



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE SAN LUIS POTOSI

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

CENTRO DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS DE POSGRADO

ANALISIS COMPARATIVO DE LA CAPTACION DE METALES
PESADOS EN SOLUCION POR DOS CEPAS DE Mucor rouxii
Y LA QUITINA COMERCIAL

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

Celia Zacarías Sánchez

ASESORADA POR M. C. ISMAEL ACOSTA RODRIGUEZ

SAN LUIS POTOSI, S. L. P.

1994

F

FD475

23

c.1



1080076900

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

ANALISIS COMPARATIVO DE LA CAPTACION DE METALES
PESADOS EN SOLUCION POR DOS CEPAS DE Mucor rouxii
Y LA QUITINA COMERCIAL

T E S I S P R O F E S I O N A L

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :
Q U I M I C O F A R M A C O B I O L O G O
P R E S E N T A

CELIA ZACARIAS SANCHEZ

ASESORADA POR M.C. ISMAEL ACOSTA RODRIGUEZ

SAN LUIS POTOSI, S.L.P.

1994

T
TD475
23



EL QUIMICO CAPAZ DE EXTRAER DE CORAZON
LOS ELEMENTOS RESPETO, DESEO, PACIENCIA,
ARREPENTIMIENTO, SORPRESA Y PERDON, Y
DE COMBINARLOS EN UNO, HABRA CREADO ESE
ATOMO QUE SE LLAMA AMOR.

KAHLIL GIBRAN

EL MUNDO ESTA LLENO DE
PEQUEÑAS ALEGRÍAS, EL
ARTE CONSISTE EN SABER
DISTINGUIRLAS.

LI-TAI-PO

A MIS PADRES: JOSEFINA

Y

JUAN

POR SER MIS MEJORES AMIGOS Y CONSEJEROS, Y
PORQUE GRACIAS A ELLOS HE PODIDO LOGRAR
UNO DE MIS MAS GRANDES SUEÑOS.

A MI TIA CLEMEN:

POR SU APOYO INCONDICIONAL
CARIÑO Y GRAN EJEMPLO.

A MIS HERMANOS: GEMA

DORA

JUAN

SILVIO

GRACIAS POR SU PACIENCIA
Y COMPRESION.

A MIS AMIGOS

QUIENES ESTAN SIEMPRE CERCA
DE MI CUANDO LOS NECESITO

A MI ASESOR: M.C. ISMAEL ACOSTA RODRIGUEZ

POR BRINDARME SU TIEMPO, SU PACIENCIA
Y CONOCIMIENTOS. PARA EL TODA MI
ADMIRACION, RESPETO Y CARIÑO

INDICE GENERAL

TITULO	PAGINA
Resumen	1
Generalidades	2
Características de la quitina	2
Mecanismo de síntesis de quitina	3
Antecedentes	6
Objetivo general	7
Objetivos particulares	7
Material y métodos	8
Lavado de quitina	8
Lavado de material	8
Obtención de la biomasa celular	9
Determinación de la capacidad de bioadsorción de metales pesados	9
Determinación de cadmio	9
Determinación de mercurio	12
Determinación de plomo	14
Determinación de zinc	16
Determinación de cobre y arsénico	19
Sistema generador de hidruros	21
Sistema de atomización de flama	22
Método del electrodo para la determinación de flúor	22
Determinación de cobalto	25
Resultados	27
Discusión	41

	T I T U L O	P A G I N A
Conclusiones		43
Bibliografía		44

I N D I C E D E T A B L A S

	T I T U L O	P A G I N A
Tabla No. 1.-	Diferenciación química de la pared celular en las diferentes fases del ciclo de vida de <u>Mucor rouxii</u> .	5
Tabla No. 2.-	Porcentaje de bioadsorción de plomo en solución por las tres biomasas celulares	29
Tabla No. 3.-	Porcentaje de bioadsorción de cadmio en solución por las tres biomasas celulares	31
Tabla No. 4.-	Porcentaje de bioadsorción de mercurio en solución por las tres biomasas celulares	33
Tabla No. 5.-	Porcentaje de bioadsorción de cobre en solución por las tres biomasas celulares.	35
Tabla No. 6.-	Porcentaje de bioadsorción de flúor en solución por las tres biomasas celulares.	37
Tabla No. 7.-	Porcentaje de bioadsorción de cobalto en solución por las tres biomasas celulares.	39
Tabla No. 8.-	Bioadsorción de metales pesados en solución por las tres biomasas celulares estudiadas.	40

INDICE DE FIGURAS

TITULO	PAGINA
Fig. No. 1.- Cinética de bioadsorción de plomo en solución por las tres biomasas celulares	28
Fig. No. 2.- Cinética de bioadsorción de cadmio en solución por las tres biomasas celulares.	30
Fig. No. 3.- Cinética de bioadsorción de mercurio en solución por las tres biomasas celulares.	32
Fig. No. 4.- Cinética de bioadsorción de cobre en solución por las tres biomasas celulares.	34
Fig. No. 5.- Cinética de bioadsorción de flúor en solución por las tres biomasas celulares.	36
Fig. No. 6.- Cinética de bioadsorción de cobalto en solución por las tres biomasas celulares.	38

RESUMEN

En la actualidad esta bien documentado que las biomásas microbianas son capaces de bioadsorber iones metálicos en solución, aún cuando las células están muertas, lo cual abre una alternativa potencial para la eliminación de metales pesados de aguas residuales, así como para su recuperación de soluciones diluidas. Por otro lado, los bioadsorbentes naturales de fácil acceso, pueden ser utilizados en los lugares donde los costosos intercambiadores iónicos no son factibles.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la captación de metales pesados (Pb^{++} , Cd^{++} , As^{+++} , Hg^{++} , Cu^{++} , Zn^{++} , Co^{++} y F^{-}) por tres biomásas celulares (Cepa silvestre de Mucor rouxii IM-80, Cepa mutante de Mucor rouxii, resistente a cobre y mercurio, así como la quitina comercial). Para cada prueba, se preparó una serie de soluciones con concentración conocida del ión metálico a probar, ajustando a un pH de 4.1. La cantidad de biomasa utilizada fue de 80 mg/200 ml de solución metálica a probar. Posteriormente, se tomaron muestras a determinados tiempos, la biomasa se removió por centrifugación a 3 000 rpm/5 min., y el sobrenadante se analizó para determinar la concentración del ión metálico. Las determinaciones de Pb^{++} , Hg^{++} , Cd^{++} y Zn^{++} fueron realizadas por el método de la ditizona, las determinaciones de As^{+++} y Cu^{++} por Espectrofotometría de Absorción Atómica, la de F^{-} por el método del Ión Selectivo y la de Co por el de la metilisobutilcetona.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes: la cepa mutante adsorbe eficientemente plomo, cadmio, mercurio, cobre y flúor (96.2%, 57.7%, 53.6%, 39% y 38.4% respectivamente, adsorbe muy poco cobalto (9.5%) y nada de arsénico y zinc. Por otro lado, la cepa silvestre sólo adsorbe con eficiencia plomo (91.5%), medianamente cobre (28%), muy poco cadmio, mercurio y cobalto (5%, 4.5% y 11.3% respectivamente) y no capta ninguna concentración de flúor, arsénico y zinc, mientras que la quitina capta un 91.5% de plomo, 36.5% de flúor, 13.3% de cobalto, 10.5% de cadmio, 9.6% de mercurio y nada de arsénico, zinc y cobre.

GENERALIDADES

Mucor rouxii es un hongo dimórfico de la familia de los Zigomicetos, el cual en presencia de oxígeno se desarrolla en forma de micelio y bajo condiciones anaeróbicas y en presencia de CO₂ crece como levadura (Acosta, 1984; Bartnicki García, 1968). Además de la composición de la atmósfera de crecimiento, la fuente de carbono y de nitrógeno también influyen sobre el dimorfismo de Mucor. En general, el desarrollo de la forma de levadura requiere de altas concentraciones de hexosas. Por otra parte, el desarrollo micelial puede ocurrir sobre una gran variedad de fuentes de carbono que incluyen hexosas, disacáridos, pentosas y otros compuestos de 3 y 4 átomos de carbono (Bartnicki García, 1968).

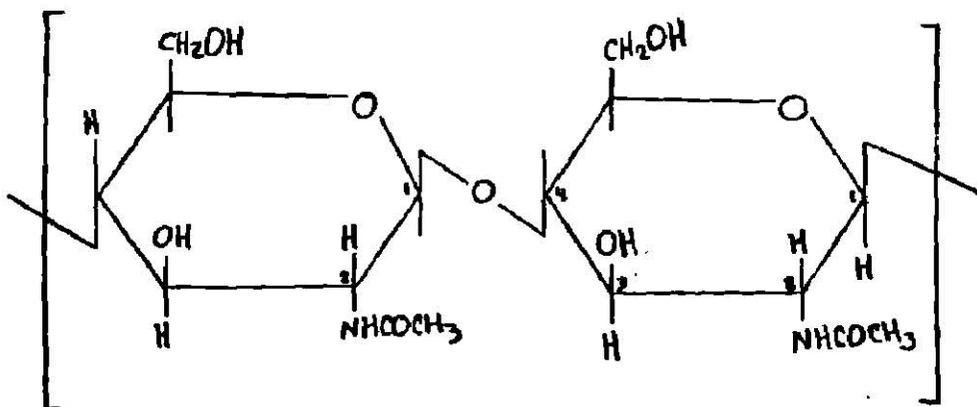
El ciclo asexual de Mucor rouxii puede ser dividido en 3 etapas:

- 1.- Germinación de las esporas.
- 2.- Crecimiento vegetativo.
- 3.- Formación de esporangióforos.

La pared celular de Mucor rouxii en sus diferentes fases de desarrollo presenta una composición química compleja (Tabla No. 1), siendo la quitina el componente estructural más importante de la cubierta, así como también puede observarse una proporción mayoritaria de manosa en la forma de levadura y la presencia de glucosa únicamente en la espora. (Bartnicki García, 1968).

CARACTERISTICAS DE LA QUITINA

La quitina es un polisacárido cristalino formado por cadenas lineales de unidades de N- acetil-D-glucosamina (2 acetamido-2-deoxi-D Glucosa) unidas por enlace glucosídico β(1-4), según la siguiente fórmula:



En la naturaleza la quitina se presenta en forma de microfibrillas. Es un sólido insoluble en agua, ácidos orgánicos diluidos, álcali concentrado, alcohol y otros solventes orgánicos. Se puede disolver en ácidos minerales concentrados, tales como HCl, H₂SO₄, H₃PO₄, etc (Acosta y Cols., 1987). La quitina se encuentra en tres formas polimórficas: α , β y γ , las cuales difieren en el arreglo de las cadenas dentro de las celdas del cristal. La α -quitina es la forma polimórfica más compactada y cristalina, y las cadenas están arregladas en forma antiparalela; la β -quitina es aquella forma en que las cadenas son paralelas y la γ -quitina es aquella forma en que las cadenas corren en formas alternadas, existiendo dos en un sentido y otra en sentido contrario. La forma polimórfica más importante es la α -quitina, la cual es además la más estable; bajo ciertas condiciones la β y γ -quitina tienden a adquirir esta forma. La α -quitina forma celdas ortorómbicas, las cuales tienen las siguientes dimensiones: a=0.476, b=1.030, c=1.885 nm. La cadena de quitina puede ser vista como una hélice de poli-N-acetil-D-glucosamina con un valor de traslación de 0.515 nm y 2 residuos de azúcar por vuelta de hélice (Bartnicki García, 1968). La unidad de celda consta de 2 cadenas corriendo en dirección opuesta. La celda cristalina de β -quitina es monoclinica con las siguientes dimensiones: a=0.485, b= 0.926 nm. La β -quitina contiene cadenas paralelas extendidas que pueden ser visualizadas como arreglos laminares unidos por puentes de hidrógeno. La quitina tiene un grado de polimerización de 2000-3000 residuos de azúcar por cadena y un peso molecular promedio de 4.2×10^5 a 6.3×10^5 daltones (Acosta, 1984).

MECANISMOS DE SINTESIS DE QUITINA

La biosíntesis de quitina in vitro fue descrita primeramente por Glaser y Brown (1957) quienes emplearon extractos libres de células de Neurospora crassa, las cuales catalizaban la incorporación de N-acetilglucosamina (GlcNac) a partir de UDP-GlcNac en un polisacárido insoluble susceptible a la acción de la quitinasa. El mecanismo de síntesis de quitina es un proceso de transglicosilación, por el cual un donador, en este caso un azúcar nucleótido, transfiere el azúcar a un aceptor mediante la enzima quitina sintetasa (UDP-2-acetamido-2-deoxi-D-glucosa: quitina 4- β -acetamido-deoxi-4 glucosiltransferasa), en presencia de ATP, Mg⁺⁺ y GlcNac, los cuales aunque actúan in vitro, no es seguro que se requiera in vivo para el funcionamiento de la enzima (Bartnicki García, 1968).

Posteriormente se demostró por estudios de microscopía electrónica que la enzima se hallaba asociada con unas microvesículas de una morfología peculiar y de un diámetro de 40-70 nm lo que las convierte en las vesículas más pequeñas aisladas hasta ahora (Acosta y Cols., 1987), ya que su única función conocida es la síntesis de microfibrillas de quitina. Por estudios in vitro se ha observado que los quitosomas sufren una serie de transformaciones durante el proceso de fibrillogénesis, la quitina cristaliza en el interior del quitosoma dando lugar a la aparición de estructuras de aspecto fibroide, hasta que la cubierta del quitosoma se abre y permite la cristalización de la quitina en forma de una microfibrilla (Acosta, 1984).

Como ya se mencionó, los quitosomas son microvesículas generalmente esferoidales de 40-70 nm de diámetro, cuya apariencia al microscopio electrónico varía. Algunos revelan una estructura interna granular rodeada por una cubierta de 6-12 nm de espesor (cicloide), en tanto que otras no muestran la estructura interna sino que aparecen sólidos con una marcada depresión en su superficie externa (proctoide) (Acosta, 1984).

TABLA No. 1

**DIFERENCIACION QUIMICA DE LA PARED CELULAR EN LAS
DIFERENTES FASES DEL CICLO DE VIDA DE *Mucor Rouxii***

COMPONENTES DE LA PARED	LEVADURAS	HIFAS	ESPORANGIOFOROS	ESPORAS
QUITINA	8.4	9.4	18.0	2.1+
QUITOSANA	27.9	32.7	20.6	9.5+
MANOSA	8.9	1.6	0.9	4.8
FUCOSA	3.2	3.8	2.1	0.0
GALACTOSA	1.1	1.6	0.8	0.0
ACIDO GLUCURONICO	12.2	11.8	25.0	1.9
GLUCOSA	0.0	0.0	0.1	42.6
PROTEINA	10.3	6.3	9.2	16.1
LIPIDO	5.7	7.8	4.8	9.8
FOSFATO	22.1	23.3	0.8	2.6
MELANINA	0.0	0.0	0.0	10.3

LOS VALORES SE PRESENTAN EN % DE PESO SECO DE LA PARED

+ NO CONFIRMADOS POR RAYOS X.

* BARTNICKI-GARCIA, CHEMISTRY OF FUNGAL CELL WALL, ANNUAL REVIEW OF MICROBIOLOGY 22, 1968

ANTECEDENTES

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 otro tipo de materiales (lodos, materia orgánica, etc.). Davis (1984) reportó la complejación de cobre y cadmio por materia orgánica natural, extraída del sedimento de la superficie del lago Urnersee (Suiza), Balistrieri y Murray, (1982) la adsorción de cobre, plomo, zinc y cadmio por Goetite (óxido de hierro preparado sintéticamente), Tada y Suzuki (1982), la adsorción y desorción de cobre, zinc, cadmio y plomo por lodos de ríos urbanos.

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 spp (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).

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, 1992), 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. Por lo anterior, sería de interés el estudiar la captación de algunos iones metálicos por la biomasa celular de otros hongos, así como por algunos componentes de la pared celular de los mismos, para tratar de implementar técnicas que impliquen el uso de la biomasa celular de los hongos más eficientes en la captación de dichos metales, para su eliminación de algunos mantos acuíferos contaminados.

OBJETIVO GENERAL

Realizar un análisis comparativo de la capacidad de bioadsorción de diferentes metales pesados por dos cepas de Mucor rouxii y la quitina comercial.

OBJETIVOS PARTICULARES

--- Comparar la capacidad de captación de algunos metales pesados en solución por las 2 cepas de M.rouxii con un trabajo previo (Martínez y cols. 1994).

--- Determinar si la quitina es la principal responsable de la bioadsorción de metales pesados.

--- Determinar cual de las biomasas celulares analizadas es más eficiente en la captación de metales pesados para tratar de implementar filtros biológicos para la eliminación de dichos metales de aguas residuales.

MATERIAL Y METODOS

Las cepas de hongos utilizadas en este trabajo fueron la cepa silvestre de Mucor rouxii IM-80 y una mutante de la misma cepa resistente a cobre y mercurio obtenida por mutagénesis con nitrosoguanidina, las cuales fueron proporcionadas por el Dr. Luis Sosa del Instituto de Investigación en Biología Experimental de la Facultad de Química de la Universidad de Guanajuato. Además, se utilizó α -quitina comercial (Sigma Chemical Company). La cepa silvestre se conservó y subcultivó en Agar Dextrosa Sabouraud, mientras que la mutante lo fue en el siguiente medio mínimo:

COMPONENTE	CONCENTRACION (g/lt)
Agar bacteriológico	20
Dextrosa	20
Fosfato ácido de potasio	6
Nitrato de amonio	1.8
Sulfato de magnesio-heptahidratado	1.0
Sulfato de fierro-heptahidratado	0.001
Sulfato de zinc-heptahidratado	0.0018
Sulfato de magnesio-heptahidratado	0.003

A este medio se le agregan 200 miligramos de sulfato de cobre heptahidratado/lt, ya que los hongos pueden perder su resistencia a metales pesados si se mantienen en medios sin metal.

LAVADO DE QUITINA

Con objeto de eliminar el exceso de níquel contenido en la quitina, ésta se lava con ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) al 5% (p/v) durante una semana con agitación constante a 28°C, cambiando la solución de EDTA cada 24 hrs.

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 horas y se enjuaga con agua tridesionizada. Por último, se seca en un horno (Felisa) a la temperatura requerida según el tipo de material. 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 4.1 con ácido clorhídrico 0.2 N.

OBTENCION DE LA BIOMASA CELULAR

Se toma una asada en condiciones esteriles de las esporas crecidas en los medios anteriores (dependiendo de la cepa), y se coloca en un tubo de ensaye conteniendo 1 ml de solución salina estéril al 0.85%. Se hacen diferentes diluciones (1:100 y 1:1000) en la misma solución salina y se cuentan las esporas en un hematocitómetro. Posteriormente, se siembran 1×10^6 esporas 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 ámbar.

DETERMINACION DE LA CAPACIDAD DE BIOADSORCION DE METALES PESADOS

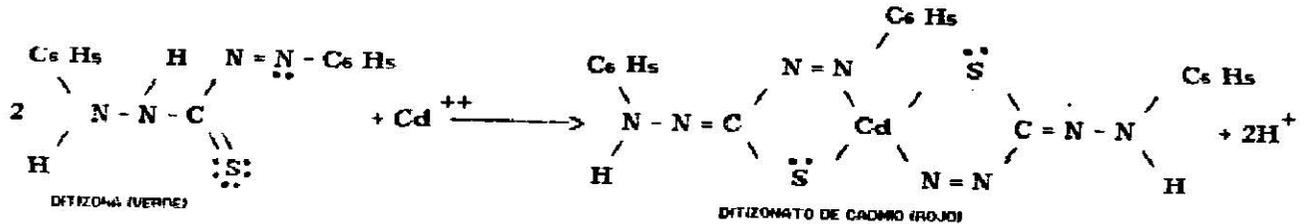
Se prepara una solución estándar del metal a probar, en agua tridesionizada; se ajusta el pH a 4.1 (potenciómetro de bolsillo PS-15, Corning) donde se obtiene la mayor captación de metal, (Acosta y Martínez, 1993). La cantidad de biomasa añadida a cada matraz Erlenmeyer fue de 80 miligramos/200 ml de 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 bajo ciertas condiciones 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



INTERFERENCIAS

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.

APARATOS

Espectrofotómetro de luz UV Shimadzu modelo 160-A.

REACTIVOS

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 hidrocioruro de hidroxilamina.- Disolver 20 gramos de hidrocioruro 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

Adicionar los reactivos en el siguiente orden, mezclando después de cada adición: 1 ml de solución de tartrato de sodio y potasio, más 5 ml de solución I de cianuro de potasio-hidróxido de sodio, más 1 ml de solución de hidrocioruro de hidroxilamina y 15 ml de solución stock de ditizona y agitar por un minuto. Pasar la capa de cloroformo dentro de un segundo embudo de separación que contiene 25 ml de solución de ácido tartárico frío. Adicionar 10 ml de cloroformo al primer embudo, agitar y pasarlo dentro del 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.

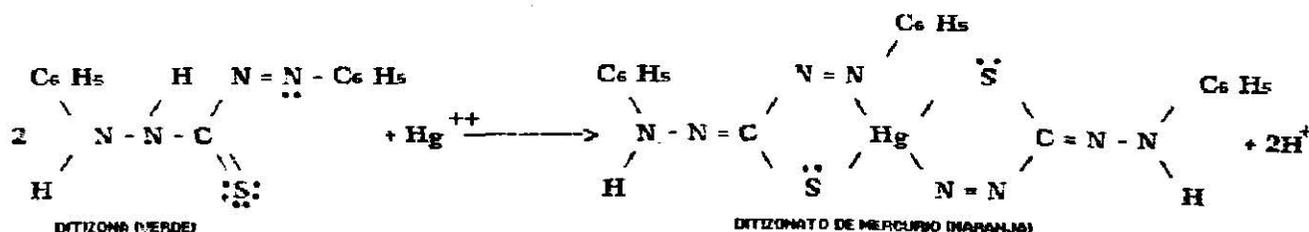
Agitar el segundo embudo por 2 minutos y descartar la capa de cloroformo, adicionar 5 ml de cloroformo, agitar 1 min. y descartar la capa de cloroformo (debido a que el complejo que forma el metal con la ditizona, se ha transferido a la solución de ácido tartárico). Enseguida adicionar en el siguiente orden: 0.25 ml de solución de hidrocioruro de hidroxilamina y 15 ml de solución de trabajo de ditizona (la cual se preparó en cloroformo), adicionar 5 ml de solución II de cianuro de potasio-hidróxido de sodio, inmediatamente agitar por 1 min. y transferir la capa de cloroformo a una celdilla; leer la absorbancia de la muestra a 518 nm obteniendo la concentración de cadmio de la curva de calibración; teniendo en cuenta que la concentración 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 estandar.

REACCION QUIMICA



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.

A P A R A T O

Espectrofotómetro UV Shimadzu Modelo 160-A.

R E A C T I V O S

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

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. Posteriormente, añadir lentamente 5 ml de persulfato de potasio y dejar enfriar durante 30 min. Añadir una ó más gotas de hidrocioruro de hidroxilamina, hasta la eliminación del color rosa. Después, transferir cada solución individualmente a embudos de separación de 1 000 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 3 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.

Lavar con agitación los extractos acumulados de Ditizona en un embudo de separación de 250 ml con 50 ml de ácido sulfúrico 0.25N. Transferir los extractos lavados a otro embudo de separación de 250 ml y añadir 50 ml de ácido sulfúrico 0.25N 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. 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, obteniendo la concentración de mercurio de una curva patrón. La concentración mínima detectable 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.

e.- Solución reductora de cianuro-citrato.- Disolver 400 gramos de citrato de amonio dibásico, 20 gramos de sulfito de sodio anhidro, 10 gramos de hidrocloreto 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.

PROCEDIMIENTO

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

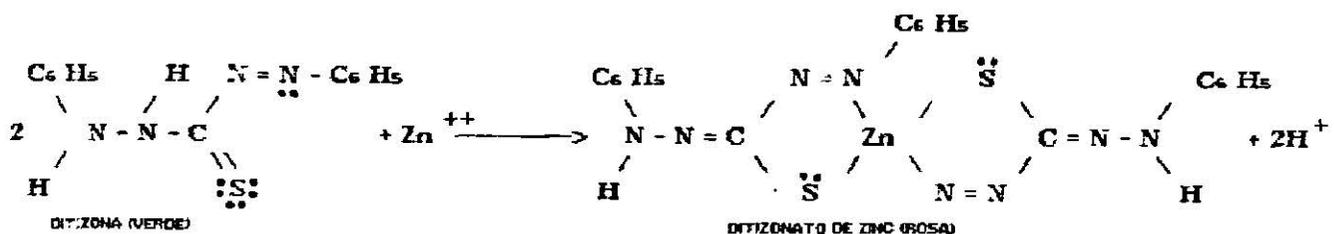
Posteriormente adicionar 50 ml de la solución citrato-cianuro amoniacal, mezclar y dejar enfriar a temperatura ambiente. Adicionar 10 ml de solución de trabajo de Ditizona, agitar vigorosamente y dejar que se separen las capas, descartar 1 ó 2 ml de la capa de cloroformo, y medir la absorbancia del extracto 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 ZINC POR EL METODO DE LA DITIZONA (Clesceri y cols., 1989)

FUNDAMENTO

El zinc es separado de otros metales por extracción con Ditizona y se determina midiendo el color del complejo zinc-Ditizona en tetracloruro de carbono, a una absorbancia de 535 nm.

REACCION QUIMICA



INTERFERENCIAS

Puede haber interferencias con cadmio, cobre, plomo y níquel.

APARATOS

Espectrofotómetro luz UV Shimadzu modelo 160-A.

REACTIVOS

- a.- Solución stock de zinc.- disolver 100 miligramos de zinc metálico en un pequeño exceso de ácido clorhídrico 1 a 1 (aproximadamente 1 ml). Diluir a 1 000 ml con agua. 1ml= 100 microgramos.
- b.- Solución estandar de zinc.- Diluir 10 ml de solución stock de zinc a 1 000 ml con agua, 1 ml = 1 microgramo de zinc.
- c.- Acido clorhídrico 0.02N.- Diluir 1 ml de ácido clorhídrico concentrado a 600 ml con agua.
- d.- Acetato de sodio 2 M.- Disolver 68 gramos de acetato de sodio trihidratado y diluir a 250 ml con agua.
- e.- Acido acético 1 a 8.
- f.- Solución buffer de acetatos.- Mezclar volúmenes iguales de acetato de sodio 2 M y ácido acético 1 a 8. Extraer con porciones de 10 ml de solución I de Ditizona, hasta que el último extracto permanezca verde, y posteriormente se extrae el exceso de Ditizona con tetracloruro de carbono.

g.- Solución de tiosulfato de sodio.- Disolver 25 gramos de tiosulfato de sodio pentahidratado en 100 ml de agua, purificar con extracción de ditizona como en el paso anterior.

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

i.- Solución I de Ditizona.- Diluir 40 ml de solución stock de Ditizona a 100 ml con tetracloruro de carbono. Preparar diariamente.

j.- Solución II de Ditizona.- Diluir 10 ml de solución I de Ditizona a 100 ml con tetracloruro de carbono. Preparar diariamente.

k.- Tetracloruro de carbono. Grado reactivo. Productos químicos Monterrey, S.A.

PROCEDIMIENTO

Colocar la muestra en un embudo de separación de 250 ml, adicionar 5 ml de buffer de acetatos y 1 ml de tiosulfato de sodio y mezclar, el pH debe de estar entre 4.0-5.5. Adicionar 10 ml de solución II de Ditizona y agitar vigorosamente por 4 min. y dejar reposar 5 min, midiendo la formación de color rojo de ditizonato de zinc a 535 nm. La cantidad mínima detectable es de 1 microgramo de zinc en 15 ml de solución.

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.

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 disociar 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 estandar 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.

Una de las formas que compensan las interferencias de matriz es el empleo del método de adiciones de estandar, 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 estandar 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 determinado. 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.

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 ioduro-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).

A P A R A T O S

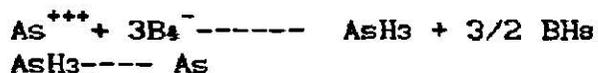
En este trabajo, se utilizó un Espectrofotómetro de Absorción Atómica marca Varian Modelo Spectr AA-20, localizado físicamente en el Centro de Investigación y Estudios de Posgrado de esta Facultad.

SISTEMA GENERADOR DE HIDRUROS PARA LA DETERMINACION DE ARSENICO EN SOLUCION

FUNDAMENTO

Esta técnica se emplea para la determinación de elementos metálicos que formen hidruros volátiles tales como: arsénico, mercurio, bismuto, antimonio, selenio, estaño y telurio. La solución que contiene la muestra, se trata en primer lugar de manera que el metal se encuentre presente en su forma iónica en una solución ácida, enseguida el agente reductor (borohidruro de sodio) es agregado a la muestra donde reacciona para liberar hidrógeno, que a su vez reduce los iones del metal generando químicamente un hidruro volátil. El hidruro gaseoso y el hidrógeno producidos son arrastrados por un flujo de nitrógeno ó argón hacia una celda de absorción de cuarzo calentada por una flama aire-acetileno, colocada en la trayectoria óptica del Espectrofotómetro. Cuando el vapor del metal es atomizado en la celda de absorción, absorbe energía de longitud de onda específica y se produce una señal, registrándose un pico, la altura del cual es proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra.

La siguiente ecuación representa una simplificación del proceso de reducción para el arsénico:



PROCEDIMIENTO

La determinación de Arsénico se realiza a partir de una solución patrón de 1 000 ppm de As en ácido clorhídrico al 1.5%. Se emplea como agente reductor una solución de borohidruro de sodio al 5% en hidróxido de sodio al 2%.

Para esta cuantificación se utilizó el método de adición de estandar. Inicialmente, se realiza una curva de adición de 5 puntos por duplicado con un volumen de calibración de 12 ml: Un primer punto con muestras sin adición (1 ml de muestra adicionada con 1 ml de agua regia), un segundo punto con la muestra adicionada de 5 ppb de As (1 ml de muestra adicionada de 1 ml de agua regia con 0.6 ml de estandar conteniendo 1 ppb de As), los puntos restantes son adiciones de 10, 20 y 40 ppb, se preparan añadiendo 0.12, 0.24 y 0.48 ml respectivamente del estandar de 1 ppm. También se prepara un duplicado para el control de agua de la EPA y otro para un blanco de reactivos. Todos se incuban durante 24 hrs. a temperatura ambiente, posteriormente se incuban a 60°C en ácido clorhídrico al 32%.

Finalmente se somete la reacción al agente reductor para la cuantificación del elemento, la línea de absorción utilizada es de 193.7 nm utilizando una lámpara de descarga sin electrodo y una flama de aire-acetileno.

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

FUNDAMENTO

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 comunmente 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.

PROCEDIMIENTO

El aparato se calibra con estándares de concentración conocida (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 absorbera automáticamente la cantidad necesaria para dar la lectura correspondiente a la concentración del metal contenido en la solución.

Las determinaciones de arsénico y cobre se realizaron en el Centro de Investigación y de Estudios de Posgrado de esta Facultad, contando con la ayuda de la Q. Laura Fuentes Rubio.

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 ciclohexileno diamino tetracético) ó citrato de sodio, acomplejaron preferentemente concentraciones de aluminio superiores a 5 mg/lit. 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.

A P A R A T O S

- a) Medidor de pH con escala expandida ó digital ó medidor del ión selectivo.
- b) Electrodo de referencia tipo manga (ORION .90-0100. Beckman 43462, CORNING 476012 ó equivalente.). No use 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; 1 ml. equivale a 100 μg de flúor.
- b) Solución standard de fluoruros. Diluir 100 ml. de la solución stock de fluoruros a 1000 ml. con agua destilada; 1 ml. equivale a 10 μg 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 ciclohexileno diamino tetraacético (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.

PROCEDIMIENTO

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 estandar 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 estandar 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 estandar.

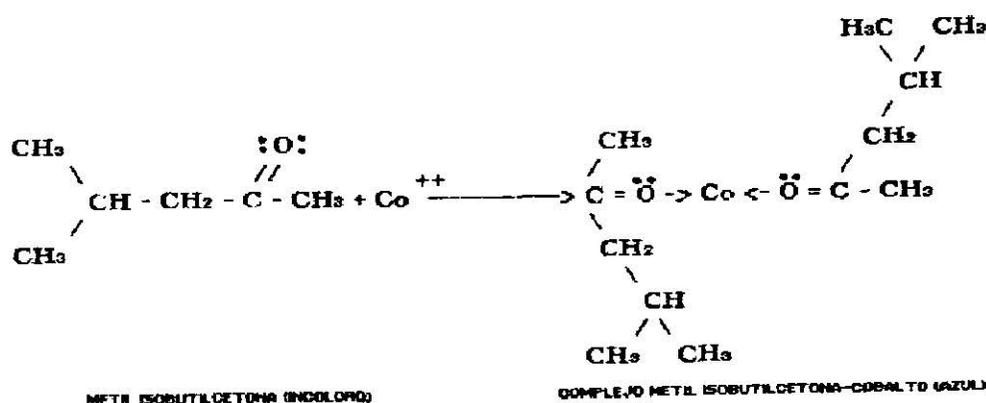
Graficar los potenciales medidos de los estándares de flúor contra la concentración, en papel semilogarítmico de 2 ciclos. Graficar mg de Flúor/lit. en el eje logarítmico con la menor concentración al final de la página. Usando el potencial medido de cada muestra, leer la concentración correspondiente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

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

FUNDAMENTO

Los iones cobalto, bajo ciertas condiciones 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 Shimadzu 160-A.

REACTIVOS

a.- Solución stock de cobalto.- Disolver 500 miligramos de nitrato de cobalto en 100 ml de agua tridesionizada. 1 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.

PREPARACION DE LA CURVA DE CALIBRACION (para Cd, Hg, Pb, Co y Zn).

Se preparan una serie de estándares (microgramos/ml) y se tratan de la misma manera que las muestras problema (ver metodología), trazándose una curva de 5 estándares contra la absorbancia de la muestra, corrigiéndose las gráficas resultantes por el método de mínimos cuadrados.

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

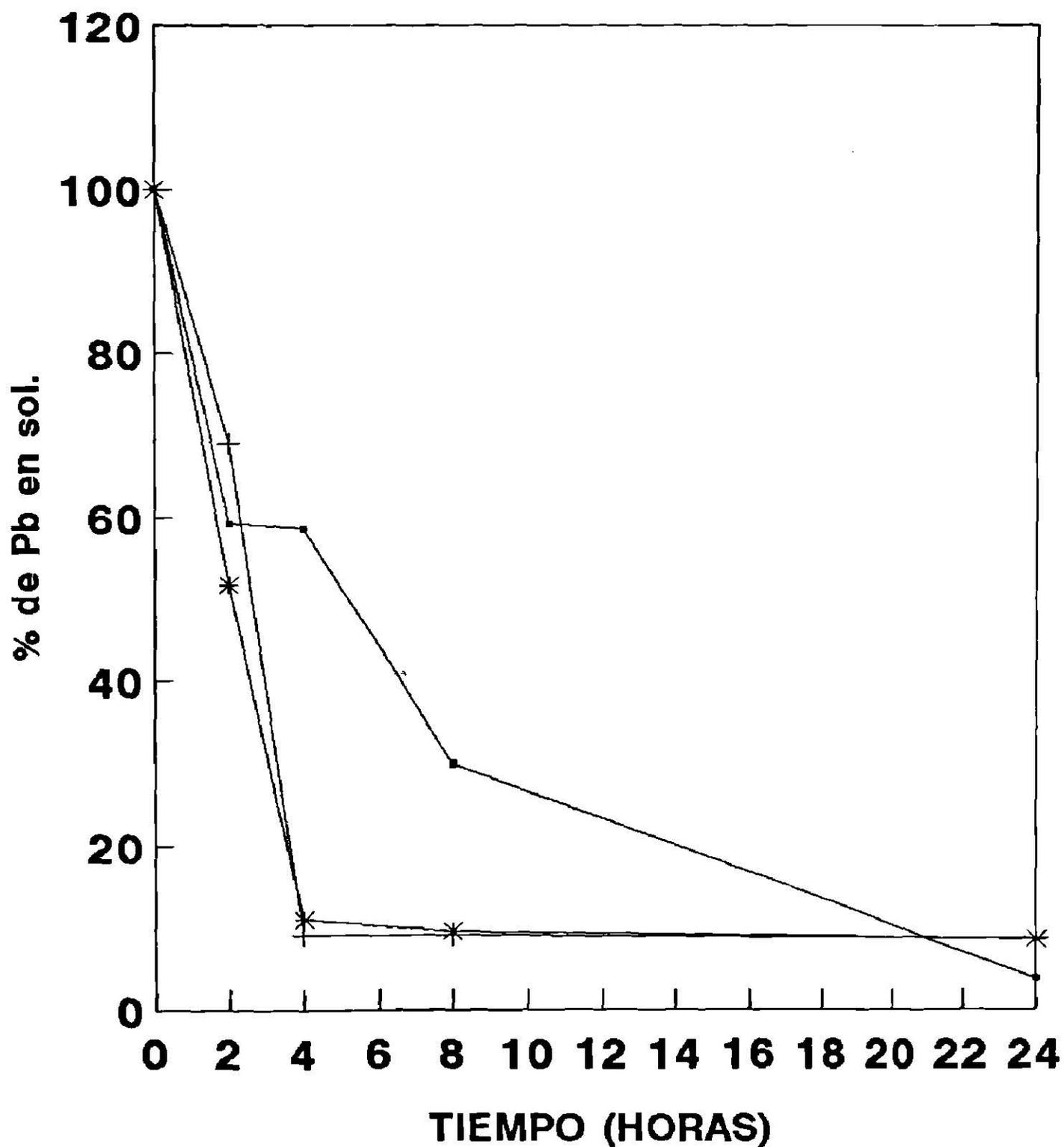
RESULTADOS

En este trabajo se probó la capacidad de los hongos Mucor rouxii silvestre y una cepa mutante del mismo hongo, así como la quitina comercial (ver material y métodos) para bioadsorber diferentes metales pesados en solución, utilizando las sales de sulfato de cobre, nitrato de cobalto, trióxido de arsénico, fluoruro de sodio, cloruro de cadmio, cloruro de mercurio y nitrato de plomo, así como zinc metálico, empleando diferentes métodos para la determinación de los metales, encontrando que la cepa mutante adsorbe eficientemente plomo, cadmio, mercurio, cobre y fluor (96.2%, 57.7%, 53.6%, 39% y 38.4% respectivamente), adsorbe muy poco cobalto (9.5%) y nada de arsénico y zinc (Tablas No. 2-7).

Por otro lado, la cepa silvestre de Mucor rouxii sólo adsorbe con eficiencia plomo (91.5%), medianamente cobre (28%), muy poco cadmio, mercurio y cobalto (5%, 4.5% y 11.3% respectivamente) y no capta ninguna concentración de flúor, arsénico y zinc. (Tablas No. 2-7).

Así mismo, la quitina también capta un 91.5% de plomo, 36.5% de flúor, 13.3% de cobalto, 10.5% de cadmio, 9.6% de mercurio, y ninguna concentración de arsénico, zinc y cobre (tablas No. 2-7).

Fig. No. 1.- CINETICA DE BIOADSORCION DE PLOMO EN SOLUCION POR LAS TRES BIOMASAS CELULARES.



— MUTANTE + SILVESTRE * QUITINA

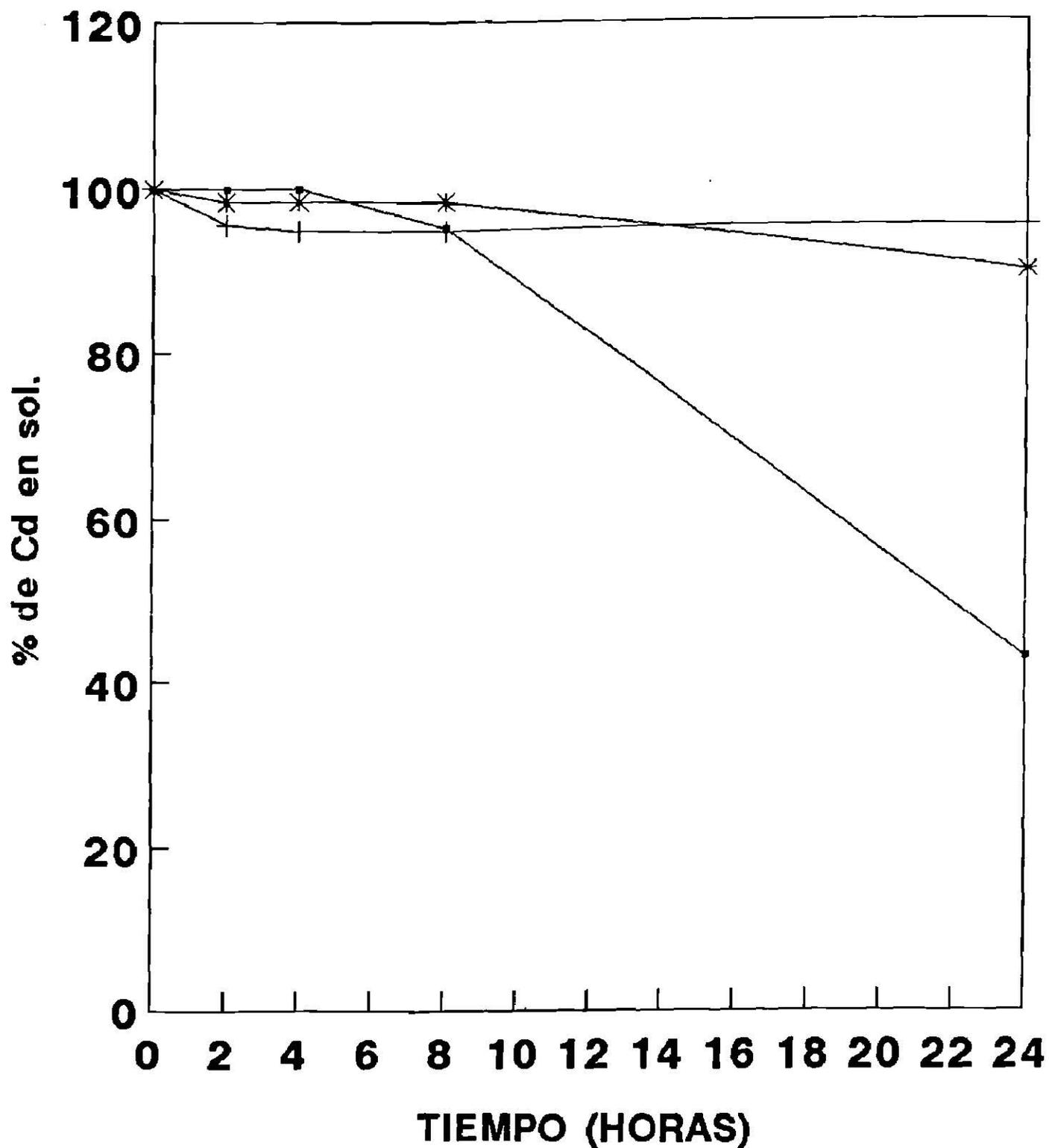
Tabla No. 2.- PORCENTAJE DE BIOADSORCION DE PLOMO EN SOLUCION POR LAS TRES BIOMASAS CELULARES ESTUDIADAS (en 200 ml, con una concentración de 200 ppm con 80 mg de biomasa en agitación constante a 28°C)

PORCENTAJE DE BIOADSORCION DE PLOMO

TIEMPO (horas)	<u>Mucor rouxii</u> mutante (*)	<u>Mucor rouxii</u> IM 80	Quitina
0	0	0	0
2	40.7	31.1	48.3
4	41.3	91	89.1
8	70.0	91	90.5
24	96.2	91.4	91.5

(*)Martínez, V., Moctezuma, M.G. y Acosta, I. 1994. Captación de metales pesados por la biomasa celular del hongo Mucor rouxii. Biotecnología. Vol. 4. No. 1. pp 17-20

Fig. No. 2.- CINETICA DE BIOADSORCION DE CADMIO EN SOLUCION POR LAS TRES BIOMASAS CELULARES.



○ MUTANTE + SILVESTRE * QUITINA

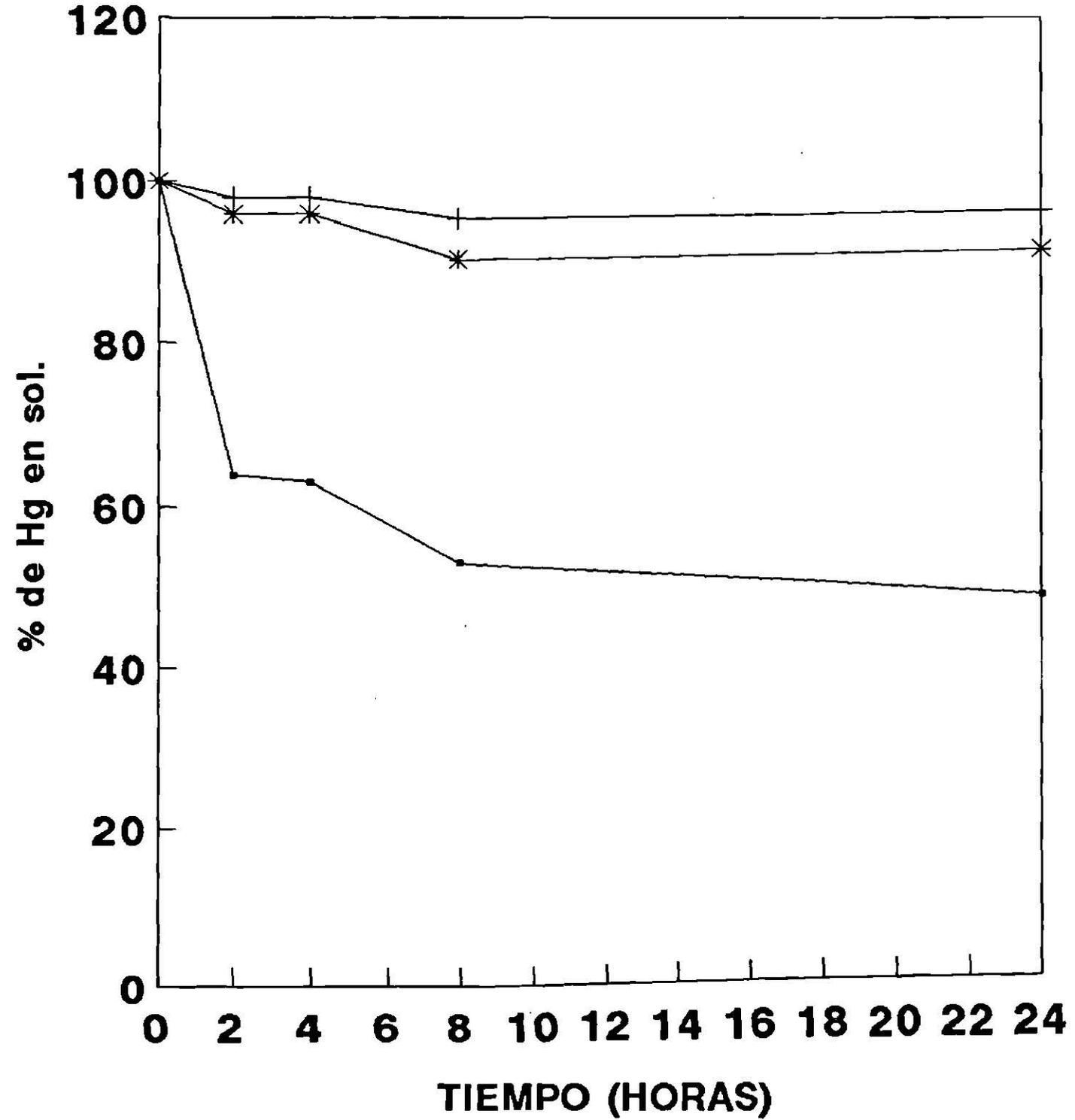
Tabla No. 3.- PORCENTAJE DE BIOADSORCION DE CADMIO EN SOLUCION POR LAS TRES BIOMASAS CELULARES ESTUDIADAS (en 200 ml, con una concentración de 200 ppm, con 80 mg de biomasa, en agitación constante a 28°C).

PORCENTAJE DE BIOADSORCION DE CADMIO

TIEMPO (horas)	<u>Mucor rouxii</u> mutante (*)	<u>Mucor rouxii</u> IM-80	Quitina
0	0	0	0
2	0	4.3	1.5
4	0	5.0	1.5
8	4.6	5.0	1.5
24	57.7	5.0	10.5

(*) Martínez, V., Moctezuma, M.G. y Acosta, I. 1994. Captación de metales pesados por la biomasa celular del hongo Mucor rouxii. Biotecnología. Vol. 4. No. 1. pp 17-20.

Fig. No. 3.- CINETICA DE BIOADSORCION DE MERCURIO EN SOLUCION POR LAS TRES BIOMASAS CELULARES.



—•— MUTANTE + SILVESTRE * QUITINA

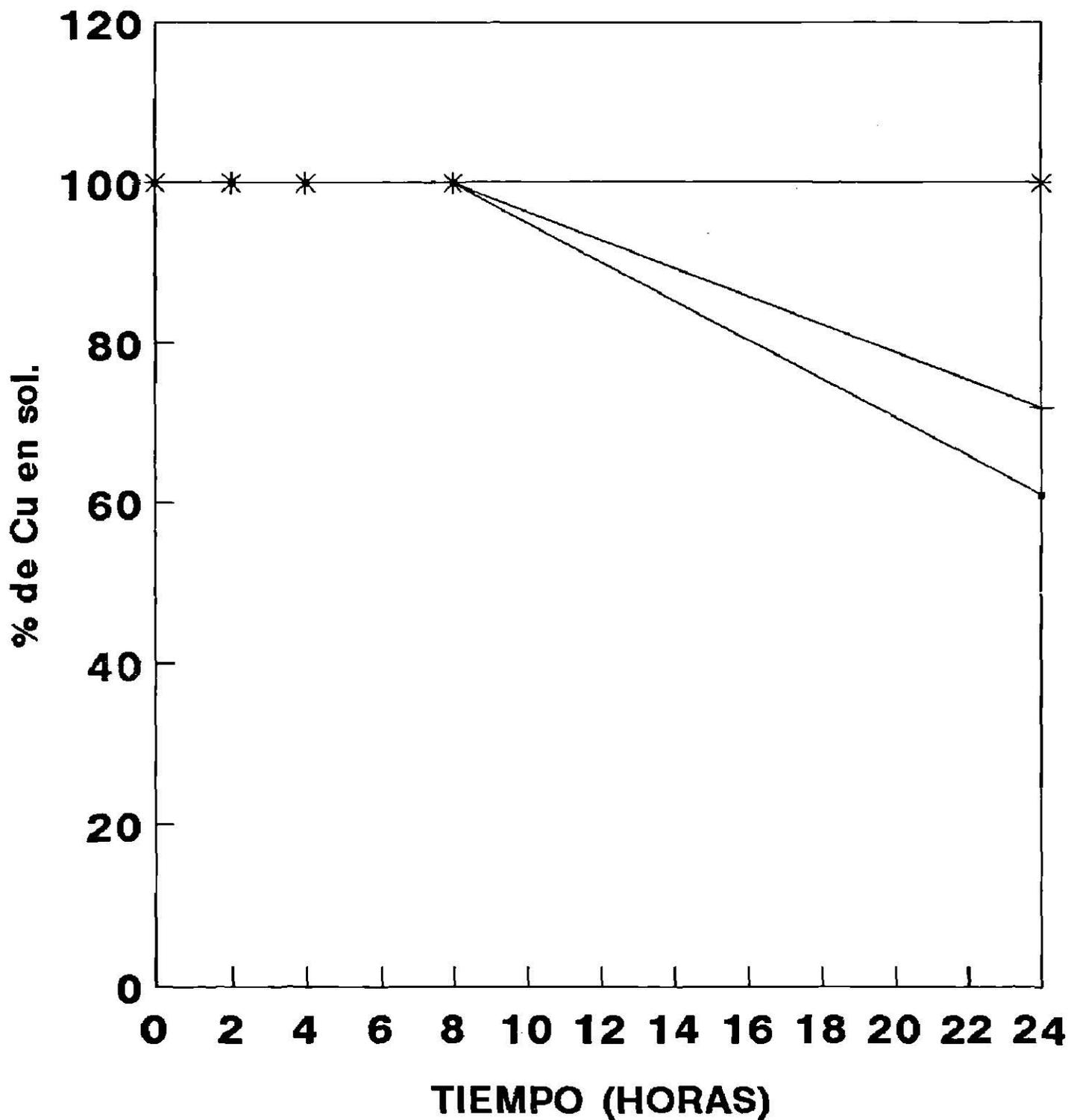
Tabla No. 4.- PORCENTAJE DE BIOADSORCION DE MERCURIO EN SOLUCION POR LAS TRES BIOMASAS CELULARES ESTUDIADAS (en 200 ml, con una concentración de 200 ppm con 80 mg de biomasa, agitación constante a 28°C)

PORCENTAJE DE BIOADSORCION DE MERCURIO

TIEMPO (horas)	<u>Mucor rouxii</u> mutante (*)	<u>Mucor rouxii</u> IM 80	Quitina
0	0	0	0
2	36.1	2	4
4	37	2.1	4
8	47	4.6	9.6
24	53.6	4.6	9.6

(*)Martínez, V., Moctezuma, M.G. y Acosta, I. 1994. Captación de metales pesados por la biomasa celular del hongo Mucor rouxii. Biotecnología. Vol. 4. No. 1. pp 17-20.

**Fig. No. 4.- CINETICA DE BIOADSORCION DE
COBRE EN SOLUCION POR LAS TRES BIOMASAS.
CELULARES.**

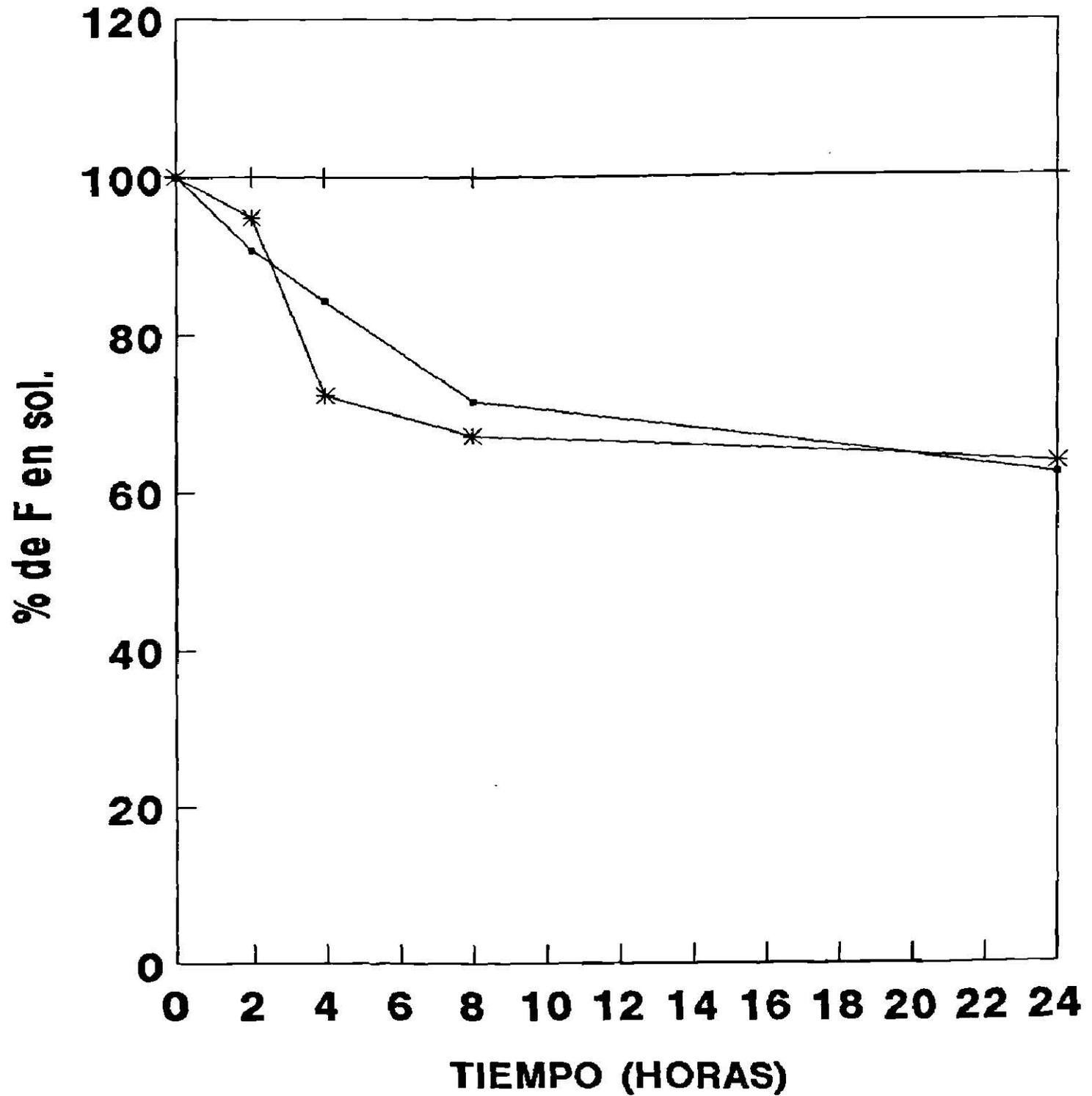


—•— MUTANTE + SILVESTRE * QUITINA

Tabla No. 5.- PORCENTAJE DE BIOADSORCION DE COBRE EN SOLUCION POR LAS TRES BIOMASAS CELULARES ESTUDIADAS (en 200 ml con una concentración de 200 ppm con 80 mg de biomasa, en agitación constante a 28°C).

PORCENTAJE DE BIOADSORCION DE COBRE			
TIEMPO (horas)	<u>Mucor rouxii</u> mutante	<u>Mucor rouxii</u> IM-80	Quitina
0-8	0	0	0
24	39	28	0

**Fig. No. 5.- CINETICA DE BIOADSORCION DE
CROMO EN SOLUCION POR LAS TRES BIOMASAS
CELULARES.**



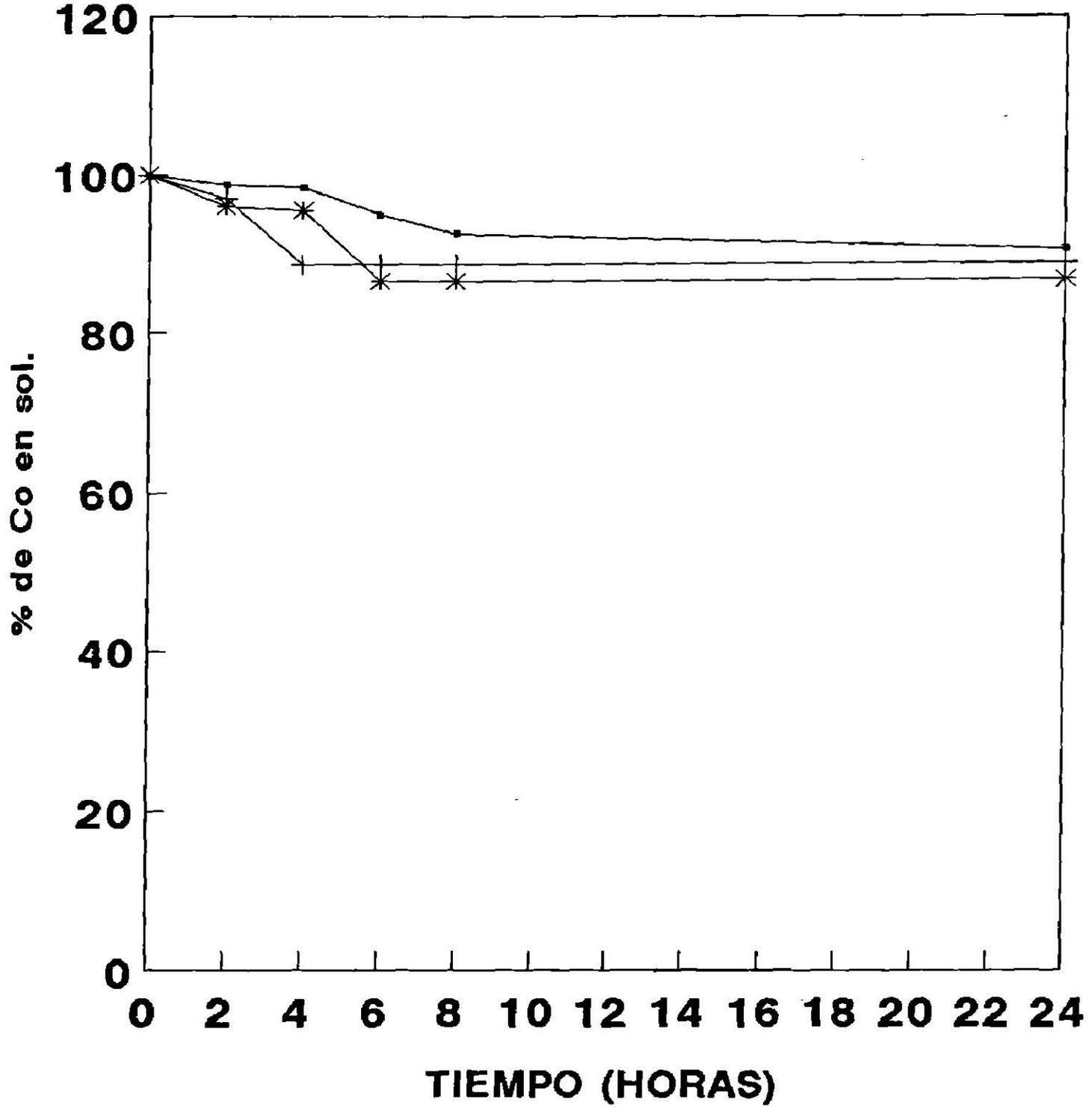
—■— MUTANTE + SILVESTRE * QUITINA

Tabla No. 6.- PORCENTAJE DE BIOADSORCION DE FLUOR EN SOLUCION POR LAS TRES BIOMASAS CELULARES ESTUDIADAS (en 200 ml, con una concentración de 200 ppm, con 80 mg de biomasa, en agitación constante a 28°C).

PORCENTAJE DE BIOADSORCION DE FLUOR

TIEMPO (horas)	<u>Mucor rouxii</u> mutante	<u>Mucor rouxii</u> IM-80	Quitina
0	0	0	0
2	9.2	0	5.1
4	15.6	0	27.5
8	28.31	0	32.7
24	38.41	0	36.5

Fig. No. 6.- CINETICA DE BIOADSORCION DE COBALTO EN SOLUCION POR LAS TRES BIOMASAS CELULARES.



—•— MUTANTE —+— SILVESTRE —*— QUITINA

Tabla No. 7.- PORCENTAJE DE BIOADSORCION DE COBALTO EN SOLUCION POR LAS TRES BIOMASAS CELULARES ESTUDIADAS (en 200 ml con una concentración de 200 ppm, con 80 mg de biomasa, en agitación constante a 28°C).

PORCENTAJE DE BIOADSORCION DE COBALTO

TIEMPO (horas)	<u>Mucor rouxii</u> mutante	<u>Mucor rouxii</u> IM-80	Quitina
0	0	0	0
2	1.2	3.0	3.9
4	1.5	11.3	4.4
6	5.0	11.3	13.4
8	7.4	11.3	13.4
24	9.5	11.3	13.4

Tabla No. 8.- BIOADSORCION DE METALES PESADOS EN SOLUCION POR LAS TRES BIOMASAS CELULARES ESTUDIADAS (conc. inicial del metal=200 ppm. Biomasa=80 mg en 200 ml. 28°C.

METAL ANALIZADO	PORCENTAJE DE BIOADSORCION A LAS 24 HRS.		
	<u>M. rouxii</u> mutante	<u>M. rouxii</u> silvestre	Quitina
Plomo	96.2	91.5	91.5
Cadmio	57.7	5	10.5
Mercurio	53.6	4.5	9.6
Flúor	38.4	0	36.45
Cobalto	9.5	11.3	13.3
Arsénico	0	0	0
Zinc	0	0	0
Cobre	39	28	0

DISCUSION

En este trabajo, se probó la capacidad de captación de diferentes metales en solución que fueron: plomo, mercurio, zinc, arsénico, flúor, cobre, cobalto y cadmio, por 2 cepas de Mucor rouxii (la cepa silvestre IM-80, y una mutante del mismo hongo resistente a cobre y mercurio, obtenida por mutagénesis con nitrosoguanidina, encontrando que presentan diferentes porcentajes de bioadsorción. La cepa mutante y la quitina captan con moderada eficiencia flúor (38.4% y 36.45% respectivamente), mientras que la cepa silvestre IM-80 no tiene ningún porcentaje de captación. Estos datos son menores a lo reportado por Olivares Trejo (1994), Acosta y Cols., (1994), quienes reportan 46.7% y 49% de captación de flúor para Mucor rouxii-1 y Cladosporium sp., que son hongos ambientales resistentes a metales pesados.

Por otro lado, Las 3 biomásas celulares captaron muy poco cobalto (9.5% la cepa mutante, 11.3% la quitina y 13.3% la cepa silvestre), siendo mayores estos porcentajes a los reportados por Olivares Trejo (1994), quien reportó que el Cladosporium sp. capta muy poco cobalto (9%), pero menores en comparación con una cepa resistente a metales pesados de Mucor rouxii, la cual tiene una eficiencia de 46.7% (Acosta y cols., 1994).

Con respecto al cobre, la cepa mutante adsorbió 39% y la silvestre 28%, mientras que la quitina no presentó ningún porcentaje de captación. En la literatura se menciona una mayor eficiencia de captación de cobre por cepas tolerantes al mismo metal, aunque no se reportan porcentajes, debido a que fueron estudios citológicos (Chávez Marín y cols., 1993). Tobin y cols., (1984) reportan menor porcentaje de captación de cobre (13%) por la biomasa de Rhizopus arrhizus, así como Olivares Trejo (1994) para una mutante de Cladosporium sp. Por otra parte, Acosta y Cols., (1994) reportan porcentajes similares de bioadsorción a la cepa silvestre por una cepa mutante de Mucor rouxii (28%).

Con respecto al cadmio, la cepa mutante presentó muy buena eficiencia de captación (57% Martínez y Cols. 1994), mientras que la cepa silvestre y la quitina comercial tienen muy poca capacidad de captación (5% la silvestre y 10.5% la quitina), siendo similar a lo reportado por Olivares Trejo (1994) (5.2% Cladosporium sp. y 7.6% el Mucor rouxii-1).

Por otra parte, la cepa mutante capta eficientemente mercurio (53.6%), lo cual coincide con lo reportado por Tobin y cols., (1984) (49%) utilizando la biomasa de Rhizopus arrhizus, y con los reportes de Acosta y cols., (1994), quienes reportan 44% de bioadsorción para una cepa de M. rouxii-2 y 54% para Helminthosporium sp., mientras que la quitina y la cepa silvestre IM-80 tienen muy baja eficiencia de captación, (9.6% y 4.5%, respectivamente). Estos datos son similares a lo reportado por Olivares Trejo (1994) con la biomasa celular de Mucor rouxii-1 (6%), aunque este mismo autor no reporta captación de mercurio por Cladosporium sp.

El plomo fue el metal que se bioadsorbió más eficientemente de todos los analizados, pues las tres biomásas presentan porcentajes mayores de 90% (96.2% la cepa mutante y 91.5% la cepa silvestre IM-80 y la quitina comercial). Estos datos son mayores que los reportados en la literatura, entre los que se encuentran los de Tobin y Cols. 1984), quienes utilizaron la biomasa de Rhizopus arrhizus (25%) y los de García Martínez, 1993; Acosta y Cols., 1993 utilizando hongos contaminantes ambientales resistentes a metales pesados.

Los únicos metales que no fueron bioadsorbidos por las biomásas celulares obtenidas fueron el zinc y el arsénico, coincidiendo con lo reportado por Acosta y cols., (1993) utilizando hongos contaminantes ambientales resistentes a metales pesados, aunque son diferentes a lo reportado por diversos autores (Tada y Shizuo, 1984; Tobin y cols., 1984; Balistrieri y Murray, 1982; Acosta y cols., 1993) quienes reportan diferentes porcentajes de captación utilizando diversas biomásas celulares.

Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo, indican que las biomásas celulares estudiadas tienen diferentes porcentajes de captación de algunos iones metálicos en solución, lo cual coincide con lo reportado por Cervantes y Gutiérrez (1994), quienes reportan que dependiendo del tipo de hongo, así como la pureza de uno o varios de los componentes de la pared celular, y el utilizarlos sólo (sin ningún otro componente de la misma) influye considerablemente en la bioadsorción de diferentes metales.

CONCLUSIONES

- 1.- Las biomosas celulares estudiadas presentan diferentes porcentajes de captación de los diversos hongos estudiados.
- 2.- La biomasa más eficiente fue la de la cepa mutante de Mucor rouxii, resistente a cobre y mercurio, y la menos eficiente la de la cepa silvestre IM-80.
- 3.- El plomo fue el metal que se bioadsorbió más eficientemente por las 3 biomosas celulares.
- 4.- El único metal que fue captado más eficientemente por la quitina comercial con respecto a las otras 2 biomosas analizadas fue el cobalto.
- 5.- La biomasa celular de la cepa mutante no captó zinc, ni arsénico, la de la cepa silvestre no captó flúor, arsénico y zinc, mientras que la quitina comercial no bioadsorbió arsénico, zinc y cobre.
- 6.- Estas biomosas celulares se pueden utilizar como filtros biológicos para la descontaminación de aguas residuales contaminadas con metales pesados, sobre todo de plomo, cadmio, mercurio, cobre y flúor.

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

- Acosta Rodríguez, I. 1984. Purificación y propiedades de la quitina sintetasa quitosomal de la fase micelial del hongo Mucor rouxii. Tesis Maestría. Instituto de Investigación en Biología Experimental. Fac. de Química. Universidad de Guanajuato.
- 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. *Biotecnología*. Vol. 3. No. 3 y 4. pp AM 1-AM 7.
- 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.
- Acosta, I., Martínez Cadena, M.G., López Romero, E., González, C. and Ruiz Herrera, J. 1987. Stabilization of chitin synthetase and purification of chitosomes from several mycelial Mucorales. *Antonie Van Leeuwenhoek*. Vol. 153. pp 171-181.
- Acosta Rodríguez, I. y Martínez Juárez, V. 1993. Bioadsorción de metales pesados por la fase micelial del hongo Mucor rouxii. *Avances en Ingeniería Química 1992*. AMIDIQ. pp 14-16.
- Albert, L.A. 1985. Curso básico de toxicología ambiental. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud. OMS, OPS, INIREB. pp 73-97.
- Asha V. Handbook of Atomic Absorption Analysis. 1987. Vol. 1. CRC Press, Inc. pp 7-14.
- Balistrieri, 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.
- Bartnicki García, S. 1968. Chemistry of fungal cell wall. *Ann. Review of Microbiology*. Vol. 22. pp 13-26.
- 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.
- Brierley, J.A. 1983. Biological accumulation of some heavy metals-biotechnological applications. P. Westbroek and E. De Jons. (eds)). *Biominalization and Biological Metal Accumulation*. D. Reidel Publishing Company. pp 499-509.
- Cervantes, C. and Gutiérrez Corona, F. 1994. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS Microbiology Reviews*. Vol. 14. pp 121-138.

- Cervantes, C. y Vaca, S. 1992. Resistencia bacteriana a los metales pesados tóxicos. Ciencia y Desarrollo. CONACYT. Vol. XVII. No. 122. pp 86-96.
- Charlot, G. 1976. Análisis cualitativo rápido de cationes y aniones. 2a. Ed. Alhambra. pp 568-573.
- 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.
- 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.
- Cortés Penagos y Cols., 1993. Mecanismos de resistencia a metales pesados en Trichoderma sp. Biotecnología. Vol. 3 y 4. pp AM 214-AM 223.
- 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.
- Davis, J.W. 1984. Complexation of trace metals by adsorbed natural organic matter. Geochimica et Cosmochimica Acta. Vol. 48. pp 679-691.
- Díaz Barriga, F., 1991. Principios de la toxicidad del cadmio. Ciencia y Desarrollo. CONACYT. Vol. XVII. No. 98. pp 61-68.
- Díaz Barriga, F. Yañez, L., Carrizales, L. Mejía, J.J., Batres, L. y Ramos, O. 1994. Algunos mecanismos de la toxicidad de los metales pesados. En: La importancia biológica de los iones inorgánicos. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. pp 94-102.
- Dreisbach, R. y Robertson, S. 1987. Toxicología Básica. Méndez Cervantes Editores. pp 73-99.
- 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.
- Horikoshi, T., Nakajima, A. and Sakaguchi, T. 1981. Metal sequestering by Chlorella vulgaris. Agric. Biol. Chem. Vol. 45. pp 781-783.
- Hoyle, B. and Beveridge, T.J. 1984. Metal binding by Escherichia coli K-12. Can. J. Microbiol. Vol. 30. pp 204-211.

- Martínez Juárez, V.M. 1991. Bioadsorción de metales pesados por la fase micelial del hongo Mucor rouxii. Tesis Licenciatura. Q.F.B. Facultad de Ciencias Químicas. UASLP.
- 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.
- Mullen, M.D., Wolf, D.C., Ferris, F.G., Beveridge, T.J., Fleming, C.A. and Bailey, G.W. 1989. Bacterial sorption of heavy metals. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 55 No. 12. pp 3143-3149.
- 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. Químico Farmacobiólogo. Fac. de Ciencias Químicas. UASLP. En prensa.
- 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.
- Salas, M.C. y Siller, F.R. 1989. Detección de tóxicos en aguas residuales. Tesis Licenciatura. Q.F.B. Fac. de Ciencias Químicas. UASLP.
- 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.
- Tada, F. and Suzuki, S. 1982. Adsorption and desorption of heavy metals in bottom mud of urban rivers. Water Res. Vol. 16. pp 1489-1494.
- Tobin, J.M. and Bohumil, V. 1981. Biosorption of uranium and thorium. Biotechnology and Bioengineering. Vol. XXIII. pp 583-604.
- 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.
- Tornabene, T.G. and Edwards, H.W. 1972. Metal sequestering capabilities by Azotobacter spp. Science. Vol. 176. pp 1334-1335.
- Tzesos, M. and Bohumil, V. 1981. Biosorption of Uranium and Thorium. Biotechnology and Bioengineering. Vol. XXIII. pp 583-604.
- Tzesos, M. and Volesky, B. 1982. The mechanism of thorium biosorption by Rhizopus arrhizus. Biotechnology and Bioengineering. Vol. XXIV. pp 955-969.
- Venkateswerlu, G. and Stotsky. 1986. Copper and cobalt alter the cell wall composition on Cunninghamella blakesleana. Can. J. Microbiol. Vol. 32. pp 654-662.

--- Volesky, B. 1987. Biosorbents for metal recovery. Elsevier Publications. Cambridge. pp 96-101.

--- Walker, S.G., Flemming, C.A., Ferris, F.G., Beveridge, T.J. and Bailey, G.W. 1989. Physicochemical interaction of Escherichia coli cell envelopes and Bacillus subtilis cell walls with two clays and ability of the composite to immobilize heavy metals from solution. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 55 No. 11. pp 2976-2983.

