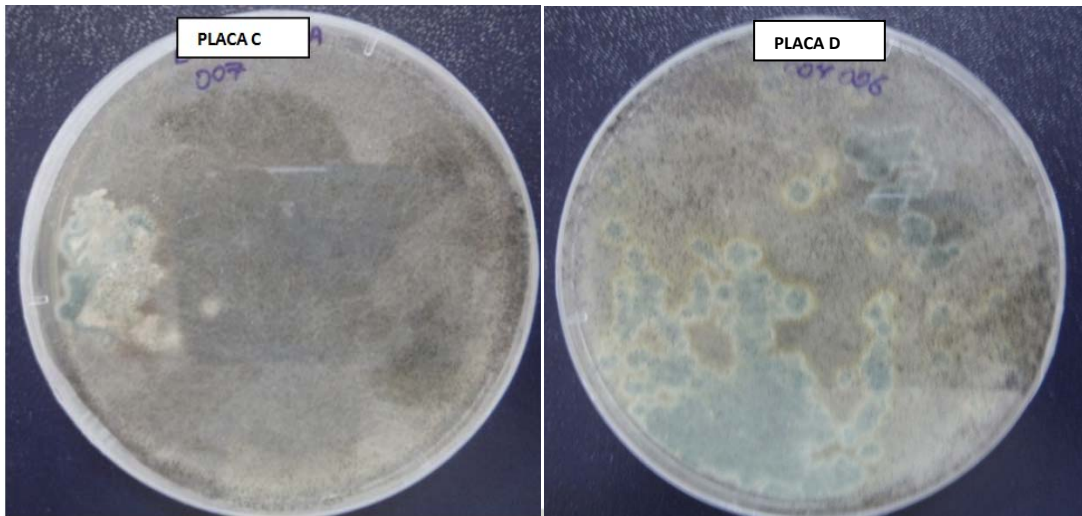


Figura 33. Placas de los hongos aislados, A se aprecia a la cepa 1H y 2H en su mayoría, B se aprecia a la cepa 1H en la parte baja, C se aprecia la cepa 2H en su mayoría y en D se aprecia 2H y 3H.

Como se puede apreciar en la figura 33, los hongos aislados generaron en abundancia las esporas, y llegaron a cubrir toda la placa Petri, estos en general se desarrollaron rápidamente.

Cuando se trata de hongos, estas se pueden diferenciar fácilmente por sus características macroscópicas, pero las características microscópicas nos ayudan a determinar a qué especie pertenece. Como se puede apreciar en la figura 33 en las placas a simple vista se diferencia la presencia mayoritariamente de 1H, 2H. Los hongos que se encontraron con más frecuencia fueron primeramente 2H seguido de 1H y solo en 2 placas se encontró a otra cepa a la que se denominó 3H, este podría deberse a que las placas sufrieron algún tipo de contaminación, por lo que se decidió no trabajar con la cepa 3H. Posteriormente se realizó repiques sucesivos en Agar Sabouraud y PDA, hasta obtener colonias puras, como se puede apreciar en las siguientes figuras 36 y 37.

En la figura 34, se aprecia en el lado izquierdo la característica que presenta es típico de *Rhizopus* asemejándose a la forma de un algodón y lado derecho corresponde al revés de la placa.

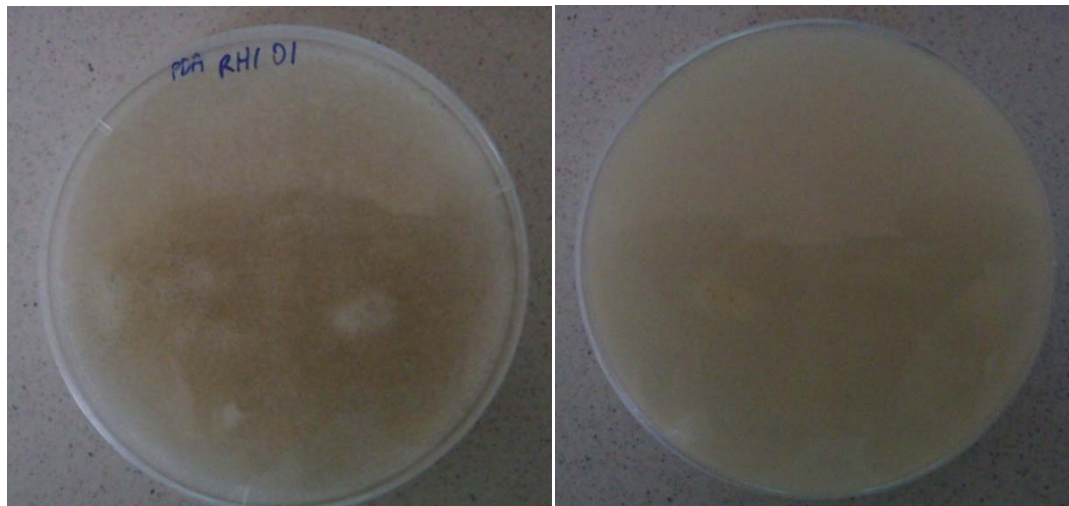


Figura 34. Placas de la cepa purificada 2H cultivada en medio PDA.



Figura 35. Placas de la cepa purificada 1H cultivada en medio Sabouraud.

En la figura 35, se aprecia en el lado izquierdo se aprecia que la característica que presenta es típico de *Aspergillus niger* y lado derecho corresponde al revés de la placa.

Una vez purificado cada cepa, se procedió a la observación microscópica para lo cual se realizó la tinción con Azul lactofenol. Al realizar la observación microscópica a la cepa 2H estas presentaban estolones y rizoides, además los esporangióforos no eran ramificados, presentaban esporangios esféricos y presentaba esporangiosporas angulares, con una apariencia elipsoidal. Y al consultar el manual de identificación de hongos,

según el Ministerio de Salud, (2007), de acuerdo a las características observadas se pudo determinar que la cepa 2H corresponde a *Rhizopus spp*, la cual se puede apreciar en la figura 36.

Respecto a la cepa 1H, microscópicamente se observó que la vesícula era globosa y que presentaba fialides alrededor de esta y se pudo apreciar la presencia de los conidios, que tenían como principal característica la forma globosa, todas estas características mencionadas permitieron determinar que hongo era y de acuerdo al manual de identificación, según el Ministerio de Salud (2007), estas características se cumplen y corresponden a *Aspergillus niger*. Por lo que podemos decir que la cepa 1H corresponde a *Aspergillus niger*.

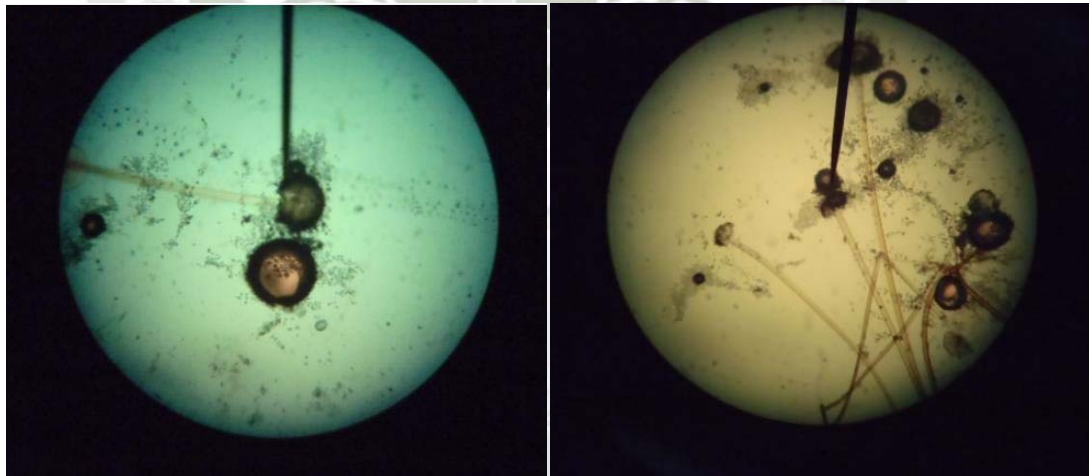


Figura 36. Observación microscópica a 40X de *Rhizopus spp*.

En la figura 37 se puede apreciar claramente las esporas de *Rhizopus spp*. En la figura 38 se aprecia a *Aspergillus niger* y en la Figura 39 se aprecia a la cepa 3H, la cual por las características que presenta sus fialides se identificó como *Penicillium*.

Al-Garni, et-al (2009), aislaron 19 especies de hongos a partir de suelos contaminados con desechos industriales, entre ellos *Aspergillus niger*, en el estudio *Aspergillus fumigatus* fue quien resultó ser el más tolerante a Cadmio hasta una concentración de 100mg/100ml de medio.



Figura 37. Observación microscópica a 40 X, se aprecia la presencia de esporas alrededor del esporangio de *Rhizopus spp.*

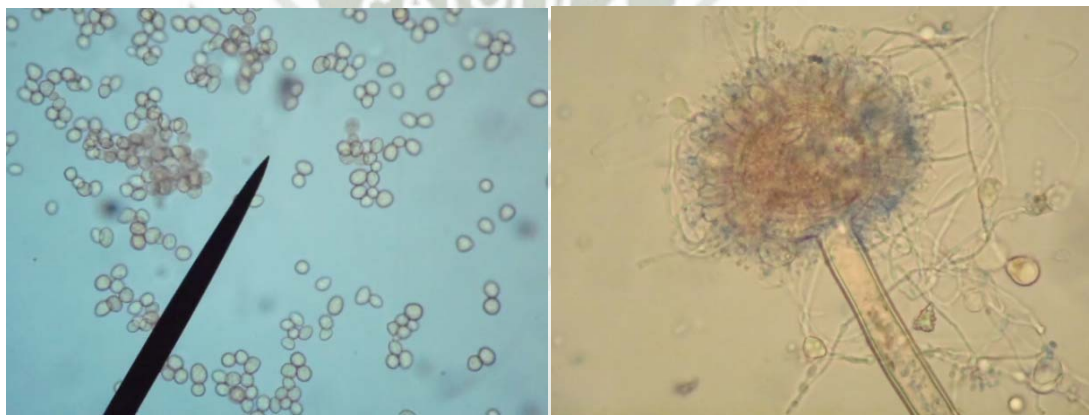


Figura 38. Observación microscópica a 40X, lado izquierdo se aprecia las esporas y lado derecho (con acercamiento de la cámara) la forma típica de *Aspergillus niger*.

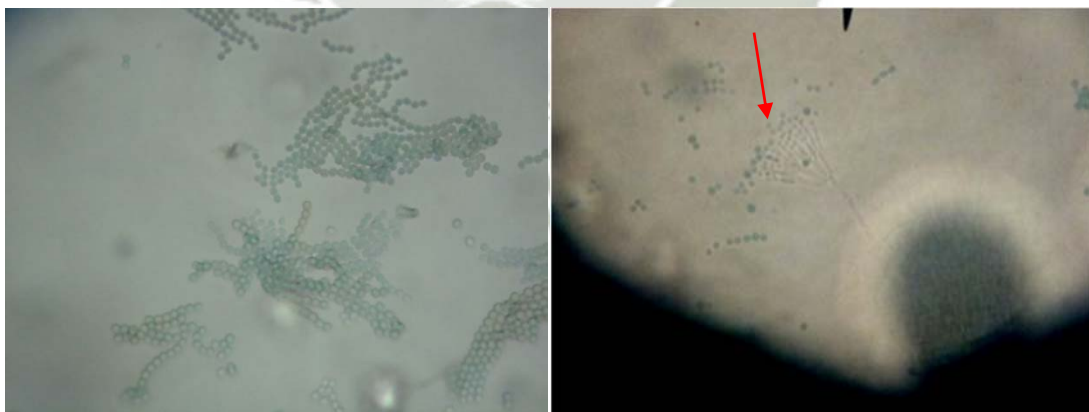


Figura 39. Observación microscópica a 40X, lado izquierdo se aprecia las esporas y lado derecho la forma típica de la fialide de *Penicillium*.

De las cepas fúngicas se decidió trabajar con *Aspergillus niger* y *Rhizopus spp*, por su presencia en todas las placas y con *Acinetobacter spp* y *Bacillus spp*. En ensayos preliminares se apreció que el desarrollo de las cepas bacterianas aisladas era rápido al cabo de 36 horas ya alcanzaba la fase estacionaria, en cambio las cepas fúngicas recién a las 120 horas alcanzaba la fase estacionaria, y además ambos necesitan condiciones un tanto diferentes, por ejemplo la temperatura, las bacterias se desarrollan bien a un promedio de 37°C, en cambio los hongos a temperatura ambiente se desarrollan bien. En cuanto al medio también difieren, por ejemplo las bacterias crecen bien a un pH promedio neutro, en cambio los hongos se desarrollan bien a un pH ácido que bordea en promedio los 5.6; Por todo lo descrito y además porque en este trabajo se quiere desarrollar un sistema fácil, económico y eficiente, se decidió trabajar con biomasa fungal y que en procesos de remoción, es un factor muy importante el área superficial del biosorbente y teniendo biomasa por parte de bacterias y hongos, pues en este trabajo se apreció que la biomasa fungal es bastante considerable frente a la bacteriana. De aquí en adelante solo se empleó las cepas fúngicas aisladas siendo: *Aspergillus niger* y *Rhizopus spp*.

Según Navarro A. et-al., (2006), debido a que la composición de la biomasa fungal presenta diversos grupos funcionales como amino, hidroxil, carboxílico, sulfhidrido y fosfato, han sido reportados en numerosos biosorbentes usados en la actualidad.

Cárdenas J. et-al (2010), reportaron el aislamiento de 23 hongos con diferente resistencia a los metales analizados dentro de estas esta *Alternaria sp*, *Penicillium sp*, *Curvularia sp*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Cephalosporium sp*, *Fusarium sp* y *Cladosporium sp*. Los hongos aislados presentan diferentes patrones de resistencia a los metales analizados, la mayoría crecen en Plomo y Zinc, pocos en Mercurio y Arsénico. Estos hongos se pueden utilizar para la captación de metales pesados en solución solos o acompañados de otras biomásas.

Díaz, M. et-al (2002), lograron aislar y caracterizar hongos resistentes a metales pesados a partir de desechos mineros obtenidos de la mina de Zimapán-Hidalgo, y

probar su capacidad para bioadsorber iones metálicos en solución, para tratar de implementar filtros biológicos. En total aislaron 7 hongos (5 *Aspergillus flavus* y 2 *Aspergillus fumigatus*), que crecen bien a 500 ppm de Plomo y Zinc, y a 200 ppm de Cobre y Plata, En donde las biomásas presentan diferentes porcentajes de remoción por ejemplo la biomasa de *A. flavus* removió 57% de Plomo.

Si bien *Rhizopus* ha sido ampliamente estudiado para la producción de ácidos orgánicos como el fumárico y el ácido láctico, últimamente muchos estudios reportan a hongos como potenciales biorremediadores de metales, por ejemplo Sukumar M. (2010), evaluó a escala laboratorio la capacidad de reducción de cromo hexavalente por *Rhizopus oryzae*, encontrando una reducción máxima de cromo con una eficiencia de 91,15%, demostrando que la remoción de cromato por *Rhizopus oryzae* indica una técnica factible y económico para la eliminación de Cromato de los efluentes de aguas residuales industriales. Tras identificar plenamente a los hongos se procedió a cultivarlos en caldos como se aprecia en la figura 40, el desarrollo de ambos micelios purificados tanto a *Aspergillus niger* y *Rhizopus spp* cultivados en medios caldos BHI y Sabouraud.



Figura 40. Cultivo de micelios, lado izquierdo el micelio de *Aspergillus niger* y en el lado derecho el micelio de *Rhizopus spp*.

4.4. Acondicionamiento a distintas concentraciones de Plomo (II) y Cadmio (II).

En esta etapa con el objetivo de apreciar hasta qué concentración de metal toleraban los hongos, se sometieron a distintas concentraciones, diversos estudios mencionan que las cepas fúngicas son más resistentes a altas concentraciones de metales que las cepas bacterianas.

Alluri H.K. et al., (2007); Doshi H. et al., (2008), indican que los microorganismos como bacterias, hongos, algas y levaduras concentran metales pesados en diferentes capacidades, en condiciones inactivados o vivos, cuando son utilizados para la eliminación de metales pesados de los diversos tipos de cuerpos de agua

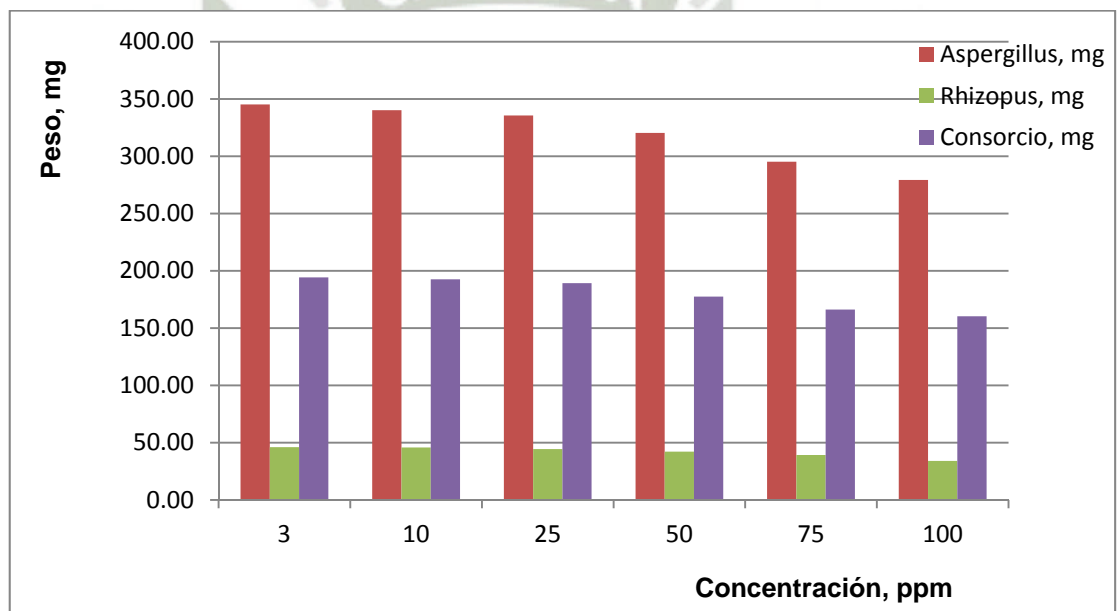


Figura 41. Desarrollo de las cepas fúngicas *Aspergillus niger*, *Rhizopus spp* y el consorcio Asp-Rhi.

En la figura 41, se aprecia que *Aspergillus niger* es quien llega a tener mayor biomasa, seguido del consorcio.

Al principio cuando se ensayó a 3 ppm de Plomo y Cadmio los hongos no presentaban dificultades para su desarrollo, lo mismo sucedió a 10, 25 y 50 ppm, pero llegado a probar a una concentración de 75 ppm se apreciaba la disminución de biomasa fungal e

inclusive que retardaba ligeramente el desarrollo, cuando se llegó a 100 ppm, esto se corrobora ya que la biomasa formada era mucho menor en comparación a la cinética sin la presencia de Plomo y Cadmio.

El acondicionamiento a distintas concentraciones es muy importante porque de alguna u otra forma se genera un nivel de resistencia a las cepas y esto permite que en el desarrollo de la biomasa, estos no se vean tan perjudicados, por ejemplo la toxicidad que ejercen los metales pesados no permite el normal desarrollo de los microorganismos.

Pal et-al, (2010), observó que la cantidad máxima de Cadmio acumulado fue por una cepa de *Aspergillus niger* tolerante a Cadmio y que gran parte del metal fue concentrado en la pared celular del hongo (65.82%). Además muestra que un microorganismo previamente acondicionado a la resistencia de metales, tiende a acumular una mayor cantidad de metal que un microorganismos silvestre. Además señala que generalmente la mayor parte del metal se acumula en la pared celular, más del 20% se distribuye en la fracción citosólica y el resto del metal se distribuye en las fracciones mitocondriales y nucleares con una mayor cantidad en la fracción mitocondrial.

4.5. Determinación de la cinética de desarrollo sin y con metales.

Antes de trabajar es necesario conocer el desarrollo de las cepas con respecto al tiempo ya que esto nos permitirá trabajar con la mayor cantidad de biomasa posible, este aspecto es muy importante ya que en la sorción de metales, es muy importante la cantidad de biosorbente, antes de empezar con los bioensayos de remoción se desarrollo la cinética de las cepas fúngicas.

Las figuras 42,43 y 44 corresponden a las cinéticas de las cepas fúngicas en ausencia de Plomo (II) y Cadmio (II).

En figura N°42, como podemos apreciar el valor de pH más bajo es de *Aspergillus niger*, aunque esto es lógico por la segregación de ácidos principalmente ácido cítrico y oxálico por parte de esta cepa, lo cual hace que el medio se torne ácido.

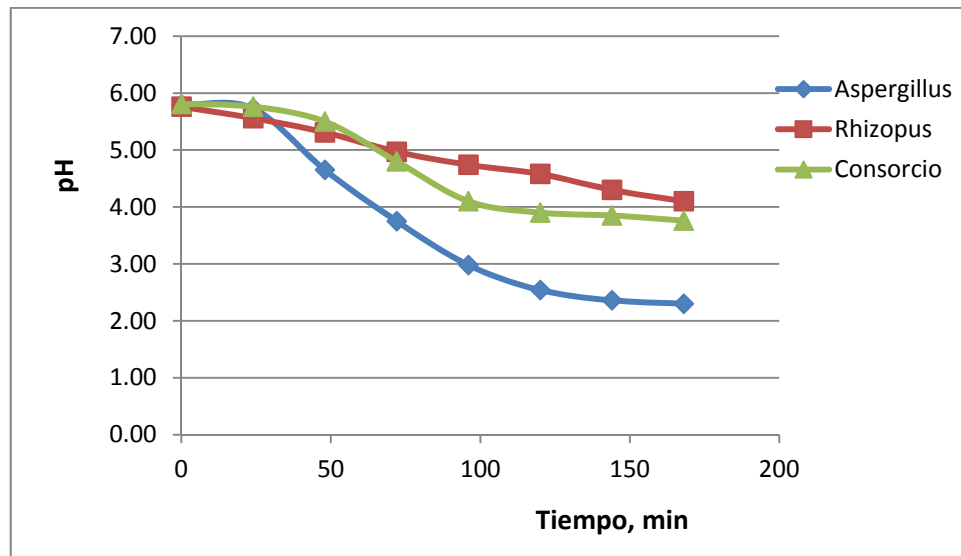


Figura 42. Cinética correspondiente al pH con respecto al tiempo de las cepas de *Aspergillus niger*, *Rhizopus spp* y en consorcio.

En el cultivo de *Rhizopus spp* no disminuye mucho el pH, pero aun así esa disminución es debido a la segregación de ácidos. Soccol C. R. et al., (1994); Yu R. et al., (1991), reportan que especies de *Rhizopus spp* han sido ampliamente utilizados en las industrias modernas de procesamiento de alimentos fermentados tradicionales, producción industrial de enzimas y ácidos orgánicos como fumárico y la producción de ácido láctico

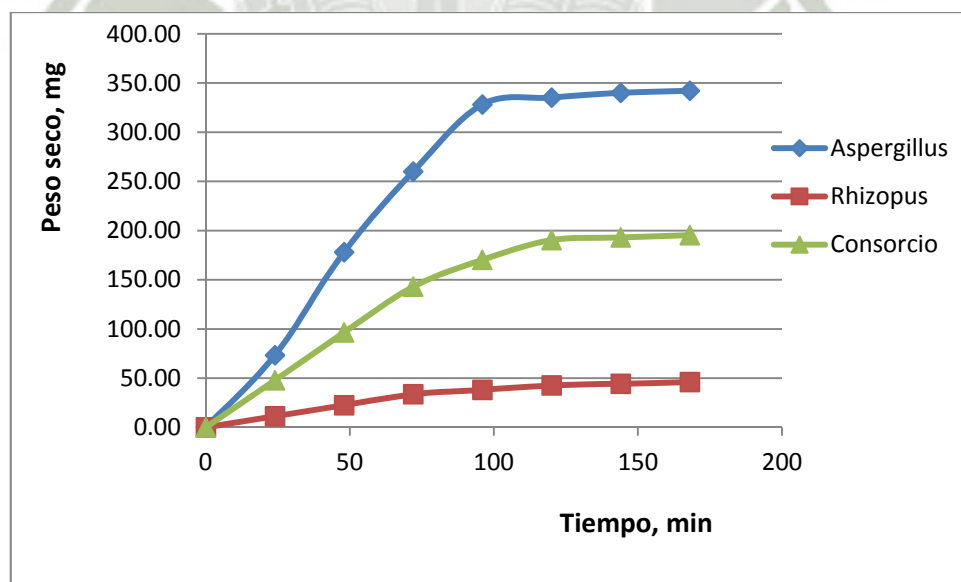


Figura 43. Cinética correspondiente al peso seco con respecto al tiempo de las cepas de *Aspergillus niger*, *Rhizopus spp* y en consorcio.

En la figura 43, quien tiene mayor peso seco es la biomasa de *Aspergillus niger*, debido a que el micelio de *Aspergillus niger* es algo denso y consistente, no es como el de *Rhizopus spp* que es más filamentososo. En la figura 44, se aprecia que el consorcio formado por *Rhizopus spp* y *Aspergillus niger* es la que más consume glucosa

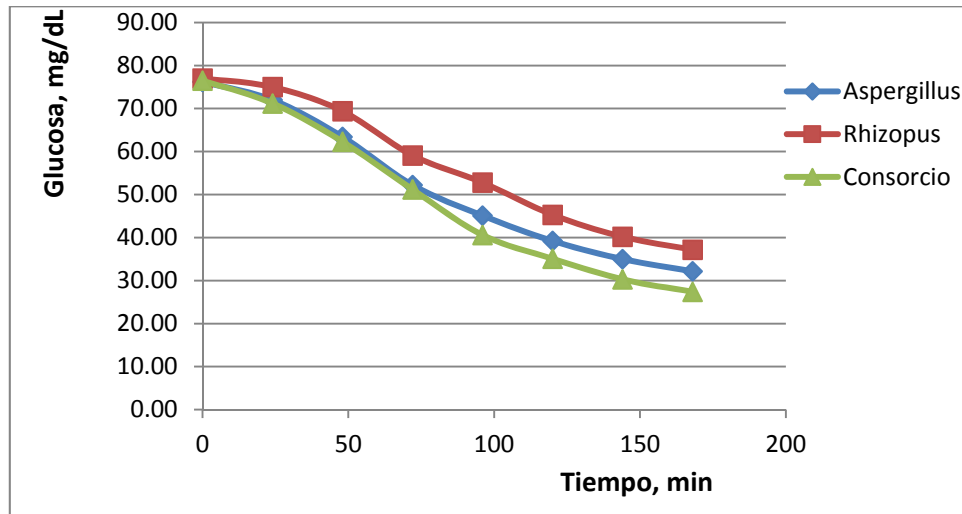


Figura 44. Cinética correspondiente a la glucosa con respecto al tiempo de las cepas de *Aspergillus niger*, *Rhizopus spp* y en consorcio.

A continuación se muestran los gráficos de las cinéticas de las cepas fúngicas con presencia de metales Plomo (II) y Cadmio (II).

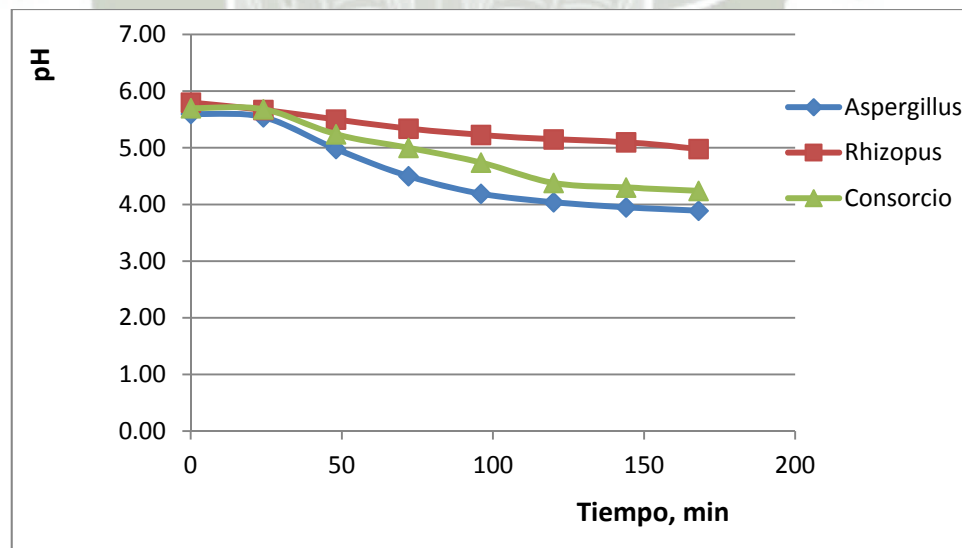


Figura 45. Cinética de pH respecto al tiempo de las cepas de *Aspergillus niger*, *Rhizopus spp* y consorcio, suplementados con Plomo (II) y Cadmio (II).

En la figura 45, se aprecia que el valor de pH más bajo corresponde a *Aspergillus niger*, aun así la presencia de Plomo (II) y Cadmio (II) no influye mucho en el desarrollo de metabolitos por parte de este hongo, esto se refleja en la disminución de pH.

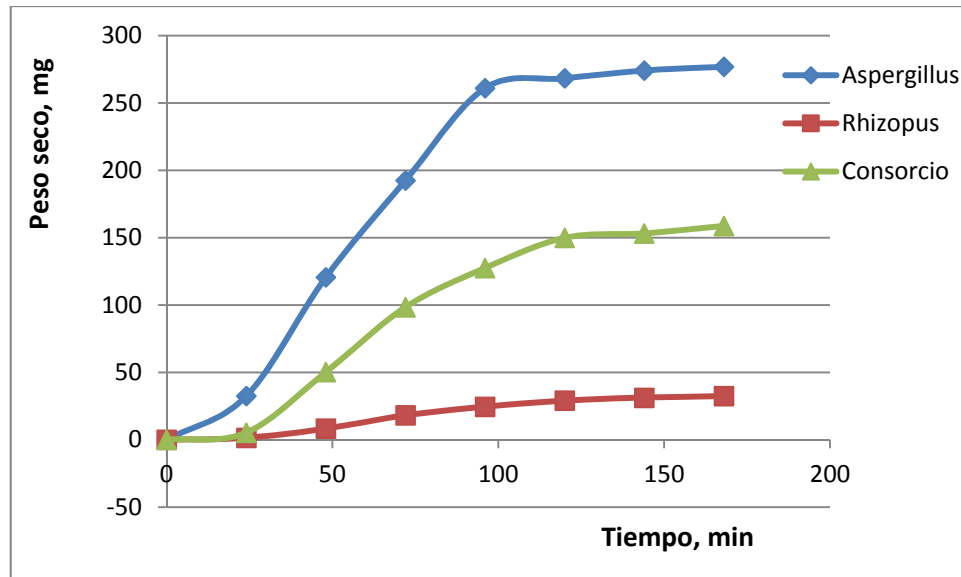


Figura 46. Cinética del peso con respecto al tiempo de las cepas de *Aspergillus niger*, *Rhizopus spp* y consorcio, suplementados con Plomo (II) y Cadmio (II).

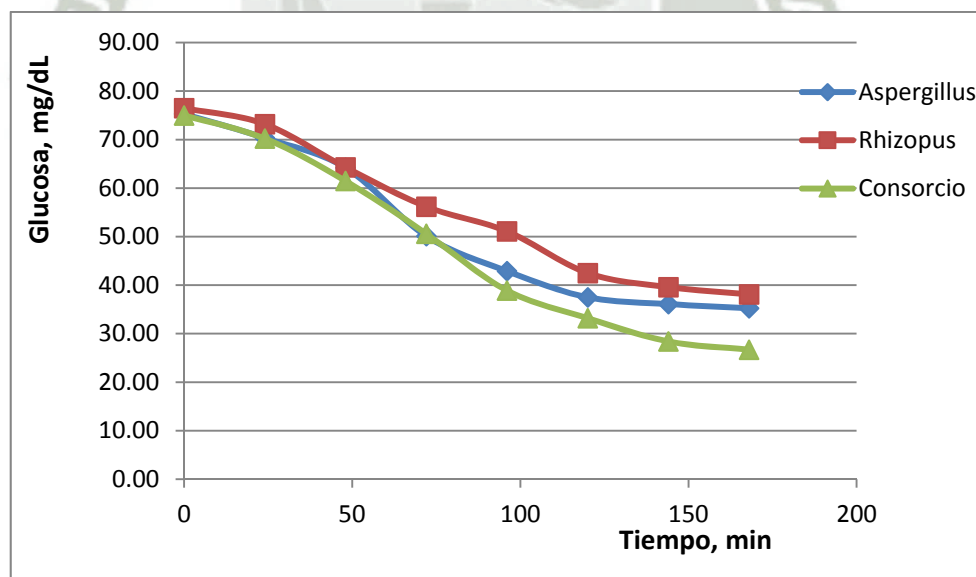


Figura 47. Cinética correspondiente a la Glucosa con respecto al tiempo de las cepas de *Aspergillus niger*, *Rhizopus spp* y consorcio, suplementados con Plomo (II) y Cadmio (II).

En los frascos donde se cultivo los hongos si se pudo apreciar como disminuía el tamaño de la biomasa a mayores concentraciones del metal, de alguna u otra forma la toxicidad de dichos metales afecta.

Vullo D., (2003), indica que la toxicidad de los metales pesados es muy alta si su concentración es alta. Su acción directa sobre los seres vivos ocurre a través del bloqueo de las actividades biológicas, es decir, la inactivación enzimática por la formación de enlaces entre el metal y los grupos -SH (sulfhidrilos) de las proteínas, causando daños irreversibles en los diferentes organismos. Esta toxicidad es reflejada en el impedimento del desarrollo de los microorganismos sometidos a altas concentraciones de metales.

4.6.Cultivo de micelio para los procesos de adsorción.

Antes de cultivar los micelios, primero se determinó el medio más adecuado ya que durante la ejecución de las etapas anteriores se apreció que el principal problema que se tendría es la sobreproducción de esporas en especial de parte de *Aspergillus niger*, lo cual es algo que no se quiere en el sistema que se desarrollará, pero si se quiere una buen cantidad de biomasa. Por lo que se ensayó con distintos medios de cultivo para evitar la formación temprana de esporas.



Figura 48. Cepas de *Rhizopus spp* (Izq.) y *Aspergillus niger* (Der.), se aprecia gran cantidad de esporas por parte de estos hongos.

4.6.1. Determinación del medio más adecuado para el cultivo de hongos *Aspergillus niger* y *Rhizopus spp.*

Tabla 13.
Crecimiento de *Aspergillus* y *Rhizopus* en distintos medios de cultivo.

Medio	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Rhizopus spp.</i>
BHI	+++	+++
Extracto de malta	++++	+++
Caldo Papa dextrosa	++++	++++
Nutritivo	+++	++
Sabouraud	++++	++++

Los resultados del ensayo de distintos medios se muestran en la tabla 13, como se puede apreciar, los medios que mostraron mayor desarrollo sin la formación abundante de esporas fue el caldo Papa dextrosa conjuntamente con el medio Sabouraud. En la figura 49 se aprecia el desarrollo de micelio *Aspergillus niger* en distintos medios.



Figura 49. Micelio de *Aspergillus niger* cultivado en distintos medios de cultivo.

De acuerdo a los resultados obtenidos, los medios más adecuados resultaron ser Sabouraud y el caldo papa dextrosa, pero como desde un principio en este trabajo se proyectó a realizar un sistema que no involucre mucho gasto económico, el medio Sabouraud es relativamente caro frente a los otros medios como el BHI, el Nutritivo, por lo que se optó por trabajar con el caldo papa Dextrosa que también presenta buenos resultados como se puede apreciar en la figura 50.



Figura 50. Micelio de *Aspergillus niger*, *Rhizopus spp* y el consorcio (*Aspergillus niger* y *Rhizopus spp*) respectivamente.

Se cultivo en medio papa dextrosa y a los 5 días el micelio de *Aspergillus niger* ya estaba desarrollado lo mismo sucedió con el micelio de *Rhizopus spp* y en cuanto al consorcio también, aunque de los tres el que ligeramente más rápido se desarrollaba era el micelio de *Aspergillus niger*.

4.7. Ensayos preliminares de remoción de Plomo (II) y Cadmio (II)

Esta etapa es muy importante ya que con esto se quiere conocer en qué cantidades Plomo (II) y Cadmio (II) son removidos por parte de la biomasa de *Aspergillus niger*, *Rhizopus spp* y consorcio *Aspergillus niger* y *Rhizopus spp*. Kapoor A. et al., (1999), demuestran que muchos tipos de hongos son capaces de eliminar o recuperar iones de metales a partir de soluciones acuosas, entre estos hongos están *Aspergillus niger*, *Mucor racemosus*, hongo *Phanerochaete*. La capacidad de biosorción de estas biomásas se debe a la potencial cantidad de compuestos orgánicos capaces de secuestrar y/o intercambiar iones metálicos. Arica, M. et al., (2004), indican que entre los grupos funcionales que presentan características quelantes se mencionan los grupos carboxilos, fosfatos, amidas, tioles, hidroxilos, quitina, gluco-proteínas, los cuales juegan un rol importante en la bioadsorción de metales pesados.

4.7.1. Remoción por parte de *Aspergillus niger*, *Rhizopus spp* y consorcio.

Este experimento tuvo como finalidad determinar cuál de las biomásas fungales era el más adecuado para llevar a cabo el proceso de remoción, esto se determinó mediante el

porcentaje de remoción que tuvieron cada uno. En la figura 51, se aprecia el micelio desarrollado de *Aspergillus niger*, *Rhizopus spp* y consorcio.



Figura 51. Micelios de *Aspergillus niger* (Izq.), *Rhizopus spp* (medio) y consorcio Asp-Rhi (Der.).

Como se aprecia en la tabla 14, *Rhizopus spp* es la cepa que mas remueve los metales Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla.

Tabla 14.
Remoción de Plomo, Cadmio y mezcla por parte de las cepas.

	<i>Rhizopus spp</i>	<i>Aspergillus niger</i>	Consortio	Nivel de significancia
Plomo(II)	86.39%	74.19%	84.17%	P>0.05 (entre Rhi. y Con.)
Cadmio(II)	69.23%	44.72%	43.42%	P>0.05 (entre Asp. y Con.)
Mezcla	74.82%	66.90%	53.43%	P<0.05

Tras realizar el análisis estadístico (apéndice 4) al tiempo final mediante la prueba de Tuckey, se determinó que no existe diferencia estadística entre los porcentajes de remoción para Plomo (II) por parte de *Rhizopus spp* y consorcio. En cuanto a Cadmio no existe diferencia estadística entre los porcentajes de remoción parte de *Aspergillus niger* y consorcio. Y para la mezcla de los metales Plomo (II) y Cadmio (II) se observa que el nivel de significancia es menor a 0.05, por lo que si existe diferencia estadística entre los porcentajes de remoción por parte de los *Aspergillus niger*, *Rhizopus spp* y consorcio Asp - Rhi. Por lo que se afirma que el tipo de micelio fungal afecta

significativamente en la remoción de los metales de Plomo (II) y Cadmio (II) y esto se debe principalmente a la composición que tiene cada biosorbente.

Navarro A. E. et-al., (2006), indican que la capacidad de biosorción de estas biomazas se debe a la potencial cantidad de compuestos orgánicos capaces de secuestrar y/o intercambiar iones metálicos, entre los cuales destacan, polialginatos, péptidoglucanos, polisacáridos, glicoproteínas, fucanoides, compuestos heterocíclicos, flavonoides, etc., en los cuales los centros atrayentes de cationes son los grupos funcionales amino, hidroxilo, carboxilato, fosfato, sulfhidrilos, etc.

Navarro A. E. et-al., (2006), mencionan que para remoción de Ni^{+2} , Cd^{+2} , Au^{+3} , Pb^{+2} , por parte de *S. cerevisiae* (levadura) el biopolímero involucrado es el péptidoglucano. En cambio en el hongo *Mucor rouxii* para la remoción de Cd^{+2} , Ni^{+2} , Zn^{+2} , Pb^{+2} , el biopolímero involucrado es el Quitosano y los polisacáridos.

Gadd, (2000), mencionan que resulta interesante la utilización de una combinación de la solubilización microbiana del Pb de la piromorfita $\text{Pb}_5(\text{PO}_4)_3\text{Cl}$, mediada por el hongo *Aspergillus niger* con la acumulación del metal disuelto por parte de plantas que crecen en suelos contaminados con dicho metal. La bioacumulación es otro proceso en el cual una vez incorporado el metal pesado al citoplasma, este es secuestrado por la presencia de proteínas ricas en grupos sulfhidrilos llamadas metalotioninas o compartimentalizado dentro de una vacuola, como ocurre en hongos.

En las figuras 52, 53 y 54 se aprecia la cinética de remoción para los metales Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla. En la figura 52 se aprecia hay una mayor remoción de Plomo (II) por parte de *Rhizopus spp*, en la figura 53, se observa que hay mayor remoción por parte de *Rhizopus spp*. En la figura 54, se observa que la mayor remoción de la mezcla de Plomo (II) y Cadmio (II), se da al trabajar con la biomasa de *Rhizopus spp* seguido de la biomasa de *Aspergillus niger*.

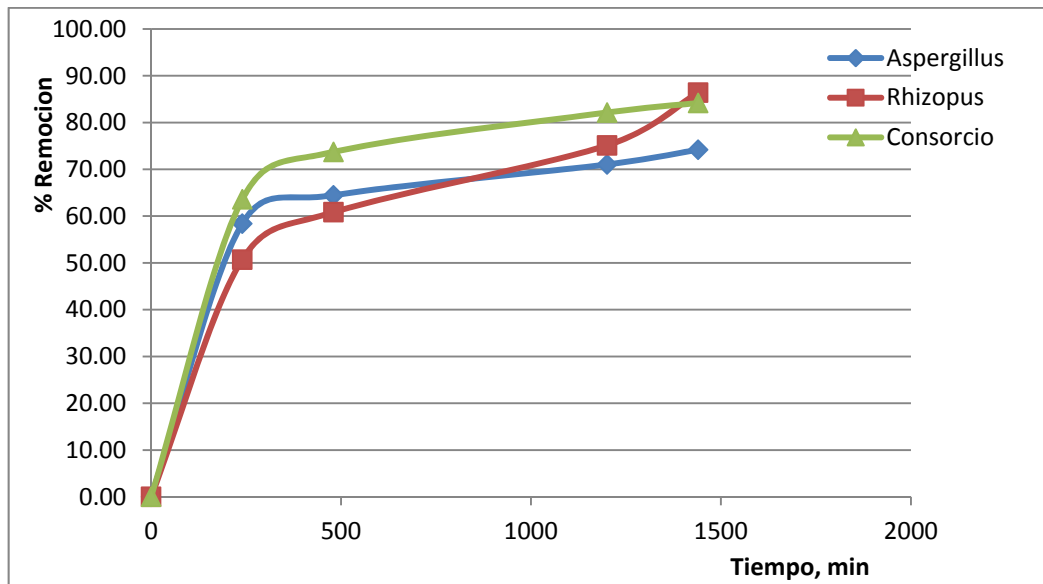


Figura 52. Cinética de remoción de Plomo (II) para *Aspergillus niger*, *Rhizopus spp* y consorcio Asp- Rhi.

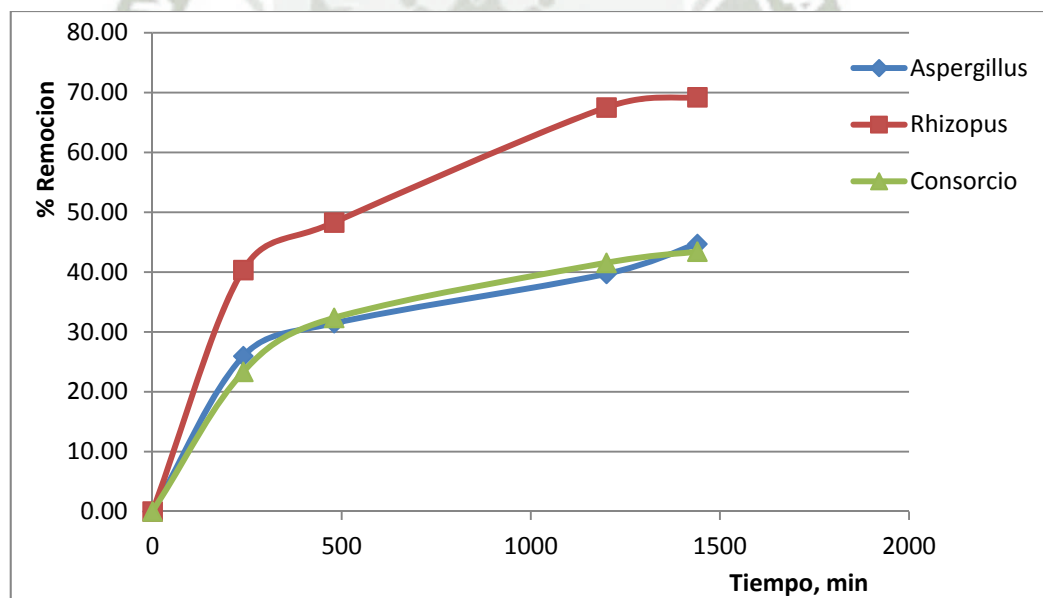


Figura 53. Cinética de remoción de Cadmio (II) para *Aspergillus niger*, *Rhizopus spp* y consorcio.

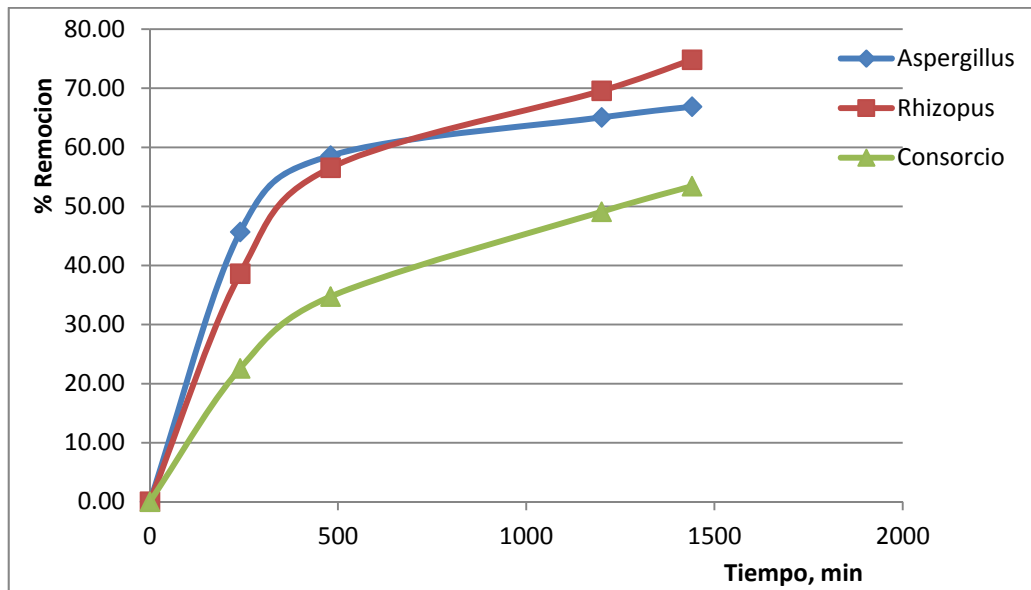


Figura 54. Cinética de remoción de Plomo (II) y Cadmio (II) para *Aspergillus niger*, *Rhizopus spp* y consorcio.

Pal et-al, (2010), reportaron que un 65.82% de Cadmio fue acumulado en la pared celular de *Aspergillus niger*. La siguiente concentración más alta del metal se encuentra en la fracción citosólica ($28,87 \pm 3,26\%$). El resto del metal está distribuido en las fracciones mitocondrial y nuclear, con mayor cantidad presente en la fracción mitocondrial.

Esta diferencia en las capacidades de remoción en los resultados principalmente difieren a que la composición del micelio fungal es distinto tanto para *Rhizopus spp* y *Aspergillus niger*.

Pal et-al, (2010), señalan que los grupos funcionales de la superficie del hongo podría actuar como ligandos para metales.

En las figuras 55, 56 y 57 se aprecia la capacidad de biosorción de Plomo (II) y Cadmio (II) y cuyos valores están en la tabla 2.2. Como se puede apreciar en la figura 55 al trabajar con *Aspergillus niger* existe una mayor capacidad de biosorción para Plomo (II). En la figura N°56 al trabajar con *Rhizopus spp* se observa que existe una mayor capacidad de biosorción para Plomo (II) y en la figura N°57 al trabajar con el consorcio existe mayor capacidad de biosorción para Plomo (II).

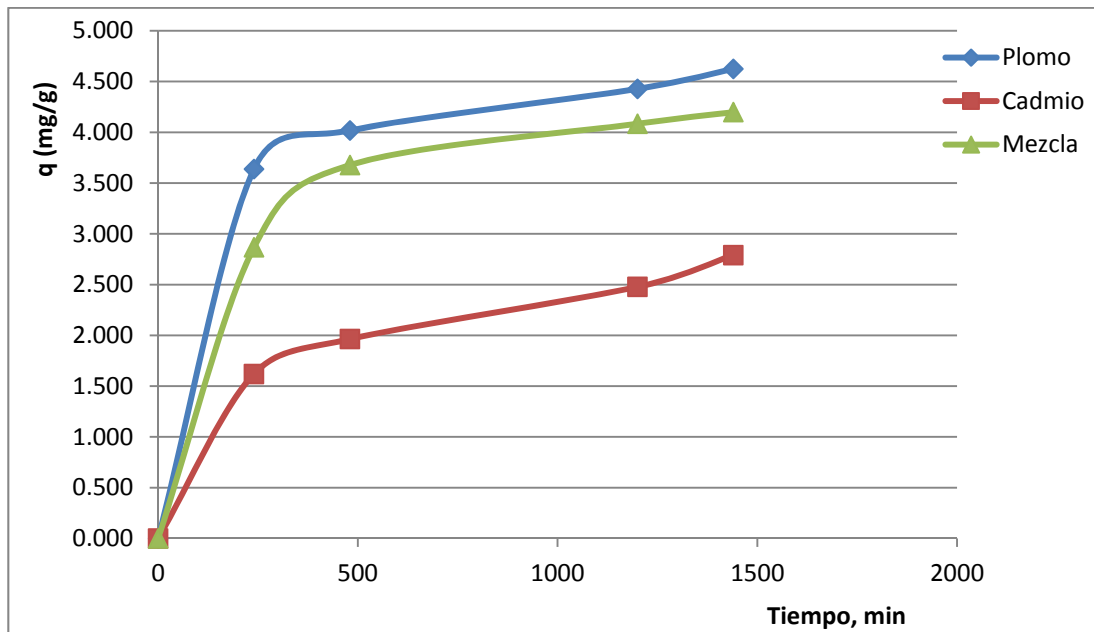


Figura 55. Capacidad de biosorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla por *Aspergillus niger*.

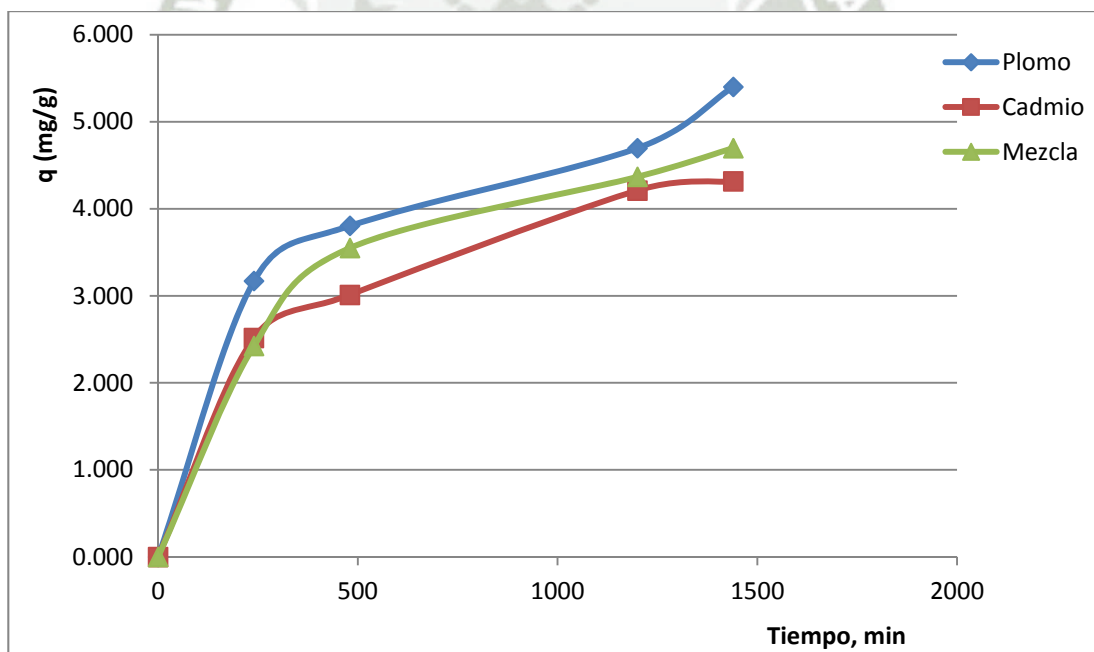


Figura 56. Capacidad de biosorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla por *Rhizopus spp.*

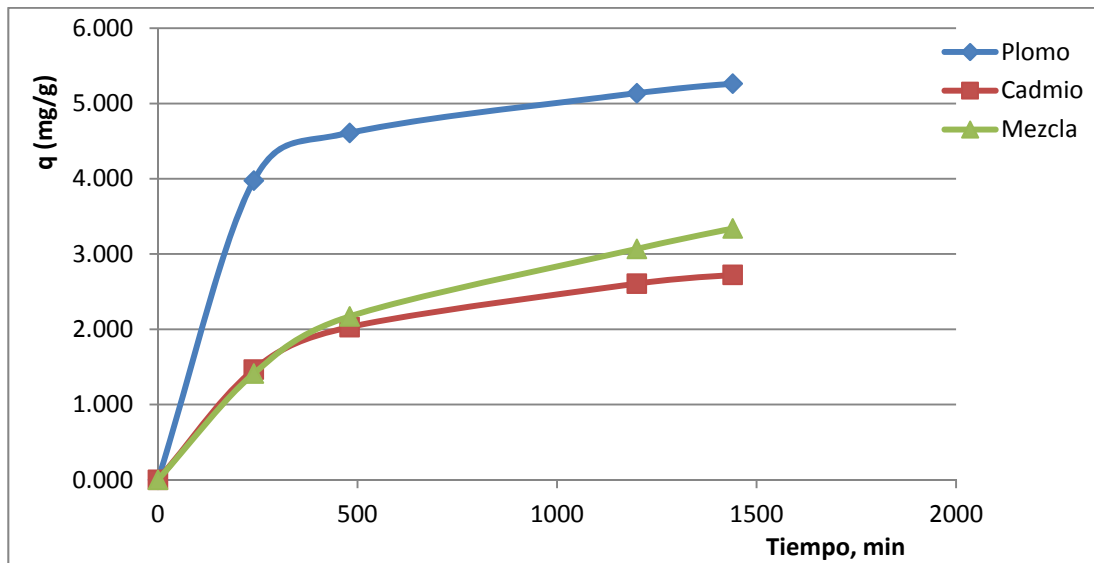


Figura 57. Capacidad de biosorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla por consorcio *Aspergillus niger* - *Rhizopus spp.*

Como se puede apreciar en los resultados anteriores tanto *Rhizopus spp* y *Aspergillus niger* tienen la capacidad de remover los metales Plomo (II) y Cadmio (II). En procesos de sorción de metales, diversos parámetros influyen como el pH, temperatura, etc. Gutiérrez et ál. (2005), mencionan que los diversos factores influyen en la biosorción de metales pesados usando biomasa fúngica. Entre estos factores se incluyen las propiedades químicas de la superficie celular y las condiciones fisico-químicas de la solución, entre ellas el pH, la temperatura, la concentración inicial del metal, la fuerza iónica, entre otros. Por tal razón se ensayo a distintos valores de pH, temperatura, biomasa y concentración.

4.7.2. Selección del micelio fungal más eficiente.

De acuerdo con los resultados que se obtuvo, se eligió trabajar con *Rhizopus spp* porque es el que mayor cantidad de metal remueve tanto en Plomo (II) y Cadmio (II), se procedió a cultivar el micelio de *Rhizopus spp*, en la figura N°58 se aprecia el cultivo de estas, el desarrollo de estos micelios es bastante uniforme.



Figura 58. Cultivo del micelio de *Rhizopus spp.*

Ahmad I. et-al (2005) Reporta que *Rhizopus sp.* Presenta una mayor bioadsorción de Cromo y Cadmio en comparación con *Aspergillus sp.*

Rhizopus spp presenta como característica principal que es un hongo algodonoso lo cual hace que abarque todo el frasco desarrollando una buena cantidad de biomasa como se puede apreciar en la figura N°59. Y en la figura N°60 se aprecia el micelio de *Rhizopus spp* retirado del medio de cultivo

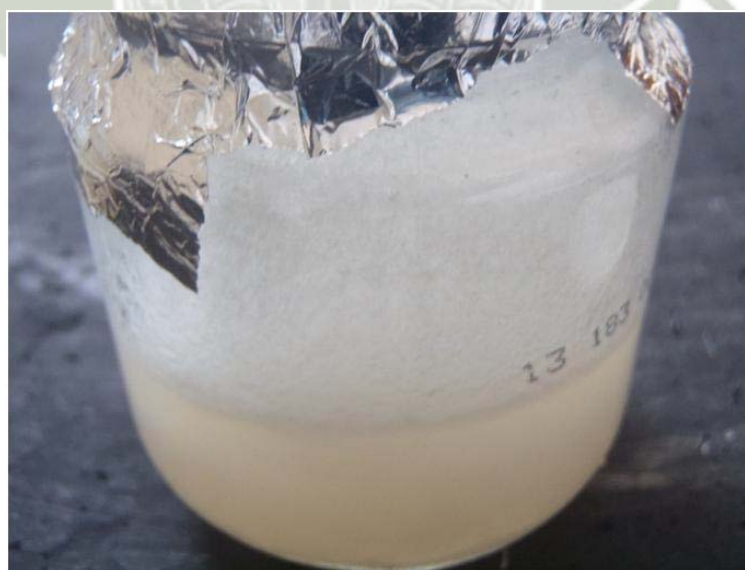


Figura 59. Micelio desarrollado de *Rhizopus spp.*



Figura 60. Micelio de *Rhizopus spp* empleados en los ensayos de remoción.

4.8. Ensayos de remoción de los metales Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla.

Para tener una eficiencia mayor en la remoción de los metales Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla, mediante el empleo del micelio de *Rhizopus spp*, se evaluó la influencia del pH, temperatura, biomasa y concentración de metal. Mediante los análisis estadísticos se determinó cuales eran los valores óptimos para cada parámetro, permitiendo de esta manera encontrar las condiciones óptimas para la remoción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla mediante el uso de la biomasa de *Rhizopus spp*.

4.8.1. Efecto pH

Aksu Z., (2001); Navarro A.E. et-al., (2006), mencionan que el pH es uno de los más importantes parámetros en los procesos de sorción de iones de metales de una solución acuosa. Ahuja, P. et al., (1999), indica que se debe considerar que los sitios de adsorción metálica en la superficie celular, y la disponibilidad de metal en una solución, son afectados por el pH, reconociendo su fuerte influencia en el proceso de biosorción. En el presente trabajo al ensayar a distintos valores de pH se apreció como influía en la remoción de Plomo y Cadmio.

La conformación de la pared celular de los hongos influye mucho en los procesos de sorción de metales. Cruz et al., (2004), indican que *Rhizopus cohnii*, su alto contenido en grupos ionizables (grupos carboxilo de manurónico y gulurónico) en la pared de la

célula polisacáridos, hace que al menos en teoría muy responsable para influir en el pH del fluido.

En la figura N°61, se aprecia el porcentaje de remoción para Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla (Plomo (II) y Cadmio (II)), mediante el uso de la biomasa de *Rhizopus spp*, al trabajar con pH 3, 4 y 5.

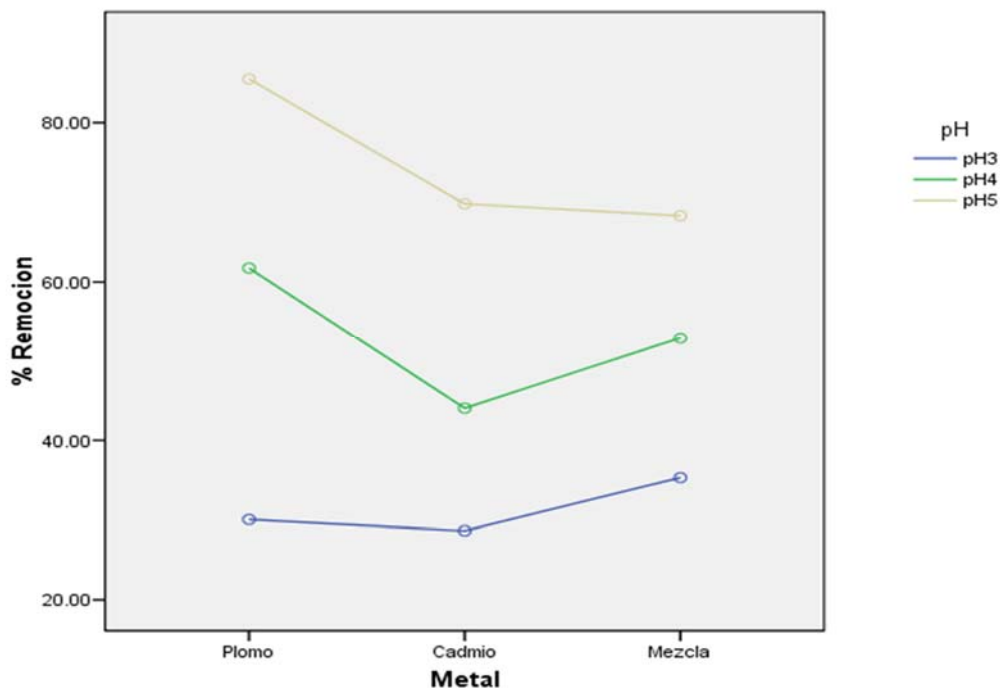


Figura 61. Porcentaje de remoción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla a distintos valores de pH.

De acuerdo a la figura 61. La biomasa de *Rhizopus spp* trabajando a pH 3 remueve el Plomo (II) en 30.06%, Cadmio (II) 28.65% y la mezcla en 35.30%. Por otra parte trabajando a pH 4 remueve Plomo (II) en 61.75%, Cadmio (II) 44.04%, y la mezcla en 52.90%. Y trabajando a pH 5 se logra remover Plomo (II) en 85.49%, Cadmio (II) 69.81%, y la mezcla en 68.32%. Diversos autores demuestran la capacidad de remoción de los metales Plomo y Cadmio por parte de cepas fúngicas se da mejor a pH superiores a 2 e inferiores a la neutralidad. Por los resultados obtenidos podemos decir que el

mayor porcentaje de remoción de los metales Plomo, Cadmio y mezcla se dio a un pH 5.

Tras realizar el análisis estadístico mediante la prueba ANOVA y el test de Tuckey (ANEXO 2) al final del ensayo para Plomo (II), se observa que el nivel de significancia es menor a 0.05, por lo que se determinó que existe diferencia estadística entre los porcentajes de remoción para Plomo (II) trabajando a pH 3, pH 4 y pH 5 por parte de *Rhizopus spp.* En cuanto a Cadmio se observa que el nivel de significancia es menor a 0.05, por lo que se establece que existe diferencia estadística entre los porcentajes de remoción para Cadmio(II) trabajando a pH 3, pH 4 Y pH 5 por parte de *Rhizopus spp.* Y para la mezcla de los metales Plomo (II) y Cadmio (II) se observa que el nivel de significancia es menor a 0.05, por lo que se determinó que existe diferencia estadística entre los porcentajes de remoción para mezcla trabajando a pH 3, pH 4 Y pH 5 por parte de *Rhizopus spp.* Estos resultados confirman que el valor de pH influye fuertemente en la remoción de metales pesados como Plomo (II) y Cadmio (II). Por los resultados mencionados anteriormente se determina que el pH 5 es el más adecuado para la remoción de Plomo (II) y Cadmio (II) mediante el uso de la biomasa de *Rhizopus spp.*

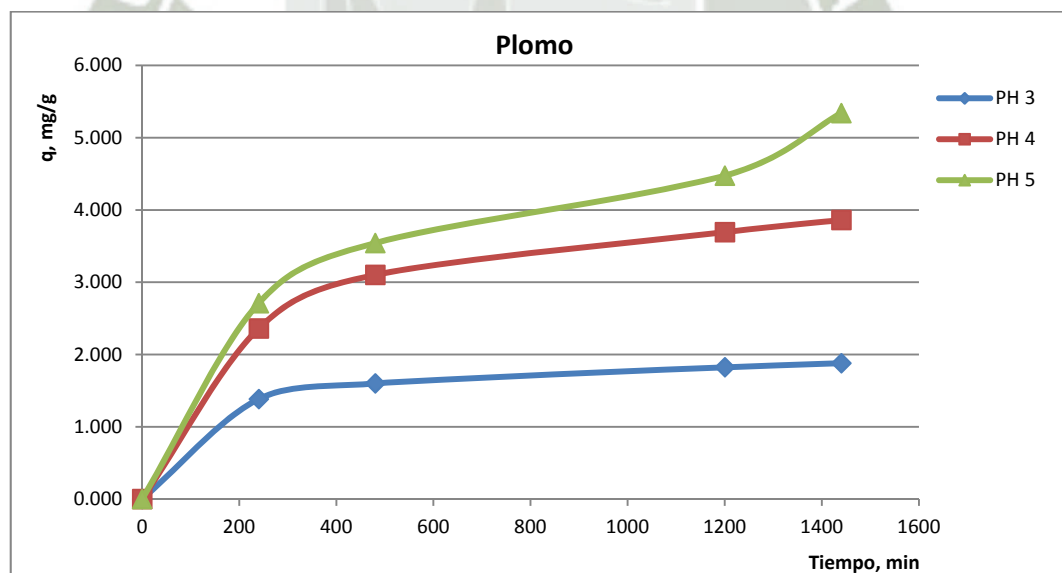


Figura 62. Capacidad de biosorción de Plomo (II) por *Rhizopus spp.* a distintos valores de pH.

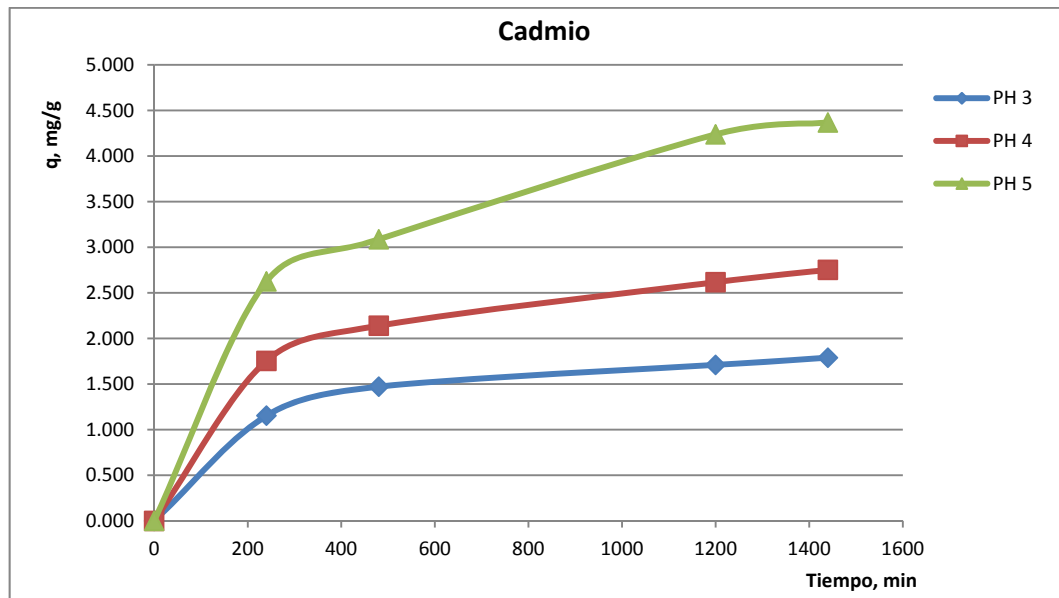


Figura 63. Capacidad de biosorción de Cadmio (II) por *Rhizopus spp* a distintos valores de pH.

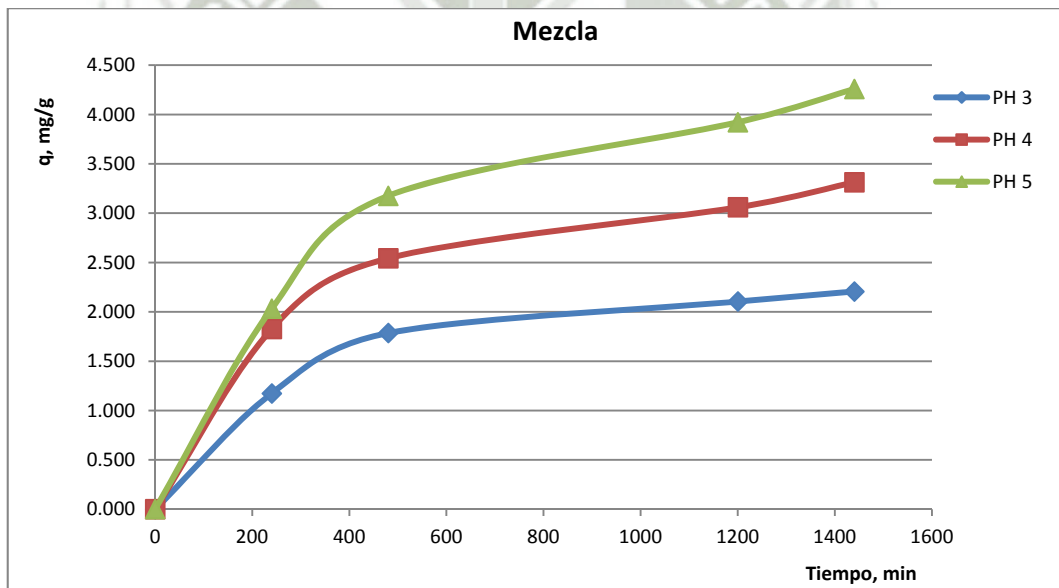


Figura 64. Capacidad de biosorción de la mezcla (Plomo (II) y Cadmio (II)) por *Rhizopus spp* a distintos valores de pH.

Como se aprecia en las figuras 62, 63 y 64, la influencia del pH en el proceso de adsorción es muy fuerte, con el transcurrir del tiempo los niveles de concentración de los metales van disminuyendo, a pH 3 y 4 existe la remoción de los metales pero se ve más favorecida al trabajar a un pH 5, podemos decir que la mejor remoción de Plomo (II) y

Cadmio (II) se dio a un pH 5, en algunos estudios también determinan valores cercanos a 5 como pH óptimo para remoción de Plomo (II) y Cadmio (II) mediante el uso de biosorbentes como por ejemplo:

Jin-ming et-al, 2010, trabajaron la biosorción de Cadmio con *Rhizopus cohnii*, reportando que a pH inferior a 2.0 no se observa casi ninguna sorción, en cambio la sorción de Cadmio se vio favorecida cuando trabajaron en pH entre el rango de 4.5 y 6.5 estableciendo una óptima a pH 4.5

Por su parte Al-Garni, 2009, reporta que se logra un mayor remoción de Cadmio cuando se trabajó a un pH de 5, empleando la biomasa de *Aspergillus fumigatus*, logrando obtener un 99% de remoción.

Pauro R. et-al, 2009, reportan que la mayor eficiencia de bioadsorción de Plomo por *Saccharomyces cerevisiae* se dió a 5.14, mientras que a pH más ácidos influyen negativamente en la bioadsorción.

a. Modelo de Primer orden

En este modelo matemático, se determinó la cantidad de sustancia adsorbida (q_{-1}) y la constante de adsorción (k_{-1}) en función al valor del pH. Los resultados de la cinética de adsorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla (Pb y Cd) en biomasa de *Rhizopus spp* en el modelo matemático de primer orden se muestran en la tabla 15.

Tabla 15.
Resultados del proceso de adsorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla en biomasa de Rhizopus spp, obtenidos en el modelo matemático de primer orden a diferentes valores de pH (3, 4 y 5).

PH	Plomo			Cadmio			Mezcla		
	r	q_{-1} mg/g	k_{-1} min ⁻¹	r	q_{-1} mg/g	k_{-1} min ⁻¹	r	q_{-1} mg/g	k_{-1} min ⁻¹
3	0.9672	1.6693	0.1000	0.9406	1.5380	0.1000	0.9991	2.1930	0.0033
4	0.9271	3.2505	0.1000	0.9959	2.6729	0.0040	0.9038	2.6719	0.1000
5	0.8764	4.0197	0.1000	0.9922	4.3063	0.0033	0.9983	4.2286	0.0028

De acuerdo con los resultados obtenidos en la tabla 16, se puede apreciar los parámetros determinados con el modelo matemático de primer orden R , q_1 y k_1 en el proceso de remoción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla a diferentes pH (3,4 y 5). Se aprecia que la cantidad de sustancia adsorbida en el equilibrio (q_1) calculados en el modelo, muestran que a pH 5 la cantidad de sustancia adsorbida tanto para Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla, es mayor en comparación con los que se obtiene trabajando a pH 3 y 4, Esto nos muestra que existe una mayor adsorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla trabajando a pH 5 mediante el uso del micelio de *Rhizopus spp*. Los coeficientes r calculados en el modelo matemático de primer orden, muestran que los datos experimentales se ajustan a los calculados en el modelo ya que presentan un valor cercano a 1, esto para Cadmio (II) y mezcla.

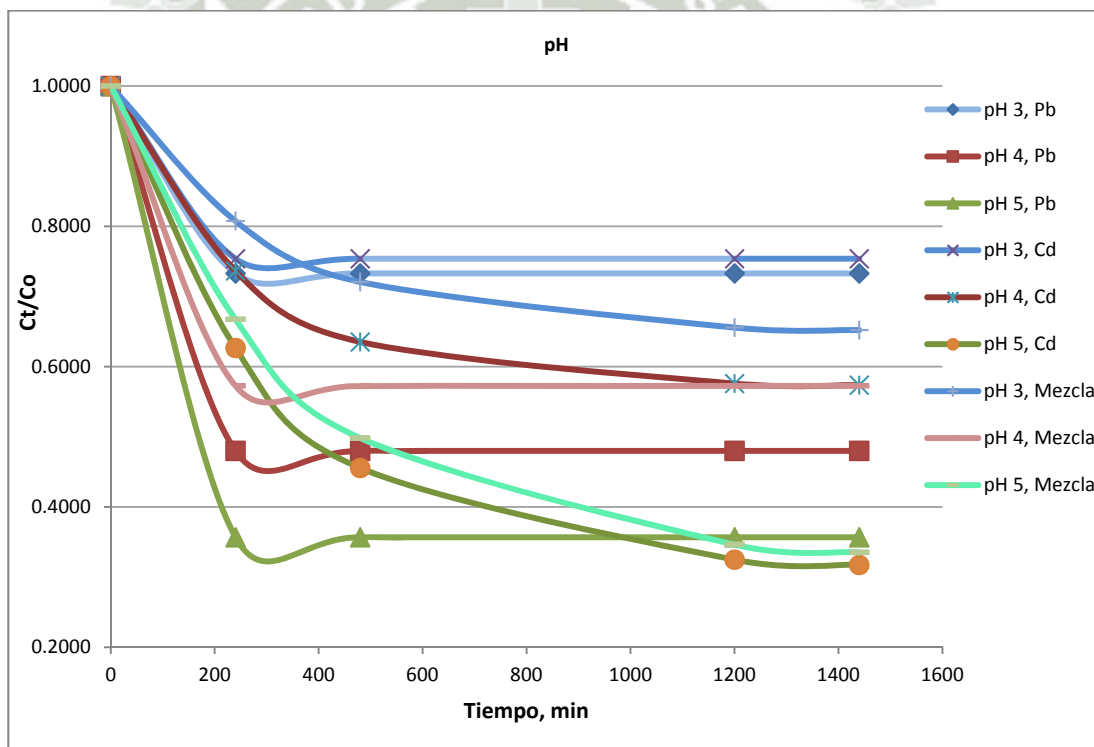


Figura 65. Proceso de bioadsorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla (Plomo (II) y Cadmio (II)) por *Rhizopus spp* a distintos valores de pH, aplicando el modelo de primer orden.

En la figura 65, se puede apreciar la disminución de la concentraciones de los metales , pero la mayor remoción de metal se da al trabajar con un pH de valor 5, el aumento del

valor de pH ayuda a que se favorezca la capacidad de adsorción de los metales Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla.

b. Modelo de Segundo orden

Con este modelo se determinó la cantidad de sustancia adsorbida (q_2), la constante β_2 y la constante de adsorción de segundo orden (k_2) para cada valor de pH. En la tabla N° 16 se muestra los resultados de los parámetros calculados según el modelo matemático de segundo orden, que corresponde a los metales Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla a distintos valores de pH.

Tabla 16.

Resultados del proceso de adsorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla en biomasa de Rhizopus spp, obtenidos en el modelo matemático de segundo orden a diferentes valores de pH (3, 4 y 5).

PH	Plomo				Cadmio				Mezcla			
	r	q_2 mg/g	β_2	k_2 min ⁻¹	r	q_2 mg/g	β_2	k_2 min ⁻¹	r	q_2 mg/g	β_2	k_2 min ⁻¹
3	0.9997	2.0001	0.9993	0.0090	0.9998	1.9872	1.0035	0.0059	0.9975	2.6123	0.9971	0.0038
4	0.9998	4.3631	0.9991	0.0050	0.9992	3.0585	1.0010	0.0053	0.9989	3.8098	0.9960	0.0039
5	0.9922	6.1598	1.0040	0.0030	0.9966	5.0900	1.0019	0.0039	0.9979	5.2162	1.0006	0.0029

Como se puede apreciar en la tabla 17, los parámetros calculados en el modelo matemático de segundo orden, muestran que las cantidades de sustancias adsorbidas en el equilibrio (q_2) calculados a distintos valores de pH aumentan a medida que se aumenta el pH, se aprecia que a pH 5 la cantidad de sustancia adsorbida son mayores en comparación con los pH 3 y 4, lo que nos indica que trabajando a pH 5, se adsorbe mayor cantidad de los metales Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla. Las constantes de adsorción de segundo orden (k_2) muestran que a pH 5 tanto para Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla presentan un valor menor en comparación con el pH 3 y 4, lo que indica que utilizando un pH de 5 la adsorción es más rápida, mientras que utilizando pH 3 y 4 la adsorción es más lenta.

Los coeficientes r calculados en el modelo matemático de segundo orden, muestran que los datos experimentales se ajustan a los calculados en el modelo ya que presentan un valor cercano a 1.

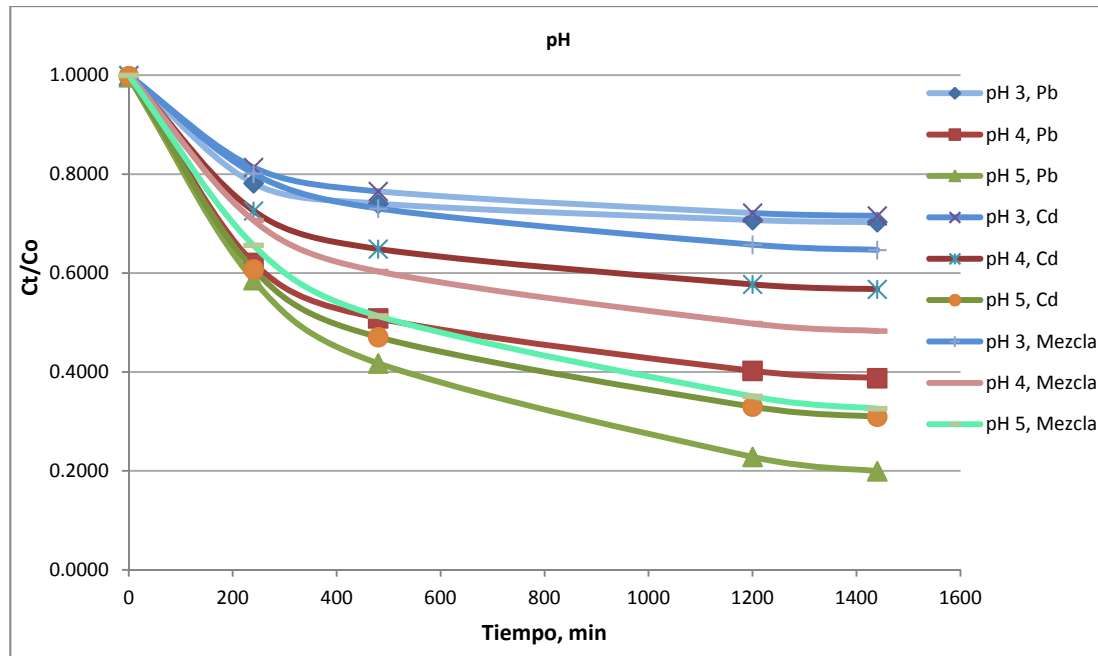


Figura 66. Proceso de bioadsorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla (Plomo (II) y Cadmio (II)) por *Rhizopus spp* a distintos valores de pH, aplicando el modelo de segundo orden.

En la figura 66, nos muestra que a medida que avanza el tiempo las concentraciones de los metales Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla disminuyen, encontrándose que a pH 5 esta disminución es mayor a que a pH 3 y 4, lo que indica que trabajando a un pH 5 se da mayor adsorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla por el micelio de *Rhizopus spp*.

Tras aplicar ambos modelos matemáticos en distintos valores de pH, se contrastaron los valores de los coeficientes r de primer orden y segundo orden, las cuales se muestran en la tabla 3.3 (apéndice 3). De acuerdo a los resultados de la tabla 3.3, podemos decir que tras aplicar los dos modelos, ambos presentan un valor cercano a 1. Pero el segundo modelo matemático presenta mejores valores de r para Plomo (II) 0.9972, Cadmio (II) 0.9985 y mezcla 0.9981 por lo que podemos decir que más se ajusta al modelo de segundo orden.

Tras haber determinado que el pH 5 es el óptimo para la remoción de los metales Plomo (II) y Cadmio (II), se procedió con la variación de temperatura.

4.8.2. Efecto temperatura

Entre otro de los parámetros más importantes para la sorción de metales se encuentra la temperatura, en este trabajo se apreció como influía en la remoción de Plomo (II) y Cadmio (II). De acuerdo a la figura 67. Nos muestra el porcentaje de remoción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla, empleando la biomasa de *Rhizopus spp* trabajando a temperaturas de 10°C, 25°C y 40°C. A la temperatura de 10°C remueve Plomo (II) en 61.92%, Cadmio (II) 50.32% y la mezcla en 43.26%. Por otra parte trabajando a 25°C remueve Plomo (II) en 84.19%, Cadmio (II) 67.35%, y la mezcla en 66.14%. Y trabajando a 40°C remueve Plomo (II) 65.65%, Cadmio (II) 63.21%, y la mezcla en 53.78%. De acuerdo a los resultados obtenidos podemos decir que el mayor porcentaje de remoción se obtiene cuando se trabaja a una temperatura de 25° C, esto es beneficioso ya que en caso de escalar el sistema no requerirá mucha energía extra para poder llegar a esta temperatura.

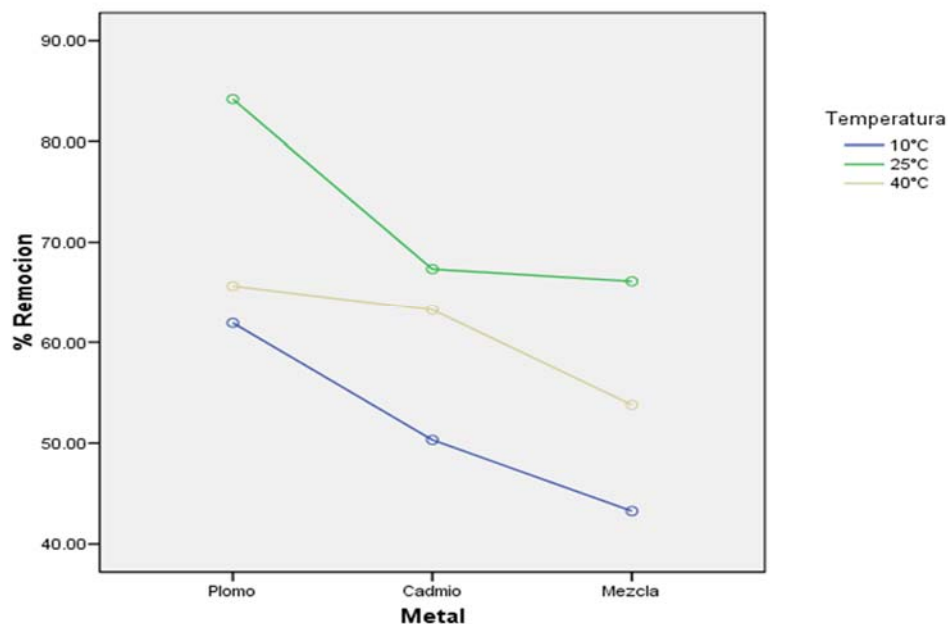


Figura 67. Porcentaje de remoción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla a distintas temperaturas.

Tras realizar el análisis estadístico mediante la prueba ANOVA y el test de Tuckey (apéndice 4) al tiempo final del ensayo para Plomo (II), se observa que el nivel de significancia es menor a 0.05, por lo que se determinó que existe diferencia estadística entre los porcentajes de remoción para Plomo trabajando a temperaturas de 10°C, 25°C y 40°C por parte de *Rhizopus spp.* En cuanto a Cadmio (II) no existe diferencia estadística entre los porcentajes de remoción trabajando temperaturas a 25°C y 40°C por parte de *Rhizopus spp.* Y para la mezcla de los metales Plomo (II) y Cadmio (II) se observa que el nivel de significancia es menor a 0.05, por lo que se determinó que existe diferencia estadística entre los porcentajes de remoción para mezcla trabajando a temperaturas de 10°C, 25°C y 40°C por parte de *Rhizopus spp.*

Por los resultados obtenidos anteriormente se determina que la temperatura de 25°C, es el más adecuado para la remoción de Plomo (II) y Cadmio (II) mediante el uso de la biomasa de *Rhizopus spp.*

Gutiérrez et-al. (2005) Evaluando el efecto de la temperatura de la solución, estos autores reportan que se obtuvo la máxima bioadsorción de Plomo (II) a los 25 °C con biomasa seca de *Saccharomyces cerevisiae*, lo cual indica que la retención del metal está gobernada por un proceso de adsorción física.

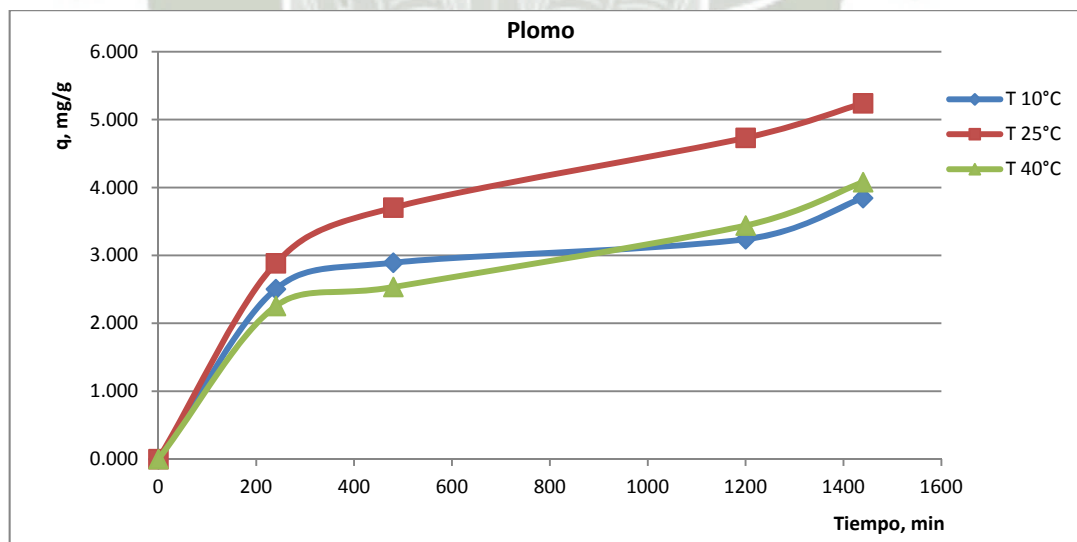


Figura 68. Capacidad de biosorción de Plomo (II) por *Rhizopus spp.* a distintas temperaturas (10, 25 y 40°C)

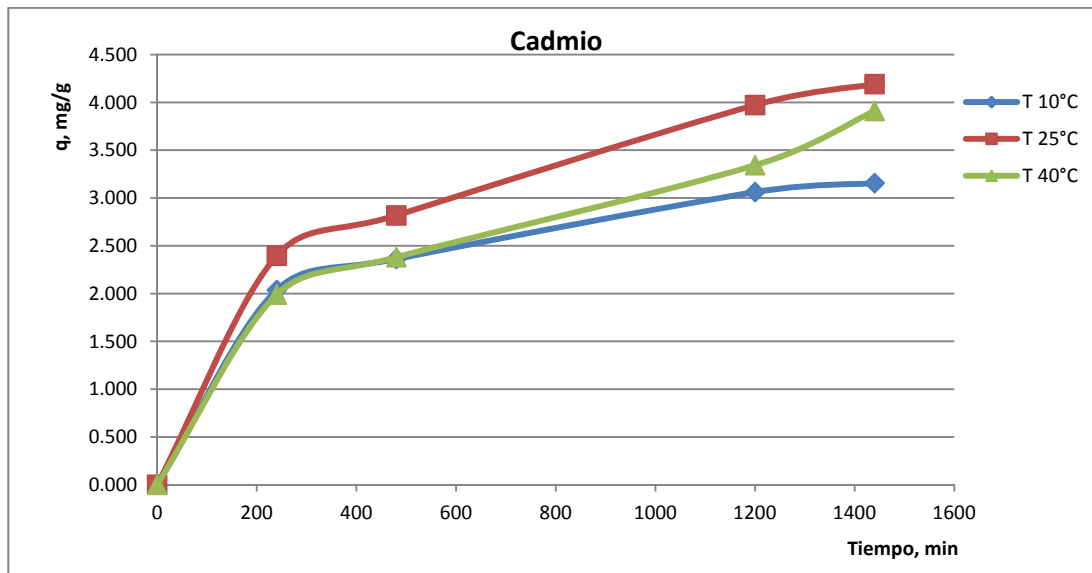


Figura 69. Capacidad de biosorción de Cadmio (II) por *Rhizopus spp* a distintas temperaturas (10, 25 y 40°C)

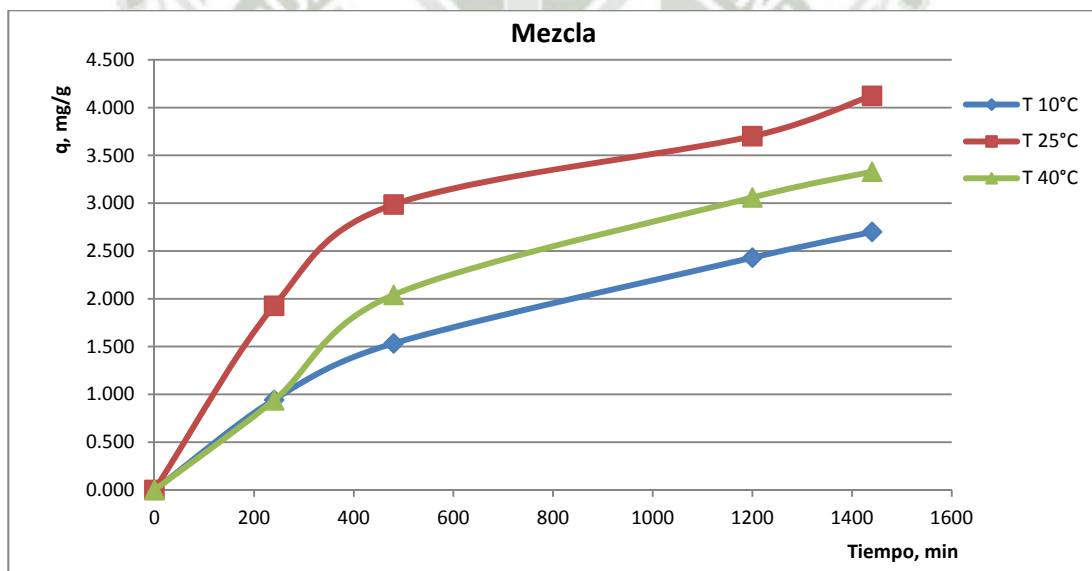


Figura 70. Capacidad de biosorción de la mezcla (Plomo (II) y Cadmio (II)) por *Rhizopus spp* a distintas temperaturas (10, 25 y 40°C)

Como podemos apreciar en las figuras 68, 69 y 70, la influencia de la temperatura en el proceso de sorción es muy fuerte, con el transcurrir del tiempo los niveles de concentración de los metales van disminuyendo, a la temperatura 10°C y 40°C existe la remoción de los metales pero se ve más favorecida al trabajar a una temperatura 25°C,

podemos decir que la mejor remoción de Plomo (II) y Cadmio (II) se dio a una temperatura de 25°C.

Una vez obtenido los resultados anteriores se aplicó modelos matemáticos para realizar la cinética del proceso de adsorción Plomo (II) y Cadmio (II) en la biomasa de *Rhizopus spp*, utilizando los modelos matemáticos de Primer orden y Segundo orden.

a. Modelo de Primer orden

En este modelo matemático, se determinó la cantidad de sustancia adsorbida (q_{-1}) y la constante de adsorción (k_{-1}) en función al valor del la temperatura. Los resultados de la cinética de adsorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla (Pb y Cd) en biomasa de *Rhizopus spp* en el modelo matemático de primer orden se muestran en la tabla n°17.

Tabla 17.
Resultados del proceso de adsorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla en biomasa de Rhizopus spp, obtenidos en el modelo matemático de primer orden a diferentes valores de temperaturas (10, 25 y 40°C).

T °C	Plomo			Cadmio			Mezcla		
	r	q_{-1} mg/g	k_{-1} min ⁻¹	r	q_{-1} mg/g	k_{-1} min ⁻¹	r	q_{-1} mg/g	k_{-1} min ⁻¹
10	0.9428	3.1604	0.1000	0.9297	2.6329	0.1000	0.9991	2.9774	0.0015
25	0.8970	4.1665	0.1000	0.9908	4.1488	0.0030	0.9971	4.0586	0.0027
40	0.8843	3.1148	0.1000	0.8627	2.9707	0.1000	0.7431	2.4007	0.1000

De la tabla 17, Se observa que a partir de los parámetros calculados en el modelo matemático de Primer orden, la cantidad de sustancia adsorbida en el equilibrio (q_{-1}), muestran que a la temperatura de 25°C la cantidad de sustancia adsorbida tanto para Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla, es mayor en comparación con los que se obtiene trabajando a 10°C y 40°C. Esto nos muestra que existe una mayor adsorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla trabajando a 25°C mediante el uso del micelio de *Rhizopus spp*. Aumentando la temperatura no se ve favorecida la adsorción como se aprecia en los resultados obtenidos a 40°, Los coeficientes r , calculados en el modelo matemático

de primer orden, muestran que los datos experimentales se ajustan a los calculados en el modelo ya que presentan un valor cercano a 1, esto para la mezcla.

Las constantes de adsorción de primer orden (k_1) muestran que a la temperatura de 10°C, para la mezcla su constante de adsorción es menor en comparación a 25°C y 40°C, lo que indica que trabajando a 10°C la adsorción es más rápida, mientras que trabajando a 25°C y 40°C, la adsorción es más lenta para la remoción de la mezcla Plomo (II) y Cadmio (II) mediante el uso de *Rhizopus spp.*

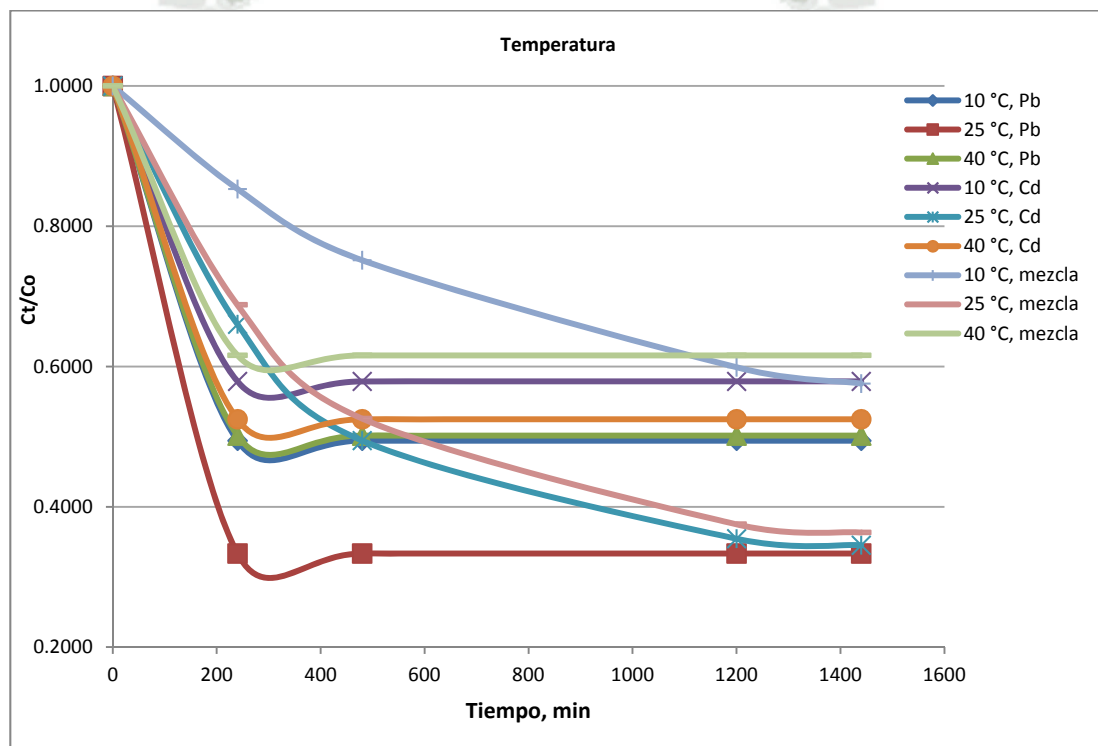


Figura 71. Proceso de bioadsorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla (Plomo (II) y Cadmio (II)) por *Rhizopus spp.* a distintas temperaturas, aplicando el modelo de primer orden.

En la figura 71, se puede apreciar la disminución de las concentraciones de los metales, Sin embargo las concentraciones en equilibrio a una Temperatura de 10°C y 40°C no es tan baja como la que se aprecia a una menor Temperatura (25°C), siendo este el adecuado para una adsorción más favorable.

b. Modelo de Segundo orden

Con este modelo se determinó la cantidad de sustancia adsorbida (q_2), la constante β_2 y la constante de adsorción de segundo orden (k_2) para cada valor de temperatura. En la tabla 18, se muestra los resultados de los parámetros calculados según el modelo matemático de segundo orden, que corresponde a los metales Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla a distintos valores de temperaturas.

Tabla N°18.

Resultados del proceso de adsorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla en biomasa de Rhizopus spp, obtenidos en el modelo matemático de segundo orden a diferentes valores de temperatura (10, 25 y 40°C).

T °C	Plomo				Cadmio				Mezcla			
	r	q_2 mg/g	β_2	k_2 min ⁻¹	r	q_2 mg/g	β_2	k_2 min ⁻¹	r	q_2 mg/g	β_2	k_2 min ⁻¹
10	0.9906	3.9756	1.0119	0.0067	0.9975	3.5252	0.9964	0.0050	0.9996	4.2109	1.0028	0.0012
25	0.9976	6.0713	1.0067	0.0036	0.9956	4.9956	1.0102	0.0033	0.9974	5.0425	1.0015	0.0028
40	0.9865	4.6518	1.0159	0.0032	0.9906	4.7533	1.0216	0.0026	0.9960	5.4525	1.0016	0.0011

De acuerdo a la tabla 18, los parámetros calculados en el modelo matemático de segundo orden, muestran que las cantidades de sustancias adsorbidas en el equilibrio (q_2) calculados a distintas temperaturas, muestran que a un temperatura de 25 °C la constante es mayor en comparación con las temperaturas 10°C y 40°C con respecto a Plomo (II) y Cadmio (II); lo que nos indica que trabajando a 25°C, se adsorbe mayor cantidad de los metales Plomo (II), Cadmio (II). Las constantes de adsorción de segundo orden (k_2) muestran que a 40°C tanto para Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla presentan un valor menor en comparación con el 10°C y 25°C, lo que indica que trabajando a 40°C la adsorción es más rápida, mientras que a las temperaturas de 10°C y 25°C la adsorción es más lenta.

Los coeficientes r calculados en el modelo matemático de segundo orden, muestran que los datos experimentales se ajustan a los calculados en el modelo ya que presentan un valor cercano a 1.

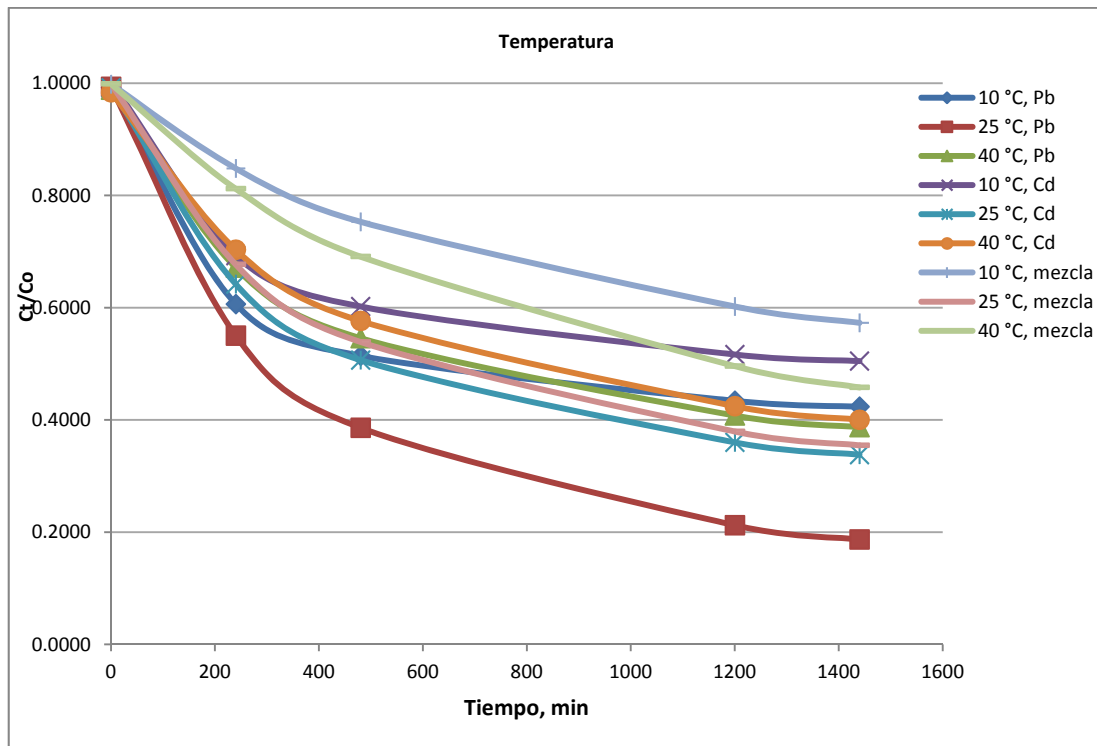


Figura 72. Proceso de bioadsorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla (Plomo (II) y Cadmio (II)) por *Rhizopus spp* a distintas temperaturas, aplicando el modelo de segundo orden.

En la figura 72, nos muestra que a medida que avanza el tiempo las concentraciones de los metales Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla disminuyen, encontrándose que a 25°C esta disminución es mayor a que a 10°C y 40°C, lo que indica que trabajando a 25°C se da mayor adsorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla por el micelio de *Rhizopus spp*.

Tras aplicar ambos modelos matemáticos en distintas temperaturas, se contrastaron los valores de los coeficientes r de primer orden y segundo orden, las cuales se muestran en la tabla 3.6 (apéndice 3). De acuerdo a los resultados de la tabla 3.6, podemos decir que tras aplicar los dos modelos, ambos presentan un valor cercano a 1. Pero el segundo modelo matemático presenta mejores valores de r para Plomo (II) 0.9916, Cadmio (II) 0.9946 y mezcla 0.9976 por lo que podemos decir que más se ajusta al modelo de segundo orden.

Tras haber determinado que la temperatura de 25°C es el óptimo para la remoción de los metales Plomo (II) y Cadmio (II), se procedió con la variación de biomasa.

4.8.3. Efecto biomasa

En la remoción de metales pesados muchas veces se establece una relación directa entre la cantidad removida y la cantidad del sorbente, considerando que a mayor área superficial mayor porcentaje de remoción de metales. Pero no siempre suele cumplirse esta lógica, en los procesos de remoción mucho influye el tamaño de partícula, esto por la disponibilidad de sitios de adsorción. Pero al trabajar con microorganismos específicamente con hongos esto difiere un poco por ejemplo en el caso de *Aspergillus niger*, tras haber desarrollado más del 50% de micelio aun no se aprecia la mayor cantidad de ácidos, pero tras haberse desarrollado completamente el pH baja fuertemente llegando incluso a valores inferiores a 2.7, y esto es diferente con cada hongo por ejemplo *Rhizopus spp* no segrega gran cantidad de ácido.

La Biosorción de Plomo y Cadmio por parte de *Aspergillus niger* y *Rhizopus*, se debe a que la superficie celular de las cepas fúngicas contiene sitios activos o de captación que presentan una gran afinidad por el Plomo y Cadmio, estos se encuentran entre los diferentes constituyentes de la pared celular como entre polialginatos, péptidoglucanos, polisacáridos, glicoproteínas etc., según Navarro A. E. et-al., (2006), mencionan que los centros atrayentes de cationes son los grupos funcionales amino, hidroxilo, carboxilato, fosfato, sulfhidrilos, etc. Al ensayar a distintas cantidades de biomasa se aprecia como influía en la remoción de Plomo y Cadmio. En figura N°73, se aprecia el porcentaje de remoción para Plomo(II), Cadmio(II) y mezcla (Plomo(II) y Cadmio(II)), mediante el uso de distintas cantidades de biomasa (1Micelio, 2MiceliosY 3Micelios) de *Rhizopus spp*.

De acuerdo a la figura 73. La biomasa de *Rhizopus spp* trabajando a biomasa de 1M (1 Micelio), 2M (2 Micelios) y 3M (3Micelios). A la biomasa de 1M remueve Plomo (II) en 28.64%, Cadmio (II) 24.38% y la mezcla en 24.50%. Por otra parte trabajando a 2M remueve Plomo (II) en 54.98%, Cadmio (II) 43.38%, y la mezcla en 44.52%. Y trabajando a 3M, remueve Plomo (II) en 83.83 %, Cadmio (II) 67.42%, y la mezcla en 66.76%. Diversos autores demuestran la capacidad de remoción de los metales Plomo (II) y Cadmio (II) por parte de cepas fúngicas se da mejor a una cantidad de biomasa.

De acuerdo a los resultados obtenidos la mayor remoción de Plomo (II) y Cadmio (II) se dio a biomasa de 3 Micelios.

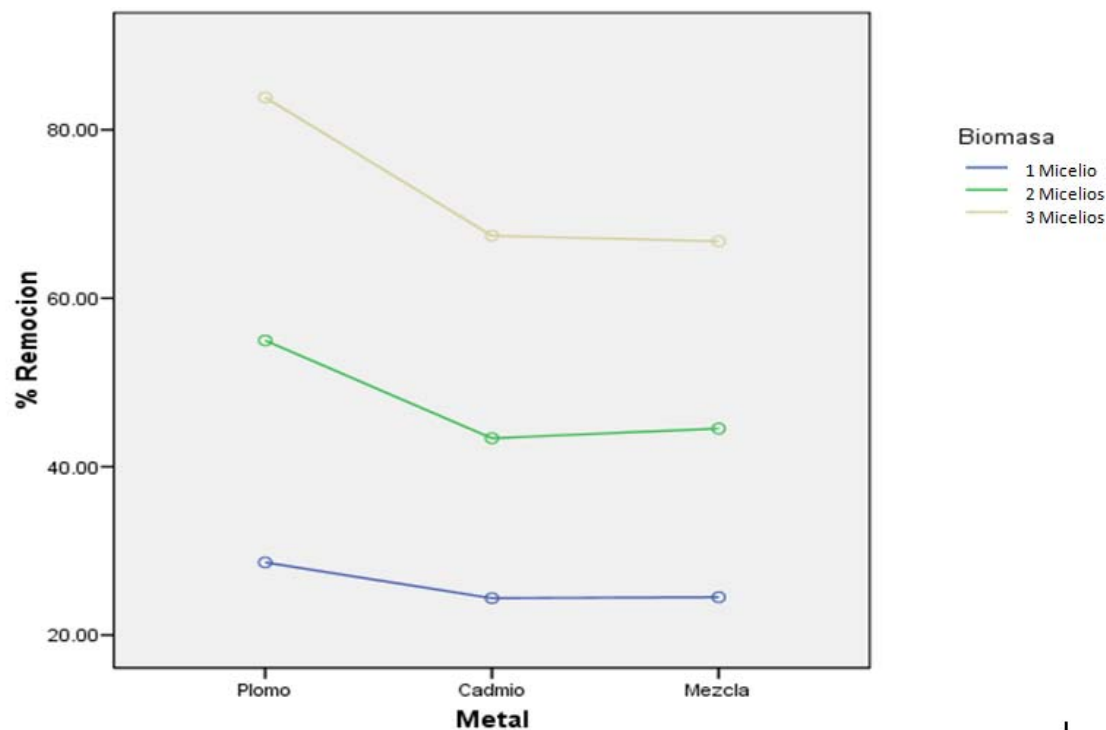


Figura 73. Porcentaje de remoción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla a distintas cantidades de biomasa.

En la figura 74, se aprecia el micelio de *Rhizopus spp* suspendido en agua destilada.

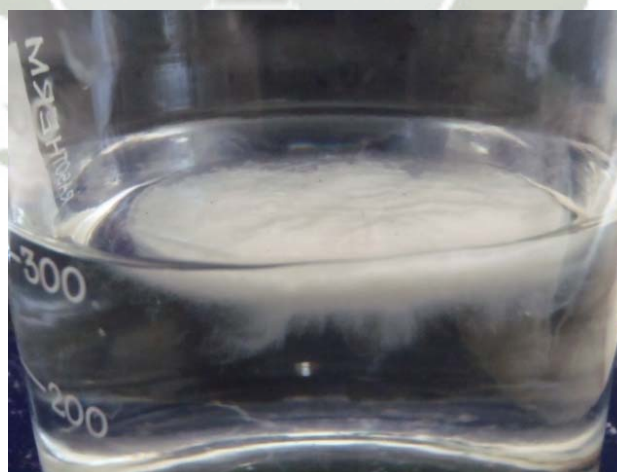


Figura 74. Micelio de *Rhizopus spp*.

Tras realizar el análisis estadístico mediante la prueba ANOVA y el test de Tuckey (apéndice 4) al tiempo final del ensayo para Plomo (II), se observa que el nivel de significancia es menor a 0.05, por lo que se determinó que existe diferencia estadística entre los porcentajes de remoción para Plomo (II) trabajando a biomásas de 1 Micelio, 2 Micelios y 3 Micelios por parte de *Rhizopus spp.* En cuanto a Cadmio se observa que el nivel de significancia es menor a 0.05, por lo que se determinó que existe diferencia estadística entre los porcentajes de remoción para Cadmio (II) trabajando a biomásas de 1 Micelio, 2 Micelios y 3 Micelios por parte de *Rhizopus spp.* Y para la mezcla de los metales Plomo (II) y Cadmio (II) se aprecia que el nivel de significancia es menor a 0.05, por lo que se determinó que existe diferencia estadística entre los porcentajes de remoción para mezcla trabajando a biomásas de 1 Micelio, 2 Micelios y 3 Micelios por parte de *Rhizopus spp.* Con los resultados obtenidos podemos decir que en el presente trabajo se establece una relación directa ya que a mayor cantidad de biomasa mayor cantidad de metal removido.

Ahmad et-al (2005), reportaron que la biomasa muerta de *Rhizopus sp.* Tenía una mayor capacidad de adsorción en comparación a *Aspergillus sp.* Las diferencias se pueden atribuir a la capacidad intrínseca del organismo, su composición química de la pared celular que conduce varios tipos de interacción de los metales con hongos.

Existen diversos estudios en donde se aplica como biosorbente a biomasa viva o muerta, en el presente trabajo se optó trabajar con biomasa fresca por no generar costos, puesto que trabajar con biomasa seca genera costos en el proceso de secado y además porque lo que se buscaba con el desarrollo de este trabajo era ofrecer un sistema sencillo de remoción de metales. Algunos estudios dan a conocer los resultados de trabajar con biomasa viva o muerta como por ejemplo.

Al-Garni, 2009, reportaron que la biomasa viva de *Aspergillus fumigatus* resultó ser la más eficiente respecto a la biomasa seca, en cuanto a la remoción de Cadmio, llegándose a remover hasta un 39.1% al emplear la biomasa viva, frente al 27.8% por parte de la biomasa muerta.

Hassan et-al (2012), reportaron que la biomasa viva de *Aspergillus c.* fue más eficiente para la remoción de Cadmio (II) en comparación con biomasa seca, lograron eliminar el 98.1% de Cd (II), de un efluente residual.

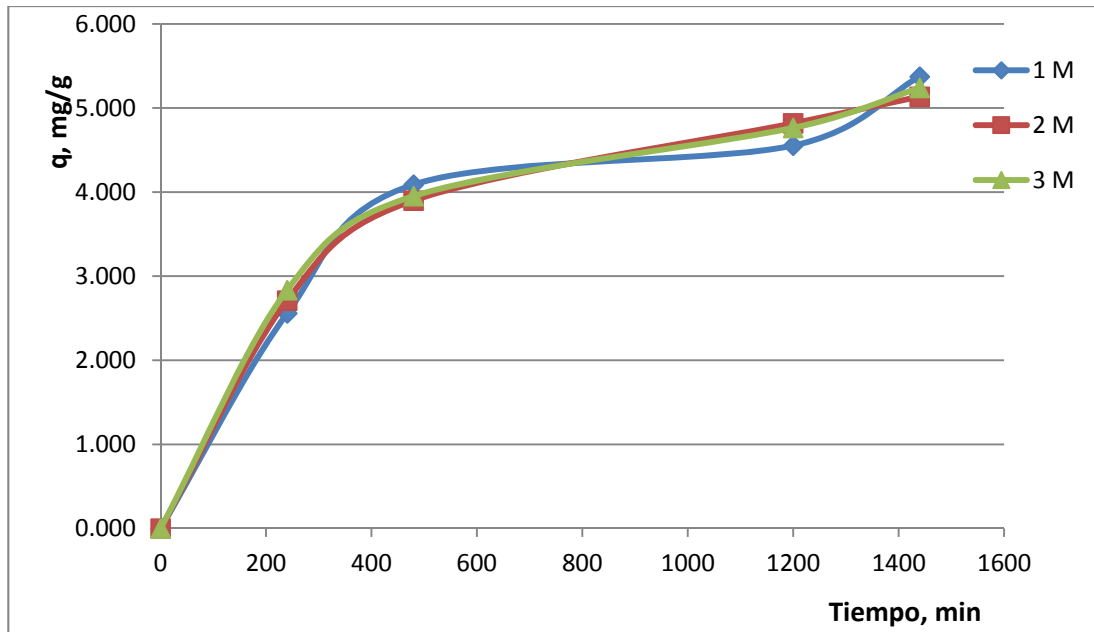


Figura 75. Capacidad de biosorción de Plomo (II) por *Rhizopus spp* a distintas cantidades de biomasa.

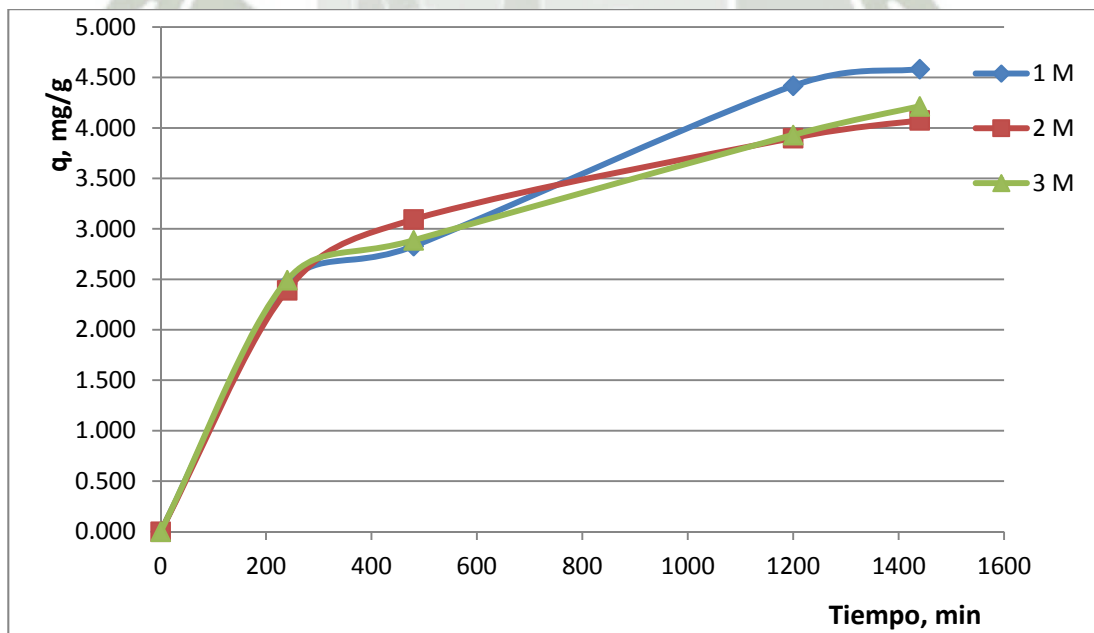


Figura 76. Capacidad de biosorción de Cadmio (II) por *Rhizopus spp* a distintas cantidades de biomasa.

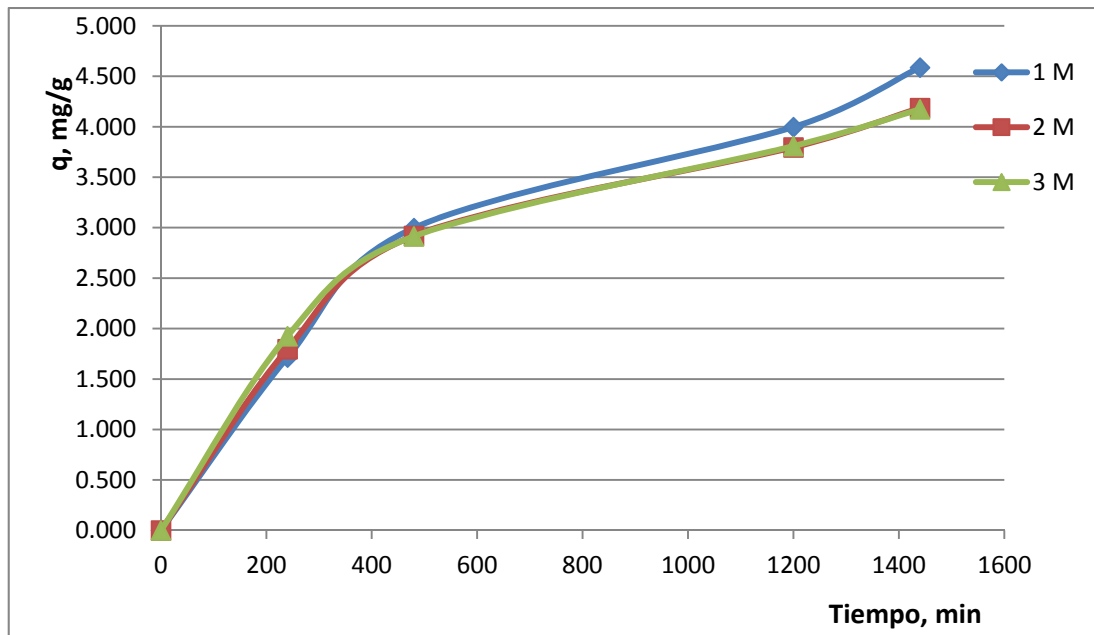


Figura 77. Capacidad de biosorción de la mezcla (Plomo (II) y Cadmio (II)) por *Rhizopus spp* a distintas cantidades de biomasa.

Como se aprecia en las figuras 75, 76 y 77, la influencia de la cantidad de biomasa en el proceso de sorción es muy fuerte, con el transcurrir del tiempo los niveles de concentración de los metales van disminuyendo, a biomasa 2 Micelios y 3 Micelios existe la remoción de los metales pero se ve más favorecida al trabajar a biomasa 1 Micelio, podemos decir que la mayor capacidad de biosorción de Plomo (II) y Cadmio (II) se dio a biomasa 1 Micelio.

Para evaluar la influencia de la cantidad de biomasa, sobre el proceso de remoción de Plomo (II) y Cadmio (II), se aplicó los modelos matemáticos de Primer orden y Segundo orden.

a. Modelo de Primer orden

Los parámetros calculados en el modelo matemático de Primer Orden (q_{-1} , K_{-1}), y el coeficiente r en función a la cantidad de biomasa, se muestran en la tabla N°19, como se puede apreciar en esta tabla la capacidad de adsorción aumenta a medida que aumenta la cantidad de biomasa, dándose la mayor cantidad de remoción de los metales Plomo (II),

Cadmio (II) y mezcla, dándose la mayor capacidad e remoción al emplear una biomasa de 3M.

Tabla 19.

Resultados del proceso de adsorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla en biomasa de *Rhizopus spp*, obtenidos en el modelo matemático de primer orden a diferentes cantidades de biomasa (1Micelio, 2Micelios Y 3Micelios).

Biomasa	Plomo			Cadmio			Mezcla		
	r	q ₁ mg/g	k ₁ min ⁻¹	r	q ₁ mg/g	k ₁ min ⁻¹	r	q ₁ mg/g	k ₁ min ⁻¹
1Micelio	0.8753	4.1305	0.1000	0.9891	4.6079	0.0024	0.8065	3.3517	0.1000
2Micelios	0.8912	4.1770	0.1000	0.9129	3.3452	0.1000	0.8397	3.1489	0.1000
3Micelios	0.8995	4.1974	0.1000	0.9046	3.3798	0.1000	0.8551	3.2047	0.1000

De acuerdo con los resultados obtenidos en la tabla 19, se puede apreciar los parámetros determinados con el modelo matemático de primer orden r, q₁ y k₁ en el proceso de remoción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla a distintas cantidades de biomasa (1 Micelio, 2 Micelios Y 3 Micelios). Se aprecia que la cantidad de sustancia adsorbida en el equilibrio (q₁) calculados en el modelo, muestran que a biomasa 1 Micelio, 2 Micelios y 3 Micelios, para Plomo (II) muestran valores similares, para Cadmio (II) se aprecia un mayor valor para la biomasa 1 Micelio y en cuanto a la mezcla muestran valores similares. Esto nos muestra que la adsorción de Plomo (II) y Cadmio (II) es igual a cualquier cantidad de biomasa estableciéndose una relación directa, mediante el uso del micelio de *Rhizopus spp*. Los coeficientes r calculados en el modelo matemático de primer orden, muestran que los datos experimentales se ajustan a los calculados en el modelo ya que presentan un valor cercano a 1, esto para Cadmio.

Respecto a la cantidad de biomasa, muchas veces se establece una relación directa pero no siempre, a 3 Micelios se logra la mayor cantidad de remoción de metales seguido de 2 Micelios y 1 Micelio. Esto debido a la cantidad de sitios para la remoción, a mayor biomasa mayor será la cantidad de sitios.

En la figura 78, se puede apreciar la disminución de las concentraciones de los metales, pero la mayor remoción de metal se da al trabajar a una biomasa de 3 Micelios, el aumento de la cantidad de biomasa, ayuda a que se favorezca la capacidad de adsorción de los metales Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla.

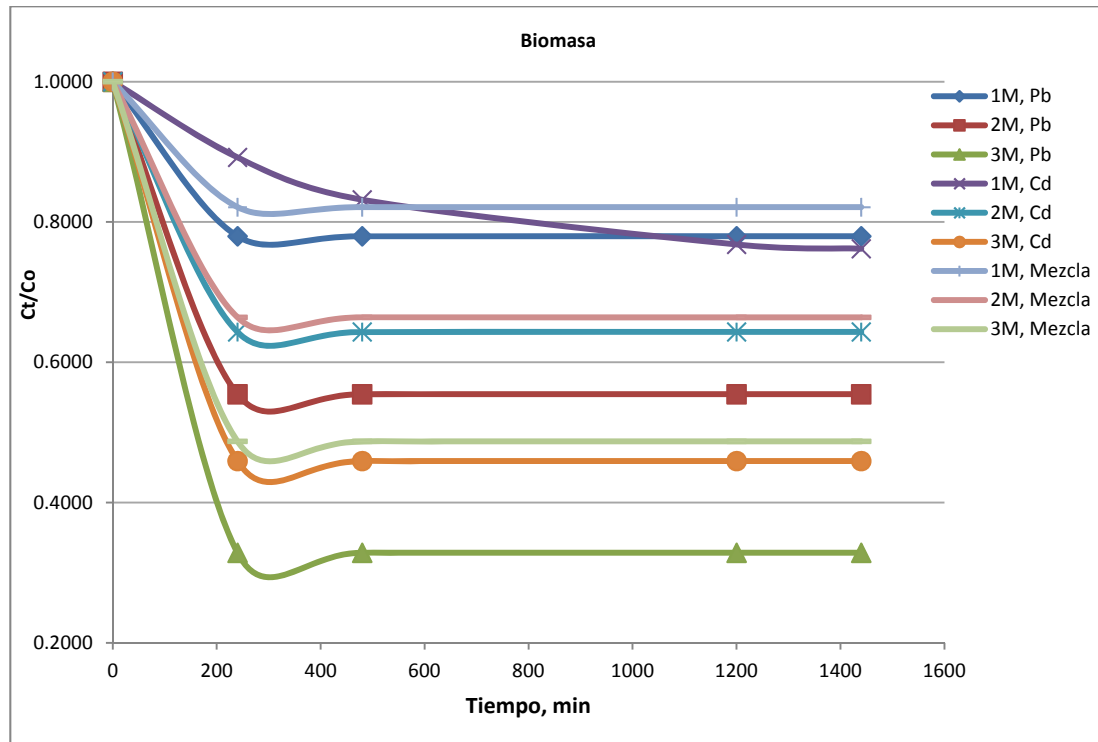


Figura 78. Proceso de bioadsorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla (Plomo (II) y Cadmio (II)) por *Rhizopus spp* a distintas cantidades de biomasa, aplicando el modelo de primer orden.

b. Modelo de Segundo orden

Los parámetros calculados en el modelo matemático de Segundo Orden la cantidad de sustancia adsorbida (q_2), la constante β_2 y la constante de adsorción de segundo orden (K_2), y el coeficiente r en función a la cantidad de biomasa se muestran en la Tabla N°20, lo que muestra es que se establece una relación directa a mayor biomasa mayor captación.

Tabla 20.

Resultados del proceso de adsorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla en biomasa de Rhizopus spp, obtenidos en el modelo matemático de segundo orden a distintas cantidades de biomasa (1Micelio, 2Micelios y 3Micelios).

Biomasa	Plomo				Cadmio				Mezcla			
	r	q ₂ mg/g	β ₂	k ₂ min ⁻¹	r	q ₂ mg/g	β ₂	k ₂ min ⁻¹	r	q ₂ mg/g	β ₂	k ₂ min ⁻¹
1Micelio	0.9906	6.1815	0.9949	0.0033	0.9929	5.7699	0.9993	0.0024	0.9962	6.2352	1.0015	0.0018
2Micelios	0.9993	6.1312	1.0048	0.0035	0.9997	4.6879	0.9964	0.0042	0.9980	5.3416	0.9926	0.0023
3Micelios	0.9984	6.0436	0.9997	0.0038	0.9952	4.8439	1.0041	0.0038	0.9989	5.2236	0.9991	0.0025

Como se puede apreciar en la tabla 20, los parámetros calculados en el modelo matemático de segundo orden, muestran que las cantidades de sustancias adsorbidas en el equilibrio (q₂) calculados a distintas cantidades de biomasa para Plomo (II) se mantienen similares, pero para Cadmio se muestra que trabajando a biomasa 1 Micelio, este tienen un valor mucho más alto que al trabajar a 2 Micelios y 3 Micelios. Y para la mezcla Plomo (II) y Cadmio (II) se aprecia que trabajando a 1Micelio es mayor la cantidad de sustancia adsorbida que a 2Micelios y 3Micelios, lo que nos indica que existe un mayor emoción de Plomo (II) y Cadmio (II) al trabajar a 1Micelio. Las constantes de adsorción de segundo orden (k₂) muestran que a biomasa de 1 Micelio presentan un valor menor tanto para Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla en comparación con 2 Micelios Y 3 Micelios, lo que indica que utilizando la biomasa 1 Micelio la adsorción es más rápida, mientras que utilizando la biomasa 2 Micelios Y 3 Micelios la adsorción es más lenta.

Los coeficientes r calculados en el modelo matemático de segundo orden, muestran que los datos experimentales se ajustan a los calculados en el modelo ya que presentan un valor cercano a 1.

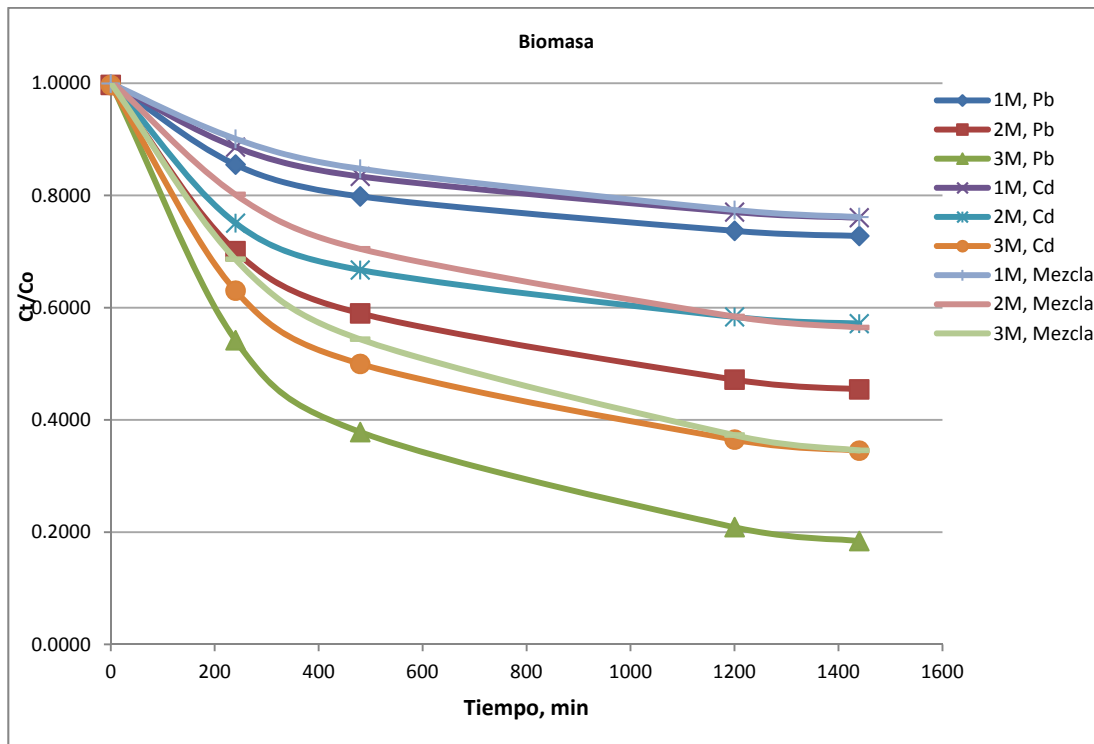


Figura 79. Proceso de bioadsorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla (Plomo (II) y Cadmio (II)) por *Rhizopus spp* a distintas cantidades de biomasa, aplicando el modelo de segundo orden.

En la figura 79, nos muestra que a medida que avanza el tiempo las concentraciones de los metales Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla disminuyen, encontrándose que a la biomasa 3 Micelios esta disminución es mayor a que a 1 Micelio Y 2 Micelios, lo que indica que trabajando a 3Micelios se da mayor remoción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla por el micelio de *Rhizopus spp*.

Los coeficientes r calculados en los modelos matemáticos de Primer y Segundo Orden, se contrastaron, las cuales se muestran en la tabla 3.9 (apéndice 3). De acuerdo a los resultados de la tabla 3.9, podemos decir que tras aplicar los dos modelos, ambos presentan un valor cercano a 1. Pero el segundo modelo matemático presenta mejores valores de r para Plomo (II) 0.9961, Cadmio (II) 0.9959 y mezcla 0.9977 por lo que podemos decir que más se ajusta al modelo de segundo orden.

Tras haber determinado que a 3Micelios es el óptimo para la remoción de los metales Plomo (II) y cadmio (II), se procedió con la variación de concentración.

En la figura 80, se aprecia el aspecto filamentososo que tiene el micelio de *Rhizopus spp*



Figura 80. Micelio de *Rhizopus spp*, como se aprecia tiene un aspecto filamentososo.

4.8.4. Efecto concentración inicial de metal

En la figura 81, se aprecia el porcentaje de remoción para Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla (Plomo (II) y Cadmio (II)), mediante el uso de la biomasa de *Rhizopus spp*, al trabajar con distintas concentraciones de metal Plomo (II) y Cadmio (II).

De acuerdo a la figura 81, la biomasa de *Rhizopus spp* trabajando a concentraciones de 10ppm, 50ppm y 90ppm, a la concentración de 10ppm remueve Plomo (II) en 99.59%, Cadmio (II) 99.90% y la mezcla en 99.47%. Por otra parte trabajando a 50ppm remueve Plomo (II) en 99.90%, Cadmio (II) 99.97%, y la mezcla en 99.88%. Y trabajando a 90ppm remueve Plomo (II) en 85.91 %, Cadmio (II) 68.73%, y la mezcla en 67.72. Por los resultados obtenidos podemos decir que el mayor porcentaje de remoción de los metales Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla se dió a la concentración de 10ppm y 50 ppm.

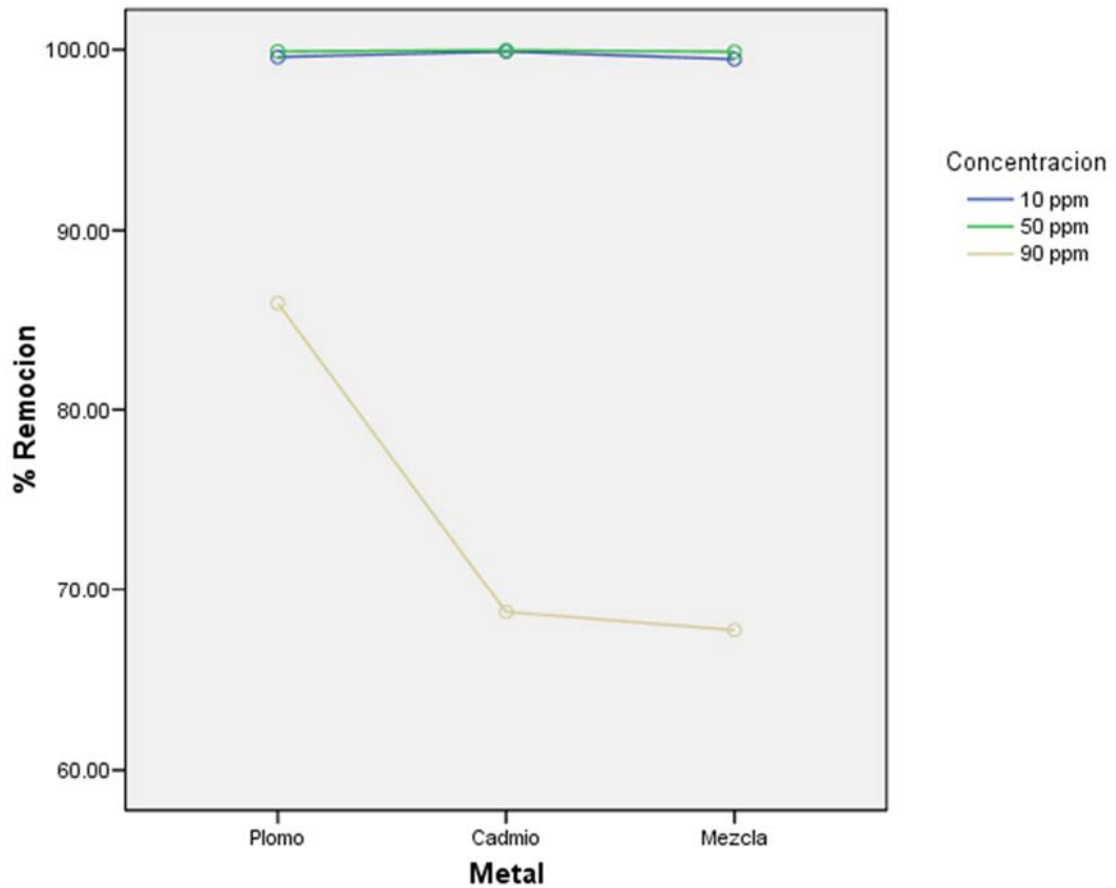


Figura 81. Porcentaje de remoción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla a distintas concentraciones de metal.

Tras realizar el análisis estadístico mediante la prueba ANOVA y el test de Tuckey (apéndice 4) al tiempo final del ensayo para Plomo (II), se determinó que no existe diferencia estadística entre los porcentajes de remoción trabajando a concentración de 10ppm y 50 ppm parte de *Rhizopus spp*. En cuanto a Cadmio (II) no existe diferencia estadística entre los porcentajes de remoción trabajando a concentración de 10ppm y 50 ppm por parte de *Rhizopus spp*. Y para la mezcla de los metales Plomo (II) y Cadmio (II) se observa que el nivel de significancia es menor a 0.05, por lo que se determinó que existe diferencia estadística entre los porcentajes de remoción para mezcla trabajando a concentraciones de 10ppm, 50ppm y 90ppm por parte de *Rhizopus spp*.

Estos resultados confirman que el valor de la concentración de metal inicial influye fuertemente en la remoción de metales pesados como Plomo (II) y Cadmio (II). Por los resultados mencionados anteriormente se determina que al trabajar a concentraciones menores a 50 ppm se da una mayor remoción de Plomo (II) y Cadmio (II) mediante el uso de la biomasa de *Rhizopus spp*, como se había mencionado anteriormente concentraciones altas de metales pesados generan toxicidad en el microorganismo. La concentración inicial del metal a trabajar siempre influye en el desarrollo del proceso de sorción.

Ahmad I. et-al (2005), reportaron que la bioadsorción de Cd y Cr fue influenciado por la concentración inicial del metal y la naturaleza del organismo. Los resultados revelaron que los hongos de sitios contaminados metálicos mostraron una mayor tolerancia a los metales y la capacidad bioadsorción de cromo y Cadmio. Además reportaron que la bioadsorción de iones Cr mostraron un aumento con el aumento de la concentración inicial del metal (Ci) de 2 mM a 6 mM. Sin embargo, un aumento adicional no dio lugar al incremento en la bioadsorción en ambos *Aspergillus* y *Rhizopus*. Sin embargo, la bioadsorción de Cd por *Aspergillus sp* fue máximo (6 mg / g) a una concentración inicial de 4 mM y disminuye a partir de esta primera concentración. *Rhizopus sp* mostro una máxima bioadsorción (8.21mg / g) a 6 mM de concentración inicial. *Rhizopus sp*. Mostro una mayor capacidad de bioadsorción en comparación con *Aspergillus sp* para ambos metales.

Como se aprecia en las figuras N°82, 83 y 84, la influencia de la concentración del metal en el proceso de sorción es muy fuerte, con el transcurrir del tiempo los niveles de concentración de los metales van disminuyendo, a concentración de 10 ppm y 50 ppm existe la remoción de los metales pero se ve más favorecida al trabajar a una concentración 90 ppm, por lo que podemos decir que la mayor capacidad de biosorción de Plomo(II) y Cadmio(II) por *Rhizopus spp* se dio favorecida a una concentración de 90 ppm.

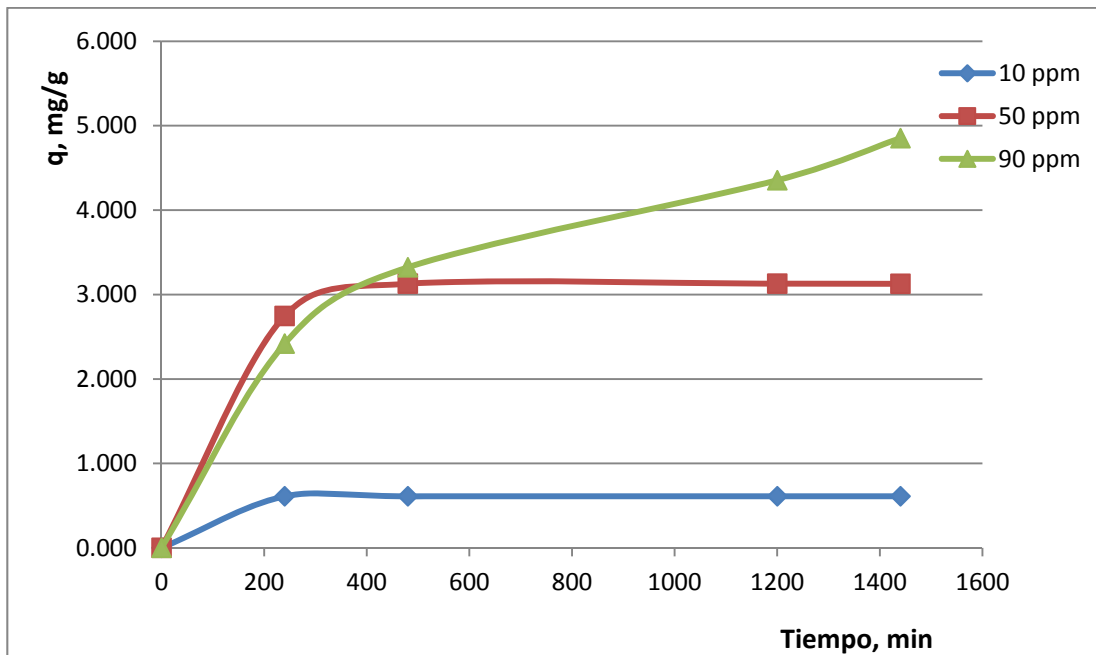


Figura 82. Capacidad de biosorción de Plomo (II) por *Rhizopus spp* a distintas concentraciones.

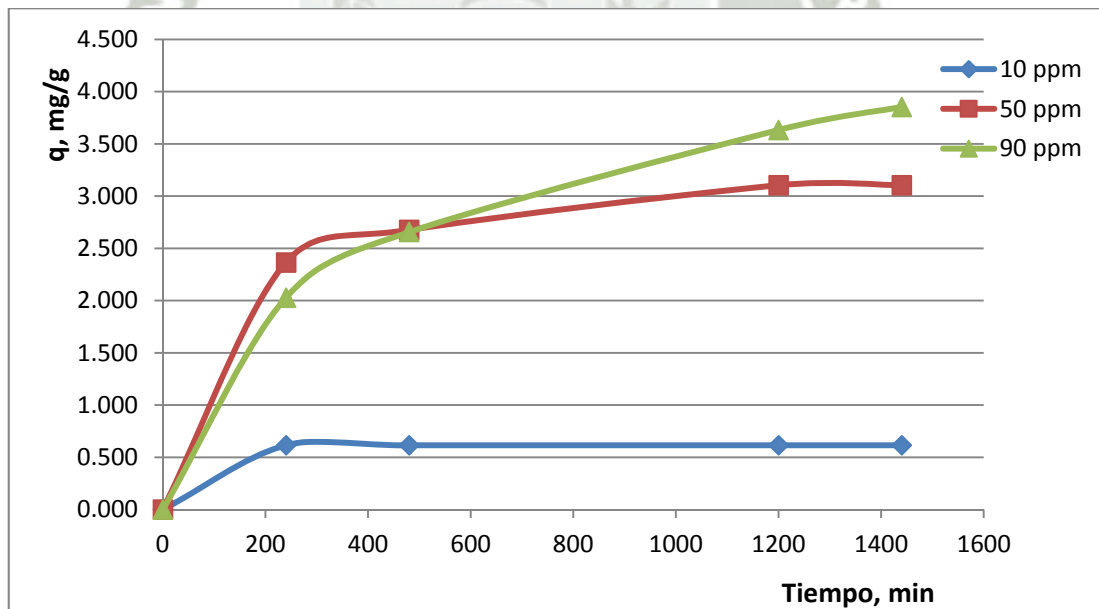


Figura 83. Capacidad de biosorción de Cadmio (II) por *Rhizopus spp* a distintas concentraciones.

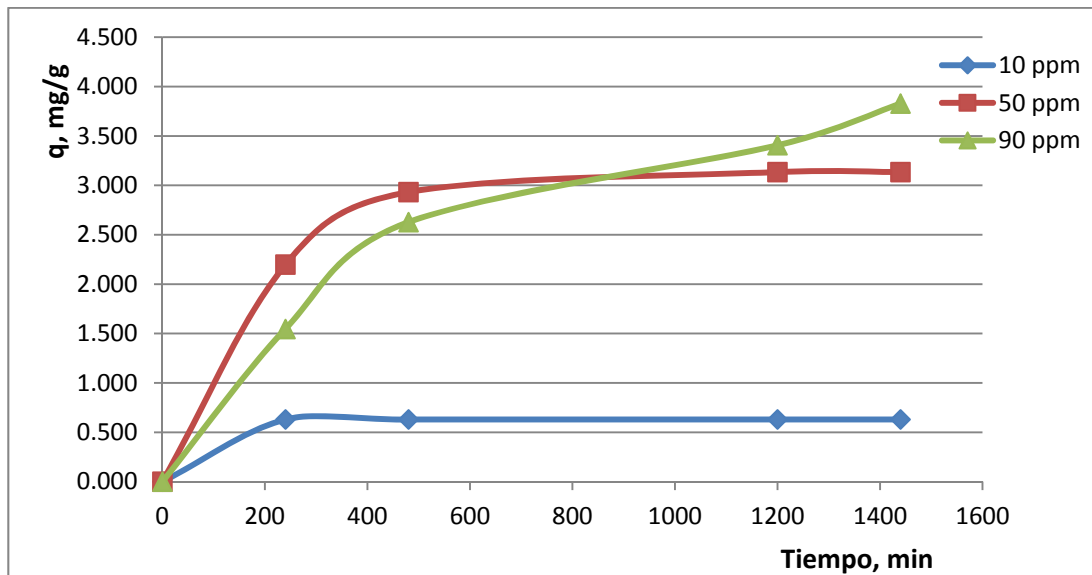


Figura 84. Capacidad de biosorción de la mezcla (Plomo (II) y Cadmio (II)) por *Rhizopus spp* a distintas concentraciones.

Una vez obtenido los resultados anteriores se aplicó modelos matemáticos para realizar la cinética del proceso de sorción Plomo (II) y Cadmio (II) en la biomasa de *Rhizopus spp*, utilizando los modelos matemáticos de Primer orden y Segundo orden, esto permitirá comprender sobre el proceso de adsorción que se da en cada experimento.

a. Modelo de Primer orden

En este modelo matemático, se determinó la cantidad de sustancia adsorbida (q_{1t}) y la constante de adsorción (k_1) en función a la concentración del metal. Los resultados de la cinética de adsorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla (Pb y Cd) en biomasa de *Rhizopus spp* en el modelo matemático de primer orden se muestran en la tabla 21.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la tabla 21, se puede apreciar los parámetros determinados con el modelo matemático de primer orden r , q_{1t} y k_1 en el proceso de remoción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla a distintas concentraciones (10, 50 y 90ppm). Se aprecia que la cantidad de sustancia adsorbida en el equilibrio (q_{1t}) calculados en el modelo, muestran que a 90ppm la cantidad de sustancia adsorbida tanto para Plomo (II), Cadmio (II) es mayor en comparación con los que se obtiene trabajando a 10ppm y 50ppm. Los coeficientes r calculados en el modelo matemático de primer

orden, muestran que los datos experimentales se ajustan a los calculados en el modelo ya que presentan un valor cercano a 1, esto para Cadmio (II) y mezcla.

Tabla 21.

Resultados del proceso de adsorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla en biomasa de *Rhizopus spp*, obtenidos en el modelo matemático de primer orden a distintas concentraciones (10, 50 y 90ppm).

Concentración ppm	Plomo			Cadmio			Mezcla		
	r	q ₋₁ mg/g	k ₋₁ min ⁻¹	r	q ₋₁ mg/g	k ₋₁ min ⁻¹	r	q ₋₁ mg/g	k ₋₁ min ⁻¹
10	0.9998	0.6225	0.1000	0.9999	0.6244	0.0334	0.9999	0.6218	0.1549
50	0.9999	3.1356	0.0087	0.9706	2.8323	0.1000	0.9997	3.1390	0.0051
90	0.8716	3.7140	0.1000	0.8787	3.0611	0.1000	0.8266	2.8246	0.1000

Como se puede apreciar en la figura 85, existe la disminución de las concentraciones de los metales, pero la mayor remoción de metal se da al trabajar a una concentración de 10 ppm.

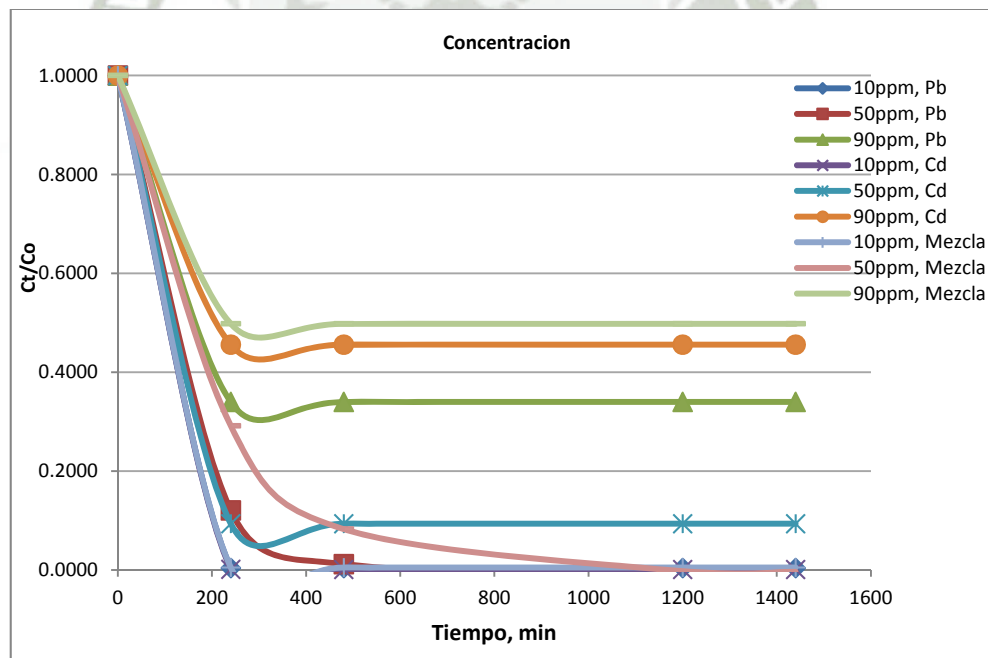


Figura 85. Proceso de bioadsorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla (Plomo (II) y Cadmio (II)) por *Rhizopus spp* a distintas concentraciones de metal aplicando el modelo de primer orden.

b. Modelo de Segundo orden

Con este modelo se determino la cantidad de sustancia adsorbida (q_2), la constante β_2 y la constante de adsorción de segundo orden (K_2) para cada concentración de metal. En la tabla 22 se muestra los resultados de los parámetros calculados según el modelo matemático de segundo orden, que corresponde a los metales Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla a distintas concentraciones de metal (10, 50 y 90ppm).

Tabla 22.

Resultados del proceso de adsorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla en biomasa de Rhizopus spp, obtenidos en el modelo matemático de segundo orden a distintas concentraciones de metal (10, 50 y 90ppm).

Concentración ppm	Plomo				Cadmio				Mezcla			
	r	q_2 mg/g	β_2	k_2 min ⁻¹	r	q_2 mg/g	β_2	k_2 min ⁻¹	r	q_2 mg/g	β_2	k_2 min ⁻¹
10	0.9991	0.6226	1.0194	1.1210	0.9997	0.6244	1.0145	9.9349	0.9998	0.6218	0.9877	2.7607
50	0.9987	3.2492	0.9979	0.0255	0.9995	3.3499	1.0064	0.0098	0.9970	3.4575	0.9950	0.0081
90	0.9981	5.8325	0.9978	0.0028	0.9990	4.7126	1.0065	0.0030	0.9967	4.9591	0.9913	0.0021

Como se puede apreciar en la tabla N°22, los parámetros calculados en el modelo matemático de segundo orden, muestran que las cantidades de sustancias adsorbidas en el equilibrio (q_2) calculados a distintas concentraciones de metal aumentan a medida que se aumenta la concentración, se aprecia que a concentración 90ppm la cantidad de sustancia adsorbida son mayores en comparación con 10 y 50 ppm.

Los coeficientes r calculados en el modelo matemático de segundo orden, muestran que los datos experimentales se ajustan a los calculados en el modelo ya que presentan un valor cercano a 1.

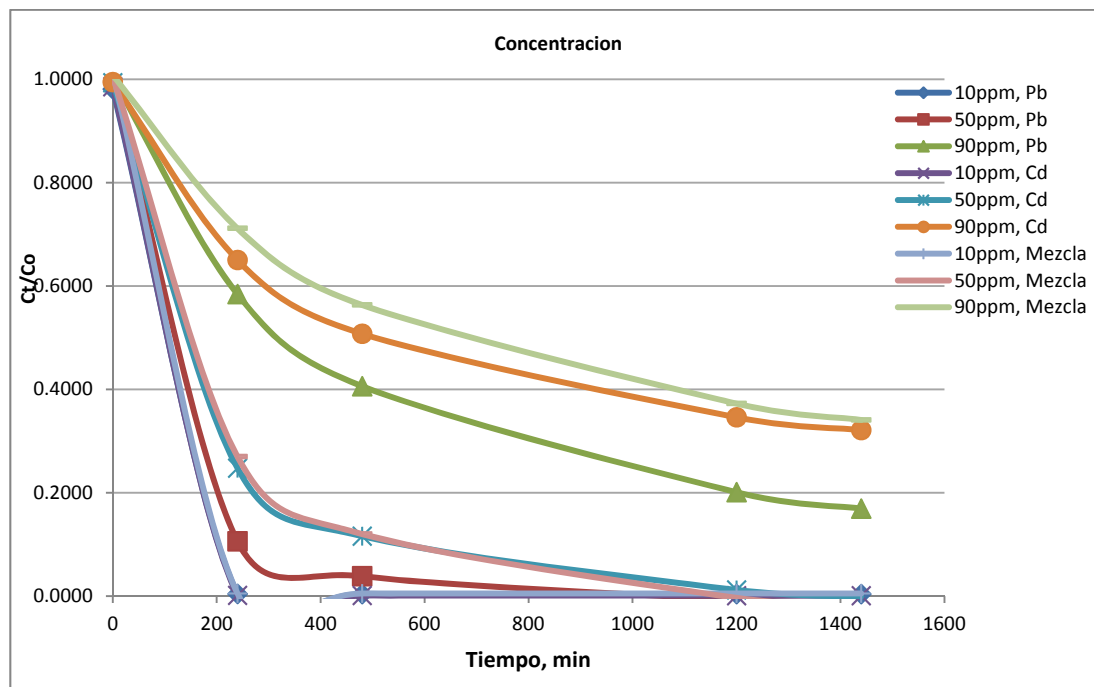


Figura 86. Proceso de bioadsorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla (Plomo (II) y Cadmio (II)) por *Rhizopus spp* a distintas concentraciones de metal, aplicando el modelo de segundo orden.

Tras aplicar ambos modelos matemáticos en distintas concentraciones de metal, se contrastaron los valores de los coeficientes r de primer orden y segundo orden, las cuales se muestran en la tabla 3.12 (apéndice 3). De acuerdo a los resultados de la tabla 3.12, podemos decir que tras aplicar los dos modelos, ambos presentan un valor cercano a 1. Pero el segundo modelo matemático presenta mejores valores de r para Plomo (II) 0.9986, Cadmio (II) 0.9994 y mezcla 0.9978 por lo que podemos decir que más se ajusta al modelo de segundo orden.

4.9. Sistema de remoción de Plomo (II) y Cadmio (II).

4.9.1. Construcción del sistema.

Al construir el sistema se decidió que este fuera sencillo, económico y eficaz. Por lo que se optó por desarrollar columnas de sorción. La implementación es bastante sencilla no requiere de una gran inversión, para la inmovilización se empleó la piedra pómez por la gran porosidad que estas presentan y se empleó una columna empacada con arena para evitar que residuos de la biomasa puedan salir.



Figura 87. Sistema de remoción de Plomo (II) y Cadmio (II).

Se realizó el empacamiento en columna porque es una manera sencilla de implementar el proceso para la remoción, el flujo de 1.05 litros por cada hora, es relativamente lento y por lo tanto se iba a tener un tiempo de retención mayor en la columna facilitando la remoción de los metales.

En la columna empacada con la biomasa de *Rhizopus spp*, tiene como principal función la remoción de los metales Plomo (II) y Cadmio (II); Los fenómenos de biosorción se caracterizan por la retención del metal mediante una interacción fisicoquímica del metal con ligandos pertenecientes a la superficie celular, según Vullo D., (2003) esta interacción se produce con grupos funcionales expuestos hacia el exterior celular pertenecientes a partes de moléculas componentes de las paredes celulares, como por ejemplo carboxilo, amino, hidroxilo, fosfato y sulfhidrilo.

Como se puede apreciar en la figura N°88 la columna fue empacada con el micelio de *Rhizopus spp*.



Figura 88. Columna inmovilizada con micelio de *Rhizopus spp.*

4.9.2. Evaluación de eficiencia de la capacidad de remoción

Se realizó mediante el porcentaje de remoción, La tabla 23 muestra los resultados de la eficiencia de remoción sin la biomasa de *Rhizopus spp.*, donde la primera columna representada por a, la segunda columna empacada con biomasa representada por b y la tercera columna de arena representada por c.

Tabla 23.
Porcentaje de remoción sin el micelio de *Rhizopus spp.*

Tiempo, min	a		b		c	
	Pb	Cd	Pb	Cd	Pb	Cd
5	8.17	4.91	14.31	12.10	65.49	68.15
60	10.26	7.33	16.47	13.71	66.01	68.08
1440	8.82	7.39	14.71	12.57	65.56	68.88
4320	7.52	5.51	12.48	11.16	63.40	66.40

En la siguiente tabla se muestra la eficiencia de remoción trabajando con una columna empacada con el micelio de *Rhizopus spp.*

Tabla 24.

Porcentaje de remoción con el micelio de Rhizopus spp.

Tiempo, min	a		b		c	
	Pb	Cd	Pb	Cd	Pb	Cd
	5	8.50	11.35	99.20	99.42	99.00
60	10.37	8.65	99.13	99.81	99.20	99.42
1440	8.23	12.31	99.20	99.62	99.40	99.49
4320	6.83	13.21	98.66	99.55	98.80	99.81

De acuerdo con la tabla 24, existe un incremento de remoción al emplear la biomasa fungal en el tiempo 5 min. de un 84.89 % para Plomo (II) y un 87.32% para Cadmio (II).

4.9.3. Análisis microbiológico.

En el sistema se incluyó una columna de arena para evitar en el supuesto caso de que el flujo arrastre biomasa de *Rhizopus spp.* al flujo final, esta columna se encargaría de retener dicha biomasa. Como se puede apreciar en la tabla n°25 Tras revisar el crecimiento en las placas inoculadas resultó que no hubo ningún crecimiento en ninguna de las placas incubadas.



Figura 89. Placas con medio Sabouraud empleadas para el análisis microbiológico.

Tabla 25.
Revisión de las placas del análisis microbiológico.

Tiempo, min	1era Rep.			2da Rep.			3era Rep.		
	1 día	2 día	3 día	1 día	2 día	3 día	1 día	2 día	3 día
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1440	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4320	-	-	-	-	-	-	-	-	-

De acuerdo a la tabla 25, no hubo ningún crecimiento, lo cual nos indica que el sistema funcionó adecuadamente ya que no hubo residuos de biomasa de hongos en la salida de la columna 3.

A pesar de que existen muchas técnicas como filtración, precipitación química, electroquímica, osmosis inversa, entre otras se han desarrollado para eliminar metales pesados como el Cadmio (II), Plomo (II) del agua contaminada; según Tarley C. et-al., (2004) hay algunas desventajas para estos tradicionales métodos, tales como el costo caro, la operación de trabajo intensivo e ineficientes a bajas concentraciones, donde el problema se hace más latente.

En la última década, la biosorción ha surgido como solución tentativa ante la contaminación latente por metales pesados. Navarro A. E. et-al., (2006), menciona que la biomasa inerte ha sido utilizada con éxito en la eliminación de metales tóxicos y de alta ley de soluciones acuosas, incluyendo bacterias, hongos, algas y plantas mayores. La biosorción se considera que es una opción prometedora para resolver la contaminación del medio ambiente de los metales pesados. Una de las alternativas que cada día toma más fuerza es el uso de biomasa tanto viva como muerta, esta tesis demuestra que la biomasa fungal podría ser una alternativa;

Y estas propiedades de captar metales al emplear biomasa se atribuye a los grupos funcionales que están presentes en ella, según Arica, M. et-al., 2004, entre los grupos funcionales que presentan características quelantes se mencionan los grupos carboxilos,

fosfatos, amidas, tioles, hidroxilos, quitina, gluco-proteínas, los cuales juegan un rol importante en la bioadsorción de metales pesados. Como se muestra en este trabajo las principales ventajas de la biosorción incluyen bajo costo, alta eficiencia de remoción y es una técnica sencilla. Trabajar con biomasa fungal resulta una alternativa potencial ya que como se ha mostrado en este trabajo de investigación resulta fácil de cultivar, no requieren condiciones especiales, es económico y algo que es muy importante en procesos de remoción de metales es la cantidad de biomasa y la biomasa fungal genera buena cantidad.

El sistema desarrollado permite tener ventajas como el uso de materiales renovables que pueden ser producidos a bajo costo, alta capacidad para remover metales como el Plomo y Cadmio de manera eficaz y rápida, capacidad de tratar grandes volúmenes de agua contaminada debido a la rapidez del proceso y bajo capital invertido.

En este trabajo de investigación se escoge dos metales de los principales metales pesados que se considera son foco de contaminación por las diferentes industrias que se encuentran en nuestra ciudad, como son el Plomo y Cadmio. Es importante desarrollar este tipo de sistemas para la remoción de metales, debido a que si estos metales no son eliminados adecuadamente, estas se acumulan en suelos agrícolas o están presentes en aguas de los ríos y el ser humano indirectamente acumula Cadmio y Plomo en su interior al consumir productos contaminados.

Por estas razones el presente trabajo de investigación se propone como una alternativa para la remoción de metales como Plomo y Cadmio de diferentes fuentes pudiendo ser efluentes industriales, aguas residuales, etc.

Como se puede apreciar este sistema no requiere gran equipamiento, no requiere una gran inversión y es renovable. Con esta investigación se establece una nueva línea de investigación en cuanto se refiere al uso de biomasa fungal para el tratamiento de aguas contaminadas con metales.

Capítulo V: Conclusiones

- Se aisló e identificó los microorganismos presentes en la poza de oxidación del laboratorio metalúrgico de la UNSA, siendo estas 2 cepas bacterianas correspondientes a *Acinetobacter spp* y *Bacillus spp* y otras pertenecientes a hongos siendo *Aspergillus niger* y *Rhizopus spp*.
- Se determinó experimentalmente que la mejor biomasa fungal para la remoción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla (Plomo (II) y Cadmio (II)) fue *Rhizopus spp*, presentando una mayor afinidad de remoción hacia el metal Plomo (II).
- En la cinética de desarrollo se determinó que el hongo *Aspergillus niger* es quien más ácido y más peso seco genera en un periodo de 168 horas, llegando a 2.30 y 342.15mg respectivamente y suplementados con los metales Plomo (II) y Cadmio (II) un valor de pH de 3.89 y un peso seco de 276.90mg.
- Se determinó las condiciones óptimas para tener una mayor remoción de Plomo (II) y Cadmio (II) mediante el uso de la biomasa de *Rhizopus spp*, siendo a un pH 5, temperatura de 25°C y una biomasa de 3 Micelios.
- Los datos experimentales hallados se sometieron a los modelos matemáticos de primer y segundo orden. Determinándose mediante análisis de regresión no lineal, que el modelo matemático de segundo orden es el que más se ajusta a los datos experimentales utilizando a *Rhizopus spp* como adsorbente.
- Se construyó el sistema, teniendo como principal componente la inmovilización de *Rhizopus spp*, que permite la remoción de Plomo (II) y Cadmio (II), trabajando a un flujo de 1.05 litros por hora se llegó a tener un 99.4% y 99.8 % de remoción de Plomo (II) y Cadmio (II) respectivamente.

Recomendaciones

- Aislar e identificar otras cepas fúngicas a partir de muestras que contengan alto contenido en metales pesados y evaluarlos como bioadsorbentes de metales pesados.
- Evaluar la capacidad de remoción de metales pesados mediante el empleo de la biomasa seca.
- Evaluar otro tipo de soportes para la inmovilización de biomasa.
- Realizar ensayos donde los bioadsorbentes tengan previamente un tratamiento ácido.



Referencias

1. Maldonado, et-al. 2005. Evidencias del mecanismo de adsorción del Cadmio divalente en *Lentinus edodes*.
2. Ministerio del Ambiente, Decreto Supremo N° 002-2008-MINAM. El Peruano, 31 de Julio del 2008.
3. Angelova V., Ivanova, R., Delibaltova, V. and Ivanov, K. 2004. Bio-accumulation and distribution of heavy metals in fibre crops (flax, cotton and hemp). *Industrial Crops and Products*, 19: 197–205.
4. García, M.A. et-al. 2004. Acumulación de metales pesados en macromicetos comestibles y factores que influyen en su captación. *Revista de Toxicología*. España. Vol. 21: pp. 11-15.
5. Garza González, María Teresa. 2005. Aislamiento de microorganismos con alta capacidad de tolerar y remover Pb (II), Cr (VI), Cd (II), Cu (II), Zn (II) y Ni (II).
6. Howard M Resh, PH.D. 2001. *Cultivos Hidropónicos, Nuevas técnicas de producción*, Barcelona.
7. Nriagu, O. J. 1996. History of Global Metal Pollution. *Science*. Vol. 272(5259), 1996, p.222-225.
8. Salomons, W. and Förstner, U. 1995. *Heavy Metals. Problems and solutions*. Berlin:Springer. 412p.
9. García, I; Diorronsoro. 2001. Degradación del suelo. Departamento de edafología y química agrícola. Universidad de Granda (España).
10. EPA's. 2003. *Integrated Risk Information System (IRIS), Compuestos del Cadmio*.
11. Moreno-Sánchez R. Devars S. 1999. Abundancia de los metales pesados en la biósfera. En: *Contaminación ambiental por metales pesados: Impacto en los seres vivos*. A. G. T. Editor, S. A.
12. Álvarez M. 2009. "Evaluación de los mecanismos de adsorción y acumulación intracelular de Plomo (Pb²⁺), en sistemas continuos de fitorremediación con *Salvinia minima*".
13. Lenntech, Plomo-Pb [acceso 20 Enero de 2013]. Disponible en: <http://www.lenntech.es/periodica/elementos/pb.htm>
14. Jin-ming et-al. 2010 . Biosorption of cadmium from aqueous solutions by industrial fungus *Rhizopus cohnii*.
15. Brubaker, E., Peryman, L. 2002. Cadmium. Environmental Bureau of investigation.

16. Mance, Geoffrey. 1987. Pollution threat of heavy metals in aquatic environments. Pollution Monitoring Series. Elsevier Applied Science Publishers. England.
17. Haas, E.M. 2003. Cadmio. Staying healthy with nutrition: The complete guide to diet and nutritional medicine.
18. Lenntech, Cadmio-Cd [acceso 20 Enero de 2013]. Disponible en: <http://www.lenntech.es/periodica/elementos/cd.htm>
19. Navarro A. E. et-al. 2006. Elucidación del efecto del pH en la adsorción de metales pesados mediante biopolímeros naturales: cationes divalentes y superficies activas, Volumen 7(2).
20. Ministerio del Ambiente, Decreto Supremo N° 010-2010-MINAM. El Peruano, 21 de Agosto del 2010.
21. Rivera, M.; Sandoval, C.; Guzmán, J.; Avila, M. y Gutiérrez, F. 2003. Utilización de hongos resistentes a cromo para la eliminación de cromo hexavalente en tierra de desechos industriales. Instituto de Investigaciones Científicas Universidad de Guanajuato. México.
22. Castro, Silva; Oliveira de Souza; Gerchenski; Batista Jaques; Rodrigues; Lima de Souza y Leonardo Rubi Rörig. 2003. Heavy metal resistance of microorganisms isolated from coal mining environments of Santa Catarina. Brazilian Journal of Microbiology 34 : 45-47
23. Romero, M.; Reinoso, H.; Urrutia, M y Moreno, A. 2006. Biosorption of heavy metals by *Talaromyces helicus*: a trained fungus for copper and biphenyl detoxification. Electronic Journal of Biotechnology. 9 (3).
24. Rodríguez, Katthia. 2005. Eficacia del hongo *Pleurotus ostreatus* como biorremediador de suelos contaminados con metales pesados. Tesis para grado de maestro en Ciencias en Biología Universidad de Puerto Rico.
25. Lovley, D. 2000. Environmental Microbe-Metal Interactions. American Society for Microbiology, Washington D.C.
26. Vullo, Diana. 2003. Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. Revista Química Viva. 2 (3)
27. Yetis U, Dolek A, Dilek FB and Ozcengiz G. 2000. The removal of Pb(II) by *Phanerochaete chrysosporium*. Water. Res. 34(16) 4090-100
28. Jianlong, W., Xinmin, Z., Decai, D., Ding, Z., 2001. Bioadsorption of lead (II) from aqueous solution by fungal biomass of *Aspergillus niger*. Journal of Biotechnology 87:273- 277.

29. Liu, Y., Xu, H., Yang, S., Tay, J., 2003. A general model for biosorption of Cd, Cu, and Zn by aerobic granules. *Journal of Biotechnology* 102:233-239.
30. Rosales, L., Mendoza, J., Katarzyna, W. y Gutierrez, F. 2002. Implementación de un Procedimiento citoquímico para la detección in situ de la reducción de Cr VI por cepas de hongos resistentes a cromato. . Instituto de Investigaciones Científicas Universidad de Guanajuato. México.
31. Lebeau, T., Bagot, D., Jézéquel, K. y Fabre, B., 2002. Cadmium biosorption by free and immobilised microorganisms cultivated in a liquid soil extract medium: effects of Cd, pH and techniques of culture. *The Science of the Total Environment* 291: 73-83.
32. Vance, D.B. 2002. Metals and groundwater part II: In-situ bioremediation of metals contaminated groundwater. 2 The 4 Technology Solutions.
33. Roane, T.M., Josephson, K.L., Pepper, I.L. 2001. Dual-Bioaugmentation strategy to enhance remediation of cocontaminated soil. *Applied and Environmental microbiology*. Vol. 67, No. 7. pp. 3208-3215. U.S.A.
34. Cañizares-Vilanueva R.O. 2000. “Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana” *Revista Latinoamericana de Microbiología*.; No. 42, pp. 131-143.
35. Alguacil F.J. 1998. Biotratamiento de contaminantes de origen Inorgánico.
36. Vallejo Figueroa, Karleidys Darina. 2008. Estudio de la adsorción de cd (ii) y pb (ii), usando como adsorbente la ulva lactuca (lechuga de mar), Cumaná.
37. Agouborde M. 2008. Remoción de metales pesados por medio de adsorbentes no convencionales”, Temuco – Chile
38. Aprende en línea, *Rhizopus spp* [acceso 20 Enero de 2013]. Disponible en: <http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/moodle/mod/resource/view.php?inpopup=true&id=100895>
39. Universidad Nacional de Salta, *Aspergillus* [acceso 20 Enero de 2013]. Disponible en: <http://www.unsa.edu.ar/matbib/hongos/04htextoaspergilos.pdf>
40. Aprende en línea, *Aspergillus spp* [acceso 20 Enero de 2013]. Disponible en: <http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/moodle/mod/resource/view.php?inpopup=true&id=100812>
41. Rocha Castro E. 2000. Principios básicos de espectroscopía; Editorial UACH, México, pág 123-203.
42. Skoog, D.A. James; Holler F. James. 1998. Principios de análisis instrumental , 5° ed.; Ed. McGraw-Hill, págs. 219-239.

43. Núñez Chaves. 2007. Técnicas in vitro para biorremediación de cromo y Plomo, instituto tecnológico de costa rica escuela de biología.
44. Gómez, Y., O.Coto., .Abín, C. Hernández. 2002. Método efectivo para el aislamiento de bacterias resistentes a níquel y cobalto. Revista CENIC Ciencias Biológicas. 33 (1): 27-31.
45. Pauro Roque J., et al. 2009. Estudios de bioadsorción de Plomo por *Saccharomyces cereviceae* en soluciones acuosas Rev. Colomb. Biotecnol. Vol. XI No. 1 Julio 2009 33-39
46. Holt, J.G. and Krieg, N.R., (eds.). 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1, Baltimore, Maryland, U.S.A. Williams and Wilkins, Co. 485 p
47. Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Dowell, V.R.; Janda, W.M.; Sommers, H.M. and WINN, W.C. 1988. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. J. B. Lippincott Company, PHiladelphHia, Pennsylvania, U.S.A. 909 p
48. Ministerio de Salud. 2007. Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas, serie de normas técnicas N°44, Lima.
49. Ahmad Iqbal, Zafar Shaheen; Ahmad Farah. 2005. Heavy Metal Biosorption potential of *Aspergillus* and *Rhizopus* sp. isolated from Wastewater treated soil, *J. Appl. Sci. Environ. Mgt.*
50. Aksu Z. 2001. Equilibrium and kinetic modeling of cadmium biosorption by *C. vulgaris* in a batch system: Effect of temperature [J]. *Separation and Purification Technology*, 21(3): 285–294.
51. Ahuja, P., Gupta, R., Saxena, R. 1999. Sorption and desorption of cobalt by *Oscillatoria angustissima*. *Current Microbiology* 39 (1): 49-52.
52. Alluri H K, Ronda S R, Settalluri V S, Singh J, Suryanarayana, V & Venkateshwar P, 2007. Biosorption: An eco-friendly alternative for heavy metal removal, *African J Biotechnol*, 6: 2924.
53. Al-Garni, Saleh M., Ghanem, Khaled M., Bahobail, Abdulaziz. 2009. Biosorption characteristics of *Aspergillus fumigatus* in removal of cadmium from an aqueous solution, *African Journal of Biotechnology* Vol. 8 (17), pp. 4163-4172, 1 September
54. Arica, M., Bayramoglu, G., Yilmaz, M., Bektas, S., Genc, O. 2004. Biosorption of Hg+2, Cd+2 and Zn+2 by Ca- alginate and immobilized wood – rooting fungus *Funalia trogii*. *Journal of Hazardous Materials* 109:191-199.
55. Bailey S E, Olin T J, Bricka R M, Adrian D D. 1999. A review of potentially low-cost sorbents for heavy metals [J]. *Water Research*,1999, 33(11): 2469–2479.

56. Cárdenas, F. Et al. 2007. Bioadsorción de Cadmio (II) en Solución Acuosa por Biomazas Fúngicas, Centro de Investigación y de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Químicas, San Luis Potosí, S.L.P.-México.
57. Cárdenas, J.; Moctezuma-Zarate, M.; Acosta-Rodríguez, I.; 2010. “Aislamiento de hongos resistentes a metales pesados a partir de agua de diferentes Ríos de la Huasteca Potosina”. Revista Académica de Investigación.
58. Cruz C C V, Da Costa, A C A, Henriques C A, Luna A S. 2004. Kinetic modeling and equilibrium studies during cadmium biosorption by dead *Sargassum* sp. biomass [J]. *Bioresource Technology*, 2004, 91(3): 249–257.
59. Díaz, M.; Moctezuma, M.; Acosta, I.; 2002. “Aislamiento de hongos resistentes a metales pesados a partir de desechos mineros y su capacidad de remoción de metales pesados y flúor en solución”.
60. Doshi H, Seth C, Ray A & Kothari I L. 2008. Bioaccumulation of heavy metals by green algae, *Curr Microbiol*, 56: 246.
61. Fuentes G., Viñals J., Herreros O. 2008. Hydrothermal purification and enrichment of Chilean copper concentrates. Part 2: The behavior of the bulk concentrates. *Journal Elsevier. Hydrometallurgy* 95. pp.95-101.
62. Gadd GM. 2000. Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. *Current Opinion in Biotechnology* 11:271-79
63. Gutierrez, M., Gonzalez, L., Sanchez, E., Mellado, D. 2005. Biosorción de Pb⁺², por biomasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Informe de Investigación. Laboratorio de Investigación de Química y Bioquímica. Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, Mexico.
64. Hassan Sahar W. 2012. Biosorption of Cadmium from Aqueous Solutions Using A local Fungus *Aspergillus cristatus* (Glaucus Group), *African Journal of Biotechnology* Vol. 11(9), pp. 2276-2286.
65. Ho. Y. S. Ng. J. C. Y: McKay, G. 2000. Kinetics of Pollutant Sorption by biosorbents : Review. *Sep. Purif. Methods*, 189-232.
66. Kapoor A, Viraraghavan T, Cullimore D R.1999. Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus niger* [J]. *Bioresource Technology*, 1999, 70(1): 95–104.
67. Li, Z. 1999. Sorption Kinetics of Hexadecyltrimethylammonium on Natural Clinoptilolite. *Langmuir*.
68. McLean, J., Beveridge, T.J. 2001. Chromate reduction by a *Pseudomonad* isolated from a site contaminated with chromated copper arsenate. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 67, No. 3. pp. 1076-1084. Canada.

69. Ministerio de salud –Digesa. 2008. Río Chili – Vítor.
70. Pal, Tapan Kumar; Bhattacharyya, Sauryya; Basumajumdar, Arunabha. 2010. Cellular distribution of bioaccumulated toxic heavy metals in *Aspergillus niger* and *Rhizopus arrhizus*. *International Journal of PHarma and Bio Sciences*, V1(2)
71. Park, D., Y.S. Yun, J.H. Jo and J.M. Park. 2005. Mechanism of hexavalent chromium removal by dead fungal biomass of *Aspergillus niger*. *Water Res.* 39:533-540.
72. Pereira Duta, Flavia; Augusto da Costa, Antonio Carlos. 2001. Bioaccumulation of copper, zinc, cadmium and lead by bacillus sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus spHaericus* and *bacillus subtilis*, *Brazilian Journal of Microbiology* 32:1-5
73. Peterle, T. J. 1991. *Wildlife toxicology*. Van Nostrand Reinhold Publication. U.S.A.
74. Rawlings D. E., Kusano T. 1994. Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiol Rev.* March; 58(1): 39–55.
75. Soccol C R, Martin B, Raimbault M, Lebeault J M. 1994. Breeding and growth of *Rhizopus* in raw cassava by solid state fermentation [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41(3): 330–336.
76. Sukumar M. 2010. Reduction of hexavalent chromium by *Rhizopus Oryzae*, *African Journal of Environmental Science and Technology* Vol. 4(7), pp. 412-418.
77. Tarley C R T, Arruda M A Z. 2004. Biosorption of heavy metals using rice milling by-products: Characterisation and application for removal of metals from aqueous effluents [J]. *Chemosphere*, 54(7): 987–995.
78. Yu R, Hang Y D. 1991. Purification ad characterization of a glucoamylase from *Rhizopus oryzae* [J]. *Food Chemistry* 40(3):301–308.
79. Slideshare, Bacilos gram negativos no fermentadores [acceso 20 Enero de 2013]. Disponible en: <http://www.slideshare.net/maceya/bacilos-no-fermentadores>
80. Ministerio de Salud, Digesa, Listado de requisitos para recepción de muestras de aguas superficiales, agua de consumo, aguas residuales y aguas de mar. [Acceso 20 Enero de 2013]. Disponible en : <http://www.digesa.minsa.gob.pe/LAB/LISTADO%20REQUISITOS%20RECEPCION%20DE%20MUESTRAS%20AGUAS%20V02.pdf>

Apéndices

Apéndice 1

Resultados de los pesos secos de las cepas fúngicas de la etapa de acondicionamiento y de las cinéticas de las cepas fúngicas en presencia y ausencia de los metales Plomo (II) y Cadmio (II).

Tabla 1.1.

Peso seco de las cepas fúngicas de Aspergillus niger, Rhizopus spp y consorcio Asp- Rhi.

Concentración ppm	<i>Aspergillus niger</i> mg	<i>Rhizopus spp</i> mg	Consortio Asp- Rhi mg
3	345.30	46.10	194.30
10	340.20	45.70	192.60
25	335.60	44.35	189.30
50	320.40	42.15	177.50
75	295.32	39.20	166.20
100	279.30	34.00	160.34

Tabla 1.2.

Cinética de las cepas fúngicas en ausencia de los metales Plomo (II) y Cadmio (II).

Tiempo horas	<i>Aspergillus niger</i>			<i>Rhizopus spp</i>			Consortio		
	pH	biomasa mg	glucosa mg/dL	pH	biomasa mg	glucosa mg/dL	pH	biomasa mg	glucosa mg/dL
0	5.80	0.00	76.20	5.76	0.00	77.00	5.81	0.00	76.50
24	5.73	73.30	72.00	5.56	11.30	75.00	5.76	47.90	71.20
48	4.65	178.10	63.43	5.31	22.50	69.40	5.50	96.40	62.30
72	3.75	260.00	52.21	4.97	33.65	59.10	4.80	142.90	51.20
96	2.98	328.23	45.10	4.74	38.10	52.80	4.10	170.30	40.60
120	2.54	335.20	39.22	4.58	42.60	45.30	3.90	190.32	35.10
144	2.36	340.00	35.00	4.30	44.20	40.20	3.85	193.00	30.30
168	2.30	342.15	32.15	4.10	46.00	37.17	3.76	195.40	27.40

Tabla 1.3.

Cinética de las cepas fúngicas en presencia de los metales Plomo (II) y Cadmio (II).

Tiempo horas	<i>Aspergillus niger</i>			<i>Rhizopus spp</i>			Consortio		
	pH	biomasa mg	glucosa mg/dL	pH	biomasa mg	glucosa mg/dL	pH	biomasa mg	glucosa mg/dL
0	5.60	0.00	75.30	5.80	0.00	76.50	5.70	0.00	75.00
24	5.54	32.43	70.34	5.67	1.42	73.20	5.68	5.30	70.23
48	4.98	120.60	64.20	5.50	8.30	64.30	5.24	50.23	61.50
72	4.50	192.50	50.12	5.34	18.20	56.20	5.00	98.40	50.60
96	4.19	261.00	42.90	5.23	24.50	51.10	4.74	127.50	38.90
120	4.04	268.30	37.50	5.15	29.14	42.50	4.38	149.90	33.20
144	3.95	274.10	36.10	5.10	31.20	39.60	4.30	153.20	28.40
168	3.89	276.90	35.24	4.98	32.50	38.10	4.24	158.70	26.70

Apéndice 2

Resultados de los porcentajes de remoción por parte de *Aspergillus niger*, *Rhizopus spp* y consorcio (*Aspergillus niger* y *Rhizopus spp*). Para la determinación de la biomasa fungal más adecuada para la remoción de Plomo y Cadmio.

Tabla 2.1.

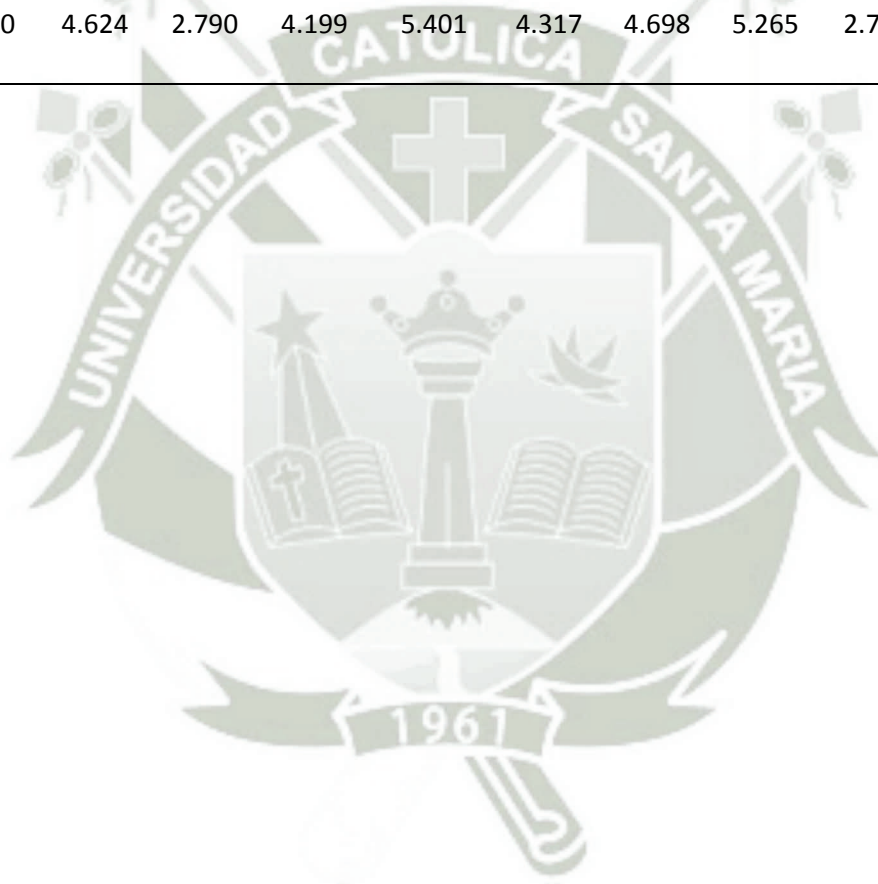
Porcentaje de remoción de Plomo (II), Cadmio (II) y consorcio, mediante el empleo de *Aspergillus niger*, *Rhizopus spp* y consorcio Asp- Rhi, correspondiente a la etapa preliminar.

Cepa	Tiempo, min	Metal		
		Plomo % R	Cadmio % R	Pb y Cd % R
Asp	0	0.00	0.00	0.00
Asp	240	58.37	25.96	45.68
Asp	480	64.45	31.47	58.58
Asp	1200	71.04	39.70	65.07
Asp	1440	74.19	44.72	66.90
Rhi	0	0.00	0.00	0.00
Rhi	240	50.70	40.36	38.61
Rhi	480	60.85	48.29	56.53
Rhi	1200	75.12	67.52	69.56
Rhi	1440	86.39	69.23	74.82
Asp-Rhi	0	0.00	0.00	0.00
Asp-Rhi	240	63.57	23.35	22.58
Asp-Rhi	480	73.70	32.36	34.73
Asp-Rhi	1200	82.13	41.56	49.09
Asp-Rhi	1440	84.17	43.42	53.43

Tabla 2.2.

Capacidad de biosorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla por *Aspergillus niger*, *Rhizopus spp* y consorcio Asp-Rhi.

Tiempo min	<i>Aspergillus</i>			<i>Rhizopus</i>			Consortio		
	Plomo q(mg/g)	Cadmio q(mg/g)	mezcla q(mg/g)	Plomo q(mg/g)	Cadmio q(mg/g)	mezcla q(mg/g)	Plomo q(mg/g)	Cadmio q(mg/g)	mezcla q(mg/g)
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
240	3.638	1.620	2.867	3.170	2.517	2.424	3.976	1.464	1.411
480	4.017	1.964	3.677	3.805	3.012	3.549	4.610	2.029	2.171
1200	4.428	2.478	4.084	4.697	4.211	4.368	5.137	2.606	3.068
1440	4.624	2.790	4.199	5.401	4.317	4.698	5.265	2.723	3.339



Apéndice 3

Resultados del porcentaje de remoción empleando *Rhizopus spp*, a distintos valores de pH, temperatura, biomasa y concentración de metal.

Tabla 3.1.

Porcentaje de remoción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla por Rhizopus spp a distintos valores de pH (3, 4 y 5).

pH	Tiempo, min	Metal		
		Plomo % R	Cadmio % R	Pb y Cd % R
3	0	0.00	0.00	0.00
3	240	22.13	18.47	18.77
3	480	25.59	23.58	28.56
3	1200	29.16	27.38	33.67
3	1440	30.06	28.65	35.30
4	0	0.00	0.00	0.00
4	240	37.73	28.07	29.15
4	480	49.59	34.24	40.59
4	1200	59.05	41.87	48.84
4	1440	61.75	44.04	52.90
5	0	0.00	0.00	0.00
5	240	43.37	41.94	32.59
5	480	56.71	49.33	50.94
5	1200	71.62	67.71	62.90
5	1440	85.49	69.81	68.32

Tabla 3.2.

Capacidad de biosorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla por *Rhizopus spp* a diferentes valores de pH (3, 4 y 5).

Tiempo min	Plomo			Cadmio			mezcla		
	pH 3	pH 4	pH 5	pH 3	pH 4	pH 5	pH 3	pH 4	pH 5
	q(mg/g)	q(mg/g)	q(mg/g)	q(mg/g)	q(mg/g)	q(mg/g)	q(mg/g)	q(mg/g)	q(mg/g)
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
240	1.383	2.359	2.709	1.153	1.755	2.625	1.173	1.826	2.031
480	1.600	3.101	3.543	1.472	2.140	3.088	1.785	2.543	3.175
1200	1.823	3.693	4.474	1.710	2.617	4.238	2.104	3.059	3.921
1440	1.879	3.861	5.340	1.789	2.753	4.369	2.206	3.313	4.259

Tabla 3.3.

Coefficientes r mediante el empleo de los modelos de primer y segundo orden, a distintos valores de pH (3, 4 y 5).

PH	Primer orden			Segundo orden		
	Plomo	Cadmio	Mezcla	Plomo	Cadmio	Mezcla
	r	r	r	r	r	r
3	0.9672	0.9406	0.9991	0.9997	0.9998	0.9975
4	0.9271	0.9959	0.9038	0.9998	0.9992	0.9989
5	0.8764	0.9922	0.9983	0.9922	0.9966	0.9979
Promedio	0.9236	0.9762	0.9671	0.9972	0.9985	0.9981

Tabla 3.4.

Porcentaje de remoción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla por *Rhizopus spp* a distintas temperaturas (10°C, 25°C y 40°C).

Temperatura, °C	Tiempo, min	Metal		
		Plomo % R	Cadmio % R	Pb y Cd % R
10	0	0.00	0.00	0.00
10	240	40.33	32.48	15.12
10	480	46.57	37.66	24.58
10	1200	52.15	48.82	38.94
10	1440	61.92	50.32	43.26
25	0	0.00	0.00	0.00
25	240	46.34	38.48	30.91
25	480	59.51	45.27	47.91
25	1200	76.03	63.81	59.37
25	1440	84.19	67.35	66.14
40	0	0.00	0.00	0.00
40	240	36.27	32.16	15.15
40	480	40.79	38.49	32.96
40	1200	55.38	54.05	49.41
40	1440	65.65	63.21	53.78

Tabla 3.5.

Capacidad de biosorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla por *Rhizopus spp* a distintas temperaturas (10°C, 25°C y 40°C).

Tiempo min	Plomo			Cadmio			mezcla		
	10°C	25°C	40°C	10°C	25°C	40°C	10°C	25°C	40°C
	q(mg/g)	q(mg/g)	q(mg/g)	q(mg/g)	q(mg/g)	q(mg/g)	q(mg/g)	q(mg/g)	q(mg/g)
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
240	2.504	2.884	2.253	2.037	2.395	1.989	0.943	1.926	0.938
480	2.892	3.703	2.534	2.361	2.818	2.380	1.534	2.986	2.041
1200	3.238	4.731	3.440	3.061	3.972	3.343	2.430	3.701	3.059
1440	3.845	5.239	4.078	3.155	4.191	3.910	2.699	4.123	3.330

Tabla 3.6.

Coefficientes r mediante el empleo de los modelos de primer y segundo orden, a distintas temperaturas (10°C, 25°C y 40°C).

T °C	Primer orden			Segundo orden		
	Plomo r	Cadmio r	Mezcla r	Plomo r	Cadmio r	Mezcla r
10	0.9428	0.9297	0.9991	0.9906	0.9975	0.9996
25	0.8970	0.9908	0.9971	0.9976	0.9956	0.9974
40	0.8843	0.8627	0.7431	0.9865	0.9906	0.9960
Promedio	0.9081	0.9277	0.9131	0.9916	0.9946	0.9976

Tabla 3.7.

Porcentaje de remoción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla por Rhizopus spp a distintas cantidades de Biomasa (1Micelio, 2Micelios y 3Micelios).

Biomasa	Tiempo, min	Metal		
		Plomo % R	Cadmio % R	Pb y Cd % R
1 Micelio	0	0.00	0.00	0.00
1 Micelio	240	13.64	13.07	9.15
1 Micelio	480	21.79	15.05	16.00
1 Micelio	1200	24.27	23.50	21.35
1 Micelio	1440	28.64	24.38	24.50
2 Micelios	0	0.00	0.00	0.00
2 Micelios	240	29.02	25.46	19.11
2 Micelios	480	41.77	32.93	31.06
2 Micelios	1200	51.59	41.52	40.38
2 Micelios	1440	54.98	43.38	44.52
3 Micelios	0	0.00	0.00	0.00
3 Micelios	240	45.35	39.87	30.81
3 Micelios	480	63.23	46.18	46.63
3 Micelios	1200	76.23	62.87	60.93
3 Micelios	1440	83.83	67.42	66.76

Tabla 3.8.

Capacidad de biosorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla por Rhizopus spp a distintas cantidades de Biomasa (1Micelio, 2Micelios y 3Micelios).

Tiempo min	Plomo			Cadmio			mezcla		
	1 M	2 M	3 M	1 M	2 M	3 M	1 M	2 M	3 M
	q(mg/g)	q(mg/g)	q(mg/g)	q(mg/g)	q(mg/g)	q(mg/g)	q(mg/g)	q(mg/g)	q(mg/g)
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
240	2.559	2.710	2.835	2.457	2.393	2.493	1.714	1.797	1.926
480	4.089	3.901	3.952	2.829	3.094	2.887	2.996	2.919	2.915
1200	4.553	4.818	4.764	4.418	3.901	3.930	3.998	3.796	3.808
1440	5.373	5.135	5.239	4.583	4.076	4.215	4.587	4.186	4.173

Tabla 3.9.

Coefficientes r mediante el empleo de los modelos de primer y segundo orden, a distintas cantidades de Biomasa (1Micelio, 2Micelios Y 3Micelios).

Biomasa	Primer orden			Segundo orden		
	Plomo	Cadmio	Mezcla	Plomo	Cadmio	Mezcla
	r	r	r	r	r	r
1 Micelio	0.8753	0.9891	0.8065	0.9906	0.9929	0.9962
2 Micelios	0.8912	0.9129	0.8397	0.9993	0.9997	0.9980
3 Micelios	0.8995	0.9046	0.8551	0.9984	0.9952	0.9989
Promedio	0.8887	0.9355	0.8337	0.9961	0.9959	0.9977

Tabla 3.10.

Porcentaje de remoción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla por Rhizopus spp a distintas concentraciones (10ppm, 50ppm y 90ppm).

Concentración, ppm	Tiempo, min	Metal		
		Plomo % R	Cadmio % R	Pb y Cd % R
10	0	0.00	0.00	0.00
10	240	99.57	99.86	99.51
10	480	99.59	99.90	99.50
10	1200	99.58	99.89	99.51
10	1440	99.59	99.90	99.47
50	0	0.00	0.00	0.00
50	240	87.70	76.16	70.02
50	480	99.92	86.20	93.43
50	1200	99.92	99.96	99.88
50	1440	99.90	99.97	99.88
90	0	0.00	0.00	0.00
90	240	42.83	36.16	27.35
90	480	58.83	47.38	46.49
90	1200	77.10	64.80	60.26
90	1440	85.91	68.73	67.72

Tabla 3.11.

Capacidad de biosorción de Plomo (II), Cadmio (II) y mezcla por Rhizopus spp a distintas concentraciones (10ppm, 50ppm y 90ppm).

Tiempo min	Plomo			Cadmio			mezcla		
	10 ppm q(mg/g)	50 ppm q(mg/g)	90 ppm q(mg/g)	10 ppm q(mg/g)	50 ppm q(mg/g)	90 ppm q(mg/g)	10 ppm q(mg/g)	50 ppm q(mg/g)	90 ppm q(mg/g)
0	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
240	0.611	2.746	2.419	0.615	2.365	2.028	0.630	2.197	1.546
480	0.611	3.129	3.323	0.615	2.676	2.656	0.630	2.932	2.628
1200	0.611	3.129	4.355	0.615	3.104	3.633	0.630	3.134	3.406
1440	0.611	3.128	4.853	0.615	3.104	3.853	0.629	3.134	3.828

Tabla 3.12.

Coefficientes r mediante el empleo de los modelos de primer y segundo orden, a distintas concentraciones (10ppm, 50ppm y 90ppm).

Concentración ppm	Primer orden			Segundo orden		
	Plomo r	Cadmio r	Mezcla r	Plomo r	Cadmio r	Mezcla r
10	0.9998	0.9999	0.9999	0.9991	0.9997	0.9998
50	0.9999	0.9706	0.9997	0.9987	0.9995	0.9970
90	0.8716	0.8787	0.8266	0.9981	0.9990	0.9967
Promedio	0.9571	0.9497	0.9421	0.9986	0.9994	0.9978



Apéndice 4

Resultados del análisis estadístico para la determinación de la mejor biomasa fungal para la remoción de plomo y cadmio, correspondiente a la etapa preliminar y resultados del análisis estadístico para la determinación de los valores óptimos de pH, temperatura, biomasa y concentración.

Tabla 4.1.

Test de Tuckey respecto a la remoción de Plomo (II) por Aspergillus niger, Rhizopus spp y consorcio Asp-Rhi, en la etapa preliminar.

Remocion				
Cepa	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	
HSD de Tukey ^a	Asp	3	74.1867	
	Asp-Rhi	3		84.1767
	Rhi	3		86.3833
	Sig.		1.000	.195
Tukey B ^a	Asp	3	74.1867	
	Asp-Rhi	3		84.1767
	Rhi	3		86.3833

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

Tabla 4.2.

Test de Tuckey respecto a la remoción de Cadmio (II) por Aspergillus niger, Rhizopus spp y consorcio Asp-Rhi, en la etapa preliminar.

Remocion				
Cepa	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	
HSD de Tukey ^a	Asp-Rhi	3	43.4467	
	Asp	3	44.6333	
	Rhi	3		69.3200
	Sig.		.280	1.000
Tukey B ^a	Asp-Rhi	3	43.4467	
	Asp	3	44.6333	
	Rhi	3		69.3200

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

Tabla 4.3.

Test de Tuckey respecto a la remoción de la mezcla (Plomo (II) y Cadmio (II)) por Aspergillus niger, Rhizopus spp y consorcio Asp-Rhi, en la etapa preliminar.

Remocion

Cepa	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
HSD de Tukey ^a	Asp-Rhi	3	53.4333	
	Asp	3		66.8967
	Rhi	3		74.8233
	Sig.		1.000	1.000
Tukey B ^a	Asp-Rhi	3	53.4333	
	Asp	3		66.8967
	Rhi	3		74.8233

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

Tabla 4.4.

Test de Tuckey respecto a la remoción de Plomo (II) por Rhizopus spp, a distintos valores de pH (3, 4 y 5).

Remocion

pH	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
HSD de Tukey ^a	pH 3	3	30.0567	
	pH 4	3		61.7533
	pH 5	3		85.4867
	Sig.		1.000	1.000
Tukey B ^a	pH 3	3	30.0567	
	pH 4	3		61.7533
	pH 5	3		85.4867

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

Tabla 4.5.

Test de Tuckey respecto a la remoción de Cadmio (II) por Rhizopus spp, a distintos valores de pH (3, 4 y 5).

Remocion

pH	N	Subconjunto para alfa = .05			
		1	2	3	
HSD de Tukey ^a	pH 3	3	28.6500		
	pH 4	3		44.0400	
	pH 5	3			69.8100
	Sig.		1.000	1.000	1.000
Tukey B ^a	pH 3	3	28.6500		
	pH 4	3		44.0400	
	pH 5	3			69.8100

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

Tabla 4.6.

Test de Tuckey respecto a la remoción de la mezcla (Plomo (II) y Cadmio (II)) por Rhizopus spp, a distintos valores de pH (3, 4 y 5).

Remocion

pH	N	Subconjunto para alfa = .05			
		1	2	3	
HSD de Tukey ^a	pH 3	3	35.2967		
	pH 4	3		52.9000	
	pH 5	3			68.3133
	Sig.		1.000	1.000	1.000
Tukey B ^a	pH 3	3	35.2967		
	pH 4	3		52.9000	
	pH 5	3			68.3133

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

Tabla 4.7.

Test de Tuckey respecto a la remoción de Plomo (II) por Rhizopus spp, a distintas temperaturas (10°C, 25°C y 40°C).

Remocion

Temperatura	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
HSD de Tukey ^a T° 10	3	61.9167		
T° 40	3		65.6433	
T° 25	3			84.1933
Sig.		1.000	1.000	1.000
Tukey B ^a T° 10	3	61.9167		
T° 40	3		65.6433	
T° 25	3			84.1933

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

Tabla 4.8.

Test de Tuckey respecto a la remoción de Cadmio (II) por Rhizopus spp a distintas temperaturas (10°C, 25°C y 40°C).

Remocion

Temperatura	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
HSD de Tukey ^a T° 10	3	50.3133	
T° 40	3		63.2400
T° 25	3		67.3400
Sig.		1.000	.452
Tukey B ^a T° 10	3	50.3133	
T° 40	3		63.2400
T° 25	3		67.3400

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

Tabla 4.9.

Test de Tuckey respecto a la remoción de la mezcla (Plomo (II) y Cadmio (II)) por Rhizopus spp, a distintas temperaturas (10°C, 25°C y 40°C).

Remocion

	Temperatura	N	Subconjunto para alfa = .05		
			1	2	3
HSD de Tukey ^a	T° 10	3	43.2600		
	T° 40	3		53.7800	
	T° 25	3			66.1333
	Sig.		1.000	1.000	1.000
Tukey B ^a	T° 10	3	43.2600		
	T° 40	3		53.7800	
	T° 25	3			66.1333

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

Tabla 4.10.

Test de Tuckey respecto a la remoción de Plomo (II) por Rhizopus spp, a distintas biomاسas (1M, 2M y 3M).

Remocion

	Biomasa	N	Subconjunto para alfa = .05		
			1	2	3
HSD de Tukey ^a	1 M.	3	28.6300		
	2 M.	3		54.9800	
	3 M.	3			83.8300
	Sig.		1.000	1.000	1.000
Tukey B ^a	1 M.	3	28.6300		
	2 M.	3		54.9800	
	3 M.	3			83.8300

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

Tabla 4.11.

Test de Tuckey respecto a la remoción de Cadmio (II) por Rhizopus spp, a distintas biomاسas (1M, 2M y 3M).

Remocion

Biomasa	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
HSD de Tukey ^a				
1 M.	3	24.3800		
2 M.	3		43.3767	
3 M.	3			67.4200
Sig.		1.000	1.000	1.000
Tukey B ^a				
1 M.	3	24.3800		
2 M.	3		43.3767	
3 M.	3			67.4200

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

Tabla 4.12.

Test de Tuckey respecto a la remoción de la mezcla (Plomo (II) y Cadmio (II)) por Rhizopus spp, a distintas biomاسas (1M, 2M y 3M).

Remocion

Biomasa	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
HSD de Tukey ^a				
1 M.	3	24.4967		
2 M.	3		44.5267	
3 M.	3			66.7600
Sig.		1.000	1.000	1.000
Tukey B ^a				
1 M.	3	24.4967		
2 M.	3		44.5267	
3 M.	3			66.7600

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

Tabla 4.13.

Test de Tuckey respecto a la remoción de Plomo (II) por Rhizopus spp, a distintas concentraciones (10ppm, 50ppm y 90ppm).

Remocion

Concentracion	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
HSD de Tukey ^a 90ppm	3	85.9067	
10ppm	3		99.5933
50ppm	3		99.9000
Sig.		1.000	.698
Tukey B ^a 90ppm	3	85.9067	
10ppm	3		99.5933
50ppm	3		99.9000

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

Tabla 4.14.

Test de Tuckey respecto a la remoción de Cadmio (II) por Rhizopus spp, a distintas concentraciones (10ppm, 50ppm y 90ppm).

Remocion

Concentracion	N	Subconjunto para alfa = .05	
		1	2
HSD de Tukey ^a 90ppm	3	68.7267	
10ppm	3		99.8967
50ppm	3		99.9700
Sig.		1.000	.978
Tukey B ^a 90ppm	3	68.7267	
10ppm	3		99.8967
50ppm	3		99.9700

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.

Tabla 4.15.

Test de Tuckey respecto a la remoción de la mezcla (Plomo (II) y Cadmio (II)) por Rhizopus spp, a distintas concentraciones (10ppm, 50ppm y 90ppm).

Remocion

Concentracion	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
HSD de Tukey ^a	90ppm	3	67.7167	
	10ppm	3		99.4733
	50ppm	3		99.8833
	Sig.		1.000	1.000
Tukey B ^a	90ppm	3	67.7167	
	10ppm	3		99.4733
	50ppm	3		99.8833

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3.000.



Apéndice 5

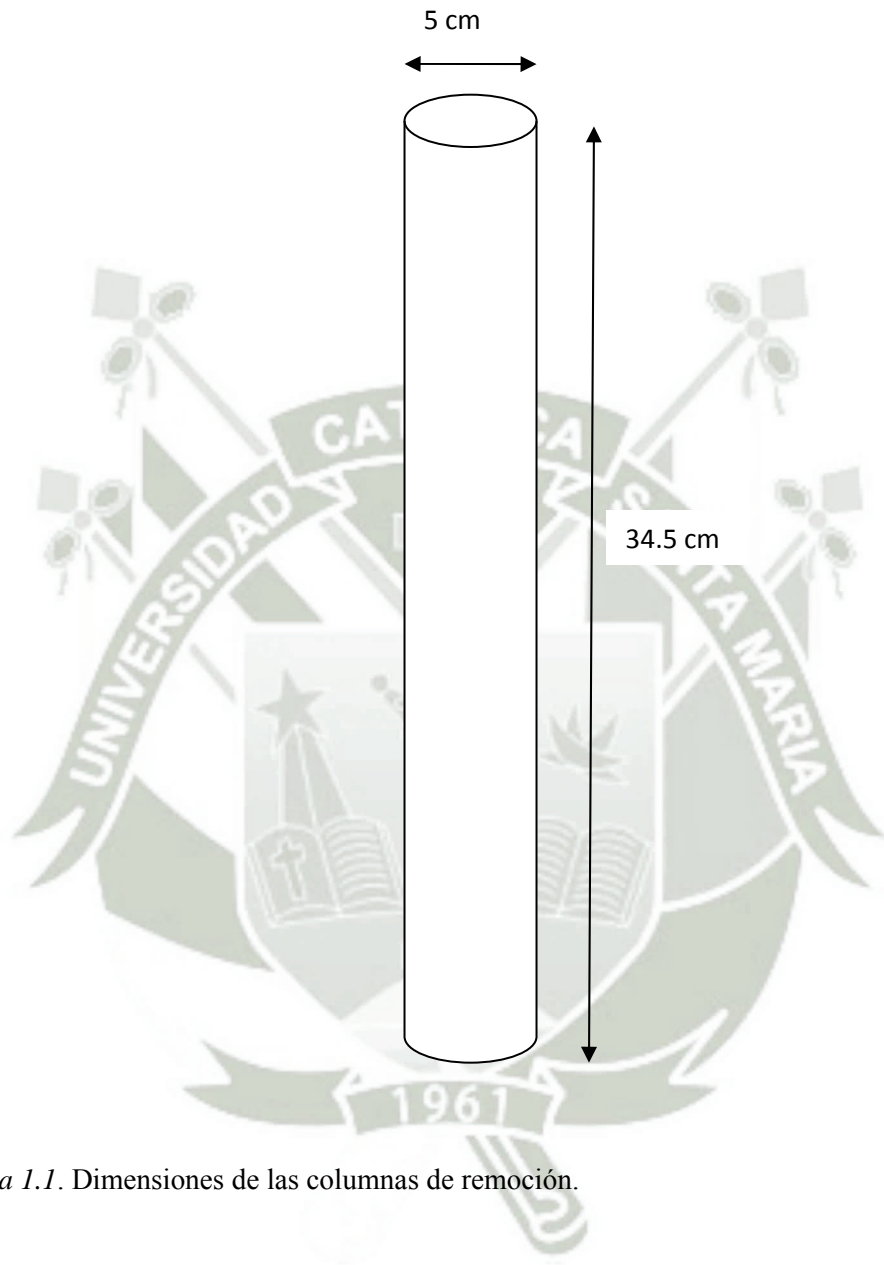


Figura 1.1. Dimensiones de las columnas de remoción.