



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**RESISTENCIA Y CAPACIDAD DE REMOCION DE Candida
albicans A DIFERENTES METALES PESADOS Y
FLUOR EN SOLUCION**

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

Rafael Gerardo Navarro Martínez

ASESORADA POR: M. C. ISMAEL ACOSTA RODRIGUEZ

SAN LUIS POTOSI, S. L. P., NOVIEMBRE DE 1995

475

1

T
TD
N3
C.



1080076899

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS DE POSGRADO

RESISTENCIA Y CAPACIDAD DE REMOCION DE *Candida albicans*
A DIFERENTES METALES PESADOS Y FLUOR EN SOLUCION

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACOBIOLOGO

p r e s e n t a:

RAFAEL GERARDO NAVARRO MARTINEZ

ASESORADA POR: M.C. ISMAEL ACOSTA RODRIGUEZ

T
T0475
N 3





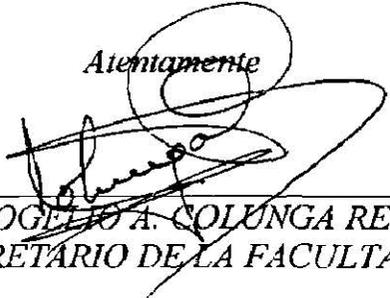
APROBACION DE TEMA DE TESIS

SR. RAFAEL GERARDO NAVARRO MARTINEZ
P R E S E N T E:

Por este conducto me permito informar a USTED que el H. Consejo Técnico Consultivo de esta Facultad de Ciencias Químicas, en sesión ordinaria de fecha 1o. DE SEPTIEMBRE DE 1995., tuvo a bien aprobar el tema de su tesis profesional titulada: "RESISTENCIA DE CANDIDA ALBICANS A DIFERENTES METALES PESADOS Y EL USO DE SU BIOMASA PARA LA BIOADSORCION DE ALGUNOS DE ELLOS.", mismo que será asesorado por el M.C. JOSE ISMAEL ACOSTA RODRIGUEZ., para la presentación de su examen profesional de **QUÍMICO FARMACOBIOLOGO.**

Sin más por el momento queda de usted.

Atentamente



ING. ROGELIO A. COLUNGA REYNA
SECRETARIO DE LA FACULTAD

San Luis Potosí, S.L.P. a 25 de septiembre de 1995

DEDICATORIAS

A MIS PADRES:

RAFAEL Y ROSA MARIA.

A MIS HERMANOS:

LUIS EDGARDO, BRENDA LUCIA Y GUILLERMO.

A MIS ABUELOS

LUIS Y MA. EMILIA.
RAFAEL Y MA. DE JESUS.

A MIS TIOS:

JORGE Y JUDITH.

AL M.C. ISMAEL ACOSTA RODRIGUEZ

POR SU VALIOSA AMISTAD Y POR COMPARTIR CONMIGO SU CONOCIMIENTO.

I N D I C E G E N E R A L

T I T U L O	P A G I N A
Resumen	1
Generalidades	2
Antecedentes	6
Objetivo General	8
Material y Métodos	9
Lavado de Material	9
Obtención de la Biomasa Celular	10
Determinación de la capacidad de bioadsorción de metales pesados	10
Determinación de Cadmio	10
Determinación de Mercurio	13
Determinación de Plomo	15
Determinación de Cromo (VI)	17
Determinación de Cobre y Arsénico por Espectrofotometría	19
Determinación de Cobre y Arsénico por el Sistema de Atomización de Flama	21
Determinación de Flúor	22
Determinación de Cobalto	23
Resultados	24
Discusión	38
Conclusiones	40
Bibliografía	41

INDICE DE FIGURAS

TITULO	PAGINA
Figura No. 1.- Levaduras de <i>Candida albicans</i>	28
Figura No. 2.- Levaduras de <i>Candida albicans</i> en presencia de 2000 ppm de Zinc	29
Figura No. 3.- Levaduras de <i>Candida albicans</i> en presencia de 1500 ppm de Arsénico	30
Figura No. 4.- Cultivo de <i>Candida albicans</i> en presencia de Zinc	31
Figura No. 5.- Cultivo de <i>Candida albicans</i> en presencia de Arsénico	32
Figura No. 6.- Cultivo de <i>Candida albicans</i> en presencia de Mercurio	33
Figura No. 7.- Resistencia de <i>Candida albicans</i> a diferentes concentraciones de los metales analizados	35
Figura No. 8.- Porcentaje de bioadsorción de los diferentes metales analizados por la biomasa celular de <i>Candida albicans</i>	37

INDICE DE TABLAS

TITULO	PAGINA
Tabla No. 1.- Clasificación taxonómica de los hongos en base a su pared celular	5
Tabla No. 2.- Resistencia de <i>C. albicans</i> a los diferentes metales analizados	34
Tabla No. 3.- Porcentaje de bioadsorción de diferentes metales y flúor por la biomasa celular de <i>C. albicans</i>	36

RESUMEN

Recientemente, se ha establecido el potencial de las biomásas celulares en la remoción de iones metálicos de soluciones acuosas. Entre estas biomásas, se han descrito bacterias, algas, hongos y muy pocas levaduras, entre las que se encuentran *Sacharomyces cerevisiae*, *Cryptococcus albidus*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida robusta*, *Candida utilis*, con diferentes porcentajes de captación de metales pesados. También se ha reportado el uso de carbón activado y algunos lodos de sedimentos de ríos para la remoción de iones metálicos de soluciones acuosas. Por otro lado existen muy pocos reportes del aislamiento de levaduras resistentes a metales pesados a partir de muestras de zonas con altos índices de contaminación. Por este motivo, el objetivo de este trabajo fue analizar la resistencia *Candida albicans* a diferentes metales pesados y su capacidad de captación de diferentes iones metálicos y flúor en solución.

Se analizaron, mediante la técnica de resistencia en placa, ocho metales (de los principales contaminantes de los mantos acuíferos de esta ciudad), encontrando diferentes resistencias: La levadura crece bien a 2000 ppm de zinc, plomo y cobre, a 1500 ppm de arsénico y a 500 ppm de plata, es más sensible a cobalto (300 ppm), mercurio y cadmio (200 ppm).

Con respecto a su potencial de captación de metales pesados, se analizaron ocho: el cromo por el método de la difenilcarbazida, el mercurio, cadmio, plomo por el de la ditizona, el arsénico y el cobre por Espectrofotometría de Absorción Atómica, el flúor por el del ión selectivo y el cobalto por el de la dimetilisobutilcetona. Se encontró que esta biomasa remueve eficientemente cromo (48%), medianamente cadmio (36%), cobre (31.6%), cobalto (22.6%), plomo (20%) y mercurio (16%), y no capta arsénico ni flúor.

GENERALIDADES

El género *Candida* incluye un variado número de especies, pero solamente algunas de ellas pueden ser oportunistas, sobresaliendo *C. albicans*, la que dependiendo de la topografía de donde se aisle, se puede encontrar entre un 60 hasta un 85%.

Clasificación:

CLASE: *Deuteromycetes*
SUBCLASE: *Blastomycetidae*
ORDEN: *Criptococal*
FAMILIA: *Criptocaceae*
GENERO: *Candida*
ESPECIES: *albicans, tropicalis, stellatoidea, krusei, parapsilosis, pseudotropicalis, guilliermondi, famata y zeylanoides.*

Algunos autores consideran dentro del género *Candida* a *Torulopsis* (*Torula*) *glabrata*, situación sujeta a discusión debido a que este hongo levaduriforme no presenta propiedades similares al del género *Candida*, de las que sobresale la producción de pseudomicelio.

Para la tipificación del género *Candida* se realiza la siguiente secuencia de pruebas:

Cultivos: Aunque puede haber pequeñas diferencias entre la morfología colonial de las especies de *Candida*, por lo regular es similar. Desarrollan en el medio de Sabouraud en un tiempo promedio de 48 a 72 horas a 25°C, dando colonias limitadas, planas, cremosas, opacas, generalmente lisas, aunque algunas veces se presentan rugosas, de color blanco o blanco amarillento, rara vez pueden dar tonalidades rosas (*C. guilliermondi*). En algunas especies es posible ver formaciones de pseudomicelio que se entremeten en el agar.

Todas las especies de *Candida* se reproducen por blastosporas, dependiendo de cada una de ellas fluctúan entre 2 a 10 μ de diámetro, formando gemas de la mitad de su tamaño; en ocasiones se logra observar pseudomicelio, sobretodo cuando provienen de medios muy pobres o viejos. Se tiñen bien con azul de algodón, PAS y Wright; aunque no se rigen por el Gram, generalmente son positivas, llegando a cambiar cuando las colonias envejecen.

Al igual que las bacterias, su tipificación se hace a base de pruebas fisiológicas y morfológicas, las más importantes son las siguientes:

Filamentación en suero. Se realiza en suero humano o en sueros con glucosa, glucosamina o sales de amonio. Se siembra la cepa a investigar en 0.5 ml de suero, se incuba a 37°C durante 3 a 3.5 horas, posteriormente se practica un examen en fresco con algún colorante o tinción (Gram). Esta prueba es presuntiva de *C. albicans*, si se forma un tubo germinal de aproximadamente

5 a 15 μ de largo, que parte de la célula levaduriforme. Es importante remarcar que después del período indicado de incubación, todas las especies de *Candida* pueden formar tubos germinativos. Mucho se ha discutido sobre el valor de esta prueba, debido a que se presentan falsas positivas y negativas, que dependen tanto de la cepa como del medio (suero), por ejemplo Zaragoza-Hernández y cols. (1991) analizaron una serie de cepas en diversos sueros provenientes de personas sanas, diabéticas, sueros lipémicos e ictericos, etc., obteniendo en ellos diferentes resultados.

Producción de pseudomicelio y clamidoconidios. Se lleva a cabo en medios pobres y tensos, como harina de maíz agar (Cornmeal) o papa zanahoria agar, a los que se les agrega 1% de algún tensoactivo como el Tween 80.

Feo (1985) comunica buenos resultados con medios como el Oxgall agar (medio a base de sales biliares) y leche diluida agar.

Cualquiera de los medios utilizados se siembran en cajas de Petri por estrías, incubándose a 25°C durante 72 horas, para hacer la observación se agrega una gota de colorante y un cubreobjetos sobre la colonia, posteriormente la caja se coloca encima de la platina del microscopio, para su investigación microscópica. Todas las especies oportunistas de *Candida* presentan pseudomicelio largo, ramificado, con acúmulos de blastosporas. En el caso específico de *C. albicans* se ven clamidosporas terminales o intercalares que miden entre 10 y 12 μ de diámetro, con una doble membrana bien formada. Esta prueba biológica es determinante para *C. albicans* y solo en raras ocasiones se puede presentar en *C. stellatoidea*.

Pruebas bioquímicas. Se basan en la fermentación (zimograma) y utilización (auxonograma) de carbohidratos. Existe un perfil bioquímico que identifica a cada una de las especies de *Candida*.

Zimograma. Debe realizarse en medio de cultivo líquido con una proporción de carbohidratos que fluctúa entre 1 y 5%, agregándole un indicador para pH ácido (rojo de fenol o púrpura de bromocresol) y una campana de fermentación, para detectar la producción de gas. Los medios se siembran a partir de colonias diferenciadas, posteriormente se incuban a 25°C durante 5 a 15 días, la lectura debe hacerse por el viraje del indicador, así como por la formación de gas.

Auxonograma. Se realiza en medio sólido base peptonado, ausente de carbohidratos, los cuales se agregan al medio en forma de penicilindros o sensidiscos (de manera similar a como se emplean en los antibiogramas), previamente se siembra la cepa problema y el carbohidrato a investigar se aplica en una solución del 1 al 2%, se incuban a 25°C durante 5 a 15 días. El desarrollo de la colonia alrededor del carbohidrato, indica una lectura positiva.

Pueden valorarse otras características que nos ayudan en la tipificación como son resistencia a la cicloheximida (actidione), reducción de sales de tetrazolio, utilización de nitratos y presencia de ureasa.

La resistencia al actidione puede medirse simplemente con el crecimiento en el medio de micose1.

La reducción de las sales de tetrazolio es una prueba importante cuando hay confusiones entre *Candida stellatoidea* con clamidoconidias positivas y *Candida albicans*.

La utilización de nitratos y presencia de ureasa los diferencia de otros géneros de levaduras como *Cryptococcus*.

PRUEBAS BIOLÓGICAS DEL GÉNERO *Candida*.

Especies	Producción de pseudomicelio	Formación de clamidoconidios	Filamentación en suero (37°C, 3h)
<i>C. albicans</i>	+	+	+
<i>C. stellatoidea</i>	+	-	-
<i>C. tropicalis</i>	+	-	-
<i>C. krusei</i>	+	-	-
<i>C. parapsilopsis</i>	+	-	-
<i>C. pseudotropicalis</i>	+	-	-
<i>C. guilliermondi</i>	+	-	-
<i>C. famata</i>	+	-	-
<i>C. zeylanoides</i>	+	-	-

Tomado de: Micología Médica Básica, Bonifaz, A. 1990. Ed. Méndez Cervantes.

COMPOSICIÓN DE LA PARED CELULAR DE *Candida albicans*.

La composición de la pared celular de las levaduras e hifas de *C. albicans* es cuantitativamente distinta. Las paredes celulares de las dos morfologías tienen concentraciones similares de lípidos, proteínas y carbohidratos, pero el contenido de mananas de la pared celular de la hifa es 20% menor que el de la pared de la levadura, mientras que la cantidad de glucana insoluble en álcali es mayor en la pared de la hifa.

De acuerdo a la composición química de la pared celular de *C. albicans* esta levadura pertenece al grupo VI (manano-glucano) de la clasificación propuesta por Bartnicki-García (1968) (tabla No. 1), pues la pared celular está compuesta principalmente por manana y glucana, con solo pequeñas cantidades de quitina. La fracción de manana (aproximadamente 40%) es un importante antígeno. Preparaciones de manana de diferentes cepas de *C. albicans* indican que existen dos serotipos, A y B. Análisis químicos detallados muestran que los polímeros de glucano de las paredes celulares tienen enlaces β (1,6) y β (1,3), mientras que los enlaces de las mananas son α (1,2) y α (1,6) con ramificaciones variables. Variaciones en los enlaces de las mananas, así como la constitución de las proteínas son responsables de dos serotipos de *C. albicans*. (San Blas, 1982).

Tabla No. 1.- CLASIFICACION TAXONOMICA DE LOS HONGOS EN BASE A SU PARED CELULAR

CATEGORIA QUIMICA	GRUPO TAXONOMICO
I. Celulosa-Glucógeno	Acrasiales
II. Celulosa-Glucana	Oomycetes
III. Celulosa-Quitina	Hyphochytridiomycetes
IV. Quitosana-Quitina	Zygomycetes
V. Quitina-Glucana	Chytridiomycetes
	Ascomycetes
	Basidiomycetes
	Deuteromycetes
VI. Manana-Glucana	Saccharomycetaceae
	Cryptococcaceae
VII. Manana-Quitina	Sporobolomycetaceae
VIII. Poligalactosamina-Galactano	Trichomycetes

Tomado de: Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi.
 Bartnicki-García, S. 1968. Ann. Rev. Microbiol. 22:87-108.

A N T E C E D E N T E S

Se ha reportado el uso de células microbianas como bioadsorbentes y bioabsorbentes naturales de metales pesados para la descontaminación y/o recuperación de dichos metales de una gran variedad de nichos ecológicos contaminados. La naturaleza de esta biomasa celular es muy diversa, pues se han utilizado bacterias, algas y hongos, así como carbón activado, materia orgánica y los lodos de sedimentos de algunos ríos.

El uso de las biomasas celulares presenta algunas ventajas sobre los métodos tradicionales existentes, como pueden ser: Su bajo costo y su selectividad para unirse a diferentes metales pesados, pues algunas de estas biomasas pueden remover muchos metales pesados, y otras sólo son específicas para muy pocos de ellos.

Leyva y cols. (1994) reportaron la remoción de cromo (VI) utilizando carbón activado y Huang y Wu (1975) coque calcinado, Balistrieri y Murray, (1982) reportaron la adsorción de cobre, plomo, zinc y cadmio por Goetite (óxido de fierro preparado sintéticamente), Davis (1984) la complejación de cobre y cadmio por materia orgánica natural, extraída del sedimento de la superficie del lago Urnersee (Suiza) y Tada y Suzuki (1982), la adsorción y desorción de cobre, zinc, cadmio y plomo por lodos de ríos urbanos, Namasivajan y Ranganathan (1995) la remoción de cadmio (II) por hidróxido de fierro (III)/cromo (III) de lodos residuales. Zacarías y cols (1995) reportan la captación de plomo, cadmio, mercurio, flúor, cobalto, arsénico, zinc y cobre, por la quitina comercial, Acosta y cols (1995) estudiaron la captación de cromo (VI) por la quitosana y quitina comercial.

Por otro lado, Horikoshi y cols (1981) reportaron la captura de uranio por el alga *Chlorella vulgaris*, Ramos y Cols. (1993), la acumulación de cobre plomo y zinc por el alga verde *Cladophora glomerata*. También se ha descrito la captura de plomo por la bacteria capsulada *Azotobacter sp* (Tornabene and Edwards, 1972); la captación de cadmio, estroncio, calcio, magnesio, sodio y potasio por 2 especies Gram positivas que son: *Bacillus megaterium* y *Streptococcus mutants* (Beveridge and Murray, 1976); la captura de osmio por *Escherichia coli* K-12 (Hoyle and Beveridge, 1984); la acumulación de uranio por *Pseudomonas aeruginosa* y *Saccharomyces cerevisiae* (Strandberg y cols., 1981), la captación de cromo (VI) por la microalga *Scenedesmus acutus* (Cañizares y cols., 1995), la remoción de cromo (VI) por la levadura capsulada *Cryptococcus neoformans* (Carro y cols., 1995), y la captación de cromo (VI) por algunos hongos filamentosos (Gutiérrez y cols., 1995).

En cuanto al uso de la biomasa celular de algunos hongos para la eliminación de metales, también hay diversos reportes entre los que se encuentran: la absorción de uranio y thorio por *Rhizopus arrhizus* y *Rhizopus sp* (Tobin y cols., 1984; Tsezos and Volesky, 1981) así como por algunas especies de *Penicillium sp* (Voleski, 1987); La captura de cobre, zinc,

manganeso, cadmio, bario, mercurio y plata por la biomasa de *Rhizopus arrhizus* (Tobin y cols., 1984); la captura de cobre por la cepa silvestre y algunas mutantes de *Mucor rouxii* (Chávez Marín y cols., 1993; Córtes Penagos y cols., 1994); la captación de cobre y plata por *Trichoderma sp* (Córtes Penagos y cols., 1993); la captura de cobre y cobalto por *Cunninghamella blakesleana* (Venkateswerlu and Stotzky, 1989), la captación de mercurio, plomo, cadmio y arsénico por la fase micelial de una cepa mutantes de *Mucor rouxii* (Acosta y Martínez, 1993; Martínez Juárez, 1991; Martínez y cols., 1994) y la bioadsorción de zinc, mercurio, cobre y plomo por hongos resistentes a algunos iones divalentes (*Mucor rouxii* 1 y 2, *Cladosporium sp* y *Helminthosporium sp*) (Acosta y cols., 1993; García Martínez, 1993), y utilizando la biomasa celular de los hongos mencionados anteriormente, Olivares Trejo (1994) y Acosta y Cols. (1994) estudiaron la bioadsorción de cobre, cobalto flúor y cadmio, la bioadsorción de cromo (VI) por *Rhizopus arrhizus* (Tobin y cols., 1984) y *Penicillium crysogenum* (Paknikar y cols., 1993), también Acosta y cols (1994) analizaron la capacidad de bioadsorción de plomo, mercurio, arsénico, zinc, cobalto, flúor, cadmio y cobre por hongos contaminantes ambientales resistentes a metales pesados, Zacarías y cols (1995) compararon la captación de metales pesados por dos cepas de *Mucor rouxii*, y Volesky y Holan (1995), reportan la captura de plomo, cadmio, cobre, zinc y uranio por las algas cafés *Ascophyllum* y *Sargassum*, y los hongos *Rhizopus sp* y *Absidia sp*.

Solo muy pocas levaduras, se han utilizado como filtros biológicos para la captación de metales pesados en solución. Entre estas se encuentran: *Saccharomyces cerevisiae* (uranio, plata, cadmio, oro), *Candida tropicalis* (cadmio, cromo, cobre, oro). Se ha reportado la acumulación de oro por 14 especies diferentes de levaduras: *C. krusei*, *C. robusta*, *C. utilis*, *Cryptococcus albidus*, *C. laurentii*, *Debaromyces hansenii*, *Endomycopsis fibuligera*, *Hansenula anomala*, *H. saturnus*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia farinosa*, *S. cerevisiae*, *Sporobolomyces salmonicolor* y *Torulopsis aerea*, con diferentes porcentajes de captación. Por otra parte, casi no hay reportes del aislamiento de levaduras resistentes a metales pesados a partir de muestras de zonas con altos índices de contaminación.

El uso de las biomasas celulares presenta algunas ventajas sobre los métodos tradicionales existentes, como pueden ser: Su bajo costo y su selectividad para unirse a diferentes metales pesados, pues algunas de estas biomasas pueden remover muchos metales pesados, y otras sólo son específicas para muy pocos de ellos.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la resistencia de *C. albicans* a diferentes metales pesados y su capacidad de captación de los mismos.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

La cepa utilizada fue la levadura *Candida albicans* del cepario del Laboratorio del Area Biológica del CIEP/FCQ/UASLP, la cual previamente se caracterizó.

PRUEBA DE RESISTENCIA EN PLACA.

Se prepararon cajas de Petri de 20 ml con Agar Sabouraud Dextrosa adicionado de diferentes sales, las cuales se guardaron en refrigeración hasta su uso. Se tomó una asada en condiciones estériles de las levaduras crecidas en ASD y se colocaron en un tubo de ensaye conteniendo 1 ml de solución salina estéril al 0.85%. Se hicieron diferentes diluciones (1:100, 1:1000), en la misma solución salina y se contaron las levaduras en un Hematocitómetro. Las placas preparadas, se inocularon con 1 000 000 de levaduras/ml, se espatularon (extendiéndose uniformemente por toda la caja de Petri con una varilla de vidrio en forma de triángulo en condiciones estériles) y se incubaron a 28°C y cuando la caja control alcanzó el máximo crecimiento (placa llena) se detuvo la prueba y se comparó el crecimiento de las placas restantes con respecto al control. Lo anterior se realizó con el objeto de valorar la resistencia de *Candida albicans* a diferentes metales divalentes.

AGAR DE DEXTROSA SABOURAUD (ASD)

Componente	concentración (g/l)
Peptona de caseína	10
Dextrosa	20
Agar purificado	20
pH= 5.7 + - 0.2	

Este medio se utilizó adicionado de los distintos metales a diferentes concentraciones de los mismos, para las pruebas de resistencia en placa.

LAVADO DE MATERIAL

Con el fin de evitar al máximo problemas por contaminación, todo el material tanto de vidrio como de plástico se debe someter al siguiente tratamiento: se lava de manera común con agua corriente y un detergente neutro (Extrán) previo remojo; se enjuaga con agua destilada y se le pasa a un recipiente que contiene ácido nítrico al 10% (v/v en agua desionizada), se deja reposar 24 hrs. y se enjuaga con agua tridesionizada. Por último se seca en un horno (Felisa) a 80°C durante 60 min. Se enfría e inmediatamente se tapa con papel aluminio y se guarda protegido del polvo.

El agua utilizada en este trabajo fue tridesionizada y ajustada a un pH de 4.0 con ácido clorhídrico 0.2 N.

OBTENCION DE LA BIOMASA CELULAR

Se siembran 1×10^6 lev/ml en 200 ml de medio de caldo de Tioglicolato y se incuban a 28°C en un baño con agitación constante durante 12 hrs (Yamato constant temp shaking bath Model 131-25). La biomasa celular obtenida se separa del medio de cultivo mediante filtración (papel filtro), después se lava con agua tridesionizada (obtenida en un desionizador Sybron/Barnstead Water Purificated Cartridge), se seca a 80°C durante 20 min., se muele manualmente en un mortero, y se guarda hasta su uso en un frasco color ambar.

DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DE BIOADSORCION DE METALES PESADOS

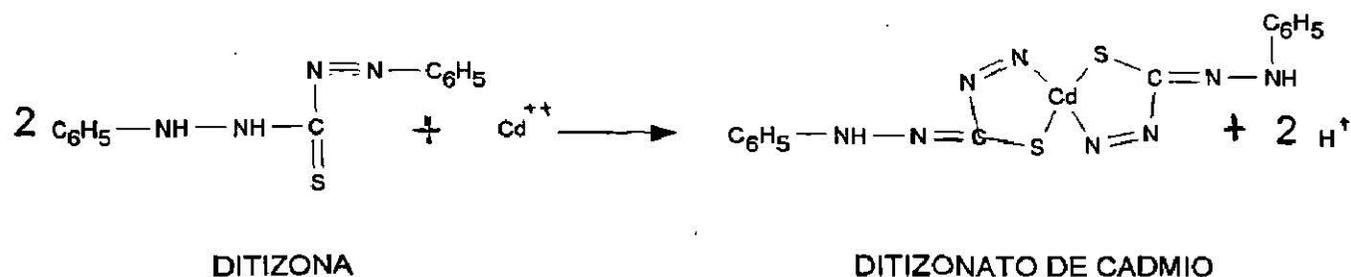
Se prepara una solución estándar del metal a probar, en agua tridesionizada; se ajusta el pH a 4.1 (potenciómetro de bolsillo PS-15, Corning) donde se obtiene la mayor captación de metal, (Acosta y Martínez, 1993). La cantidad de biomasa añadida a cada matraz Erlenmeyer fue de 80 miligramos/200 ml de solución a probar. Se toman alícuotas de 10 ml a determinados tiempos, la biomasa es removida por centrifugación (3000 rpm/5 min. Centrífuga Clínica, Solbat) y al sobrenadante se le determina la concentración y/o porcentaje del ión metálico no adsorbido por la biomasa celular (ver metodología abajo), y por diferencia se determina la cantidad adsorbida por la biomasa celular. El valor obtenido en el sobrenadante debe ser inverso al adsorbido por la biomasa.

DETERMINACION DE CADMIO POR EL METODO DE LA DITIZONA (Clesceri y cols., 1989)

FUNDAMENTO

Los iones cadmio reaccionan con la ditizona para formar un compuesto de color rosa a rojo que puede ser extraído con cloroformo. Los extractos obtenidos con el cloroformo son medidos fotométricamente y la concentración de cadmio es obtenida a partir de una curva patrón del mismo metal.

REACCION QUIMICA



I N T E R F E R E N C I A S

En las condiciones especificadas, las concentraciones de los iones metálicos normalmente encontradas en el agua no interfieren. Tampoco la luz normal del cuarto afecta el color del ditizonato de cadmio.

A P A R A T O S

Espectrofotómetro de luz UV Shimadzu modelo 160-A.

R E A C T I V O S

a.- Solución stock de cadmio.- Disolver 0.2272 gramos de cloruro de cadmio en 1 litro de agua tridesionizada, 1 mililitro de esta solución es igual a 100 microgramos de cadmio. Esta solución se guarda a 4°C en un frasco de polietileno.

b.- Solución de tartrato de sodio y potasio.- Disolver 250 gramos de tartrato de sodio y potasio en agua tridesionizada y aforar a 1 litro.

c.- Soluciones de hidróxido de sodio-cianuro de potasio.

Solución I.- Disolver 400 gramos de hidróxido de sodio y 10 gramos de cianuro de potasio en agua tridesionizada y aforar a 1 litro. Guardar a 4°C en un frasco de polietileno. Estable por 1 mes.

Solución II.- Disolver 400 gramos de hidróxido de sodio y 0.5 gramos de cianuro de potasio en agua tridesionizada y aforar a 1 litro. Guardar a 4°C en un frasco de polietileno. Estable por 1-2 meses.

d.- Solución de hidrocloreuro de hidroxilamina.- Disolver 20 gramos de hidrocloreuro de hidroxilamina en agua tridesionizada y aforar a 100 ml. guardar a 4°C en recipiente de polietileno.

e.- Solución stock de Ditizona.- Disolver 100 miligramos de ditizona en 50 ml de cloroformo y filtrar a través de un papel filtro (Whatman No. 42), recibir el filtrado en un embudo de separación, lavando el papel filtro con 3 porciones de 5 ml de cloroformo.

Adicionar 100 ml de hidróxido de amonio (1:99 v/v en agua tridesionizada) al embudo de separación y agitar por 1 minuto, dejar que se separen las fases de cloroformo y la acuosa. Transferir la fase de cloroformo a un segundo embudo de separación, reteniendo la capa acuosa de color naranja en el primer embudo, repitiendo la extracción en la fase de cloroformo del segundo embudo usando 100 ml de hidróxido de amonio, transferir las fase acuosas a un tercer embudo de separación, desechandose las fases de cloroformo.

Adicionar porciones de 2 ml de ácido clorhídrico 1:1 (v/v con agua tridesionizada) al tercer embudo que contiene las fases acuosas, mezclando después de cada adición hasta que los precipitados de ditizona y la solución no presenten un color naranja. Extraer los precipitados de ditizona con 3 porciones de 25 ml de cloroformo, diluir los extractos combinados ajustando con cloroformo a un litro; 1 ml de la solución stock corresponde a 100 microgramos de ditizona.

f.- Solución de trabajo de ditizona.- Diluir la solución stock de ditizona con cloroformo para producir una solución de trabajo de 10 microgramos/ml. Esta solución debe de prepararse diariamente.

g.- Cloroformo. Grado reactivo. Marca Productos Químicos Monterrey, S.A.

h.- Solución de ácido tartárico.- Disolver 20 gramos de ácido tartárico en agua tridesionizada y aforar a 1 lt. Guardar a 4°C. Este reactivo debe de usarse frío.

i.- Acido clorhídrico concentrado.

j.- Hidróxido de sodio 6 N.

PROCEDIMIENTO

1.- Colocar la muestra en un embudo de separación. Añadir 1 ml de solución de tartrato de sodio y potasio, 5 ml de solución I de cianuro de potasio-hidróxido de sodio, 1 ml de solución de hidrocloreuro de hidroxilamina y 15 ml de solución stock de ditizona.

2.- Agitar por un minuto pasando la capa clorofórmica a un segundo embudo de separación que contiene 25 ml de solución de ácido tartárico frío.

3.- Adicionar 10 ml de cloroformo al primer embudo, agitar y pasar la capa clorofórmica al segundo embudo, sin permitir que la capa acuosa pase al segundo embudo, debido a que el ditizonato formado se descompone al contacto con el álcali.

4.- Agitar el segundo embudo por dos minutos y descartar la capa de cloroformo, adicionar 5 ml de cloroformo, agitar un minuto y descartar la capa de cloroformo (debido a que el complejo que forma el metal con la ditizona, se ha transferido a la solución de ácido tartárico).

5.- Enseguida adicionar en el siguiente orden: 0.25 ml de solución de hidrocloreuro de hidroxilamina, 15 ml de solución de trabajo de ditizona (la cual se preparó en cloroformo), 5 ml de solución II de cianuro de potasio-hidróxido de sodio.

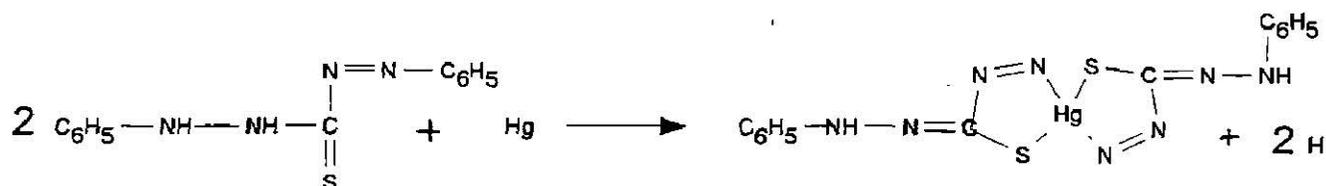
6.- Agitar inmediatamente por un minuto y transferir la capa de cloroformo a una celdilla; leer la absorbancia de la muestra a 518 nm. La cantidad mínima detectable es de 0.5 microgramos/15 ml de solución de ditizona.

DETERMINACION DE MERCURIO POR EL METODO DE LA DITIZONA
(Clesceri y cols., 1989)

FUNDAMENTO

Los iones mercurio reaccionan con la solución de Ditizona en cloroformo para formar un compuesto de color naranja. Las diferentes tonalidades del color naranja se miden en un Espectrofotómetro, calculando las concentraciones a partir de una curva estándar.

REACCION QUIMICA



DITIZONATO DE MERCURIO

INTERFERENCIAS

El cobre, oro, paladio, platino divalente y plata reaccionan con la Ditizona en solución ácida. El cobre presente en los extractos de Ditizona se encuentra en la fase orgánica y el mercurio en la fase acuosa. Los otros contaminantes por lo general no se encuentran en estas soluciones.

APARATO

Espectrofotómetro UV Shimadzu Modelo 160-A.

REACTIVOS

a.- Agua libre de mercurio.- Se utiliza agua tridesionizada para la preparación de todos los reactivos y diluciones.

b.- Solución stock de mercurio.- Disolver 135.3 miligramos de cloruro mercúrico en 700 ml de agua, añadir 1.5 ml de ácido nítrico concentrado y aforar a 1000 ml con agua; 1.0 ml= 100 microgramos de mercurio.

c.- Solución estandar de mercurio.- Diluir 10 ml de solución stock de mercurio a 1000 ml con agua; 1.0 ml= 1.00 microgramos de mercurio. Preparar antes de usarse.

d.- Solución de permanganato de potasio.- Disolver 5 gramos de permanganato de potasio en 100 ml de agua.

e.- Acido sulfúrico concentrado exento de mercurio.

f.- Solución de persulfato de potasio.- disolver 5 gramos de persulfato de potasio en 100 ml de agua.

g.- Solución de hidrocloreuro de hidroxilamina.- Disolver 50 gramos de hidrocloreuro de hidroxilamina en 100 ml de agua.

h.- Solución de Ditizona.- Diluir 60 ml de solución stock de Ditizona (ver metodología de cadmio) con cloroformo a 1 000 ml; 1 ml= 6 microgramos de Ditizona.

i.- Acido sulfúrico 0.25 N.- Diluir 250 de ácido sulfúrico 1N a 1 000 ml con agua.

j.- Solución de bromuro de potasio.- Disolver 40 gramos de bromuro de potasio en 100 ml de agua.

k.- Cloroformo. Grado reactivo. Productos Químicos Monterrey, S.A.

l.- Solución buffer de carbonato-fosfato.- Disolver 150 gramos de fosfato de sodio dodecahidratado y 38 gramos de carbonato de potasio anhidro en 1 000 ml de agua. Extraer con Ditizona hasta que la solución permanezca azul. Lavar con cloroformo para remover el exceso de Ditizona.

m.- Sulfato de sodio anhidro.

PROCEDIMIENTO

1.- Añadir a cada muestra problema obtenida 500 ml de agua (o cualquier otro volumen seleccionado), 1 ml de solución de permanganato de potasio y 10 ml de ácido sulfúrico concentrado, mezclar y calentar a ebullición. Si es necesario, añadir más permanganato de potasio hasta que persista un color rosa, después de que la ebullición ha cesado.

2.- Adicionar lentamente 5 ml de persulfato de potasio y dejar enfriar durante 30 minutos, agregar una o más gotas de hidrocloreuro de hidroxilamina, hasta la eliminación del color rosa.

3.- Transferir cada solución individualmente a embudos de separación de 1000 ml. Añadir 25 ml de solución stock de ditizona, agitar vigorosamente y transferir las capas orgánicas a un embudo de separación de 250 ml. Repetir la extracción al menos tres veces para asegurar una extracción adecuada, la última capa de ditizona debe tener un color azul intenso semejante al de la solución original de ditizona.

4.- Lavar con agitación los extractos acumulados de ditizona en un embudo de separación de 250 ml con 50 ml de ácido sulfúrico 0.25 N.

5.- Transferir los extractos lavados a otro embudo de separación de 250 ml y añadir 50 ml de ácido sulfúrico 0.25 N y 10 ml de bromuro de potasio y agitar vigorosamente para transferir el ditizonato de mercurio de la capa orgánica a la capa acuosa. Descartar la capa más inferior de Ditizona, lavar la capa acuosa con un pequeño volumen de cloroformo y descartar el cloroformo de los lavados.

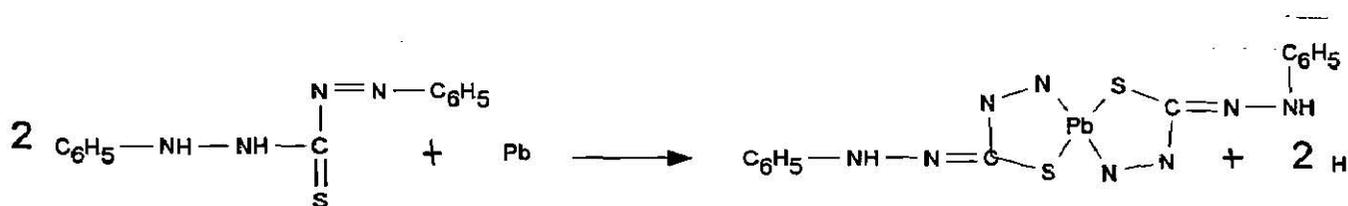
6.- Añadir 20 ml de solución buffer de fosfato-carbonato a cada embudo de separación y añadir 10 ml de solución de ditizona. Agitar vigorosamente, dejar separar y transferir la capa de cloroformo a una celdilla y leer a una absorbancia de 492 nm. La cantidad mínima detectable por esta técnica es de 1 microgramo/10 ml de solución de Ditizona.

DETERMINACION DE PLOMO POR EL METODO DE LA DITIZONA (Clesceri y cols., 1989)

FUNDAMENTO

La muestra acidificada conteniendo pequeñas cantidades de plomo (ppm) se pone a reaccionar con la solución reductora de citrato de cianuro amoniacal y se extrae con Ditizona en cloroformo para formar un ditizonato de plomo de color rojo cereza. El color resultante es medido fotométricamente a una longitud de onda de 510 nm.

REACCION QUIMICA



DITIZONATO DE PLOMO

INTERFERENCIAS

En una solución de cianuro amoniacal débil (pH 8.5 a 9.5), la Ditizona forma complejos coloridos con bismuto, estaño y talio monovalente.

A P A R A T O S

Espectrofotómetro luz UV Shimadzu modelo 160-A.

R E A C T I V O S

a.- Solución stock de plomo. Disolver 0.1599 gramos de nitrato de plomo en 200 ml de agua y adicionar 10 ml de ácido nítrico concentrado y diluir a 1 000 ml con agua. 1 ml= 100 microgramos de plomo.

b.- Solución de trabajo de plomo.- Diluir 20 ml de solución stock de plomo a 1 000 ml con agua. 1 ml= 2 microgramos de plomo.

c.- Acido nítrico 1 a 5.- Diluir 200 ml de ácido nítrico concentrado a 1 000 ml con agua.

d.- Hidróxido de amonio 1 a 10.- Diluir 10 ml de hidróxido de amonio concentrado a 100 ml con agua.

e.- Solución reductora de cianuro-citrato.- Disolver 400 gramos de citrato de amonio dibásico, 20 gramos de sulfito de sodio anhidro, 10 gramos de hidrocloreuro de hidroxilamina y 40 gramos de cianuro de potasio en agua y diluir a 1 000 ml: mezclar esta solución con 2 litros de hidróxido de amonio concentrado.

f.- Solución stock de Ditizona.- Ver metodología de cadmio.

g.- Solución de trabajo de Ditizona.- Diluir 100 ml de solución stock de Ditizona a 250 ml con cloroformo; 1ml= 40 microgramos de Ditizona.

h.- Solución de sulfito de sodio.- Disolver 5 gramos de sulfito de sodio anhidro en 100 ml de agua.

P R O C E D I M I E N T O

1.- A la muestra problema, se le añade 1 ml de ácido nítrico concentrado, y se incuba a 4°C hasta su procesamiento.

2.- Adicionar 20 ml de ácido nítrico 1 a 5 y filtrar en papel filtro Whatman No. 541 recibiendo el filtrado en un embudo de separación de 250 ml, enjuagar el matraz de la digestión con 50 ml de agua y adicionar al filtrado.

3.- Añadir 50 ml de la solución citrato-cianuro amoniacal, mezclar y dejar enfriar a temperatura ambiente. Adicionar 10 ml de solución de trabajo de Ditizona, agitar vigorosamente y dejar que se separen las capas, descartar 1 ó 2 ml de la capa de cloroformo, y medir la absorbancia del extracto a 510 nm, utilizando como blanco solución de trabajo de Ditizona. La cantidad mínima detectable por esta técnica es de 1 microgramo/10 ml de solución de Ditizona.

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE CROMO HEXAVALENTE (Cr(VI))

FUNDAMENTO

La concentración del Cr(VI) en solución acuosa se determina por un método colorimétrico indirecto. El método se basa en la reacción del Cr(VI) y difenilcarbazida que produce un complejo de color rojo violeta de composición desconocida. La reacción es sensible y específica.

REACTIVOS Y SOLUCIONES

- 1.- Solución de ácido sulfúrico (Productos Químicos Monterrey) 1:1.
Mezclar volúmenes iguales de ácido sulfúrico concentrado y agua tridesionizada.
- 2.- Acido fosfórico al 85%.
Esta solución reactivo es de la marca Merck.
- 3.- Solución de difenilcarbazida (Fisher Scientific Co.)
Se disuelven 0.2 g de 1,5-difenilcarbazida en 100 ml de alcohol etílico, esta solución se agrega a una solución previamente preparada mezclando 40 ml de ácido sulfúrico concentrado con 36 ml de agua tridesionizada. El reactivo debe refrigerarse para mantener la estabilidad.
- 4.- Solución stock de Cromo.
Se seca el dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) durante 2 hrs. en estufa (Felisa) a $110^\circ C$. Se pesan 203.3 mg de dicromato de potasio, se agregan a un matraz volumétrico de 1 L y se adiciona agua tridesionizada aforando hasta la marca. Esta Solución tiene una concentración de 77.11 mg de Cr(VI)/L.
- 5.- Solución patrón de Cromo.
Se pipetea 5 ml de la solución stock de cromo a un matraz volumétrico de 50 ml y se afora con agua tridesionizada. La concentración de esta solución patrón es de 7.711 mg de Cr(VI)/L.

PROCEDIMIENTO

- 1.- Se colocan 5 ml de muestra en un matraz volumétrico de 50 ml. La muestra debe tener una concentración en el rango de 0.154 a 0.616 mg/lt. En caso de que la concentración sea mayor se deberán hacer las diluciones adecuadas.
- 2.- Se adicionan 0.5 ml de una solución de ácido sulfúrico y se agita levemente durante 1 min.

- 3.- Se adicionan 0.1 ml de ácido fosfórico al 85%, y se afora a la marca con agua tridesionizada del pH deseado y se agita levemente durante 30 segundos.
- 4.- Se agrega 1 ml de solución de difenilcarbazida y se agita levemente durante 1 min.
- 5.- Se deja reposar por espacio de 10 min. para que se desarrolle completamente el color.
- 6.- La absorbancia de la muestra se mide en un Espectrofotómetro de doble haz (Espectrofotómetro de luz Uv Shimadzu modelo 160-A) a una longitud de onda de 540 nm y usando como referencia un blanco preparado con agua tridesionizada de acuerdo al procedimiento anterior. La concentración de la muestra se determina por medio de una curva de calibración.

NOTA: Una mayor exactitud se obtiene si las muestras se realizan por duplicado y si el Espectrofotómetro se calibra a 0 con un blanco que se prepara siguiendo el procedimiento anterior, pero usando agua tridesionizada.

La curva de calibración concentración de Cr(VI) contra Absorbancia, que se usa para calcular la concentración de la muestra a partir de la Absorbancia, se hace cada vez que se prepara una nueva solución de difenilcarbazida (mínimo 2 veces y por duplicado), y se obtiene por el siguiente procedimiento:

- 1.- Se pipetea de 1 a 4 ml de la solución patrón de Cr(VI) de concentración de 7.711 mg/L en matraces volumétricos de 50 ml.
- 2.- Se desarrolla el color y se mide la Absorbancia de acuerdo al procedimiento descrito anteriormente.
- 3.- Los datos de concentración contra Absorbancia se grafican para observar si son lineales.
- 4.- Los datos de concentración Contra Absorbancia se correlacionan por medio de la ecuación.

$$\text{CONCENTRACION} = K * \text{ABSORBANCIA} + B$$

donde: K= Pendiente

B= Ordenada al origen

NOTA. Todos los experimentos se realizaron mínimo 2 veces y por duplicado.

DETERMINACION DE COBRE Y ARSENICO EN SOLUCION POR ESPECTROFOTOMETRIA DE ABSORCION ATOMICA. (Asha Varma, 1987).

FUNDAMENTO

Esta técnica se fundamenta en las características propias de los átomos. Cada átomo tiene un número específico de electrones asociado con su núcleo, en una estructura orbital, la cual es única para cada elemento. La configuración electrónica más estable de un átomo conocida como "estado basal" es la configuración orbital normal de menor energía de un átomo. Si se aplica energía de magnitud adecuada a un átomo, éste absorbe dicha energía y un electrón exterior será promovido a una configuración orbital superior inestable o "estado excitado". El átomo de manera espontánea e inmediata regresa a su estado basal inicial, emitiendo la energía radiante equivalente a la cantidad de energía inicialmente absorbida.

La cuantificación de interés en Absorción Atómica es medir la cantidad de luz absorbida a determinada longitud de onda, cuando su trayectoria pasa a través de una nube de átomos. (Clesceri y cols., 1989).

El uso de fuentes de luz especiales y la selección cuidadosa de la longitud de onda específica, permite la determinación cuantitativa individual de los elementos en presencia de otros. La nube atómica requerida para las determinaciones en Absorción Atómica, es producida por el suministro suficiente de energía térmica a la muestra para dissociar los compuestos químicos en átomos libres. Para este propósito, un volumen de la solución de la muestra se conduce a la flama alineada en la trayectoria de la luz. Las fuentes de luz con líneas estrechas de longitud de onda, no sólo proporcionan alta sensibilidad, sino que también hacen de la Absorción Atómica una técnica analítica muy específica con pocas interferencias espectrales.

INTERFERENCIAS

A pesar de la alta especificidad de la técnica de Absorción Atómica pueden existir interferencias que disminuyan su capacidad analítica. Sin embargo, puesto que estas interferencias están bien definidas, es fácil eliminarlas o compensarlas. Entre ellas, las más comunes son la interferencia de matriz y la absorción de fondo. La primera ocurre cuando las características físicas de la muestra (viscosidad, tensión superficial y características de temperatura) y del standard difieren considerablemente. Esto puede suceder, cuando la solución de la muestra tiene una alta concentración de sales disueltas o ácido, cuando se han usado diferentes solventes en las soluciones de la muestra y del standard o cuando las soluciones de la muestra y del standard están a temperaturas radicalmente diferentes. (Asha Varma, 1987).

Una de las formas que compensan las interferencias de matriz es el empleo del método de adiciones de standard, ésta es una técnica útil que a menudo hace posible trabajar en la presencia de una interferencia y aún hacer determinaciones precisas de la concentración del analito. En el método de adiciones de standard se toman tres alícuotas de la muestra. Se diluye la primera a un volumen conocido con el solvente adecuado. A la segunda y tercer alícuotas se le añaden cantidades adecuadas de estándares conocidos y se lleva al mismo volumen, para que las soluciones finales contengan diferentes adiciones del metal a ser analizado. Se determina la absorbancia de cada solución. Se grafican las lecturas obtenidas de absorbancia contra la concentración añadida y se extrapola la línea resultante hasta cero de absorbancia. El intercepto sobre el eje de las X da la concentración del metal en la solución de la muestra diluida. Con esto, tanto la solución de la muestra como la de los estándares se ajusta a las mismas condiciones.

La interferencia por absorción de fondo se debe a dos causas: dispersión de la luz por partículas en la flama y absorción molecular de la luz de la lámpara por diferentes moléculas presentes en la flama. Ciertas muestras cuando son atomizadas, absorben o dispersan la luz de la fuente debido a la existencia de especies moleculares gaseosas, partículas salinas, etc., etc. La absorbancia molecular puede controlarse a menudo, usando una flama de temperaturas más altas, que rompa a las especies moleculares absorbentes. Afortunadamente, la absorción de fondo puede distinguirse de la absorción debida al elemento de interés. El elemento puede absorber sólo la línea estrecha emitida por la fuente primaria; la absorción de fondo es menos específica y se extiende sobre una amplia banda de longitud de onda (Asha Varma, 1987).

La manera más común de compensar esta absorción de fondo, es usar un corrector de fondo, el cual emplea una fuente continua (una lámpara de arco de deuterio en el ultravioleta o una lámpara de yoduro-tungsteno para las longitudes de onda visible). Una fuente continua emite luz de un amplio espectro de longitudes de onda en lugar de líneas específicas. Con la corrección de fondo, se obtiene simultáneamente la compensación a la misma longitud de onda usada para medir la Absorción Atómica. Con este sistema, la luz de la fuente primaria y de la fuente continua pasan alternativamente a través de la flama. El elemento a determinar absorbe la luz sólo de la fuente igualmente. Por tanto, cuando electrónicamente se miden ambos haces de luz, el efecto de la absorbancia de fondo es eliminada.

El método espectrofotométrico de Absorción Atómica es tan preciso y exacto que para obtener resultados confiables, las técnicas empleadas requieren de controles estrictos en la realización de cada una de las etapas del proceso (mediciones adecuadas, un gran cuidado al realizar la técnica, calibración correcta del aparato, etc). (Asha Varma, 1987; Clesceri y cols., 1989).

A P A R A T O S

En este trabajo, se utilizó un Atomic Absorption Spectrometer Varian, Modelo Spectr AA-20, localizado físicamente en el Centro de Investigación y Estudios de Posgrado de esta Facultad.

SISTEMA DE ATOMIZACION DE FLAMA PARA LA DETERMINACION DE COBRE Y ARSENICO EN SOLUCION (Asha Varma, 1987)

F U N D A M E N T O

Este método, es simple y fácil de usar, y proporciona un medio ambiente estable para el Análisis por Absorción Atómica. El primer paso es la conversión de la muestra en solución en un vapor atómico. El proceso involucra nebulización o atomización, la selección y distribución de las gotas de vapor de la medida correcta, el mezclado del vapor seleccionado con la flama del gas, y su introducción en el mechero (quemador del aparato).

El sistema de flama utilizado más comúnmente en Análisis de Absorción Atómica es el de Aire-Acetileno. La temperatura de la flama es aproximadamente de 2 300°C, y requiere un flujo de acetileno de 4 lts/min., además, es recomendable y muy seguro, sobre todo en longitudes de onda de cerca de 2 000 Amstrongs, y se utiliza para analizar la mayoría de elementos que no forman óxidos refractarios. Por este sistema se realizó la determinación de cobre de las muestras en estudio.

P R O C E D I M I E N T O

El aparato se calibra con estándares de concentración conocida del mismo metal (la concentración depende de la naturaleza de la muestra). Posteriormente se coloca la muestra en el sistema de capilaridad del aparato (mínimo 25 ml), el cual absorberá automáticamente la cantidad necesaria para dar la lectura correspondiente a la concentración del metal contenido en la solución.

METODO DEL ELECTRODO PARA LA DETERMINACION DE FLUOR
(Clesceri y cols., 1989)

FUNDAMENTO

El método se basa en el uso de un electrodo de Ión Específico, diseñado para usarse junto con un electrodo de referencia de Calomel y un potenciómetro que tenga una escala expandida en milivoltios. El elemento clave del Electrodo Selectivo para fluoruros es un cristal de fluoruro de lantano a través del que se establece un potencial en soluciones de fluoruros a diferentes concentraciones. El cristal contacta con la solución o muestra por un lado y una solución interna de referencia por otro lado.

La actividad del fluoruro depende de la fuerza iónica total de la solución y del pH, así como de las especies acomplejantes de fluoruros. La adición de un amortiguador apropiados (TISAB= Total Ionic Strength Activity Buffer), provee una fuerza iónica suficiente para ajustar el pH y romper los complejos de manera que en efecto el electrodo mida concentración.

b) INTERFERENCIAS

Los cationes polivalentes como el Al III, Fe III y Si IV acomplejan el ión fluoruro. El grado al cual sucede el acomplejamiento depende del pH de la solución y los niveles relativos de fluoruros y especies acomplejantes. Sin embargo, la adición de CDTA (ácido ciclohexilen diamino tetracético) ó citrato de sodio, acomplejaron preferentemente concentraciones de aluminio superiores a 5 mg/lt. y liberaron fluoruro como ión libre; de la misma manera los iones hidrógeno en solución ácida formaron complejos con el ión fluoruro, pero el acomplejamiento es insignificante si el pH es superior a 5. En soluciones alcalinas, el ión hidrógeno interferirá con la respuesta del electrodo, cuando la concentración del ión fluoruro sea mayor a 1/10 del nivel del ión fluoruro. A pH menor ó igual a 8, la concentración de hidróxido es menor ó igual a 10^{-6} M y no causará interferencia.

El electrodo de fluoruro no responde al ión fluoroborato (BF_4); si se sospecha que una muestra contiene fluoroboratos, destilar para activar la hidrólisis del fluoroborato a fluoruro libre.

APARATOS

a) Medidor de pH con escala expandida, digital y/o medidor del ión selectivo.

b) Electrodo de referencia tipo manga (ORION .90-0100. Beckman 43462, CORNING 476012 ó equivalente.). No usar electrodos de referencia de punta fibra, debido a que muestran un comportamiento errático en soluciones muy diluidas.

c) Electrodo de fluoruros.

d) Agitador magnético, con barras de agitación cubiertas de teflón.

e) Cronómetro.

R E A C T I V O S.

a) Solución stock de fluoruros. Disolver 221 mg de fluoruro de sodio anhidro en agua destilada y diluir a 1000 ml; un ml. equivale a 100 μ g de flúor.

b) Solución standard de fluoruros. Diluir 100 ml. de la solución stock de fluoruros a 1000 ml. con agua destilada; un ml. equivale a 10 μ g de flúor.

c) Solución buffer de ajuste ó regulación de fuerza iónica total (TISAB). Poner aproximadamente 500 ml. de agua destilada en un vaso de 1 litro y añadir 57 ml. de ácido acético glacial, 58 g. de cloruro de sodio y 4 g. de 1-2 ácido ciclohexilen diamino tetracético (en lugar de CDTA pueden usarse 12 gramos de citrato de sodio dihidratado, pero puede haber alguna pérdida de sensibilidad). Agitar para disolver. Poner el vaso en un baño de agua fría y añadir lentamente hidróxido de sodio 6 N (125 ml. aproximadamente) con agitación, hasta que el pH esté entre 5 y 5.5. Transferir a un matraz volumétrico de 1 litro y añadir agua destilada hasta la marca.

P R O C E D I M I E N T O

a) CALIBRACION DEL APARATO.

Normalmente no se requieren mayores ajustes del medidor de pH, si se usan electrodos en el rango de 0.2 a 2 mg. de flúor por litro. Para aquellos instrumentos con 0 en la escala central, ajustar el control de calibración, de manera que el standard de 1 mg. de flúor por litro lea en el cero (100 mV); cuando el medidor esté en la posición de escala expandida, esto no puede hacerse en algunos medidores que no tienen un control de calibración de mV.

b) PREPARACION DE LOS ESTANDARES DE FLUORURO.

Preparar una serie de estándares añadiendo respectivamente 0.5, 5, 10 ml. de solución standard de fluoruro en matraces volumétricos de 100 ml. A cada matraz añadir 50 ml. de la solución TISAB y diluir a 100 ml con agua destilada; mezclar bien. Estos estándares son equivalentes a 0.5, 1 y 2 mg de flúor por litro (debido a que la concentración de la muestra se reduce a la mitad por la adición de la solución TISAB, multiplicar por 2 la concentración verdadera de los estándares, para que se pueda leer la concentración original de la muestra directamente).

c) TRATAMIENTO DE LA MUESTRA.

En un matraz volumétrico de 100 ml añadir 50 ml. de la muestra (solución problema de fluor); diluir a la marca con TISAB y mezclar bien; ajustar tanto los estándares como la muestra a la misma temperatura.

d) MEDICION CON EL ELECTRODO.

Transferir cada standard y muestra a una serie de vasos de 150 ml. Introducir los electrodos y medir el potencial desarrollado mientras se agita en un agitador magnético. Evitar la agitación antes de introducir los electrodos a la solución, debido a que se atrapa aire alrededor del cristal y pueden producirse lecturas erróneas ó fluctuaciones de la aguja.

Dejar que los electrodos permanezcan en la solución 3 minutos, antes de tomar una lectura final positiva en mV. Enjuagar los electrodos en agua destilada y secar con papel entre cada lectura. En algunos casos, alargar el periodo de medición a 5 minutos para alcanzar el equilibrio. Para disminuir los cambios de temperatura es útil una capa de material aislante como corcho, entre el agitador y el contenedor de la muestra.

Cuando se usen medidores de pH de escala expandida ó medidores de ión selectivo, recalibrar frecuentemente el electrodo, checando la lectura del potencial del standard de 1 mg. de fluor por litro y ajustar el control de calibración, si es necesario, hasta que el medidor lea como antes. Confirmar la calibración después de la lectura de cada standard.

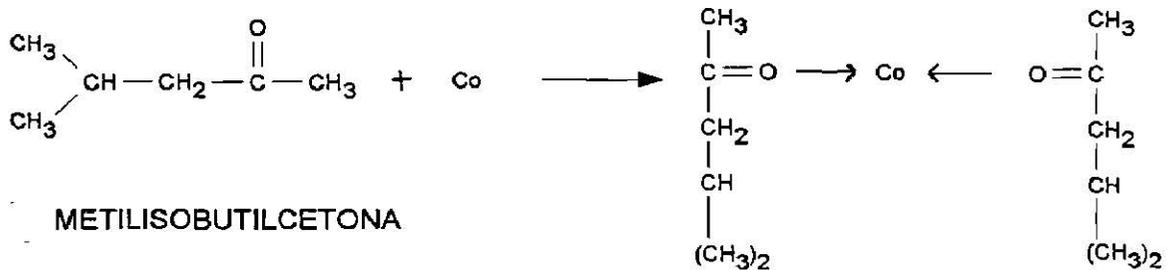
Graficar los potenciales medidos de los estándares de flúor contra la concentración, en papel semilogarítmico de 2 ciclos. Graficar mg de Flúor/lit. en el eje logarítmico con la menor concentración al final de la página. Usando el potencial medido de cada muestra, leer la concentración correspondiente de fluoruro de la curva standard.

DETERMINACION DE COBALTO POR EL METODO COLORIMETRICO DE LA METILISOBUTILCETONA. (Charlot, 1976).

FUNDAMENTO

Los iones cobalto, en presencia de tiocianato de amonio reaccionan con la metilisobutilcetona para formar un complejo azul estable.

REACCION QUIMICA



INTERFERENCIAS

Algunas veces puede haber interferencias por iones férricos, pero estas se eliminan por la adición de fluoruro de sodio a la mezcla de reacción.

APARATOS

Espectrofotómetro de luz Uv-visible Shimadzu 160-A.

REACTIVOS

a.- Solución stock de cobalto.- Disolver 500 miligramos de nitrato de cobalto en 100 ml de agua tridesionizada. Un ml de esta solución equivale a 5 miligramos de nitrato de cobalto.

b.- Solución de tiocianato de amonio al 20% (p/v).- Disolver 20 gramos de tiocianato de amonio en 100 ml de agua tridesionizada. Guardar a temperatura ambiente en recipiente de cristal.

c.- Fluoruro de sodio en cristales.

d.- Metilisobutilcetona. Marca Productos Químicos Monterrey, S.A.

PROCEDIMIENTO

1.- En un embudo de separación, a la solución problema se le agrega 0.5 ml de solución de tiocianato de amonio al 20% (p/v).

2.- Después se le agregan 5 miligramos de fluoruro de sodio para eliminar el fierro y algunos iones interferentes de la muestra problema.

3.- Agregar 4 ml de metilisobutilcetona y agitar suavemente durante 1 min.

4.- La aparición en el disolvente de un color azul, indica la presencia de cobalto, siendo la intensidad directamente proporcional a la concentración del metal (sensibilidad hasta 25 ppm), y se lee a una absorbancia de 622 nm, obteniéndose la concentración del metal en base a una curva patrón.

NOTA: TODOS LOS EXPERIMENTOS SE REALIZARON POR DUPLICADO Y UN MINIMO DE DOS VECES CADA UNO.

R E S U L T A D O S

Se analizaron ocho metales (de los principales contaminantes de los mantos acuíferos de esta ciudad), encontrando diferentes resistencias: La levadura crece bien a 2000 ppm de zinc, plomo y cobre, a 1500 de arsénico, a 500 de plata y es más sensible a cobalto (300 ppm), mercurio y cadmio (200 ppm). Además hay muy pocas alteraciones microscópicas en presencia de los diferentes metales, en presencia de plomo las colonias desarrollan un color café oscuro. (Figuras 1-7, Tabla No. 1).

Con respecto a su potencial de captación de metales pesados se encontró que esta biomasa capta eficientemente cromo (48%), medianamente cadmio (36%); cobre (31.6%), cobalto (22.6), plomo (20%) y mercurio (16%). No capta arsénico ni flúor, además, no se presentan alteraciones microscópicas. (Figura No. 8, Tabla No. 2).

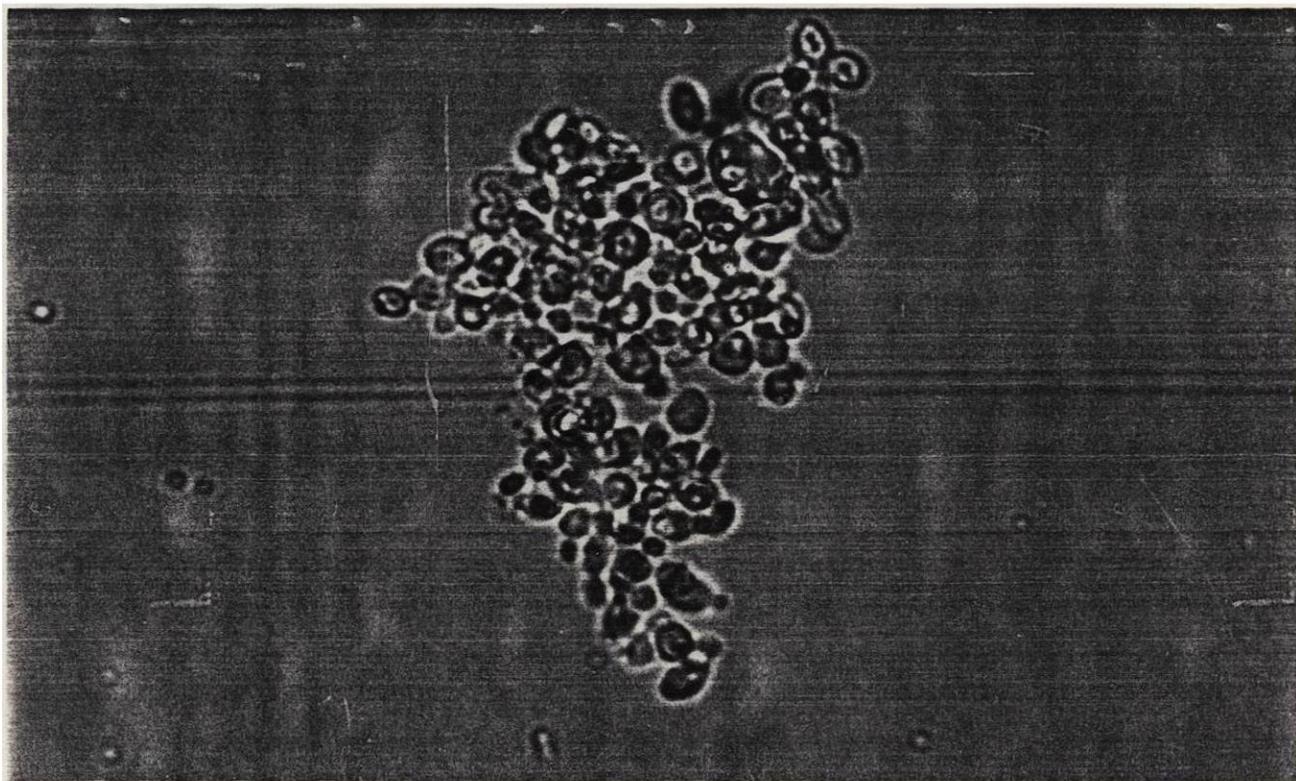


Figura No. 1.- LEVADURAS DE *Candida albicans*.

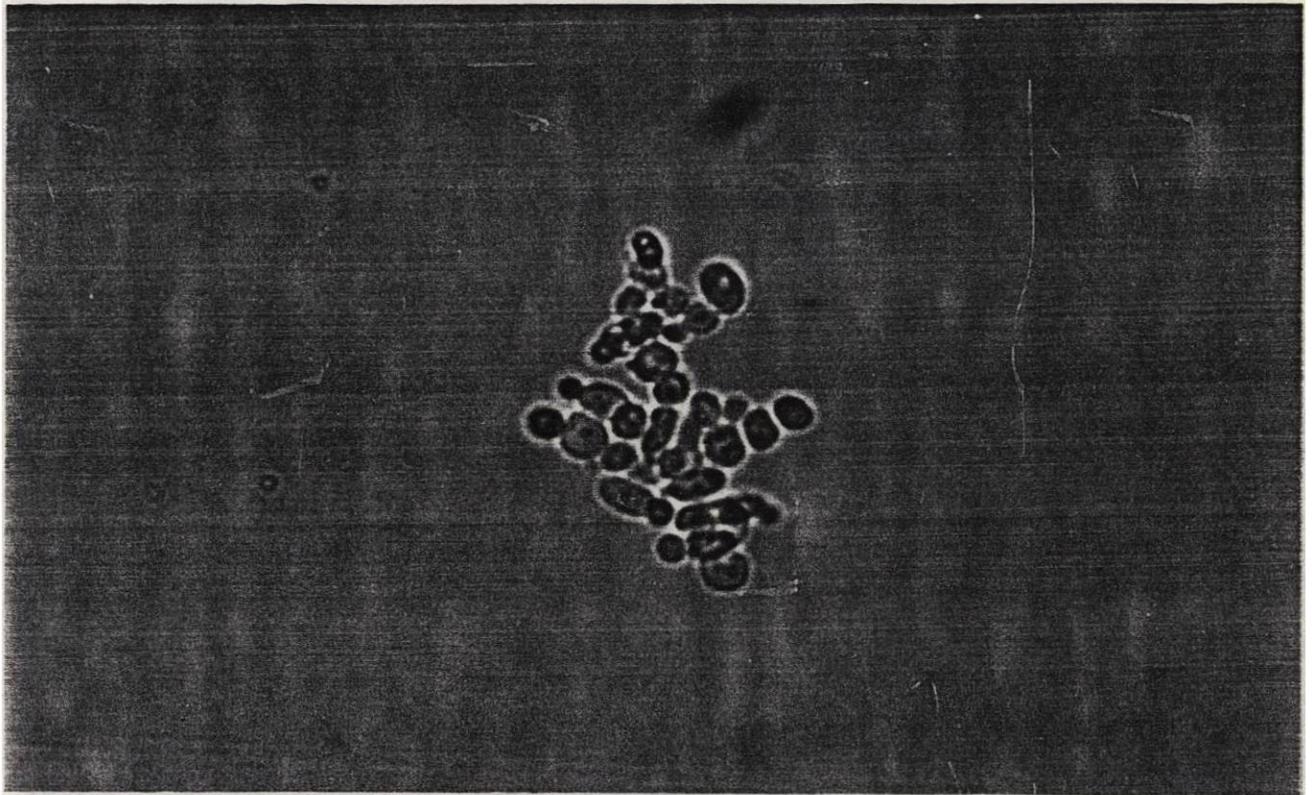


Figura No. 2.-LEVADURAS DE *Candida albicans* EN PRESENCIA DE 2000 PPM DE ZINC

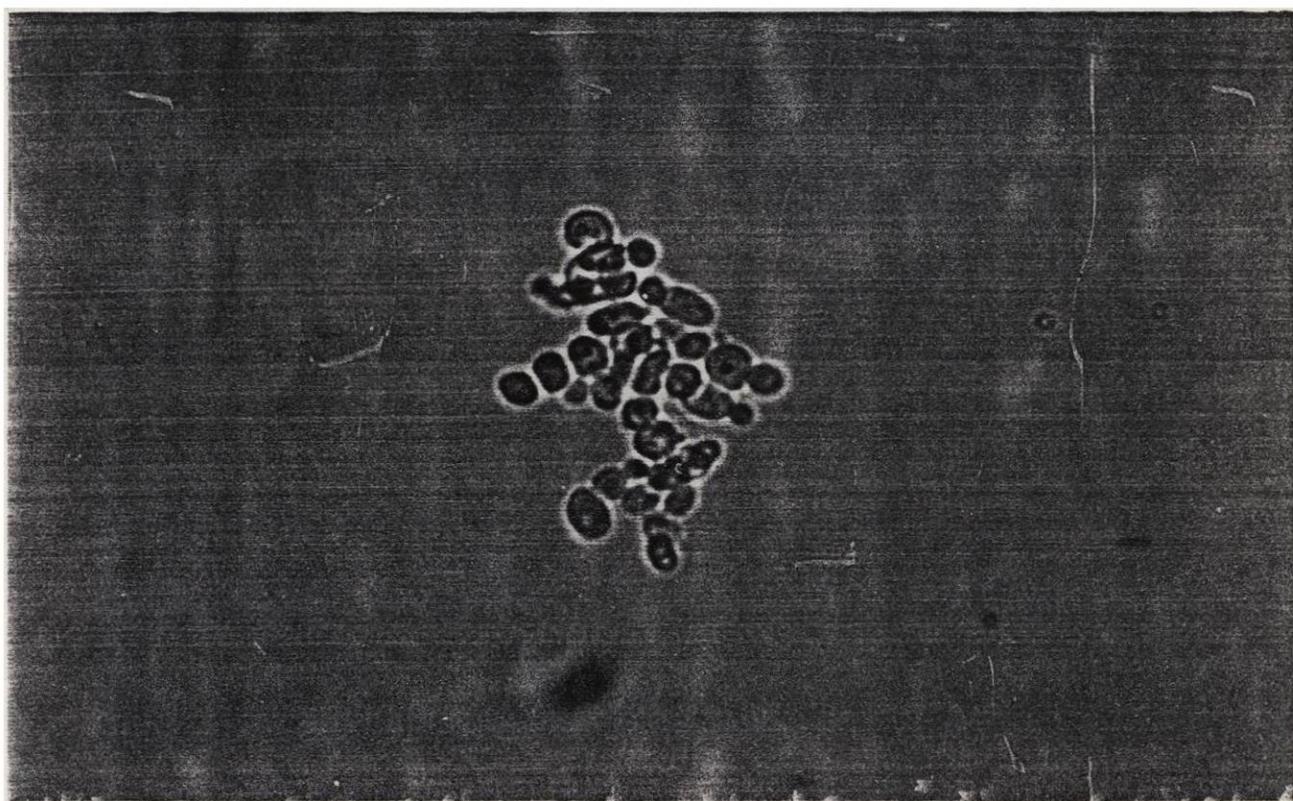


Figura No. 3.- LEVADURAS DE *Candida albicans* EN PRESENCIA DE 1500 PPM DE ARSENICO

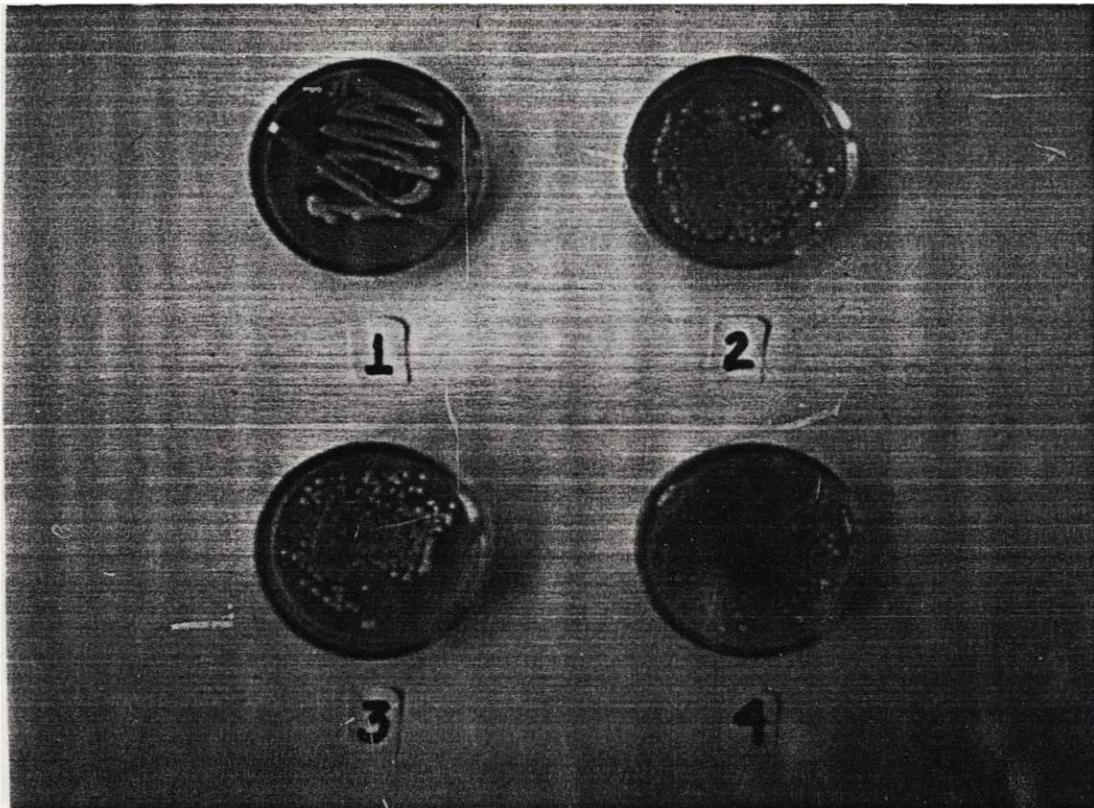


Figura No. 4.- CULTIVO DE *Candida albicans*
1.- CONTROL SIN METAL.
2.- 1000 PPM DE PLOMO.
3.- 1500 PPM DE PLOMO.
4.- 2000 PPM DE PLOMO.



Figura No. 5.-CULTIVO DE *Candida albicans*
1.- CONTROL SIN METAL.
2.- 500 PPM DE PLATA.
3.- 1000 PPM DE PLATA.
4.- 1500 PPM DE PLATA.

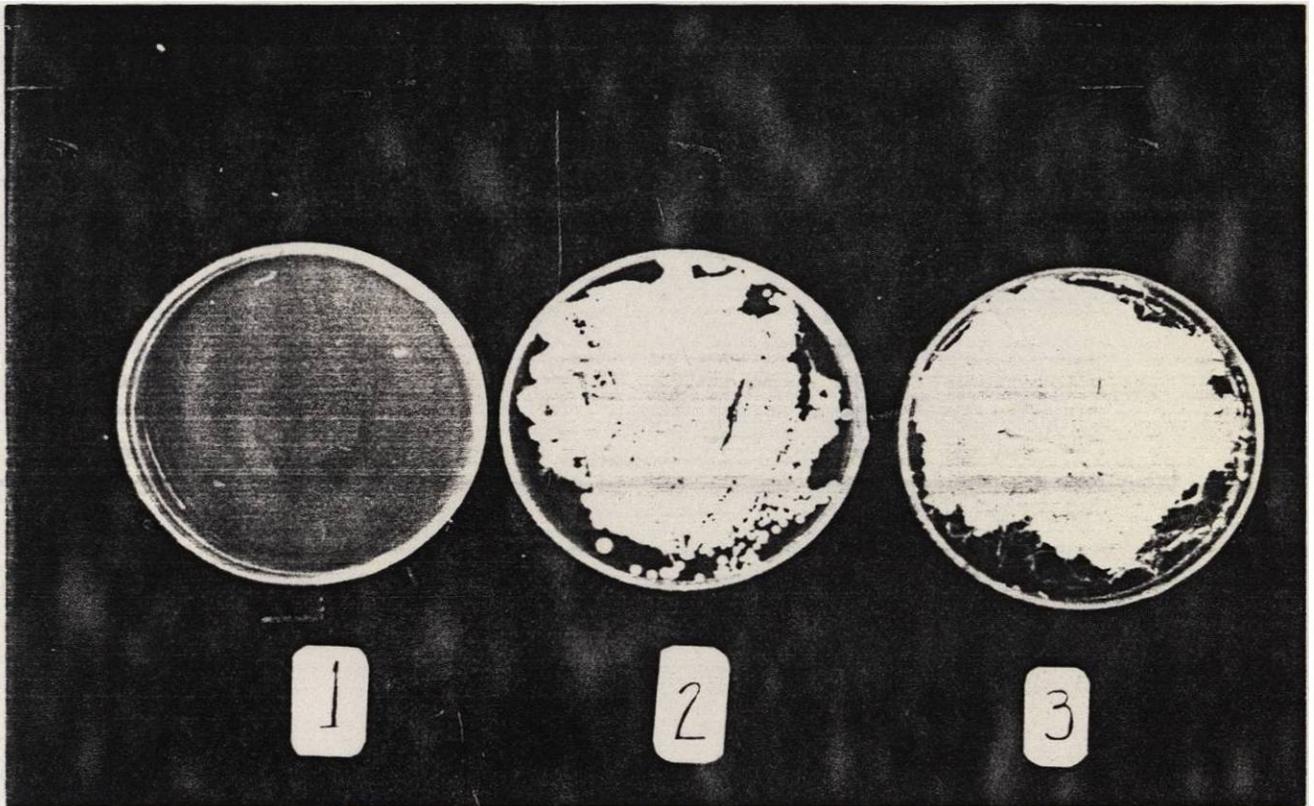


Figura No. 6.-CULTIVO DE *Candida albicans*
1.- 500 PPM DE MERCURIO
2.- 200 PPM DE MERCURIO
3.- CONTROL SIN METAL

TABLA No. 2. RESISTENCIA DE *C.albicans* A LOS DIFERENTES METALES ANALIZADOS.

METAL ANALIZADO	CONCENTRACION DEL METAL (PPM)
Zinc	2000
Plomo	2000
Cobre	2000
Arsénico	1500
Plata	500
Cobalto	300
Mercurio	200
Cadmio	200

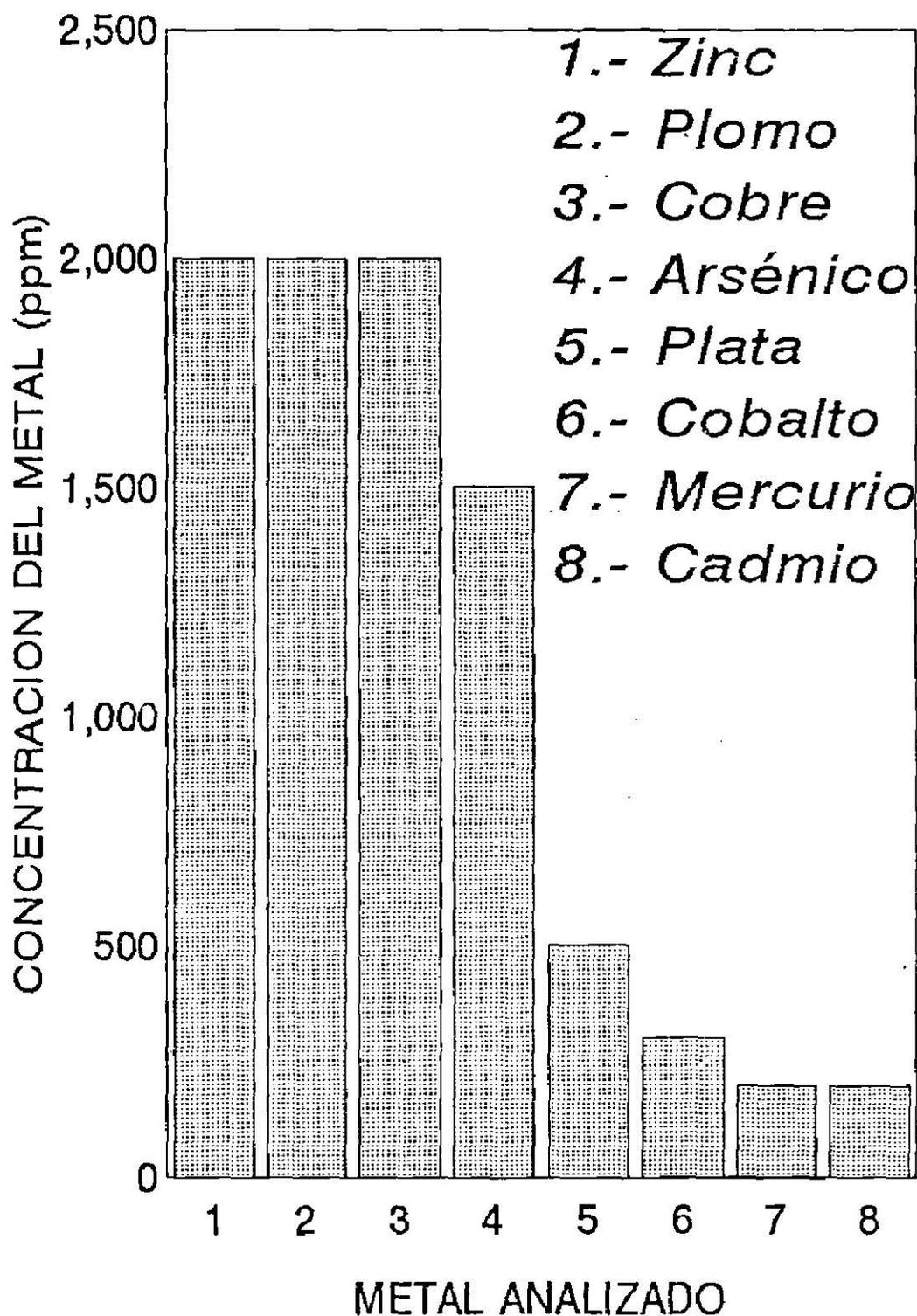


Figura No. 7.- RESISTENCIA DE *C. albicans* A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LOS METALES ANALIZADOS (4-5 días de incubación. 28°C. Agar Sabouraud Dextrosa.

TABLA No. 3. PORCENTAJE DE BIOADSORCION DE DIFERENTES METALES Y FLUOR POR LA BIOMASA CELULAR DE *C. albicans*.

METAL ANALIZADO	PORCENTAJE DE CAPTACION
Cromo	48.0
Cadmio	36.0
Cobre	31.6
Cobalto	22.6
Plomo	16.0
Mercurio	16.0
Arsénico	0
Flúor	0

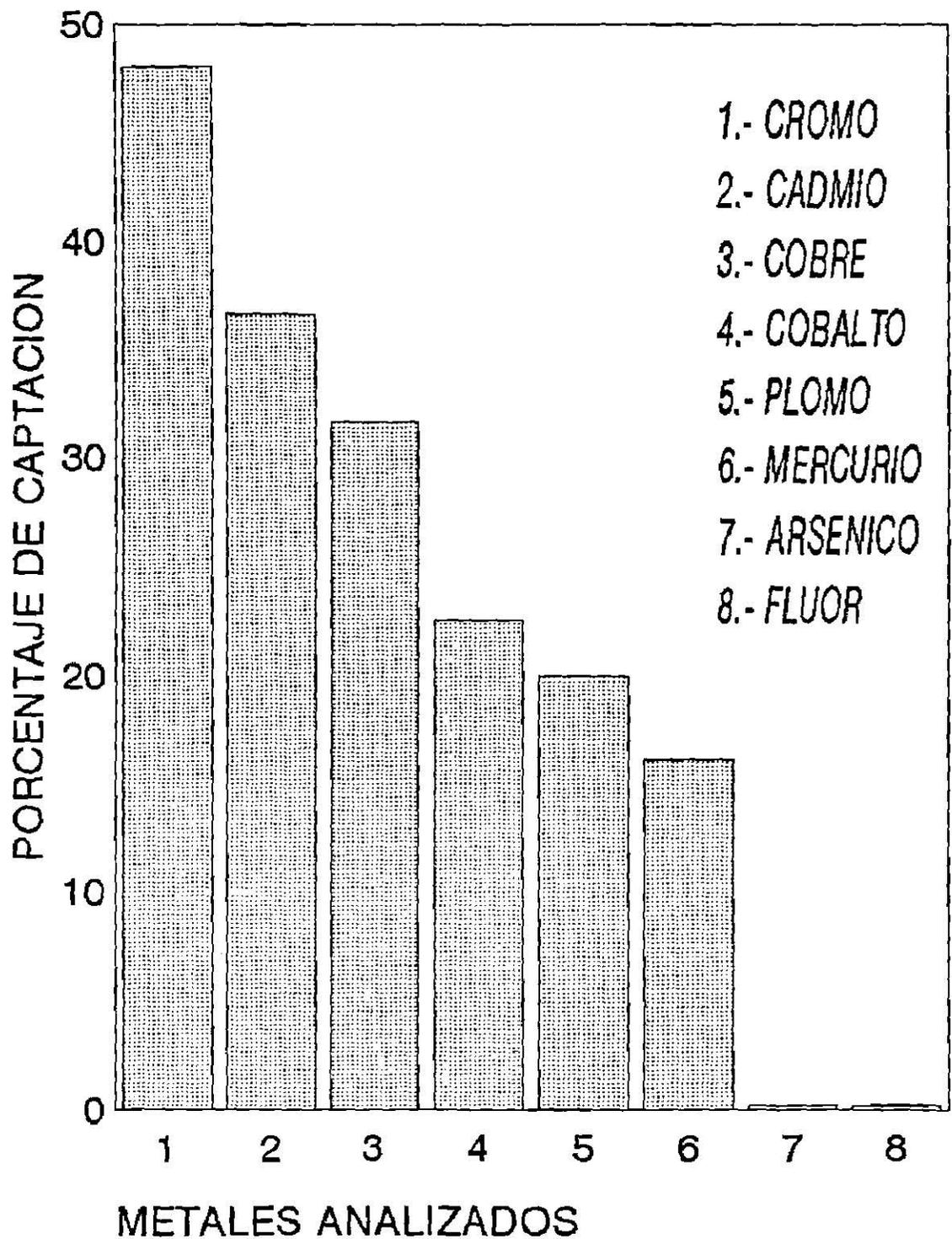


Figura No. 8.- PORCENTAJE DE BIADSORCION DE LOS DIFERENTES METALES ANALIZADOS POR LA BIOMASA CELULAR DE *C. albicans*

DISCUSION

En el presente trabajo, se analizó la resistencia de *Candida albicans* a diferentes metales pesados. Dicho estudio se realizó con la finalidad de conocer el comportamiento de esta levadura en presencia de los mismos, ya que en la literatura hay muy pocos reportes del aislamiento de este tipo de microorganismos a partir de zonas contaminadas con metales, como por ejemplo Mendoza y cols. (1994) aislaron una cepa de *Cryptococcus albidus* resistente a plata a partir de jales de minas de Guanajuato.

Con respecto a la resistencia de la levadura a los ocho metales pesados (plomo, zinc, cobalto, cobre, arsénico plata, mercurio y cadmio), se encontró que es más resistente a plomo, zinc y cobre (2000 ppm), concidiendo con lo reportado por Díaz Pérez (1994), quien aisló diferentes especies de *Aspergillus* sp a partir de desechos mineros resistentes a plomo y zinc, con Carro y cols (1995) para la levadura capsulada *Cryptococcus neoformans*, reportando resultados similares y con García Martínez (1993) con dos cepas de *Mucor* sp, *Cladosporium* sp y *Helminthosporium* sp, aislados de zonas aledañas a la planta de zinc de la ciudad de San Luis Potosí, y con Ramos y cols (1993) con el alga *Cladophora glomerata*, que puede crecer en presencia de cobre, plomo y zinc.

Con respecto al arsénico, se encontró que *Candida albicans* crece hasta en 1500 ppm de arsénico, lo que no concuerda con los reportes de la literatura, pues la mayoría indican crecimiento hasta en 200 ppm de arsénico (Carro y cols, 1995; Díaz Pérez, 1994).

Por otro lado la levadura fue medianamente sensible a plata (500 ppm), coincidiendo con lo reportado por Mendoza y cols (1994) con *Cryptococcus albidus* y es muy sensible a cobalto, mercurio y cadmio, lo que concuerda con la dificultad reportada para el aislamiento de mutantes resistentes a estos metales (Cervantes y Vaca, 1992).

También en este trabajo se analizó la capacidad de bioadsorción de diferentes metales pesados que fueron: Cromo, cadmio, cobre, cobalto, plomo, mercurio y arsénico, además de flúor, por una cepa silvestre de *Candida albicans*, pues en la literatura se ha reportado la captación de diferentes metales por algunas levaduras, incluido el oro, con diferentes porcentajes de captación (Volesky y Holan, 1995; Sakaguchi y cols., 1994; Carro y cols., 1995; Mattuschka y cols., 1993).

La biomasa celular de *C. albicans* presenta diferentes porcentajes de captación de los diferentes metales analizados, siendo el cromo (VI), cadmio y cobre los que se bioadsorbieron más eficientemente, mientras que el arsénico y el flúor no fueron removidos por la biomasa estudiada.

Se ha sugerido que la pared celular de los hongos, es el primer sitio de interacción con especies metálicas; la remoción de metales de la solución depende del tipo y concentración del metal, factores ambientales y biomasa. La asociación de algunos iones metálicos a las paredes de los hongos puede deberse a: la carga del mismo, la absorción, al acomplejamiento, precipitación y cristalización (Mullen y cols., 1992). La pared celular está compuesta por polisacáridos, algunos de los cuales están asociados a proteínas o con otros componentes que incluyen lípidos y melaninas. Todos los hongos filamentosos a

excepción de los Oomycetes, contienen quitina y quitosana, las cuales son polímeros de N-acetilglucosamina y D-glucosamina, respectivamente, y se cree que participan activamente en la bioadsorción de metales en la pared celular de los hongos; el contenido de estos polisacáridos puede variar durante las diferentes etapas del desarrollo de los hongos (Bartnicki García, 1968), y Muzzarelli y cols., (1986) reportan que el calcio y el magnesio no son atrapados por estos componentes de la pared celular.

Por otra parte, según la clasificación taxonómica de Bartnicki García (1968), *C. albicans*, pertenece al grupo VI, debido a que su pared celular está compuesta principalmente de glucanas y mananas, los cuales pudieran ser los responsables de la remoción de metales pesados en solución por el hongo, y también puede ser la causa de las diferencias en la captación de los diferentes metales estudiados por los hongos, junto con algunos parámetros como: temperatura, pH y tiempo de incubación. Por ejemplo, el *M. rouxii*, que capta eficientemente plomo, mercurio y cadmio, pertenece al grupo IV, (quitosana-quitina), el *Helminthosporium sp.*, el cual es la única biomasa estudiada que remueve arsénico, está clasificado en el grupo III (celulosa-quitina), *Penicillium chrysogenum* capta eficientemente cadmio y se encuentra en el grupo V (quitina-glucana), y otras especies del mismo grupo como el *Aspergillus flavus*, bioadsorben eficientemente flúor.

Los resultados obtenidos en este trabajo, confirman la capacidad de captación específica de diferentes metales pesados y flúor por diferentes biomasas celulares, pues dependiendo de la biomasa estudiada los porcentajes de bioadsorción de los iones metálicos varían, por lo que estos microorganismos se pueden utilizar para la eliminación selectiva de metales que contaminan en gran medida los ecosistemas naturales (ríos, mantos acuíferos, zonas de cultivo, mares, etc.) o la recuperación y/o purificación de metales preciosos de desechos mineros (como la eliminación de cobre a partir de soluciones ricas en oro, plata y cobre) por las biomasas más eficientes en la captación de dichos metales pesados.

C O N C L U S I O N E S

- 1.- *Candida albicans* es más resistente a zinc, plomo, cobre y arsénico y es más sensible a mercurio y cadmio.
- 2.- Las diferencias en los patrones de resistencia indican una capacidad selectiva de la levadura para crecer en presencia de los diferentes metales analizados.
- 3.- No se encontraron alteraciones microscópicas en presencia de los diferentes metales.
- 4.- En presencia de plomo los cultivos desarrollan un color oscuro.
- 5.- La biomasa celular de *C. albicans* capta eficientemente cromo (48%), medianamente cadmio (36%), cobre (31.6%), cobalto (22.6%), plomo y mercurio (16%) y no capta arsénico ni flúor.
6. Los resultados encontrados en este trabajo indican que la biomasa de la levadura *C. albicans* presenta diferentes porcentajes de captación de metales pesados y flúor, especialmente, de cromo y cadmio por lo que en un futuro se pudieran implementar filtros biológicos con esta biomasa sola o mezclada con otras, para tratar de eliminar metales pesados de nichos acuáticos y zonas urbanas que presentan contaminación por los mismos, y así tratar de disminuir los riesgos que representan para la salud humana.

B I B L I O G R A F I A

1. Acosta, I., García, G., Torre, M.E. y Moctezuma, M.G. 1993. Aislamiento de hongos contaminantes ambientales resistentes a metales pesados y su potencial uso como bioadsorbentes naturales. *Biotechnología*. Vol. 3. No. 3 y 4. pp AM 1-AM 7.
2. Acosta, I., García, M.G., Torre, M.E., Zacarías, C., Mendoza, J., Olivares, J.J., Vázquez, E., Díaz, P., Martínez, V., Fuentes, L. y Moctezuma, M.G. 1994. El uso de la biomasa celular de hongos filamentosos en la eliminación de metales pesados en aguas residuales. Tercer Simposio Iberoamericano de Ecología y Medio Ambiente. En Prensa.
3. Acosta, I., García, M.G., Torre, M.E., Zacarías, C., Olivares, J.J., Vázquez, E. y Moctezuma, M.G. 1994. Capacidad de bioadsorción de algunos hongos contaminantes ambientales resistentes a metales pesados. *Avances en Ingeniería Química*. pp. 140-143.
4. Acosta, I., Gutierrez, C., Nava, V., Díaz, P., Navarro, R., Alvarez, N., Mendez, G., Robles, A., Adame, G., Mendoza, J., Fuentes, L. y Moctezuma, M.G. 1995. Eliminación de metales pesados y flúor en solución por la biomasa celular de algunos hongos filamentosos. *Asociación de Ingenieros de Minas Metalurgistas y Geólogos de México, A.C.* pp 1-15.
5. Asha V. *Handbook of Atomic Absorption Analysis*. 1987. Vol. 1. CRC Press, Inc. pp 7-14.
6. Balistriero, L.S. and Murray, J.W. 1982. The adsorption of Cu, Pb, Zn, and Cd on goetite from major ion seawater. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. Vol. 46. pp 1253-1265.
7. Bartnicki-García, S. 1968. Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Ann Rev. Microbiol.* Vol. 22. pp 87-108.
8. Beveridge, T.J. and Murray, R.G.E. 1980. Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* Vol. 141. No. 2. pp 876-887.
9. Bonifaz, A. 1990. *Micología Médica Básica*. Ed. Mendez Cervantes.
10. Brady, D., Duncan, J.R. 1993. Bioaccumulation of metal cations by *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Biohydrometallurgical Technologies: Torma, A.E., Apel, M.L., Brierley, C.L. Eds; The minerals, metals and materials Society: Warrendale, P.A.* 2: 711-724.

11. Brierley, J.A. 1983. Biological accumulation of some heavy metals-biotechnological applications. P. Westbroek and E. De Jons. (eds). *Biom mineralization and Biological Metal Accumulation*. D. Reidel Publishing Company. pp 499-509.
12. Brierley, C.L. and Brierley, J.A. 1993. Immobilization of biomass for industrial application of biosorption. In: *Biohydrometallurgical Technologies*: Torma, A.E., Apel, M.L., Brierley, C.L. Eds; The minerals, metals and materials Society: Warrendale, P.A. 2: 35-44.
13. Cañizares, R., Cruz, M. y Domínguez, A. 1995. Remoción de cromo por *Scenedesmus acutus*. XXVI Congreso Nacional de Microbiología. Veracruz, Ver. W107.
14. Carro, B., Moctezuma., M.G. y Acosta I. 1995. Remoción de cromo (VI) por la biomasa celular de la levadura capsulada *Cryptococcus neoformans*. Primer Verano de la Ciencia UASLP. En Prensa.
15. Chávez Marín, G., Cano Rodríguez, I., Mendoza Olivares, D., Amézquita López, F., Caracheo Aguilar, S., Obregón Herrera, A., Ramírez Salgado, P., Sosa Luna, L., Martínez Cadena, G. y Gutiérrez Corona, F. 1993. Proteínas inducibles por cobre en cepas de *Mucor rouxii* tolerantes y sensibles al metal. *Biotecnología*. Vol. No. 3 y 4. pp AM 189-AM 192.
16. Clesceri, L.S., Greenberg, A.E. and Rhodes, R. 1989. Standard methods for the examination of waster and wastewaster. 17th. Academic Press. pp 49-50, 83-83, 107-109, 119-120.
17. Cortés Penagos y Cols., 1993. Mecanismos de resistencia a metales pesados en *Trichoderma sp.* *Biotecnología*. Vol. 3 y 4. pp AM 214-AM 223.
18. Cortés Penagos y Cols., 1994. Tolerancia a metales en hongos: Mecanismos y aplicaciones. En: *La importancia biológica de los Iones Inorgánicos*. Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Morelia, Mich. pp 118-132.
19. Davis, J.W. 1984. Complexation of trace metals by adsorbed natural organic matter. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. Vol. 48. pp 679-691.
20. Díaz Pérez, P. 1994. Aislamiento de hongos tolerantes a metales pesados a partir de desechos mineros. Tesis Licenciatura. Q.F.B.. Facultad de Ciencias Químicas. UASLP.
21. Gadd, G.M. (1992). Microbial control of heavy metal pollution. In: Fry, J.C., Gadd, G.M., Herbert, R.A., Jones, C.W., Watson-Crick. *Microbial Control of Enviromental Pollution*. 59-88.

22. García Martínez, M.G. 1993. Aislamiento de hongos contaminantes ambientales resistentes a metales pesados y su potencial uso como bioadsorbentes naturales. Tesis de Licenciatura. Q.F.B. Fac. de Ciencias Químicas. UASLP.
23. Gutierrez, C., Moctezuma, M.G. y Acosta, I. 1995. Bioadsorción de cromo (VI) por diferentes biomásas celulares , VI Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería.
24. Guzmán, J., Anguiano, P., Reyes, V., Sandoval, C. y Cuesta, J.R. (1995). Régimen de activación de alumina sulfatada y efectos en la adsorción de Cr(VI). Memorias del V Congreso Iberoamericano de Química Inorgánica. 37-40.
25. Horikoshi, T., Nakajima, A. and Sakaguchi, T. 1981. Metal sequestering by *Chlorella vulgaris*. Agric. Biol. Chem. Vol. 45. pp 781-783.
26. Hoyle, B. and Beveridge, T.J. 1984. Metal binding by *Escherichia coli* K-12. Can. J. Microbiol. Vol. 30. pp 204-211.
27. Huang, C.P. and Wu, M.H. 1975. Chromium removal by carbon adsorption. J. Water Pollution Control Federation. 47(10): 2437-2446.
28. Kuyucak, N., and Volesky, B. 1989a. Accumulation of cobalt by marine alga. Biotechnol. Bioeng., 33, 809-814.
29. Leyva-Ramos, R., Juárez-Martínez, A. and Guerrero-Coronado, R.M. 1994. Adsorption of chromium (VI) from aqueous solutions on activated carbon. Wat. Sci. Tech., 30(9), 191-197.
30. Martínez Juárez, V.M., Moctezuma Zárate, M.G. y Acosta Rodríguez, I. 1994. Captación de metales pesados por la biomasa celular del hongo *Mucor rouxii*. Biotecnología. Vol. 4. No. 1. pp 17-20.
31. Mattuschka, B., Junghaus, K. and Straube, G. (1993). Biosorption of metals by waste biomass. In: Biohydrometallurgical Technologies: Torma, A.E., Apel, M.L. Brierley, C.L. Eds; The minerals, metals and materials Society: Warrendale, P.A. 2: 35-44.
32. Mendoza, E., Sosa, L. , Gutiérrez, F., Obregón, A., Mendoza, D., Lappe, P. y Ulloa, M. (1994). *Cryptococcus albidus* aislada de zonas mineras de Guanajuato como resistente a plata es capaz de acumular este metal. Memorias del V Congreso Nacional de Micología. 156.
33. Mullen, M.D., Wolf, D.C., Beveridge, T.J., Bailey, G.W. 1992. Sorption of heavy metals by soil fungi *Aspergillus niger*. Soil Biology and Biochemistry. Vol. 24. pp 129-135.

34. Muzzarelli, R.A., Bregani, F., Sigon, F. 1986. Chelating abilities as aminoacids glucans and sugar acids glucans derived from chitosan. En: Eccles, H., Hund, S., Eds. Immobilization of ions by biosorption. Chichester: Ellis Horwood. pp 173-182.
35. Namasivayan, C. and Ranganathan, K. 1995. Removal of Cd (II) from wastewater by adsorption on "waste" Fe(III)/Cr(III) hydroxide. Water Res. 29(7) 1737-1744.
36. Nemeč, P., Prochazka, H., Stamberg, K., Katzer, J., Stamberg, J., Jilek, R., Hulak, P. 1977. Process of treating mycelia of fungi for retention of metals. U.S. Patent 4 021 368.
37. Olivares Trejo, J.J. 1994. Capacidad de bioadsorción de metales pesados por la biomasa celular de dos hongos resistentes a algunos iones metálicos en solución. Tesis Licenciatura. Q.F.B. Fac. de Ciencias Químicas. UASLP.
38. Paknikar, K.M., Palnitkar, U.S. and Puranik, P.R. 1993. Biosorption of metals from solution by micelial waste of *Penicillium chrysogenum*. In: Biohydrometallurgical Technologies: Torma, A.E., Apel, M.L., Brierley, C.L. Eds; The minerals, metals and materials Society: Warrendale, P.A. 2: 229-236.
39. Ramos, R., Sosa, L. y Gutiérrez, M. 1993. Microalgas que crecen sobre desechos de minas de oro y plata. Biotecnología. No. 3 y 4. pp AM 232-AM 235.
40. Sakaguchi, T., Nakajima, A. 1987. Accumulation of Uranium by biopigments. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 40: 133-141.
41. San Blas, G. 1982. The cell wall of fungal human pathogens: Its possible role in host-parasite relationship. Mycopathologia. Vol. 79. pp 159-194.
42. Strandberg, G.W., Starling, S. and Parrott, J. 1981. Microbial cells as biosorbents for heavy metals: Accumulation of uranium by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pseudomonas aeruginosa*. Applied and Environmental Microbiology. pp 237-245.
43. Tada, F. and Suzuki, S. 1982. Adsorption and desorption of heavy metals in botton mud of urban rivers. Water Res. Vol. 16. pp 1489-1494.
44. Tobin, J.M., Cooper, D.G. and Neufeld, R.J. 1984. Uptake of metal ions by *Rhizopus arrhizus* biomass. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 47. No. 4. pp 821-824.

45. Tornabene, T.G. and Edwards, H.W. 1972. Metal sequestering capabilities by *Azotobacter sp.* Science. Vol. 176. pp 1334-1335.
46. Tzesos, M. and Bohumil, V. 1981. Biosorption of Uranium and Thorium. Biotechnology and Bioengineering. Vol. XXIII. pp 583-604.
47. Tzesos, M. and Volesky, B. 1982. The mechanism of thorium biosorption by *Rhizopus arrhizus*. Biotechnology and Bioengineering. Vol. XXIV. pp 955-969.
48. Venkateswerlu, G. and Stotsky. 1986. Copper and cobalt alter the cell wall composition on *Cunninghamella blakesleana*. Can. J. Microbiol. Vol. 32. pp 654-662.
49. Volesky, B. and Holan, Z.R. 1995. Biosorption of heavy metals Biotechnol. Prog.. Vol 11 pp 235-250.
50. Zacarías, C., Martínez, V., Olivares, J., Torre, M.E., Moctezuma, M.G., Fuentes, L., Mendoza, J. y Acosta, I. 1995. Analisis comparativo de la captación de metales pesados por la biomasa celular de dos cepas de *Mucor rouxii* y la quitina comercial. Memorias del V Congreso Iberoamericano de Química Inorgánica. pp. 19-23.
51. Zouboulis, A.I., Kydros, K.A. and Matis, K.A. (1995). Removal of hexavalent chromium anions from solutions by pyrite fines. Water Res. 29(7). 1755-1760.

