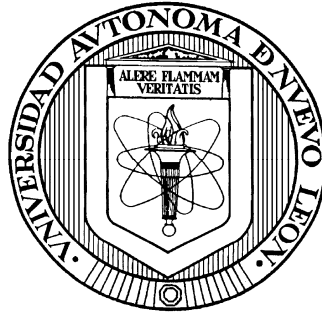


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN REACTOR EN COLUMNA A ESCALA BENCH
PARA LA REMOCIÓN DE METALES PESADOS UTILIZANDO LA PROTEÍNA
QUIMÉRICA METALOTIONEÍNA-TIOREDOXINA**

Por

VERONICA ALMAGUER CANTU

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Biotecnología

Abril, 2011

**DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN REACTOR EN COLUMNA A ESCALA
BENCH PARA LA REMOCIÓN DE METALES PESADOS UTILIZANDO
LA PROTEÍNA QUIMÉRICA METALOTIONEÍNA-TIOREDOXINA**

Aprobación de la Tesis:

Dra. Lilia H. Morales Ramos
Presidenta

Dra. Katiushka Arévalo Niño
Secretaria

Dra. Ma. Del Socorro Flores González
Vocal 1

Dr. Benito Pereyra Alférez
Vocal 2

Dr. Isaías Balderas Rentería
Asesor Externo

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1 INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	5
2.1 Contaminación Ambiental	6
2.1.1 Metales Pesados	6
2.1.1.1 Plomo (Pb).	9
2.1.1.2 Cadmio (Cd).	12
2.1.1.3 Legislación Ambiental Mexicana.	13
2.1.1.4 Legislación Ambiental Internacional.	14
2.2 Biosorción	16
2.2.1 Mecanismos de Biosorción	16
2.2.2 Factores que afectan la Biosorción	17
2.2.3 Evaluación Cuantitativa de la Capacidad de Biosorción.	18
2.2.3.1 Isotermas de Adsorción.	19
2.3 Metalotioneínas	21
2.3.1 Estructura y clasificación	22
2.3.2 Enlace a metales	24
2.3.3 Expresión de Proteínas Recombinantes	26

2.3.3.1	<i>Escherichia coli</i>	27
2.3.3.2	Vector	29
2.3.3.3	Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	30
2.3.3.4	Diseño de iniciadores	31
2.3.3.5	Electroforesis en condiciones desnaturalizantes	32
2.4	Sistemas de Remoción de Metales	33
2.4.1	Inmovilización	33
2.4.2	Ecuación General de Balance de Masa	34
2.4.3	Reactor tipo Batch	35
2.4.4	Reactor en Columna de Lecho Fijo	36
3	JUSTIFICACIÓN	38
3.1	Definición del Problema	39
3.2	Hipótesis	40
4	OBJETIVO	41
4.1	Objetivo General	42
4.2	Objetivos Particulares	42
5	MÉTODOS	44
5.1	Ubicación	45
5.2	Métodos	45
5.2.1	Extracción de ARN del tejido hepático	45

5.2.2	Obtención de ADNc.	47
5.2.3	Amplificación del gen de la Metalotioneína I.	47
5.2.4	Digestión con Endonucleasas de restricción <i>Xba I</i> y <i>Kpn I</i>	49
5.2.5	Construcción del vector recombinante que codifica para la proteína de fusión <i>Mt-Thio</i>	51
5.2.6	Transformación bacteriana	52
5.2.7	Caracterización de las clonas recombinantes	52
5.2.8	Optimización de la expresión de la proteína Metalotioneína-Tiorredoxina en la clona recombinante.	53
5.2.8.1	Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	54
5.2.8.2	Ensayos de Remoción de Cadmio y Plomo	55
5.2.9	Cinéticas de Remoción de Metales con Biomasa Libre	56
5.2.10	Pruebas de remoción con agentes de inmovilización.	57
5.2.11	Isotermas de adsorción con biomasa inmovilizada	59
5.2.12	Cinéticas de Adsorción en Columna	60
5.2.12.1	Construcción del reactor en columna de lecho fijo	60
5.2.12.2	Operación de la columna en estado no estacionario	60
5.2.12.3	Modelo matemático de la difusión y modelo de sorción en la columna lecho fijo	62
6	RESULTADOS Y DISCUSIONES	71
6.1	Extracción de ARN del tejido hepático	72
6.2	Obtención de ADNc.	

6.3	Amplificación del gen de la Metalotioneína I.	73
6.4	Digestión con Endonucleasas de restricción <i>Xba I</i> y <i>Kpn I</i>	
6.5	Construcción del vector recombinante que codifica para la proteína de fusión <i>Mt-Thio</i>	75
6.6	Transformación bacteriana	76
6.7	Caracterización de las clonas recombinantes	76
6.7.1	Curva de crecimiento bacteriano	77
6.7.2	Detección de la proteína de fusión mediante SDS-PAGE	79
6.8	Optimización de la expresión de la proteína Metalotioneína-Tiorredoxina en la clona recombinante.	80
6.8.1	Cuantificación por Bradford (Proteínas Totales)	80
6.8.2	Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	83
6.8.3	Ensayos de Remoción de Cadmio y Plomo	84
6.9	Cinéticas de Remoción de Metales con Biomasa Libre	87
6.10	Pruebas de remoción con agentes de inmovilización.	90
6.11	Isotermas de adsorción con biomasa inmovilizada	92
6.12	Cinéticas de Adsorción en Columna	98
6.12.1	Construcción y Operación del reactor en columna de lecho fijo	98
6.12.2	Modelo matemático de la difusión y modelo de sorción en la columna lecho fijo	102
7	CONCLUSIONES	113
8	RECOMENDACIONES	117

9 BIBLIOGRAFÍA	119
APÉNDICE I. Método Analítico para la Cuantificación de Plomo(II) y Cadmio(II) por Espectroscopia de Absorción Atómica	125
APÉNDICE II. Resultados de las Cinéticas de Remoción de Plomo(II) y Cadmio(II) en Columna a Diferentes Flujos Volumétricos	134
APÉNDICE III. Aporte Teórico-Práctico	137

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
2.1	NIVELES MÁXIMOS PERMISIBLES DE PLOMO EN DESCARGAS DE AGUAS RESIDUALES	11
2.2	NIVELES MÁXIMOS PERMISIBLES DE METALES PESADOS EN AGUAS DE USO CONTINUO SEGÚN LA US-EPA (1973) Y LAS NORMAS OFICIALES MEXICANAS	15
2.3	CRITERIOS PARA LA SELECCIÓN DE UN SISTEMA DE EXPRESIÓN DE PROTEINAS RECOMBINANTES	27
5.1	COMPOSICIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASAPARA LA AMPLIFICACIÓN DEL ADN _c	48
5.2	CONDICIONES DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL ADN _c	48
5.3	CONDICIONES DE DIGESTIÓN CON LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN <i>Xba I</i> Y <i>Kpn I</i>	49
5.4	COMPOSICIÓN DE LA REACCIÓN DE LIGACIÓN	51
5.5	DISEÑO FACTORIAL 2 ³ PARA DETERMINAR CONDICIONES DE MÁXIMA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN.	53
5.6	COMPOSICIÓN DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA	55
5.7	CONDICIONES DE OPERACIÓN DE LAS COLUMNAS DE BIOSORCIÓN DE PLOMO (II) Y CADMIO (II)	61
6.1	VALORES DE LAS LECTURAS DE ABSORBANCIA DURANTE LA CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANA DE <i>E. coli</i> TOP 10 Y LA CLONA RECOMBINANTE <i>pMt-Thio</i>	78
6.2	CONCENTRACIÓN DE PROTEINAS TOTALES OBTENIDAS EN EL DISEÑO FACTORIAL 2 ³ PARA DETERMINAR CONDICIONES DE MÁXIMA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN.	81
6.3	ANÁLISIS DE LOS EFECTOS PRESENTADOS POR LOS FACTORES Y SUS INTERACCIONES EN LAS DIFERENTES CONDICIONES PARA LA	81

CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS TOTALES.

- 6.4 RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE REMOCIÓN DE CADMIO (II) USANDO *E. coli* TOP 10 Y *pMt-Thio* CON Y SIN INDUCCIÓN. CONDICIONES 100 rpm, 30°C, [IPTG] 0.13 mM, pH 5. 85
- 6.5 RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE REMOCIÓN DE PLOMO (II) USANDO *E. coli* TOP 10 Y *pMt-Thio* CON Y SIN INDUCCIÓN. CONDICIONES 100 rpm, 30°C, [IPTG] 0.13 mM, pH 5. 86
- 6.6 RESULTADOS DE LAS CINÉTICAS DE REMOCIÓN DE CADMIO (II) UTILIZANDO *E. coli* TOP 10 Y *pMt-Thio* CON INDUCCIÓN ACTIVAS E INACTIVAS. CONDICIONES 100 rpm, 30°C, [IPTG] 0.13 mM, pH 5. 88
- 6.7 RESULTADOS DE LAS CINÉTICAS DE REMOCIÓN DE PLOMO (II) UTILIZANDO *E. coli* TOP 10 Y *pMt-Thio* CON INDUCCIÓN ACTIVAS E INACTIVAS. CONDICIONES 100 rpm, 30°C, [IPTG] 0.13 mM, pH 5. 88
- 6.8 RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS DE ADSORCIÓN DE PLOMO(II) EN LA BIOMASA DE *pMt-Thio* INMOVILIZADA EN ALGINATO DE CALCIO. 92
- 6.9 RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS DE ADSORCIÓN DE CADMIO(II) EN LA BIOMASA DE *pMt-Thio* INMOVILIZADA EN ALGINATO DE CALCIO. 93
- 6.10 ECUACIONES DE LOS MODELOS DE ISOTERMAS DE ADSORCIÓN Y SUS PARÁMETROS CORRESPONDIENTES PARA LA BIOADSORCIÓN DE PLOMO(II) EN LA BIOMASA DE *pMt-Thio* INMOVILIZADA EN ALGINATO DE CALCIO. 95
- 6.11 ECUACIONES DE LOS MODELOS DE ISOTERMAS DE ADSORCIÓN Y SUS PARÁMETROS CORRESPONDIENTES PARA LA BIOADSORCIÓN DE CADMIO (II) EN LA BIOMASA DE *pMt-Thio* INMOVILIZADA EN ALGINATO DE CALCIO. 97
- 6.12 CONDICIONES DE OPERACIÓN PARA LAS CORRIDAS EXPERIMENTALES EN LAS COLUMNAS DE LECHO FIJO 99
- 6.13 CARACTERÍSTICAS ELECTROQUÍMICAS DE LAS SOLUCIONES DE NITRATO DE PLOMO (II) Y CADMIO (II). 103
- 6.14 COMPARACIÓN DE VELOCIDAD DE FLUJO, TIEMPO DE RESIDENCIA, NÚMERO DE REYNOLDS, COEFICIENTE DE TRANSFERENCIA DE MASA Y VELOCIDAD DE ADSORCIÓN EXPERIMENTAL PARA PLOMO (II) Y CADMIO (II) ($C_0 \sim 100$ mg/L, TEMPERATURA 25°C Y pH 5). 104
- 6.15 VALORES DE LAS CONSTANTES DE VELOCIDAD DE REMOCIÓN (k_{adi}) Y LA CONSTANTE DE REMOCIÓN (K) PARA PLOMO Y CADMIO. 105

- 6.16 COMPARACIÓN DEL COEFICIENTE DE TRANSFERENCIA DE MASA, LA CONSTANTE DE VELOCIDAD DE ADSORCIÓN, COEFICIENTE DE TRANSFERENCIA DE MASA INTRAPARTICULAR Y LA CONSTANTE DE VELOCIDAD GLOBAL CON DIFERENTES VELOCIDADES DE FLUJO DE LA SOLUCIÓN DE CADMIO (II) ($C_0 \sim 100$ mg/L, TEMPERATURA 25°C, y pH 5) 109
- 6.17 COMPARACIÓN DEL COEFICIENTE DE TRANSFERENCIA DE MASA, LA CONSTANTE DE VELOCIDAD DE ADSORCIÓN, COEFICIENTE DE TRANSFERENCIA DE MASA INTRAPARTICULAR Y LA CONSTANTE DE VELOCIDAD GLOBAL CON DIFERENTES VELOCIDADES DE FLUJO DE LA SOLUCIÓN DE PLOMO (II) ($C_0 \sim 100$ mg/L, TEMPERATURA 25°C, y pH 5) 109
- 6.18 COMPARACIÓN LOS PORCENTAJES DE REMOCIÓN DE PLOMO (II) Y CADMIO (II) OBTENIDOS EN LOS EXPERIMENTOS DE REMOCIÓN EN COLUMNA DE LECHO FIJO EMPACADA CON *pMt-Thio* INMOVILIZADA EN ALGINATO DE CALCIO. (TEMPERATURA 25°C, y pH 5.0) 111

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
2.1	Unión del zinc a las MTs de mamíferos en su dominio beta y en el alfa	25
2.2	Mapa del plásmido pThioHis	29
2.3	Balance de masa en un proceso de biosorción de metales	34
2.4	Reactor tipo Batch	35
2.5	Columna de bioadsorción de lecho fijo: a) curva de efluente típica; b) representación esquemática del reactor.	37
5.1	Extracción del tejido hepático del ratón previamente intoxicado con Cd(NO ₃) ₂ 0.1M	46
5.2	Descripción esquemática de la construcción del vector de expresión que codifica para la proteína de fusión <i>Thio-Mt</i>	50
5.3	a) Preparación de la suspensión biomasa: alginato en relación 1:1, b) solidificación del biosorbente en CaCl ₂ 0.1M, pH~7, 25°C. c) <i>pMt-Thio</i> inmovilizada en alginato de calcio, ø 0.5 cm.	58
5.4	Construcción del reactor en columna de lecho fijo que opera en estado no estacionario.	61
5.5	Operación de la columna en estado no estacionario	62
6.1	Hígado obtenido del ratón intoxicado con la solución de Cd/Hg	72
6.2	Electroforesis en gel de agarosa para comprobar la pureza e integridad del ARN extraído a partir de tejido hepático y renal de ratón.	73
6.3	Electroforesis en gel de agarosa con gradiente de temperatura que muestra el producto amplificado por PCR correspondiente al gen de la MT1 de ratón. Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2; 53°C, carril 3; 55°C, carril 4; blanco, carril 5; 57°C, carril 6; 58°C, carril 7; 59°C.	74
6.4	Electroforesis en gel de agarosa al 1% que muestra la clonación del gen de la MT I en el plásmido <i>pThio-His A</i> . En el carril 1 se presenta el marcador de peso molecular, en el carril 2, el vector recombinante con el inserto <i>pMt-Thio</i> digerida con las enzimas <i>Kpn I</i> y <i>Xba I</i> para liberar el inserto y observar su tamaño.	75

6.5	Crecimiento de clonas recombinantes en medio LB adicionado con ampicilina, incubado a 37 °C en posición invertida durante 16 h	76
6.6	Electroforesis en gel de agarosa de la digestión con <i>Kpn I</i> y <i>Xba I</i> del ADN plasmídico de a) siete colonias positivas a la transformación; b) comprobación de las colonias 2, 3 y 7.	77
6.7	Curva de crecimiento de <i>E. coli</i> TOP 10 y la cepa modificada <i>pMt-Thio</i> a la cual se indujo a la expresión de la proteína recombinante con IPTG. Condiciones: 150 rpm, 35°C, 0.25 mM IPTG.	78
6.8	Cinética de expresión de la proteína de fusión durante 24 h de crecimiento después de la inducción con IPTG. Condiciones: 150 rpm, 35°C, 0.25 mM IPTG, gel de poliacrilamida al 12% y tinción con azul de Coomassie	79
6.9	Curva de calibración de BSA para la cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford.	82
6.10	Diagrama de Pareto para la mitad de los efectos $ \Delta / 2 $ producidos en la expresión de proteínas totales.	82
6.11	Localización de la proteína de fusión <i>Mt-Thio</i> en geles de poliacrilamida al 12% a) espacio periplásmico, b) fracción citoplasmática. Las muestras fueron colectadas con 2 h de incubación después de la inducción.	83
6.12	Porcentajes de remoción de cadmio (II) utilizando <i>E. coli</i> TOP 10 como control y <i>pMt-Thio</i> con y sin inducción. Concentración de IPTG: 0.130 mM	85
6.13	Porcentajes de remoción de plomo (II) utilizando <i>E. coli</i> TOP 10 como control y <i>pMt-Thio</i> con y sin inducción. Concentración de IPTG: 0.130 mM	86
6.14	Ajuste al modelo de la cinética de segundo orden de los datos obtenidos de la cinética de sorción de cadmio (II) con la biomasa de <i>pMt-Thio</i> activa (Exp 1) e inactiva (Exp 2).	89
6.15	Ajuste al modelo de la cinética de segundo orden de los datos obtenidos de la cinética de sorción de plomo (II) con la biomasa de <i>pMt-Thio</i> activa (Exp 1) e inactiva (Exp 2).	89
6.16	Porcentajes de remoción de plomo (II) y cadmio (II) utilizando 0.1 g de alginato de calcio al 3%, Agarosa al 3% y Agar-Agar al 3% en contacto con una solución de 100 mg/L de metal, a 25°C y pH 5 durante 24 h.	91
6.17	Porcentajes de remoción de plomo (II) y cadmio (II) utilizando la biomasa de <i>pMt-Thio</i> libre e inmovilizada en alginato de calcio al 3%, una solución metálica de 100 mg/L de metal, a 25°C y pH 5 durante 24 h.	91

6.18	Gráfica de la ecuación lineal del modelo de Freundlich para la isoterma de la adsorción de plomo (II) por la biomasa de <i>pMt-Thio</i> inmovilizada en alginato de calcio. pH 5, Temperatura 25 °C.	96
6.19	Gráfica de la ecuación lineal del modelo de Langmuir para la isoterma de la adsorción de plomo (II) por la biomasa de <i>pMt-Thio</i> inmovilizada en alginato de calcio. pH 5, Temperatura 25 °C.	96
6.20	Gráfica de la ecuación lineal del modelo de Freundlich para la isoterma de la adsorción de cadmio (II) por la biomasa de <i>pMt-Thio</i> inmovilizada en alginato de calcio. pH 5, Temperatura 25 °C.	98
6.21	Gráfica de la ecuación lineal del modelo de Langmuir para la isoterma de la adsorción de cadmio (II) por la biomasa de <i>pMt-Thio</i> inmovilizada en alginato de calcio. pH 5, Temperatura 25 °C.	98
6.22	Concentración de plomo (II) a la salida de la columna de lecho fijo en función del tiempo (Temperatura 25°C, pH~5).	100
6.23	Concentración de cadmio (II) a la salida de la columna de lecho fijo en función del tiempo. (Temperatura 25°C, pH~5).	101
6.24	Influencia del N_{Re} sobre el coeficiente de transferencia de masa (k_e)	104
6.25	Influencia del flujo sobre la velocidad de de remoción experimental debida a la adsorción en superficie y la difusión intraparticular (r_{aide})	105
6.26	Grafica de $\ln(C_o/C)$ vs. C_o-C para determinar la constante de remoción k_{adi} y K ; a) plomo y b) cadmio	106
6.27	Efecto de la concentración inicial de a) cadmio (II) y b) plomo (II) en la cinética de bioadsorción utilizando <i>pMt-Thio</i> inmovilizada en alginato de calcio. Condiciones: ~0.0638 g de biosorbente, Temperatura 25 °C, pH 5.	107
6.28	Ajuste gráfico de $-\ln \left[1 - \left(\frac{C_{ob}-C_b}{C_{ob}-C_{eb}} \right)^2 \right]$ vs. t (tiempo) para la obtención de la difusión intraparticular; a) cadmio (II) y b) plomo (II).	108

RESUMEN

Verónica Almaguer Cantú

Fecha de Graduación: Abril, 2011

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Biológicas

Título del Estudio: DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN REACTOR EN COLUMNA A ESCALA BENCH PARA LA REMOCIÓN DE METALES PESADOS UTILIZANDO LA PROTEÍNA QUIMÉRICA METALOTIONEÍNA-TIOREDOXINA

Número de páginas: 150

Candidato para el grado de Doctor en Ciencias con especialidad en Biotecnología

Área de Estudio: Biotecnología Ambiental

Propósito y Método del Estudio: Los metales pesados cadmio y plomo han sido reconocidos como muy tóxicos por su efecto en el medio ambiente. El conocimiento de los efectos toxicológicos de estos metales obliga a removerlos de las aguas residuales antes ser descargadas en efluentes municipales. Siendo Nuevo León un estado altamente industrializado no escapa de esta realidad. La bioadsorción ofrece una técnica potencialmente aplicable y de bajo costo para la remoción y recuperación de metales pesados en disolución, por lo cual en esta investigación se planteó el análisis de diversos factores, como la construcción de isothermas de adsorción y la operación de un biorreactor a escala bench para estudiar el poder de sorción que presenta la biomasa de *E. coli* modificada genéticamente para la producción de la proteína de fusión Metalotioneína-tiorredoxina, inmovilizada en alginato de calcio

Contribuciones y Conclusiones: En la parte experimental se planteó un análisis de las condiciones que favorecen al biosorción de ambos metales encontrando que utilizando la biomasa de la cepa modificada de forma inactiva existe mayor porcentaje de remoción y una vez inmovilizada se pudieron efectuar los análisis de determinación cuantitativa de la sorción de ambos metales. Al realizar las isothermas de adsorción, refieren que el proceso de lleva a cabo a través de una difusión hacia el interior del biosorbente y no en superficie. En la operación de las columnas de lecho fijo se determinaron los parámetros adimensionales de escalamiento del reactor los coeficientes de transferencia de masa para cada una de las corridas experimentales resolviendo las ecuaciones de continuidad de una columna de lecho fijo de material biosorbente esférico y poroso

FIRMA DEL ASESOR:

Dra. Lilia H. Morales Ramos

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Los metales pesados cadmio y plomo son los que poseen un mayor potencial de riesgo para los humanos y el medio ambiente. Estos metales han sido ampliamente reconocidos como muy tóxicos por su efecto en el medio ambiente, donde se acumulan en la cadena alimenticia.

Las diversas actividades industriales dedicadas al uso y/o manejo de metales pesados, han llevado por consecuencia la multiplicación de los casos de contaminación en aguas residuales, lo que con frecuencia complica la capacidad de autolimpieza del ecosistema receptor, dando por resultado la acumulación de éstos a niveles problemáticos.

La principal vía antropogénica por la cual el cadmio entra en el ambiente es a través de los residuos industriales de procesos como la manufactura de plásticos, la minería, la fabricación de pigmentos, la manufactura de baterías plata-cadmio, la preparación de aleaciones, y los procesos metalúrgicos. Dosis elevadas de cadmio en los humanos pueden resultar en anemia. La mayor parte de las descargas de plomo al medio ambiente proceden de la fabricación de baterías de plomo-ácido sulfúrico, la fundición, y la manufactura de tableros electrónicos. Cantidades excesivas de plomo en el cuerpo humano pueden causar hipertensión y daño cerebral. El conocimiento de

los efectos toxicológicos de estos metales obliga a removerlos de las aguas residuales antes ser descargadas en aguas municipales.

Siendo Nuevo León un estado altamente industrializado no escapa de esta realidad. Nuestro estado se encuentra dentro de las tres entidades en el país de mayor contaminación con plomo, junto con el Estado de México y Coahuila.

En el área Metropolitana de la ciudad de Monterrey, existen una decena de fábricas de pintura, entre 45 y 50 empresas recuperadoras de plomo, así como las principales empresas metalúrgicas del país y se han detectado por lo menos 15 basureros de metales pesados que son ilegales (Alanís, 1999).

De igual forma el cadmio es uno de los principales metales utilizados en diversos procesos de la industria en el Área Metropolitana de Monterrey, tal es el caso de las industrias que se dedican a la fabricación de baterías de Ni-Cd, o donde es utilizado como reactivo químico.

Las aguas residuales generadas de los diferentes procesos que involucran metales pesados, reciben tratamientos fisicoquímicos, para reducir a niveles permisibles de descarga el contenido de metales en las mismas; dichos tratamientos llegan a ser muy complejos y a su vez costosos.

La biorremoción ofrece una técnica potencialmente aplicable y de bajo costo para la remoción y recuperación de metales pesados en disolución (Vullo, 2003).

La aplicación industrial de la biorremoción ha estado dirigida principalmente hacia los sistemas microbianos. Los microorganismos tales como bacterias, hongos y levaduras pueden incorporar y acumular metales pesados y compuestos organometálicos de su medio externo con alta eficiencia donde se involucran diversos mecanismos relacionados a su composición química.

De igual forma la producción de proteínas y secuencias peptídicas situadas en la membrana y paredes celulares de algunos microorganismos tolerantes a metales pesados incrementan la capacidad de estos para unir metales pesados en su superficie.

Por tal motivo en este trabajo de investigación se estudio el proceso de biosorción de cadmio(II) y plomo(II) a partir de muestras sintéticas en un bioreactor consistente en una columna de lecho fijo con biomasa de *E. coli* modificada genéticamente con el gen de la proteína quimérica metalotioneína–tioredoxina inmovilizada a escala Bench.

CAPÍTULO 2
ANTECEDENTES

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Contaminación Ambiental

La constante expansión de la actividad industrial cuyo fin es satisfacer las necesidades humanas va de la mano con el aumento de la cantidad de contaminantes que son desechados día a día. Esta acumulación de desechos, principalmente en áreas urbanas, genera la dispersión de gran variedad de compuestos en suelos, aguas superficiales y aire, con la filtración de los mismos hacia las aguas subterráneas. Si bien la mayoría de los contaminantes altamente dañinos tienen características orgánicas son los inorgánicos los que despiertan mayor interés debido a su nula posibilidad de ser degradados por mecanismos naturales. En este ámbito los metales pesados representan un problema de contaminación ambiental grave ya que estos se encuentran en forma de sales disueltos en agua lo cual afecta severamente los ecosistemas acuáticos.

2.1.1 Metales Pesados

Los metales pesados son elementos tóxicos para el ser humano ya que son capaces de causar efectos indeseables en el metabolismo, originando enfermedades graves e

incapacitantes que pueden incluso causar la muerte, sin embargo, es importante mencionar que la toxicidad de un metal depende de la dosis en que sea ingerido así como de la capacidad de excreción del mismo. La presencia de estos metales pesados en los alimentos tiene su origen en las distintas fases de la cadena alimentaria, desde el cultivo hasta el procesamiento y la distribución, por ejemplo el mercurio tiene su origen en la utilización de alquilvercurio en agricultura para evitar el crecimiento de hongos; este metal pasa a la cadena alimentaria acumulándose en los tejidos adiposos de peces y herbívoros. Otro claro ejemplo es la contaminación por cadmio donde la principal fuente de contaminación es el uso de fertilizantes a base de roca fosfórica, de forma similar a lo que ocurre con el arsénico, que además es utilizado en diversos plaguicidas. Otros metales pesados tóxicos que presentan la misma problemática son cobre, plomo, níquel y zinc.

Los efectos de los metales sobre el funcionamiento de los ecosistemas varían considerablemente y son de importancia económica y de salud pública debido a que entre los mecanismos moleculares que determinan la toxicidad de los metales pesados se encuentran:

1. El desplazamiento de iones metálicos esenciales de biomoléculas y bloqueo de sus grupos funcionales,
2. Modificación de la conformación activa de biomoléculas, especialmente enzimas y polinucleótidos,
3. Ruptura de la integridad de biomoléculas.
4. Modificación de otros agentes biológicamente activos. (Cols *et.al.*, 2001).

Si bien algunos metales pesados son indispensables en bajas concentraciones, ya que forman parte de sistemas enzimáticos (Fergusson, 1990), muchos de ellos son esenciales para el crecimiento como el sodio, potasio, magnesio, calcio, vanadio, manganeso, fierro, cobalto, níquel, cobre, zinc y molibdeno. Sin embargo su fisiología presenta una particularidad: su deficiencia causa enfermedades, su exceso intoxicaciones. Se ha reportado que tienen efectos tóxicos sobre las células, principalmente como resultado de su capacidad para alterar o desnaturalizar las proteínas. (Cañizares, 2000). Sus mecanismos de incorporación en el ser humano son principalmente dos vías: por medio de los alimentos o como partículas que se respiran y se van acumulando en el organismo, hasta llegar a límites de toxicidad. Si la incorporación es lenta se producen intoxicaciones crónicas, que dañan los tejidos u órganos en los que se acumulan. (Fergusson, 1990.)

Su entrada a los ecosistemas está ligada al desarrollo tecnológico, el consumo masivo e indiscriminado y la producción de desechos principalmente urbanos, esto ha provocado la presencia de los metales pesados en cantidades importantes en el ambiente, provocando numerosos efectos sobre la salud y el equilibrio de los ecosistemas. (Fergusson, 1990.)

Los metales presentan particular movilidad en los ecosistemas acuáticos naturales y toxicidad en las formas superiores de vida. Es por esta particularidad que a los iones de metales pesados se les ha dado prioridad como los contaminantes inorgánicos más importantes en el ambiente. Aún cuando se encuentren presentes en cantidades bajas e indetectables, la recalcitrancia y consiguiente persistencia de los metales pesados en cuerpos de agua, implica que a través de procesos naturales como la biomagnificación, su concentración puede llegar a ser tan elevada que empiece a ser tóxica. Los metales

pesados pueden ser detectados ya sea en su estado elemental, lo que implica que no sufren modificaciones, o enlazados en varios complejos con sales. De cualquier manera, los iones metálicos no pueden ser mineralizados. (Atkinson *et al.*, 1998)

Los metales tienen aplicación directa en numerosos procesos de producción de bienes y servicios. Los más importantes son: arsénico, cadmio, cobalto, cromo, cobre, mercurio, níquel, plomo, estaño y zinc. Dada la aplicación de los metales es importante conocer las propiedades, usos y efectos que causan sobre los seres vivos, por lo que a continuación se mencionan, específicamente del plomo, cadmio, níquel, cobre y zinc, dado que son los metales de interés para el presente estudio.

2.1.1.1. Plomo (Pb).

El plomo es un sólido metálico, relativamente poco abundante en la corteza terrestre ($13 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), de color gris, blando, pesado y dúctil. Su presencia en el ambiente se debe principalmente a actividades antropogénicas como la industria, fundición y al uso que se le dio como detonante en las gasolinas. Tiene numerosas aplicaciones, pero en la actualidad su consumo está sufriendo un retroceso debido a que está siendo reemplazado en algunos de sus mercados tradicionales, por materiales plásticos de menor costo, mayor vida útil y, sobre todo, inertes (ej. Cañerías). Entre sus usos más extendidos, se pueden mencionar: conductos para líquidos (aguas, ácidos, etc.), antidetonante en naftas, en la obtención de ácido sulfúrico, como base de pinturas y aleaciones, como aislante de radiaciones, acumuladores.

Este elemento es altamente tóxico; se absorbe en forma acumulativa por vía percutánea, respiratoria y digestiva, afectando principalmente los sistemas nervioso y renal; la enfermedad a la que conduce la acumulación de plomo en el organismo se conoce como saturnismo. Su eliminación resulta compleja y lenta y sólo es posible cuando los niveles de absorción son bajos debido a lo cual, el mejor tratamiento es el preventivo. (Ferguson, 1990).

La biodisponibilidad del plomo en los suelos depende de la composición de éstos, de su acidez, de las especies de plomo presentes en ellos y de otros factores. Se sabe que las plantas pueden incorporarlo a su organismo, al igual que el ganado que ingiere suelos contaminados junto con la hierba.

En México han sido reportados casos de contaminación por este metal. En Torreón Coahuila en una colonia cercana a una importante industria fundidora se reportaron niveles de 40000 mg de $\text{Pb}\cdot\text{Kg}^{-1}$ de suelo. En el municipio de Marín Nuevo León, se encontró un suelo que anteriormente tuvo uso industrial, con 61140 mg de $\text{Pb}\cdot\text{Kg}^{-1}$ de suelo. En el municipio de Monterrey Nuevo León, en un parque público y un lote urbano se encontró un contenido de plomo de 492 y 764 mg de $\text{Pb}\cdot\text{Kg}^{-1}$ de suelo, respectivamente. (Rodríguez *et. al.*, 2006)

En Nuevo León según el Instituto Nacional de Ecología el plomo es el metal contaminante con mayor presencia en la región. Esto debido principalmente a las actividades propias de la región como son el caso de fundición, manufactura de pinturas, fabricación de acumuladores, etc.

La intoxicación en adultos ocurre a concentraciones superiores a los 80 $\mu\text{g}/100$ ml de sangre. La Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994 determina como limite permisible de plomo en agua para consumo humano la cifra de 0.025 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

Se han establecido diversas normas que fijan límites máximos permisibles de plomo en descargas de aguas residuales; en el ambiente laboral y en productos de consumo como pinturas, loza vidriada y alimentos. En México se han establecido los límites descritos a continuación (Ver TABLA 2.1).

TABLA 2.1

NIVELES MÁXIMOS PERMISIBLES DE PLOMO EN DESCARGAS DE AGUAS RESIDUALES

Fuente	Límites máximos	
	Promedio diario (mg·L ⁻¹)	Promedio instantáneo (mg·L ⁻¹)
Industrias de productos de vidrio prensado y soplado	0.6	0.7
Industrias del hierro y el acero	0.6	0.7
Industrias de acabados metálicos	0.6	0.7
Industrias de laminación, extrusión y estiraje de cobre y sus aleaciones	0.6	0.7
Industria, actividades agroindustriales, de servicios y el tratamiento de aguas residuales del drenaje y alcantarillado urbano o municipal	1.0	2.0
Disposición mediante riego agrícola de aguas residuales de origen urbano o municipal	5.0	---

Fuente: (Instituto Nacional de Ecología 1998).

2.1.1.2. Cadmio (Cd).

Es un metal dúctil, de color blanco plateado con un ligero matiz azulado. Es más blando y maleable que el zinc, pero poco más duro que el estaño.

El uso comercial importante del cadmio fue como cubierta electrodepositada sobre hierro o acero para protegerlos contra la corrosión. La segunda aplicación es en baterías de níquel-cadmio y la tercera como reactivo químico y pigmento.

Se recurre a cantidades apreciables en aleaciones de bajo punto de fusión como lo son aleaciones de latón (latón), soldaduras y cojinetes. Los compuestos de cadmio se emplean como estabilizadores de plásticos y en la producción de cadmio fosforado.

El cadmio se acumula en el organismo humano, fundamentalmente en los riñones, causando hipertensión arterial. La absorción pulmonar es mayor que la intestinal, por lo cual, el riesgo es mayor cuando el cadmio es aspirado. El cadmio ha sido asociado con la aparición de cáncer en animales de experimentación, así como con casos de cáncer de próstata en humanos. (Instituto Nacional de Ecología, 2005)

Las aguas residuales con cadmio procedentes de las industrias mayoritariamente terminan en suelos. Las causas de estas corrientes de residuos son por ejemplo la producción de zinc, minerales de fosfato y las bioindustrias del estiércol. El cadmio de las corrientes residuales puede también entrar en el aire a través de la quema de residuos urbanos y de la quema de combustibles fósiles. Debido a las regulaciones sólo una pequeña cantidad de cadmio entra ahora en el agua a través del vertido de aguas residuales de casas o industrias. (Greenwood *et. al.*, 1997).

Las normas oficiales mexicanas establecen como promedio mensual $0.20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ y un promedio diario de $0.40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ como límite permisible de cadmio en aguas residuales industriales (NOM-003-ECOL-1997). El límite permisible de Cd presente en agua para consumo humano es de $0.005 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de (NOM-127-SSA1-1994).

2.1.1.3. Legislación Ambiental Mexicana.

La situación a nivel mundial con respecto al problema de la calidad del agua es tangible. Esta dificultad no es ajena a México y particularmente a Nuevo León. Los factores que influyen en la contaminación del medio ambiente de cada región están determinados por las actividades humanas propias de ésta. Es evidente que uno de los principales problemas que enfrentamos en nuestro estado es la contaminación por metales pesados, en mayor medida debida al mal manejo de este tipo de residuos peligrosos. La Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Medio Ambiente que rige en nuestro país, establece como residuo y/o material peligroso: “Todos aquellos residuos o materiales que, en cualquier estado físico, que por sus características corrosivas, reactivas, explosivas, tóxicas, inflamables o biológico-infecciosas, representen un peligro para el equilibrio ecológico o el ambiente” (NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002).

Debido a las características propias de los metales pesados son considerados como materiales peligrosos. La lista de contaminantes prioritarios que enuncia la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA), se incluyen a los siguientes elementos: arsénico, cromo, cobalto, níquel, cobre, zinc, plata, cadmio, mercurio, titanio,

selenio y plomo (Instituto Nacional de Ecología, 2005). En México la Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-1993, enlista como generadores de residuos y como residuos a los distintos procesos que involucren la producción de descargas que contengan plomo, cadmio, cobre, níquel, zinc, etc. En dicha norma se enmarca los distintos giros y procesos industriales, generadores de estos residuos peligrosos.

El término de metales pesados no tiene un base científica rigurosa o una definición química sin embargo con excepciones son considerados metales pesados todos aquellos cuya gravedad específica es mayor o igual que 5 g/cm^3 . Tienen una gravedad específica significativamente superior a la del sodio, calcio, y otros metales ligeros. Se presentan en diferente estado de oxidación en agua, aire y suelo y presentan diversos grados de reactividad, carga iónica y solubilidad en agua. (Instituto Nacional de Ecología, 2005).

2.1.1.4. Legislación Ambiental Internacional.

La directiva 76/464 de la Comunidad Económica Europea considerando que el Programa de Acción de las Comunidades Europeas en materia de medio ambiente prevé determinado número de medidas encaminadas a proteger las aguas continentales y las aguas marinas frente a determinados contaminantes, clasifico en dos listas las sustancias que alteran los ecosistemas acuáticos determinando en la primer lista las sustancias que deben ser eliminadas en su totalidad de los efluentes acuáticos mientras que en el segundo listado se mencionan las sustancias que debido a su toxicidad deben de manejarse a menor concentración. La Lista I comprende determinadas sustancias individuales que forman parte de las categorías y grupos de sustancias escogidas

principalmente por su toxicidad, persistencia y bioacumulación, entre ellas se encuentra el cadmio y los diferentes compuestos del cadmio. En la Lista II se encuentran metales y metaloides como plomo, cobre, zinc, níquel, selenio entre otros, ya que son considerados como portadores de efectos perjudiciales sobre el medio acuático, que no obstante puedan limitarse a determinada zona según las características de las aguas receptoras y su localización. Siguiendo en materia de metales pesados otra de las legislaciones vigentes y aplicables en nuestro país es la establecida por la US-EPA (1973) para aguas de uso continuo en irrigación, las cuales difieren en gran medida por lo establecido en las Normas Oficiales Mexicanas. (Tabla 2.2)

TABLA 2.2

NIVELES MÁXIMOS PERMISIBLES DE METALES PESADOS EN AGUAS DE USO CONTINUO SEGÚN LA US-EPA (1973) Y LAS NORMAS OFICIALES MEXICANAS

Metal ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	US-EPA (1973)	NOM
Cu	200	200
Cr	1000	10
Pb	5000	500
Co	200	*
Cd	10	10
Ni	500	500

NOM-CCA-033-ECO/1993

US-EPA.1973 (en agua de uso continuo para irrigación)

NOTA: Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

ND= No Detectado.

*No reportado

2.2 Biosorción

La biosorción ocurre en la interacción de los iones metálicos con los grupos funcionales que conforman la pared celular de microorganismos, ya sean vivos o muertos, y depende del grado de afinidad entre las especies metálicas o sus formas iónicas y los sitios de unión en la estructura molecular de la pared celular (Raraz, 1995). El proceso es relativamente rápido y por el hecho de ser un fenómeno de superficie, facilita la recuperación del metal y el reuso del material como biosorbente, por lo cual, esto constituye una área de investigación y desarrollo en la eficiencia de la biosorción de metales pesados en diferentes biomásas.

2.2.1 Mecanismos de Biosorción

Se ha sugerido que los grupos funcionales involucrados en el mecanismo de biosorción de metales se encuentran principalmente en los polisacáridos y proteínas (compuestos ricos en grupos amino, grupos carboxilo, fosfatos y sulfatos). Durante la reacción, los cationes compiten con los protones por los sitios en los cuales pueden permutarse y/o acomplejarse en ella.

El proceso de biosorción se lleva a cabo por diferentes mecanismos fisicoquímicos dependientes de factores ambientales externos, tipo de metal y formación iónica en disolución y del tipo de sitio activo responsable de captar cada metal. La captación del

metal se lleva a cabo por diferentes mecanismos entre los cuales se encuentran: complejación, intercambio iónico, quelación, adsorción y microprecipitación ya sea individual o combinada, o bien en el atrapamiento iónico en los espacios de la red polisacárida que conforman la estructura de las paredes celulares y membrana (Gadd, 1990). Marroquín G. y Garza Gzz. (2004) evaluaron de la contribución de los grupos funcionales de la biomasa de *Acremonium* sp., *Rhodotorula* sp. y *Chlorella* sp. en la adsorción de cadmio(II) y plomo(II) y reportaron que los carboxílicos, aminos y tioles tienen la mayor influencia en la remoción de estos metales.

Según Wase y Forster (1997) debido al gran número de candidatos que existen para ser utilizados como material biosorbente, se ha establecido una lista de características que debe reunir un material para poder ser utilizado como biosorbente:

1. Tanto la captura como la liberación del metal deben de ser rápidas y eficientes.
2. Debe de producirse a bajo costo y ser reusable.
3. Debe de tener características deseables de tamaño de partícula, forma y propiedades mecánicas.
4. Debe de ser selectivo.
5. La desorción del metal debe llevarse a cabo fácilmente y en forma económica.

2.2.2 Factores que afectan la Biosorción

La capacidad de sorción de metales que presentan los microorganismos dependen de diferentes factores físicos como los son el pH y la cantidad de biomasa. En cuanto al comportamiento general observado para diferentes tipos de metales y biosorbentes se ha

observado que la biosorción del metal es despreciable a valores de pH entre 1 y 2 y se incrementa conforme el pH aumenta hasta alcanzar un máximo a valores entre 5 y 7. Otra variable importante es la concentración de biomasa utilizada (Modak y Natarajan, 1995). Al respecto varios trabajos han sido publicados en los cuales se analizan estos efectos.

2.2.3 Evaluación Cuantitativa de la Capacidad de Biosorción.

La capacidad de remoción de metales de la biomasa microbiana se evalúa a través de isotermas de equilibrio experimental. Para esto se pone en contacto una concentración diluida del material biosorbente con una serie de disoluciones a concentraciones crecientes del elemento metálico soluble y se establece un equilibrio entre la concentración de metal enlazado a la biomasa y la concentración de metal que permanece en solución (Volesky, 1999). La isoterma es un modelo matemático que se aplica cuando el secuestro del metal se determina como una función de la concentración del metal en solución.

La relación entre la cantidad de metal unido a un adsorbente y la concentración de equilibrio a una temperatura constante se denomina isoterma de adsorción. Se han definido cinco tipos de isotermas para estudiar la adsorción en gases. La que se adapta más al proceso de sorción estudiado en esta investigación, es el tipo 1, en el que la cantidad del metal adsorbido para determinada cantidad de adsorbente, se incrementa rápidamente al aumentar la concentración del metal, pero conforme la superficie de sorbente se va cubriendo con el metal se hace más lenta.

La capacidad total de intercambio es parámetro insustituible en el análisis de cualquier sistema de adsorción, ya que la misma caracteriza a los adsorbentes y se calcula mediante:

$$q = V(C_0 - C_e)/w \quad (2.1)$$

Donde

q : Capacidad de adsorción, mg de soluto/g de sólido ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)

C_o : Concentración inicial de la disolución de metal ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

C_e : Concentración de metal de equilibrio de la disolución ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$).

V : Volumen de disolución en contacto con el adsorbente (L)

w : Masa de adsorbente (g)

2.2.3.1 Isotermas de Adsorción.

Existen diferentes modelos que tratan de explicar el fenómeno de la adsorción por medio de diferentes teorías.

Uno de los modelos más representativos es el de Langmuir:

$$q = \frac{q_{\max} b C_e}{1 + b C_e} \quad (2.2)$$

o puede ser escrito en forma lineal:

$$\frac{C_e}{q} = \frac{1}{b q_{\max}} + \frac{C_e}{q_{\max}} \quad (2.3)$$

Donde

q : Capacidad de adsorción, mg de soluto/g de sólido ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)

q_{\max} : Capacidad de adsorción máxima, mg de soluto/ g de sólido ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)

C_e : Concentración de equilibrio de soluto en el líquido, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

b : Constante de Langmuir, $\text{L}\cdot\text{mg}^{-1}$

Otro modelo de isoterma ampliamente usado es el semiempírico atribuido a Freundlich, el cual es descrito por una ecuación clásica que puede ser expresada de la siguiente forma:

$$q = K(C_e)^{1/n} \quad (2.4)$$

Donde

q : Capacidad de intercambio en el equilibrio, mg de soluto/g de sólido

C_e : Concentración de equilibrio de soluto en el líquido, mg·L⁻¹

K : Constante, L·mg⁻¹

n : Constante adimensional

Este modelo es muy empleado en concentraciones medias y bajas, y el hecho de que los valores de los datos se ajusten al modelo de Freundlich no implica ningún mecanismo definido, pero si implica que describe un proceso de adsorción favorable, lo cual se detecta si $n > 1$.

2.3 Metalotioneínas

Las **metalotioneínas** (MTs) constituyen una familia de proteínas ricas en cisteína, de bajo peso molecular (entre 6000 y 7000 Da). Las MTs tiene la capacidad de unirse a metales pesados tanto fisiológicos (zinc, cobre, selenio) como xenobióticos (como cadmio, mercurio, plata y arsénico), a través de los grupos tiol (-SH) de sus residuos de cisteína, que representan casi el 30% de sus restos de aminoácidos (Sigel, *et. al.* 2009).

Las MTs están presentes en un vasto rango de grupos taxonómicos, desde procariotas (como la cianobacteria *Syneccococus spp.*), protozoarios (el género de ciliados *Tetrahymena*), plantas (como *Pisum sativum*, *Triticum durum*, *Zea mays*, *Quercus suber.*), levaduras (como *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*), invertebrados (como el nematodo *Caenorhabditis elegans*, el insecto *Drosophila melanogaster*, el molusco *Mytilus edulis*, o el equinodermo *Strongylocentrotus purpuratus*) y vertebrados (como la gallina *Gallus gallus*, *Homo sapiens* o ratones *Mus musculus*). La producción de las MTs es inducida por metales esenciales como Cu y Zn, y los no esenciales como Cd, Ag y Hg, tanto en vertebrados como en invertebrados (Benedicto J. *et.al.* 2000).

Las MTs fueron descubiertas en 1957 por Vallee y Margoshe tras purificar una proteína unida a cadmio en la corteza renal equina. Las funciones de las MTs no están completamente aclaradas, pero datos experimentales sugieren que pueden proveer homeostasis de metales fisiológicamente importantes (Cu, Zn), detoxificación de metales tanto esenciales como no esenciales, y defensa antioxidante (Roesijadi, 1996; Viarengo *et. al.*, 2000; Amiard *et. al.*, 2006).

Hay cuatro isoformas principales expresadas en el cuerpo humano; allí se sintetizan grandes cantidades, principalmente en el hígado y los riñones. Su síntesis depende de la disponibilidad de oligoelementos, como zinc, cobre y selenio, y los aminoácidos histidina y cisteína.

La inducción de MTs se ha detectado en organismos de áreas contaminadas o de experimentos in vitro con exposición a metales como Ag, Cd, Cu, Hg y Zn, en el laboratorio y en el campo. La retención de metales por parte de las MTs es evidente en los tejidos donde se producen las MTs, indicando la importancia de estos en la admisión, acumulación y expulsión de metales (Bebianno and Langston 1998). El alcance de la inducción de MTs puede variar entre especies y distintos tejidos

2.3.1 Estructura y clasificación

Es sabido que la molécula de MT no contiene aminoácidos aromáticos, y 20 unidades de cisteína suelen encontrarse en su secuencia primaria en las siguientes repeticiones: Cys-X-Cys, Cys-Cys-X-Cys-Cys, y Cys-X-Cys-Cys, donde X representa otro aminoácido (que no es cisteína). Las diferentes fuentes de producción de las MTs representan una secuencia muy variada en cuanto al peso molecular, número y distribución de residuos de Cys, sin mostrar homología general.

Según su estructura primaria, las MTs fueron clasificadas por diferentes métodos desde 1987 (Fowler *et. al.*) en tres diferentes clases. Posteriormente en 2001 Binz y Kāgi, en su investigación clasificaron las MTs de estructura primaria en 15 familias en cuanto a la distribución de los residuos de cisteína a lo largo de la secuencia de las MTs. La familia 15 contiene las MTs vegetales, que en 2002 fueron divididas por Cobbet y

Goldsbrough en 4 tipos (1, 2, 3 y 4) según su distribución de residuos de Cys y regiones sin Cys llamadas “espaciadores”, características de las MTs vegetales.

Elementos de estructura secundaria fueron observados en varias MTs de *Synechococcus*, mamíferos, equinodermas, y crustáceos, pero hasta el momento, el contenido de dichas estructuras se considera pobre en las MTs, y su influencia funcional no es considerada.

La estructura terciaria de las MTs es altamente heterogénea. Mientras que las MTs de vertebrados, equinodermas, y crustáceos muestran una estructura bidominal con metales divalentes como Zn(II) o Cd(II) (la proteína se dobla de manera que puede unir metales en dos dominios funcionalmente independientes, cada uno con un cluster metálico; las MTs de levaduras y procariotas muestran una estructura monodominal (un solo dominio con un cluster metálico).

La estructura cuaternaria no ha sido considerada muy ampliamente en las MTs. Procesos de dimerización y oligomerización han sido observados y atribuidos a varios mecanismos moleculares, incluyendo la formación intermolecular de puentes disulfuros, el puenteo a través de metales unidos a través de residuos de Cys o His en MTs diferentes, o interacciones inorgánicas mediadas por iones fosfato. Las MTs diméricas y poliméricas han mostrado propiedades novedosas en cuanto a detoxificación de metales.

Las MTs tienen diversas preferencias en cuanto a su unión con metales, que han sido asociadas con especificidad funcional. Por ejemplo, la MT1 de *Mus musculus* se une favorablemente a iones de metales divalentes (Zn(II), Cd(II),...), mientras que la MT1 de levaduras es selectiva respecto a iones de metales monovalentes (Cu(I), Ag(I),...). Una nueva clasificación de MTs como Zn- o Cu-tioneínas está siendo desarrollada, teniendo en cuenta estas preferencias funcionales.

2.3.2 Enlace a metales

Existen una gran cantidad de reportes acerca de las uniones de metales como Cd, Zn, Hg, Cu, Ag, etc., a las MT's que comprueban que el mecanismo de unión del metal a la proteína ocurre de forma secuencial y no cooperativo, puesto que cuando se tienen MTs parcialmente metaladas (es decir, que tienen todavía disponible cierta capacidad de unirse a metales) estas continúan con el proceso de unión de metales sin afectar las uniones establecidas anteriormente.

La cisteína es un aminoácido con azufre, por eso el nombre “-tioneína” y es en esta parte donde se favorece la unión a metales. Las metalotioneínas participan en el ingreso, transporte, y regulación del zinc, en sistemas biológicos. Las MTs de mamíferos se unen a tres iones Zn(II) en su dominio beta y a cuatro en el alfa (figura 2.1). A través de la unión y el desprendimiento de zinc, las MTs pueden regular los niveles de zinc dentro del cuerpo. La metalotioneína también transporta iones zinc dentro de la célula, donde es cedido a otra proteína u organelo. De esta manera la tioneína-metalotioneína se vuelve un componente clave del sistema de señales de zinc en las células.

Otra de las forma de actuar de las MTs que provienen de mamíferos es la habilidad que presentan para capturar peligrosos radicales oxidantes, como los radicales superóxido e hidroxilo. En esta reacción, la cisteína es oxidada a cistina, y los iones metálicos que están unidos a la cisteína son liberados al medio provocando la activación en la síntesis de más MTs. La expresión de MTs es rápidamente inducida por una variedad de sustancias que incluye metales, hormonas, citocinas, oxidantes, estrés, e

irradiación (Andrews, 2000; Haq *et. al.*, 2003). Este ha sido propuesto como un importante mecanismo en el control del estrés oxidativo.

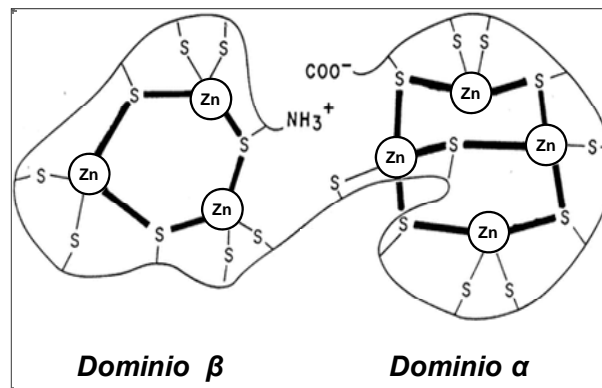


Figura 2.1. Unión del zinc a las MTs de mamíferos en su dominio beta y en el alfa

Este sistema explica el proceso de sorción de metales divalentes utilizando metalotioneínas provenientes de mamíferos como materiales biosorbentes el cual es pieza clave de este estudio.

La inducción de la síntesis de MTs en muchas especies marinas por metales contaminantes (Ag, Cd, Cu, Hg) ha llevado a proponer el uso de estas proteínas como potenciales biomarcadores específicos para exposición a metales y toxicidad en biomonitoreo acuático (Langston *et. al.*, 1998; Cajaraville *et. al.*, 2000; Soazing and Marc, 2003; Amiard *et. al.*, 2006), siempre que los factores naturales y fisiológicos sean tenidos en cuenta (Rainbow, 1998; Legras *et. al.*, 2000).

Los programas de monitoreo para los metales traza frecuentemente usan organismos de ambientes de agua salada, como estuarios y zonas intermareales, donde la salinidad puede fluctuar en períodos de horas, días, semanas, y temporadas y esto es factor importante en la síntesis de las MTs. (Leung *et. al.*, 2000; Amado *et. al.*, 2006). Por lo tanto, si las medidas de MTs son incorporadas en programas de biomonitoreo, la

influencia de la salinidad en la concentración de MTs debe ser considerada (Leung *et al.*, 2002).

2.3.3 Expresión de Proteínas Recombinantes

La producción de proteínas recombinantes en diferentes modelos posibilitan obtener proteínas humanas con fines terapéuticos, aditivos en alimentos, vacunas, entre otras; tales enzimas pueden provenir de bacterias, entre ellas *E. coli*, algunas levaduras, células vegetales, células de mamíferos, etc, (TABLA 2.3).

Se han preferido modelos con levaduras y bacterias ya que son cultivos rápidos y económicos, los cuales se pueden escalar con relativa facilidad aún a altas densidades celulares, lo cual permite la obtención de la proteína de interés con alta productividad. Cada uno de estos modelos presenta ventajas y desventajas que son los criterios a tener en cuenta en su selección para la expresión de una proteína en particular. (Higgins, *et al.*, 1999).

TABLA 2.3
CRITERIOS PARA LA SELECCIÓN DE UN SISTEMA DE EXPRESIÓN DE
PROTEINAS RECOMBINANTES

SISTEMA DE EXPRESION	CLASIFICACIÓN	PUENTES DISULFURO	GLICOSILACIÓN	SECRECION	COSTOS DE FERMENTACIÓN
Células de mamíferos	Eucariota	Si	Si, parecida a la humana	Posible	Alto
Células de plantas	Eucariota	Si	Si, L-frucosa terminal	Posible	Alto
<i>Aspergillus sojæ</i>	Hongo filamentoso	Si	Si, desconocida aún	Posible	Bajo
<i>Arxula adenivorans</i>	Levadura dimórfica	Si	Si, desconocida aún	Posible	Bajo
<i>Pichia pastoris</i>	Levadura metilotrófica	Si	Si, terminales manosa α 1, 3	Posible	Bajo
<i>Staphylococcus carnosus</i>	Coco gran positivo	Limitado	No	Secreción al periplasma	Bajo
<i>Escherichia coli</i>	Bacteria Gram negativa	Si	No	Secreción al periplasma	Bajo

Tomado de Gellissen G, 2005.

2.3.3.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli es una bacteria Gram negativa, no es esporoformadora y usualmente tiene flagelos peritricos o fimbrias. La primera descripción fue hecha por Escherich en 1885. Se encuentra frecuentemente en los intestinos de los animales, incluido el humano (Susman M, 1999). Fue uno de los primeros microorganismos de los cuales se tiene un análisis detallado tanto genética como molecularmente, y fue el primero empleado para ingeniería genética y producción de proteínas recombinantes. Además, de ser un organismo modelo usado en investigación, se ha convertido en el microorganismo

industrial más usado como sistema de expresión de proteínas en procariontes, como también, para la producción de enzimas para uso diagnóstico, propósitos analíticos y para producir proteínas sintéticas de uso farmacéutico. (Gellissen G, 2005). Algunas deficiencias que tiene la expresión de proteínas a nivel de fermentador están: el tiempo de inducción de la expresión de la proteína recombinante, inestabilidad de los vectores, ineficiencia del promotor, inestabilidad del mRNA, ineficiencia del sistema de traducción, carencia de la maquinaria para hacer ciertas modificaciones postraduccionales como la glicosilación, toxicidad de los productos, proteólisis, producción de proteínas insolubles almacenadas en cuerpos de inclusión, un inadecuado plegamiento y consecuente inactividad de los productos (Vaillancourt P, 2003).

En algunos casos cuando el inserto de ADN que se expresa produce cambios significativos en la célula anfitriona, dicha modificación se utiliza para reflejar su clonación exitosa. Sin embargo, la técnica o estrategia más común es la detección y selección basadas en la presencia de genes marcadores en el vector; como por ejemplo:

- Gen lac Z el cual expresa la enzima β -galactosidasa que le da la habilidad de hidrolizar la β -galactosa. Este marcador se puede reconocer porque las células transformadas exitosamente y crecidas sobre un agar que contenga 5-bromo-4cloro-3-indolil β -D-galactosido (X-gal), este sustrato se hidroliza por la β -galactosidasa produciendo una coloración azul.

- Genes de resistencia a algún antibiótico, son aquellos vectores que codifican una proteína, la cual permite el crecimiento de la célula anfitriona en presencia de un antibiótico específico, por ejemplo el gen Amp que codifica una beta-lactamasa, capaz de degradar la ampicilina (Sambrook *et. al.*, 2001)

2.3.3.2 Vector

Es un pequeño vehículo hecho de ADN, que llevará un fragmento foráneo de ADN. Hay muchas clases de vectores de clonación: plásmidos y bacteriófagos, e incluso otros que se usan para mayor capacidad de recepción de información genética como son los BAC's y cósmidos.

Los plásmidos son secuencias de ADN extracromosomal las cuales se replican autónomamente y disponen de un marcador de selección. En esta investigación se trabajo con el vector pThioHis A (Figura 2.2), el cual muestra un sitio de clonación múltiple donde fue insertado el gen de la Metalotioneína I de ratón.

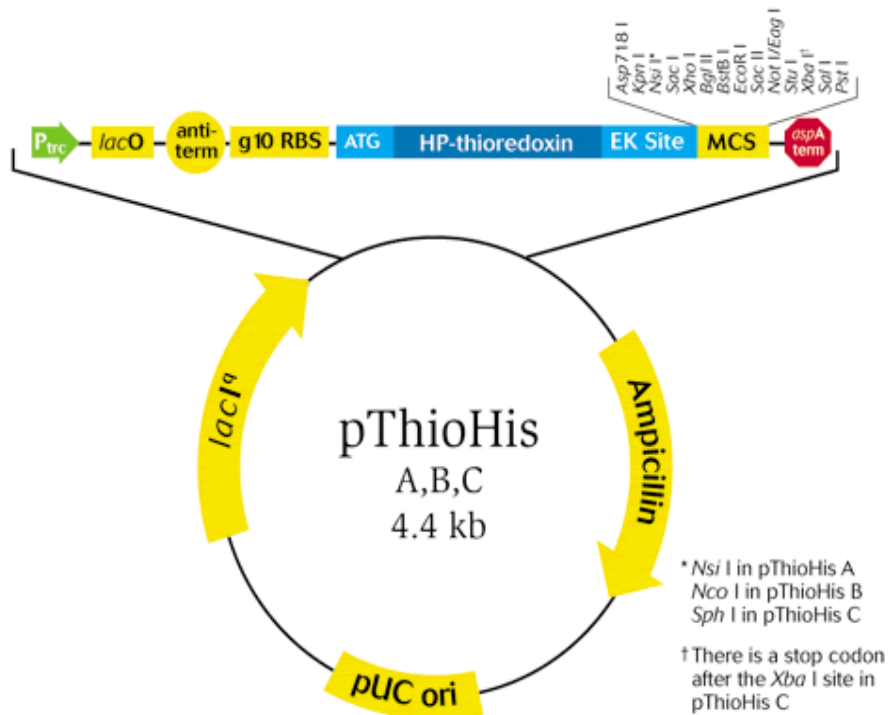


Figura 2.2. Mapa del plásmido pThioHis

2.3.3.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR en sus siglas en inglés) es un método de análisis rápido y sencillo que permite la detección y amplificación de fragmentos específicos de ADN. La polimerasa es una enzima cuya actividad es la síntesis de una cadena de ADN complementaria a una cadena de ADN sencilla. Para ello necesita la presencia de pequeñas secuencias de ADN denominadas cebadores que deben ser complementarias de los extremos de la secuencia que se desea ampliar. La PCR consta de tres pasos que se repiten un número determinado de ciclos:

- Separación del ADN para que se encuentre en forma de cadena sencilla.
- Unión de los cebadores al ADN de cadena sencilla.
- Síntesis de la cadena complementaria de ADN a partir de los cebadores (primers).

La repetición de estos ciclos hace que la cantidad del fragmento de ADN que se está amplificando aumente de manera exponencial, de modo que aunque se parta de una cantidad muy pequeña al final de un número determinado de ciclos se obtendrá una cantidad muy importante. El diseño de los cebadores es muy importante y su especificidad dependerá del tipo de amplificación que se desee hacer, pudiendo utilizarse cebadores específicos, semiespecíficos o arbitrarios. Pueden realizarse análisis por PCR de tipo cualitativo o cuantitativo.

2.3.3.4 Diseño de iniciadores

El procedimiento reportado por Dávila *et. al.* (2006) para el diseño de los iniciadores menciona el uso de genBank del cual selecciono la secuencia NM_013602 que corresponde al cADN de la MT1, la secuencia encontrada haciendo uso del programa “genBank” para la Metalotioneína I de ratón fue la siguiente.

NM_013602. *Mus musculus* meta [gi:7305284] 186 pb liner ROD 06-APR-2003

```
1 atggaccca actgctctg ctccaccggc ggctctgca ctgcaccag ctctgcgcc
61 tgcaagaact gcaagtgcac ctctgcaag aagagctgct gctctgctg tccctgggg
121 tgctccaaat gtgcccaggg ctgtgtctgc aaaggcgccg cggacaagtg cacgtgctgt
181 gctga.
```

Así mismo analizó mediante el programa *DNA Strider*, contemplando los primeros y los últimos 18 nucleótidos, tomando en cuenta que tuvieran una terminación hacia la región 3' preferencial en bases que se unen por 3 puentes de hidrógeno (Guanina y Citosina) con el fin de favorecer el anclaje de la ADN polimerasa durante la amplificación del gen por PCR. A esos 18 nucleótidos se les añadió a los extremos 9 nucleótidos cuya secuencia fuese de reconocimiento para las enzimas de restricción *Kpn I* y *Xba I*, las cuales fueron posteriormente aprovechadas para la inserción al sitio múltiple de clonación del vector y tomando siempre en cuenta que el gen debe estar en marco de lectura con el ATG de la proteína de fusión (tioredoxina).

Tomando en cuenta todas las especificaciones mencionadas anteriormente, la secuencia de los iniciadores es la siguiente:

GGGGTACCTATGGACCCCAACTGCTCC Primer Forward

GCTCTAGAGGTCAGGCACAGCACGTGC Primer Reverso.

2.3.3.5 Electroforesis en condiciones desnaturalizantes

El SDS es un agente desnaturalizante de proteínas que provoca la ruptura de los enlaces que mantienen la estructura de las mismas, de modo que adquieren todas la misma forma. Además les proporciona carga neta negativa, de modo que la separación se realiza en función del tamaño.

2.4 Sistemas de Remoción de Metales

2.4.1 Inmovilización

La inmovilización se define como las distintas formas de agrupamiento o adhesión celular a diferentes soportes por adhesiones físicas o químicas, gracias a esto el microorganismo es capaz de formar agrupaciones por biopelículas o colonizaciones.

La inmovilización trae ventajas como: la posibilidad de manejar velocidades de agitación mayores, lo cual se traduce en mayores regímenes de flujo y mayor transferencia de masa y de calor; se garantiza que las células crezcan dentro del soporte o adheridas al mismo, con lo cual se evita que incremente dramáticamente la viscosidad del medio y se adquiere la posibilidad de reutilizar el biocatalizador en otras fermentaciones (Pierotty *et. al.*, 2006).

Los soportes que se han utilizado para la inmovilización de biomasa microbiana incluyen el agar, la celulosa, los alginatos, las poliacrilamidas, la sílica gel y el glutaraldehído (Gadd y White, 1998), mezclados en densidades de 4 a 6 % de biomasa por 1% del soporte (p/p) reduciéndose por lo tanto la cantidad requerida de agente (Cañizares, 2000).

En este estudio como soporte se utilizó alginato de calcio al 3% para inmovilizar la biomasa bacteriana inactiva en una proporción 1:1. El uso de este material se debe a que este agente de inmovilización cumple con las características físicas que proporcionan estabilidad al sistema y es ampliamente utilizado en la remoción de metales en solución acuosa.

2.4.2 Ecuación General de Balance de Masa

Todos los procesos de tratamiento de aguas residuales se pueden analizar por medio de una caja negra y balances de materia. El balance de masa no es más que la frase ya conocida de “la materia no se crea ni se destruye, solo se transforma”, es una Ley básica de la Física que aplicándola a la sorción de metales es tan sencillo como decir que todos los materiales que entran en el proceso tienen que ser iguales a los que salen, a menos que ocurra algo dentro de la caja negra que produzca materia o algo que consuma materia. El balance de masa es la clave en el diseño y análisis de los procesos microbiológicos.

$$\left[\begin{array}{c} \text{Tasa de} \\ \text{Materia} \\ \text{ACUMULADA} \end{array} \right] = \left[\begin{array}{c} \text{Tasa de} \\ \text{Materia} \\ \text{ENTRANTE} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{c} \text{Tasa de} \\ \text{Materia} \\ \text{SALIENTE} \end{array} \right]$$

Figura 2. 3. Balance de masa en un proceso de biosorción de metales

Si este proceso o “reacción” ocurre dentro de una caja negra, esta caja negra se convierte en un reactor y el primer término de la ecuación del balance de masa ya no se puede suponer como cero.

Muchos procesos naturales así como procesos ingenieriles se pueden analizar convenientemente usando el concepto del reactor ideal. Una caja negra puede ser pensada como un reactor si tiene volumen y si los materiales se mezclan o fluyen a través del reactor (Vesilind y Morgan, 2004).

En base a ciertas consideraciones sobre el flujo y el mezclado, se definen diferentes tipos de reactores. En este trabajo los reactores que se utilizaron fueron el tipo de reactor batch que no es más que un reactor donde no hay flujo de entrada ni de salida y el segundo tipo de reactor utilizado fue uno conocido como de mezcla completa que se trabajo en una configuración tubular con lecho fijo, que como su nombre lo indica tiene una mezcla homogénea y además flujos continuos de entrada y salida.

2.4.3 Reactor tipo Batch

Como se había mencionado anteriormente, el reactor tipo batch es un reactor donde no existe flujo de entrada ni de salida, es simplemente un reactor con agitador que homogeniza la mezcla.

Las ventajas del reactor mienten con su flexibilidad. Un solo recipiente puede realizar una secuencia de diversas operaciones sin la necesidad de romper la contención. Esto es particularmente útil cuando se procesan tóxicos o componentes altamente potentes.

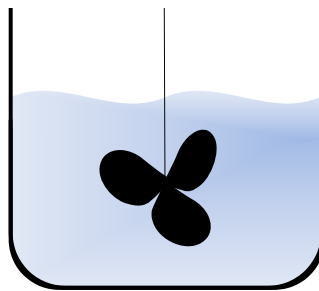


Figura 2.4. Reactor tipo Batch

A pesar de que estos reactores son muy usados en procesos industriales y aplicaciones de control de contaminación, para el tratamiento de aguas residuales son poco útiles pues se necesita tener entrada y salida de agua para que se puedan tratar volúmenes de agua residual considerables.

Para entender un poco más de estos reactores, se plantea la ecuación del balance de masa de la siguiente forma:

$$V \frac{dC}{dt} = -kC^nV \quad (2.5)$$

Donde V habla del volumen del reactor, k está asociada a la constante de remoción de materia, C se refiere a la concentración que en este caso en particular se refiere al metal y n es el orden de la ecuación cinética que representa el proceso.

2.4.4 Reactor en Columna de Lecho Fijo

El proceso que se plantea en esta investigación implica una transferencia de materia en un reactor en columna de lecho fijo que por definición es aquel que opera de forma no estacionaria, donde las partículas permiten el paso del fluido sin separarse unas de otras, esto hace que la altura del lecho se mantenga constante y por tanto la fracción de vacío en el lecho (porosidad) se mantiene constante. En esta etapa el fluido experimenta la mayor caída de presión del proceso.

En esta operación se circula con una velocidad volumétrica de flujo constante F , a través de una columna de lecho fijo, una disolución que contiene el único soluto M (metal divalente) en el disolvente B (agua). El lecho fijo de la columna consiste en esferas de biomasa de *E. coli* modificada genéticamente (*pMt-Thio*) inmovilizada en alginato de calcio las cuales adsorben a M . Al iniciar la percolación los intersticios del lecho están totalmente llenos de la disolución que contiene M y el sólido está puro, el líquido de precolación desplaza uniformemente al disolvente de forma que la concentración de la disolución de M es siempre uniforme en cualquier sección transversal. Para mayor sencillez se supondrá que la concentración de equilibrio de M sorbido sobre el sólido es proporcional a la concentración local de M en la disolución. Se supondrá

también que la concentración de M en la disolución de percolación es siempre pequeña y que la resistencia del sólido a la transferencia de masa es despreciable.

Para deducir la expresión de la concentración de M en la columna en función del tiempo y de la distancia de ascenso de la misma, es conveniente considerar las dos fases como continuas y dispuestas colateralmente así mismo se considera que el comportamiento es de estado no estacionario (Figura 2.4).

Por lo que se hace necesario considerar que el flujo molar del disolvente es constante en toda la longitud de la columna durante el tiempo de operación.

Así mismo este concepto aplica para la adsorción de metales pesados disueltos en agua sobre biomazas inmovilizadas en matrices poliméricas.

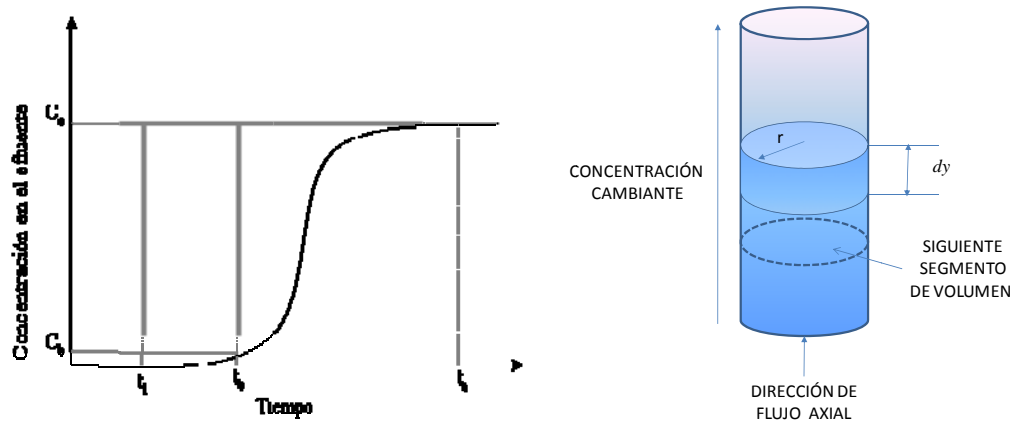


Figura 2.5. Columna de bioadsorción de lecho fijo: a) curva de efluente típica; b) representación esquemática del reactor.

CAPÍTULO 3
JUSTIFICACIÓN

CAPÍTULO 3

JUSTIFICACIÓN

3.1 Definición del Problema

Los metales pesados en disolución encontrados en el medio ambiente, representan un grave peligro para la salud humana, debido a que éstos se acumulan en tejidos vivos a través de la cadena alimenticia, por tanto existe la necesidad de controlar la contaminación con metales a efluentes de aguas, tanto de desecho como de consumo humano. Actualmente, existen tecnologías que se emplean para recuperar metales tanto preciosos como de interés industrial, las cuales producen residuos con altas concentraciones del mismo, provocando la contaminación del ambiente. Estos métodos involucran macromoléculas acomplejantes de metales, así mismo resinas de intercambio iónico, los cuales, si bien pueden mostrar un elevado porcentaje de remoción también presentan cortos tiempos de vida y costos elevados de obtención de materiales y tratamiento posterior, fenómeno que, al utilizar materiales biosorbentes no ocurre.

El manejo de microorganismos o sus biomoléculas como medios de biorremediación ofrece una alternativa potencialmente amigable con el medio ambiente debido a su fácil manejo y a la poca complejidad de su tratamiento al final del proceso de biosorción, esto

debido a que el material biosorbente presenta la ventaja de recuperar el metal para su reutilización y en algunas ocasiones, incluso el biosorbente puede volverse a utilizar, sin necesidad de confinar de forma agresiva los materiales implicados en la remediación.

Como en todos los problemas generados por el desarrollo de la humanidad, la tendencia es hacia la prevención, no obstante, existe una cantidad exagerada de focos de contaminación sobre los cuales se debe prestar especial atención. La legislación es clara, pero no así en la ejecución de la misma, por tal motivo, buscar alternativas de tratamiento que puedan ser implementadas en las industrias generadoras de desechos acuosos contaminados con metales a bajo costo, será una medida inevitable para mantener la política tanto de prevención y cuidado como de saneamiento a lo ya dañado.

En este trabajo, lo que se pretende es fusionar las tecnologías de la ingeniería genética con el diseño de reactores en columna para inmovilizar una proteína quimérica previamente evaluada como elemento biosorbente de metales pesados para generar un sistema novedoso, económico y de fácil manejo para la descontaminación de efluentes acuosos.

3.2 Hipótesis

La biomasa de *E. coli* modificada genéticamente para la producción de la metalotioneína I murina recombinante, fusionada a la tioredoxina, e inmovilizada en un reactor de flujo continuo ascendente en columna de lecho fijo, remueve eficientemente plomo (II) y cadmio(II) de efluentes acuosos.

CAPÍTULO 4

OBJETIVO

CAPÍTULO 4

OBJETIVO

4.1 Objetivo General

Diseñar y evaluar un reactor en columna a escala Bench para la remoción de metales pesados utilizando biomasa inmovilizada de *E. coli* genéticamente modificada con el gen de la proteína quimérica metalotioneína-tioredoxina.

4.2 Objetivos Particulares

- ✚ Obtener la biomasa de *E. coli* modificada genéticamente que produzca la proteína quimérica metalotioneína-tioredoxina, a través de la metodología ya establecida.
- ✚ Determinar el agente de inmovilización para la proteína quimérica metalotioneína-tioredoxina.
- ✚ Realizar bioensayos cinéticos en reactores batch a escala laboratorio que permitan obtener las constantes cinéticas de bioeliminación de cadmio (II) y plomo

(II) de disoluciones ideales, con la biomasa libre, el agente de inmovilización y la biomasa inmovilizada.

- ✚ Elaborar las isotermas experimentales de adsorción de cadmio (II) y plomo (II), y determinar la afinidad y la capacidad máxima del bioadsorbente para remover estos metales.
- ✚ Evaluar los parámetros susceptibles para el escalamiento al sistema en columna de lecho fijo y de flujo continuo ascendente (Tiempo de retención, concentración de metal, capacidad de remoción del sistema, área de contacto)
- ✚ Montar un reactor en columna de flujo continuo, ascendente a escala Bench empacándolo con la biomasa genéticamente modificada e inmovilizada.
- ✚ Monitorear el desempeño del reactor en columna de flujo continuo en la remoción de cadmio (II) y plomo (II), mediante cinéticas a diferentes tiempos de retención a las condiciones óptimas de escalamiento.
- ✚ Obtener las constantes cinéticas de bioeliminación de cadmio (II) y plomo (II) a partir de los tiempos de retención hidráulicos probados en el reactor de flujo continuo
- ✚ Analizar e interpretar los resultados.

CAPÍTULO 5

MÉTODOS

CAPÍTULO 5

MÉTODOS

5.1. Ubicación

El desarrollo de la presente investigación se realizó con el apoyo de la Facultad de Ciencias Biológicas (F.C.B.) y la Facultad de Ciencias Químicas (F.C.Q.) de la U.A.N.L. teniendo como base de operaciones el Laboratorio L1 del Instituto de Biotecnología de la F.C.B. y el Laboratorio de Ingeniería Genética de la F.C.Q.

5.2. Métodos

5.2.1. Extracción de ARN del tejido hepático

Para inducir la expresión de la MT1 se utilizaron 2 ratones macho (*Mus musculus*), adultos, a los cuales se les administró una solución de $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ vía subcutánea para

inducir la activación de la expresión del gen que codifica la Metalotioneína I (MT1). Después de un periodo de intoxicación de 6 h, ambos ratones fueron anestesiados con cloroformo y sacrificados de forma rápida, posteriormente se abrieron por la línea media del abdomen (ver figura 5.1) para extraer su hígado, el cual se dosifico y almaceno a -20° C para trabajar con el después.



Figura 5.1. Extracción del tejido hepático del ratón previamente intoxicado con $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ 0.1M

Se procedió a extraer el ARN de las células hepáticas agregando 500 μL de Trizol[®] a temperatura ambiente (Chomczynski P, *et. al.* 1987), homogenizando la muestra en un homogenizador positrón, después se añadieron 200 μL de Cloroformo agitándolo vigorosamente se dejó reposar por espacio de 2-3 minutos y se llevó a centrifugación a 10,000 *rpm* durante 15 minutos, esto favoreció la separación de las fases con lo cual se extrajo la fase que contenía en ARN y se transfirió a un tubo nuevo con 500 μL de isopropanol se aplicó agitación vigorosa y se llevó a centrifugación a 10,000 *rpm* durante 5 minutos el sobrenadante fue descartado, mientras que la pastilla se lavó con etanol al 70% en dos ocasiones, llevándolo a centrifugación a 7,500 *rpm* durante 5 minutos. La pastilla de ARN resultante se suspendió en agua estéril miliQ[®] y se verificó

su pureza e integridad por espectrofotometría UV y electroforesis en gel de agarosa al 1%.

5.2.2. Obtención de ADNc.

Para la obtención del ADNc se trabajó apropiadamente la Retrotranscripción, colocando en un tubo 9 μ L de ARN, 1 μ L de Random primers y se dejó reposar por 15 minutos. Aparte en otro tubo se colocaron 4 μ L de buffer 5X, 1 μ L de Random primers, 1 μ L de dNTP's 200 μ M, 1 μ L de RNAsin y 0.8 μ L de Ditioneitol (DTT). El contenido de ambos tubos se mezcló y se elevó su temperatura a 65°C por espacio de 5 minutos, posteriormente se colocó a 37°C por 10 minutos y se agregó 1 μ L de la enzima Transcriptasa reversa y se dejó a esa temperatura durante 50 minutos más, al final para inactivar la enzima se elevó la temperatura a 95°C por 5 minutos y se prosiguió a la amplificación del gen la metalotioneína I.

5.2.3. Amplificación del gen de la Metalotioneína I.

Utilizando los iniciadores diseñados previamente por Dávila (2006) para la amplificación del gen de la Metalotioneína I con sitios de reconocimiento en sus extremos para las enzimas *Kpn I* y *Xba I*. (TABLA 5.1)

GGGGTACCTATGGACCCCAACTGCTCC Primer Forward

GCTCTAGAGGTCAGGCACAGCACGTGC Primer Reverso

El ADNc obtenido se utilizó para la reacción de amplificación (PCR) en la que fue necesario trabajar con un gradiente programado en la temperatura de alineación (TABLA 5.2).

TABLA 5.1

COMPOSICIÓN DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL ADNc

Reactivo	Cantidad (μ L)
Buffer 10X	2.5
MgCl ₂	1.0
dNTP's	1.0
P1 (Forward)	1.0
P2 (Reverso)	1.0
cADN	5.0
Taq polimerasa	1.0
Agua miliQ estéril	12.5

TABLA 5.2

CONDICIONES DE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA PARA LA AMPLIFICACIÓN DEL ADNc

No. Paso	Temperatura °C	Tiempo (min)
1. Desnaturalización inicial	95	5
2. Desnaturalización	95	1
3. Alineación	52 – 62	1
4. Extensión	72	1
5. Extensión final	72	5

5.2.4. Digestión con Endonucleasas de restricción *Xba I* y *Kpn I*

Se preparó una reacción de digestión con *Xba I* para el gen MTI amplificado por PCR, la cual fue incubada a 37°C por 2 h, y posteriormente a 65°C para inactivar la enzima *Xba I*. Se prosiguió a la digestión con *Kpn I* como la indica la tabla 5.3 a 37°C por 3 h. con el objeto de obtener un producto amplificado con los extremos adaptados para su ligación en el vector de expresión y su posterior introducción en bacterias de la cepa *E.coli* Top10.

TABLA 5.3

CONDICIONES DE DIGESTIÓN CON LAS ENZIMAS DE RESTRICCIÓN *Xba I* Y *Kpn I*

Digestion con <i>Xba I</i>	
Cantidad (μL)	Reactivo
2.0	Buffer 2 10 X
7.5	Agua
0.5	SBA
1.0	XbaI (10 U/ μL)
9.0	ADN
Digestion con <i>Kpn I</i>	
1.0	KpnI (10 U/ μL)
2.5	Buffer 4 10 X
1.5	Agua

La digestión del plásmido *pThioHis A* se realizó con las mismas enzimas de restricción para cortar en el sitio de clonación múltiple y llevar a cabo la ligación con el fragmento previamente digerido con *Xba I* y *Kpn I*. La enzima *Kpn I* corta el plásmido en la posición 3832 mientras que *Xba I* corta en 3878 produciendo dos bandas de 46bp y la otra de 4354bp. (FIGURA 5.2)

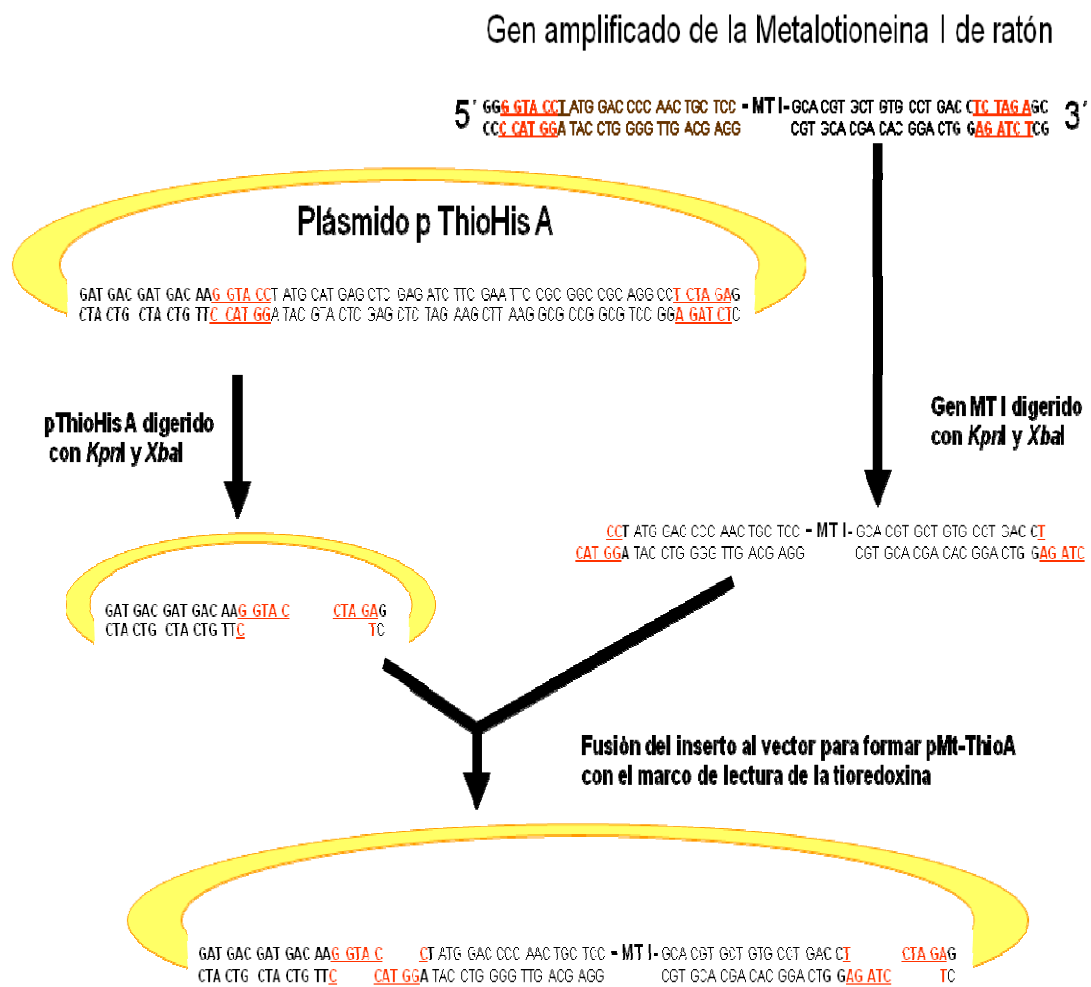


Figura 5.2. Descripción esquemática de la construcción del vector de expresión que codifica para la proteína de fusión *Thio-Mt*

5.2.5. Construcción del vector recombinante que codifica para la proteína de fusión *Mt-Thio*

El fragmento obtenido de la PCR correspondiente al gen de la MTI previamente digerido con las enzimas de restricción *Xba I* y *Kpn I*, así como el vector plasmídico *pThioHis A* digerido, con las mismas enzimas, fueron unidos covalentemente en una reacción catalizada por la *ADN-ligasa* dando como resultado una molécula recombinante la cual fue nombrada *pMt-Thio* (figura 5.1). La reacción de ligación fue realizada manteniendo una relación molecular aproximada de 3:1 entre el inserto y el vector, para lo cual fue necesario determinar la concentración de ADN tanto en el inserto como en el vector (ver TABLA 5.4).

TABLA 5.4.

COMPOSICIÓN DE LA REACCIÓN DE LIGACIÓN

Reactivo	Cantidad (μL)
Buffer 10 X	2
Enzima Ligasa	1
Agua	5.4
Inserto 750 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	2
Plásmido 870 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	11.6
Total	20

5.2.6. Transformación bacteriana

Posteriormente se llevo a cabo la transformación de bacterias calcio-competentes con el plásmido recombinante obtenido por ligación con la finalidad de propagarlo. Se prepararon bacterias calcio-competentes para realizar la transformación con el vector *pMt-Thio*, la cepa utilizada fue la Top10 de *Escherichia coli*. Una vez obtenidas las bacterias calcio-competentes se llevó a cabo la transformación, colocando 80 ng de vector + 150 μ L de bacterias competentes, se aplicó choque térmico bajando la temperatura a 0°C durante 30 min, después a 45°C y finalmente 2 min a 0°C. El producto de la transformación se inoculó en medio LB y se incubó durante 1 h a 37 °C con agitación de 150 rpm, a continuación se sembró en una caja de Petri con agar LB adicionado con ampicilina (25mg/mL) para permitir la selección de las bacterias que adquieren el plásmido, lo cual se traduce en la resistencia a dicho antibiótico.

5.2.7. Caracterización de las clonas recombinantes

Se llevó a cabo la propagación de bacterias recombinantes en matraz con 50 mL de medio LB+amp con el propósito de realizarles una extracción de ADN plasmídico. El ADN fue tratado bajo las condiciones de PCR establecidas para la amplificación del gen MTI y se comprobó su presencia por electroforesis en gel de agarosa.

5.2.8. Optimización de la expresión de la proteína Metalotioneína-Tiorredoxina en la clona recombinante.

Se utilizó un diseño de experimentos 2^3 para analizar las variables de temperatura, concentración de IPTG y agitación sobre la expresión de la proteína de fusión por parte de la clona recombinante trabajando con temperaturas de 28°C y 37°C, concentración de IPTG de 0.250 mM y 0.125 mM, con agitación de 100 y 250 rpm (ver TABLA 5.5). En 100 mL de medio de cultivo utilizado fue LB+amp, una vez que se llegó a la fase exponencial, se agregó IPTG (10µL/mL) y se muestreo a diferentes tiempos (0, 0.5, 1, 2, 6, 24 h), todos los experimentos se realizaron por triplicado.

TABLA 5.5

DISEÑO FACTORIAL 2^3 PARA DETERMINAR CONDICIONES DE MÁXIMA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN.

Experimento	Agitación (rpm)	Temperatura (°C)	[IPTG] mM
1	250	37	0.25
2	100	37	0.25
3	250	28	0.25
4	100	28	0.25
5	250	37	0.13
6	100	37	0.13
7	250	28	0.13
8	100	28	0.13

Se realizó la cuantificación de proteínas totales utilizando el método de Bradford con la finalidad de utilizar la misma cantidad de proteínas totales en el análisis de la expresión máxima de la proteína de fusión. Se colocaron 4 μL de muestra y 196 μL del reactivo de Bradford (BioRad®). La curva de calibración se realizó con suero de albúmina bovina, en el intervalo de 0.875 a 1.4 mg/mL . La mezcla se leyó en un espectrofotómetro a 620 nm . Como referencia se tomó la curva de calibración con albúmina, aunque para cada medición de proteínas se empleó una curva de calibración distinta (Dawson, R.M.C., 1986).

5.2.8.1. Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La electroforesis de proteínas se realizó en un gel de poliacrilamida al 12% (ver TABLA 5.6) en condiciones reductoras, diluyendo las muestras en Buffer de muestra adicionado con 2-mercaptoetanol (SIGMA®). Las condiciones de corrida se mantuvieron a 120V y 60 mA durante 2 h. Finalmente, los geles fueron teñidos con azul de Coomassie® y el peso molecular de las muestras se determinó comparando las bandas obtenidas con el marcador de peso molecular utilizado.

TABLA 5.6.

COMPOSICIÓN DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA

Solución	Gel 12% (10mL)	Gel concentrador (2mL)
H ₂ O	3.3	1.4
Mezcla de Acrilamida 30%	4	0.33
Tris 1.5M (pH 8.8)	2.5	0.25
SDS 10 %	0.1	0.02
APS 10%	0.1	0.02
TEMED	0.004	0.002

5.2.8.2. Ensayos de Remoción de Cadmio y Plomo

De acuerdo a lo reportado con Dávila (2006), se prosiguió a ensayar el porcentaje de remoción de metal que presenta la biomasa modificada. El ensayo consistió en inocular 9 matraces con ~98 mL de caldo LB; tres de ellos se inocularon con *E. coli* TOP 10 y al resto se les agrego ampicilina y se inocularon con la bacteria recombinante, todos se colocaron en agitación con 250 rpm y 37°C, al llegar a la fase exponencial tres matraces con la bacteria recombinante se les agrego el inductor IPTG y después de una hora de crecimiento a 30 °C se añadieron 2 ml de un stock de 1000 mg/l de la solución metálica al medio de cultivo, la concentración inicial de metal en el medio de cultivo fue de 20 mg/l y se tomaron muestras a los 5, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420 y 480 min, las muestras se centrifugaron a 3500 rpm durante 10 min y se determino la

concentración de metal remanente utilizando la técnica de Espectroscopia de Absorción Atómica (APENDICE I). Este procedimiento se realizo de la misma forma tanto para cadmio (II) como para plomo (II).

5.2.9. Cinéticas de Remoción de Metales con Biomasa Libre

Se realizó un diseño de experimentos para la cinética de remoción de metales en 24 h de contacto con plomo(II) y cadmio(II), en un primer experimento se utilizo la biomasa de *E. coli* Top 10, la cual también se utilizo como blanco, y posteriormente se utilizaron la biomasa de la cepa *pMt-Thio* con la previa inducción a la expresión de la proteína de fusión con IPTG, el experimento 1, para cada una de las biomasas consistió poner en contacto la cepa aún en crecimiento con el metal a una concentración de 100 mg/l, tal y como se realizo en los ensayos de remoción para cada metal descritos en la sección anterior, y se tomaron muestras a diferentes tiempos, el experimento 2 consistió en producir la biomasa durante 24 h y posteriormente se separo por centrifugación a 4000 rpm durante 15 min, se lavo con buffer Tris-HCl 0.1M y se coloco en contacto con una solución de 100 mg/L del metal. Tanto el experimento 1 como el 2 se realizaron para las dos biomasas utilizadas, por triplicado con plomo (II) y cadmio (II).

5.2.10. Pruebas de remoción con agentes de inmovilización.

Se realizaron cinéticas de remoción de plomo (II) y cadmio (II) en solución por separado utilizando diferentes matrices poliméricas: alginato de calcio, agarosa, agar-agar. Se prepararon 50 mL de las soluciones de cada matriz polimérica a una concentración de 3% *p/v*. La preparación del Alginato de Calcio consistió en disolver 3 g de alginato de sodio en 100 mL de agua destilada y posteriormente gotear esta solución en una solución de CaCl₂ 0.1M con agitación constante para favorecer la gelificación de las gotas obteniendo el material en forma de esferas de 0.5 cm de diámetro. En el caso de la preparación de la agarosa y el agar-agar también se disolvieron 3 g en 100 mL de agua aplicando calor y agitación constante una vez que la solución alcanzaba la temperatura de 45°C se colocaron diferentes porciones 0.0654 mL sobre un vidrio de reloj, el cual después se colocó dentro de una cámara de enfriamiento rápido que opera con CO₂ sólido (~-40°C) durante 1 min. Una vez obtenidas las esferas del material polimérico se procedió a realizar los ensayos de remoción de plomo (II) y cadmio (II) en solución colocando 10 esferas (0.0320 g) del material polimérico en contacto con 10 mL cada una de las soluciones metálicas de 100 mg/L tomándose muestras a diferentes tiempos (0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24 h).

Posteriormente se realizó el ensayo con la biomasa inmovilizada en alginato de calcio en una proporción 1:1 (biomasa húmeda: alginato de sodio). La biomasa utilizada se obtuvo de un cultivo preparado bajo las condiciones óptimas de expresión de la proteína recombinante después 24 h, la biomasa fue centrifugada a 4500 rpm durante 20 min y se

separo por centrifugación. Una vez que se tuvo la biomasa se mezcló con la solución de alginato de sodio al 3% y se dosificó por gotas a la solución de CaCl_2 0.1M con agitación de 50 rpm para favorecer la gelificación de las esferas. Una vez que se obtuvo el material biosorbente inmovilizado este se lavó en 2 ocasiones con NaCl 0.85%. El biosorbente se mantuvo en la solución de NaCl 0.85% a 4°C hasta que se utilizó en la prueba de remoción (figura 5.3).



Figura 5.3 a) Preparación de la suspensión biomasa: alginato en relación 1:1, b) solidificación del biosorbente en CaCl_2 0.1M, pH~7, 25°C. c) *pMt-Thio* inmovilizada en alginato de calcio, \varnothing 0.5 cm.

Una vez que se obtuvo el biosorbente inmovilizado se prosiguió con el ensayo de remoción de metal colocando 10 esferas (aproximadamente 0.638 g) del material biosorbente en contacto con 10 mL de la solución metálica de 100 mg/L, tomando muestras en diferentes tiempos (0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 24 h) para poder comparar los porcentajes de remoción de la biomasa libre con la biomasa inmovilizada.

5.2.11. Isotermas de adsorción con biomasa inmovilizada

Se realizaron una serie de experimentos de remoción para cada uno de los metales a 25 °C y pH 5 variando la concentración de inicio del metal con la finalidad de determinar la capacidad máxima de adsorción del biosorbente tanto para plomo (II) como para cadmio (II). La serie de experimentos consistió en crecer la biomasa en un matraz bajo las condiciones de expresión óptimas ya establecidas y después de 24 h se separaron las células del medio por centrifugación a 4500 rpm por 15 min y se mezclaron con el alginato de sodio al 3% respetando la proporción 1:1 y se gelifico por goteo en una solución de CaCl₂ 0.1M. Posteriormente se pusieron en contacto 10 esferas del material biosorbente (~0.0638 g) con diferentes concentraciones de cada uno de los metales (5- 300 mg/L) se pusieron en contacto con la solución metálica. Tanto en la biosorción de plomo (II) como en la de cadmio (II) el tiempo que se dejó en contacto fue de 7 h y se monitoreo el avance de la remoción del metal para determinar el coeficiente de Difusión intraparticular, D_i (cm²/min).

5.2.12. Cinéticas de Adsorción en Columna

5.2.12.1. Construcción del reactor en columna de lecho fijo

Para la selección de las dimensiones de este sistema se tomaron en cuenta los resultados obtenidos por diferentes autores que utilizaron sistemas semejantes, así como, el tiempo de residencia y un factor de empaquetamiento del lecho fijo propuestos. De acuerdo con lo anterior se trabajó con los flujos de 40, 60 y 80 mL/min para operar la columna. Utilizando una solución metálica de 100 mg/L , tanto para plomo (II) como para cadmio (II). El flujo de solución metálica fue ascendente para asegurar uniformidad en el contacto con la biomasa para lo cual fue necesario operar con una bomba peristáltica (figura 5.4).

5.2.12.2. Operación de la columna en estado no estacionario

El sistema propuesto consta de una columna con 50 cm de altura de lecho fijo por 5 cm de diámetro, el lecho fijo consistió de biomasa inactiva inmovilizada en alginato de calcio (figura 5.5). Las caídas de presión dentro de la columna fueron despreciadas debido a la fracción de lecho fijo que se utilizó. (TABLA 5.7)

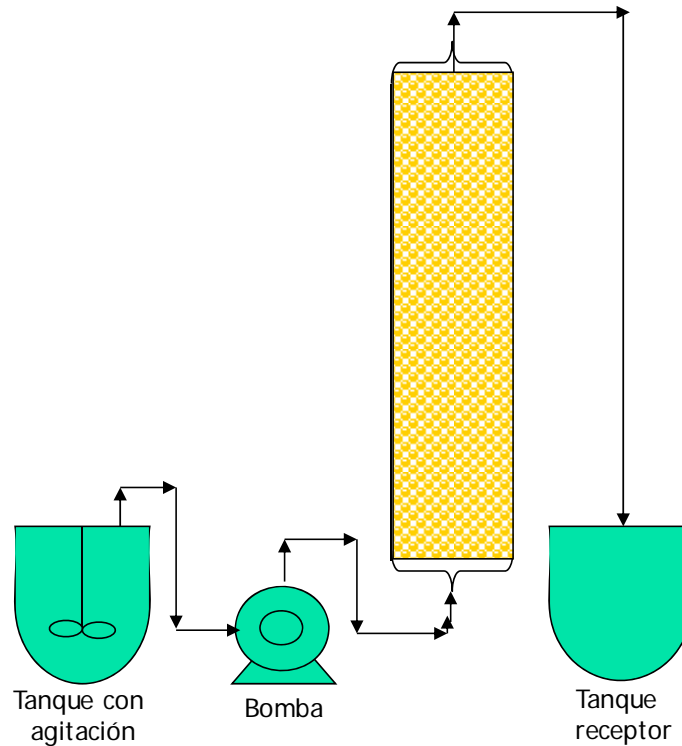


Figura 5.4 Construcción del reactor en columna de lecho fijo que opera en estado no estacionario.

TABLA 5.7

CONDICIONES DE OPERACIÓN DE LAS COLUMNAS DE BIOSORCIÓN DE PLOMO (II) Y CADMIO (II)

COLUMNA DE BIOSORCIÓN DE LECHO FIJO	
Área transversal de la columna	19.63 cm ²
Volumen total de la columna	981.74 mL
Fracción de espacio hueco	0.3 (294.52 mL)
Fracción de empaque	0.7 (687.22 mL)
Densidad de solución ρ_{sol}	0.9967~ 1.0 g/mL
Viscosidad de la solución metálica μ_{sol}	0.5340~0.6 g/cm/min
Altura de empaque de columna	50 cm
Concentración metálica	100 mg/L

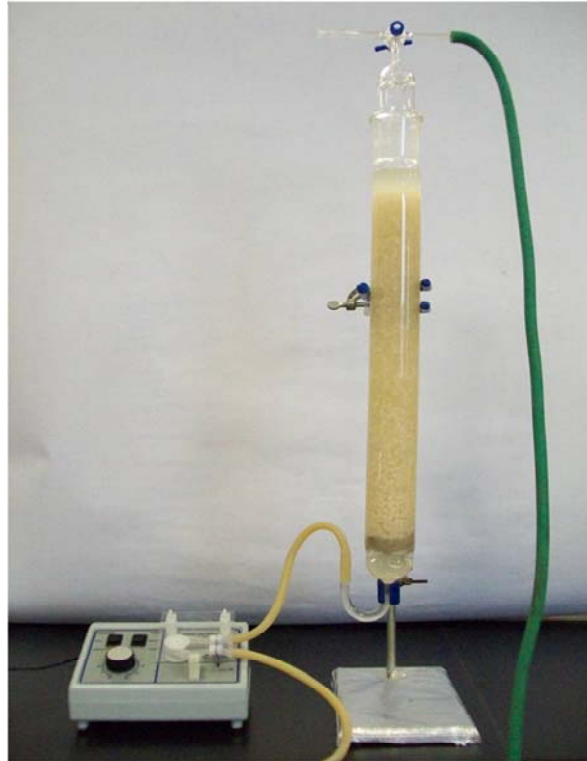


Figura 5.5 Operación de la columna en estado no estacionario

5.2.12.3. Modelo matemático de la difusión y modelo de sorción en la columna lecho fijo

Con los resultados obtenidos en la operación de la columna a las diferentes condiciones (Ver APÉNDICE II) se realizó el modelo matemático de la bioadsorción de metales en el reactor en columna de lecho fijo para determinar el coeficiente de transferencia de masa para cada una de las corridas experimentales realizadas, el cual se detalla a continuación.

Para el desarrollo del modelo, se tomo como referencia lo publicado por Aksu y Kutsal (1998) en su trabajo de remoción de cobre utilizando un reactor en columna empacado con biomasa de alga inmovilizada. Ellos consideraron diferentes

características tales como: a) las partículas de biosorbente no son porosas, b) biosorbente en forma esférica y c) la biosorción solo se refiere a un proceso de adsorción en superficie. En esta investigación se utilizó la biomasa de *pMt-Thio* inmovilizada en alginato de calcio para la remoción de plomo (II) y cadmio (II). Sin embargo es bien sabido que los pellets de alginato de calcio que contienen la biomasa de estudio presentan cierta porosidad (Prouzet, E. *et. al.* (2006); Idris, A. *et. al.* (2006)). Así que para este estudio se hicieron las siguientes consideraciones; a) Proceso isotérmico, b) Fracción de espacios huecos en la columna constante, c) unidades de biosorbente presentan porosidad, d) todas las unidades de biosorbente con las que se trabajaron presentaban formas esféricas, e) la biosorción de los iones metálicos se desarrollo principalmente en tres pasos: difusión externa de la solución a la superficie del biosorbente, adsorción superficial en el biosorbente, y difusión al interior del biosorbente. Por lo anterior el modelo del que se tomo referencia se extendió a considerar estas variables. Para comenzar con la propuesta fue necesario establecer el diferencial del balance de masa en la columna de lecho fijo el cual está dado por la ecuación 1 (Weber Jr, *et. al.*, 1991)

$$v_{sol} \frac{\partial C}{\partial L} + \frac{\partial C}{\partial t} + \rho_P \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \frac{\partial q}{\partial t} = D_L \frac{\partial^2 C}{\partial L^2} \quad (5.1)$$

Donde C es la concentración metálica en la fase líquida (mg/L), L es la coordenada axial con origen en la entrada de la columna (cm), ε es la fracción de espacio hueco dentro del empaquetamiento, v_{sol} es la velocidad intersticial de la solución en la columna (cm/min), ρ_P es la densidad de la biomasa inmovilizada (mg/m^3), q es la concentración del metal sorbida por unidad de biosorbente (mg/g), D_L es el coeficiente de dispersión axial y t representa el tiempo (min). Si despreciamos el coeficiente de dispersión axial,

considerando un estado estacionario (equilibrio) antes del punto en el cual la concentración del efluente en la salida comienza a incrementarse rápidamente, entonces la ecuación 1 se escribe de esta forma:

$$v_{sol} \frac{dC}{dL} = -\rho_P \frac{1-\varepsilon}{\varepsilon} \frac{dq}{dt} \quad (5.2)$$

Y si consideramos que $G = \rho_P(1-\varepsilon)A_{col}L \times 10^{-3}$ y $F = \varepsilon v_{sol}A_{col}$, la ecuación 2 puede ser expresada como

$$\frac{FL}{-G} \frac{dC}{dL} \times 10^{-3} = \frac{dq}{dt} \quad (5.3)$$

Donde F es la velocidad de flujo volumétrico del ion metálico dentro de la columna de lecho fijo (mL/min), G es la cantidad de biosorbente utilizada en el lecho (g) y A_{col} es el área de la sección transversal de la columna (cm^2).

El término $\frac{dq}{dt}$ representa la velocidad local de remoción de metal por efecto de la adsorción superficial y la difusión hacia dentro del pellet ($mg/g/min$). Diferentes modelos dinámicos han sido reportados para la remoción de plomo (II) y cadmio (II) los cuales difieren principalmente en la expresión que representa la velocidad de sorción. En este trabajo se asumió que la remoción neta de ambos metales es debida a un fenómeno de tipo saturación por adsorción superficial (AS) acompañado de la difusión del intraparticular en este caso refiriendo al biosorbente (DI). Así entonces la relación entre la velocidad de remoción de los iones metálicos en cuestión por $AS + DI$ y la concentración del ion metálico en equilibrio esta dado por

$$\frac{dq}{dt} = \frac{k_{adi}C}{1+KC} \quad (5.4)$$

Donde k_{adi} y K son las constantes de velocidad de remoción ($l/g/min$) por $AS + DI$ y la constante de remoción (l/g) respectivamente. Por lo anterior podemos utilizar la ecuación 5.3 en la ecuación 5.4 para obtener,

$$\frac{FL}{-G} \frac{dC}{dL} \times 10^{-3} = \frac{k_{adi}C}{1+KC} \quad (5.5)$$

Y si integramos la ecuación 5 considerando que $L = 0; C=C_o$ y $L=L; C=C$:

$$\ln \frac{C_o}{C} = \left(-\frac{G}{F}\right) k_{adi} \times 10^{-3} + K(C_o - C) \quad (5.6)$$

Donde C_o y C son la concentración de metal inicial y a la salida (mg/L) respectivamente. k_{adi} y K se determinaron por la grafica de $\ln \frac{C_o}{C}$ vs. (C_o-C) .

Considerando que el transporte del ion metálico de la solución a la superficie del biosorbente inmovilizado empacado en la columna puede ser correlacionado con algunos números dimensionales importantes los cuales caracterizan las condiciones del flujo y permiten el escalamiento se procedió a encontrar la forma de determinar dichos parámetros lo cual se explica a continuación.

El coeficiente de masa externo (de la solución a la superficie del biosorbente) puede ser estimado usando la correlación de Wakao y Funazkri (1978) (ecuación 5.7), para relacionarlo con el Número de Sherwood (N_{Sh}), Número de Reynolds (N_{Re}) y el número de Schmidt (N_{Sc}).

$$N_{Sh} = 2.0 + 1.1 N_{Sc}^{\frac{1}{3}} N_{Re}^{\frac{3}{5}}, \text{ aplicable con } 3 < N_{Re} < 10,000 \quad (5.7)$$

El número de Sherwood está relacionado al coeficiente de masa externo y a la difusividad externa por,

$$N_{Sh} = \frac{k_e d_m}{D_e} \quad (5.8)$$

Donde k_e es el coeficiente de transferencia de masa entre el biosorbente y los iones metálicos de la solución (cm/min), d_m es el diámetro de la esfera del biosorbente (cm) y D_e es la difusividad del ion metálico en solución (cm^2/min).

La difusividad del metal, se explica a través de la teoría de la difusión de un electrolito cuando se encuentra en una solución diluida simple (es decir con la presencia de solo un ion metálico) mejor conocida como la ecuación de *Nernst-Haskell* (ecuación 5.9) la cual se aplica para definir la difusividad externa de los iones en solución. (Longworth, L.G.; 1972)

$$D_e = \frac{RT}{F_N^2} \left[\frac{\frac{1}{z^+} + \frac{1}{z^-}}{\frac{1}{\lambda^+} + \frac{1}{\lambda^-}} \right] \times 60 \quad (5.9)$$

Donde R es la constante de gases ideales ($J/mol/K$), T es la temperatura absoluta (K), F_N es la constante de Faraday ($96500 C/g \cdot eq$), z^+ y z^- son las valencias del catión y el anión respectivamente, y λ^+ y λ^- son las conductancias cationica y anionica a dilución infinita ($mos/g \cdot eq$). La multiplicación del factor 60 en la ecuación 5.9 es utilizada para cambiar las unidades de D_e de cm^2/s a cm^2/min .

El número de Reynolds en el reactor en columna de lecho fijo está definido de la siguiente forma:

$$N_{Re} = \frac{d_m v_{sol} \rho_{sol}}{\mu_{sol}} \quad (5.10)$$

Donde ρ_{sol} es la densidad del metal contenida en la solución (g/mL) y μ_{sol} es la viscosidad del metal contenido en la solución ($g/cm/min$).

El número de Schmidt en el lecho fijo está definido como,

$$N_{Sc} = \frac{\mu_{sol}}{\rho_{sol} D_e} \quad (5.11)$$

El valor de k_e puede ser determinado de la ecuación 5.7 a diferentes velocidades de flujo de la solución metálica en el reactor de lecho fijo. La difusión hacia dentro de la esfera del biosorbente debida a la porosidad que presenta puede ser estimada utilizando la ecuación de Urano y Tachikawa (1991),

$$-\ln \left[1 - \left(\frac{q}{q_e} \right)^2 \right] = \frac{4\pi^2 D_i t}{d_m^2} \quad (5.12)$$

Donde D_i es la difusión intraparticular (cm^2/min), t es el tiempo (min), y q y q_e son la capacidad de remoción del metal a cualquier tiempo y en equilibrio (mg/g) respectivamente. Esto fue asumido sin considerar el efecto de la velocidad del flujo sobre la difusividad hacia dentro del biosorbente. Para estimar el valor de q y q_e , los datos de los experimentos por lote fueron utilizados, aplicando las siguientes ecuaciones.

$$q = \frac{(C_{ob} - C_b)V}{G_b \times 1,000} \quad (5.13)$$

$$q_e = \frac{(C_{ob} - C_{eb})V}{G_b \times 1,000} \quad (5.14)$$

Donde C_{ob} es la concentración inicial del ion metálico en el sistema por lotes, C_b es la concentración a tiempo t , también en el sistema por lotes, V es el volumen de la solución metálica (L) y G_b es la cantidad de biosorbente (g) utilizada en dicho sistema.

Así entonces la ecuación 5.15 se obtiene de sustituir las ecuaciones 5.13 y 5.14 en la ecuación 5.12

$$-\ln \left[1 - \left(\frac{C_{ob} - C_b}{C_{ob} - C_{eb}} \right)^2 \right] = \frac{4\pi^2 D_i t}{d_m^2} \quad (5.15)$$

De igual forma, el coeficiente de transferencia de masa intraparticular (k_i) puede ser estimado considerando la siguiente relación (Treybal, R.E.; 1984)

$$k_i = \frac{10D_i}{d_m \phi_s} \quad (5.16)$$

Donde ϕ_s es la esfericidad de las unidades del biosorbente que conforma la cama inmovilizada.

Considerando la velocidad de transferencia de masa externa, la velocidad de adsorción y la velocidad de transferencia intraparticular, los iones metálicos son transportados de la solución hacia la interface solido-líquido (superficie externa del biosorbente inmovilizado) y la adsorción ocurre en la superficie externa del biosorbente donde se comienza la difusión del ion metálico hacia dentro del mismo (intraparticular). La velocidad del transporte de los iones metálicos a la superficie del biosorbente puede ser expresada como

$$r_s = k_e A_p (C - C_s) \times 10^{-3} \quad (5.17)$$

Donde r_s es la velocidad de transferencia de masa externa ($mg/g/min$), A_p es el área de la superficie externa por unidad de peso de la cama inmovilizada (cm^2/g), y C_s es la concentración de ion metálico adsorbido sobre la cama inmovilizada (mg/L).

La velocidad de remoción de los iones metálicos en solución debida a la combinación de los efectos de la adsorción en superficie y la difusión hacia dentro del biosorbente puede ser descrita por una ecuación de la velocidad de remoción simple de primer orden, especialmente a bajas concentraciones de ion metálico. Dicha ecuación qued descrita de la siguiente manera:

$$r_{adi} = k_{adi} C_s \quad (5.18)$$

Por lo tanto la resistencia, $\left(\frac{1}{k_{adi}}\right)$ debida a la adsorción superficial así como la intraparticular puede ser dividida en dos partes: la resistencia provocada por la adsorción en superficie $\left(\frac{1}{k_{ad}}\right)$ y la resistencia provocada por la difusión intraparticular $\left(\frac{1}{k_i}\right)$, esto es:

$$\frac{1}{k_{adi}} = \frac{1}{k_i} + \frac{1}{k_{ad}} \quad (5.19)$$

donde k_{ad} es la constante de velocidad de la adsorción en superficie

En el equilibrio $r_s = r_{adi}$ por lo tanto

$$k_e A_p (C - C_s) \times 10^{-3} = \frac{1}{\frac{1}{k_{ad}} + \frac{1}{k_i}} C_s \quad (5.20)$$

$$C_s = \frac{k_e A_p}{\frac{10^3}{\frac{1}{k_{ad}} + \frac{1}{k_i}} + k_e A_p} C \quad (5.21)$$

La velocidad e remoción total tanto por *AS* como por *DI* puede ser expresada utilizando la ecuación 5.18 en términos de *C* quedando de la siguiente forma:

$$r_{adi} = \frac{1}{k_i} + \frac{1}{k_{ad}} \frac{k_e A_p}{\frac{10^3}{\frac{1}{k_{ad}} + \frac{1}{k_i}} + k_e A_p} C = \frac{1}{\frac{10^3}{k_e A_p} + \frac{1}{k_{ad}} + \frac{1}{k_i}} C = k_o C \quad (5.22)$$

$$\text{Donde } k_o = \frac{1}{\frac{10^3}{k_e A_p} + \frac{1}{k_{ad}} + \frac{1}{k_i}} \quad (5.23)$$

y k_o es la constante de velocidad de primer orden.

La cantidad total del ion metálico captada (M_c , *mg*) en los experimentos en la columna fue calculada a través de la determinación del área bajo la curva de $C_{ad} = (C_o - C_s)$ vs. tiempo (*t*) considerando la concentración de metal alimentada a la columna y la velocidad del flujo. Esto puede ser expresado de la siguiente forma,

$$M_c = \frac{F}{1000} \int_{t=0}^{t=t_{total}} C_{ad} dt \quad (5.24)$$

Mientras que la cantidad total de ion metálico que queda dentro de la columna (M_{total}) puede ser calculada como,

$$M_{total} = \frac{C_o F t_{total}}{1000} \quad (5.25)$$

El porcentaje de remoción total (%RM) se calcula así

$$\%RM = \left(\frac{M_u}{M_{total}} \right) \times 100 \quad (5.26)$$

Experimentalmente, la velocidad de remoción tanto de plomo (II) como de cadmio (II) (r_{adie}) se calcula,

$$r_{adie} = \frac{M_u}{G \times t_{total}} \quad (5.27)$$

El tiempo de residencia (τ) de la solución dentro de la columna se calcula utilizando la siguiente ecuación,

$$\tau = \frac{A_{col} \times L \times \varepsilon}{F} \quad (5.28)$$

CAPÍTULO 6

RESULTADOS Y DISCUSIONES

CAPÍTULO VI

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Extracción de ARN del tejido hepático

Se indujo la expresión de las metalotioneínas en dos ratones al intoxicarlos con una solución de Cadmio/Mercurio. Los ratones intoxicados mostraron conducta de ansiedad posterior a la intoxicación, así como movimientos involuntarios repetitivos (temblor) y erizamiento capilar, esta actividad disminuyó hasta presentar un estado de aletargamiento y déficit de movimientos. A las 6 h de intoxicación, se sacrificaron y se extrajo el tejido hepático para obtener el ARN total (figura 6.1).

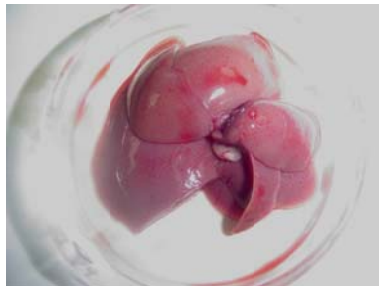


Figura 6.1. Hígado obtenido del ratón intoxicado con la solución de Cd/Hg

Se obtuvieron aproximadamente 50 μg de ARN de cada muestra original consistente en un pequeño trozo de tejido hepático, las cuales se suspendieron en 50 μL de agua estéril. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa para observar las condiciones de la muestra y descartar aquellas que estuvieran degradadas. De estas muestras se optó por usar solo la muestra 1 de las obtenidas ya que se observaron con menor degradación en la electroforesis en gel de agarosa (figura 6.2).

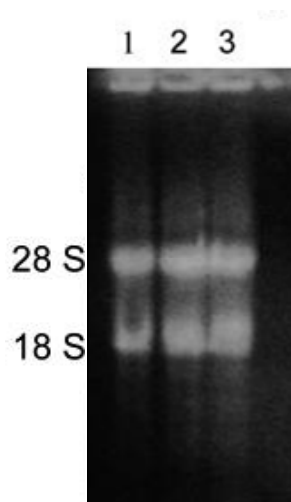


Figura 6.2 Electroforesis en gel de agarosa para comprobar la pureza e integridad del ARN extraído a partir de tejido hepático y renal de ratón.

Amplificación del gen de la Metalotioneína I.

Se procedió a realizar la amplificación del gen de la MT1 bajo las condiciones anteriormente descritas utilizando el ADNc sintetizado a partir de la reacción de retrotranscripción del ARN extraído. De acuerdo al resultado que se obtuvo en la electroforesis, la amplificación del gen de la Metalotioneína I de aproximadamente 200 pb se obtuvo al trabajar la temperatura de alineación a 55 °C. En tales muestras se observa claramente la presencia de una única y clara banda del tamaño esperado por el fragmento que se amplificó (204 pares de bases) correspondiente a los 186

nucleótidos del gen y los 9 nucleótidos a cada extremo añadidos artificialmente para preparar al inserto amplificado para su digestión con las enzimas de restricción que permitieran su clonación. (Figura 6. 3)

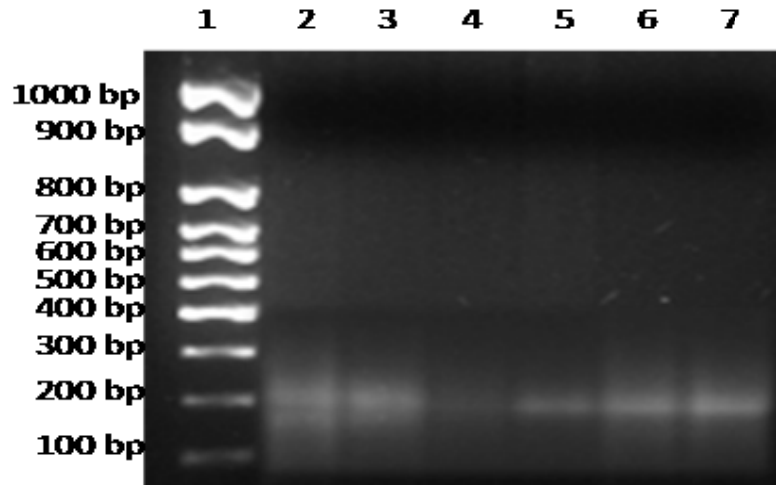


Figura 6.3 Electroforesis en gel de agarosa con gradiente de temperatura que muestra el producto amplificado por PCR correspondiente al gen de la MT1 de ratón. Carril 1 marcador de peso molecular, carril 2; 53°C, carril 3; 55°C, carril 4; blanco, carril 5; 57°C, carril 6; 58°C, carril 7; 59°C.

Construcción del vector recombinante que codifica para la proteína de fusión *Thio-Mt*.

Una vez amplificado el fragmento se procedió a clonarlo en el vector plasmídico *pThio-His A*, para lo cual fue necesario digerir ambos con las enzimas de restricción *Xba I* y *Kpn I*. Se llevó a cabo la ligación obteniendo excelentes resultados de la clonación, que se comprobaron realizando la digestión del plásmido recombinante con las enzimas de restricción *Kpn I* y *Xba I* y se realizó electroforesis en gel de agarosa 1% donde se observan las bandas correspondientes a el vector y al inserto (figura 6.4).

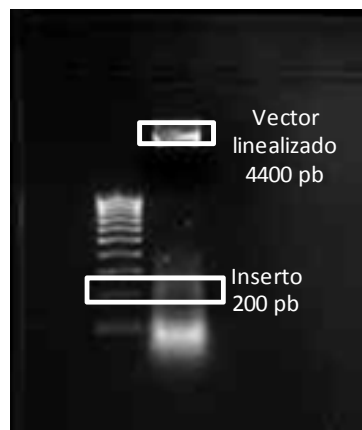


Figura 6.4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% que muestra la clonación del gen de la MT I en el plásmido *pThio-His A*. En el carril 1 se presenta el marcador de peso molecular, en el carril 2, el vector recombinante con el inserto *pMt-Thio* digerida con las enzimas *Kpn I* y *Xba I* para liberar el inserto y observar su tamaño.

Transformación Bacteriana.

La transformación bacteriana fue comprobada por el crecimiento de las bacterias modificadas en el medio sólido adicionado con ampicilina, esto permitió la selección de las bacterias que adquirieron el plásmido, lo cual se traduce en la resistencia a dicho antibiótico (figura 6.5).

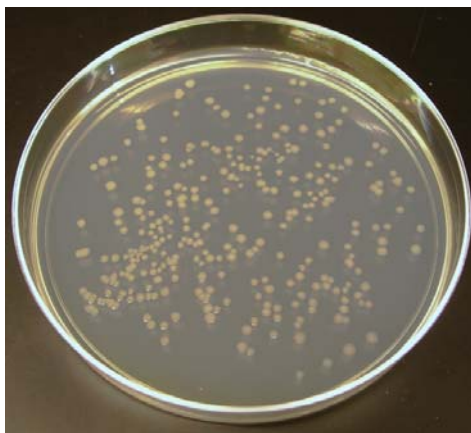


Figura 6.5. Crecimiento de clonas recombinantes en medio LB adicionado con ampicilina, incubado a 37 °C en posición invertida durante 16 h.

Caracterización de las clonas recombinantes

Se levantaron diferentes colonias las cuales fueron sembradas en medio LB+amp líquido con la finalidad de propagarlas, posteriormente se tomo una muestra la cual fue centrifugada y tratada para la extracción del ADN plasmídico. Una vez que se obtuvo se llevo a cabo la digestión con las enzimas de restricción *Kpn I* y *Xba I*, y se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1% donde se observaron claramente que tres de ellas presentaron los fragmentos correspondientes a la digestión realizada (figura 6.6).

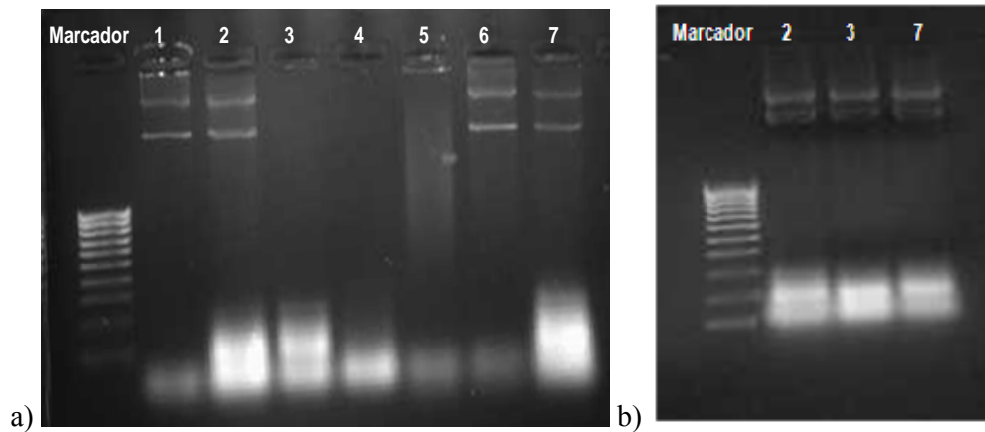


Figura 6.6. Electroforesis en gel de agarosa de la digestión con *Kpn I* y *Xba I* del ADN plasmídico de a) siete colonias positivas a la transformación; b) comprobación de las colonias 2, 3 y 7.

Curva de crecimiento bacteriano

Las curvas de crecimiento que corresponden al cultivo de la bacteria nativa *Escherichia coli* Top10 utilizada en este trabajo experimental, así como de la clona *pMt-Thio* se pueden observar en la figura 6.7. Podemos observar que las dos inician su fase exponencial prácticamente al mismo tiempo, 120 *min* y terminan cerca de los 420 *min*. El comportamiento de crecimiento de la bacteria modificada no cambia; aún después de haber agregado el inductor IPTG el crecimiento continua de forma similar al de la cepa *E. coli* TOP 10 (TABLA 6.1).

TABLA 6.1

VALORES DE LAS LECTURAS DE ABSORBANCIA DURANTE LA CURVA DE CRECIMIENTO BACTERIANA DE *E. coli* TOP10 Y LA CLONA RECOMBINANTE *pMt-Thio*

Tiempo (min)	Absorbancia (nm)	
	<i>E. coli</i> TOP10	<i>pMt-ThioA</i>
30	0.026	0.027
60	0.110	0.100
90	0.175	0.149
120	0.374	0.310
150	0.589	0.510
180	0.796	0.729
210	0.969	0.928
240	1.079	1.097
270	1.164	1.174
300	1.209	1.24
330	1.265	1.295
360	1.317	1.341
390	1.356	1.385
420	1.448	1.415
450	1.433	1.446
480	1.442	1.465

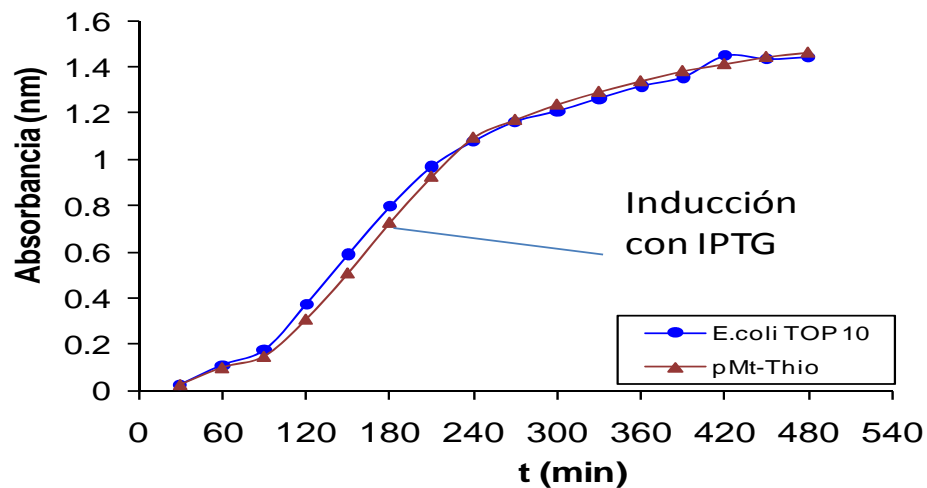


Figura 6.7. Curva de crecimiento de *E. coli* TOP 10 y la cepa modificada *pMt-Thio* a la cual se indujo a la expresión de la proteína recombinante con IPTG. Condiciones: 150 rpm, 35°C, 0.25 mM IPTG.

Detección de la proteína de fusión mediante SDS-PAGE

Para la detección de la proteína expresada se empleó la electroforesis en gel de poliacrilamida 12% y posteriormente tinción con azul de Coomassie®. Las bandas obtenidas (~ 21 kDa) demostraron un considerable incremento en la expresión de la proteína en función del tiempo de cultivo. Se puede observar que la sobreexpresión inicia desde la primera hora después de la inducción con IPTG 0.25 mM (figura 6.8).

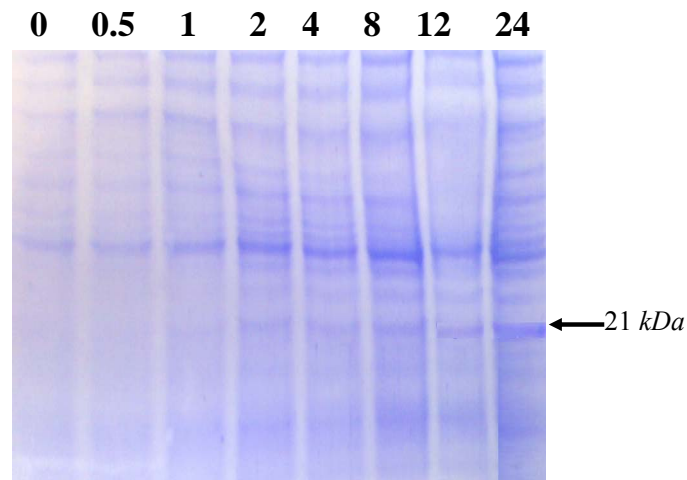


Figura 6.8 Cinética de expresión de la proteína de fusión durante 24 h de crecimiento después de la inducción con IPTG. Condiciones: 150 rpm, 35°C, 0.25 mM IPTG, gel de poliacrilamida al 12% y tinción con azul de Coomassie.

Optimización de la expresión de la proteína Metalotioneína-Tiorredoxina en la clona recombinante

Cuantificación por Bradford (Proteínas Totales)

La cuantificación de proteína total obtenida a partir de los lisados celulares y los sobrenadantes de cada experimento se realizó mediante el método de Bradford (Bradford, M.M; 1976) para lo cual fue necesario realizar una curva de calibración con diferentes concentraciones de Suero de Albúmina Bovina (BSA) (figura 6.9).

Se evidenció que el sobrenadante contiene aproximadamente la misma concentración de proteína total en las diferentes condiciones de expresión de la proteína recombinante, no así para los lisados celulares (TABLA 6.2).

Para la serie de experimentos realizados, el análisis de los efectos de los factores y sus interacciones (TABLA 6.3) muestra que la respuesta obtenida a niveles bajos de agitación (A) y temperatura (B) es mayor que para el caso de los niveles altos, y de acuerdo al diagrama de Pareto (figura 6.10) se puede decir que los factores A y B, en sus niveles bajos son los más importantes en la producción de proteínas totales. En el análisis del factor de la concentración de IPTG (C) este no presenta el mismo comportamiento sin embargo al analizar sus interacciones con el resto de los factores se encontró mejor resultado al manejarlo a niveles bajos.

TABLA 6.2

CONCENTRACIÓN DE PROTEINAS TOTALES OBTENIDAS EN EL DISEÑO FACTORIAL 2^3 PARA DETERMINAR CONDICIONES DE MÁXIMA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA DE FUSIÓN.

Experimento	Agitación (rpm)	T (°C)	[IPTG] (mM)	[P] _T	[P] _T
				(Fase Insoluble) ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	(Fase Soluble) ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
1	250	37	0.250	0.732±0.0879	0.467±0.0226
2	100	37	0.250	0.765±0.0622	0.485±0.0559
3	250	30	0.250	1.052±0.1836	0.491±0.0089
4	100	30	0.250	1.027±0.1381	0.457±0.0561
5	250	37	0.125	0.555±0.0317	0.518±0.0495
6	100	37	0.125	0.821±0.0307	0.412±0.0046
7	250	30	0.125	1.051±0.1115	0.416±0.1691
8	100	30	0.125	0.837±0.0848	0.364±0.0404

TABLA 6.3

ANÁLISIS DE LOS EFECTOS PRESENTADOS POR LOS FACTORES Y SUS INTERACCIONES EN LAS DIFERENTES CONDICIONES PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEINAS TOTALES.

FACTOR	Av(+)	Av(-)	Δ	$ \Delta/2 $
A	0.848	0.863	-0.015	0.007
B	0.718	0.992	-0.274	0.137
C	0.894	0.816	0.078	0.039
AB	0.644	0.932	-0.289	0.144
AC	0.892	0.829	0.063	0.032
BC	0.749	0.944	-0.196	0.098
ABC	0.732	0.837	-0.105	0.053

A: Agitación
B: Temperatura
C: [IPTG]

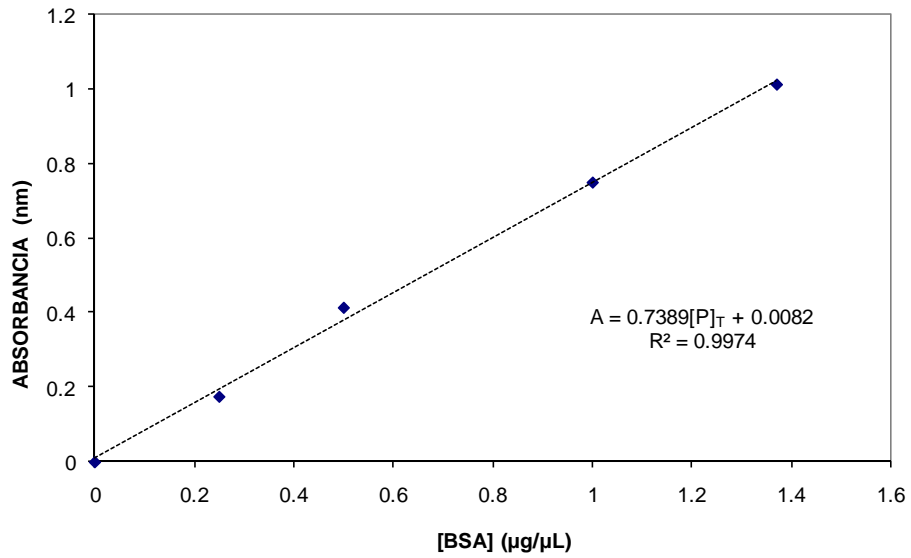


Figura 6.9 Curva de calibración de BSA para la cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford.

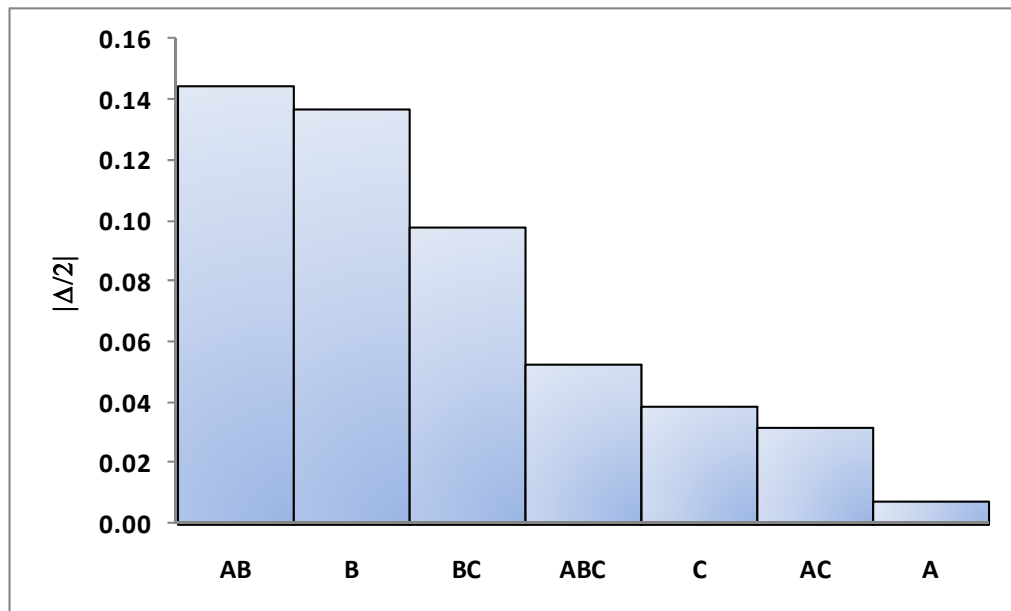


Figura 6.10 Diagrama de Pareto para la mitad de los efectos $|\Delta / 2|$ producidos en la expresión de proteínas totales.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

La proteína de fusión fue localizada en los lisados celulares en donde la expresión máxima de la misma se obtuvo a 100 *rpm* y 30 °C utilizando IPTG a una concentración 0.25 *mM* como factor de inducción (figura 6.11), lo cual corrobora lo ya reportado en la cuantificación de proteínas totales, la proteína no es secretada al medio. La proteína se localiza en el periplasma en todas las condiciones experimentales mostrando diferentes niveles de expresión en un peso molecular esperado de 21 *kDa* (figura 6.10a). Los resultados obtenidos coinciden con los encontrados por Wei Chen Kao *et. al.* (2006) al fusionar la MT I de ratón a la MBP (Maltosa-binding protein) en *E. coli* utilizando el vector pMAL-p2X. Este comportamiento favorece la función de la proteína para enlazar metales ya que su posición en el periplasma favorece la transferencia de masa, no así en aquellos sistemas en los cuales la MT se expresa en el citoplasma en donde existe un impedimento al proceso de transferencia de masa (Huang C.C. *et. al.*, 2003).

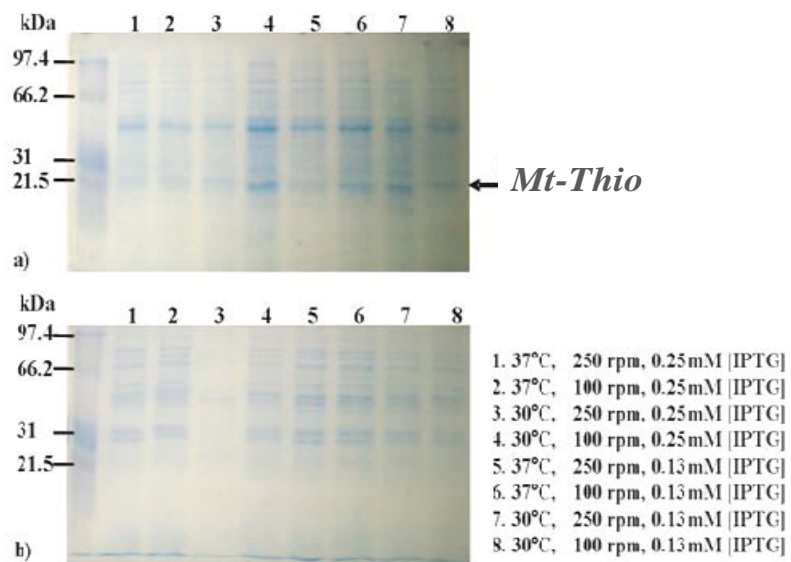


Figura 6.11. Localización de la proteína de fusión *Mt-Thio* en geles de poliacrilamida al 12% a) espacio periplásmico, b) fracción citoplasmática. Las muestras fueron colectadas con 2 h de incubación después de la inducción.

Ensayos de Remoción de Cadmio y Plomo

Los experimentos realizados con la cepa control *E. coli* y la *pMt-Thio* con y sin inductor marcan la evidencia de remoción de metal debida a la presencia de la proteína quimérica (TABLA 6.4 y 6.5), donde se puede observar que la cepa control tiene muy bajos porcentajes de remoción aunque marca una ligera tendencia a incrementar.

Este comportamiento también se presenta en la cepa *pMt-Thio* sin inductor, sin embargo, esta presenta porcentajes de remoción alrededor del 50% tanto en la remoción de cadmio como en la plomo. El mayor porcentaje de remoción lo presento la cepa *pMt-Thio* con inductor la cual mostró un ~70% de remoción de cadmio y un ~86% de remoción de plomo cerca de las 4 h de contacto. Después de presentar su máximo porcentaje de remoción, estos comenzaron a decrecer. Al final de la cinética el porcentaje de remoción para cadmio (II) disminuyo 84%, mientras que para plomo (II) disminuyo 76% de su máximo porcentaje alcanzado (figura 6.12 y 6.13).

TABLA 6.4

RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE REMOCIÓN DE CADMIO (II) USANDO *E. coli* TOP 10 Y *pMt-Thio* CON Y SIN INDUCCIÓN. CONDICIONES 100 rpm, 30°C, [IPTG] 0.13 mM, pH 5.

t (min)	Concentración Residual (mg/L)		
	<i>E. coli</i>	<i>pMt-Thio</i>	<i>pMt-Thio</i> +Inductor
0	20.245±0.658	19.938±1.417	20.943±1.007
5	19.840±0.645	19.738±1.403	20.734±0.997
15	19.642±0.639	18.751±1.333	19.697±0.947
30	18.018±0.586	17.745±1.261	15.708±0.755
60	17.838±0.580	17.282±0.759	11.781±0.566
120	17.659±0.574	17.110±0.751	8.835±0.425
180	16.070±0.523	8.555±0.376	6.214±0.505
240	15.909±0.517	8.469±0.372	6.152±0.500
300	15.114±0.492	8.385±0.368	12.359±1.005
360	14.963±0.487	8.301±0.364	18.499±1.504
420	14.813±0.482	8.218±0.361	18.480±1.502
480	14.665±0.477	8.136±0.357	18.462±1.501

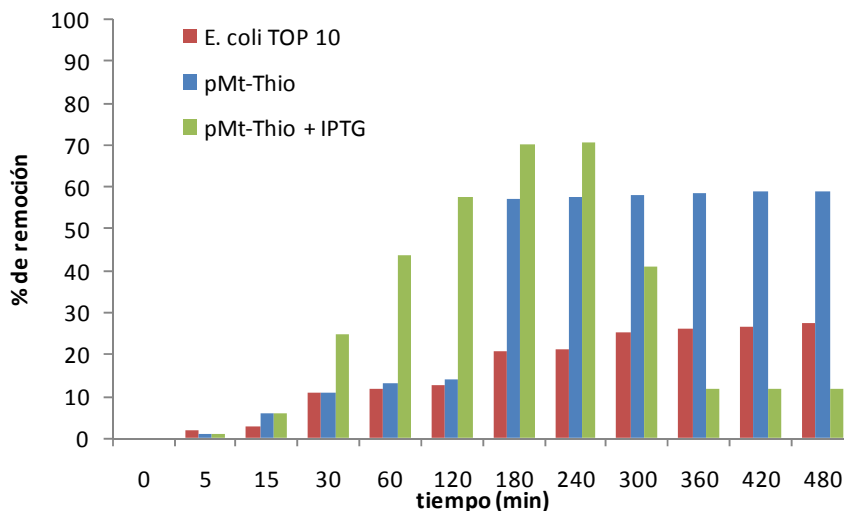


Figura 6.12 Porcentajes de remoción de cadmio (II) utilizando *E. coli* TOP 10 como control y *pMt-Thio* con y sin inducción. Concentración de IPTG: 0.130 mM

TABLA 6.5

RESULTADOS DE LOS ENSAYOS DE REMOCIÓN DE PLOMO (II) USANDO
E. coli TOP 10 Y *pMt-Thio* CON Y SIN INDUCCIÓN.
 CONDICIONES 100 rpm, 30°C, [IPTG] 0.13 mM, pH 5.

t (min)	Concentración Residual (mg/L)		
	<i>E. coli</i>	<i>pMt-Thio</i>	<i>pMt-Thio</i> +Inductor
0	19.767±0.747	20.273±0.909	20.981±1.126
5	19.440±0.851	19.813±1.336	20.492±1.232
15	19.183±0.903	18.823±1.269	19.468±1.171
30	17.601±1.031	17.906±0.777	16.575±0.890
60	17.425±1.021	17.727±0.769	7.459±0.400
120	16.554±0.970	17.549±0.761	4.848±0.260
180	15.064±0.882	9.242±0.890	3.830±0.206
240	14.913±0.874	9.150±0.881	2.987±0.160
300	14.168±0.830	9.058±0.873	6.815±0.366
360	14.026±0.822	8.908±0.878	9.795±0.526
420	13.886±0.813	8.695±0.784	16.600±0.891
480	13.747±0.805	8.248±0.572	16.584±0.890

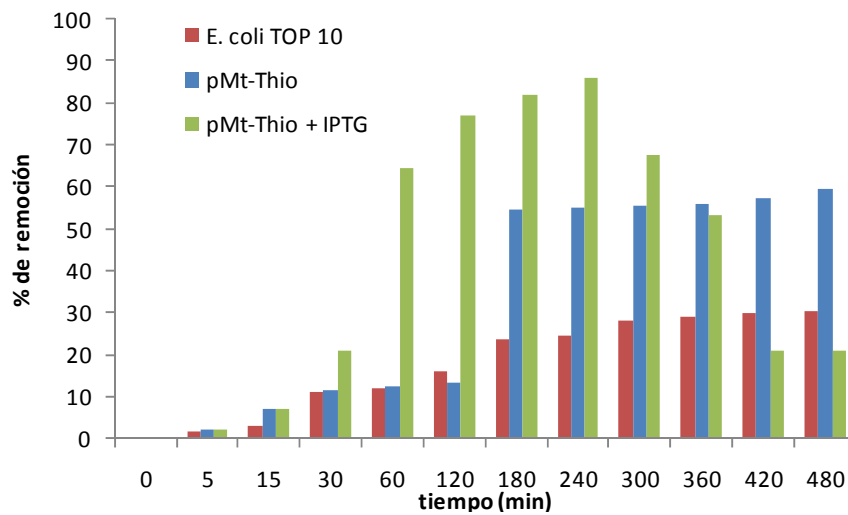


Figura 6.13 Porcentajes de remoción de plomo (II) utilizando *E. coli* TOP 10 como control y *pMt-Thio* con y sin inducción. Concentración de IPTG: 0.130 mM

Cinéticas de Remoción de Metales con Biomasa Libre

Los resultados marcaron que la biomasa de la cepa recombinante inducida a la expresión de la proteína de fusión tiene mejores resultados sobre la remoción de metales (TABLAS 6.6 y 6.7), y que este resultado se favorece aún más cuando se trabaja con la biomasa inactiva metabólicamente (sin presencia de nutrientes). Los resultados obtenidos en estas cinéticas de sorción se ajustaron al modelo de la cinética de segundo orden (ecuación 6.1) con la finalidad de determinar la afinidad del biosorbente por el metal (figuras 6.14 y 6.15).

$$\frac{t}{c_e} = \frac{1}{C_m^2 k} + \frac{1}{C_m} t \quad (6.1)$$

Se encontró que la biomasa inactiva de la *pMt-Thio* previa inducción a la expresión de la proteína recombinante tiene mayor afinidad a los iones plomo (II) ($k_m = 0.90 \text{ L}/(\text{mg} \cdot \text{h})$) que a los iones cadmio (II) ($k_m = 0.25 \text{ L}/(\text{mg} \cdot \text{h})$) removiendo al final de la cinética un 94.74% del plomo en la solución mientras que para cadmio removió alrededor de un 35.22%.

TABLA 6.6

RESULTADOS DE LAS CINÉTICAS DE REMOCIÓN DE CADMIO (II)
UTILIZANDO *E. coli* TOP 10 Y *pMt-Thio* CON INDUCCIÓN ACTIVAS E
INACTIVAS. CONDICIONES 100 rpm, 30°C, [IPTG] 0.13 mM, pH 5.

Tiempo (h)	Concentración Residual (mg/L)			
	Experimento 1		Experimento 2	
	<i>E coli</i>	<i>pMt-Thio</i>	<i>E coli</i>	<i>pMt-Thio</i>
0	100.010±1.234	77.790±0.879	90.190±0.776	90.190±1.931
1	95.792±0.716	71.012±0.315	75.679±0.396	71.077±0.479
2	89.590±0.420	73.170±1.565	63.787±0.889	58.796±0.620
3	90.923±0.567	74.176±1.498	64.257±1.259	53.435±0.598
4	86.817±0.312	77.451±0.567	60.564±1.978	57.642±0.729
5.5	83.924±0.987	78.938±0.321	65.671±0.296	62.568±1.423
7.5	83.584±0.981	75.987±0.978	62.847±0.832	55.640±0.534
24	86.075±0.994	79.147±0.376	69.405±0.745	58.428±0.991

TABLA 6.7

RESULTADOS DE LAS CINÉTICAS DE REMOCIÓN DE PLOMO (II)
UTILIZANDO *E. coli* TOP 10 Y *pMt-Thio* CON INDUCCIÓN ACTIVAS E
INACTIVAS. CONDICIONES 100 rpm, 30°C, [IPTG] 0.13 mM, pH 5.

Tiempo (h)	Concentración Residual (mg/L)			
	Experimento 1		Experimento 2	
	<i>E coli</i>	<i>pMt-Thio</i>	<i>E coli</i>	<i>pMt-Thio</i>
0	95.300±0.987	91.749±1.278	83.760±0.991	83.760±0.798
1	92.420±1.365	89.593±0.967	46.699±0.989	23.146±1.111
2	91.813±0.912	88.469±0.823	45.720±0.923	20.009±1.098
3	90.908±0.891	87.688±0.968	43.462±0.945	12.671±0.791
19	89.373±0.467	87.222±1.112	42.199±0.912	8.449±0.856
20	88.261±0.799	85.515±0.347	41.939±0.876	7.650±0.974
23	88.043±0.458	84.077±0.113	37.144±0.923	7.412±0.991
24	86.416±0.396	80.113±0.165	23.970±0.951	4.406±0.982

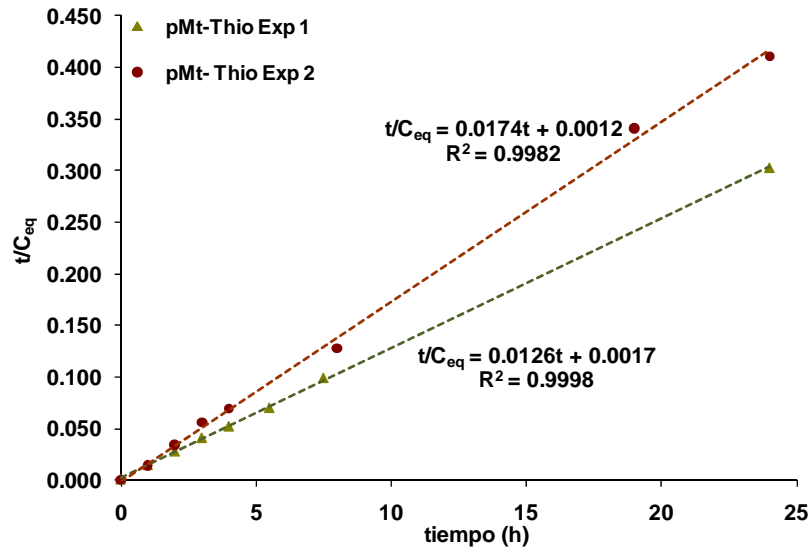


Figura 6.14 Ajuste al modelo de la cinética de segundo orden de los datos obtenidos de la cinética de sorción de cadmio (II) con la biomasa de *pMt-Thio* activa (Exp 1) e inactiva (Exp 2).

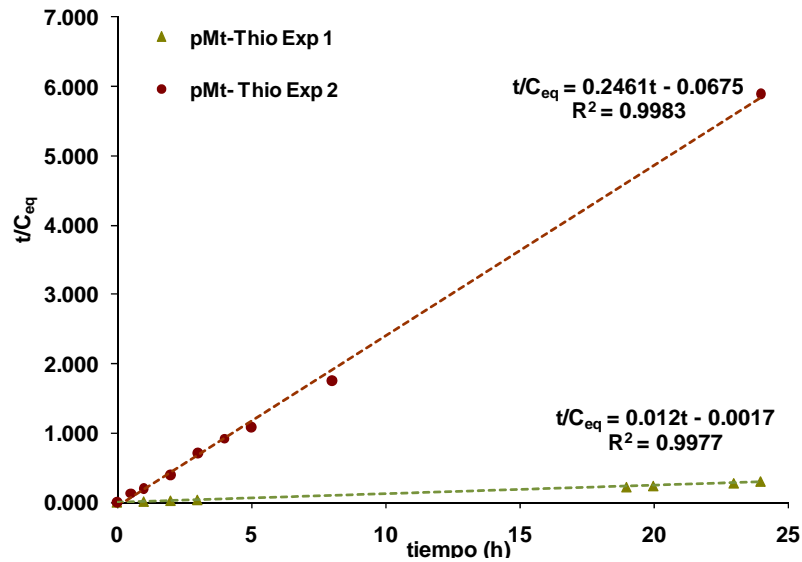


Figura 6.15 Ajuste al modelo de la cinética de segundo orden de los datos obtenidos de la cinética de sorción de plomo (II) con la biomasa de *pMt-Thio* activa (Exp 1) e inactiva (Exp 2).

Pruebas de remoción con agentes de inmovilización.

Los resultados demuestran que el alginato de calcio 3% es capaz de remover un 23.6% de plomo (II) y un 7.3% de cadmio (II) mientras que la agarosa al 3% solo remueve 2.5% y 1.5% respectivamente y el agar-agar 3% remueve 3.5% y 2.5% respectivamente (figura 6.16). El alginato de calcio presentó mejores resultados para el sistema de remoción de ambos metales, además de presentar la ventaja de manejarlo a temperatura ambiente, por lo cual se decidió utilizar esta matriz polimérica para la inmovilización de la bacteria.

En el ensayo de biosorción de cadmio (II) con la biomasa de la *pMt-Thio* inmovilizada en alginato de calcio al 3% se encontró que la transferencia de masa se ve favorecida ya que el porcentaje de remoción aumenta de 35.21% a 59.08 %, no así para la remoción de plomo (II) donde el porcentaje de remoción no sufre cambios drásticos ya que los porcentajes de remoción utilizando la biomasa libre son similares, 94.74% comparado con 91.89% en el sistema inmovilizado (figura 6.17).

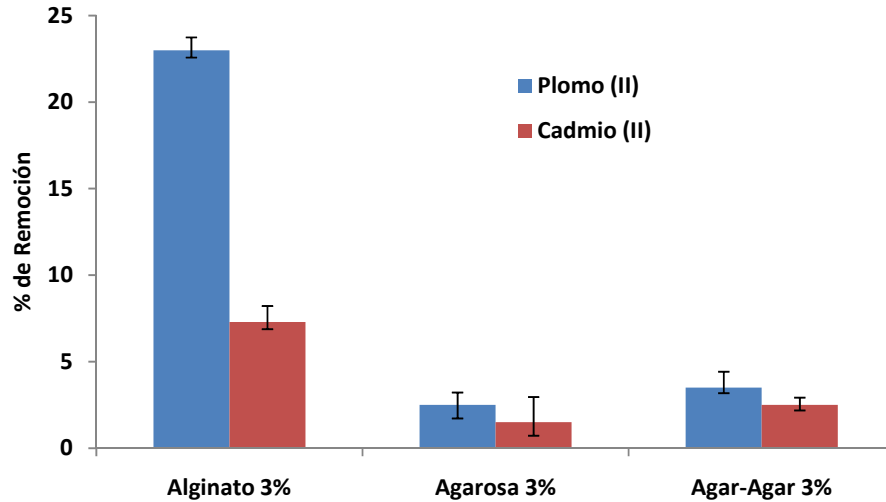


Figura 6.16 Porcentajes de remoción de plomo (II) y cadmio (II) utilizando 0.1 g de alginato de calcio al 3%, Agarosa al 3% y Agar-Agar al 3% en contacto con una solución de 100 mg/L de metal, a 25°C y pH 5 durante 24 h.

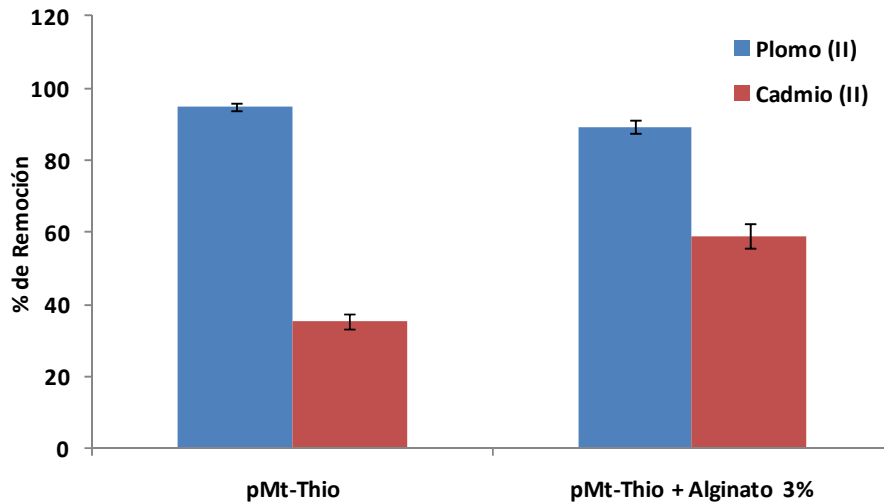


Figura 6.17 Porcentajes de remoción de plomo (II) y cadmio (II) utilizando la biomasa de *pMt-Thio* libre e inmovilizada en alginato de calcio al 3%, una solución metálica de 100 mg/L de metal, a 25°C y pH 5 durante 24 h.

Isotermas de adsorción con biomasa inmovilizada

La adsorción de una sustancia de una fase a la superficie de otra en un sistema específico conlleva a una distribución definida termodinámicamente de la sustancia entre las fases conforme el sistema alcanza el equilibrio. Esta distribución puede ser expresada en términos de isotermas de adsorción.

Para la elaboración de las isotermas de adsorción se utilizaron 0.008 g de biomasa y se trabajó a una temperatura de 25°C. Las TABLAS 6.8 y 6.9 muestran los resultados de los experimentos de adsorción de plomo (II) y cadmio (II) respectivamente con 2 h de contacto ya que el proceso de remoción tuvo que lograrse equilibrar durante este tiempo, así como los valores calculados de la capacidad de adsorción del metal correspondiente por la biomasa.

TABLA 6.8

RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS DE ADSORCIÓN DE PLOMO(II) EN LA BIOMASA DE *pMt-Thio* INMOVILIZADA EN ALGINATO DE CALCIO.

C_o (mg/L)	C_e (mg/L)	q (mg/g)
5.672	1.822±0.505	4.812±0.505
13.230	4.684±1.513	10.682±1.513
27.603	16.992±6.347	13.265±6.347
54.081	37.130±8.181	21.188±8.181
127.075	103.234±0.521	30.016±0.521
218.149	195.733±4.368	28.020±4.368
238.146	262.609±9.629	29.361±9.629
387.064	369.240±4.245	37.952±4.245

TABLA 6.9

RESULTADOS DE LOS EXPERIMENTOS DE ADSORCIÓN DE CADMIO(II)
EN LA BIOMASA DE *pMt-Thio* INMOVILIZADA EN ALGINATO DE
CALCIO.

C_o (mg/L)	C_e (mg/L)	q (mg/g)
6.134	4.021±1.196	1.841±1.196
12.736	11.329±0.190	3.316±0.190
27.406	22.220±1.465	7.296±1.465
51.051	44.872±2.515	10.621±2.515
97.700	87.564±5.215	16.358±5.215
160.497	142.029±3.620	23.085±3.620
209.467	176.106±6.492	24.076±6.492
290.206	270.945±8.560	41.702±8.560

Los datos obtenidos muestran que la capacidad de adsorción para una concentración inicial dada de ion metálico es mayor para plomo (II) que para cadmio (II). Esta diferencia entre los dos iones se puede atribuir a la diferencia en su radio iónico. El radio iónico del ion plomo (II) es de 1.20 Å mientras que para el ion cadmio (II) es de 0.97 Å (Cruz-Garritz *et. al.* 2002). Mientras más pequeño sea el radio iónico del metal, mayor es su tendencia a hidrolizarse; ya que su densidad de carga es mayor y por lo tanto su esfera de solvatación, y esto disminuye la bioadsorción. Este comportamiento también fue observado al trabajar con esta misma biomasa pero en estado libre.

En general, los datos indican que la capacidad de adsorción se incrementa conforme aumenta la concentración inicial del metal en ambos casos, esto indica que la saturación de la superficie de la biomasa es dependiente de la concentración inicial del ion metálico. Así, a bajas concentraciones los sitios de adsorción toman el metal disponible más rápidamente. Sin embargo, a concentraciones altas, los iones metálicos tienen que difundir hacia la superficie de la biomasa y los iones más hidrolizados se difundirán más lentamente. Dicho comportamiento fue observado por Khoo y Ting (2001) al estudiar la bioadsorción de oro en biomasa fúngica inmovilizada en alcohol polivinílico (PVA), así mismo Dong (2004) demostró el mismo efecto al trabajar con la remoción de cobre(II) utilizando esporas de *Cladosporium* sp. inmovilizadas en alginato.

No obstante existen otros factores además del radio iónico que influyen en la afinidad de adsorción metálica que pueden estar relacionados con la estructura y composición del bioadsorbente. (Inthorn *et. al.* 2002)

Los dos modelos matemáticos más utilizados para describir una isoterma de adsorción son los de Freundlich y Langmuir. Estos modelos utilizan parámetros que reflejan la naturaleza del adsorbente y pueden ser usados para comparar el rendimiento del proceso de adsorción. (Volesky, 1999)

A partir de los datos obtenidos en los procesos de biosorción (TABLAS 6.8 y 6.9), y de las ecuaciones que describen las isotermas de Langmuir (ecuación 2.2) y Freundlich (ecuación 2.4) se puede modelar matemáticamente el proceso de biosorción de iones metálicos por la biomasa de *pMt-Thio* como un fenómeno de adsorción. Las figuras 6.18 y 6.19 muestran las ecuaciones lineales de Freundlich y Langmuir y su ecuación lineal de regresión correspondiente para los datos de la

adsorción de plomo (II) por la biomasa de *pMt-Thio* inmovilizada en alginato de calcio.

El Modelo de Freundlich es una ajuste ampliamente usado en concentraciones medias y bajas, y el hecho de que los valores de los datos se ajusten a este modelo implica que describe un proceso de adsorción favorable, lo cual se detecta si $n > 1$ y por lo cual se puede determinar que el proceso de adsorción de plomo (II) se ve favorecido según el ajuste a este modelo matemático.

No obstante el proceso de adsorción de plomo (II) no es favorablemente descrito por ninguno de los dos modelos lo que indica que el proceso de biosorción no forma una monocapa como lo sugieren ambos modelos por lo que se puede estar presentando el fenómeno de difusión intraparticular que posteriormente es descrito (TABLA 6.10).

TABLA 6.10

ECUACIONES DE LOS MODELOS DE ISOTERMAS DE ADSORCIÓN Y SUS PARÁMETROS CORRESPONDIENTES PARA LA BIOADSORCIÓN DE PLOMO(II) EN LA BIOMASA DE *pMt-Thio* INMOVILIZADA EN ALGINATO DE CALCIO.

Modelo	Ecuación	Parámetros		r^2
Freundlich	$q = KC_e^{1/n}$	K 1.36	n 2.91	0.9354
Langmuir	$q = \frac{q_{\max} b C_e}{1 + b C_e}$	q_{\max} [mg · g ⁻¹] 7.59	b [L · mg ⁻¹] 0.112	0.9735

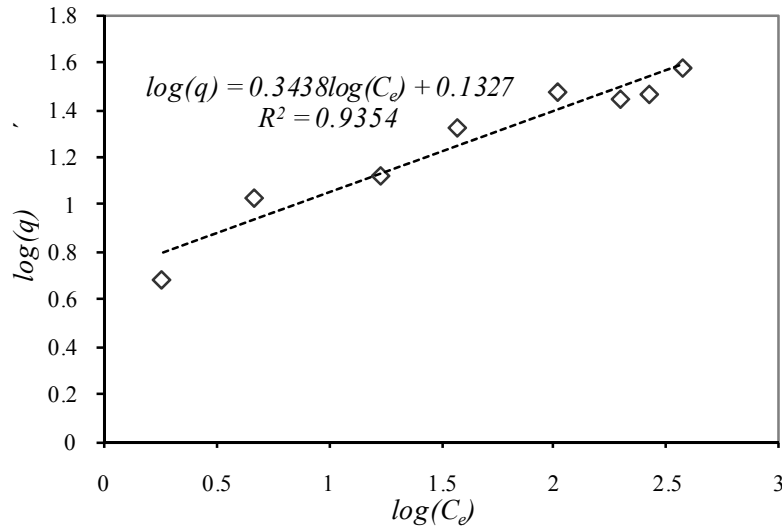


Figura 6.18 Gráfica de la ecuación lineal del modelo de Freundlich para la isoterma de la adsorción de plomo (II) por la biomasa de *pMt-Thio* inmovilizada en alginato de calcio. pH 5, Temperatura 25 °C.

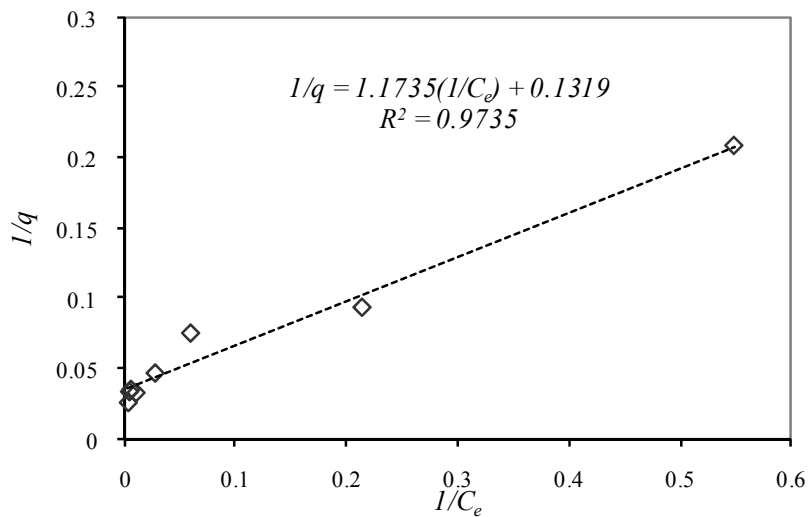


Figura 6.19 Gráfica de la ecuación lineal del modelo de Langmuir para la isoterma de la adsorción de plomo (II) por la biomasa de *pMt-Thio* inmovilizada en alginato de calcio. pH 5, Temperatura 25 °C.

Los datos obtenidos en la bioadsorción de cadmio (II) se ajustaron a los modelos de Freundlich y Langmuir (figuras 6.20 y 6.21) dicho resultado aunque no presenta una correlación satisfactoria, si indica la formación de una monocapa en la superficie el bioadsorbente. El valor de q_{max} es mayor en cadmio (II) que en plomo (II) al igual que la afinidad del metal por el bioadsorbente (b). El ajuste de los datos al modelo de Freundlich comprueba cualitativamente que se está llevando a cabo la adsorción de los iones en la superficie del adsorbente debido a que $n > 1$, sin embargo no se descarta la posibilidad de la difusión hacia el interior de la esfera del biosorbente (TABLA 6.11). El fenómeno de difusión intraparticular para ambos metales es analizado más adelante.

TABLA 6.11

ECUACIONES DE LOS MODELOS DE ISOTERMAS DE ADSORCIÓN Y SUS PARÁMETROS CORRESPONDIENTES PARA LA BIOADSORCIÓN DE CADMIO (II) EN LA BIOMASA DE *pMt-Thio* INMOVILIZADA EN ALGINATO DE CALCIO.

Modelo	Ecuación	Parámetros		r^2
Freundlich	$q = KC_e^{1/n}$	$\frac{K}{0.312}$	$\frac{n}{1.14}$	0.9673
Langmuir	$q = \frac{q_{max} b C_e}{1 + b C_e}$	$q_{max} \text{ [mg} \cdot \text{g}^{-1}\text{]}$ 24.27	$b \text{ [L} \cdot \text{mg}^{-1}\text{]}$ 0.019	0.9693

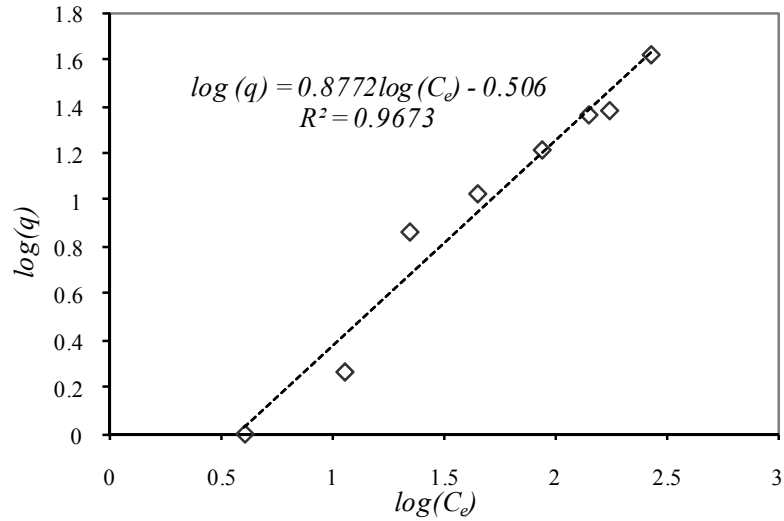


Figura 6.20 Gráfica de la ecuación lineal del modelo de Freundlich para la isoterma de la adsorción de cadmio (II) por la biomasa de *pMt-Thio* inmovilizada en alginato de calcio. pH 5, Temperatura 25 °C.

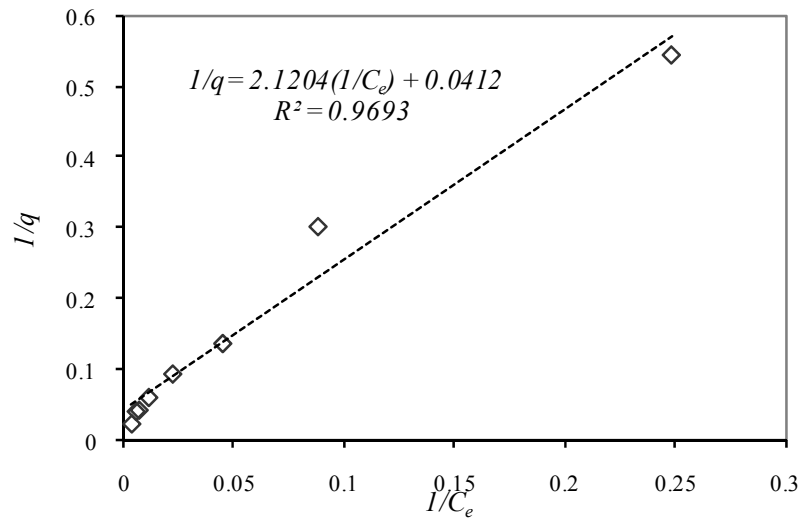


Figura 6.21 Gráfica de la ecuación lineal del modelo de Langmuir para la isoterma de la adsorción de cadmio (II) por la biomasa de *pMt-Thio* inmovilizada en alginato de calcio. pH 5, Temperatura 25 °C.

Cinéticas de Adsorción en Columna

Construcción y Operación de la columna de lecho fijo en estado no estacionario

En la TABLA 6.12 se muestran las condiciones de operación para las corridas en la columna tanto para plomo (II) como para cadmio (II).

TABLA 6.12
CONDICIONES DE OPERACIÓN PARA LAS CORRIDAS EXPERIMENTALES
EN LAS COLUMNAS DE LECHO FIJO

METAL	PLOMO (II)			CADMIO (II)		
Flujo (<i>mL/min</i>)	40	60	80	40	60	80
[M] ₀ (<i>mg/L</i>)	113.480	111.446	96.259	101.444	101.647	106.335

Los resultados obtenidos en la biosorción de plomo (II) presentan (figura 6.22) la concentración de metal a la salida de la columna en función del tiempo para los diferentes flujos volumétricos (*F*) y se observa que para en el flujo de 40 y 80 *mL/min* durante los primeros 60 minutos de operación existe mayor remoción que en el caso de 60 *mL/min*. Después de los 60 minutos de operación la concentración en la salida de la columna aumenta paulatinamente en orden decreciente de acuerdo al flujo, esto es que la concentración de plomo (II) a la salida de la columna es mayor en el flujo de 80 *mL/min* y menor a los 40 *mL/min*. Finalmente los porcentajes de remoción de plomo (II) en los diferentes flujos, fueron 24.23% de remoción a 80 *mL/min*, 51.19% a 60 *mL/min* y 65.07% a 40 *mL/min*.

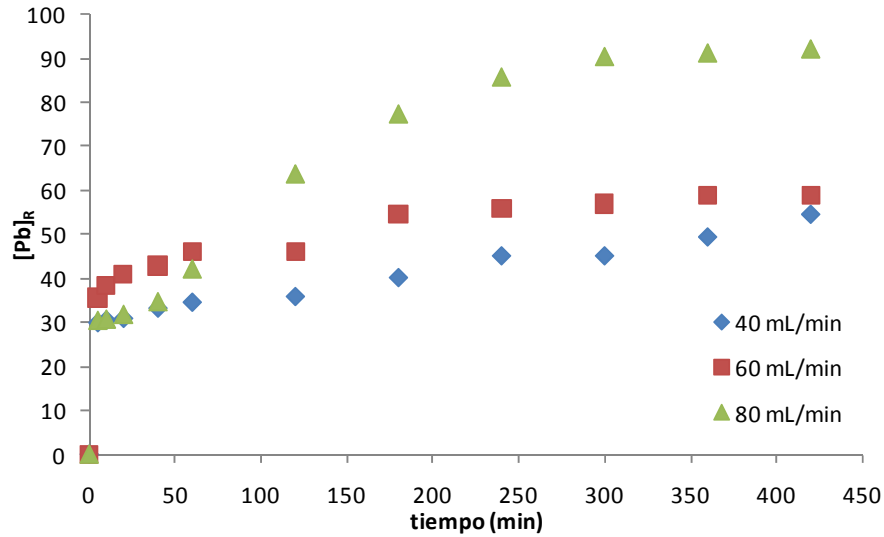


Figura 6.22 Concentración de plomo (II) a la salida de la columna de lecho fijo en función del tiempo (Temperatura 25°C, pH~5).

Para el caso de la biosorción de cadmio (II) en la figura 6.23 se presentan los datos experimentales de cada corrida a diferentes flujos volumétricos, donde se observa que a tiempos menores a 50 minutos de operación la concentración a la salida es menor en los flujos de 40 y 60 mL/min , lo cual indica que existe mayor adsorción del metal a estos flujos comparándolos con el flujo de 80 mL/min . Dicho comportamiento se observa durante toda la cinética, sin embargo en el flujo de 80 mL/min la concentración a la salida de la columna casi iguala a la concentración de entrada después de los 100 min . Esto se comprueba al determinar los porcentajes de remoción en los diferentes flujos, obteniéndose un 37.31% de remoción a 40 mL/min , 34.22% a 60 mL/min y 33.20% a 80 mL/min .

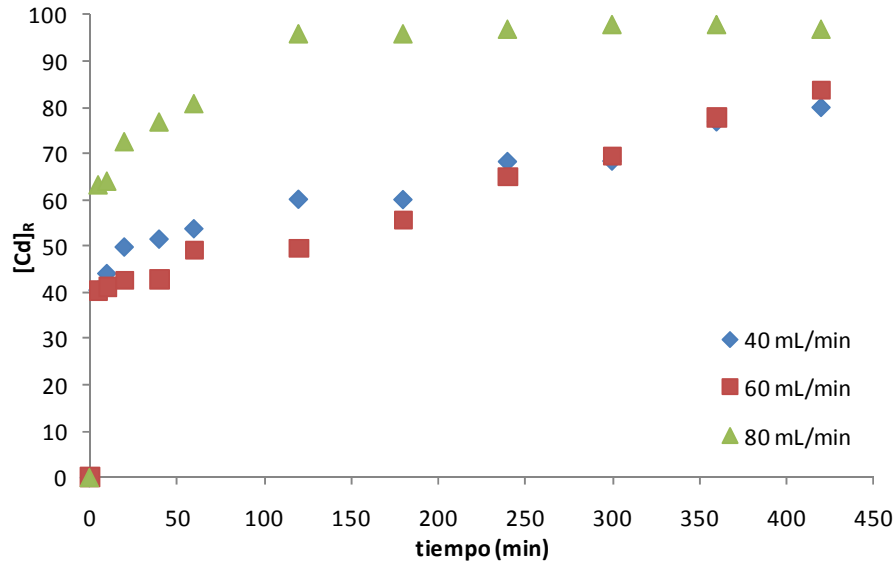


Figura 6.23 Concentración de cadmio (II) a la salida de la columna de lecho fijo en función del tiempo. (Temperatura 25°C, pH~5).

Comparando los resultados obtenidos se confirma que el biosorbente presenta mayor afinidad para la remoción de plomo (II) que para cadmio (II) ya que los porcentajes de remoción son mayores para este metal, así mismo, se puede comprobar que el flujo que más favorece la remoción del metal del efluente es el de 40 *mL/min*, seguido del de 60 *mL/min* con una diferencia de 4 a 10 *mg/L* después de los 100 *min* en el caso la remoción de plomo (II) mientras que en la remoción de cadmio (II) después de los 150 *min* se observa los mismas concentraciones en la salida de la columna para estos mismos flujos.

Modelo matemático de la difusión y modelo de sorción en la columna empacada

La dinámica de remoción del metal de la solución acuosa depende de la transferencia de masa de la solución matriz a la superficie de la esfera del biosorbente, de la adsorción en superficie y a la difusión intraparticular. Para estudiar el efecto del N_{Re} sobre el coeficiente de transferencia de masa (k_e), la velocidad de flujo se vario de 40 a 80 mL/min manteniendo una concentración inicial de metal $\sim 100 mg/L$, pH 5 y $25^\circ C$ de temperatura. El número de Reynolds es dependiente de la velocidad de flujo por lo que los valores de este fueron calculados utilizando la ecuación 5.10 con $d_m = 0.5 cm$, $\rho_{sol} = 0.9967 g/mL$, $\varepsilon = 0.3$, $A_{col} = 19.63 cm^2$, y $\mu_{sol} = 0.528 g/cm/min$, datos determinados de resultados experimentales. Los valores del numero de Reynolds obtenidos variaron entre 6.339 y 12.678, dichos valores indicaron el uso de la ecuación propuesta por Wakao y Funazkri ($3 < N_{Re} < 10,000$) para calcular el número de Sherwood (N_{Sh}) y posteriormente con la ecuación 5.8 se determino el coeficiente de transferencia de masa (k_e). La difusividad externa D_e de los iones metálicos en la solución a $25^\circ C$ fue calculada utilizando la ecuación 5.9 considerando los valores especificados en la tabla 6.13 para cada ion metálico, encontrándose que para plomo fue de 8.9546×10^{-4} y $7.3686 \times 10^{-4} cm^2/min$ para cadmio (II).

TABLA 6.13

CARACTERISTICAS ELECTROQUÍMICAS DE LOS SOLUCIONES DE NITRATO DE PLOMO (II) Y CADMIO (II).

Parámetro	PLOMO	CADMIO
λ^+ (mohs*cm ² *s/eq)	75.500	52.630
λ^- (mohs*cm ² *s/eq)	74.1	74.1
z^+ (e ⁻)	2	2
z^- (e ⁻)	1	1
F (A*s/eq)	96500	96500
T (K)		298
R (J/(mol·K))		8.314

De igual forma el número de Schmidt fue determinado utilizando la ecuación 5.11 utilizando los valores de D_e calculados. Los coeficientes de transferencia de masa (k_e) fueron calculados utilizando la ecuación 5.7 y 5.8 y se graficaron contra el Número de Reynolds (N_{Re}) (Figura 6.24). Esto demuestra que N_{Re} incremento mientras el tiempo de residencia (τ) disminuye y k_e incrementa conforme se incrementa la velocidad del flujo. Dicho comportamiento se observo igual tanto para plomo (II) como para cadmio (II). El tiempo de residencia, el número de Reynolds, el coeficiente de transferencia de masa y el equilibrio en la velocidad de remoción calculados de los experimentos se muestran en la tabla 6.14. Esto indica que la resistencia a la transferencia de masa externa desciende con el incremento en la velocidad del flujo.

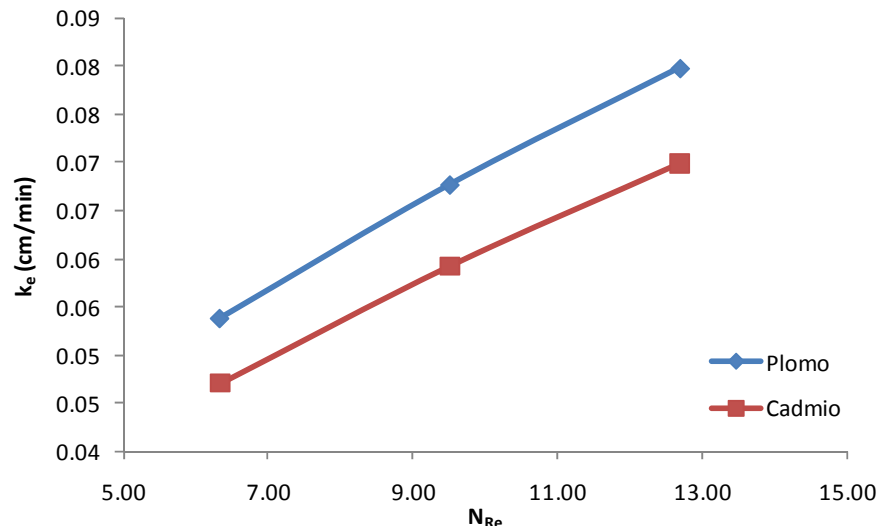


Figura 6.24 Influencia del N_{Re} sobre el coeficiente de transferencia de masa (k_e)

TABLA 6.14

COMPARACIÓN DE VELOCIDAD DE FLUJO, TIEMPO DE RESIDENCIA, NÚMERO DE REYNOLDS, COEFICIENTE DE TRANSFERENCIA DE MASA Y VELOCIDAD DE ADSORCIÓN EXPERIMENTAL PARA PLOMO (II) Y CADMIO (II) ($C_0 \sim 100 \text{ mg/L}$, TEMPERATURA 25°C Y pH 5).

F (mL/min)	τ (min)	Cantidad de biosorbente (g)	N_{Re}	$k_e \times 10^2$ (cm/min)		$r_{aide} \times 10^3$ (mg/g/min)	
				Pb	Cd	Pb	Cd
40	7.361		6.339	5.385	4.709	4.409	2.260
60	4.908	669.897	9.508	6.770	5.925	5.110	3.115
80	3.681		12.678	7.978	6.986	2.786	4.216

La velocidad de adsorción de plomo (II) fue mayor utilizando un flujo volumétrico de 60 mL/min que para el flujo de 40 mL/min , esta tendencia no se presenta en 80 mL/min donde se disminuyó más de un 50% la velocidad de adsorción, esto es debido a que el tiempo de contacto a este flujo fue insuficiente para establecer el equilibrio entre el biosorbente y el ion metálico. En el caso de la velocidad de adsorción del cadmio (II), esta incrementa conforme se incrementa el flujo de la solución metálica lo cual indica que la adsorción se favorece aún más en un flujo de 80 mL/min , aunque esto solo se presenta durante los primeros minutos de

remoción (figura 6.25). Por lo tanto en el caso de la remoción de plomo (II) como en cadmio (II) el flujo que favorece mejor la remoción es el de 60 mL/min se presenta la mayor velocidad de adsorción así como el mayor coeficiente de transferencia de masa.

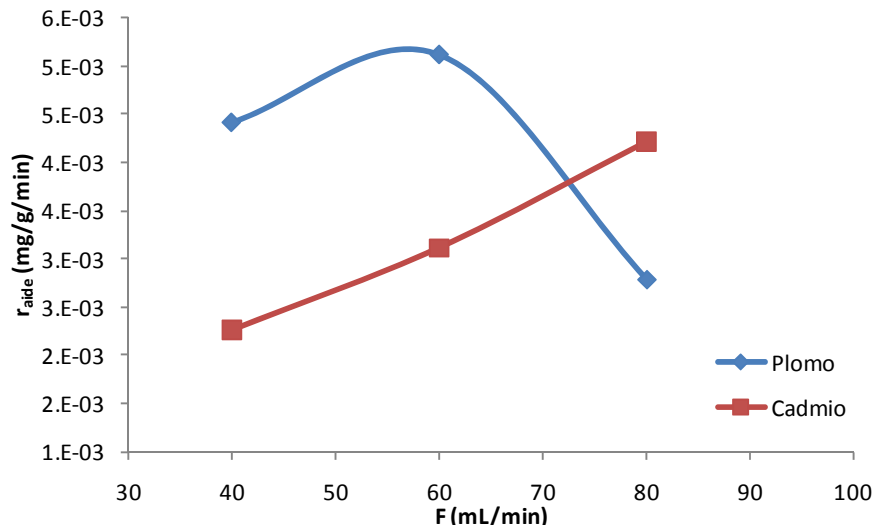


Figura 6.25. Influencia del flujo sobre la velocidad de de remoción experimental debida a la adsorción en superficie y la difusión intraparticular (r_{aide})

La constante de de la velocidad de remoción (k_{adi}) y la constante de remoción (K) (TABLA 6.15) se calculo determinando la pendiente y la intercepción de la grafica de $\ln(C_o/C)$ vs. (C_o-C) (Figura 6. 26).

TABLA 6.15

VALORES DE LAS CONSTANTES DE VELOCIDAD DE REMOCIÓN (k_{adi}) Y LA CONSTANTE DE REMOCIÓN (K) PARA PLOMO Y CADMIO.

Flujo mL/min	Plomo		Cadmio	
	K	k_{adi}	K	k_{adi}
40		5.3083×10^{-6}		1.4384×10^{-5}
60	0.015	7.9624×10^{-6}	0.0186	2.1576×10^{-5}
80		1.0617×10^{-5}		2.8769×10^{-5}

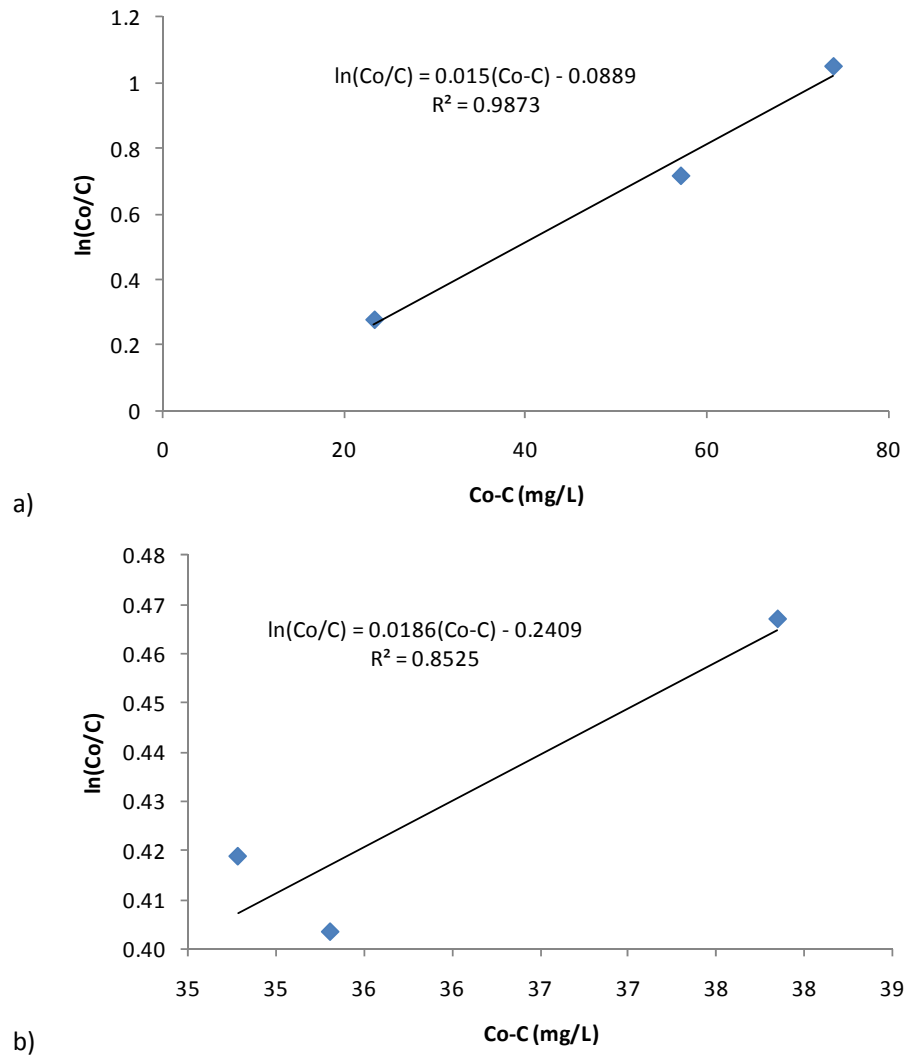


Figura 6.26 Grafica de $\ln(C_o/C)$ vs. C_o-C para determinar la constante de remoción k_{adi} y K ; a) plomo y b) cadmio.

Para determinar la difusión intraparticular, los resultados obtenidos en las isotermas de adsorción descritos en el apartado 5.3.11 (con biomasa inmovilizada) fueron utilizados (figura 6.27).

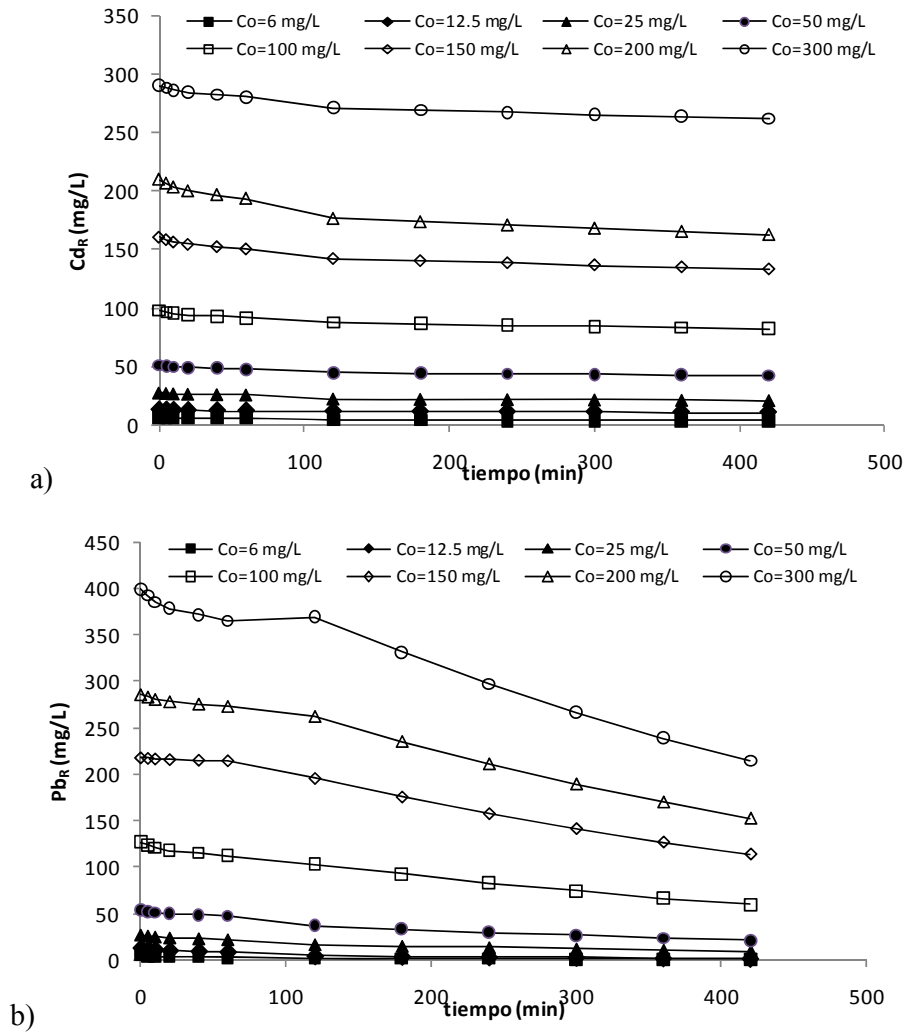


Figura 6.27. Efecto de la concentración inicial de a) cadmio (II) y b) plomo (II) en la cinética de bioadsorción utilizando *pMt-Thio* inmovilizada en alginato de calcio. Condiciones: ~0.0638 g de biosorbente, Temperatura 25 °C, pH 5.

La concentración del metal al término de cada experimento por lote fue considerada como la concentración en equilibrio. La gráfica de $-\ln \left[1 - \left(\frac{C_{ob}-C_b}{C_{ob}-C_{eb}} \right)^2 \right]$ vs. t (tiempo) se realizó para cada experimento y estas ajustaron a una línea recta con

valores de coeficientes de correlación por arriba de 0.97 (figura 6.28). La difusión intraparticular (D_i) se calculo utilizando la ecuación 5.15 y fue de $5.0027 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{min}$ para la remoción de plomo (II) mientras que la remoción de cadmio (II) presento una difusión intraparticular de $3.0396 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{min}$ ($d_m = 0.5 \text{ cm}$), estos resultados explican el porqué no se forma una monocapa y por lo tanto en la isoterma de adsorción los modelos de Freundlich y Langmuir no ajustan a los datos obtenidos.

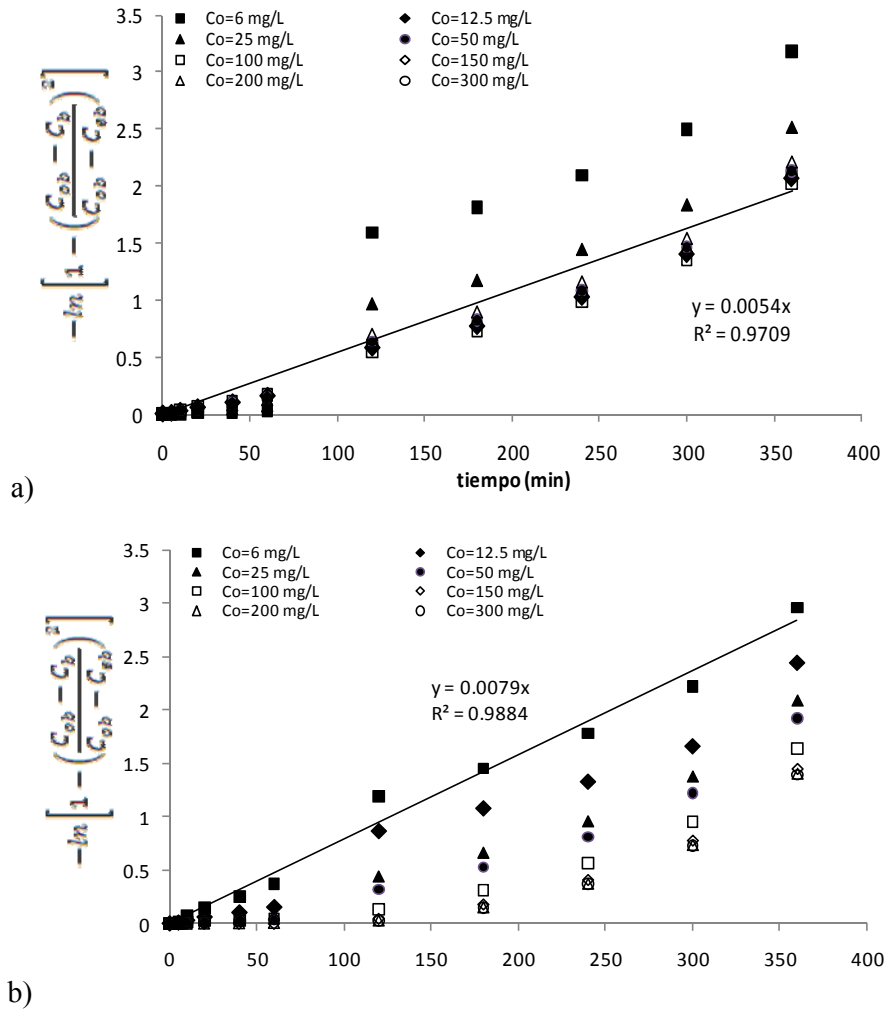


Figura 6.28 Ajuste gráfico de $-\ln \left[1 - \left(\frac{C_{ob} - C_b}{C_{ob} - C_{eb}} \right)^2 \right]$ vs. t (tiempo) para la obtención de la difusión intraparticular; a) cadmio (II) y b) plomo (II).

El coeficiente de transferencia de masa intraparticular (k_i) se determino utilizando la ecuación 5.16 con ayuda del D_i calculado y con $\phi = 1$ (la esfericidad de las partículas se considero 1 ya que el biosorbente eran esferas de biomasa inmovilizada en alginato de calcio). El valor calculado de k_i es 1.0005×10^{-3} l/g/min para plomo (II) y 6.0793×10^{-4} l/g/min para cadmio (II). La constante de velocidad de adsorción (k_{ad}) fue determinada utilizando la ecuación 5.19 con la ayuda de los valores calculados de k_{adi} y k_i . La constante de velocidad de adsorción global de primer orden (k_o) se calculo utilizando la ecuación 5.23 con $A_p = 12.3103$ cm²/g (TABLAS 6.16 y 6.17).

TABLA 6.16

COMPARACIÓN DEL COEFICIENTE DE TRANSFERENCIA DE MASA, LA CONSTANTE DE VELOCIDAD DE ADSORCIÓN, COEFICIENTE DE TRANSFERENCIA DE MASA INTRAPARTICULAR Y LA CONSTANTE DE VELOCIDAD GLOBAL CON DIFERENTES VELOCIDADES DE FLUJO DE LA SOLUCIÓN DE CADMIO (II) ($C_o \sim 100$ mg/L, TEMPERATURA 25°C, y pH 5)

F (mL/min)	k_e (cm/min)	$k_e A_p \times 10^3$ (l/g/min)	K_{adi} (l/g/min)	k_{ad} (l/g/min)	k_i (l/g/min)	k_o (l/g/min)
40	4.7083×10^{-2}	0.5796	1.4384×10^{-5}	1.4733×10^{-5}		1.4036×10^{-5}
60	5.9256×10^{-2}	0.7295	2.1576×10^{-5}	2.2370×10^{-5}	6.8392×10^{-4}	2.0957×10^{-5}
80	6.9845×10^{-2}	0.8598	2.8769×10^{-5}	3.0198×10^{-5}		2.7837×10^{-5}

TABLA 6.17

COMPARACIÓN DEL COEFICIENTE DE TRANSFERENCIA DE MASA, LA CONSTANTE DE VELOCIDAD DE ADSORCIÓN, COEFICIENTE DE TRANSFERENCIA DE MASA INTRAPARTICULAR Y LA CONSTANTE DE VELOCIDAD GLOBAL CON DIFERENTES VELOCIDADES DE FLUJO DE LA SOLUCIÓN DE PLOMO (II) ($C_o \sim 100$ mg/L, TEMPERATURA 25°C, y pH 5)

F (mL/min)	k_e (cm/min)	$k_e A_p \times 10^3$ (l/g/min)	K_{adi} (l/g/min)	k_{ad} (l/g/min)	k_i (l/g/min)	k_o (l/g/min)
40	5.3843×10^{-2}	0.6628	5.3083×10^{-6}	5.3366×10^{-6}		5.2661×10^{-6}
60	6.7704×10^{-2}	0.8335	7.9624×10^{-6}	8.0263×10^{-6}	1.00×10^{-3}	7.8871×10^{-6}
80	7.9762×10^{-2}	0.9819	1.0617×10^{-5}	1.0730×10^{-5}		1.0503×10^{-5}

Aksu y Kutsal en 1998 estudiaron la biosorción de iones cobre (II) sobre la biomasa seca del alga *Cladophora* sp. en un reactor en columna de lecho fijo y analizaron tanto el flujo como la concentración de los iones cobre (II). Ellos consideraron que las partículas del alga no eran porosas, ni esféricas por lo que la adsorción solo ocurría en superficie. En la presente investigación la biomasa de *pMt-Thio* fue inmovilizada en esferas de alginato de calcio por lo cual se considero este sistema como material biosorbente con características de ser poroso y esférico, por lo que se considero que la sorción tanto de plomo (II) como de cadmio(II) ocurría no solo en la superficie sino que se presento la difusión intraparticular, esto también fue corroborado al momento de hacer las isotermas de adsorción ya que no se ajustaron a los modelos de formación de monocapa.

En el trabajo de Aksu y Kutsal se presento un ligero incremento en la velocidad de adsorción conforme aumentaron las velocidad de flujo (hasta 4.45 mL/min). El incremento en la velocidad de flujo provoca una disminución en la resistencia a la transferencia de masa pero a muy altas velocidades de flujo como es el caso de esta investigación disminuye el tiempo de contacto por lo tanto el equilibrio en el proceso de adsorción entre la biomasa y los iones metálicos puede no ser alcanzado afectando así la velocidad de adsorción al disminuir su valor.

Así mismo Aksu y Kutsal reportaron que el coeficiente de transferencia de masa es aproximadamente 20 veces mayor que la constante de velocidad de adsorción. En sus estudios concluyen también que el paso limitante en el proceso de adsorción es la adsorción en superficie. Esto coincide con los resultados de esta investigación que refiere que el fenómeno de adsorción en superficie es el paso limitante debido a la resistencia para la remoción de plomo (II) y cadmio (II). En la remoción de cadmio

(II) la constante de velocidad de transferencia de masa externa ($k_e A_p$) es entre 30 - 40 veces mayor que la constante de velocidad de adsorción en la superficie (k_{ad}) la cual también es menor entre 20 - 40 veces que la constante de velocidad de difusión intraparticular (k_i). Así mismo los resultados en la remoción de plomo (II) marcan una diferencia notable; en cuanto a $k_e A_p$ es entre 90 - 120 veces mayor que k_{ad} quien a su vez también es entre 90 - 187 veces menor que k_i .

Dentro de los mismos resultados podemos apreciar que los valores máximos de k_{ad} y $k_e A_p$ son mayores a flujos altos debido a que ambas los flujos mayores favorecen la transferencia de masa del medio líquido a la fase sólida.

Los porcentajes de remoción totales después de las 7 horas de operación a los diferentes flujos volumétricos demuestran que la remoción del metal se ve favorecida a flujos menores lo cual confirma que el tiempo de residencia debe ser mayor para que se pueda establecer el equilibrio de biosorción (TABLA 6.18).

TABLA 6.18

COMPARACIÓN LOS PORCENTAJES DE REMOCIÓN DE PLOMO (II) Y CADMIO (II) OBTENIDOS EN LOS EXPERIMENTOS DE REMOCIÓN EN COLUMNA DE LECHO FIJO EMPACADA CON *pMt-Thio* INMOVILIZADA EN ALGINATO DE CALCIO. (TEMPERATURA 25°C, y pH 5.0)

F (mL/min)	Cadmio (II)			Plomo (II)		
	40	60	80	40	60	80
C_o (mg/L)	101.444	101.647	106.335	113.480	111.446	96.259
C_R (mg/L)	63.596	66.865	71.028	39.640	54.398	72.932
%RM	37.309	34.218	33.204	65.069	51.189	24.234

Göksungur *et. al.* (2003) reportaron un tratamiento caustico a la levadura de panadería y su posterior uso como biosorbente de iones cobre. Ellos reportaron el uso

de la levadura inmovilizada en alginato de calcio empacadas en un reactor en columna. La velocidad del flujo que manejaron fue 2.35 mL/min y la concentración de entrada era de 95.5 mg/L (pH 4) el tiempo de residencia que manejaron fue de 11.3 min. En la fase inicial de la biosorción el material biosorbente removió un 98 % de cobre.

Yu *et. al.* en 2001 reportó la remoción de plomo y cobre utilizando un reactor en columna empacada con aserrín. Ellos calcularon la capacidad de remoción de plomo y cobre en mezcla por el aserrín utilizando concentraciones de 50 y 100 mg/L . Los resultados obtenidos fueron semejantes en ambas concentraciones presentando una capacidad de 0.65 mg/g para cobre y 1.1 mg/g en plomo.

CAPÍTULO 7
CONCLUSIONES

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se logro repetir la modificación genética reportada por Dávila (2006) y a la vez se produjo la biomasa de *E. coli* modificada genéticamente comprobando dicha modificación a través del análisis en gel de poliacrilamida de la producción de la proteína quimérica Metalotioneina-Tioredoxina, lo cual también se comprobó al ensayar la bisorción de los metales pesados plomo(II) y cadmio(II).

Dentro de las pruebas de remoción de metales se pudo determinar que permitir a la biomasa la producción prolongada de la proteína recombinante enaltece su capacidad de sorción de metales, lo cual permite trabajar con la biomasa de forma inactiva, lo que presenta ventajas sobre el manejo y operación de un reactor de remoción de metales.

Los resultados de la cinética de sorción de plomo (II) presentan mayores porcentajes de remoción de este metal con respecto al cadmio (II), lo cual se confirma en las posteriores pruebas de remoción que se realizaron con la biomasa ya inmovilizada.

Para la selección del material de soporte que se utilizó se tomaron en cuenta diferentes parámetros como lo son el manejo y la disposición final del residuo, por tal motivo se decidió trabajar únicamente con polímeros naturales con los cuales se realizaron ensayos de biosorción y se seleccionó al alginato de calcio al 3% que presentó mayor poder de remoción para ambos metales, frente a la agarosa al 3% y al agar-agar al 3%. Este resultado fue decisivo debido a que el manejo de materiales biosorbentes inmovilizados en matrices poliméricas tiene la desventaja de disminuir el poder de remoción del biosorbente que se inmoviliza debido al impedimento estérico de las cadenas del polímero, por esta razón el utilizar un material que además de inmovilizar pueda remover metales favorece el diseño del material biosorbente final.

Una vez que se estableció el soporte de inmovilización de la biomasa de la cepa *pMt-Thio* se prosiguió a realizar los ensayos de remoción de plomo(II) y cadmio (II), resultado una marcada remoción de plomo (II) con respecto al cadmio, sin embargo, el hecho de encontrar poder de remoción en la matriz polimérica solo sirvió para compensar la pérdida del poder de remoción de la biomasa de la *pMt-Thio* debida al entrecruzamiento del polímero.

En el análisis cuantitativo de la remoción del metal se realizaron isothermas de adsorción para determinar el proceso por el cual se lleva a cabo la remoción del metal, la mayoría de los procesos de sorción de líquidos en sólidos se explican a través de los modelos matemáticos de Freundlich y/o Langmuir, por lo cual se decidió a trabajar sobre ellos, sin embargo, los resultados demostraron que no se presenta una adsorción superficial que forme una monocapa, por lo que se decidió analizar las isothermas realizadas a diferentes tiempos con la finalidad de determinar la existencia de una

difusión hacia el interior de la esfera del biosorbente por parte de los iones metálicos, y se pudo determinar la constante de velocidad de migración de los iones hacia el interior de la esfera del biosorbente.

Una vez que se monto la columna de lecho fijo se prosiguió a analizar los resultados de la biosorción tanto de plomo (II) como de cadmio (II) a los diferentes flujos volumétricos manejados, se encontraron los valores de los parámetros adimensionales que permiten el escalamiento del reactor tales como el N_{Re} , N_{Sc} , N_{Sh} y el coeficiente de transferencia de masa (k_e) así mismo se pudo determinar los tiempos de retención para cada caso encontrando que en los flujos de menor intensidad se alcanza el equilibrio del proceso de transferencia de masa.

A través de esta información se pudieron determinar las constantes de velocidad de los diferentes procesos de sorción de metal que se presentan en el bioreactor encontrándose que el paso limitante en el proceso de biosorción es la adsorción en superficie ya que las constantes de velocidad de la transferencia de masa y la de difusión intraparticular supera de forma contundente a la constante de velocidad de adsorción en superficie que se presento en el biorreactor.

Por lo anterior se puede concluir que se evaluó satisfactoriamente el reactor en columna de lecho fijo diseñado a escala Bench para la remoción de metales pesados como lo son el plomo (II) y el cadmio (II) utilizando la biomasa de *E. coli* modificada genéticamente para la producción de la proteína de fusión Metalotioneína-Tiorredoxina.

CAPÍTULO 8
RECOMENDACIONES

CAPÍTULO 8

RECOMENDACIONES

La presente investigación es un trabajo que forma parte de una línea de investigación que continua en desarrollo por lo cual es recomendable continuar con el desarrollo de las diferentes áreas de oportunidad que surgieron durante la realización de este proyecto, entre las cuales se pueden enlistar las siguientes.

- Optimizar la remoción de plomo(II) y cadmio(II) en el sistema variando los flujos volumétricos
- Trabajar el sistema propuesto con disoluciones polimetálicas y muestras reales.
- Recuperar los metales sorbidos en el sistema y reutilizar en múltiples ciclos de sorción-desorción el material biosorbente.
- Trabajar la cepa modificada para su aplicación como un posible biosensor de metales pesados.

CAPÍTULO 9
BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Aksu, Z., Kutsal, T., Sastry S.V. y Khan M.A. Determination of kinetic parameters in the biosorption of copper(II) on *Cladophora* sp., in a packed bed column reactor. *Process Biochemistry*, 33(1): 7–13. (1998).
2. Alanís J. M. Nuevo León, Coahuila y Edo. México, los tres estados con mayor contaminación por plomo. *Periódico La crónica de Hoy*. México D.F. 06/jul/1999. <http://www.cronica.com.mx/1999/jul/06/med05.html> (1999).
3. Amado, L., Kuzminov, A. The Replication Intermediates in *Escherichia coli* are not the Product of DNA Processing or Uracil Excision. *J. Biol. Chem.* 28:22635-46 (2006).
4. Amiard, J. C., Amiard-Triquet C., Barka S., Pellerin J. y Rainbow P. S. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquatic Toxicology* 76: 160–202 (2006)
5. Andrews, G.K. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochemical Pharmacology*. 59(1): 95-104 (2000).
6. Atkinson, B. W., Bux, F. y Kassan, H. C. Considerations for application of biosorption technology to remediate metal-contaminated industrial effluents. *Water SA*. 24:129-135 (1998).
7. Bebianno, M. J. y Langston, W. J. Metallothionein induction in *Mytilus edulis* exposed to cadmium. *Marine Biology* 108: 91–96 (1998).
8. Benedicto, J., Martínez-Gomez C., Campillo J. Induction of Metallothioneins in *Mullus barbatus* as Specific Biomarker of Metal Contamination: A field study in the western Mediterranean. *Ciencias Marinas*, 31(1B): 265–274 (2005).
9. Binz P.A. y Kägi, J.H.R. Molecular Evolution of Metallothioneins: Contributions from Coding and Non-Coding Regions. Institute of Biochemistry, University of Zürich, Zürich, Switzerland (2001).
10. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein- dye binding. *Analy. Biochem.* 72:248–254 (1976).
11. Cajaraville M.P., Bebianno M.J., Blasco J., Porte C. y Sarasquete C. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. *Sci Total Environ* 247: 295-311 (2000).

12. Cañizares, V. y O. Rosa. Bisorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 43: 131 -143 (2000).
13. Chomczynski P. y Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 162(1):156-9 (1987).
14. Cobbett, C.S. y Goldsborough, P.B. Phytochelatin and Metallothioneins: Roles in Heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 159-182 (2002).
15. Cols, N., Roepstorff, K., Gonzalez-Duarte, R., y Atrian, S. Secretion of mouse-metallothionein by engineered *E. coli* cells in metal-enriched cultured media. *J.Mol.Microbiol,Biotechnol*; 3(4): 507-512 (2001).
16. Cruz Garritz, D., J.A. Chamizo, y A. Garrita. Estructura Atómica, Un enfoque Químico. Pearson Education, México (2002).
17. Dávila-Reyes H.P. Expresión de la Metalotioneína I de Ratón en *Escherichia coli* y su aplicación en la Remoción de Metales. Tesis QFB, FCQ, UANL (2006).
18. Dawson, R. M. C. Data for Biochemical Research, 3a ed, Pergamon Press (Oxford and New York) 116 (1986).
19. Dong X. A comparative study of Cu (II) biosorption on Ca-alginate and immobilized live and inactivated *Cladosporium* sp. *J Environ Biol*. 25(3):337-41 (2004).
20. Fergusson, J.E. The heavy elements: Chemistry, environmental impact, and health effects. 1a. ed., Pergamon Press (Oxford and New York) ISBN 0080348602 (1990).
21. Fowler B.A., Hildebrand C.E., Kojima Y. y Webb M. Nomenclature of metallothionein. *Experientia Suppl.* 52: 19-22 (1987).
22. Gadd, G.M. Biosorption. Chemistry and Industry. 13: 421-426 (1990).
23. Gadd, G.M. y White, C. Microbial treatment of metal pollution: a working biotechnology. *Trend. Biotechnol.* 11: 353-359 (1993).
24. Gellissen G., Production of Recombinant Proteins. Novel Microbial and Eukaryotic Expression Systems. Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KGaA, Germany. ISBN 3-527-31036-3 (2005).
25. Göksungur, Y., Üren, S., y Güvenç, U. Biosorption of Copper Ions by Caustic Treated Waste Baker's Yeast Biomass. *Turkish Journal of Biology*, 27: 23–29 (2003).
26. Greenwood N. N. y Earnshaw A. Chemistry of the Elements. 2a ed Lavoisier Librairie (1997).
27. Haq, F., Mahoney, M. y Koropatnick J. Signaling events for metallothionein induction. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 533(2): 211-226 (2003).
28. Higgins J.J., Litvan I., Nee L.E. y Loveless B.S. A lack of the R406W tau mutation in progressive supranuclear palsy and corticobasal degeneration. *Neurology*. 52:404-406 (1999).
29. Huang, C. C., Chan, S. H. H. and Hsu, K. S. GMP/protein kinase G-dependent potentiation of glutamatergic transmission induced by nitric oxide in immature rat rostral ventrolateral medulla neurons in vitro. *Mol. Pharmacol.* 64(2): 521-532 (2003).

30. Idris, A., y Suzana, W. Effect of sodium alginate concentration, bead diameter, initial pH and temperature on lactic acid production from pineapple waste using immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. *Process Biochemistry*, 41:1117–1123 (2006).
31. Instituto Nacional de Ecología, Dirección de Investigación en Monitoreo Atmosférico y Caracterización Analítica de Contaminantes de la Dirección General del CENICA-INE (1998).
32. Instituto Nacional de Ecología, Dirección de Investigación en Monitoreo Atmosférico y Caracterización Analítica de Contaminantes de la Dirección General del CENICA-INE (2005).
33. Inthorn D., Sidtitoon, N., Silapanuntakul, S. y Incharoensakdi, A. Sorption of mercury, cadmium and lead by microalgae, *Science Asia*, 28:253-261 (2002).
34. Khoo K.M. y Ting, Y.P. Polyvinyl alcohol as an immobilization matrix--a case of gold biosorption. *Water Sci Technol.* 43(11):17-23 (2001).
35. Langston, W. J. y Zhou, M. J. Cadmium accumulation distribution and elimination in the bivalve *Macoma balthica*: neither metallothionein nor metallothionein-like proteins are involved. *Marine Environmental Research* 21:225–237 (1987).
36. Legras, S., Mouneyra, C., Amiard, J. C., Amiard-Triquet C. y Rainbow, P. S. Changes in metallothionein concentrations in response to variation in natural factors (salinity, sex, weight) and metal contamination in crabs from a metal-rich estuary. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* 246(2):259-279 (2000).
37. Leung W.C., Wong M-F., Chua H., Lo W., Yu P.H.F. y Leung C.K. Removal and recovery of heavy metals by bacteria isolated from activated sludge treating industrial effluents and municipal wastewater. *Water Sci. Technol.* 41:233-240 (2000).
38. Marroquín Guerra, S.G. y M.T. Garza González. Evaluación de la contribución de los grupos funcionales carboxílicos, aminos y tioles de la biomasa de *Chlorella* sp. y *Acremonium* sp. en la sorción de cromo(VI) cadmio(II) y níquel(II). *Rev. Soc. Quim. Mex. Secc. Quim. Amb.* 1:53-56 (2004).
39. Modak, J.M. y Natarajan, K.A. Biosorption of metals using nonliving biomass. *Minerals and Metallurgical Processing.* 12 (4): 189 – 196 (1995).
40. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-003-ECOL-1997, que establece los Límites Máximos Permisibles de Contaminantes para las Aguas Residuales Tratadas que se Reúsen en Servicios al Público
41. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-052-SEMARNAT-1993, que establece las Características de los Residuos Peligrosos y el Listado de los mismos y los Límites que hacen a un Residuo Peligroso por su Toxicidad al Ambiente
42. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, protección Ambiental-Salud Ambiental Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos-clasificación y Especificaciones de Manejo.
43. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-127-SSA1-1994, Salud Ambiental, Agua Para Uso y Consumo Humano-Límites Permisibles de Calidad y Tratamientos a que debe someterse el Agua para su Potabilización.
44. Pierotty D., Otálvaro A. y Algecira N. Producción de ácido giberélico utilizando biocatalizadores soportados en matrices porosas. *Universitas Scientarium.* 11:41-50 (2006).

45. Pingarrón Carrazón J. M. y Sánchez Batanero P. Química Electroanalítica, Fundamentos y Aplicaciones. 1a Edición, Editorial Síntesis. 60-85. Madrid España (2003).
46. Prouzet, E., Khani, Z., Bertrand, M., Tokumoto, M., Ferreol, V. G., y Tranchant, J. F. An example of integrative chemistry: Combined gelation of boehmite and sodium alginate for the formation of porous beads. *Microporous and Mesoporous Materials*, 96:369–375 (2006).
47. Rainbow, P. S., Fialkowski, W. y Smith, B. D. The sandhopper *Talitrus saltator* as a trace metal biomonitor in the Gulf of Gdansk, Poland. *Marine Pollution Bulletin*. 36(3): 193-200 (1998).
48. Raraz, A.G. Biological and Biotechnological Waste Mangament in Material Processing. *JOM Journal of the Mineral Metals And Materials Society*, 47(2): 56- 63 (1995).
49. Roesijadi, G. The basis for increased metallothionein in a natural population of *Crassostrea virginica*. *Biomarkers* 4: 467–472 (1999).
50. Sambrook, J. y Russell, D. W. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, N.Y. (2001).
51. Sigel, A., Sigel, H. y Sigel, R.K.O., Metallothioneins and Related Chelators. Metal Ions in Life Sciences. 5a ed. Cambridge: RSC Publishing. ISBN 978-1-84755-899-2 (2009).
52. Skoog Douglas A., West Donald M. y Holler James F. Química Analítica 6ª Edición, McGraw-Hill, México ISBN 970-1-03358-2 (1995).
53. Soazing, L. y Marc, L. Potential use of the levels of the mRNA of a specific metallothioneins isoform (*MT-20*) in mussel (*Mytilus edulis*) as a biomarker of cadmium contamination. *Mar. Poll. Bull.* 46: 1450-1455 (2003).
54. Sussman, M. *Escherichia coli* and human disease. In *Escherichia coli* mechanisms of virulence, M. Sussman (ed.). Cambridge University Press, New York. 3–48 (1999).
55. Treybal, R. E., “Mass transfer operations”, McGraw-. Hill, N. York, 6ª ed 287 (1984).
56. Urano, K., y Tachikawa, H. Process development for removal and recovery of phosphorus from wastewater by a new adsorbent. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 30: 1897–1899 (1991).
57. Vaillancourt, R.R., Lee, T., Huang, Q., Oikemus, S., Shank, J., Ventura, J.-J., Cusson, N., Su, B., Davis, R.J. y Kelliher M.A. The death domain kinase RIP1 is essential for TNF (alpha) signaling to p38 MAP kinase by recruiting the MAP3K, MEKK3. *Mol. Cell. Biol.* 23:8377-85 (2003).
58. Vallee BL. The function of metallothionein. *Neurochem Int* 27(1):23–33 (1995).
59. Vesilind, P.A. y Morgan, S.M. Introduction to Environmental Engineering, 2a ed. Thompson Brooks/Cole Publishers. (2004)
60. Viarengo, A., Burlando, B., Dondero, F., Marro, A. y Fabbri, R. Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes. *Biomarkers* 4: 455–466 (2000)
61. Volesky, B. Biosorption for the next century. Chemical Engineering Department. Mc Gill University, Canadá. 161-170 (1999).
62. Vullo D.L. Microorganismos y metales pesados: una interacción con el medio ambiente. *Revista Química Viva*. 2(3), www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar (2003).

63. Wakao, N., y Funazkri, T. Effect of fluid dispersion coefficients on particle-to-fluid mass transfer coefficients in packed beds: Correlation of Sherwood numbers. *Chemical Engineering Science*, 33(10), 1375–1384 (1978).
64. Wase J. y Foster C. Biosorbents for metal ions, Taylor & Francis Eds. 141 – 217 (1997).
65. Weber Jr, W. J., McGinley, P. M., y Katz, L. E. Sorption phenomena in subsurface systems: Concepts, models and effects on contaminant fate and transport. *Water Research*. 25: 499–528 (1991).
66. Wei-Chen Kao, Yao-Pang Chiu, Chia-Che Chang and Jo-Shu Chang. Localization Effect on the Metal Biosorption Capability of Recombinant Mammalian and Fish Metallothioneins in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Prog.* 22: 1256- 1264 (2006).
67. Yu, B., Zhang, Y., Shukla, A., Shukla, S. S., y Dorris, K. L. The removal of heavy metals from aqueous solutions by sawdust adsorption - removal of lead and comparison of its adsorption with copper. *Journal of Hazardous Materials*, B84(1): 83–94. (2001).

APÉNDICE I

MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE PLOMO (II) Y CADMIO(II) POR ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN ATÓMICA

Espectrofotómetro de Absorción Atómica GBC Mod. 932AA
Análisis de Plomo (II)

Method

Instrument Parameters

System Type	Flame
Element	Pb
Matrix	
Lamp Current	5.0 mA
Wavelength	283.3 nm
Slit Width	0.5 nm
Slit Height	Normal
Instrument Mode	Abs. BC On

Sample Measurement Parameters

Measurement Mode	Integration
Sample Introduction	Manual
Read Time	2.0 s
Time Constant	0.0
Replicates	3

Calibration Parameters

Calibration Mode	Conc Least Squares
Overrange Sample Action	None
Conc. Units	µg/ml
Conc. Decimal Places	3
Calibration Failure On	R Value
Cal. Failure Limit: R Value	0.950
Calibration Failure Action	Continue
Measure Sample Blank After Cal.	No
Auto Save Method After Cal.	Yes

Quality Parameters

Second Fail Action	Stop
Range Checking	Off
Check Sample Conc	1.000 µg/ml
Check Sample Lower Range	80.0 %
Check Sample Upper Range	120.0 %
Check Sample Fail Action	Stop
Check Sample Flag	*

Flame Control Parameters

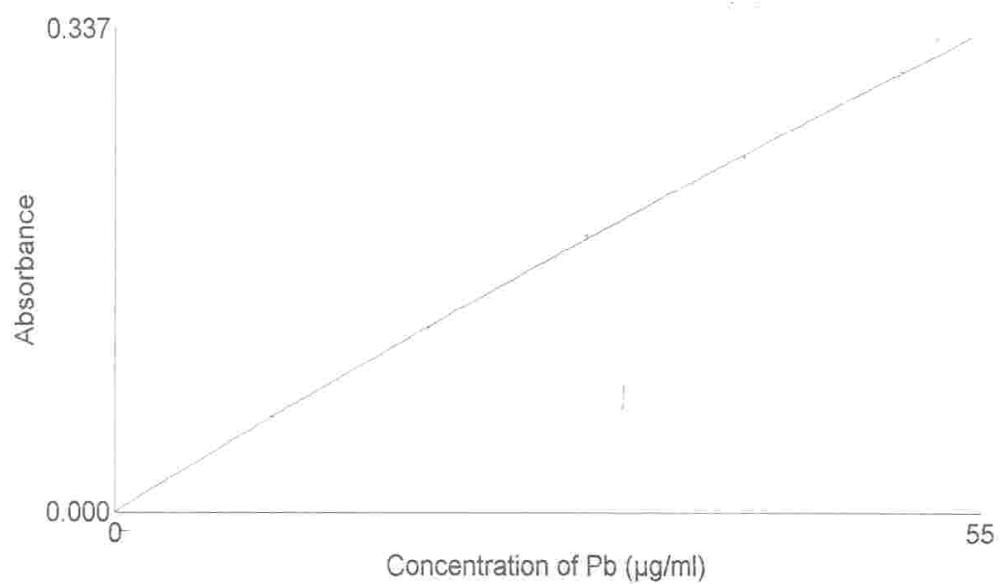
Flame Type	Air-Acetylene
Fuel Flow	2.00 l/min
Oxidant Flow	10.0 l/min
Burner Angle	0.0°
Workhead Height	15.0 mm

Full Calibration

Calibration Mode

Conc Least Squares Max Error : 0.336 R²: 1.000

Sample Label	Conc. (µg/ml)	%RSD	Mean Abs.
Cal Blank	-----	HIGH	0.0006
Standard 1	10.000	0.41	0.0658
Standard 2	20.000	1.12	0.1282
Standard 3	30.000	0.64	0.1921
Standard 4	40.000	0.57	0.2472
Standard 5	50.000	0.61	0.3062



Method

Instrument Parameters

System Type	Flame
Element	Pb
Matrix	
Lamp Current	5.0 mA
Wavelength	261.4 nm
Slit Width	0.5 nm
Slit Height	Normal
Instrument Mode	Abs. BC On

Sample Measurement Parameters

Measurement Mode	Integration
Sample Introduction	Manual
Read Time	2.0 s
Time Constant	0.0
Replicates	3

Calibration Parameters

Calibration Mode	Conc Least Squares
Overrange Sample Action	None
Conc. Units	µg/ml
Conc. Decimal Places	3
Calibration Failure On	R Value
Cal. Failure Limit R Value	0.950
Calibration Failure Action	Continue
Measure Sample Blank After Cal.	No
Auto Save Method After Cal.	Yes

Quality Parameters

Second Fail Action	Stop
Range Checking	Off
Check Sample Conc	1.000 µg/ml
Check Sample Lower Range	80.0 %
Check Sample Upper Range	120.0 %
Check Sample Fail Action	Stop
Check Sample Flag	*

Flame Control Parameters

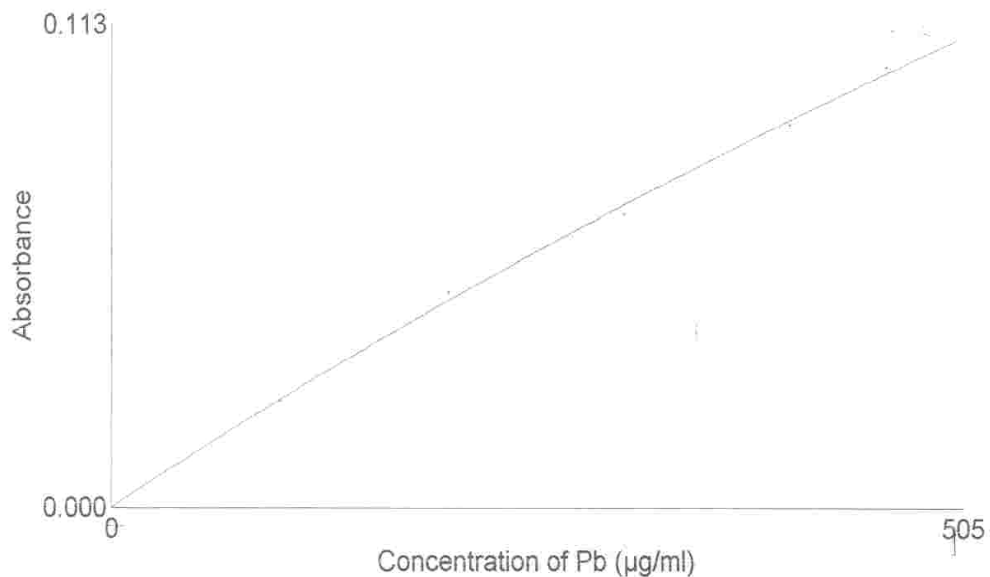
Flame Type	Air-Acetylene
Fuel Flow	2.00 l/min
Oxidant Flow	10.0 l/min
Burner Angle	0.0°
Workhead Height	15.0 mm

Full Calibration

Calibration Mode

Conc Least Squares Max Error : 9.975 R² : 0.997

Sample Label	Conc. (µg/ml)	%RSD	Mean Abs.
Cal Blank	----	HIGH	0.0007
Standard 1	100.220	2.51	0.0247
Standard 2	200.260	2.10	0.0501
Standard 3	303.790	0.64	0.0685
Standard 4	401.970	0.79	0.0893
Standard 5	459.350	1.77	0.1028



Espectrofotómetro de Absorción Atómica GBC Mod. 932AA
Análisis de Cadmio (II)

Method

Instrument Parameters

System Type	Flame
Element	Cd ^I
Matrix	
Lamp Current	3.0 mA
Wavelength	228.8 nm
Slit Width	0.5 nm
Slit Height	Normal
Instrument Mode	Abs. BC On

Sample Measurement Parameters

Measurement Mode	Integration
Sample Introduction	Manual
Read Time	2.0 s
Time Constant	0.0
Replicates	3

Calibration Parameters

Calibration Mode	Conc Least Squares
Overrange Sample Action	None
Conc. Units	µg/ml
Conc. Decimal Places	3
Calibration Failure On	R Value
Cal. Failure Limit R Value	0.950
Calibration Failure Action	Continue
Measure Sample Blank After Cal.	No
Auto Save Method After Cal.	Yes

Quality Parameters

Second Fail Action	Stop
Range Checking	Off
Check Sample Conc	1.000 µg/ml
Check Sample Lower Range	80.0 %
Check Sample Upper Range	120.0 %
Check Sample Fail Action	Stop
Check Sample Flag	*

Flame Control Parameters

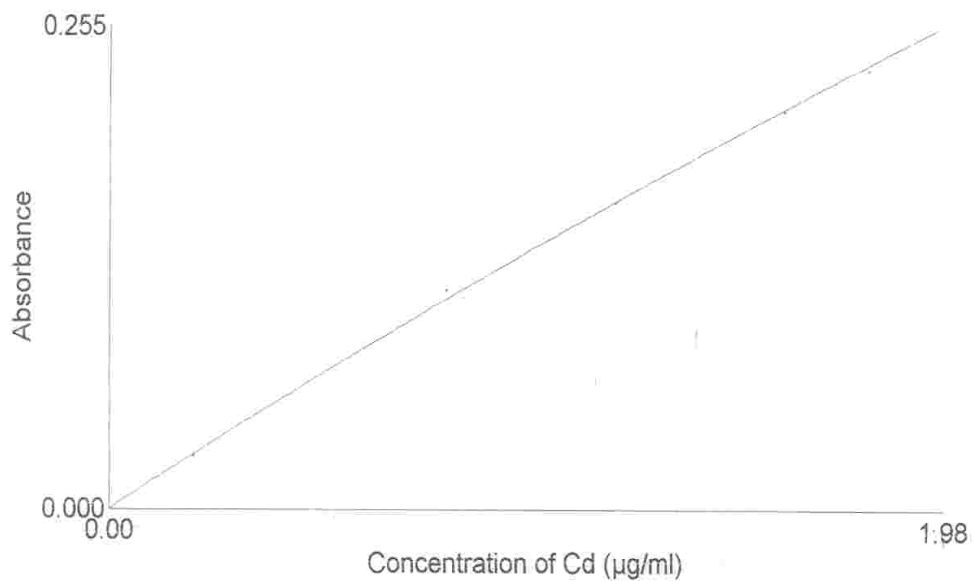
Flame Type	Air-Acetylene
Fuel Flow	2.00 l/min
Oxidant Flow	10.0 l/min
Burner Angle	0.0°
Workhead Height	15.0 mm

Full Calibration

Calibration Mode . . .

Conc Least Squares .Max Error : 0.037 R² : 0.999

Sample Label	Conc. (µg/ml)	%RSD	Mean Abs.
Cal Blank	----	HIGH	0.0001
Standard 1	0.200	3.06	0.0280
Standard 2	0.800	0.79	0.1154
Standard 3	1.200	1.22	0.1614
Standard 4	1.600	0.92	0.2099
Standard 5	1.800	0.59	0.2316



Method

Instrument Parameters

System Type	Flame
Element	Cd
Matrix	
Lamp Current	3.0 mA
Wavelength	326.1 nm
Slit Width	0.5 nm
Slit Height	Normal
Instrument Mode	Abs. BC On

Sample Measurement Parameters

Measurement Mode	Integration
Sample Introduction	Manual
Read Time	2.0 s
Time Constant	0.0
Replicates	3

Calibration Parameters

Calibration Mode	Conc Least Squares
Ovrrange Sample Action	None
Conc. Units	µg/ml
Conc. Decimal Places	3
Calibration Failure On	R Value
Cal. Failure Limit R Value	0.950
Calibration Failure Action	Continue
Measure Sample Blank After Cal.	No
Auto Save Method After Cal.	Yes

Quality Parameters

Second Fail Action	Stop
Range Checking	Off
Check Sample Conc	1.000 µg/ml
Check Sample Lower Range	80.0 %
Check Sample Upper Range	120.0 %
Check Sample Fail Action	Stop
Check Sample Flag	*

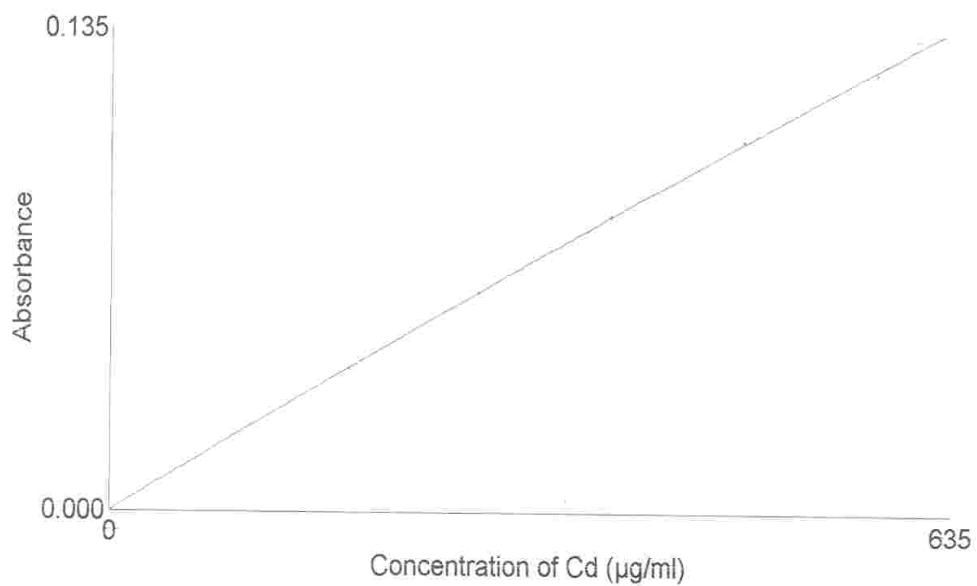
Flame Control Parameters

Flame Type	Air-Acetylene
Fuel Flow	2.00 l/min
Oxidant Flow	10.0 l/min
Burner Angle	0.0°
Workhead Height	15.0 mm

Full Calibration
 Calibration Mode

Conc Least Squares Max Error : 4.280 R² : 1.000

Sample Label	Conc. (µg/ml)	%RSD	Mean Abs.
Cal Blank	-----	2.77	-0.0259
Standard 1	180.880	1.08	0.0400
Standard 2	277.910	1.07	0.0612
Standard 3	376.960	0.20	0.0824
Standard 4	476.820	0.44	0.1035
Standard 5	576.900	0.18	0.1224



APÉNDICE II

RESULTADOS DE LAS CINÉTICAS DE REMOCIÓN DE PLOMO (II) Y CADMIO (II) EN COLUMNA A DIFERENTES FLUJOS VOLUMÉTRICOS

RESULTADOS DE LAS CINÉTICAS DE REMOCIÓN DE PLOMO (II) EN COLUMNA A DIFERENTES FLUJOS VOLUMÉTRICOS

P L O M O (I I)			
<i>F</i> (mL/min)	80	40	60
<i>t</i> (min)			
0	0	0	0
5	29.922	35.647	30.434
10	30.501	38.413	30.701
20	30.907	41.039	31.794
40	33.225	42.951	34.671
60	34.584	46.261	42.104
120	35.882	46.073	63.73
180	40.182	54.546	77.379
240	45.147	55.995	85.774
300	45.145	57.028	90.429
360	49.433	58.839	91.231
420	54.588	58.916	92.143
[Pb] _{R total}	39.64	54.398	72.932
[Pb] _O	113.48	111.446	96.259

**RESULTADOS DE LAS CINÉTICAS DE REMOCIÓN DE CADMIO (II) EN
COLUMNA A DIFERENTES FLUJOS VOLUMÉTRICOS**

		C A D M I O (II)		
<i>F</i> (mL/min)	<i>t</i> (min)	80	40	60
		0	0	0
	5	40.527	40.338	63.38
	10	44.107	41.204	64.186
	20	49.837	42.577	72.723
	40	51.541	42.847	76.985
	60	53.79	49.052	80.958
	120	60.156	49.508	96.083
	180	60.089	55.675	96.083
	240	68.305	65.105	97.083
	300	68.412	69.437	98.083
	360	76.892	77.848	98.083
	420	80.009	83.83	97.083
	[Cd] _{R total}	63.596	66.865	71.028
	[Cd] _o	101.444	101.647	106.335

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO



Verónica Almaguer Cantú

Candidato para el Grado de
Doctor en Ciencias con Especialidad en Biotecnología

Tesis: DISEÑO Y EVALUACIÓN DE UN REACTOR EN COLUMNA A ESCALA BENCH PARA LA REMOCIÓN DE METALES PESADOS UTILIZANDO LA PROTEÍNA QUIMÉRICA METALOTIONEÍNA-TIOREDOXINA

Campo de Estudio: Biotecnología Ambiental

Biografía:

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León el 20 de Enero de 1982, hija de Gonzalo Almaguer González y Ma. Hortensia Cantú de Almaguer.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Licenciado en Química Industrial en 2005 con Tesis de investigación y Testimonio de Desempeño Académico Satisfactorio (CENEVAL). Alumna Becaria de Tiempo Completo de la FCQ, División de Estudios de Superiores, UANL de 2004 a 2006, para obtener grado de Maestra en Ciencias con orientación en Procesos Sustentables. Alumna Becaria de 2007 a 2009 de CONACYT, en la FCB, UANL.

Experiencia Profesional: Maestro de la Licenciatura en Química Industrial de la FCQ de la UANL de 2005- 2008, asistente de investigación en el Laboratorio de Biotecnología desde 2003 y en el Laboratorio de Síntesis Orgánica de 2005 a 2008 dentro de la misma institución. Maestra de Asignatura en FIME, UANL desde 2008 a la fecha.