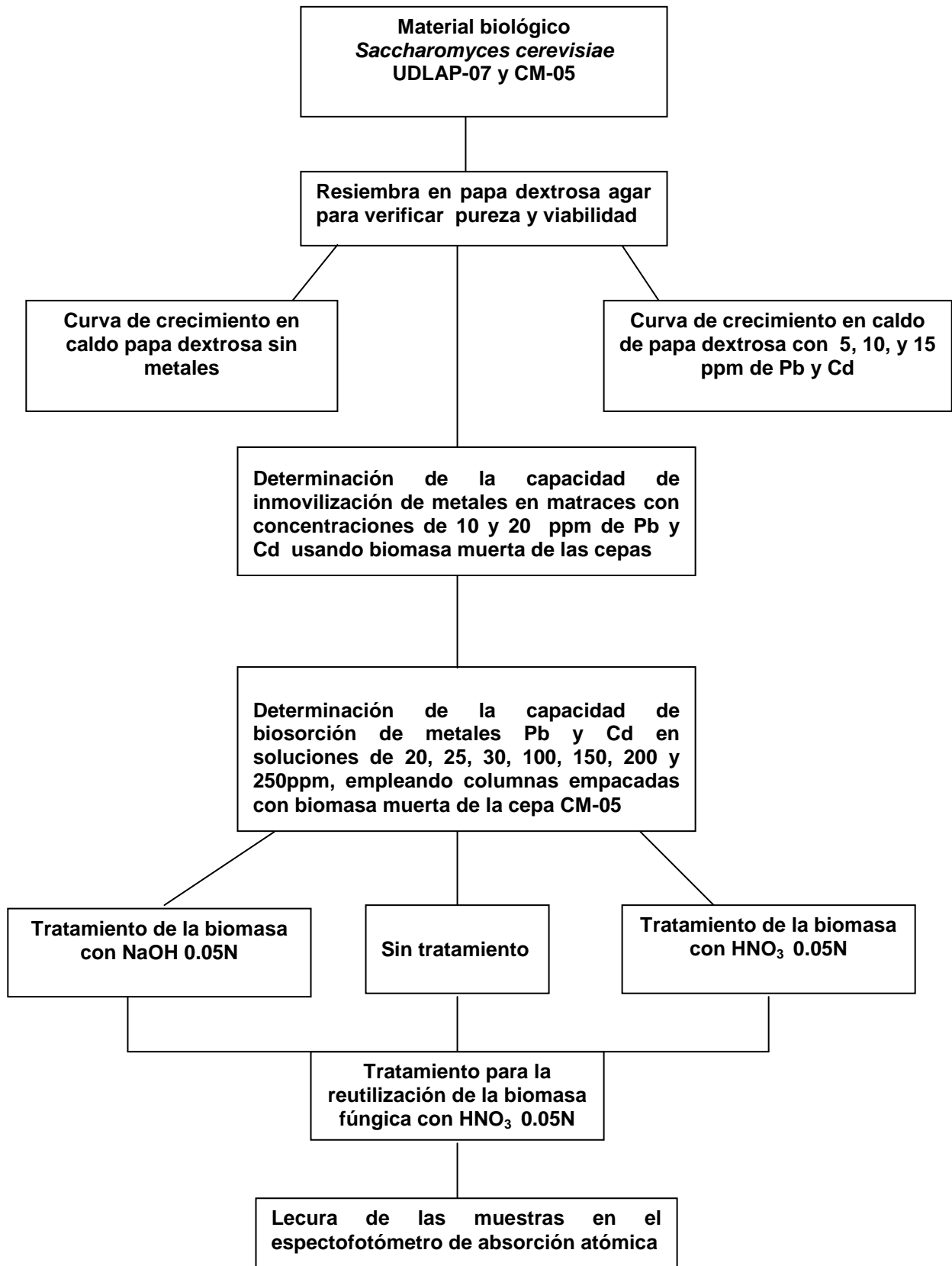


VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 DIAGRAMA DE TRABAJO



7.2 OBTENCIÓN DE MATERIAL BIOLÓGICO.

La especie fúngica utilizada fue *Saccharomyces cerevisiae* obtenida de diferentes procedencias: 1) del cepario de la Universidad de las Américas Puebla, que en el siguiente trabajo será denominada como: UDLAP-07; y 2) levadura de venta comercial: CM-05.

7.3 DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LA LEVADURA.

Las cepas UDLAP-07 y CM-05, fueron inoculadas en agar de papa y dextrosa para verificar su pureza. Posteriormente se inocularon tubos con 5 ml caldo de papa dextrosa y se incubaron en agitación a 28°C durante toda la noche.

Se midió la absorbancia de estos cultivos en un espectrofotómetro SPECTRONIC 20D+ a una longitud de onda de 620 nanómetros. Cuando estos cultivos presentaron una absorbancia de alrededor de 0.05 se transfirieron a matraces Erlenmeyer de 250 ml con 200 ml de caldo papa dextrosa a pH 6.5.

Los matraces se incubaron a 28°C, con agitación a una velocidad de 125 rpm por espacio de 24 horas. Se tomaron alícuotas de 6 ml cada hora y se leyeron en el espectrofotómetro, para determinar la cinética de crecimiento.

Para realizar la curva de crecimiento en presencia de metales, se prepararon soluciones patrón de 1mg/ml de $Pb(NO_3)_2$ y $Cd(NO_3)_2 \cdot 4 H_2O$, y a partir de ellas se obtuvieron soluciones de 1, 10 y 15 ppm. Con estas soluciones se prepararon los caldos de cultivo para el crecimiento de las levaduras.

Los medios de cultivo se inocularon con una suspensión de levaduras hasta obtener una absorbancia de 0.05 a una longitud de onda de 620 nm.

Los matraces se sometieron a agitación a una velocidad de 125 rpm durante su periodo de crecimiento. Se tomaron alícuotas de 6 ml durante la fase exponencial del crecimiento de cada levadura, realizando la medición de la absorbancia en el espectrofotómetro SPECTRONIC 20D+ a una longitud de onda de 620 nanómetros.

7.4 PREPARACIÓN DE LA BIOMASA DE LEVADURA.

La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* UDLAP-07, se cultivó en placas de papa dextrosa agar (PDA) (Apéndice A) y se incubaron a una temperatura de 28 °C durante 96 horas. Se raspó todo el crecimiento de las placas y se inoculó en 200ml de caldo de papa dextrosa. Los matraces

Erlenmeyer se colocaron en un agitador eléctrico durante 7 días a 28 °C con una velocidad constante de 125 rpm.

Los cultivos se filtraron al vacío empleando un embudo Buchner y papel filtro adecuado, de esta manera se obtuvo la biomasa fúngica viva.

Para el caso de la biomasa fúngica muerta, posteriormente se colocó en un horno a 65-70 °C durante 24 horas hasta deshidratarse. Una vez secada la biomasa se trituró, para obtener una mayor superficie expuesta para la biosorción de metales.

7.5 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE BIOSORCIÓN.

7.5.1 CAPACIDAD DE BIOSORCIÓN DE LA LEVADURA UDLAP-07.

Se colocó 0.66 mg del biosorbente en 150 ml de solución de metales que contenía 10 ppm de Cd y 10 ppm de Pb. Se tomaron alícuotas de 20 ml cada 5 minutos durante 25 minutos, filtrándolas para separar el sorbente del sorbato. El filtrado fue empleado para realizar las lecturas de metales en el espectrofotómetro de absorción atómica.

7.5.2 CAPACIDAD DE BIOSORCIÓN DE LA LEVADURA CM.

Se colocó 0.66 mg del biosorbente de la cepa sin hidratar en 150 ml de solución de metales que contenía 10 ppm de Cd y 10 ppm de Pb. Se tomaron alícuotas de 20 ml cada 5 minutos durante 25 minutos, filtrándolas para separar el sorbente del sorbato. El filtrado fue empleado para realizar las lecturas de metales en el espectrofotómetro de absorción atómica.

7.6 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE BIOSORCIÓN EMPLEANDO COLUMNA EMPACADA CON BIOMASA FÚNGICA.

Se pesaron 4 gramos de la levadura CM-5. Se hidrataron con agua desionizada, hasta obtener una biomasa de característica viscosa y sólida. El volumen de agua desionizada empleado fue de 10 ml. Posteriormente esta biomasa fue utilizada para empacar una columna de vidrio de 15cm de longitud.

Se prepararon 3 columnas empacadas con biomasa fúngica y se eluyó a través de ellas un volumen de 15 ml de una solución de metal. Se tomaron fracciones del eluyente cada 5 minutos. El líquido recuperado fue filtrado y almacenado para su posterior lectura en el espectrofotómetro de absorción atómica. Las soluciones empleadas fueron de una concentración igual a 20, 25, 30, 100, 150, 200 y 250ppm de Pb, para el Cd se emplearon las mismas concentraciones.

Se empacaron tres columnas por cada concentración de la solución de metales, una de ellas fue tratada con NaOH 0.05 N haciendo circular un volumen de 15 ml después de haber hecho pasar la solución con metales; a la segunda se le hizo circular 15 ml de una solución de HNO₃ 0.05N. Lo anterior se hizo con la finalidad de exponer en la biomasa una cantidad mayor de sitios de adsorción. Finalmente la última columna no fue sometida a un tratamiento ácido o básico.

Posteriormente a cada columna le fue circularado un volumen de 15 ml de HNO₃ 0.05N con la finalidad de desorber los metales fijados y poder reutilizar la biomasa.

Consecutivamente se recolectó el líquido proveniente de las columnas y a cada muestra se le determinó la absorbancia por medio del espectrofotómetro de absorción atómica.

7.7 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE METALES PESADOS (Cd Y Pb) POR ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN ATÓMICA.

La determinación de la concentración de los metales pesados en las muestras obtenidas a partir de la filtración se hizo utilizando un espectrofotómetro de absorción atómica.

7.7.1 PREPARACIÓN DE ESTÁNDARES

- Estándares de plomo utilizando nitrato de plomo: Se prepararon los estándares de plomo con 1 ml de HCl 1N por cada 50 ml de solución, con las siguientes concentraciones: 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 ppm.
- Se prepararon los estándares de cadmio con 1 ml de HCl 1N por cada 50 ml de solución, con las siguientes concentraciones: 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0 ppm.
- Solución blanco: Por cada 50 mL de agua destilada, 1 ml de HCl 1N.

7.7.2 CONDICIONES INSTRUMENTALES PARA LA LECTURA DE CADMIO

- Corriente de lámpara: 5.0 mA
- Longitud de onda: 228.8 nm
- Paso de la luz: 0.5 nm
- Flujo de aire: 13.50 l/min
- Flama empleada: Aire acetileno
- Flujo de acetileno: 2.00 l/min

7.7.3 CONDICIONES INSTRUMENTALES PARA LA LECTURA DE PLOMO.

- Corriente de lámpara: 10mA
- Longitud de onda: 324.8 nm
- Paso de la luz: 0.5 nm
- Flujo de aire: 13.50 l/min
- Flama empleada: Aire acetileno
- Flujo de acetileno: 2.00 l/min

- Estándares de plomo utilizando nitrato de plomo: Se prepararon los estándares de plomo con 1 ml de HCl 1N por cada 50 ml de solución, con las siguientes concentraciones: 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 ppm.

- Estándares de cadmio utilizando nitrato de cadmio: Se prepararon los estándares de cadmio con 1 ml de HCl 1N por cada 50 ml de solución, con las siguientes concentraciones: 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0 ppm.

- Agua desionizada.

7.8 MATERIAL Y EQUIPO

- Espectrofotómetro de absorción atómica equipada para flama. VARIAN spectrAA 110/220FS. El equipo debe estar calibrado antes de su operación.

- Lámpara de cátodo hueco de alta intensidad Cd y Pb Varian Ultra No. de parte 5610108900.

- Material de laboratorio diverso.

7.8.1 CONDICIONES INSTRUMENTALES PARA LA LECTURA DE CADMIO

- Corriente de lámpara: 5.0 mA
- Longitud de onda: 228.8 nm
- Paso de la luz: 0.5 nm
- Flujo de aire: 13.50 l/min
- Flama empleada: Aire acetileno
- Flujo de acetileno: 2.00 l/min

7.8.2 CONDICIONES INSTRUMENTALES PARA LA LECTURA DE PLOMO.

- Corriente de lámpara: 10mA
- Longitud de onda: 324.8 nm
- Paso de la luz: 0.5 nm
- Flujo de aire: 13.50 l/min
- Flama empleada: Aire acetileno
- Flujo de acetileno: 2.00 l/min

7.9 CÁLCULO DE LA CAPACIDAD DE BIOSORCIÓN (q).

La determinación del coeficiente “q” se cálculo a partir de los resultados obtenidos de la capacidad de biosorción empleando la siguiente fórmula:

Cálculo de la capacidad de biosorción (q)	
$q=(C_i-C_f)V/S$	
C _i =Concentración inicial de la solución de metal	V=Volumen empleado para eluir la columna
C _f =Concentración final adsorbida a los 25 min.	S= Cantidad en gr. de biomasa de levadura empleada