

Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana

ROSA OLIVIA CAÑIZARES-VILLANUEVA

Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Ave. IPN No. 2508, San Pedro Zacatenco. C. P. 07300. México, D. F.

E-mail

ABSTRACT. Microorganisms are known to remove heavy metal ions from water and their utilization as biosorbents for heavy metal removal, offers a potential alternative to the existent methods for the detoxification and recovery of toxic/precious metals present in industrial wastewater. Many yeasts, fungi, algae, bacteria and some aquatic plants have the capacity to concentrate metals from aqueous diluted solutions, and to accumulate them inside the cell structure. To date, the most successful biotechnological processes utilize biosorption and bioprecipitation, but other processes such as binding by specific macromolecules may have future potential. Technologies using these processes are currently used to control pollution from diverse sources. In this article, the term biosorption is used to encompass uptake by whole biomass (living or dead) via physico-chemical mechanisms such as adsorption or ion exchange. Where living biomass is used, metabolic uptake mechanisms may also contribute to the process. Mention is made about systems that employ a mixture of microorganisms as well as higher plants.

Key words: biomass, heavy metal, biosorption, bioprecipitation, microbial removal.

RESUMEN. La utilización de microorganismos como biosorbentes de metales pesados, ofrece una alternativa potencial a los métodos ya existentes para la destoxificación y recuperación de metales tóxicos o valiosos presentes en aguas residuales industriales. Muchas levaduras, hongos, algas, bacterias y cierta flora acuática tienen la capacidad de concentrar metales a partir de soluciones acuosas diluidas y de acumularlas dentro de la estructura microbiana. Actualmente los procesos biotecnológicos más eficientes utilizan la biosorción y la bioprecipitación, pero otros procesos tales como la unión a macromoléculas específicas pueden tener un potencial en el futuro. Las tecnologías que usan estos procesos son comúnmente usadas para el control de la contaminación de diversas fuentes. En este artículo, el término biosorción es usado para abarcar la utilización por la biomasa total (viva o muerta) vía mecanismos fisicoquímicos tales como la adsorción y el intercambio iónico. El mecanismo de utilización metabólica es usado cuando se utiliza la biomasa viva. Asimismo se mencionan sistemas que emplean mezclas de microorganismos así como plantas superiores.

Palabras clave: biomasa, metales pesados, biosorción, bioprecipitación, eliminación microbiana.

INTRODUCCIÓN

Los avances en la ciencia y la tecnología desde la revolución industrial, han aumentado la capacidad del ser humano para explotar los recursos naturales. Sin embargo, esto ha generado perturbaciones en los ciclos biogeoquímicos elementales.³⁹ La introducción repentina de compuestos químicos xenobióticos o la reubicación masiva de materiales naturales en diferentes compartimientos ambientales, con frecuencia puede abatir la capacidad de autolimpieza de los ecosistemas receptores y por lo tanto dar como resultado la acumulación de contaminantes a niveles problemáticos y hasta perjudiciales. Se hace necesario acelerar la eliminación de los contaminantes para remediar los problemas existentes y disminuir el impacto de incidentes futuros mediante el control del ingreso de contaminantes.

La contaminación del ambiente con metales tóxicos y

radionúcleos surge como resultado de actividades humanas, principalmente industriales, sin embargo, fuentes como la agricultura y la eliminación de residuos también contribuyen (Tabla 1). Estos contaminantes son descargados en la atmósfera y en los ambientes acuáticos y terrestres, principalmente como solutos o partículas y pueden alcanzar concentraciones elevadas, especialmente cerca del sitio de descarga. Los efectos de los metales sobre el funcionamiento de los ecosistemas varían considerablemente y son de importancia económica y de salud pública. 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 y 4. modificación de otros agentes biológicamente activos.⁴⁶



Fig. 1. Procesos que contribuyen a la captación microbiana y detoxificación de metales. La localización de algunos de los procesos, especialmente reacciones redox, no se conoce (se indican las localizaciones propuestas) y puede variar entre grupos, cepas y especies de organismos procarióticos y eucarióticos. Tomada de Gadd y White, 1993.²¹

Los metales pesados constituyen un grupo cercano a los 40 elementos de la Tabla Periódica que tienen una densidad mayor o igual a 5 g/cm^3 .⁴⁷ El rasgo distintivo de la fisiología de los metales pesados, es que aún cuando muchos de ellos son esenciales para el crecimiento como el Na, K, Mg, Ca, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn y Mo, se ha reportado que también tienen efectos tóxicos sobre las células, principalmente como resultado de su capacidad para alterar o desnaturalizar las proteínas.

Debido a su movilidad en los ecosistemas acuáticos naturales y a su toxicidad para las formas superiores de vida, los iones de metales pesados presentes en los abastecimientos de agua superficiales y subterráneos, 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.³

Una vez en el ambiente, los metales pueden sufrir transformaciones a diferentes formas móviles y/o pueden ser inmovilizados en trampas ambientales. La biotransformación e inmovilización producen efectos como la precipitación del oro,⁶¹ pero otros mecanismos, por ejemplo la sedimentación de radionúcleos por el plancton marino,¹⁶ tienen probablemente un mayor significado global como trampas para contaminantes. La deposición de metales vía microorganismos es de gran importancia en los ciclos biogeoquímicos; por ejemplo, la formación de microfósiles y de minerales, la deposición de hierro y manganeso y la mineralización de uranio y plata.^{6,40}

Los avances tecnológicos para el abatimiento de la contaminación por metales tóxicos consisten en el uso selectivo y en el mejoramiento de estos procesos naturales para el tratamiento de residuos particulares. Los procesos por los cuales los organismos interactúan con los metales tóxicos son muy diversos (Fig. 1). Sin embargo, existen en la práctica tres categorías generales de procesos biotecnológicos para el tratamiento de residuos líquidos que contienen me-

tales tóxicos: la biosorción; la precipitación extracelular y la captación a través de biopolímeros purificados y de otras moléculas especializadas, derivadas de células microbianas. Estos procesos no son excluyentes y pueden involucrar fenómenos fisicoquímicos y biológicos. Las tecnologías que utilizan estos procesos se encuentran actualmente en uso para controlar la contaminación de diversas fuentes, incluyendo las actividades de fundición y de minería.²¹

Los métodos convencionales para el tratamiento de aguas residuales con metales que incluyen: precipitación, oxidación, reducción, intercambio iónico, filtración, tratamiento electroquímico, tecnologías de membrana y recuperación por evaporación, resultan costosos e ineficientes, especialmente cuando la concentración de los metales es muy baja.^{58,66} El uso de sistemas biológicos para la eliminación de metales pesados a partir de soluciones diluidas tiene el potencial para hacerlo mejor y a menor costo.³⁰ Los métodos químicos resultan costosos debido a que el agente activo no puede ser recuperado para su posterior reutilización. Además, el producto final es un lodo con alta concentración de metales lo que dificulta su eliminación.³

Los microorganismos y sus productos pueden ser bioacumuladores muy eficientes de metales solubles y particulados, especialmente a partir de concentraciones externas diluidas, por esto las tecnologías basadas en los microorganismos ofrecen una alternativa o ayudan a las técnicas convencionales para la eliminación/recuperación de metales.

Muchos metales pesados son esenciales para el crecimiento y el metabolismo microbiano en bajas concentraciones, *e. g.* Cu, Zn, Mn, mientras que a otros no se les conoce función biológica, *e. g.* Au, Ag, Pb, Cd. Una característica de estos metales y de elementos relacionados es que pueden ser altamente tóxicos para las células vivas.¹⁷ Por lo tanto, si se considera el uso de células vivas para un sistema de eliminación de metales, la toxicidad puede conducir a un envenenamiento e inactivación.⁴⁸ El uso de biomasa muerta o productos derivados de ella elimina el problema de la toxicidad, no solo de la provocada por metales disueltos, sino también por condiciones adversas de operación, además del componente económico de mantenimiento incluyendo el suplemento de nutrientes. Sin embargo, las células vivas pueden presentar una variedad más amplia de mecanismos para la acumulación de metales como el transporte, la formación de complejos extracelulares y la precipitación (Tabla 2). De manera adicional, la tolerancia y resistencia a los metales pesados son propiedades que están muy distribuidas en los microorganismos de todos los grupos.^{5,7,18,53}

En el esquema de la Fig. 2, la biomasa microbiana (o sus productos) es puesta en contacto con una solución de metales y una vez que éstos han sido removidos por ella, se tiene la opción de recuperar la biomasa íntegra (funcional) utilizando reactivos químicos suaves para retirar los metales sin destruirla, permitiendo así su utilización posterior

Tabla 1. Fuentes antropogénicas de metales tóxicos y elementos relacionados ^{a,b}.

A	B				C		D	E	F		Total
	Carbón ^c	Aceite ^c	Madera	Energía ^c	No ferrosos	Fe y acero			Residuos sólidos	Aguas residuales	
As	23,830	57	210	820	19,090	1,945	7,730	7,550	793	12,842	124,820
Cd	8,529	143	120	125	7,371	156	3,666	2,450	1,147	24,319	38,970
Cr	308,775	1,408		5,700	13,350	15,620	92,680	50,610	20,339	61,290	172,480
Cu	5,185	1,959	900	720	16,588	1,601	411	33,740	27,970	40,905	147,370
Hg	4,670		180	1,800	229		5,245	1,145	2,420	498	11,860
Mn	1,087,212	1,395		11,400	17,905	25,000	230,600	20,515	25,256	134,055	1,708,270
Ni	181,262	27,070	1,200	10,500	14,631	5,238	60,246	7,440	259	60,710	380,650
Pb	8,158	250,449	2,100	720	54,725	9,732	192	9,300	42,100	16,470	346,150
Se	33,878	4,845		18,000	13,630	2	6,566	4,250	348	5,904	88,740
Va	46,925	76,120		300	789	1,151	25,470	550	1,295	676	230,000
Zn	11,100	2,159		18,000	97,287	34,325	824,935	85,015	65,100	103,715	1,729,880

A: Metal tóxico B: Potencia y energía C: Metales D: Agricultura E: Manufactura F: Eliminación de residuos

^aAdaptado de Nriagu y Pacyna, 1988.⁴⁵ ^bTodas las cantidades están en ton/año. ^cRendimiento directo de combustión, incluyendo el Pb derivado del petróleo y eliminación de cenizas de carbón. Los espacios vacíos significan que la cantidad de metal emitido es despreciable.



Tabla 2. Comparación de la biosorción de metales pesados por células inertes o células vivas.

Adsorción por biomasa inerte inmovilizada	Incorporación por células vivas inmovilizadas
Ventajas	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Independiente del crecimiento, biomasa muerta, no sujeto a las limitaciones de toxicidad. No necesita de nutrientes en la solución de alimentación, de disposición de nutrientes, ni productos metabólicos. 2. Los procesos no están gobernados por limitaciones biológicas. 3. La selección de la técnica de inmovilización no está gobernada por limitaciones de toxicidad o inactivación térmica. 4. Son muy rápidos y eficientes en la remoción de metales; la biomasa se comporta como un intercambiador de iones. 5. Los metales pueden ser liberados fácilmente y recuperados. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Aunque cada célula puede llegar a saturarse, el sistema se auto-restablece debido al crecimiento. 2. Los metales se depositan en un estado químico alterado y menos sensible a la desorción espontánea. 3. La actividad metabólica puede ser la única forma económica de lograr cambios en estado de valencia o degradar compuestos organometálicos; se pueden utilizar sistemas multienzimáticos. 4. Se pueden mejorar las cepas por medio del aislamiento de mutantes o la manipulación genética, debido a que ésta es una propiedad microbiana más que un producto bajo explotación. 5. Se pueden emplear dos o más organismos de una manera sinérgica.
Desventajas	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Rápida saturación: cuando los sitios de interacción con el metal están ocupados, es necesario remover el metal antes de utilizarse nuevamente, sin importar su valor. 2. El secuestro por adsorción es sensible al pH. 3. El estado de valencia del metal no puede ser alterado biológicamente, <i>e.g.</i> para dar formas menos solubles. 4. Las especies organometálicas no son susceptibles de degradación. 5. El mejoramiento de estos procesos biológicos es limitado ya que las células no efectúan un metabolismo; la producción de agentes adsorbentes ocurre durante la etapa de pre-crecimiento. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. La toxicidad; sólo se pueden tratar los metales a bajas concentraciones, sin embargo se han utilizado cepas resistentes a los metales. 2. Es necesario alimentar los flujos bajo condiciones fisiológicamente permisibles. 3. Se necesitan nutrientes para el crecimiento. 4. La disposición de los productos metabólicos y los nutrientes del crecimiento no consumidos. 5. Los productos metabólicos pueden formar complejos con los metales, impidiendo la precipitación. 6. La recuperación de los metales por desorción es limitada, debido a que pueden formar uniones intracelulares. 7. El modelamiento de un sistema no definido representa grandes dificultades matemáticas.

Adaptado de Macaskie, 1990.⁴³

en un nuevo ciclo de tratamiento. En caso de que no importe la integridad de la biomasa, el metal puede ser retirado de la misma por métodos más drásticos. En la parte central del esquema, cuando se ha llegado a la saturación de la biomasa (o de sus productos) con el metal, se plantea la posibilidad de recircular parte de la solución que aún contiene metales, para ser sometida a un nuevo ciclo de eliminación por biomasa fresca y/o regenerada, por otra parte se tiene una descarga descontaminada o con una concentración de metal menor a la inicial.

Las fuentes de los metales no son renovables y las reservas naturales están siendo consumidas, por lo tanto; es imperativo que aquellos metales considerados peligrosos desde el punto de vista ambiental, o aquellos de importancia tecnológica, de significado estratégico o de valor económico, deban ser removidos/recuperados en su lugar de origen, utilizando sistemas de tratamiento apropiados.³

PROCESO DE BIOSORCIÓN DE METALES PESADOS

El término “biosorción”, se utiliza para referirse a la captación de metales que lleva a cabo una biomasa completa (viva o muerta), a través de mecanismos fisicoquímicos como la adsorción o el intercambio iónico. Cuando se utiliza biomasa viva, los mecanismos metabólicos de captación también pueden contribuir en el proceso.

El proceso de biosorción involucra una fase sólida (sorbente) y una fase líquida (solvente, que es normalmente el agua) que contiene las especies disueltas que van a ser sorbidas (sorbato, *e. g.* iones metálicos). Debido a la gran afinidad del sorbente por las especies del sorbato, este último es atraído hacia el sólido y enlazado por diferentes mecanismos. Este proceso continúa hasta que se establece un equilibrio entre el sorbato disuelto y el sorbato enlazado al

Figura 2. Principios básicos involucrados en la eliminación/recuperación de metales de soluciones acuosas por biomasa microbiana o productos derivados. Tomada de Gadd, 1988¹⁹.

sólido (a una concentración final o en el equilibrio). La afinidad del sorbente por el sorbato determina su distribución entre las fases sólida y líquida. La calidad del sorbente está dada por la cantidad del sorbato que puede atraer y retener en forma inmovilizada.

En la última década, el potencial para la biosorción de metales por biomasa ha quedado bien establecido.²⁶ Por razones económicas, resultan de particular interés los tipos de biomasa abundante, como los desechos generados por fermentaciones industriales de gran escala o de ciertas algas que enlazan metales y se encuentran en grandes cantidades en el mar. Algunos de estos tipos de biomasa que absorben metales en cantidades elevadas, sirven como base para los procesos de biosorción de metales, previendo su uso particularmente como medios muy competitivos para la detoxificación de efluentes industriales que contienen metales²⁶ y para la recuperación de metales preciosos.^{24,36,37,38}

Los sistemas que utilizan células vivas pueden emplear tanto una mezcla de microorganismos como de plantas superiores. Por ejemplo, los florecimientos de algas y bacterias fortalecidos por la adición de aguas residuales, disminuye los metales Cu, Cd, Zn, Hg y Fe de los efluentes mineros.²² El sistema de meandro usado en la mina de Pb Homestake (MO, EEUU), hace pasar sus efluentes con Pb, Cu, Zn, Mn, Fe, Ni y Cd a través de canales que contienen algas, cianobacterias y plantas superiores (Fig. 3). Los metales son removidos de la columna de agua con una eficiencia >99%.²² Estos sistemas tan complejos utilizan seguramente otros mecanismos como la precipitación y el

atrapamiento de partículas, además de la biosorción, los cuales concentran los metales en el sedimento en formas que han reducido enormemente la movilidad y disponibilidad biológica.

Los hongos, incluyendo las levaduras, han recibido especial atención con relación a la biosorción de metales, particularmente porque la biomasa fúngica se origina como un subproducto de diferentes fermentaciones industriales^{14,54,58} (Tabla 3). La acumulación de actínidos por biomasa íntegra parece que se lleva a cabo principalmente por biosorción independiente del metabolismo,⁵⁰ siendo la pared celular el principal sitio de acumulación.^{55,58} Células impermeabilizadas con carbonato o detergente, pueden aumentar su captación y acumular metales como gránulos o depósitos intracelulares.²⁰

Partículas que contienen metales, por ejemplo, polvo de zinc, magnetita y sulfuros metálicos, pueden ser removidas de las soluciones por la biomasa fúngica, como la de *Aspergillus niger*, que es un residuo de la fermentación para producir ácido cítrico, por una combinación de los procesos de biosorción y atrapamiento.⁵⁹

BIOSORCIÓN DE METALES PESADOS POR BIOMASA INMOVILIZADA

Las desventajas del uso de biomasa microbiana en suspensión, incluyen su tamaño de partícula tan pequeño, su baja resistencia mecánica y la dificultad para separar la biomasa del efluente. Sin embargo, el uso de partículas de



Figura 3. Sistema de meandro como proceso para disminuir la contaminación por metales tóxicos. Tomada de Gadd y White, 1993.²¹

Tabla 3. Biomasa de uso potencial como biosorbente de metales pesados.

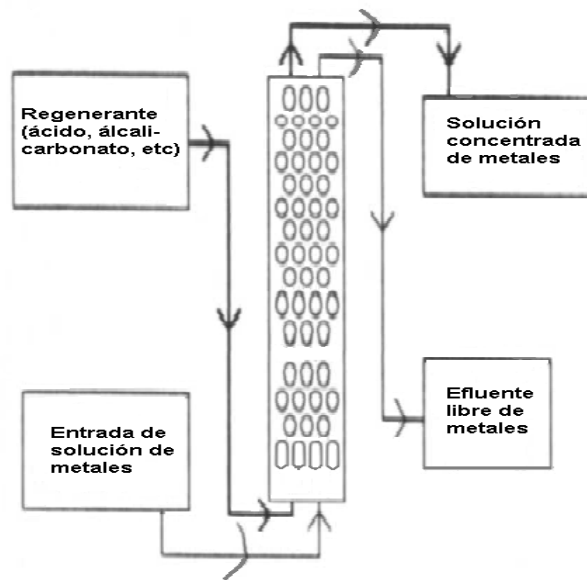
<p>Subproductos de procesos industriales:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (industria alimentaria) • <i>Penicillium chrysogenum</i> (industria de antibióticos) • <i>Rhizopus arrhizus</i> (industria alimentaria) • <i>Aspergillus niger</i> (industria de ácido cítrico y enzimas) • <i>Bacillus</i> spp. (industria de antibióticos y aminoácidos) • <i>Streptomyces nursei</i> (industria farmacéutica) • Lodos activados • Lodos digeridos anaeróbicamente <p style="text-align: center;">Algas marinas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Sargassum fluitans</i>

Adaptado de Atkinson *et al.*, 1998.³

biomasa inmovilizada en reactores de cama empacada o fluidizada, disminuye estas desventajas.^{42,62} La biomasa viva inmovilizada, tiene primero que tomar la forma de biopelícula sobre soportes preparados a partir de una varie-

dad de materiales inertes.²⁰ Estas biopelículas se han utilizado en diferentes configuraciones de biorreactores, incluyendo los discos biológicos rotatorios, los reactores de cama fija, los filtros de percolación, las camas fluidizadas y los biorreactores tipo air-lift^{19,58} (Fig. 4A, B; 5A, B). Los "pellets" de los reactores anaerobios de flujo ascendente también pueden ser integrados a un proceso de biosorción. Estos "pellets" tienen de por sí un tamaño uniforme y un estado inmovilizado natural, por lo tanto no requieren de una preparación posterior. Resultan adecuados para su aplicación en reactores de columna. Sin embargo, su baja capacidad de biosorción (1.9 mg g⁻¹ de Zn y Cd) puede limitar su aplicación.³ Adicionalmente al uso de biopelículas, se ha inmovilizado biomasa viva o muerta de todos los grupos microbianos, por encapsulación o entrecruzamiento.^{13,19,42} 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.²¹ La biomasa generalmente se mezcla con los agentes de inmovilización en densidades de 4 a 6 % de biomasa por 1% del soporte (p/p) reduciéndose por lo tanto la cantidad requerida de agente.⁴¹

La biomasa microbiana puede ser usada en su estado "natural" o modificada, por ejemplo por medio de un tratamiento alcalino, para mejorar la eficiencia de biosorción.^{8,9,19} La biomasa de *Bacillus* sp. que también es un desecho de fermentaciones industriales, se trata con álcali



Reactor de cama empacada (3 b)

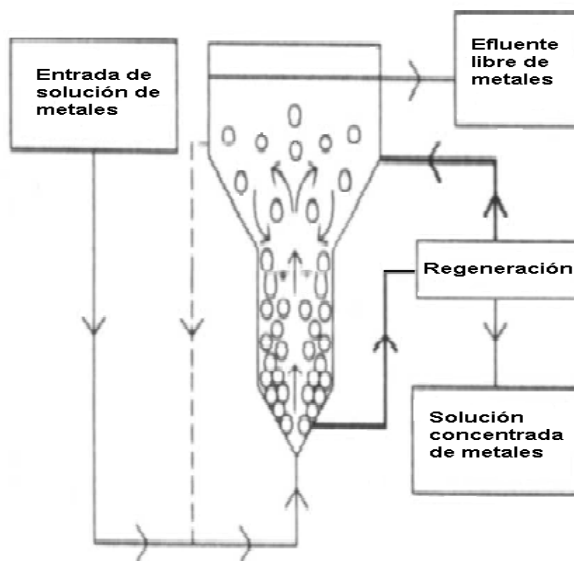
Proceso: biosorción

Biomasa: inmovilizada

Regeneración: *in-situ*

Escala: hasta 20 kg de biomasa (pero es posible la construcción modular)

Aplicaciones comerciales: AMT-Bioclaim™ Algasorb, BIO-FIX



Reactor de cama fluidizada (3 c)

Proceso: biosorción, aplicaciones actuales utilizan material inerte

Biomasa: inmovilizada

Regeneración: ciclo separado (se puede usar remoción por pulsos)

Escala: 80-90 kg de biomasa

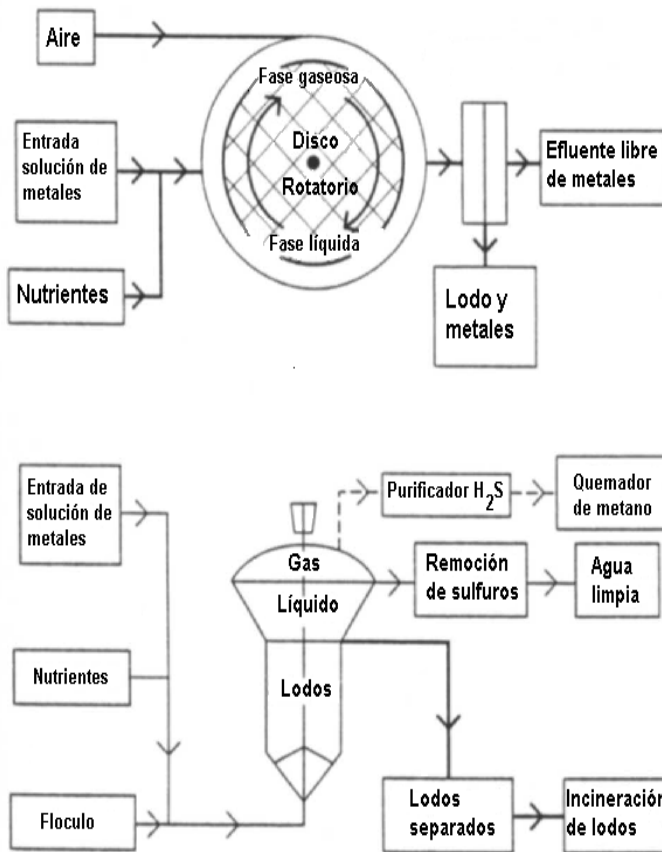
Aplicación comercial: AMT-Bioclaim

Clave: ○○ Partículas de biomasa
 → Entrada, salida
 - - - - - Recirculación
 ↺ Regeneración de biomasa

Figura 4 (A, B). Procesos que utilizan biorreactores con biomasa inmovilizada para disminuir la contaminación por metales tóxicos. Tomada de Gadd y White, 1993.²¹ A. Reactor de cama empacada. B. Reactor de cama fluidizada

para mejorar la captación de metales, se entrecruza químicamente, se “petetiza” por extrusión o se muele y se deseca para proveer de un material que tiene una vida de anaquel indefinida. Esta preparación de *Bacillus* no es selectiva y remueve Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, U y Zn (individuales o en mezcla), en un intervalo de concentraciones muy amplio. Las cargas de metales son superiores al 10 % del peso seco y tiene una eficiencia de eliminación >99% y efluentes con una concentración total de metales de alrededor de 10-50 partes por billón (AMT-Bioclaim Process™, EEUU, Ad-

vanced Mineral Technologies Inc.) (Fig. 4 A, B). El proceso AMT-Bioclaim™ emplea preparaciones granuladas de *Bacillus*, en dos sistemas de reactores, uno de cama fija que contiene aproximadamente 20 Kg de gránulos y se utiliza para volúmenes pequeños (<15 l min⁻¹), mientras que otro más grande, de cama fluidizada que contiene aproximadamente 80-90 Kg de biomasa, se utiliza para flujos mayores (>35 l min⁻¹). Después de su captación, los metales se separan de la biomasa utilizando ácido sulfúrico, hidróxido de sodio o agentes quelantes y son recuperados



Reactor de discos rotatorios (3 d)

Proceso: biosorción, precipitación y transformaciones aeróbicas (y degradación de residuos orgánicos)

Biomasa: biopelícula

Regeneración: ninguna, los metales son removidos durante la formación de lodos en la biopelícula

Escala ca. $2.5 \times 10^4 \text{ m}^3 \text{ día}^{-1}$

Aplicación comercial: Procesos de tratamiento biológico en las minas de Homestake

Biorreactor de lecho de lodos (3 e)

Procesos: biosorción; precipitación de sulfuros (anaeróbico)

Biomasa: lodos floculados

Regeneración: ninguna

Escala: potencialmente grande

Aplicación comercial: procesos Shell-Budelco

Clave:
 - - - Gas
 → Líquido
 → Lodos

Figura 5 (A, B). Utilización de biorreactores para disminuir la contaminación por metales tóxicos. Tomada de Gadd y White, 1993.²¹ A, Reactor de discos rotatorios (biodiscos). B, Biorreactor de lecho de lodos.

utilizando métodos químicos. Los gránulos de biomasa son regenerados por medio de un tratamiento alcalino para su uso repetido.⁶³ El uso de biomasa inmovilizada de *Rhizopus arrhizus* adicionada de polímero, mejora la eliminación de uranio.⁵⁷

Se han utilizado camas fluidizadas con biomasa de *Chlorella vulgaris* y *Spirulina platensis* inmovilizadas en alginato y en poliacrilamida para eliminar diversos metales, incluyendo Cu, Pb, Zn y Au, a partir de mezclas y se han desarrollado varios esquemas para la recuperación selectiva de estos metales.^{14,25} El alginato y la poliacrilamida presentan buena resistencia a la presión hidrostática y a la degradación mecánica, sin embargo, se cree que la poliacrilamida no es lo suficientemente fuerte para aplicaciones comerciales.

De los productos comerciales, Alga SORBTM (Bio-Recovery Systems, Inc., Las Cruces NM, EEUU) contiene biomasa algal inmovilizada en una matriz de sílica y se utiliza en sistemas por lote o en columnas. Las columnas se empacan con las partículas algales inmovilizadas que tienen un tamaño de 40 a 50 mallas. Este sistema se ha utilizado para la eliminación de Ag, Al, Au, Co, Cu, Cr, Hg,

Ni, Pb, Pd, Pt, U y Zn a partir de efluentes contaminados⁴ (Fig. 4 A). La recuperación selectiva de los metales se lleva a cabo por medio de un tratamiento con reactivos químicos apropiados, después del cual la biomasa regenerada retiene aproximadamente el 90 % de su capacidad original para captar metales, aún después de 18 meses de un uso regular.

BIO-FIX es un biosorbente que utiliza biomasa de diferentes fuentes, incluyendo cianobacterias (*Spirulina*), una levadura, algas y plantas (*Lemna* sp. y *Sphagnum* sp.). La biomasa se mezcla con las gomas guar y xantana para dar un producto consistente, luego se inmoviliza en forma de esferas con plisulfona. La captación de Zn que se obtiene con este proceso, es aproximadamente 4 veces superior al que se logra con una resina de intercambio iónico. El orden de afinidad de BIO-FIX es $\text{Al} > \text{Cd} > \text{Zn} > \text{Mn}$. Los iones metálicos removidos, son eluidos con HCl o HNO₃ y el biosorbente puede ser reutilizado con más de 120 ciclos de extracción-elución^{8,9} (Fig. 4 A).

El bisulfuro de hidrógeno (H₂S) es producido por bacterias reductoras del azufre, tales como *Desulphovibrio* y/o *Desulphotomaculum* sp. Los productos de solubilidad de la

mayoría de los sulfuros metálicos son extremadamente bajos y precipitan fácilmente como sulfuros, por ejemplo ZnS, CdS, CuS y FeS. La actividad reductora de azufre puede ocurrir como resultado del decaimiento de la biomasa anaerobia en los sistemas de biosorción, y por lo tanto actúa como un mecanismo auxiliar útil para la remoción de metal. En las compañías Shell Research Ltd (Sittingbourne, Kent, UK) y Budelco BV (Budel-Dorplein, The Netherlands), se construyó un reactor de 9 m³ de acero inoxidable del tipo de cama de lodos que utiliza bacterias reductoras del azufre. Esta planta removió de manera exitosa, metales tóxicos y azufre por precipitación de los metales como sulfuros, a partir de agua del subsuelo contaminada. El reactor mencionado, utiliza un consorcio seleccionado pero no identificado, de bacterias reductoras del azufre que utilizan etanol como fuente de carbono para su crecimiento. Este sistema fue capaz de tolerar un amplio intervalo de pH y de temperaturas de operación, generando efluentes con una concentración de metal por debajo de las partes por billón. Las bacterias metanogénicas presentes en el consorcio, también removieron el acetato producido por las bacterias reductoras del azufre, dejando el efluente con una demanda biológica de oxígeno aceptablemente baja. El exceso de H₂S gaseoso, fue eliminado de los gases de desecho utilizando una solución de ZnSO₄ (Fig. 5 B).

Comparado con los métodos convencionales para la eliminación de metales tóxicos de efluentes industriales, el proceso de biosorción ofrece las ventajas de operación a bajo costo, reducción del volumen de lodos químicos y/o biológicos que deberán ser eliminados, una alta eficiencia en la destoxificación de efluentes muy diluidos y no requiere nutrientes.

Una vez concluidas las pruebas de laboratorio y cuando se cuenta con un biosorbente potencial que ha demostrado capacidad para adsorber y quelar los iones metálicos deseados, se deben resolver algunas preguntas que servirán de apoyo para decidir su aplicación a escala piloto o industrial (Fig. 6). Generalmente, entre más complicado resulte

un proceso se requiere de mayor capital para llevarlo a cabo. El diseño y tipo de proceso (lote/continuo) está definido por completo por la elección de la biomasa y su método de inmovilización (si se requiere que sea inmovilizada). La automatización de las instalaciones también aumentará los costos de manera considerable. La complejidad del proceso generará la necesidad de contar con personal más capacitado. Por lo tanto, con el objeto de mantener los costos bajos, los ingenieros y los biotecnólogos deben pugnar por diseños y operación sencillos.

Cuando se determina la posibilidad de aplicación de un biosorbente particular, la capacidad máxima del agente para enlazar metales a su superficie, contribuirá de manera considerable al costo total del proceso. Este valor se verá influido directamente por el volumen de biomasa requerido por cada ciclo de tratamiento, que a su vez determina la cantidad de lodo generado que deberá ser eliminado, así como el costo y tipo de transporte requerido. Aún cuando se puedan obtener biosorbentes sin costo, *e. g.* lodos residuales, el volumen que se requiera transportar puede generar costos prohibitivos al proceso. Como en cualquier proceso industrial, entre más cerca se encuentre la fuente de la materia prima (biomasa) del punto de su aplicación, el proceso se vuelve más factible. Otro aspecto que debe considerarse es el costo de la preparación del biosorbente. Actualmente, la mayor parte de las investigaciones se ha concentrado en el uso de biosorbentes granulados empacados en columnas, de manera similar a las columnas de intercambio iónico. No obstante que el atrapamiento celular imparte resistencia mecánica, resistencia a compuestos químicos y a la degradación microbiana de la biomasa, los costos de los agentes de inmovilización no pueden ser despreciados. Las células en suspensión no resultan adecuadas para su uso en columnas debido a que por su baja densidad y pequeño tamaño, provocan taponamiento del lecho, lo que da como resultado una amplia caída de presión.⁵⁶

Cuando se está determinando la eficiencia y posibilidades de un proceso de tratamiento, deben tomarse en cuenta

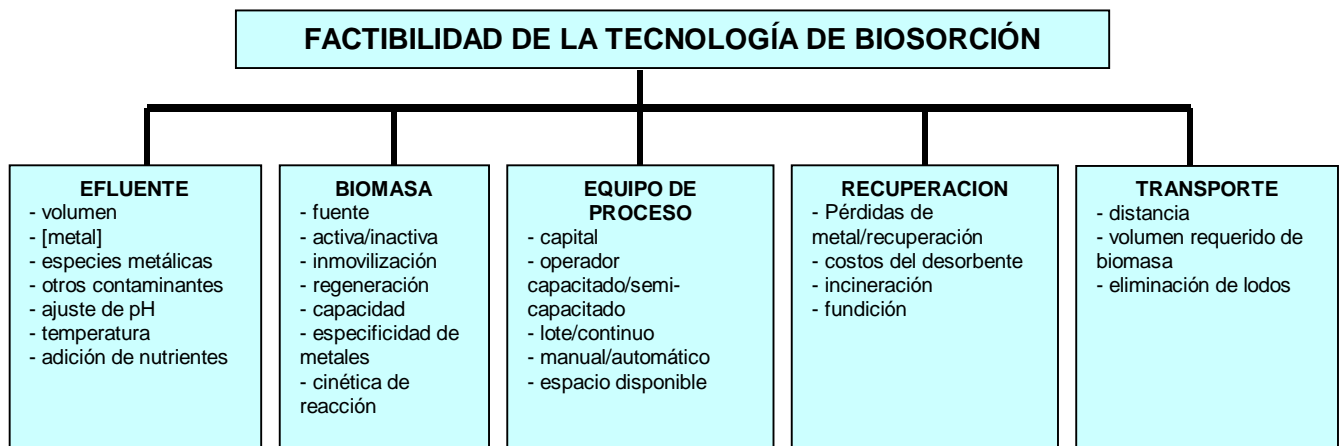


Figura 6. Consideraciones relacionadas con la factibilidad de un biosorbente para la eliminación de metal (es) de afluentes contaminados. Tomada de Atkinson *et al.*, 1998.³



también la regeneración y la reutilización del material biosorbente. Si el agente activo puede ser regenerado a través de un ciclo de desorción sin destruir la integridad de la pared celular y por lo tanto, los sitios de unión de metales o ligandos, el proceso se vuelve más lucrativo. Sin embargo, debe tomarse en cuenta que la inmovilización y el atrapamiento celular, ofrecerán cierta resistencia a las técnicas de desorción *e. g.* disolución en ácidos y/o bases fuertes. El propósito de la desorción es resolubilizar los metales unidos a la biomasa en volúmenes muy reducidos y fáciles de manejar y recuperar los metales si es que éstos son de interés económico. Si la biomasa se puede obtener sin costo y los costos de preparación y transporte son mínimos, los metales se pueden recuperar por medio de técnicas destructivas tales como la incineración o la exposición a ácidos/bases fuertes.¹⁹ Las técnicas destructivas aumentan los costos por la eliminación de los lodos.

El uso de hongos para la eliminación de metales pesados, cada vez se vuelve más importante.^{23,26,28,31,33,34,35,49,51,52,64,65} En la tabla 4 se presenta una comparación de la capacidad de captación de metales de varios adsorbentes.⁴⁴ La biomasa fúngica en polvo se ha utilizado en numerosos estudios para la adsorción de metales tóxicos presentes en soluciones diluidas. Sin embargo, la principal dificultad de este sistema es la separación de la biomasa una vez que se ha llevado a cabo la adsorción de los metales pesados. Como una solución a las dificultades mencionadas, se ha propuesto la inmovilización de la biomasa fúngica pulverizada en matrices sólidas, lo que facilita la separación de la biomasa a partir de la fase acuosa y mejora la resistencia y el manejo de la propia biomasa. La inmovilización de células vivas de hongos se ha llevado a cabo en arena,²⁷ mientras que la inmovilización de células muertas se ha hecho en fibras textiles, en poliacrilamida, alginato, polisulfona y en otros compuestos orgánicos, y se ha utilizado para la eliminación de metales pesados.^{15,32,57,60}

CONSIDERACIONES GENERALES Y CONCLUSIONES

El desarrollo potencial de los sistemas microbianos para la recuperación de metales, depende de muchos factores que incluyen la capacidad, eficiencia y selectividad del biosorbente, su facilidad de recuperación, su equivalencia con los tratamientos físicos y químicos actualmente en uso, así como su economía y tolerancia en contra de interferencias de otros componentes de los efluentes ó de las condiciones de operación. Se ha sugerido que para poder competir con las tecnologías existentes, las eficiencias de remoción tienen que ser > 99 % y sus capacidades de carga deben ser > 15 mg/g.^{11,12}

Como se mencionó con anterioridad, existe una amplia variedad de mecanismos que pueden estar involucrados en la acumulación microbiana de metales pesados y sin duda ciertos tipos de biomasa o productos derivados de ella, tienen gran capacidad y pueden actuar como agentes altamen-

Tabla 4. Comparación de la velocidad de captación (Q_{MAX}), mmol/g) de Pb y Cu de varios adsorbentes.

Adsorbente	Pb ²⁺	Cu ²⁺
Zeolita natural australiana	0.08	-
Carbón activado en polvo	0.10	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.33	0.29
<i>Rhizopus arrhizus</i>	0.50	0.25
Carbón activado granular, F-400	0.15	0.03
Resina de intercambio iónico (Duolita GT-73)	1.37	-
DP95Ca (base de algas marinas)	1.55	1.30
ER95Ca (base de algas marinas)	1.26	1.11

Fuente: Adaptada de Matheickal y Yu, 1999.⁴⁴

Q_{max} se calcula a partir de la ecuación de Langmuir: $q = (b Q_{max} c) / (1 + b c)$ donde q es la cantidad de metal pesado adsorbido por unidad de peso (seco) de adsorbente, c es la concentración de la solución en el equilibrio, Q_{max} es la adsorción máxima y b es una constante. Los parámetros de Langmuir (Q_{max} y b) se obtuvieron para diferentes valores de pH en el equilibrio. Se llevaron a cabo experimentos por lote utilizando matraces con concentraciones conocidas de metales (0.4-4.5 mMol). Se añadieron 200 mg de los biosorbentes DP95Ca y ER95Ca a los matraces y se agitó por 24 h a $21 \pm 2^\circ\text{C}$. Los biosorbentes se removieron por filtración utilizando membranas de $0.45 \mu\text{m}$ y se determinó la concentración de metales en los filtrados por espectrofotometría de absorción atómica.

te eficientes para la eliminación de metales. Debe quedar claro que las tecnologías basadas en el uso de biomasa microbiana no tienen necesariamente que reemplazar a los tratamientos ya existentes, pero sí pueden actuar como suplementos o sistemas de pulimento para los procesos existentes que no resultan completamente eficientes.

La selectividad constituye un problema para muchos sistemas de biosorción de metales, pero ésta puede disminuirse dependiendo de las concentraciones relativas de los diferentes metales presentes. Además puede alcanzarse un cierto grado de selectividad a través de una selección de cepas microbianas, en sistemas donde los iones tienen afinidades muy diferentes por el biosorbente. Por otra parte, puede lograrse mayor selectividad en la recuperación si se utilizan procedimientos de elusión apropiados.

Tanto la biomasa viva como la muerta y sus productos derivados o excretados, pueden acumular metales pesados y radionúcleos. Las células vivas tienen posibilidades en procesos comerciales y la biomasa microbiana de los lodos activados parece ser un sistema eficiente actualmente disponible. Sin embargo, la producción de metalotioninas, la acumulación de metales particulados, la precipitación ex-

tracelular y la formación de complejos que llevan a cabo las células vivas, ha recibido poca atención por los industriales y estos procesos aún son sujeto de investigaciones futuras. Como se mencionó antes, la recuperación de metales en los procesos que utilizan células vivas puede resultar difícil, sobre todo si éstos fueron compartamentalizados o precipitados internamente. La toxicidad puede resultar problemática no sólo a causa de los metales pesados, sino también debido a condiciones de operación adversas, *e. g.* temperaturas elevadas, acidez, etc. Sin embargo, existe la posibilidad de aislar cepas microbianas resistentes.

Parece ser que el uso de biomasa muerta tiene ventajas sobre las células vivas: no es necesario adicionar nutrientes, resulta inmune a la toxicidad ó a condiciones de operación adversas, la recuperación de los metales es más fácil por medio de tratamientos que permiten la regeneración de la biomasa y la propia biomasa puede obtenerse de manera más económica, como un producto industrial de desecho. Para algunos tipos de biomasa y elementos como el uranio y el torio, la eliminación parece ser completamente por un proceso de biosorción independiente del metabolismo.

Cuando se trata de la recuperación de metales valiosos, el consenso general es utilizar preparaciones inmovilizadas o peletizadas, que aparentemente compiten en costo y características de operación con los tratamientos estándar.¹¹ Cuando no se trata de elementos valiosos, en donde no resulta de interés su recuperación, la biomasa contaminada resulta un problema. Por lo tanto cualquier proceso deberá producir volúmenes bajos y residuos confinables. Resulta claro que la eliminación de metales y radionúcleos es importante desde el punto de vista de protección ambiental, pero generalmente esto no tiene prioridad industrial ni política. Parece irónico que algunos de los sistemas de eliminación/recuperación actualmente en operación comercial, son poco sofisticados, utilizan células vivas y su principal objetivo es la destoxificación.

De continuar la contaminación del ambiente por metales y radionúcleos potencialmente tóxicos, será interesante constatar si las autoridades administrativas y las industrias responsables toman acciones para rectificar la situación, probablemente a través de una explotación completa de las tecnologías basadas en microorganismos. Resulta razonable pensar que debido a la preocupación cada vez mayor por los problemas ambientales y a la necesidad de reciclar y recuperar elementos valiosos, esta situación deberá cambiar en el futuro.

En México, en los últimos años ha aumentado el número de grupos de investigación en Universidades e Institutos, que se han abocado al estudio de sistemas microbianos y a la búsqueda de alternativas para los procesos convencionales de tratamiento de aguas residuales que contienen metales tóxicos. En algunos casos, los estudios han alcanzado un nivel piloto de experimentación. Como resultado de este esfuerzo, actualmente, existen en nuestro país, industrias que han adoptado biotecnologías microbianas para el tratamiento de sus aguas residuales. Adicionalmente, el

conocimiento de los niveles de contaminación por residuos peligrosos (incluidos los metales pesados) en México, ha llevado al establecimiento de una normatividad más rigurosa sobre las descargas de efluentes industriales en el hábitat acuático.

Debido a razones climáticas y económicas, en México se ha construido un número importante de lagunas de estabilización, para darle tratamiento a las aguas residuales de pequeñas ciudades, así como de industrias ubicadas en áreas rurales. De acuerdo con Alvarez (1986),² existían a esa fecha 82 plantas de tratamiento que utilizaban lagunas de estabilización en los estados de Aguascalientes, Baja California (Norte y Sur), Sonora, Veracruz, Coahuila, Colima, Durango, Hidalgo, Jalisco, México, Guerrero, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí y Tlaxcala; 6 plantas de lagunas aireadas en los estados de Aguascalientes, Guanajuato, Oaxaca, Puebla, Quintana Roo y Sinaloa; 6 plantas de zanjas de oxidación en los estados de Baja California (Norte y Sur), Coahuila, Colima, Guanajuato, Jalisco y Nuevo León y 45 plantas de lodos activados en los estados de Baja California (Norte y Sur), Coahuila, Colima, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Sinaloa, Veracruz y Zacatecas.

Por otra parte, se continúan aplicando métodos fisicoquímicos tradicionales, aun cuando se sabe que resultan poco eficientes cuando las concentraciones de los iones metálicos son del orden de partes por millón en volúmenes de agua muy grandes.

Las tecnologías microbianas que se han mencionado ampliamente en la presente revisión, aparentemente resultan costosas y por lo tanto de aplicación muy limitada en países como el nuestro, aún en vías de desarrollo. Sin embargo, los procesos de biosorción de metales pesados, particularmente aquellos que utilizan hongos/levaduras, podrían encontrar aplicación en México, ya que es un país que cuenta con una industria de fermentación importante (*e. g.* ácido cítrico, levadura de panificación, cerveza, vinos, enzimas, antibióticos, etc.), que pudiera proveer de la biomasa microbiana que sería utilizada como biosorbente.

BIBLIOGRAFIA

1. Aksu, Z. 1998. Biosorption of heavy metals by microalgae in batch and continuous systems. En: *Algae for waste water treatment*. N. Tam y V. S. Wong, (eds.). Springer-Verlag and Landes Bioscience, Germany. pp. 37-53.
2. Alvarez, V. A. 1986. Evaluación de los efectos que los detergentes causan sobre la población fotosintética de un modelo de laguna de estabilización de tipo facultativo. Tesis de Licenciatura. ENEP-Iztacala-UNAM.
3. Atkinson, B. W., F. Bux y H. C. Kassan. 1998. Considerations for application of biosorption technology to remediate metal-contaminated industrial effluents. Wa-



- ter SA. 24:129-135.
4. Bedell, G. W. y D. W. Darnall. 1990. Immobilization of non-viable biosorbent, algal biomass for the recovery of metal ions. En: *Biosorption of Heavy Metals*. B. Volesky (ed.), CRC Press. Boca Raton, FL. pp. 313-326.
 5. Belliveau, B. H., M. E. Starodub, C. Cotter y J.T. Trevors. 1987. Metal resistance and accumulation in bacteria. *Biotechnol. Adv.* 5:101-127.
 6. Beveridge, J. T. 1989. En: *Metal Ions and Bacteria*. T. J. Beveridge, y R. J. Doyle, (eds.). John Wiley & Sons. New York. pp. 1-30.
 7. Bosecker, K. 1986. Bacterial metal recovery and detoxification of industrial waste. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 16:105-119.
 8. Brierley, C. L. 1990 a. Bioremediation of metal-contaminated surface and groundwater. *Geomicrobiol. J.* 8:201-223.
 9. Brierley, J. A. 1990 b. En: *Biosorption of Heavy Metals*. B. Volesky (ed.), CRC Press. Boca Raton, Fl. pp. 305-311.
 10. Brierley, J. A. y C. L. Brierley. 1983. En: P. Westbroek y E. W. De Jong, (eds.). "Biomineralization and Biological metal accumulation". Reidel Publ. Dordrech, pp. 499-509.
 11. Brierley, J. A., G. M. Goyak y C. L. Brierley. 1986. En: "Immobilisation of ions by Bio-sorption". H. Eccles y S. Hunt (eds). Ellis- Horwood, Chichester. pp. 105-117.
 12. Brierley, C. L., D. P. Kelly, K. J. Seal y D. J. Best. 1985. *Materials and Biotechnology*. En: "Biotechnology. Principles and Applications". I. J. Higgins, D. J. Best y J. Jones, (eds.). Blackwell, Oxford. pp. 163-212.
 13. De Rome, L. y G. M. Gadd, 1991. Use of pelleted and immobilized yeast and fungal biomass for heavy metal and radionuclide recovery. *J. Ind. Microbiol.* 7:97-104.
 14. Ehrlich, H. L. y C. L. Brierley (eds.) .1990. *Microbial Mineral Recovery*, McGraw-Hill.
 15. Ferguson, C. R., M. R. Peterson y T. H. Jeffers. 1989. Removal of metal contaminants from water using biomass immobilized in polysulfone beads. En: *Biotechnology in Minerals and Metal Processing*. B. J. Scheiner, F.M. Doyle y S.K. Kawatra (eds.). Society of Mining Engineers, Littleton, CO, U.S.A. pp. 193-199.
 16. Fisher, N. S., J. K. Cochran, S. Krishnaswami y H. D. Livingston. 1988. Predicting the oceanic flux of radionuclides on sinking biogenic debris. *Nature* 335: 622-625.
 17. Gadd, G. M., y A. J. Griffiths. 1978. Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microbial Ecol.* 4:303-317.
 18. Gadd, G. B. 1986. The uptake of heavy metals by fungi and yeasts: the chemistry and physiology of the process and applications for biotechnology. En: *Immobilisation of Ions by Bio-sorption*. H. Eccles y S. Hunt (eds.). Chichester: Ellis Horwood Ltd, pp. 135-147.
 19. Gadd, G. M. 1988. Accumulation of metals by microorganisms and algae. En: *Biotechnology – A Comprehensive Treatise Special Microbial Processes*. H. J. Rehm (ed.). VCH Verlagsgesellschaft. Weinheim. Volume 6 b, pp. 401-433.
 20. Gadd, G. M. y C. White. 1989. Heavy metal and radionuclide accumulation and toxicity in fungal and yeasts. En: *Metal-Microbe Interactions*. R. K. Poole y G. M. Gadd (eds.), IRL Press, Oxford. pp. 19-38.
 21. Gadd, G. M. y C. White. 1993. Microbial treatment of metal pollution – a working biotechnology?. *Trends Biotechnol.* 11:352-359.
 22. Gale, N. L., y B.G. Wixson. 1979. Removal of heavy metals from industrial effluents by algae. *Dev. Ind. Microbiol.* 20:259-273.
 23. Galun, M., E. Galun, B. Z. Siegel, P. Keller, H. Lehr y S. M. Siegel. 1987. Removal of metal ions from aqueous solutions by *Penicillium* biomass: Kinetic and uptake parameters. *Water Air Soil Pollut.* 33:359-371.
 24. Greene, B., M. Hosea, R. McPherson, M. Henzl, M.D. Alexander y D.W. Darnall. 1986. Interaction of gold (I) and gold (II) complexes with algal biomass. *Environ. Sci. Technol.* 20:627-632.
 25. Harris, P. O. y G. J. Ramelow 1990. Binding of metal ions by particulate biomass derived from *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus quadricauda*. *Environ. Sci. Technol.* 24:220-228.
 26. Holan, Z. R. y B. Volesky. 1995. Accumulation of cadmium, lead, and nickel by fungal and wood biosorbents. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 53:133-146.
 27. Huang, C., C. P. Huang y A.L. Morehart. 1990. The removal of Cu (II) from dilute aqueous solutions by *Saccharomyces cerevisiae*. *Wat. Res.* 24:433-439.
 28. Huang, C. y C. P. Huang. 1996. Application of *Aspergillus niger* and *Rhizopus oryzae* for Cu (II) removal. *Wat. Res.* 30:1985-1990.
 29. Hughes, N. M. y K. R. Poole. 1989. *Metals and microorganisms*. Ed. Chapman and Hall. New York, pp. 253 – 347.
 30. Hutchins, S. R., M. S. Davidson, J.A. Brierley, y C. L. Brierley. 1986. Microorganisms in reclamation of metals. *Annu. Rev. Microbiol.* 40:311-336.
 31. Kapoor, A. y T. Viraraghavan. 1995. Fungal biosorption –an alternative treatment option for heavy metal bearing wastewater: a review. *Biores. Technol.* 53:195-206.
 32. Kapoor, A. y T. Viraraghavan. 1998. Removal of heavy metals from aqueous solutions using immobilized fungal biomass in continuous mode. *Wat. Res.* 32:1968-1977.
 33. Kapoor, A., T. Viraraghavan y D. R. Cullimore. 1999. Removal of heavy metals using the fungus *Aspergillus niger*. *Biores. Technol.* 70:95-104.
 34. Kiff, R. J. y D. R. Little. 1986. Biosorption of heavy metals by immobilized fungal biomass. En: *Immobilization of Ions by Biosorption*. H.H. Eccles y S. Hunt (eds.). Ellis Horwood, Chichester. pp. 71-80.

35. Kurek, E., J. Czaban y J. Bollag. 1982. Sorption of cadmium by microorganisms in competition with other soil constituents. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:1011-1015.
36. Kuyucak, N. y B. Volesky. 1989a. Accumulation of gold by algae biosorbent. *Biorecovery* 1:189-204.
37. Kuyucak, N. y B. Volesky. 1989b. The elution of gold sequestered on a natural biosorbent. *Biorecovery* 1:205-218.
38. Kuyucak, N. y B. Volesky. 1989c. The mechanism of gold biosorption. *Biorecovery* 1:219-235.
39. Liu, S. y J. M. Suflita. 1993. Ecology and evolution of microbial populations for bioremediation. *Trends Biotechnol.* 11:344-352.
40. Lovley, D. R., E. J. P. Phillips, Y. A. Gorby y E. R. Landa. 1991. Microbial reduction of uranium. *Nature* 350:413-416.
41. Lu, Y. y E. Wilkins. 1995. Heavy metal removal by caustic-treated yeasts immobilised in alginate. En: *Bioremediation of inorganics*. R. E. Hinchee, J. L. Means y D. R. Burris (eds.). Battelle Press, Ohio, pp. 117-124.
42. Macaskie, L. E. y A. D. R. Dean. 1989. Biological Waste Treatment. En: *Advances in Biotechnological processes*. Vol. 12. A. Mizrahi (ed.), Alan R. Liss, New York, pp. 159-201.
43. Macaskie, L. E. 1990. An immobilized cell bioprocess for the removal of heavy metals from aqueous flows. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 49:357-379.
44. Matheikal, J. T. y Q. Yu. 1999. Biosorption of lead (II) and copper (II) from aqueous solutions by pre-treated biomass of Australian marine algae. *Biores. Technol.* 69:223-229.
45. Nriagu, J. O. y J. M. Pacyna. 1988. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333:134-139.
46. Ochiai, E. I. 1987. General principles of biochemistry of the elements. Plenum Press, New York 648 p.
47. Passow, H., A. Rothstein, y T. W. Clarkson. 1961. The general pharmacology of heavy metals. *Pharmacol. Rev.* 13:185-224.
48. Shumate II, S. E. y G. W. Strandberg. 1985. Accumulation of metals by microbial cells. En: *Comprehensive Biotechnology. Principles, Applications and regulations of Biotechnology in industry, Agriculture and Medicine*. M. Moo-Young, C. N. Robinson, y J. A. Howell (eds.). Pergamon Press, New York. Vol. 4, pp. 235-247.
49. Tobin, J. M., D.G. Cooper y R. J. Neufeld. 1984. Uptake of metal ions by *Rhizopus arrhizus* biomass. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:821-824.
50. Tobin, J. M. D. G. Cooper y R. J. Neufeld. 1988. The effects of cation competition on metal adsorption by *Rhizopus arrhizus* biomass. *Biotechnol. Bioeng.* 31:282-286.
51. Townsley, C. C., I. S. Ross y A. S. Atkins. 1986. Copper removal from a simulated leach effluent using the filamentous fungus *Trichoderma viride*. En: *Immobilization of Ions by Biosorption*. H. Eccles y S. Hunt (eds.). Ellis Horwood, Chichester. pp. 159-170.
52. Treen-Sears, M. E., S. M. Martin y B. Volesky. 1984. Propagation of *Rhizopus javanicus* biosorbent. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:137-141.
53. Trevors, J. T., G. W. Stratton, y G. M. Gadd. 1986. Cadmium transport, resistance, and toxicity in bacteria, algae, and fungi. *Can. J. Microbiol.* 32:447-464.
54. Tsezos, M. y B. Volesky. 1981a. Biosorption of uranium and thorium. *Biotechnol. Bioeng.* 23:583-604.
55. Tsezos, M. y B. Volesky. 1981b. The mechanism of uranium biosorption by *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnol. Bioeng.* 24:385-401.
56. Tsezos, M. 1990. Engineering aspects of metal binding by biomass. En: *Microbial Mineral Recovery*. H. L. Ehrlich y C. L. Brierley (eds.). McGraw-Hill, New York, pp. 325-340.
57. Tsezos, M. y A. A. Deutschmann. 1990. An investigation on engineering parameters for the use of immobilized biomass particles in biosorption. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 48:29-39.
58. Volesky, B. 1990. Removal and recovery of heavy metals by biosorption. En: *Biosorption of Heavy Metals*. B. Volesky (ed.). CRC Press. Boca Raton, FL. pp. 7-44.
59. Wainwright, M., I. Singleton y R. G. J. Edyvean. 1990. *Biorecovery* 2:37-53.
60. Wales, D. S. y B. F. Sagar. 1990. Recovery of metal ions by microfungus filters. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 49:345-355.
61. Watterson, J. R. 1992. Preliminary evidence for the involvement of budding bacteria in the origin of Alaskan placer gold. *Geology*. 20:315-318.
62. White, C. y G. M. Gadd. 1990. Biosorption of radionuclides by fungal biomass. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 49: 331-343.
63. Whitlock, J. L. y G. R. Smith. 1989. En: *Biohydrometallurgy*. J. R. Salley, R. G. L. McCready y P. L. Wichlacz (eds.). Canmet. Ottawa. pp. 121-130.
64. Yakubu, N. A. y A. W. L. Dudeney. 1986. Biosorption of uranium with *Aspergillus niger*. En: *Immobilisation of Ions by Biosorption*. H. Eccles y S. Hunt. (eds.), Ellis Harwood, Chichester. pp. 183-200.
65. Zhou, J. L. y R. J. Kiff. 1991. The uptake of copper from aqueous solutions by immobilized fungal biomass. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 52:317-330.
66. Zinkus, G. A., W.D. Byers y W.W. Doerr, 1998. Identify appropriate water reclamation technologies. *Chem. Eng. Eng. Progr.* May: 19-31.