

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

TÍTULO DEL PROYECTO

**BIORREMOCIÓN DE CROMO (CROMO TOTAL Y CROMO VI)
EN AGUA SINTÉTICA POR DOS INÓCULOS BACTERIANOS
NATIVOS COMPUESTOS, A ESCALA DE LABORATORIO**

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

DIANA SOFÍA GUEVARA ZUMÁRRAGA

SANGOLQUÍ, octubre del 2010.

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS

ELABORADO POR

Diana Sofía Guevara Zumárraga

COORDINADOR DE LA CARRERA

Ing. Rafael Vargas

SECRETARIO ACADÉMICO

Abg. Vanesa Andrade

Sangolquí, octubre del 2010

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Señorita: Diana Sofía Guevara Zumárraga como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología.

Fecha

MSc. Alma Koch
Directora

Dra Blanca Naranjo
Codirectora

DEDICATORIA

A mis padres por su abnegación, trabajo y sacrificio.
por su ejemplo de fortaleza ante las dificultades.

Diana Sofía Guevara Zumárraga.

AGRADECIMIENTO

A Dios, por permitirme llegar hasta este momento tan importante de mi vida y llegar a cumplir esta meta.

A la Escuela Politécnica del Ejército por haber permitido la ejecución del proyecto gracias al cual fue posible el desarrollo de la tesis.

A mis padres, por su comprensión, paciencia y amor, en mis años de estudio, a ellos les debo todo lo que soy. Gracias por todo su apoyo. A mis hermanos Alex y Rosana por su ayuda, apoyo y ejemplo.

A Blanquita y Almita por haber creído en mí, por su guía incondicional en la elaboración de este trabajo, por demostrarme que se puede salir adelante, mil gracias.

Al Ing. Enrique Arévalo e Ing. Paulina Guevara por su colaboración.

A la Dra. Valeria Ochoa de la Universidad San Francisco de Quito por su acogida y ayuda.

A mis compañeras de laboratorio: Elenita, Caro y Diana por haber estado a mi lado trabajando hombro a hombro para sacar adelante el proyecto. Gracias por su ayuda.

A Joha, mi compañera de trabajo y amiga, gracias por haber compartido conmigo todo el proceso de la elaboración de este trabajo, mil gracias por todas tus palabras y tu apoyo. Lo logramos!!!

A Grace y Ferchi gracias por brindarme su amistad y su ayuda.

Finalmente a todas las personas que se cruzaron en este camino y que me dieron palabras de aliento y apoyo, también a todos quienes de una u otra manera colaboraron con la ejecución de la tesis y me dieron su mano.

Diana Sofía Guevara Zumárraga.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS	ii
CERTIFICACIÓN	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTO	v
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vi
LISTADO DE TABLAS	ix
LISTADO DE CUADROS	x
LISTADO DE FIGURAS	xi
LISTADO DE ANEXOS	xiii
ABREVIATURAS	xiv
RESUMEN	xv
ABSTRACT	xvi
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1 Formulación del problema.	1
1.2 Justificación del problema.....	1
1.3 Objetivos:	3
1.4 Marco Teórico:	3
1.4.1 Contaminación por metales pesados.	3
1.4.2 Biorremediación de Metales Pesados:	4
1.4.3 Cromo	6
1.4.4 Cromo en la Industria.	8
1.4.5 El cromo en la Industria Textil.	9
1.4.6 Toxicidad del Cromo.	10
1.4.7 Organismos Involucrados en la Remoción de Cromo	11
1.4.8 Mecanismos Utilizados por Microorganismos.	12
1.4.9 Biosorción por biomasa muerta.....	17
1.4.10 Tipos de biomasa o biomateriales.....	18
1.4.11 Influencia de las condiciones de la biosorción sobre la remoción de metales pesados..	19
1.5 Hipótesis.	21
CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS	22

2.1 Participantes.....	22
2.2 Zona de Estudio:	22
2.3 Período de tiempo de investigación: Julio 2009 – Abril 2010.	23
2.4 Diseño Experimental	23
2.5 Procedimientos.....	25
2.5.1 Medio de Cultivo.....	25
2.5.2 Estandarización del Método para la Medición de Cr VI.....	26
2.5.3 Determinación de Cr VI.....	27
2.5.4 Determinación de Cromo Total.....	28
2.5.5 Obtención de la Biomasa.	29
2.5.6 Preparación de Agua Sintética	30
2.5.7 Adsorción por biomasa muerta de los inóculos.....	31
2.5.8 Conteo Bacteriano por Siembra Profunda.....	32
2.6 Análisis de Datos:	33
CAPÍTULO 3: RESULTADOS	34
3.1 Medio de cultivo, cambio de coloración por remoción de cromo.	34
3.2 Estandarización del Método para la Determinación de Cromo VI.....	35
3.3 Determinación de Cromo VI.....	37
3.4 Determinación de Cromo Total.....	40
3.5 Tinción Gram de los Inóculos	43
3.6 Adsorción por biomasa muerta	44
3.7 Conteo Bacteriano por Siembra Profunda.	48
CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN	51
4.1 La biotecnología en la remoción de cromo.	51
4.2 Consorcios Bacterianos.	52
4.3 Determinación de cromo VI.....	53
4.4 Tinción Gram de los inóculos.	54
4.5 Efecto de las concentraciones en la remoción de cromo.	56
4.6 Adsorción de Cr por biomasa muerta.	57
4.6.1 Importancia del pH en la remoción de cromo por biomasa muerta.	59
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES	63
CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES	64

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA	65
ANEXO A: Ventajas y Desventajas entre biomasa inerte y células vivas	75
ANEXO B: Estructura de la difenilcabazida	76
ANEXO C: Estructura de la quelación del Cr III en la difenilcarbazona.....	77
ANEXO D: Tratamientos con 50 mg.L ⁻¹ de cromo	78
ANEXO E: Tratamientos con 100 mg.L ⁻¹ de cromo.....	79
ANEXO F: Precipitado del inóculo I 5	80

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1	Descripción de los tratamientos del diseño experimental para la determinación de la remoción de cromo.	23
Tabla 2.2	Descripción de los tratamientos del diseño experimental preparado para la determinación de la remoción de cromo con biomasa.	24
Tabla 2.3	Componentes del medio de cultivo.	25
Tabla 3.1	Promedio de las Absorbancias para la elaboración de la curva estándar	35
Tabla 3.2	Prueba de igualdad de las varianzas de las absorbancias, medidas para la cuantificación de cromo VI. Variable dependiente: Absorbancia 540 nm.	36
Tabla 3.3	Análisis de Varianza para la variable Porcentaje de Remoción de cromo VI.	40
Tabla 3.4	Prueba de Tukey para la variable Porcentaje de remoción de cromo VI frente al factor Tiempo en días.	40
Tabla 3.5	Análisis de Varianza para la variable Porcentaje de Remoción de cromo Total.	42
Tabla 3.6	Prueba de Tukey para la variable Porcentaje de remoción de cromo total del factor Tiempo en días.	43
Tabla 3.7	Análisis de varianza para la variable Porcentaje de remoción de cromo realizado por la biomasa.	46
Tabla 3.8	Grupos Tukey para el Porcentaje de remoción realizado por la biomasa.	47

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1	Compuestos de cromo y sus usos en diferentes procesos de la industria.	8
Cuadro 1.2	Tipos de biomasa nativa que han sido usadas para la preparación de biosorbentes.	19

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1.	Mecanismos de interacción entre los metales pesados y microorganismos.	6
Figura 1.2	Especies de Cromo VI dependiendo del pH.	7
Figura 1.3	Estructuras de colorantes premetalizados con cromo. a) Azul ácido 158 (Azul palatín sólido GGN) b) Azul rojo 180 (Rojo Neolan R).	10
Figura 1.4	Procesos que contribuyen a la captación microbiana y destoxificación 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.	16
Figura 2.1	Medios de cultivo (1) 10 mg.L ⁻¹ (2) 50 mg.L ⁻¹ (3) 100 mg.L ⁻¹ y controles (4 y 5).	26
Figura 2.2	Equipo de Absorción atómica VARIAN AA240FS.	29
Figura 2.3	Crecimiento del inóculo I5 en frascos BOECO (a) Medio de cultivo inicial. (b) Medio de cultivo luego de 4 días.	29
Figura 2.4	Almacenamiento de la biomasa de los inóculos. (a) Inóculo I 5. (b) Inóculo M 3.	30
Figura 2.5	Filtro millipore con biomasa seca de los inóculos. (a) Biomasa seca del inóculo I5. (b) Biomasa seca de los dos inóculos I5 y M3.	30
Figura 2.6	Medio sintético para el ensayo de biomasa. (1) Medio con 2 mg.L ⁻¹ de Cr, (2) con 10 mg.L ⁻¹ de Cr, (3) con 20 mg.L ⁻¹ de Cr, (4) con 35 mg.L ⁻¹ de Cr y (5) con 50 mg.L ⁻¹ de Cr.	31
Figura 2.7	Ensayo de biomasa colocada en la Incubadora con agitación Wise Cube.	31
Figura 2.8	(a) Recolección de las muestras.(b) Dilución de las muestras.	32
Figura 2.9	Diluciones en tubos tapa rosca con 9,9 mL de solución salina	33
Figura 3.1	Inóculo M 3 con 10 mg.L ⁻¹ de Cr. (a) 7 días de Incubación (b) 30 días de incubación. C = control.	34
Figura 3.2	Inóculo I 5 con 10 mg.L ⁻¹ de Cr. (a) 7 días de incubación (b) 30 días de incubación, C = control.	35
Figura 3.3	Curva estándar para la cuantificación de la concentración de Cr VI.	36
Figura 3.4	Curvas de remoción de cromo VI para los inóculos M 3 e I 5 con sus respectivos controles. Concentración inicial 10 mg.L ⁻¹ de Cr.	37
Figura 3.5	Curvas de remoción de cromo VI a concentraciones de 50 y 100 mg.L ⁻¹ con sus respectivos controles (a) Inóculo I 5 (b) Inóculo M 3.	38

Figura 3.6	Remoción de cromo VI a los 9 días (a) Inóculo M 3 (b) Inóculo I 5. C = control.	39
Figura 3.7	Porcentaje de remoción de cromo VI vs. Tiempo (días) realizado por los inóculos M3 e I5 para la concentración de 10 mg.L ⁻¹ .	39
Figura 3.8	Disminución de la concentración de cromo total para los inóculos M3 e I5 con sus respectivos controles. Concentración inicial 10 mg.L ⁻¹ .	41
Figura 3.9	Porcentaje de remoción de cromo total vs. Tiempo (días) de los inóculos M3 e I5 para la concentración de 10 mg.L ⁻¹ .	42
Figura 3.10	Tinción Gram. Lente 100X. Morfología del inóculo I5 al microscopio óptico. (a) Inóculo inicial I 5 (las flechas indican bacilos) (b) Inóculo I 5 con 10 mg.L ⁻¹ de Cr luego de incubación.	43
Figura 3.11	Tinción Gram 100 X. Morfología del inóculo M 3 al microscopio óptico. (a) Inóculo inicial M 3 (B = bacilos. L = levaduras) (b) Inóculo M 3 con 10 mg.L ⁻¹ de Cr a los 40 días de incubación (c) Inóculo M 3 con 50 mg.L ⁻¹ de Cr a los 40 días de incubación.	44
Figura 3.12	Viales después de centrifugación. (a) 10 mg.L ⁻¹ (b) 35mg.L ⁻¹ (c) 50mg.L ⁻¹ . 1 = M 3; 2 = I 5.	45
Figura 3.13	Porcentaje de Remoción de cromo realizada por la biomasa del Inóculo M3. Tiempo 120 minutos, pH= 2, Temp.35°C, 150 rpm.	45
Figura 3.14	Porcentaje de Remoción de cromo realizada por la biomasa del Inóculo I5. Tiempo 120 minutos, pH= 2, Temp.35°C, 150 rpm.	46
Figura 3.15	Porcentajes de remoción de los inóculos por cada concentración.	48
Figura 3.16	Curva de crecimiento de los inóculos sin fuente de cromo (a) I5 a 35°C (b) M3 a 35°C y 150 rpm.	49
Figura 3.17	Curva de Crecimiento del Inóculo M3 a 35°C, 150 rpm con 10 mg.L ⁻¹ .	50

LISTADO DE ANEXOS

ANEXO A	Ventajas y Desventajas entre biomasa inerte y células vivas	75
ANEXO B	Estructura de la difenilcarbazida	76
ANEXO C	Estructura de la quelación del Cr III en la difenilcarzona	77
ANEXO D	Tratamientos con 50 mg.L ⁻¹ de cromo	78
ANEXO E	Tratamientos con 100 mg.L ⁻¹ de cromo	79
ANEXO F	Precipitado del inóculo I 5.	80

ABREVIATURAS

rpm	Revoluciones por minuto
Cr VI	Cromo hexavalente
Cr III	Cromo trivalente
min	Minutos
L	Litro
mL	Mililitro
μm	Micrómetros
nm	Nanómetros
s	Segundos
h	Horas
UFC	Unidades formadoras de colonias

RESUMEN

En la presente investigación se utilizaron dos consorcios bacterianos nativos compuestos denominados I 5 obtenido por exposición del medio de cultivo con colorantes al ambiente y M 3 aislado de una muestra de suelo contaminado con agua textil, con la finalidad de evaluar la remoción de Cr VI utilizando como fuente de cromo al cromato de potasio (K_2CrO_4) tanto con células vivas como biomasa muerta. Para los ensayos con células vivas se utilizó un pH 6 a 35°C y concentraciones iniciales de 10, 50 y 100 mg.L⁻¹ de Cr VI, obteniendo un porcentaje de remoción de 98% para la concentración inicial de 10 mg.L⁻¹ para los dos inóculos, mientras que para las dos concentraciones restantes el crecimiento bacteriano se vio afectado, resultando inhibitorias. Con respecto a la biomasa muerta se utilizaron los mismos consorcios previamente autoclavados a 121°C por 15 min los cuales fueron colocados en concentraciones iniciales de 2,10, 20, 35 y 50 mg.L⁻¹ a pH 2 con cantidad de 1g.L⁻¹ de peso seco de inóculo, a 150 rpm a 35°C por 2 h obteniéndose porcentajes de remoción de entre 40 a 70% para la biomasa muerta de I 5 y entre un 20 a 40 % para M 3. El inóculo más adecuado para la remoción de cromo fue el inóculo I 5 tanto para células vivas como para biomasa muerta.

ABSTRACT

The present study used two native bacterial consortiums: I 5 obtained by the exposure of a culture medium with dyes to the environment and M 3 isolated from a soil sample contaminated with textile water. The purpose was to evaluate the removal of Cr VI using both living cells and biomass as source of chromium potassium chromate (K_2CrO_4). For studies with living cells, we used a pH 6, 35 °C and initial concentrations of 10, 50 and 100 $mg.L^{-1}$ of Cr VI, obtaining a removal percentage of 98% for the initial concentration of 10 $mg.L^{-1}$ for both inoculums. The bacterial growth was affected in the two remaining concentrations which were inhibitory. For the death biomass, we used the same consortiums previously autoclaved at 121 ° C for 15 min which were inoculated at initial concentrations of 2, 10, 20, 35 and 50 $mg.L^{-1}$ at pH 2 with 1 $g.L^{-1}$ of dry weight of inoculum, at 150 rpm and 35 ° C for 2 h obtaining removal percentages between 40 and 70% for the biomass of I 5 and between 20 and 40% for M 3. The most appropriate inoculum for the removal of chromium in synthetic water was I 5 for both live cells and biomass.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema.

Actualmente uno de los mayores problemas que se afronta a nivel mundial es el deterioro constante del ambiente a causa de contaminantes que son vertidos sobre la superficie terrestre y el agua. Muchos de estos contaminantes son metales pesados que en altas concentraciones, son tóxicos para el ser humano y otros organismos, trayendo como consecuencia una alteración en la vida natural de los ecosistemas (Núñez, 2007).

Los procesos de la industria textil no liberan grandes cantidades de metales; sin embargo, aún las pequeñas concentraciones pueden producir acumulación en los tejidos de animales acuáticos (Mansilla *et al.*, 2001), las industrias textiles para sus procesos consumen cantidades considerables de agua, sus efluentes generan impactos sobre los recursos aire, suelo, agua; siendo uno de ellos el uso excesivo de agua vertiendo directamente al alcantarillado municipal (Ospina *et al.*, 2007).

En general, los tratamientos tecnológicos utilizados en la remoción de cromo (Cr) pueden ser bastante costosos, requieren de mucha energía o altas cantidades de reactivos y pueden crear otras formas de desechos, además, en concentraciones muy bajas, estos métodos son ineficientes (Lee *et al.*, 2006).

1.2 Justificación del problema.

La norma ambiental ecuatoriana establece $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ como la concentración permitida en las descargas al sistema de alcantarillado para cromo hexavalente (Cr VI), igualmente para descargas a un cuerpo de agua dulce y a un cuerpo de agua marina (Recurso Agua, libro VI, anexo 1, emitido por la Presidencia de la República del Ecuador, 2007).

Para el tratamiento de los efluentes líquidos que contienen metales pesados, existen diferentes métodos físico-químicos, siendo los de mayor uso en la actualidad los siguientes: precipitación, intercambio iónico, ósmosis inversa y adsorción. Estos, aunque efectivos presentan varias desventajas cuando son aplicados a efluentes industriales constituidos por soluciones metálicas diluidas. Entre las desventajas se pueden mencionar los costos importantes en términos energéticos y de consumo de productos químicos. Además, la precipitación química aunque efectiva para la eliminación de metales pesados, crea un nuevo problema ambiental: el de los lodos que después tendrán que ser almacenados (Monge-Amaya *et al.*, 2008; Higuera *et al.*, 2009).

Los microorganismos son una alternativa potencial sobre los procesos convencionales para la recuperación de metales de soluciones industriales, este fenómeno es conocido como biosorción y se refiere a las interacciones físico-químicas entre la biomasa microbiana y el metal pesado (Monge-Amaya *et al.*, 2008).

En los últimos años, la biosorción basada en la habilidad de ciertas biomasas de capturar especies metálicas de soluciones acuosas, han recibido especial atención por su potencialidad para el tratamiento de aguas residuales. Varios estudios han demostrado que la biomasa de diferentes especies de bacterias, hongos y algas es capaz de concentrar, en su estructura, iones metálicos que se encuentran en ambientes acuáticos (Monge-Amaya *et al.*, 2008).

Además, existen bacterias listas para ser aisladas del suelo, sedimentos y aguas contaminadas que tienen propiedades para reducir cromatos y dicromatos, como es el caso de *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, entre otras (Otiniano *et al.*, 2007).

La sobrevivencia y la estabilidad de las bacterias es mejor cuando están presentes en cultivos mixtos, en forma de consorcios o inóculos. Esto se debe a que cada cepa presenta diferencias significativas tanto fisiológicas como metabólicas. Las respuestas variadas y la resistencia exhibida por cada una de ellas hacia diferentes metales genera una dinámica bien adaptada y una población más fuerte a través del intercambio de material genético entre las cepas presentes (Sannasi *et al.*, 2006).

1.3 Objetivos:

Objetivo General:

- Evaluar la Biorremoción de Cromo en agua sintética por dos inóculos bacterianos nativos compuestos, a escala de laboratorio.

Objetivos Específicos:

- Comprobar la viabilidad de los inóculos bacterianos nativos compuestos proporcionados por el cepario del Laboratorio de Microbiología de la ESPE.
- Fijar los parámetros de crecimiento bacteriano para llevar a cabo el diseño experimental.
- Preparar el agua sintética con la concentración apropiada de cromo.
- Obtener biomasa de los inóculos.
- Establecer el diseño experimental con los tratamientos.
- Cuantificar las concentraciones de Cromo VI y Cromo Total en cada una de las unidades experimentales mediante métodos espectrofotométricos y espectrofotometría de absorción atómica, según el diseño experimental.
- Analizar estadísticamente los datos obtenidos para establecer cual de los inóculos es el más adecuado en la remoción de Cromo.

1.4 Marco Teórico:

1.4.1 Contaminación por metales pesados.

Las actividades industriales generan una contaminación a gran escala con metales pesados (cobre, zinc, plomo, cadmio, cromo, níquel, mercurio, cobalto, plata y oro) en el medio ambiente. En los suelos, suelen afectar la fertilidad y su uso posterior, mientras que en el caso de los acuíferos y aguas superficiales, pueden comprometer seriamente el uso de este recurso como fuente de agua para el consumo humano (Núñez, 2007).

El impacto ambiental de los contaminantes metálicos depende de su capacidad de acomplejamiento con componentes del medio ambiente y su respuesta a las condiciones físico-químicas y biológicas con el entorno. Los metales son especies químicas no degradables, una vez volcados al medio ambiente, sólo pueden distribuirse entre el aire, el agua y el suelo, a veces cambiando su estado de oxidación o bien incorporándose a los seres vivos (Núñez, 2007).

Los metales pesados son elementos con altos pesos atómicos, superiores a 45 y una densidad superior a 5 g.cm^{-3} , excluyendo a los grupos alcalino y alcalinotérreo. Aunque algunos son imprescindibles para el desarrollo de las funciones vitales de los organismos, los denominados esenciales como cobalto, cobre, hierro, manganeso, molibdeno, zinc, vanadio y estroncio, en cantidades excesivas son perjudiciales e incluso letales para los seres vivos. Los metales pesados no esenciales comúnmente implicados en problemas de contaminación de las aguas subterráneas son: cromo, cadmio, mercurio, plomo, arsénico y antimonio (López *et al.*, sin año).

1.4.2 Biorremediación de Metales Pesados:

En los procesos de biorremediación generalmente se emplean mezclas de ciertos microorganismos capaces de degradar o acumular sustancias contaminantes. Los microorganismos utilizados en biorremediación pueden ser los ya existentes (nativos) en el sitio contaminado. Los metales pesados no son biodegradables, pero las bacterias pueden concentrarlos de tal manera de aislarlos para que sean eliminados más fácilmente (Biorremediación, 2006) o cambiar sus estados de oxidación menos tóxicos para el medio ambiente.

Uno de los mayores problemas ambientales es la acumulación de metales pesados en los ecosistemas, producto de desechos industriales mal tratados. A diferencia de otras tecnologías, la biorremediación es rentable cuando se aplica; además según la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), la biorremediación y la fitorremediación son las técnicas de control de contaminación más económicas disponibles

(Vullo, 2003). Además la EPA ha establecido un nivel máximo permisible de $100\mu\text{g.L}^{-1}$ de agua para Cr III y Cr VI en el agua potable (Tinitus, 2010).

En los últimos años el avance de la nanotecnología ha venido en aumento con múltiples iniciativas, en lo que concierne a sistemas de purificación de agua, se está diseñando membranas reactivas (membranas de ferrocene) que son capaces de tratar desechos orgánicos en el agua al imitar el funcionamiento de las membranas celulares. Asimismo, se están desarrollando catalizadores diseñados nanométricamente que permitan una mayor eficiencia en las reacciones químico-biológicas entre el catalizador y el contaminante a precipitar, estos catalizadores son añadidos al agua en un tanque-reactor especial en el que se lleva a cabo la reacción y se precipitan los contaminantes (Delgado, 2006).

Se tiene conocimiento de la capacidad de algunas bacterias Gram positivas (incluyendo una cepa de *Bacillus subtilis*) para reducir cromato en condiciones aeróbicas, la mayoría de los estudios sobre la reducción de cromato se han llevado a cabo utilizando bacterias Gram negativas en su mayoría, cepas de *Pseudomonas* y *Enterobacter* (Garbizu *et al.*, 1998), algunos microorganismos son capaces de reducir el Cr VI a Cr III que es menos tóxico para los sistemas biológicos (Haq y Shakoori, 1998).

La capacidad de reducir Cr VI aeróbicamente se ha detectado en especies del género *Pseudomonas*. Sin embargo, en condiciones anaeróbicas, la reducción de Cr VI a Cr III no es un proceso estrictamente específico y pueden ser llevadas a cabo por microorganismos Gram-positivos y Gram-negativos, como un ejemplo se tiene a *Enterobacter cloacae* HO1, una cepa aislada de lodos activados que utiliza cromato (CrO_4^{2-}) como aceptor de electrones en un modo de respiración anaeróbica (Garbizu *et al.*, 1998). Existen diferentes mecanismos que utilizan los microorganismos para lograr la inmovilización del metal, como la biosorción, bioacumulación, biomineralización, biotransformación y quimiosorción como muestra la Figura 1.1 (Vullo, 2003).

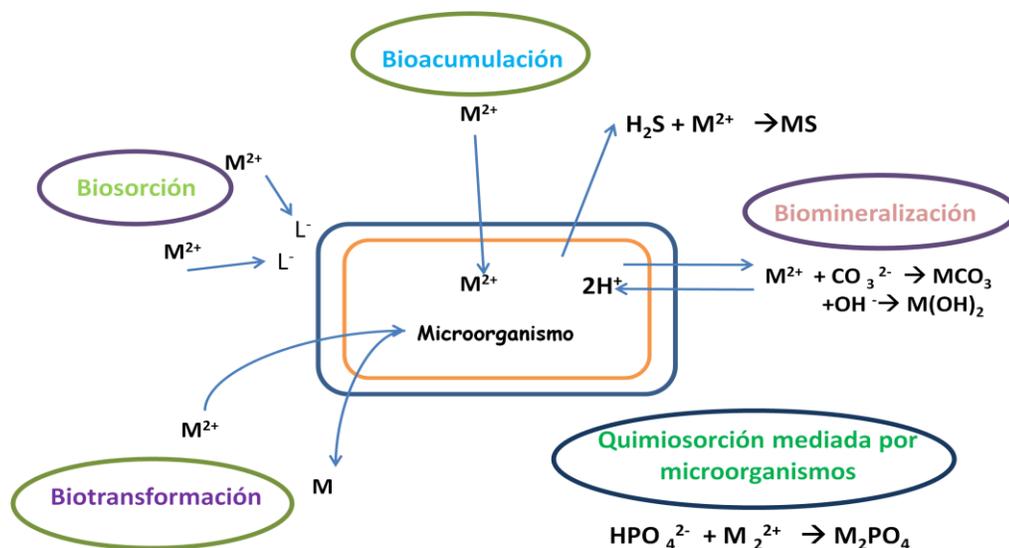


Figura 1.1 Mecanismos de interacción entre los metales pesados y microorganismos (Vullo, 2003).

1.4.3 Cromo

El cromo (Cr) es un metal de transición localizado en el grupo VI – B de la tabla periódica, cuyas especies más estables y abundantes son: la trivalente, Cr III estado de oxidación más estable y la hexavalente Cr VI, agente de oxidación fuerte (Soto, 2006).

El Cr es de amplia importancia, ya que es utilizado en distintas actividades industriales y aunque puede existir en diferentes estados de oxidación, en el ambiente solo se encuentran en forma estable los estados +3 y +6 (Núñez, 2007).

El Cr VI se encuentra comúnmente en forma de oxianiones hidrosolubles, cromatos (CrO_4^{2-}) y dicromatos ($Cr_2O_7^{2-}$), mientras que el Cr III en forma de óxidos, hidróxidos o sulfatos que son menos móviles y existe unido a materia orgánica en el suelo y en ambientes acuáticos. El Cr VI es un fuerte agente oxidante y en presencia de materia orgánica, es reducido a Cr III; esta transformación es más rápida en ambientes ácidos. Sin embargo, niveles elevados de Cr VI pueden sobrepasar la capacidad reductora del ambiente y puede así persistir como un contaminante. Diversos compuestos de cromo son contaminantes ambientales presentes en agua, suelos y efluentes de industrias, debido a que dicho metal es ampliamente utilizado en distintas actividades manufactureras, tales como

cromado electrolítico, fabricación de explosivos, curtido de pieles, aleación de metales, fabricación de colorantes y pigmentos, entre otros (Gutiérrez y Cervantes, 2008).

Los compuestos de Cr VI son oxidantes fuertes y altamente solubles, con capacidad de atravesar fácilmente las membranas biológicas, mientras que los compuestos de Cr III tienden a formar precipitados relativamente inertes a pH cercanos a la neutralidad (Nuñez, 2007). Las especies de cromo hexavalentes existen principalmente como ácido crómico (H_2CrO_4) y sus sales ión hidrógeno cromato $HCrO_4^-$, ión cromato CrO_4^{2-} , dependiendo del pH. Las especies predominantes, como función del pH, son ácido crómico (H_2CrO_4) a pHs menores que 1, ión hidrógeno cromato ($HCrO_4^-$) a pHs entre 1 y 6 y, ión cromato CrO_4^{2-} a pHs sobre 6. El ión dicromato ($Cr_2O_7^{2-}$) es un dímero del ión hidrógeno cromato $HCrO_4^-$, el cual se forma cuando la concentración de cromo excede aproximadamente a 1 g.L^{-1}

Dependiendo de la concentración de cromo y el pH de la solución (Figura 1.2), el Cr VI puede existir principalmente como ión dicromato ($Cr_2O_7^{2-}$), ión hidrógeno cromato ($HCrO_4^-$) y ácido crómico (H_2CrO_4) de acuerdo a la siguiente ecuación (Hossain *et al.*, 2005).

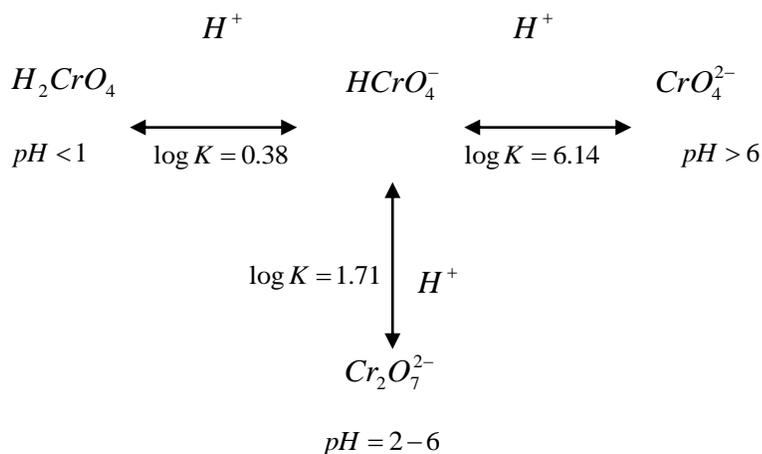


Figura 1.2 Especies de Cromo VI dependiendo del pH (Hossain *et al.*, 2005).

1.4.4 Cromo en la Industria.

El cromo y sus compuestos son muy importantes para diversos usos, por ejemplo: es utilizado en la limpieza de metales de procesamiento curtido de cuero, conservación de la madera, la cerámica, la pirotecnia, la electrónica, fabricación de aleaciones metálicas (Morales *et al.*, 2008), en la industria química, colorantes, plaguicidas, el cromado electrolítico o galvanoplastia, el uso de compuestos de cromo mordientes en teñido de telas y otros usos menores como conservación de la madera, fotograbado, fabricación de cerillos, explosivos, linóleo, como colorantes, pigmentos, por lo que es el contaminante más común en una amplia variedad de desechos industriales, es por ello primordial considerar su toxicidad en el medio laboral y en el medio ambiente en general (Figuroa, sin año). En el Cuadro 1.1 se muestra algunos tipos de compuestos de cromo y los usos que tienen en diferentes industrias

Cuadro 1.1 Compuestos de cromo y sus usos en diferentes procesos de la industria (Figuroa, sin año).

Tipo de compuesto	Usos
<i>Acido Crómico</i>	<i>Galvanoplastia</i>
<i>Dicromato sódico</i>	<i>Curtido de pieles</i>
<i>Trifluoruro de cromo</i> <i>Cloruro crómico</i>	<i>Mordiente para teñidos</i>
<i>Sulfato crómico</i>	<i>Colorante de gemas sintéticas</i>
<i>Fluoruro de cromo</i> <i>Dicromato sódico</i>	<i>Tinción de telas</i>
<i>Dicromato de sodio</i>	<i>Mordiente</i>
<i>Acetato de cromo</i>	<i>Estampados de textiles</i>
<i>Ión trivalente (Cr^{3+})</i> <i>Ión hexavalente (Cr^{6+}), (CrO_4^{2-})</i>	<i>Colorante de vidrio</i>

Entre los efluentes que causan mayor preocupación están los desagües de galvanoplastia que pueden descargar Cr VI. El curtido de cueros y la industria textil, como también la manufactura de colorantes y pigmentos, pueden descargar Cr III y Cr VI a los cuerpos de agua (Tinitus, 2010).

1.4.5 El cromo en la Industria Textil.

El cromo es el metal pesado cuantitativamente más importante en el vertido de la Industria Textil; procede esencialmente de los procesos de tintura (Riva *et al.*, 1980).

El cromo es utilizado como colorante mordiente para el tintado de lana; en la actualidad, más del 65% de la lana se tiñe con colorantes con cromo o premetalizados.

Para los colorantes mordientes con cromo, se utiliza un método de tintura que maneja iones de cromo para ‘adherir’ materias colorantes a la fibra. El cromo forma un complejo tanto con el colorante como con los grupos presentes en la fibra, actuando como puente. Este nexo es extremadamente fuerte suplementado por interacciones iónicas entre la materia colorante y la fibra y produce una excelente durabilidad del color ante los lavados. La materia colorante se aplica primero a la fibra y luego, en una fase por separado, se añade sal de cromo. Se utilizan sales de Cr VI, que son solubles en agua, el cromo se reduce hasta formar sobre la fibra, por grupos, un complejo Cr III soluble en agua. Se pueden añadir ácidos orgánicos o tiosulfatos para aumentar el nivel de fijación (Walters *et al.*, 2005).

Los colorantes premetalizados se tratan de soluciones tintóreas creadas mediante un proceso químico previo a la fase de tintura; en este caso el procedimiento es el siguiente: una o varias moléculas de colorante, generalmente ácido, se asocian con un átomo metálico formando un complejo molecular (Figura 1.3) con afinidad por las fibras proteicas y poliamídicas. La formación de este complejo químico se consigue calentando una solución acuosa del cromóforo con una sal de cromo trivalente, siempre en un medio de pH por debajo de 4. Si bien se obtiene con ellos una extensa gama de colores, estos adolecen de falta de brillo en azules, verdes y violetas. Suelen aplicarse a los tejidos para evitar que se encojan (Los colorantes, 2009).

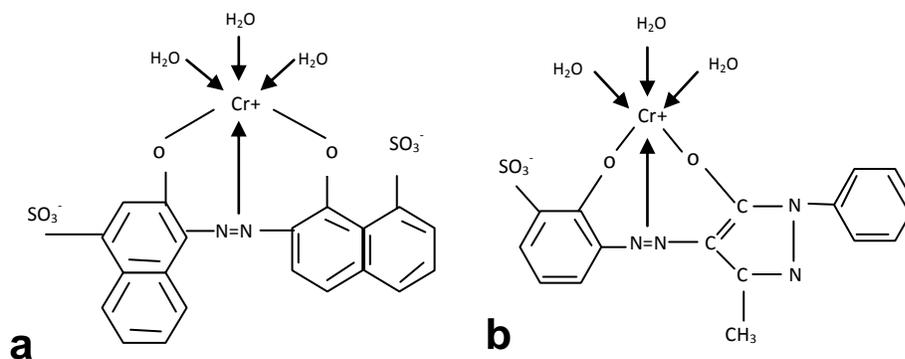


Figura 1.3 Estructuras de colorantes premetalizados con cromo. a) Azul ácido 158 (Azul palatín sólido GGN) b) Azul rojo 180 (Rojo Neolan R) (Los colorantes, 2009).

1.4.6 Toxicidad del Cromo.

Los efectos biológicos del cromo dependen de su estado de oxidación. El Cr VI es considerado la forma más tóxica del metal, debido a que atraviesa fácilmente las membranas biológicas y puede ser transportado activamente al interior de las células por medio del transportador de sulfato; por su analogía química con el sulfato, el cromato es un inhibidor competitivo del transporte de aquel ión esencial. El Cr VI es altamente tóxico para todas las formas de vida, siendo mutagénico y carcinogénico en el hombre y mutagénico en bacterias. Se ha propuesto que la toxicidad del Cr VI se debe a que, al igual que otros metales, produce estrés oxidativo. En este proceso dentro de las células se generan intermediarios reducidos de cromo que, en presencia de H_2O_2 , funcionan como catalizadores de una reacción tipo Fenton, llevando a la formación de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO). Conduce el consecuente daño oxidativo, produciendo peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y daños a los ácidos nucleicos (Gutiérrez y Cervantes, 2008).

Por otra parte, el Cr III es relativamente inocuo debido a su insolubilidad e incapacidad para atravesar las membranas biológicas; dicha especie constituye un oligoelemento indispensable para procesos bioquímicos y fisiológicos en células superiores, en cantidades muy pequeñas. El Cr III específicamente tiene acciones en el metabolismo de la glucosa, el

colesterol y los ácidos grasos, además de desempeñar un papel importante en diferentes reacciones enzimáticas (Gutiérrez y Cervantes, 2008). En pequeñas cantidades, el cromo se considera un nutriente esencial para numerosos organismos, pero en niveles elevados, es tóxico y mutagénico (Srinath *et al.*, 2002).

La toxicidad de los metales pesados es muy amplia. Su acción directa sobre los seres vivos ocurre a través del bloqueo de las actividades biológicas, es decir, la inactivación enzimática por la formación de enlaces entre el metal y los grupos sulfhidrilos (–SH) de las proteínas, causando daños irreversibles en los diferentes organismos (Vullo, 2003).

1.4.7 Organismos Involucrados en la Remoción de Cromo

Las células microbianas interactúan con el cromato a diferentes niveles: pared celular, periplasma y membrana plasmática, hasta el citoplasma y los organelos celulares (en el caso de los hongos). Es muy común que los microorganismos nativos de sitios contaminados con cromato muestren resistencia al ión, debido a que poseen mecanismos activos o pasivos que les permiten removerlo o detoxificarlo, algunos de los cuales son de interés e importancia biotecnológica. Entre las bacterias descritas se incluyen las cianobacterias *Nostoc calcicola* HH-12 y *Chroococcus* sp. HH-11, *Acinetobacter* sp., *Streptococcus equisimilis* (CECT 926), *Bacillus coagulans* (CECT 12) y *E. coli*. También, en algunos casos, ha sido utilizada la cepa transgénica de *E. coli* que expresa las proteínas captadoras de metales MerP de la bacteria Gram positiva *Bacillus cereus* RC-607 o de la bacteria Gram negativa *Pseudomonas* sp. K-62 ; respecto de los hongos, se han utilizado *Aspergillus* sp. e *Hirsutella* sp., *Rhizopus nigricans*, *Rhizopus cohnii*, *Trichoderma viridae*, *Penicillium chrysogenum*, entre otros. (Gutiérrez y Cervantes, 2008).

La remoción de Cr VI por levaduras también está ganando mucha atención desde que éstos microorganismos eucarióticos se han experimentado para ser útiles en procesos biotecnológicos (Villegas *et al.*, 2008).

Algunos estudios han reportado que Cr VI es reducido a Cr III por un gran número de especies de bacterias como: *Pseudomonas fluorescens LB300*, *Bacillus sp.*, *Enterobacter cloacae HO1*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Shewanella spp.*, y *Pseudomonas aeruginosa*, en estos estudios, la glucosa o ácidos orgánicos fueron usados como fuente de carbono y energía. Existen datos en los que se reporta que los compuestos aromáticos pueden ser utilizados como fuente de energía para la reducción del Cr VI, existen diferentes comportamientos para utilizar los metabolitos formados durante la degradación de compuestos aromáticos como fuentes de carbono para la reducción de Cr VI (Huaxiao *et al.*, 2009).

También han sido reportadas en la disminución de cromato como *Alcaligenes*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, y *Vibrio*. Tanto aerobios como anaerobios son activos. Bajo condiciones adecuadas, se ha logrado 99% de reducción de Cr VI, pero a concentraciones muy altas del ión, el porcentaje de reducción disminuye (Otidiano *et al.*, 2007). La incorporación de cromato a través del transportador de sulfato ha sido demostrada en varios tipos de bacterias como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* y *Alcaligenes eutrophus*; la alteración en la función de dicho transportador causa el fenotipo de resistencia a cromato (Gutiérrez y Cervantes, 2008).

Consortios microbianos también han sido reportados para la biosorción de Cr como en el trabajo realizado por Muneer *et al.* (2009), quienes utilizan una bacteria (*Bacillus thuringiensis*), una levadura (*Candida utschlssii*) y un protozoo (*Stilonychia mytilus*). Al igual que Sannasi *et al.* (2006) quien utiliza un consorcio de seis bacterias Gram negativas y tres Gram positivas para la biosorción de Cr VI. Chirwa *et al.* (2000) reporta en su investigación la remoción de Cr VI de manera anaeróbica conjuntamente con la degradación de fenol realizado por un consorcio de bacterias. Yun-guo *et al.* (2008) utiliza como consorcio a *Bacillus sp.* y *Pseudomonas putida Migula* en la remoción simultánea de Cr VI y fenol.

1.4.8 Mecanismos Utilizados por Microorganismos.

Los microorganismos poseen una variedad de rutas por las cuales pueden detoxificar el agua de metales pesados. Entre ellas se pueden citar:

1.4.8.1 Los sistemas de transporte e incorporación (bioacumulación)

Este mecanismo celular involucra un sistema de transporte de membrana que internaliza al metal pesado presente en el entorno celular con gasto de energía. Una vez incorporado el metal pesado al citoplasma, éste es secuestrado por la presencia de proteínas ricas en grupos sulfhidrilos llamadas metalotioninas o también pueden ser introducidos en una vacuola, como ocurre en hongos (Vullo, 2003). Las metalotioninas se unen a los iones metálicos evitando sus interacciones con otras proteínas esenciales para los microorganismos, ejemplo la cepa de *Pseudomonas* y a la cianobacteria *Synechococcus* (Suárez y Reyes, 2002).

La incorporación de cromato a la célula a través del transportador de sulfato ha sido demostrada en varios tipos de bacterias como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* y *Alcaligenes eutrophus*. Adicionalmente, en algunos géneros de bacterias se ha descrito la existencia de determinantes genéticos de resistencia a cromato presentes en plásmidos, los cuales codifican transportadores de membrana que dirigen el flujo de iones cromato del citoplasma de la célula al exterior (Gutiérrez y Cervantes, 2008).

En levaduras el Cr VI puede incorporarse a las células por un transportador aniónico no específico, un sistema de permeasas que transporta diferentes aniones como sulfatos y fosfatos. Evidencia adicional en este sentido se obtuvo por la observación de que algunos mutantes resistentes a cromato de hongos filamentosos y levaduras mostraron una dramática disminución en el transporte de sulfato (Gutiérrez y Cervantes, 2008).

1.4.8.2 La interacción y unión con componentes de la superficie celular (biosorción).

La biosorción es un fenómeno ampliamente estudiado para la remediación de metales pesados. Los microorganismos utilizados como biosorbentes, aislados a partir de los ecosistemas contaminados, retienen metales pesados a intervalos de tiempo

relativamente cortos al entrar en contacto con soluciones que contengan metales. Esto minimiza los costos en un proceso de remediación ya que no requiere el agregado de nutrientes al sistema, al no tener un metabolismo microbiano activo. El fenómeno de biosorción se caracteriza por la retención del metal mediante una interacción físico-química del metal con ligandos pertenecientes a la superficie celular. Esta interacción se produce con grupos funcionales expuestos hacia el exterior celular pertenecientes a partes de moléculas componentes de la pared celular como carboxilos, amino, hidroxilo, fosfato y sulfhidrilos (Vullo, 2003).

Debido a su naturaleza de oxianión, el Cr VI no es atrapado por los componentes aniónicos de las envolturas bacterianas; sin embargo, derivados catiónicos de Cr III se unen fuertemente con lipopolisacáridos de *Salmonella*, con paredes celulares de *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* y con polímeros capsulares de *Bacillus licheniformis* (Gutiérrez y Cervantes, 2008).

1.4.8.3 La transformación química (reducción o biotransformación).

El principal problema de los metales pesados es que no pueden ser biodegradados. Sin embargo los microorganismos pueden interactuar con ellos transformándolos; las principales transformaciones se dan en el estado de oxidación. Esto influye de forma drástica en la movilidad del contaminante. Los microorganismos pueden actuar y biodegradar la materia orgánica y los compuestos orgánicos (ácidos húmicos principalmente) a los que suelen estar asociados los metales pesados en los acuíferos, modificando igualmente su movilidad (López *et al.*, sin año).

Este proceso involucra un cambio químico sobre el metal pesado. Las reducciones de V (V) a V (III), Au (III) a Au (0) y Cr (VI) a Cr (III), conducen a la precipitación del metal bajo condiciones fisiológicas. El Cr VI al pasarlo a Cr III produce la inmovilización por precipitación de hidróxidos y la disminución de la mutagenicidad. El uso de microorganismos que tengan esta capacidad de conversión es de fundamental importancia en el tratamiento biológico de efluentes industriales (Vullo, 2003).

Las principales transformaciones de los metales pueden ser directas, por medio de cambios en el estado de valencia cuando actúan como donantes o receptores de electrones, e indirectas, por medio de agentes oxidantes y reductores producidos por los microorganismos y que son responsables de cambios en el pH y del potencial redox (López *et al.*, sin año).

Un amplio rango de bacterias ha sido identificado como capaz de llevar a cabo la reducción completa de Cr VI a Cr III, por reacciones de óxido – reducción de naturaleza biótica o abiótica. Se han descrito tres mecanismos de reducción de Cr VI:

1. En condiciones aeróbicas, la reducción de Cr VI ha sido asociada con cromato reductasas que usan NADH o NADPH como cofactores.

2. En la reducción en condiciones de anaerobiosis, el Cr VI es usado como aceptor de electrones en la cadena transportadora de electrones.

3. La reducción puede también llevarse a cabo por reacciones químicas asociadas con compuestos como aminoácidos, nucleótidos, azúcares, vitaminas, ácidos orgánicos o glutatión (Gutiérrez y Cervantes, 2008). La reducción puede deberse a enzimas membranales o de la fracción soluble y ocurrir bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas.

Las reductasas descritas incluyen:

- Enzimas membranales de *Pseudomonas putida* que transfieren electrones al Cr VI por citocromos dependientes de NADH.
- Las NADH: flavín oxidoreductasas de *Enterobacter cloacae* que usan al Cr VI como aceptor de electrones.
- La nitroreductasa de *Vibrio harveyi*, que posee una actividad primaria como nitrofurazona nitrorreductasa y una función secundaria como reductasa de Cr VI.
- La reductasa férrica de *Paracoccus denitrificans*, que usa Fe III nitrilotriacetato y Cr VI como substratos (Gutiérrez y Cervantes, 2008).

En conclusión, la reducción de Cr VI parece ser un eficiente sistema de resistencia a cromato en bacterias, específicamente en la transformación química del cromo se ha descrito bacterias y hongos para remover, por reducción, el Cr VI. Las bacterias utilizadas incluyen *Bacillus sp*, *E. coli*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. ambigua*, *E. cloacae*, bacterias reductoras de sulfato, *Shewanella sp.* y *Arthrobacter sp*; en el caso de los hongos, los microorganismos descritos incluyen las levaduras *Candida utilis*, *Candida maltosa* y una cepa industrial de *Saccharomyces cerevisiae*, hongos filamentosos como las cepas Ed8 de *Aspergillus sp* y H13 de *Penicillium sp.* Los procesos microbianos de biosorción y de transformación química de cromo son promisorios y de importancia práctica en el contexto de la biotecnología ambiental (Gutiérrez y Cervantes, 2008).

La Figura 1.4 muestra los procesos de la captación microbiana y la localización de los diferentes procesos antes descritos.

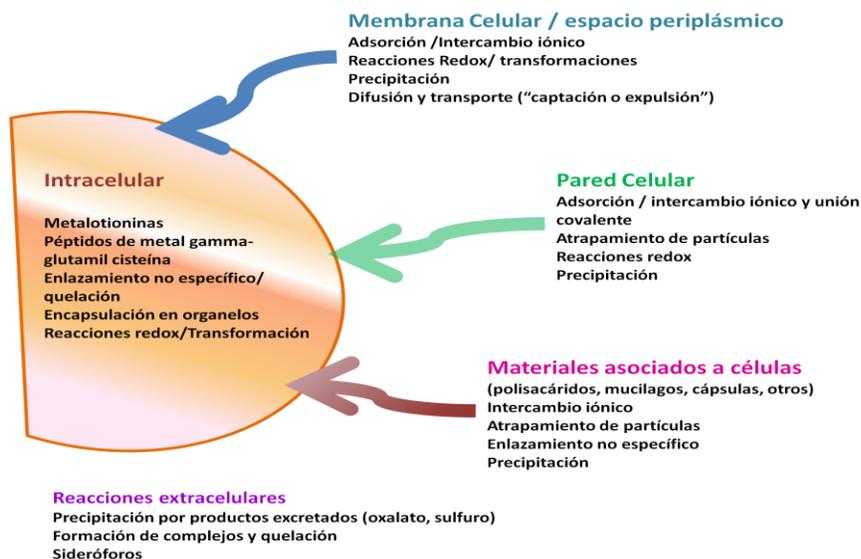


Figura 1.4 Procesos que contribuyen a la captación microbiana y detoxificación de metales. La localización de algunos de los procesos, especialmente reacciones redox, no se conoce (se indican las localizaciones propuestas) y puede variar entre grupos, cepas y especies de organismos procarióticos y eucarióticos. (Cañizares, 2000).

1.4.9 Biosorción por biomasa muerta.

La biosorción de metales pesados es un proceso pasivo no metabólico, de la unión del metal con el biosorbente. Algunos desechos industriales son utilizados para este propósito como lo son bacterias, levaduras, hongos y algas; los cuales pueden funcionar como biosorbentes de metales pesados. La biosorción es considerada un proceso físico-químico rápido (Febrianto *et al.*, 2009).

En 1995 se hizo un esfuerzo para resumir el tipo y eficacia de los biosorbentes, así como los procesos de tratamiento por biosorción desde entonces los estudios han continuado de manera intensiva, considerándose el empleo de biomasa bacteriana o fúngica, cultivadas en lote, en biorreactores o inmovilizadas en diferentes matrices, para remover por biosorción el cromo presente en medio de cultivo o en efluentes industriales (Gutierrez y Cervantes, 2008).

El uso de biosorbentes para la remoción de contaminantes tóxicos o para la recuperación de valiosos recursos de aguas residuales, es uno de los más recientes descubrimientos en el medio ambiente o recursos biológicos de tecnología. Las mayores ventajas de esta tecnología sobre la convencional incluye no solamente su bajo costo sino también su alta eficiencia, la disminución de químicos o lodos biológicos, la habilidad de regenerar los biosorbentes y la posibilidad de recuperar el metal luego de la adsorción. (Park *et al.*, 2010).

La compleja estructura de la biomasa implica que existe muchas vías por las que los biosorbentes remueven los contaminantes; por ejemplo, la estructura y aspectos funcionales de polímeros extracelulares de microorganismos como grupos aminas, amidas, carbonilos, carboxilos, hidroxilos, imidazoles, sulfonatos, sulfhidrilos, fenólicos, fosfatos y fosfodiéster. Sin embargo, la presencia de algunos grupos funcionales no garantiza una satisfactoria biosorción de contaminantes, pues existen barreras conformacionales o

estéricas, entre otras, que pueden estar presentes. Para que se pueda obtener una eficiente biosorción de la biomasa depende de varios factores, incluyendo el número de sitios reactivos en el biosorbente, accesibilidad a los sitios, estado químico de los sitios y afinidad entre los sitios y el contaminante particular de interés. La biosorción de colorantes y metales ocurre principalmente a través de interacciones como: intercambio iónico, formación de complejos, adsorción por fuerzas físicas, precipitación y atrapamiento en espacios interiores (Park *et al.*, 2010).

1.4.10 Tipos de biomasa o biomateriales

Los diversos cuidados que implican el mantenimiento de microorganismos vivos como nutrientes, biorreactores, manutención de una población saludable, temperatura y pH hace que la biomasa muerta sean en efecto más aplicables. La biomasa muerta a comparación de las células vivas poseen ventajas y desventajas que deben ser analizadas para realizar un proceso de biorremediación (Anexo A). El primer gran reto enfrentado por los investigadores de la biosorción fue seleccionar los tipos de biosorbentes de una gran lista de biomateriales. Cuando se escoge un material que va a ser utilizado como biosorbente a escala industrial se debe tener en cuenta que sea fácilmente disponible y barato. Considerando estos factores la biomasa nativa puede provenir de: desperdicios industriales, los cuales deben ser libres de carga; organismos fácilmente obtenidos en grandes sumas en la naturaleza y organismos que pueden ser de rápido crecimiento o cultivos especiales o propagados con propósitos de biosorción. Los biosorbentes como se muestra en el Cuadro 1.2 se encuentran dentro de las siguientes categorías: bacterias, hongos, algas, residuos industriales, residuos de agricultura, residuos naturales y otros biomateriales (Park *et al.*, 2010).

Cuadro 1.2 Tipos de biomasa nativa que han sido usadas para la preparación de biosorbentes (Park *et al.*, 2010).

Categoría	Ejemplos
Bacterias	Bacterias Gram positivas (<i>Bacillus sp.</i> , <i>Corynebacterium sp.</i> , y otros), bacterias Gram negativas (<i>Escherichia sp.</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , entre otros), cianobacterias (<i>Anabaena sp.</i> , <i>Synechocystis sp.</i> , entre otros.)
Hongos	Mohos (<i>Aspergillus sp.</i> , <i>Rhizopus sp.</i> , etc.), champiñones (<i>Agaricus sp.</i> , <i>Trichaptum sp.</i> , etc.) y levaduras (<i>Saccharomyces sp.</i> , <i>Candida sp.</i> , y otros)
Algas	Micro-algas (<i>Chlorella sp.</i> , <i>Chlamydomonas sp.</i> , entre otros.), macro algas (Algas verdes (<i>Enteromorpha sp.</i> , <i>Codium sp.</i> , y otros) , algas cafés (<i>Sargassum sp.</i> , <i>Ecklonia sp.</i> , y otros.) y algas rojas (<i>Geildium sp.</i> , <i>Porphyra sp.</i> , entre otros)).
Residuos Industriales	Residuos de fermentación, residuos de comida/bebida, lodos activados, lodos anaerobios.
Residuos de agricultura	Residuos de frutas/vegetales, cascarilla, salvado de trigo, cascarilla de soya.
Residuos naturales	Residuos de plantas, aserrín, cortezas de árboles, hierbas.
Otros	Materiales de quitosano, materiales de celulosa, entre otros.

1.4.11 Influencia de las condiciones de la biosorción sobre la remoción de metales pesados.

La investigación de los factores que afectan la eficiencia de la biosorción de metales pesados es de gran interés para la comunidad industrial. La eficiencia es fuertemente influenciada por las características químicas de las soluciones por ejemplo pH, temperatura, la concentración inicial, entre otros.

1.4.11.1 Influencia del pH.

El pH de la solución es un factor crucial en la biosorción de metales pesados. El valor del pH influencia significativamente los sitios de disociación sobre la superficie de la biomasa y el comportamiento químico del metal pesado, por ejemplo hidrólisis, formación de complejos por ligandos orgánicos y/o inorgánicos, reacciones redox, y precipitación, como también la especie del metal y la disponibilidad. La biosorción de cromo total varía como función del pH, con iones presentes como ácido crómico (H_2CrO_4), ión hidrógeno cromato ($HCrO_4^-$), ión dicromato ($Cr_2O_7^{2-}$), ión cromato (CrO_4^{2-}) y Cr^{3+} que son las

especies dominantes. A pH 1-2, el ión hidrógeno cromato (HCrO_4^-) es la especie dominante (Sari y Tuzen, 2008).

La biosorción del cromo a bajo pH sugiere que la carga negativa de las especies de cromo (cromato/dicromato) se unen por una atracción electrostática a grupos funcionales con carga positiva sobre la superficie de los biosorbentes. Cuando el pH incrementa las cargas de la superficie pasan a ser negativas y la biosorción disminuye. En condiciones alcalinas, los grupos carboxilos se encuentran desprotonados y tienen una carga negativa. En bajas concentraciones de cromo, la principal especie es HCrO_4^- con pH debajo de 5, mientras que la especie CrO_4^{2-} incrementa con el aumento del valor de pH y se convierte en la principal especie a pH por encima de 7 (Sivaprakash *et al.*, 2009).

La biosorción del metal depende de la protonación o desprotonación de los grupos funcionales sobre la pared celular (Abbas *et al.*, 2008).

1.4.11.2 Influencia de la temperatura.

La temperatura parece afectar a la biosorción en menor medida dentro del rango de 20 a 35°C. La remoción por biosorción de la mayoría de los contaminantes es endotérmica, así, a mayor temperatura usualmente mayor remoción por biosorción realizada por el adsorbato a través del incremento de la actividad de la superficie y energía cinética. Sin embargo, las altas temperaturas pueden también causar daños físicos al biosorbente, es por esto que los procesos de biosorción se llevan a cabo a temperatura ambiente. A diferencia de las condiciones controladas del laboratorio, los efluentes industriales contienen varios contaminantes incluyendo el contaminante de interés, por lo tanto es necesario para las investigaciones tomar en cuenta el efecto inhibitorio de las fuerzas iónicas y la competición de los iones presentes en los efluentes. Estos factores influyen en la remoción compitiendo por los sitios de unión del adsorbato (Park *et al.*, 2010).

1.4.11.3 Efecto de Iones.

Los iones de algunos efluentes también tienen una influencia en la adsorción por cuanto algunos pueden poseer una afinidad por los grupos funcionales y pueden unirse más rápido que el metal, es decir, compiten por los sitios de unión. Los iones pueden cambiar la actividad del biosorbente o también pueden formar complejos, una alta concentración de otros contaminantes reducirá la remoción del metal de interés (Park *et al.*, 2010).

1.4.11.4 Efecto de la cantidad de adsorbente.

La eficiencia de la biosorción es altamente dependiente de la cantidad de biomasa, a mayor cantidad de biomasa o adsorbente se tiene mayor cantidad de grupos funcionales o sitios de adsorción. Es por ello que la cantidad de adsorbente es muy importante para que se produzca en menos tiempo la adsorción, pues si se tiene pocos sitios puede existir la saturación de los mismos y no llevar a cabo una completa adsorción de toda la concentración que se encuentre del metal. Sin embargo gran cantidad de biosorbente puede afectar la biosorción, debido a que puede darse una agregación de la biomasa la cual causa una disminución en el área efectiva de la biosorción (Sari y Tuzen, 2008).

1.5 Hipótesis.

Los consorcios bacterianos nativos compuestos (I 5 y M 3) remueven el cromo presente en el agua sintética a nivel de laboratorio.

CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

La investigación fue desarrollada en la Escuela Politécnica del Ejército en el Laboratorio de Microbiología; la misma que forma parte del proyecto interno “Obtención de un inóculo bacteriano nativo compuesto capaz de degradar contaminantes típicos de efluentes de industrias textiles, para que sea utilizado como biomasa en plantas de tratamiento biológico de aguas residuales a escala real” financiado por la ESPE para el año 2009.

Se contó con la colaboración de la MSc. Alma Koch como Directora y la Dra. Blanca Naranjo como Codirectora, además el Ing. Enrique Arévalo quien contribuyó en las mediciones realizadas en el equipo de Absorción Atómica (VARIAN AA 240FS), el Ing. Pedro Romero en los análisis estadísticos y la participación de Ing. Irina Moncayo e Ing. Diana Ayala.

2.2 Zona de Estudio:

Los inóculos bacterianos que se utilizaron fueron aislados de suelo contaminado con agua residual textil y del ambiente, los cuales se mantienen en el cepario del Laboratorio de Microbiología (Ayala, 2010; Moncayo, 2010).

Los análisis de laboratorio fueron llevados a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la Escuela Politécnica del Ejército ESPE y en los laboratorios de la Subsecretaría de Electricidad y Energía Renovable (ex CEEA) ubicado en el campus Politécnico quienes aportaron con el equipo de Absorción Atómica.

2.3 Período de tiempo de investigación: Julio 2009 – Abril 2010.

2.4 Diseño Experimental

Se utilizó un DCA para los dos inóculos (M 3 e I 5) por separado, en el caso de células vivas como se describe en la Tabla 2.1

Tabla 2.1 Descripción de los tratamientos del diseño experimental para la determinación de la remoción de cromo.

Tratamiento	Descripción	Unidad experimental	Número de repeticiones	Control
T1	10 mg.L ⁻¹ K ₂ CrO ₄ + medio de cultivo + inóculo	Erlenmeyer de 250 mL con 140 mL de medio de cultivo.	3	10 mg.L ⁻¹ K ₂ CrO ₄ + medio de cultivo.
T2	50 mg.L ⁻¹ K ₂ CrO ₄ + medio de cultivo + inóculo	Erlenmeyer de 250 mL con 140 mL de medio de cultivo.	3	50 mg.L ⁻¹ K ₂ CrO ₄ + medio de cultivo.
T3	100 mg.L ⁻¹ K ₂ CrO ₄ + medio de cultivo + inóculo	Erlenmeyer de 250 mL con 140 mL de medio de cultivo.	3	100 mg.L ⁻¹ K ₂ CrO ₄ + medio de cultivo.

En el caso de la Biomasa muerta se utilizó un diseño factorial 2 x 5 (inóculo bacteriano, concentración de cromo) con tres repeticiones, como se describe en la Tabla 2.2. Los datos fueron analizados en el programa estadístico SPSS 15.0

Tabla 2.2 Descripción de los tratamientos del diseño experimental preparado para la determinación de la remoción de cromo con biomasa.

Tratamiento	Descripción	Unidad experimental	Número de repeticiones	Control
T1	2 mg.L ⁻¹ K ₂ CrO ₄ + agua destilada estéril + 30 mg de biomasa del inóculo M 3.	Erlenmeyer de 100 mL con 30 mL de agua sintética.	3	2 mg.L ⁻¹ K ₂ CrO ₄ + agua destilada estéril.
T2	10 mg.L ⁻¹ K ₂ CrO ₄ + agua destilada estéril + 30 mg de biomasa del inóculo M 3.	Erlenmeyer de 100 mL con 30 mL de agua sintética	3	10 mg.L ⁻¹ K ₂ CrO ₄ + agua destilada estéril.
T3	20 mg.L ⁻¹ K ₂ CrO ₄ + agua destilada estéril + 30 mg de biomasa del inóculo M 3.	Erlenmeyer de 100 mL con 30 mL de agua sintética	3	20 mg.L ⁻¹ K ₂ CrO ₄ + agua destilada estéril.
T4	35 mg.L ⁻¹ K ₂ CrO ₄ + agua destilada estéril + 30 mg de biomasa del inóculo M 3.	Erlenmeyer de 100 mL con 30 mL de agua sintética	3	35 mg.L ⁻¹ K ₂ CrO ₄ + agua destilada estéril.
T5	50 mg.L ⁻¹ K ₂ CrO ₄ + agua destilada estéril + 30 mg de biomasa del inóculo M 3.	Erlenmeyer de 100 mL con 30 mL de agua sintética	3	50 mg.L ⁻¹ K ₂ CrO ₄ + agua destilada estéril.
T6	2 mg.L ⁻¹ K ₂ CrO ₄ + agua destilada estéril + 30 mg de biomasa del inóculo I 5.	Erlenmeyer de 100 mL con 30 mL de agua sintética	3	2 mg.L ⁻¹ K ₂ CrO ₄ + agua destilada estéril.
T7	10 mg.L ⁻¹ K ₂ CrO ₄ + agua destilada estéril + 30 mg de biomasa del inóculo I 5.	Erlenmeyer de 100 mL con 30 mL de agua sintética	3	10 mg.L ⁻¹ K ₂ CrO ₄ + agua destilada estéril.
T8	20 mg.L ⁻¹ K ₂ CrO ₄ + agua destilada estéril + 30 mg de biomasa del inóculo I 5.	Erlenmeyer de 100 mL con 30 mL de agua sintética	3	20 mg.L ⁻¹ K ₂ CrO ₄ + agua destilada estéril.
T9	35 mg.L ⁻¹ K ₂ CrO ₄ + agua destilada estéril + 30 mg de biomasa del inóculo I 5.	Erlenmeyer de 100 mL con 30 mL de agua sintética	3	35 mg.L ⁻¹ K ₂ CrO ₄ + agua destilada estéril.
T10	50 mg.L ⁻¹ K ₂ CrO ₄ + agua destilada estéril + 30 mg de biomasa del inóculo I 5.	Erlenmeyer de 100 mL con 30 mL de agua sintética	3	50 mg.L ⁻¹ K ₂ CrO ₄ + agua destilada estéril.

2.5 Procedimientos

2.5.1 Medio de Cultivo

Se utilizó el medio de cultivo de Jiang *et al.*; 2004 modificado por Ayala (2010) y Moncayo (2010) con los componentes y concentraciones que se indica en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3 Componentes del medio de cultivo.

Nombre del compuesto	Concentraciones
EDTA sódico	0,0014 g.L ⁻¹
Sulfato ferroso FeSO ₄	0,001 g.L ⁻¹
Sulfato de calcio CaSO ₄ .H ₂ O	0,14 g.L ⁻¹
Cloruro de sodio NaCl	0,1 g.L ⁻¹
Fosfato monoácido de potasio K ₂ HPO ₄	1 g.L ⁻¹
Sulfato de magnesio heptahidratado MgSO ₄ .7H ₂ O	1,4 g.L ⁻¹
Fosfato diácido de potasio KH ₂ PO ₄	2 g.L ⁻¹
Sulfato de amonio (NH ₄) ₂ SO ₄	4 g.L ⁻¹
Glucosa	5 g.L ⁻¹
Buffer Fosfato.	

El medio de cultivo consistió en la preparación de soluciones madre para cada una de los componentes del medio de cultivo. Se autoclavó el volumen requerido de cada solución por separado y se las conservó en refrigeración a 5°C.

Al medio se le colocó una fuente de Cr VI, utilizando cromato de potasio (K₂CrO₄) J.T.Baker (Yun-guo *et al.*, 2008) de una solución madre de 500 mg.L⁻¹, con el cual se realizaron las concentraciones de 10, 50 y 100 mg.L⁻¹ (Chirwa y Wang, 2000; Wie-Hua *et al.*, 2006; Akmar *et al.*, 2007) que se utilizaron en el ensayo, como lo muestra la Figura 2.1. El volumen de medio sintético utilizado fue de 140 mL en erlenmeyers y frascos BOECO de 250 mL, a una temperatura de incubación de 35°C (Incubadora VWR 1515E) para el inóculo en condiciones anaeróbicas (I 5) y 35°C con 150 rpm (Incubadora con agitación VWR 1570) para el inóculo en condiciones aerobias (M 3) (Yun-guo *et al.*, 2008).



Fig. 2.1 Medios de cultivo (1) 10mg.L^{-1} (2) 50mg.L^{-1} (3) 100mg.L^{-1} y controles (4 y 5).

Para la activación de los inóculos utilizados en el diseño experimental se colocó el 20% del Inóculo I 5 y el 10% del Inóculo M 3 en 200 ml, se dejaron en incubación por 3 y 2 días respectivamente a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ para el inóculo I 5 (Moncayo, 2010). Las condiciones para el inóculo M 3 fueron 35°C y 45 rpm (Ayala, 2010).

Para cada unidad experimental se utilizó el 5% de inóculo activado (Song *et al.*, 2009) en 140 mL de medio de cultivo, con una población de 1×10^5 UFC colocado en erlenmeyers de 250 mL para el inóculo M 3 y en frascos BOECO de 250 mL para el inóculo I 5.

2.5.2 Estandarización del Método para la Medición de Cr VI.

Para la determinación de Cr VI se utilizó un método combinado entre el Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater y el Manual de equipo HACH, por el método de difenilcarbazida (Lokeshwari y Keshava, 2009).

Se realizaron curvas para la cuantificación de Cr VI con una variedad de estándares de $0,04-0,06-0,08-0,1-0,2-0,3$ y $0,4\text{ mg.L}^{-1}$ de Cr VI a partir de una solución de 500 mg.L^{-1} de Cr VI.

Las diluciones se realizaron en balones de 25 mL y transferidas a tubos de ensayo (25x150) donde se colocó el reactivo Chroma Ver3 para HACH, se agitó en Vortex (VM-300), se dejó reposar por 5 min y se leyó en espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm. Las curvas estándar aceptadas fueron aquellas con un rango de R^2 de 0,995 a 0,999.

Se aceptaron cinco curvas con las cuales, se realizó una sola en el programa SPSS 15.0; la ecuación resultante fue utilizada para la determinación de cromo VI en el ensayo.

2.5.3 Determinación de Cr VI

Se utilizó el método colorimétrico de la difenilcarbazida (Chirwa y Wang, 2000; Villegas *et al.*, 2008; Lokeshwari y Keshava, 2009) con reactivos utilizados para equipo HACH el cual es un método combinado entre el Standard Methods y el manual del equipo HACH.

Se tomaron muestras de 2 mL de cada unidad experimental en viales de 2 mL los cuales fueron centrifugados a 14000 rpm por 5 min (Zahoor y Rehman, 2009) en microcentrífuga SIGMA 1-14. Se tomó el sobrenadante y realizó las siguientes diluciones: para 10 mg.L⁻¹ (1:100) para 50 mg.L⁻¹ (1:500) y para 100 mg.L⁻¹ (1:100) , se pasó una muestra de 10 mL a tubos de ensayo de 25x150, se les colocó el reactivo Chroma Ver3 para HACH, se los agitó en Vortex (VM-300) y se los dejó reposar por 5 min, luego se colocó una muestra de aproximadamente 2 mL en la celda de cuarzo y se realizó la medición de la absorbancia a longitud de onda a 540 nm en Espectrofotómetro (Genesys 10 UV Scanning). Con las absorbancias obtenidas se calculó la concentración en mg.L⁻¹ mediante la ecuación obtenida en la estandarización del método.

La reacción que se produce entre el Cr VI con la difenilcarbazida es la siguiente:



Donde:

H_4L = difenilcarbazona

H_2L = difenilcarbazona

En la reacción se produce una oxidación simultánea de la difenilcarbazona (Anexo B) a difenilcarbazona y la reducción de Cr VI a Cr III, con una quelación del Cr III en la difenilcarbazona (Anexo C). La estructura del quelato, es de color violeta que se lo determina espectrofotométricamente a una longitud de onda a 540 nm en donde la intensidad de color es directamente proporcional a la concentración de cromo hexavalente.

2.5.4 Determinación de Cromo Total

Se tomaron muestras de 2 mL de cada unidad experimental en microtubos de 2 mL, se centrifugó a 14000 rpm por 5 min (Zahoor y Rehman, 2009) en una microcentrífuga SIGMA 1-14.

Se tomó el sobrenadante y realizó diluciones para las muestras de 10 mg.L^{-1} (1:10), 50 y 100 mg.L^{-1} (1:100). Para determinar la concentración de cromo total se utilizó el equipo de Absorción Atómica (Figura 2.2) Marca VARIAN AA 240 FS (Standard Methods, Alves de Lima *et al.*, 2007).

Antes de cada lectura en el equipo, se realizó la curva estándar con concentraciones de 0,1-0,3-0,5-0,7 y 1 mg.L^{-1} de cromo, se utilizó el reactivo certificado Chromium ICP Standard de 1000 mg.L^{-1} a partir del cual se realizaron las diluciones.



Figura 2.2 Equipo de Absorción atómica VARIAN AA240FS

2.5.5 Obtención de la Biomasa.

Para obtener la cantidad requerida de bacterias se procedió de la siguiente manera: se dejó en crecimiento a cada inóculo en medio de cultivo durante tres a cuatro días en un 1 L de medio de cultivo. Para el inóculo I 5 se lo colocó en frascos Boeco de 1000 mL (Figura 2.3), y para M 3 en erlenmeyer de 2000 mL.

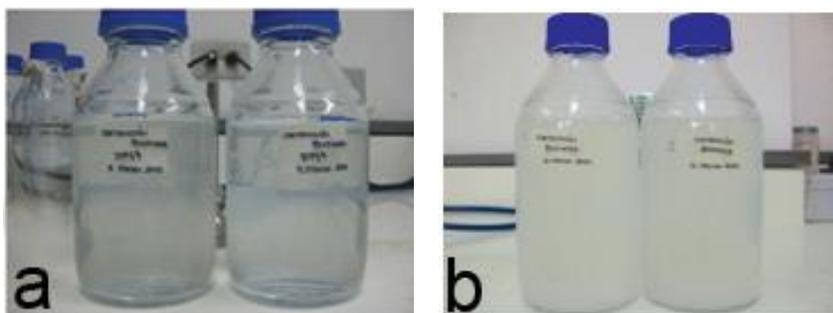


Figura 2.3 Crecimiento del inóculo I5 en frascos BOECO (a) Medio de cultivo inicial. (b) Medio de cultivo luego de 4 días.

Pasados los cuatro días de incubación, se recolectó el inóculo en tubos falcon llenando las tres cuartas partes y se centrifugó a 4000 rpm a 5 °C en centrífuga refrigerada (Eppendorf 5810R) por 20 min, después se retiró el sobrenadante y se realizaron dos lavados con agua destilada estéril (Ferrari *et al.*, 2004), repitiendo las mismas condiciones con el cambio de tiempo a 15 min en centrifugación. Se almacenó en frascos BOECO de 250 mL (Figura 2.4) manteniéndolos en refrigeración a 5°C. Obtenido aproximadamente 200 mL de inóculo, se autoclavó a 121°C por 15 min en Autoclave Tuttnauer 3870 ML.

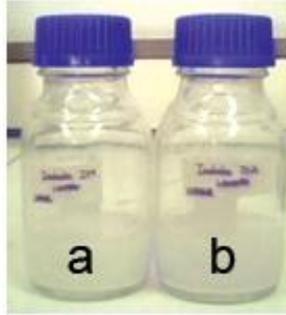


Figura 2.4 Almacenamiento de la biomasa de los inóculos. (a)Inóculo I 5. (b)Inóculo M 3

Obtenida la cantidad de inóculo se verificó el peso seco del inóculo por mL, para la que se tomó una muestra de 1 mL de inóculo, se filtró en membrana estéril Millipore de $0,45\mu\text{m}$ y se dejó en la estufa (L-C OVEN) a 30°C hasta peso constante (Figura 2.5)

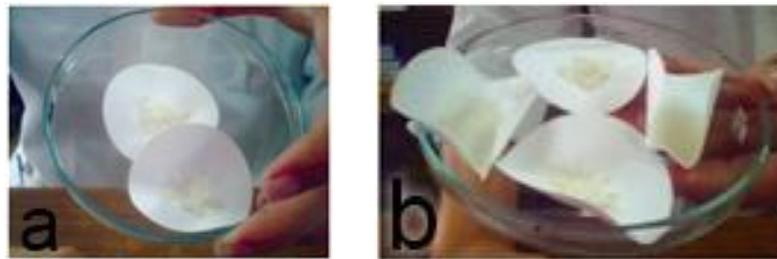


Figura 2.5 Filtro millipore con biomasa seca de los inóculos. (a) Biomasa seca del inóculo I5. (b) Biomasa seca de los dos inóculos I5 y M3.

2.5.6 Preparación de Agua Sintética

Para el agua sintética utilizada en el ensayo de biomasa, se utilizó agua destilada obtenida en el laboratorio en destilador (Millipore Direct-Q) con filtro de $0,22\mu\text{m}$ previamente esterilizada; se colocó cromato de potasio (K_2CrO_4 J.T Baker) como fuente de Cr VI y ácido clorhídrico (HCl 1N) para regular hasta pH 2 (Ochie *et al.*, 2008; Febrianto *et al.*, 2009; Sivaprakash *et al.*, 2009). Las concentraciones de cromo utilizadas fueron 2, 10, 20, 35 y $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (Figura 2.6).

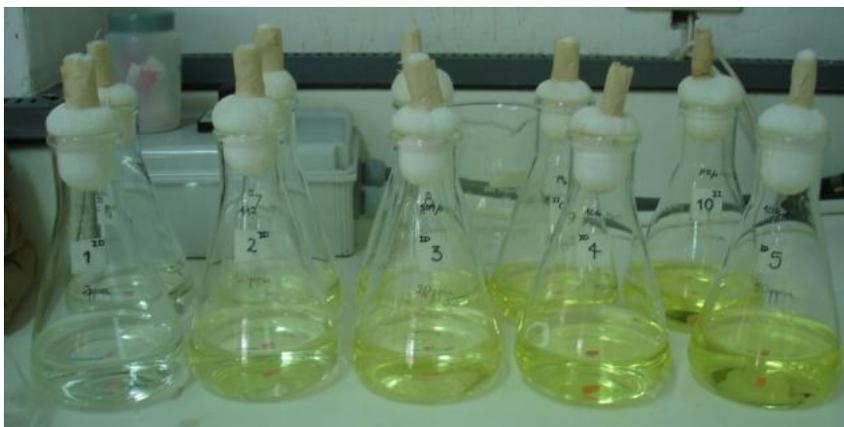


Figura 2.6 Medio sintético para el ensayo de biomasa. (1) Medio con 2 mg.L^{-1} , (2) con 10 mg.L^{-1} , (3) con 20 mg.L^{-1} , (4) con 35 mg.L^{-1} y (5) con 50 mg.L^{-1}

El medio sintético fue colocado en erlenmeyers de 100 mL y puestos en la incubadora con agitación Wise Cube Marca WIS-20R por 2 h a 35°C y 150 rpm (Figura 2.7).



Figura 2.7 Ensayo de biomasa colocada en la Incubadora con agitación Wise Cube.

En cada unidad experimental se colocó 30 mg en peso seco de inóculo en 30 mL de agua sintética equivalente a 1 g.L^{-1} (Lokeshwari y Keshava, 2009).

2.5.7 Adsorción por biomasa muerta de los inóculos

Se recogieron muestras cada 30 min durante 2 h. Se tomó 1 mL de muestra en microtubos de 2 mL (Figura 2.8), a los cuales se los colocó en la microcentrífuga (SIGMA 1-14) por 5 min a 14000 rpm.

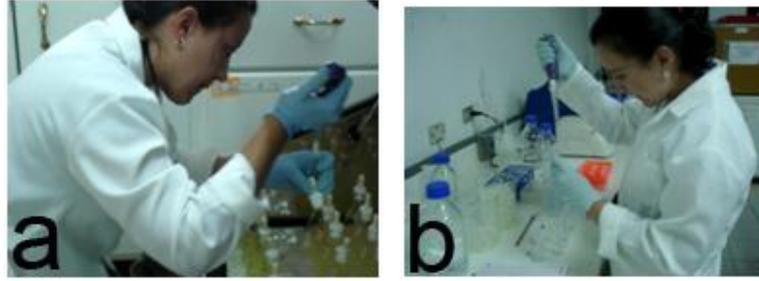


Figura 2.8 (a) Recolección de las muestras.(b) Dilución de las muestras

Se tomó muestras del sobrenadante y se realizaron diluciones: para la muestra de 2 mg.L^{-1} (1:5), para 10 mg.L^{-1} (1:10) para 20 mg.L^{-1} (1:20) para 35 mg.L^{-1} (1:50) y para la muestra de 50 mg.L^{-1} (1:100), a las que se realizó la medición de absorbancia en equipo de Absorción Atómica (VARIAN AA240FS).

2.5.8 Conteo Bacteriano por Siembra Profunda

Se utilizó el método de enumeración de bacterias del Manual Benson's modificada por Ayala (2009) y Moncayo (2009). Las diluciones se realizaron en tubos tapa rosca con 9,9 mL de solución salina concentrada (45 g de NaCl diluido en 500 mL de agua destilada), esterilizados (Figura 2.9). Cada una de las diluciones fueron homogenizadas por 20 s en *vortex* antes de realizar la siguiente dilución. Una vez realizadas las diluciones se inoculó en 25 mL de Agar PCA estéril (Difco Plate Count Agar) dispensado en matraces de 100 mL y mantenidos a 45°C . Una vez inoculado, se mezcló manualmente realizando movimientos de agitación lenta (veinte veces) sobre el mesón y se las colocó en cajas petri esterilizadas, se incubó a 35°C por 48 h en la Incubadora VWR 1515E.

Se realizó el conteo en las cajas que presentaron colonias completamente aisladas y separadas, obteniendo entre 30 y 300 Unidades Formadoras de Colonias (UFC).

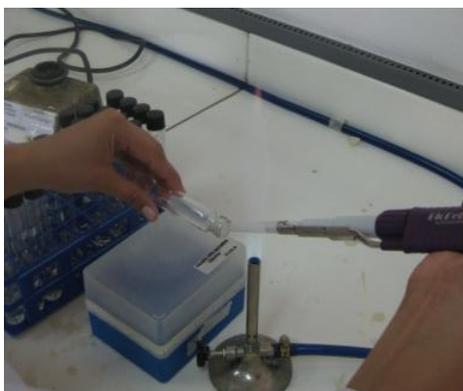


Figura 2.9 Diluciones en tubos tapa rosca con 9,9 mL de solución salina.

2.6 Análisis de Datos:

Se realizó la evaluación estadística de los datos obtenidos de la medición de concentraciones de cromo VI y cromo total en los medios de cultivo a través del análisis realizado en el programa estadístico SPSS 15.0 con el fin de determinar la capacidad de los inóculos bacterianos para degradar cromo. Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y pruebas Tukey.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

Los inóculos usados en ésta investigación presentaron anteriormente porcentajes significativos de remoción de colorantes, por lo que se vio la necesidad de conocer su comportamiento ante la exposición al Cr VI, para en el futuro usarlos en biorremediación de efluentes textiles. Los consorcios bacterianos nativos compuestos asignados como: M 3 que fue aislado de una muestra de suelo contaminado por agua textil y el inóculo I 5 obtenido por exposición del medio de cultivo con colorantes, al ambiente.

El inóculo M 3 en una investigación anterior fue analizado en condiciones aerobias y el inóculo I 5 en condiciones anaerobias, por lo que se consideró mantener las mismas condiciones en las que se trabajó.

3.1 Medio de cultivo, cambio de coloración por remoción de cromo.

En la muestra de concentración de 10 mg.L^{-1} sometida a remoción de cromo, provocó un cambio de coloración en el medio de cultivo. En la Figura 3.1 se puede observar este cambio en las 3 repeticiones a los 7 días de incubación (Figura 3.1 a) a comparación de la coloración final a los 30 días de incubación (Figura 3.1 b) cambiando la coloración amarilla.

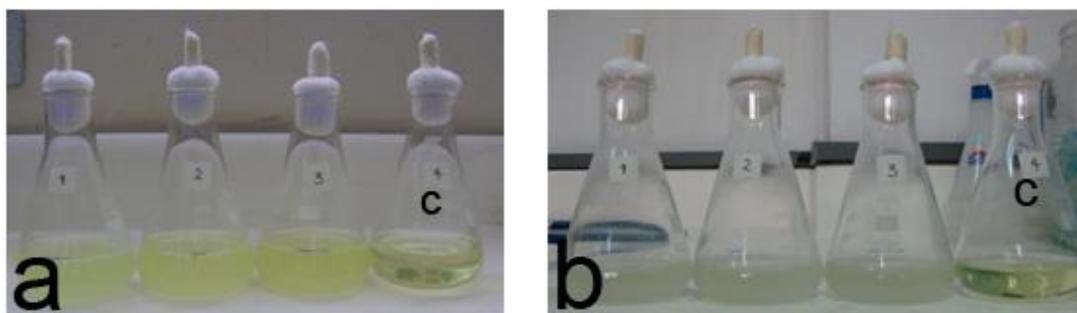


Figura 3.1 Inóculo M 3 con 10 mg.L^{-1} de Cr. (a) 7 días de Incubación (b) 30 días de incubación. C=control

En el Inóculo I 5 en el medio de cultivo con la concentración de 10 mg.L^{-1} hubo cambio de coloración como se observa en la Figura 3.2.

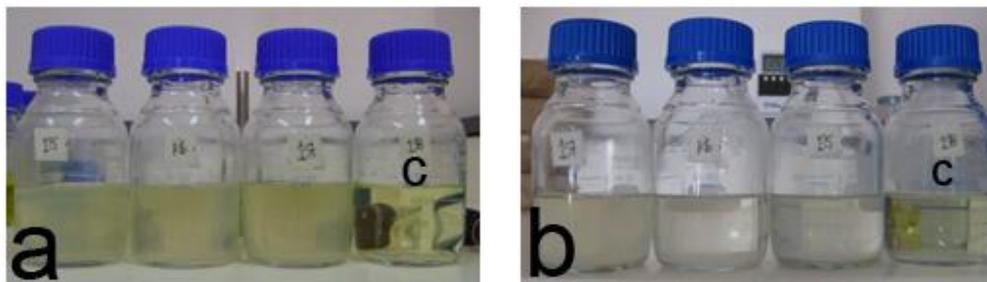


Figura 3.2 Inóculo I 5 con 10 mg.L^{-1} de Cr. (a) 7 días de incubación (b) 30 días de incubación, C= control.

En las concentraciones de 50 mg.L^{-1} y 100 mg.L^{-1} para el inóculo M 3 no se observó un cambio visible de coloración del medio al finalizar el ensayo (Anexo D y E). Para el inóculo I 5 a partir de los 22 días del ensayo en las concentraciones de 50 y 100 mg.L^{-1} se formó un precipitado de color verdoso en éstas dos concentraciones (Anexo F).

3.2 Estandarización del Método para la Determinación de Cromo VI

La Tabla 3.1 muestra los promedios de las cinco repeticiones de la determinación de las absorbancias para cada una de las concentraciones indicadas.

Tabla 3.1 Promedio de las Absorbancias para la elaboración de la curva estándar.

Concentración, mg.L^{-1}	Promedio de absorbancia a 540 nm	Repeticiones
0	0,00620	5
0,04	0,03760	5
0,06	0,05300	5
0,8	0,06640	5
0,1	0,08440	5
0,2	0,15800	5
0,3	0,23640	5
0,4	0,31000	5

La curva estándar que se muestra en la Figura 3.3, se aproximó a la recta con la ecuación $y = 0,76x + 0,006$ y un R^2 de 0,999. La curva estándar se realizó para determinar la concentración de Cr VI en los ensayos.

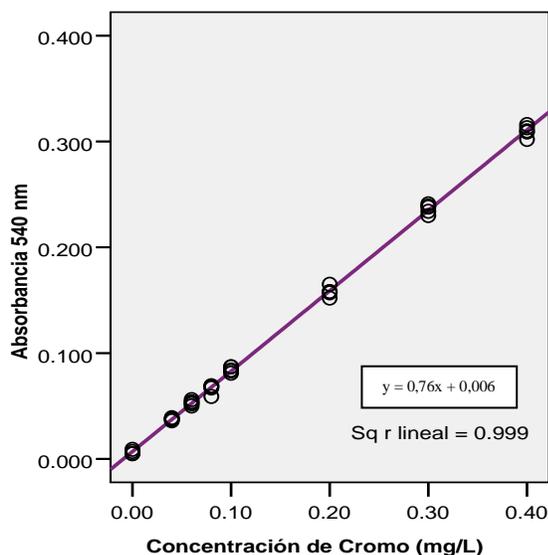


Figura 3.3 Curva estándar para la cuantificación de la concentración de Cr VI.

Para validar estadísticamente los datos obtenidos de la curva estándar, se los analizó con la prueba de Levene (Tabla 3.2). El valor de significancia de la Prueba de Levene (0,400) es mayor que el 5% con lo que se acepta la hipótesis nula de la igualdad de las varianzas poblacionales.

Tabla 3.2 Prueba de igualdad de las varianzas de las absorbancias, medidas para la cuantificación de cromo VI. Variable dependiente: Absorbancia 540 nm

F	gl1	gl2	Significación
1,078	7	32	0,400

3.3 Determinación de Cromo VI

Los inóculos presentaron remoción de cromo en la concentración de 10 mg.L^{-1} tanto para M 3 como para I 5 a los 9 días de incubación. Como se puede observar en la Figura 3.4 los controles también presentaron una remoción de cromo VI, con lo que se sugiere que en el medio de cultivo existe un agente reductor.

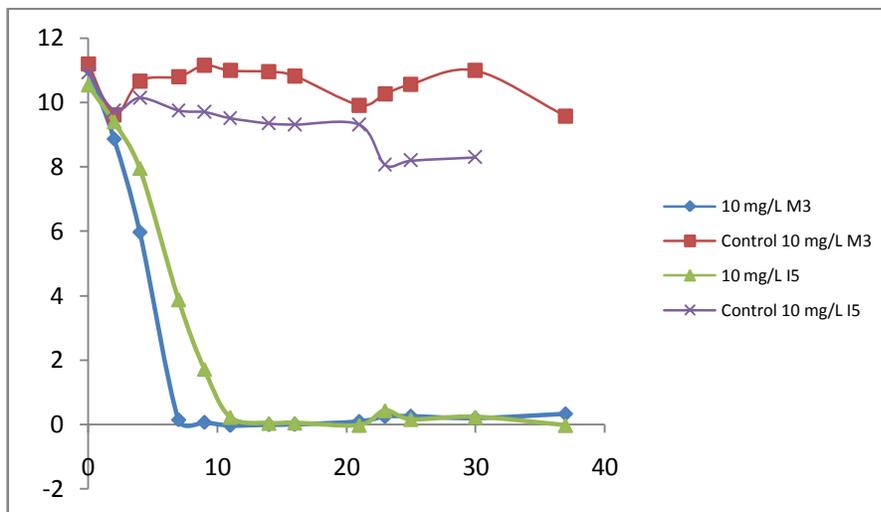


Figura 3.4 Curvas de remoción de cromo VI para los inóculos M 3 e I 5 con sus respectivos controles. Concentración inicial 10 mg.L^{-1} .

En las concentraciones de 50 mg.L^{-1} y 100 mg.L^{-1} , los inóculos no presentaron remoción. En la Figura 3.5 (a) se muestra el comportamiento para el inóculo I 5 y en la Figura 3.5 (b) para el inóculo M 3, cada concentración se presenta con su respectivo control.

Los tratamientos que contenían las bacterias poseen un comportamiento igual a los controles en cuanto a la concentración de cromo.

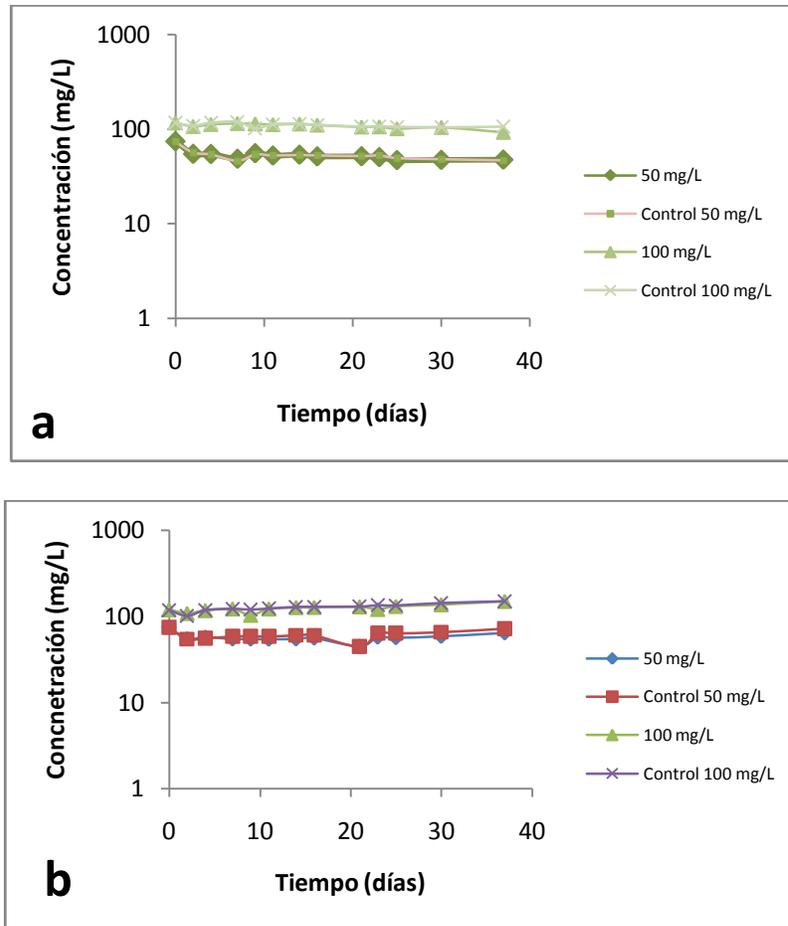


Figura 3.5 Curvas de remoción de cromo VI a concentraciones de 50 y 100 mg.L⁻¹ con sus respectivos controles (a) Inóculo I 5 (b) Inóculo M 3.

Debido a que los inóculos no presentaron remoción de cromo en concentraciones de 50 y 100 mg.L⁻¹, se analizaron estadísticamente los datos obtenidos para la concentración de 10 mg.L⁻¹, comparando los dos consorcios en términos de porcentajes de remoción, realizándose un ANOVA y pruebas Tukey, los que serán indicados más adelante.

En la Figura 3.6 se muestra visualmente el cambio de color de Cr VI a los 9 días para la concentración de 10 mg.L⁻¹. En éste método, el color es directamente proporcional a la concentración de Cr VI, es por ello que los tubos control mostraron un color fucsia a lo largo del ensayo, mientras que las repeticiones de 10 mg.L⁻¹ la coloración disminuyó a medida que la concentración de Cr VI disminuía.

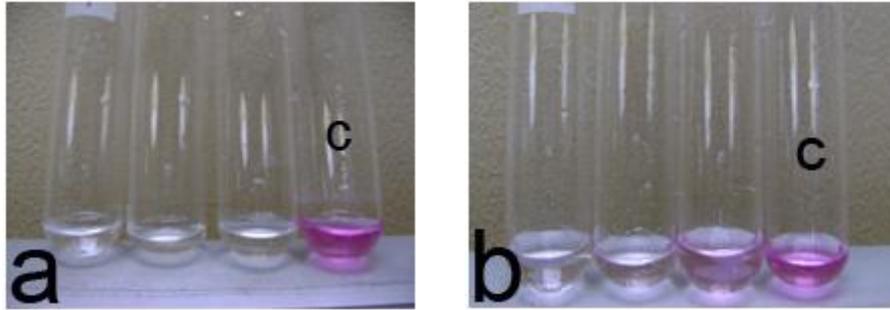


Figura 3.6 Remoción de cromo VI a los 9 días (a) Inóculo M 3 (b) Inóculo I 5. C= control.

A los 9 días se observó la remoción de Cr VI, en éste día alcanzan un porcentaje de remoción de 98% para M 3 y un 83% para I 5; pero en el día 16 es donde los dos inóculos llegan a remover un 98% de Cr VI, constituyendo el máximo porcentaje de remoción de Cr VI, manteniéndose así hasta el día 30 (Figura 3.7).

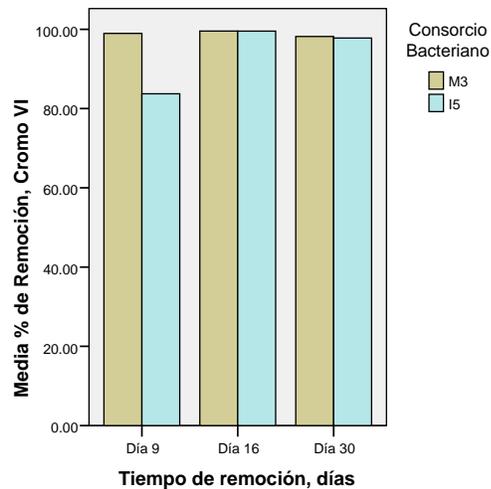


Figura 3.7 Porcentaje de remoción de cromo VI vs. Tiempo (días) realizado por los inóculos M3 e I5 para la concentración de 10 mg.L^{-1} .

El análisis de varianza (Tabla 3.3), muestra una significancia mayor que el 5%, existiendo significancia estadística, esto indica que las varianzas de los porcentajes de remoción son iguales y se acepta la hipótesis nula.

Tabla 3.3 Análisis de Varianza para la variable Porcentaje de Remoción de cromo VI.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	FV	Sig.
Inter-grupos	228,734	3	76,245	2,186	,121
Intra-grupos	697,572	20	34,879		
Total	926,306	23			

La Tabla 3.4 muestra la prueba Tukey realizada a los datos de porcentaje de remoción de Cr VI para I 5 y M 3, se confirma que los datos son estadísticamente iguales dado que se agrupan en un solo conjunto. Los promedios de porcentajes de remoción, con un 95% de confianza, son iguales en los días analizados.

Tabla 3.4 Prueba de Tukey para la variable Porcentaje de remoción de Cr VI frente al factor Tiempo en días.

HSD de Tukey

Tiempo de remoción, días	N	Subconjunto para alfa = .05
		1
Día 9	6	91,3607
Día 44	6	96,8037
Día 30	6	98,0006
Día 16	6	99,5634
Sig.		0,108

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.
 a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000.

3.4 Determinación de Cromo Total

Los datos se obtuvieron en el Equipo de Absorción Atómica (VARIAN AA240FS), las absorbancias dadas fueron corregidas de acuerdo al factor de dilución para conseguir la concentración de Cr.

En la Figura 3.8 se muestra la curva de la disminución de la concentración de cromo total para la concentración inicial de 10 mg.L^{-1} realizada por los dos inóculos, el inóculo I 5 es el que presenta remoción de cromo total llegando aproximadamente a 3 mg.L^{-1} .

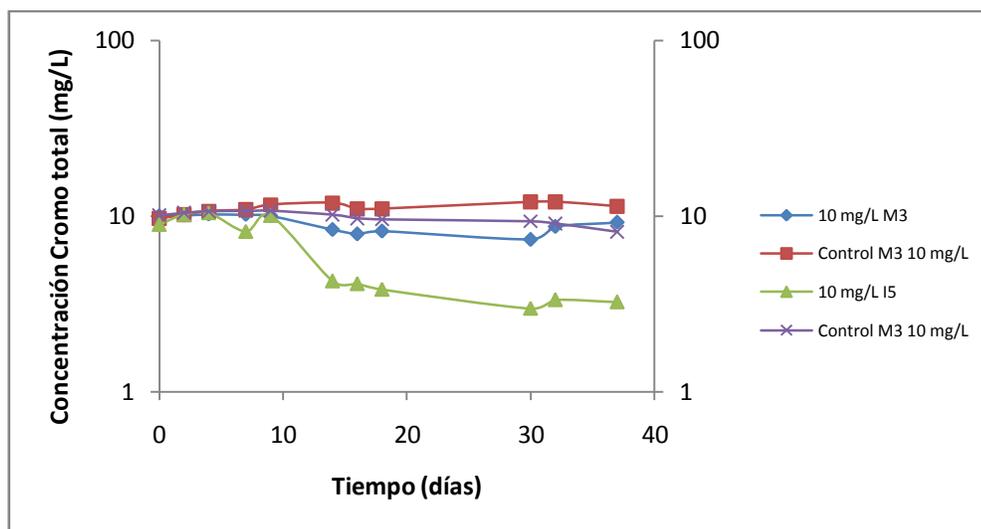


Figura 3.8 Disminución de la concentración de cromo total para los inóculos M 3 e I 5 con sus respectivos controles. Concentración inicial 10 mg.L^{-1}

Los consorcios bacterianos redujeron la concentración de 10 mg.L^{-1} en un porcentaje de remoción para cromo total de 26% en el caso de M 3 (aproximadamente) y un 67 % para I 5 a los 30 días de incubación. El inóculo más eficiente para la remoción de cromo total es el inóculo I 5 (Figura 3.9).

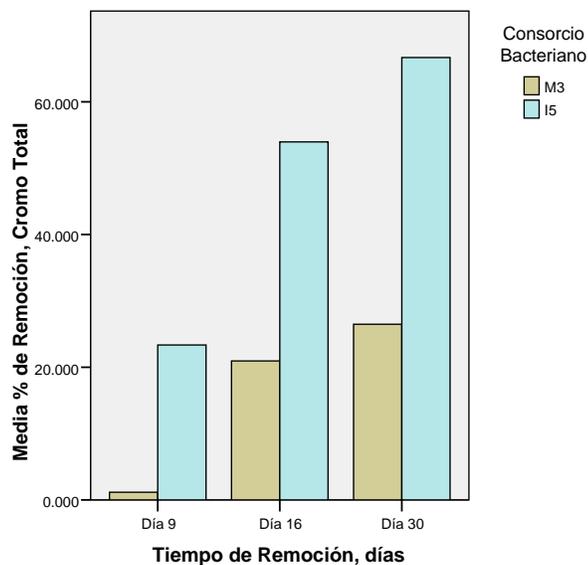


Figura 3.9 Porcentaje de remoción de cromo total vs. Tiempo (días) de los inóculos M3 e I5 para la concentración de 10 mg.L⁻¹.

El análisis de varianza (ANOVA) tiene una significancia estadística (0,041) lo que indica que los datos son significativamente diferentes, con porcentajes de remoción de cromo total, diferentes para los dos inóculos (Tabla 3.5)

Tabla 3.5 Análisis de Varianza para la variable Porcentaje de Remoción de cromo Total.

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	3790,599	2	1895,299	3,993	0,041
Intra-grupos	7119,904	15	474,660		
Total	10910,503	17			

Los grupos Tukey muestran que no existe diferencia significativa entre los días 16 y 30 para el porcentaje de remoción de cromo total, lo que quiere decir que con el 95% de confianza no hay diferencia estadística para los porcentajes de remoción en estos días.

Por otro lado, la remoción día 9 difiere de los días 16 y 30 pues se encuentra en otro subgrupo dentro del análisis de Tukey (Tabla 3.6).

Tabla 3.6 Prueba de Tukey para la variable Porcentaje de remoción de cromo total del factor Tiempo en días.

DHS de Tukey

Tiempo de Remoción, días	N	Subconjunto	
		2	1
Día 9	6	12,25833	
Día 16	6		37,45667
Día 30	6		46,57000
Significación		1,000	0,512

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 193,585.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6,000

b Alfa = 0,05.

3.5 Tinción Gram de los Inóculos

Se realizó una Tinción Gram a los inóculos madre, en el inóculo I 5 se encontró en su mayoría bacilos Gram negativos, como lo muestra la Figura 3.10.



Figura 3.10 Tinción Gram. Lente 100X. Morfología del inóculo I5 al microscopio óptico. **(a)** Inóculo inicial I 5 (las flechas indican bacilos) **(b)** Inóculo I 5 con 10 mg.L⁻¹ de Cr luego de incubación.

En la tinción Gram realizada al inóculo madre M 3 se observó bacilos Gram negativos y levaduras como se indica en la Figura 3.11 a, e igualmente se realizó una tinción Gram luego de la incubación, se observó que el inóculo M 3 sufre cambios con la exposición al Cr, como lo muestra la figura 3.11 b con 10 mg.L⁻¹ de Cr y 3.11 c con 50 mg.L⁻¹ de Cr.

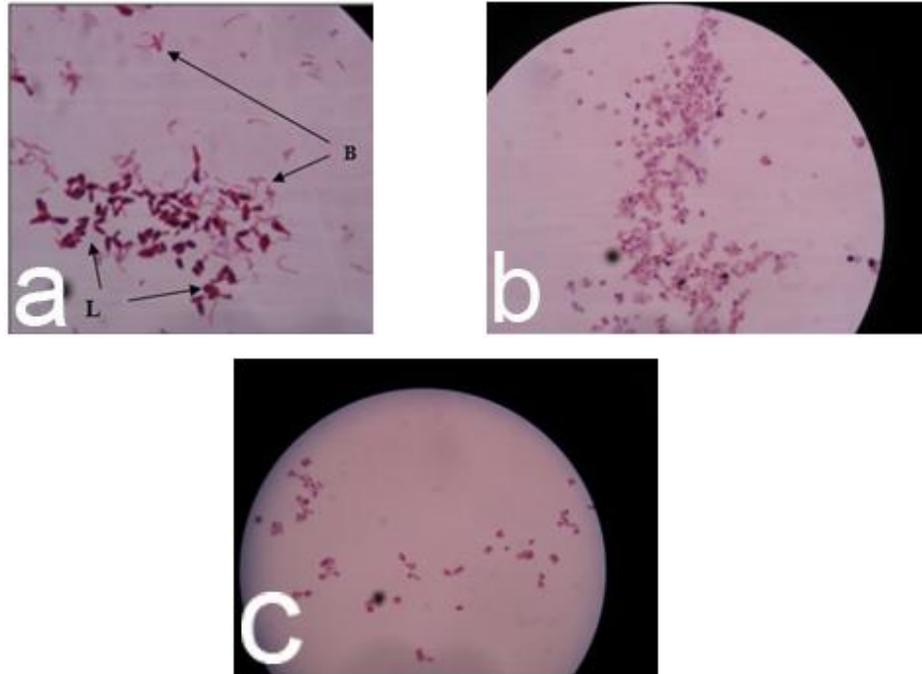


Figura 3.11 Tinción Gram 100 X. Morfología del inóculo M 3 al microscopio óptico. (a) Inóculo inicial M 3 (B=bacilos. L=levaduras) (b) Inóculo M 3 con 10 mg.L^{-1} de Cr a los 40 días de incubación. (c) Inóculo M 3 con 50 mg.L^{-1} de Cr a los 40 días de incubación.

3.6 Adsorción por biomasa muerta

Para evaluar la remoción de cromo, también se realizaron pruebas con la biomasa muerta proveniente de los mismos consorcios I 5 y M 3. Una vez obtenidas en la cantidad necesaria para el ensayo, se utilizó la biomasa en cinco concentraciones 2, 10, 20, 35 y 50 mg.L^{-1} en un tiempo de 2 h con agitación continua a 150 rpm y pH 2. Cada unidad experimental contenía 1 g.L^{-1} (biomasa/agua sintética).

La Figura 3.12 muestra los viales en los cuales se tomó la muestra y se centrifugó, se puede observar el pellet que corresponde a la biomasa y su coloración amarilla que se debe a la adsorción del cromo. A medida que transcurre el tiempo, el porcentaje de remoción no es estable.

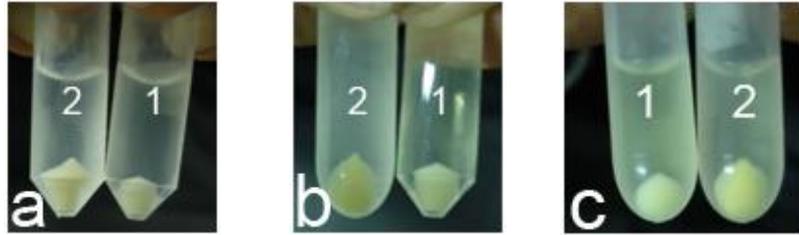


Figura 3.12 Viales después de centrifugación. (a) 10 mg.L⁻¹ (b) 35mg.L⁻¹ (c) 50mg.L⁻¹. 1=M3; 2=I5.

En la Figura 3.13 se observa la tendencia de remoción del Inóculo M3 para cada concentración, se ve un comportamiento variable a lo largo del tiempo.

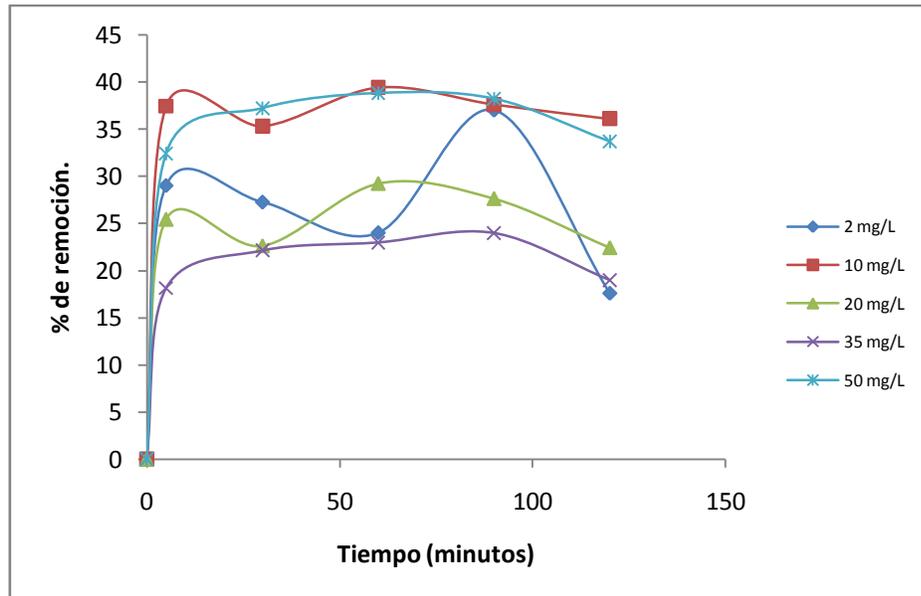


Figura 3.13 Porcentaje de Remoción de cromo realizada por la biomasa del Inóculo M3. Tiempo 120 minutos, pH=2, Temp.35°C, 150 rpm.

Mientras que el inóculo I 5 (Figura 3.14) muestra un comportamiento más estable en la capacidad de adsorción a lo largo del tiempo (120 min).

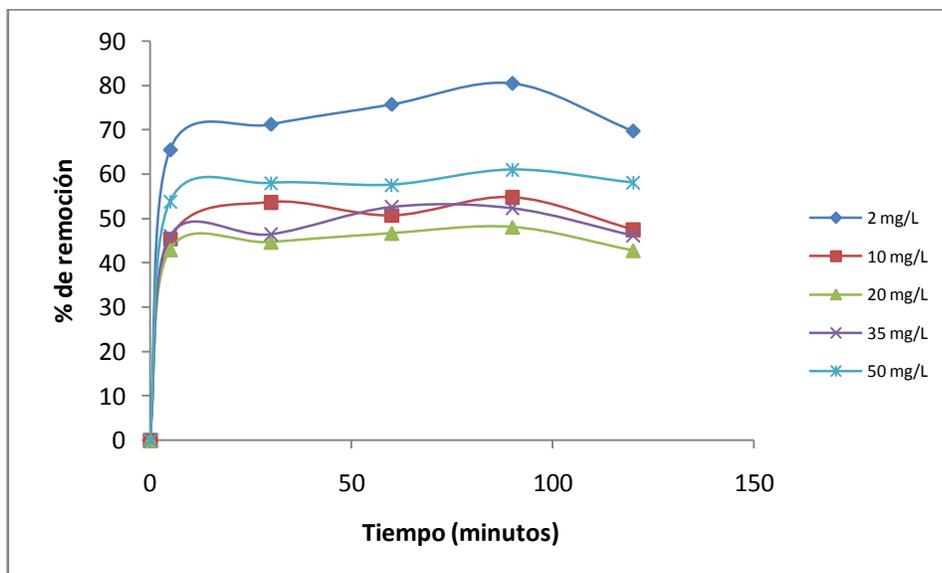


Figura 3.14 Porcentaje de Remoción de cromo realizada por la biomasa del Inóculo I5. Tiempo 120 minutos, pH=2, Temp.35°C, 150 rpm.

Para el análisis estadístico de la remoción de cromo por biomasa se tomó un modelo factorial de 2x5 (inóculo*concentración inicial) con tres repeticiones cada una.

El análisis de varianza realizado para el diseño experimental con respecto al factor biomasa se tiene un $p=1,0789E-20$ (Tabla 3.7) lo que indica que se acepta la hipótesis alternativa que dice que al menos un tipo de biomasa utilizada es diferente, es decir que uno de los dos consorcios es el más adecuado para la remoción de cromo, al igual, la concentración inicial de cromo posee un valor p de $1,5381E-11$ (Tabla 3.5), lo que indica que la concentración de cromo inicial tiene un efecto para la remoción de cromo.

Tabla 3.7 Análisis de varianza para la variable Porcentaje de Remoción de Cromo realizado por la biomasa.

<i>FV</i>	<i>SC</i>	<i>GI</i>	<i>CM</i>	<i>F</i>	<i>P(significación)</i>
Biomasa	5514,27103	1	5514,27103	1649,43064	1,0789E-20
[Cr] ₀	951,615347	4	237,903837	71,161877	1,5381E-11
B*[Cr]	1387,37935	4	346,844837	103,748346	4,4496E-13
Error	66,8627211	20	3,34313606		
Total	7920,12844	29			

Mediante la prueba Tukey (Tabla 3.8), se obtuvo que el porcentaje de remoción tanto para la concentración de 2mg.L^{-1} y para la de 50mg.L^{-1} se encuentran en un solo grupo, para estas concentraciones se tiene un mayor porcentaje de remoción y se sitúan en el primer grupo con 43% y 45% de remoción respectivamente.

Tabla 3.8 Grupos Tukey para el Porcentaje de remoción realizado por la biomasa.

[Cr] ₀	Grupos Tukey		
	1	2	3
35 mg.L-1	32,6		
20 mg.L-1	32,6		
10 mg.L-1		41,8	
2 mg.L-1		43,7	43,7
50 mg.L-1			45,9

En la figura 3.15 se indica el porcentaje de remoción de los inóculos utilizados (M 3 e I 5) para cada una de las concentraciones experimentadas. Se puede observar que I 5 tiene el mayor porcentaje de remoción de cromo en la concentración de 2 mg.L^{-1} con un 70% de remoción, mientras que M 3 tiene un 18% en ésta misma concentración. Los más bajos porcentajes de remoción para los dos inóculos son para las concentraciones de 20 y 35 mg.L^{-1} . Para la concentración de 50 mg.L^{-1} se tiene un 58 % de remoción para I 5 y 34% para M 3.

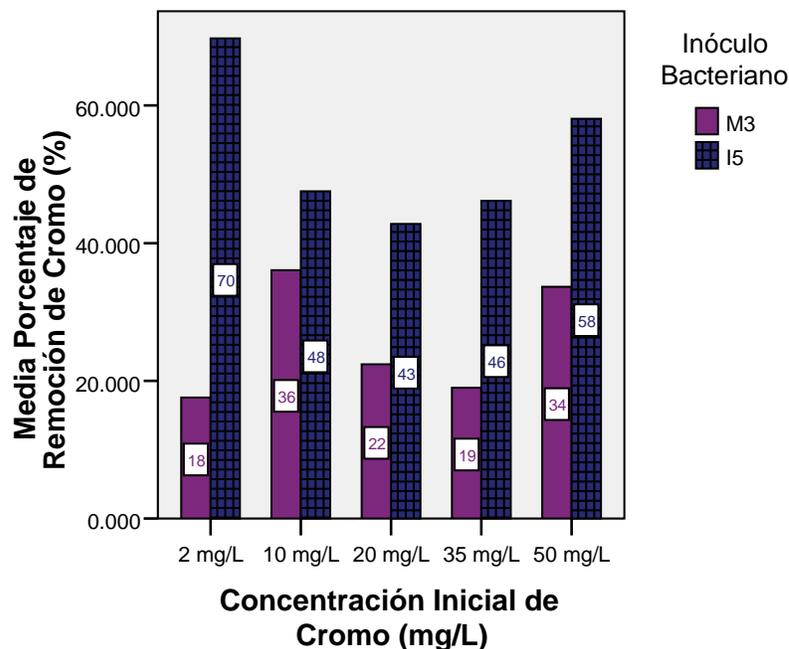


Figura 3.15 Porcentajes de remoción de los inóculos por cada concentración.

3.7 Conteo Bacteriano por Siembra Profunda.

Se realizó las curvas de crecimiento para I 5 y M 3 las cuales se construyeron con los datos obtenidos por siembra profunda a partir del primer día, el consorcio no contenía fuente de Cr en el medio de cultivo. En la Figura 3.16 se puede observar la curva de crecimiento para los dos consorcios bacterianos. La curva de crecimiento nos da a conocer la tendencia de crecimiento de los inóculos sin fuente de Cr para M 3 a 35°C y 150 rpm, e I 5 a 35°C en condiciones anaerobias.

Al inicio del ensayo se tiene un rápido crecimiento de los inóculos pues alcanzan un orden de 10^7 a 10^8 a los 2 días. El inóculo M 3 es el que tiene una fase de latencia prolongada y decae fuertemente al día 18.

Mientras que el inóculo I 5 mostró en éste ensayo un crecimiento y decaimiento de la concentración.

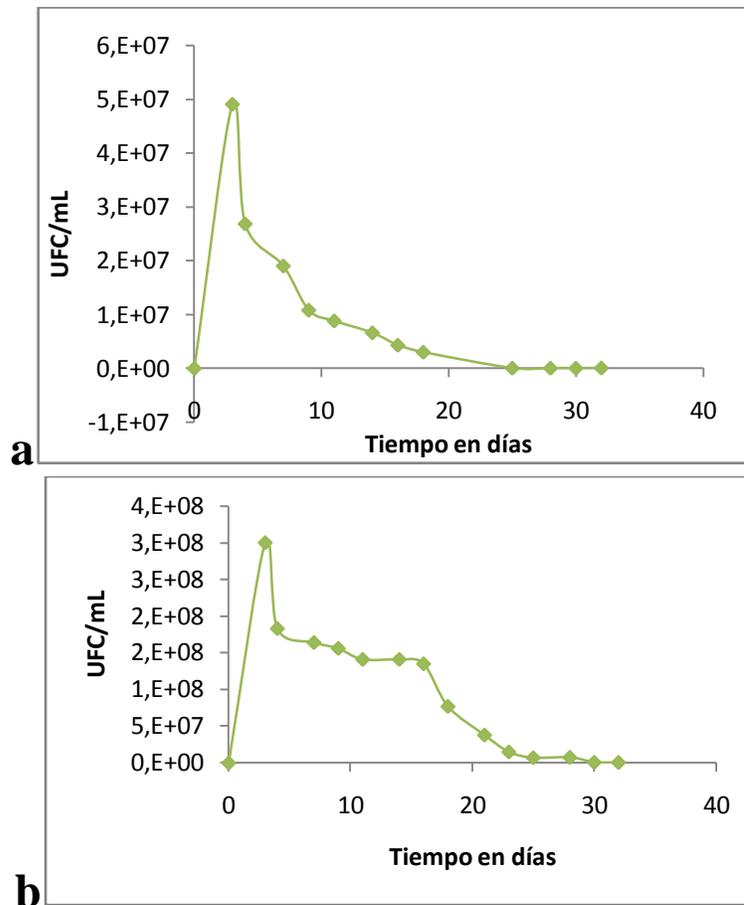


Figura 3.16 Curva de crecimiento de los inóculos sin fuente de cromo (a) I5 a 35°C (b) M3 a 35°C y 150 RPM.

Los dos inóculos tienen un crecimiento diferente, se debe tomar en cuenta que las bacterias que se contabilizaron para la tendencia de crecimiento del consorcio fueron bacterias que crecieron en agar conteo a 35°C a las 48 horas, es decir las bacterias con las cuales se realizaron las curvas son bacterias mesófilas, aerobias facultativas heterótrofas.

También se realizó la curva de crecimiento para el inóculo M 3 con 10 mg.L⁻¹ de cromo, (Figura 3.17) en la que se puede observar que existe una disminución de la concentración bacteriana entre el día 5 y 10, con respecto a la curva control.

En la Figura 3.17 muestra el crecimiento bacteriano de M3 con la disminución de la concentración de Cr VI, se observa que, cuando existe mayor crecimiento de bacterias empieza a decaer la concentración de Cr y que cuando se mantiene estable la concentración de bacterias, también lo hace la concentración de Cr VI.

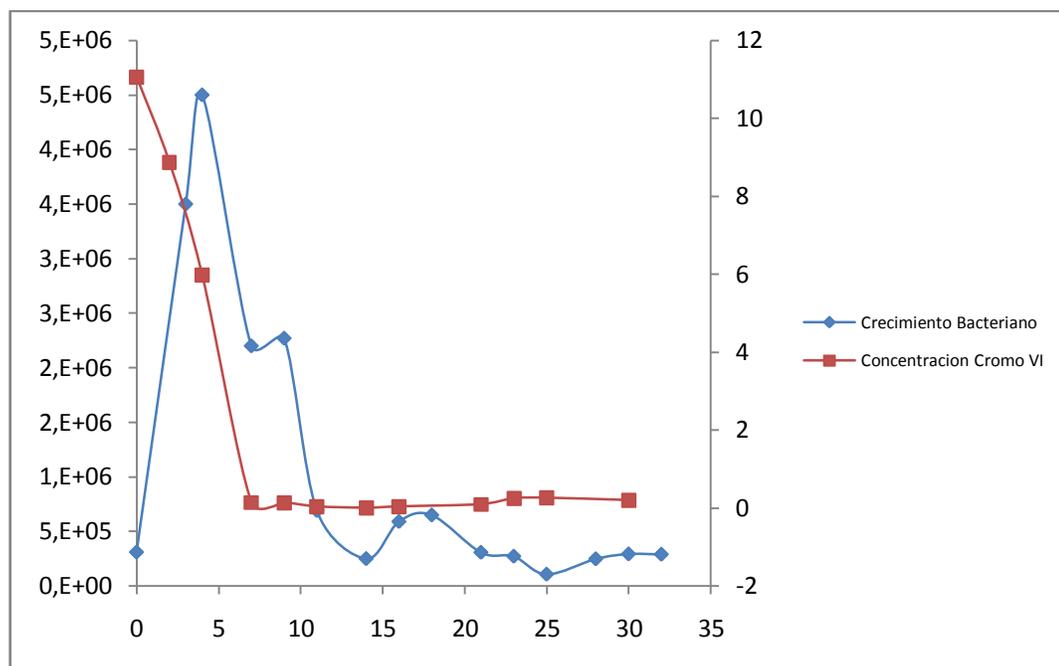


Figura 3.17 Curva de Crecimiento del Inóculo M3 a 35°C, 150 rpm con 10 mg.L⁻¹

CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN

4.1 La biotecnología en la remoción de cromo.

Esta investigación se orientó a la evaluación de la capacidad de remoción de Cr con dos consorcios bacterianos nativos compuestos, tanto con células vivas como con células muertas con la finalidad de investigar su comportamiento para la aplicación de un tratamiento biológico en la remediación de aguas residuales textiles.

Los tratamientos convencionales físico-químicos para la remediación de metales incluyen: precipitación química, métodos de oxidación y reducción, filtración, tratamiento electroquímico, ósmosis inversa, intercambio iónico, cementación, electro-diálisis, tecnologías de membrana, entre otras; éstos métodos generalmente requieren el uso de reactivos costosos, específicos e ineficientes a bajas concentraciones de metales ($<100 \text{ mg.L}^{-1}$), los cuales producen lodos tóxicos u otros subproductos de desecho (Sannasi *et al.*, 2006). Además los procesos convencionales para remover los metales de efluentes industriales pueden ser inefectivos o extremadamente costosos especialmente cuando se encuentran en solución en un rango de $1-100 \text{ mg.L}^{-1}$ (Baral *et al.*, 2008; Zahoor y Rehman, 2009). Como se mencionó antes dichos métodos no son efectivos a bajas concentraciones tornándose altamente costosos y de bajo rendimiento a condiciones reales (Cuiziano y Navarro, 2008); por lo tanto es importante el desarrollo de métodos innovadores que tengan bajo costo y sean amigables con el ambiente para la eliminación de metales tóxicos de las aguas residuales.

En el presente trabajo se llevó a cabo la investigación con dos consorcios bacterianos nativos compuestos (I 5 y M 3) que estuvieron expuestos a efluentes textiles.

Para la remoción de metales pesados en concentraciones bajas, los métodos convencionales son ineficientes y costosos. A estas concentraciones bajas, 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. Los microorganismos y sus productos pueden ser bioacumuladores muy eficientes (Cañizares, 2000).

4.2 Consorcios Bacterianos.

Una vez aislados los inóculos se los mantuvo en condiciones de laboratorio y se los utilizó para someterlos a la exposición al cromo. Al trabajar con consorcios bacterianos, los microorganismos pueden combinar sus rutas metabólicas para degradar completamente el contaminante; es decir, se puede dar una combinación de reacciones entre los microorganismos de los consorcios (Moncayo, 2010).

La supervivencia y estabilidad de las bacterias son mejores cuando éstos son presentados como un cultivo mixto. Esto se debe a que cada cepa tiene diferencias significativas, tanto fisiológica como metabólicamente y las respuestas a la resistencia por cada una de ellas hacia los metales generan una adaptación y una población más invulnerable a través del intercambio genético entre las cepas que se encuentran presentes (Sannasi *et al.*, 2006).

Una amplia variedad de microorganismos como bacterias, levaduras, algas, protozoos y hongos se encuentran en aguas que reciben efluentes industriales. Éstos microorganismos han desarrollado la capacidad de protegerse ellos mismo de la toxicidad de los metales pesados mediante varios mecanismos tales como la adsorción, metilación, alojamiento, oxidación y reducción (Zahoor & Rehman, 2009).

Los microorganismos aislados a partir de ecosistemas contaminados, retienen los metales pesados presentes en agua en tiempos relativamente cortos al entrar en contacto con soluciones de dichos metales, minimizando los costos en un proceso de remediación (Cuiziano y Navarro, 2008). Los inóculos aislados respondieron a la concentración de 10 mg.L⁻¹, y no soportaron las otras concentraciones, lo que nos indica que los inóculos no estuvieron expuestos a tales cantidades de cromo en el lugar de la toma de muestra.

4.3 Determinación de cromo VI.

Varios mecanismos bacterianos de resistencia al cromato han sido reportados (Ramírez *et al.*, 2008). La respuesta celular a la presencia de metales incluye varios procesos como la biosorción por la biomasa celular, transporte celular activo, uniones por moléculas del citoplasma, precipitación y reacciones de óxido-reducción (Zahoor y Rehman, 2009). Actualmente, los procesos biotecnológicos presentan un gran interés por la variedad de métodos detoxificantes de metales pesados, dentro de éste contexto, la biotecnología posee dos grandes áreas para el mismo objetivo como son la bioacumulación y la biosorción (Cuiziano y Navarro, 2008).

En la investigación llevada a cabo y según las mediciones de cromo obtenidas, los microorganismos de los consorcios, reducen primero el Cr VI a otro estado de oxidación, posiblemente a Cr III fuera de la célula, puesto que con los métodos utilizados se detectó que baja la concentración, primero en términos de Cr VI y luego en cromo total, por lo tanto las bacterias utilizan métodos de reducción y luego por alguna otra vía toman el cromo. Aquí posiblemente son responsables los microorganismos que han terminado su ciclo de vida, utilizando la adsorción. Sin embargo a pesar de que en los dos consorcios ocurrió lo mismo, las condiciones anaerobias ayudaron a remover mayormente el cromo total de la solución acuosa, esto puede deberse a que el Cr VI es usado principalmente en estas condiciones como aceptor de electrones.

Los mejores mecanismos caracterizados comprenden la salida de iones cromato del citoplasma de la célula y la reducción de Cr VI a Cr III según Ramírez *et al.*, 2008.

Un amplio rango de bacterias ha sido identificado con capacidad de llevar a cabo una completa reducción de Cr VI a Cr III por reacciones de óxido-reducción de naturaleza biótica y abiótica. Tres mecanismos de reducción han sido descritos:

- i) En condiciones aeróbicas, la reducción de cromato ha sido comúnmente asociada con reductasas que usan NADH o NADPH como cofactores y donadores de electrones.

- ii) En anaerobiosis, algunas bacterias, como *Pseudomonas fluorescens* y *Enterobacter cloacae*, pueden usar Cr VI como un aceptor de electrones en la cadena de transporte de electrones (Akmar *et al.*, 2007; Ramírez *et al.*, 2008)
- iii) Reducción de Cr VI también puede ser llevada a cabo por reacciones químicas asociadas con compuestos tales como aminoácidos, nucleótidos, azúcares, vitaminas, ácidos orgánicos o glutatión. Como por ejemplo, el ascorbato el cual es capaz de reducir Cr VI (Ramírez *et al.*; 2008).

En microorganismos como *Pseudomonas*, *Enterobacter* y *Agrobacterium*, la reducción de cromato se encuentra bien documentada.

4.4 Tinción Gram de los inóculos.

La observación al microscopio óptico nos proporcionó una idea básica de los microorganismos expuestos al cromo, se debería utilizar herramientas que puedan proporcionar imágenes más reales para demostrar el daño o alteraciones de la pared celular o de la forma de los microorganismos del consorcio.

Al realizar las tinciones de los inóculos expuestos al cromo, se observaron bacilos Gram negativos y levaduras con lo que se podría decir que los inóculos se seleccionaron debido a las condiciones expuestas.

Las levaduras son microorganismos eucariotas adecuados para la investigación, ya que son capaces de acumular cromo desde soluciones acuosas y almacenarlas dentro de ellas (Pas *et al.*, 2004). Dentro de los microorganismos que se encuentran en los consorcios madre observados mediante tinción y microscopio óptico, se encuentran levaduras, en mayor cantidad en el inóculo M3 ya que éste fue aislado del suelo.

Según Pas *et al.* (2004) en cuya investigación observaron el efecto del Cr III y Cr VI sobre la morfología de las células en la levadura *Candida intermedia*, asegura que el efecto causado por el 10 mM de Cr III a las 12 h, inhibió fuertemente el crecimiento de la

levadura y consecuentemente afecta las propiedades morfológicas, especialmente en la forma de las células y de las células hijas, ya que éstas luego de la exposición al cromo poseen una forma tubular con conexiones alargadas, mientras que las levaduras que crecieron sin cromo aparecen en parejas y cadenas cortas, como resultado de la partición bipolar.

Igualmente Muter *et al.* (2001) reporta algunos cambios similares en las células de la levadura *Candida utilis* que creció en presencia de Cr VI de 2 a 6 mM, quienes atribuyen los cambios al daño de la pared celular.

Es conocido que las células de las membranas son impermeables al Cr III, mientras que el Cr VI ingresa en la mayoría de las células microbianas en la forma de iones cromato (CrO_4^{2-}) y dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) a través del mecanismo de transporte de aniones fisiológicamente importantes de estructura similar como son los iones de sulfato SO_4^{2-} o fosfato PO_4^{3-} . Aunque los mecanismos de recepción en las levaduras de Cr III y Cr VI no han sido completamente aclaradas (Pas *et al.*, 2004).

Al realizar las tinciones Gram de los inóculos madre se pueden observar una forma definida de los microorganismos del consorcio, luego de la exposición al cromo se observó un cambio morfológico de las células presentes, sean éstos bacilos o levaduras, pierden su forma inicial y toman una forma redondeada, siendo difícil distinguir en las tinciones lo que coincide con lo reportado por Muter *et al.*, (2001) en el que demuestra que el incremento en el medio de cromo de 50 a 100 mg.L^{-1} , dio lugar a una inhibición significativa del crecimiento celular en la levadura *Candida utilis*. Además en esta investigación se da a conocer que los daños pueden darse en la estructura superficial y en la forma de la célula (alargamiento) en la exposición a 100-300 mg.L^{-1} de Cr.

Posiblemente el cromo causa un daño en las estructuras celulares de los consorcios. Además parecen perder la capacidad para ser teñidas.

El crecimiento de los inóculos I 5 y M 3 fue inhibido a concentraciones de 50 mg.L^{-1} y 100 mg.L^{-1} , al igual que Muter *et al.*, (2001), puede atribuirse al daño en el glucano que es el responsable de la forma de la célula y en el complejo manano-proteína.

4.5 Efecto de las concentraciones en la remoción de cromo.

Los consorcios bacterianos evaluados en la presente investigación, lograron remover el cromo desde una concentración inicial de 10 mg.L^{-1} , las otras dos concentraciones a las cuales fueron expuestas (50 y 100 mg.L^{-1}) resultaron inhibitorias y letales para los consorcios bacterianos I 5 y M 3, al igual que Liu *et al.*, (2006) quien reportó que el crecimiento de *Bacillus sp.* fue significativamente afectada por la concentración de 100 mg.L^{-1} .

Sin embargo, en el trabajo realizado por Zahoor y Rehman (2009) en *Bacillus sp.* JDM-2-1 y *Staphylococcus capitis* lograron reducir Cr VI (100 mg.L^{-1}) del medio un 85% y 81% a las 96 h respectivamente, también estas mismas bacterias fueron capaces de reducir un 86% y 89% de Cr VI después de 144 h de incubación directamente del efluente industrial.

Para Liu *et al.* (2006), las concentraciones de 5, 10 y 20 mg.L^{-1} tiene un escaso impacto en el crecimiento de las células de *Bacillus sp.*, a partir de 40 mg.L^{-1} se observó inhibición en el crecimiento y que además la glucosa promovió la reducción de Cr VI al igual que Wang *et al.* (1998) encontró en su investigación que la glucosa también originó la reducción de Cr VI realizada por *Penicillium sp.*

Muneer *et al.* (2009) en su investigación utilizó tres tipos de microorganismos para remover $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de Cr VI, bacteria *Bacillus thuringiensis*, levadura *Candida etchellsii*, y con el protozoo *Stylonychia mytilus*, aislados desde aguas residuales de industrias, los cuales fueron evaluados individualmente y en diferentes combinaciones, obteniendo que la bacteria tuvo un porcentaje de remoción de 82%, la levadura de 80% a las 72 h de incubación y el protozoo 60% a las 96 h. En el caso de la combinación de organismos, la bacteria y levadura removieron 78% del metal a las 48 h, la levadura y protozoo 82%, la bacteria y protozoo 82% y por último la bacteria, levadura y protozoo 90% a las 96 h.

En el trabajo realizado por Haq y Shakoori (1998), también se obtuvieron porcentajes de remoción altos con levaduras, una de las dos levaduras aisladas mostró 74%,

90% y 98% de reducción en el medio en 48, 72 y 96 h, respectivamente mientras que la segunda cepa utilizada mostró reducción del 2%, 26% y 98% en 48, 72 y 96 h, respectivamente.

La mezcla de microorganismos tiene mayor porcentaje de remoción de cromo VI, como sucedió en ésta investigación en la que, utilizando los consorcios bacterianos nativos compuestos, se tiene porcentajes significantes de remoción de cromo para 10 mg.L^{-1} .

El pH con el que se trabaje, debe ayudar tanto a las soluciones químicas del cromo y a los inóculos bacterianos. Es decir se debe adecuar el pH con el fin de utilizarlos en la remediación de efluentes industriales de este metal pesado.

Se trabajó con un pH 6 para iniciar la biorremoción de cromo debido a que los inóculos bacterianos fueron probados anteriormente a este pH removiendo porcentajes significativos con respecto a colorantes, las grandes diferencias en la biorremediación se da en encontrar las condiciones óptimas para cada microorganismo principalmente con lo referente al valor de pH, Lui *et al.* (2006) sugiere que la modificación de este valor es importante en los diferentes cultivos para lograr una reducción máxima de cromo en la biorremediación del cromato.

4.6 Adsorción de Cr por biomasa muerta.

Para la remediación de los metales pesados, se han utilizado un sin número de biomateriales para la adsorción; con respecto al cromo se han investigado los comportamientos de hongos, algas, bacterias; además las técnicas de la microscopía electrónica y la espectroscopía han ayudado para conocer los grupos funcionales que exponen los diferentes microorganismos y la forma de actuar con las especies de cromo (Ochie *et al.*, 2008).

La bioadsorción es una propiedad de la biomasa, en particular de la microbiana, de inmovilizar y concentrar metales en soluciones acuosas (Brady y Tobin, 1995; Volesky y May-Philips, 1995; López *et al.*, 2000) es la primera etapa de acumulación de metales se

trata de la adsorción del metal sobre la pared celular independientemente del metabolismo (Carmona *et al.*, 2005), los componentes de la superficie celular que actúan como bioadsorbentes son polímeros estructurales y extracelulares con un alto contenido de grupos funcionales, que interactúan con los metales atrapándolos dentro de su estructura (Suárez y Reyes, 2002).

Ochie *et al.* (2008) menciona una técnica que se desarrolló para la recuperación de Cr VI desde agua residual usando bolas magnéticas bio-funcionales, en este trabajo, los resultados de la espectroscopía Infra-Roja muestra que los grupos $-\text{NH}^{3+}$, $-\text{NH}^{2+}$, y NH -juegan un papel muy importante en la adsorción de Cr VI. Por otro lado, Das & Guha (2007) examinaron la biosorción de Cr VI sobre especies de hongos (*Termitomyces clypeatus*), ellos afirmaron que los grupos amino, carboxilo, hidroxilo y grupos fosfato forman enlaces químicos con el ion cromato.

La biomasa fue tratada en autoclave a 121°C y 15 psi, aunque existen otros tratamientos que pueden realizarse en la biomasa. Se escogió éste tratamiento (autoclavado) debido a que de ésta manera existe una lisis completa de las células permitiendo una mayor exposición de grupos funcionales, como lo demuestra en la investigación de Espíndola (2009) en el cual se realizó la adsorción de arsénico por cianobacterias dando un mejor porcentaje de adsorción aquellas que fueron sometidas a tratamiento con autoclave.

Por otro lado también Abbas *et al.* (2008) menciona que las modificaciones físicas de la biomasa como el calor y tratamiento con autoclave reduce la biosorción de Cr III y Cr VI, la cual puede atribuirse a la pérdida de la captación intracelular.

La biomasa puede remover, en menor tiempo, concentraciones del metal sin necesidad de un medio de cultivo, resultando una técnica económica y en la que se puede utilizar varios tipos de biomasa como adsorbentes, los cuales son mucho más económicos. Sin embargo, se debe experimentar con las condiciones para así encontrar las adecuadas que favorezcan la remoción del metal. El pH es un parámetro muy importante para realizar una eficaz adsorción. En esta investigación se experimentó con la biomasa de los consorcios y según los datos obtenidos la biomasa de los inóculos I 5 y M 3 son un potente producto para llevar a cabo la adsorción de cromo.

La interacción inicial entre los microorganismos y los metales ocurre por atracción electrostática entre los iones cargados en solución y los grupos funcionales de la superficie celular microbiana. En las bacterias Gram negativas, la membrana externa es capaz de unir un amplio rango de iones metálicos. Los grupos fosforilo de los lipopolisacáridos, son los constituyentes de la membrana externa de las bacterias gram negativas que primero se unen a los iones metálicos existiendo también algunos grupos carboxilo disponibles para interactuar con los metales. Sin embargo es el peptidoglicano quien se une fuertemente a los iones metálicos con sus grupos carboxilo (Suárez y Reyes, 2002).

Dentro de los constituyentes de los biosorbentes se puede identificar dos tipos de grupos funcionales a) débilmente reactivos como lípidos o glucanos en los cuales los grupos hidroxilos son reactivos y b) fuertemente reactivos como ácidos carboxílicos, aminoácidos, proteínas, ligninas, polifenoles, quitina y productos derivados (Cuiziano y Navarro, 2008).

La calidad del biosorbente está dada por la cantidad del sorbato que pueda atraer y retener en forma inmovilizada. El término de biosorción se utiliza en relación a la captación de metales que lleva a cabo una biomasa muerta completa, a través de mecanismos físico-químicos como la adsorción o el intercambio iónico (Cuiziano y Navarro, 2008).

4.6.1 Importancia del pH en la remoción de cromo por biomasa muerta.

El ensayo se llevó a cabo a un pH ácido (pH 2) encontrándose una adsorción inmediata obteniendo porcentajes de remoción de hasta 70%, es posible que a bajo pH, los iones del cromato divalente (CrO_4^{2-}) se unan a los grupos monovalentes protonados con carga positiva presente en la biomasa, por ejemplo los grupos aminos, o probablemente ocurra un mecanismo de intercambio de iones. El Cr VI en la forma HCrO_4^- en la solución puede ser sustituida por OH^- (Sannasi *et al.*, 2006).

Diferentes tipos de grupos funcionales presentes sobre la pared celular como carboxilos, aminos, hidroxilos y sulfhidrilos facilitan la unión de los metales (Sannasi *et al.*,

2006). Los iones de cromo VI se unen a los grupos OH en la forma aniónica como HCrO_4^- a bajos pH (Sharma and Bhattacharyya *et al.*, 2004).

En la mayoría de las investigaciones se ha tratado a la biomasa en algunos rangos de pH, para obtener una mayor remoción. Baral *et al.* (2008) concluye en su trabajo que el porcentaje de adsorción realizado por la *Salvinia cucullata* (hierba) subió de un 6.2 a 57.9% cuando el pH inicial de la solución se redujo de 4.5 a 1.7; el incremento puede ser explicado por la protonación del adsorbente. A pH bajo, se encuentra mayor concentración de iones hidrógeno (protones), las cargas negativas en la superficie del interior de los poros son neutralizados y nuevos sitios de adsorción son desarrollados como resultado de la superficie prevista de una carga positiva, para obtener complejos adsorbidos.

En la revisión realizada por Febrianto *et al.* (2009) se obtienen datos de microorganismos y del rango de pH al que se han realizado las investigaciones, en los que tratan a pH ácido para remover el Cr VI; como en el caso de: *Saccharomyces cerevisiae* a pH 2, *Spirulina platensis* pH 1.5, *Aspergillus niger* pH 2.2, *Bacillus lecheniformis* pH 2.5, *Rhizopus arrhizus* pH 1.3, *Lyngbya putealis* pH 2, *Agaricus bisporus* pH 1, constatando que la remoción del cromo se puede llevar a cabo a pH ácido para mejores resultados.

El porcentaje de adsorción es una función de la concentración inicial de los iones del metal, el cual hace que sea un factor importante a ser considerado para una efectiva biosorción. En general, los datos revelan que la capacidad de adsorción aumenta con el incremento en la concentración inicial de iones del metal, entonces la saturación depende de la concentración del ión metálico inicial. A bajas concentraciones los sitios de absorción toman el metal disponible rápidamente, sin embargo a altas concentraciones los iones del metal necesitan difundirse a la superficie de la biomasa por difusión intraparticular; con el incremento de la concentración del metal, el porcentaje de metal removido decae debido a la disminución de capacidad de carga de la biomasa (Abbas *et al.*, 2008).

Los grupos funcionales que pueden exponer los microorganismos que se encuentran en los consorcios, al parecer tienen afinidad entre sí ya que en las curvas de remoción se muestra un comportamiento diferente, ya que se da una igual adsorción, estadísticamente, entre las concentraciones de 2 mg.L^{-1} (70%) y la de 50 mg.L^{-1} (58%) en el inóculo I5,

mientras que para M3 se tiene los mayores porcentajes de remoción para 10 mg.L⁻¹ y 50 mg.L⁻¹ con un 36 y 34 % respectivamente, de entre las concentraciones ensayadas.

Como se explicó anteriormente los consorcios poseen microorganismos como bacilos Gram negativos, levaduras, entre otros, por ello, no se puede establecer la cantidad de levaduras y bacilos que fueron suministrados en cada tratamiento por lo que difieren los comportamientos en la adsorción.

Entonces, como existe una mezcla de microorganismos se sugiere que los grupos funcionales tienen una atracción entre sí, dejando pocos grupos para que se realice la adsorción; las paredes celulares de los microorganismos exponen los grupos funcionales que pueden tener afinidad entre ellos y así disminuyen la capacidad de adsorción.

Al colocar la concentración menor puede que exista más afinidad entre los grupos porque existe menos especies de cromo que adsorban a los grupos que quedan libres. Además, al colocar una mayor cantidad de concentración de cromo, existen mayor cantidad de las especies de cromo que al colocar la biomasa rápidamente tienen mayor afinidad por los grupos funcionales y no dejan que se unan entre sí. Suárez y Reyes (2002) en su trabajo mencionan que la unión a iones metálicos reduce las cargas repulsivas entre los constituyentes aniónicos de moléculas de lipopolisacáridos y proteínas adyacentes. Sin duda, éstos supuestos deben ser sometidos a un exhaustivo análisis general en otros experimentos.

También Suárez y Reyes (2002) dicen que los grupos fosforilo de los lipopolisacáridos son los constituyentes de la membrana externa de las bacterias Gram negativas que primero se unen a los iones metálicos. Sin embargo, es el peptidoglicano el que se une fuertemente a los iones metálicos por los grupos carboxilo, la interacción también se puede dar entre las diferentes capas que tienen tanto los bacilos Gram negativos como las levaduras (fosfolípidos, lipopolisacáridos, glucanos, mananos, quitina) pero aún no se puede dar un veredicto certero, serán necesarios nuevos análisis a partir de los resultados obtenidos en ésta investigación.

La biomasa de los consorcios tuvo porcentajes significativos para adsorber el cromo; sin embargo, no se realizaron isotermas de adsorción por cuanto dicha biomasa

mixta con variedad de microorganismos y por lo tanto de grupos funcionales expuestos se comportó como un adsorbente heterogéneo. Se debería aislar cada cepa presente para realizar los ensayos e isothermas de adsorción, con el fin de conocer si los porcentajes de adsorción son mayores como consorcio o con cada una de las cepas presentes.

Como ya se nombró anteriormente los mismos inóculos bacterianos analizados M 3 e I 5 soportaron concentraciones de colorantes y, a la vez con la presente investigación se han realizado experimentos para observar degradación o resistencia a fenol, cobre, zinc y detergentes de los mismos consorcios, comprobando que los inóculos podrían ser utilizados para la remoción de efluentes textiles en varias etapas, intercalando condiciones aerobias y anaerobias, en las cuales se espera remover la mayor cantidad de los contaminantes de los efluentes textiles.

Haq y Shakoori (1998), propusieron un tipo de tratamiento biológico utilizando en primer lugar las bacterias para luego utilizar a las levaduras en un segundo paso y por último utilizar algas (*Spirulina*).

En el trabajo realizado por Barrionuevo *et al.*, 2009 probaron cinco cepas bacterianas, que fueron aisladas a partir de ecosistemas contaminados, éstas bacterias poseen capacidad adsorptiva para Cd II y Zn II y además capacidad de reducir Cr VI a Cr III, los consorcios I 5 y M 3 también tienen la capacidad de reducir el Cr VI y adsorber concentraciones de Zn. Los autores de éste trabajo utilizaron las cepas únicas y en combinaciones para conocer los mayores porcentajes de remoción de Cr VI, siendo *Klebsiella oxytoca* P2 y el cultivo mixto *Klebsiella ornithinolytica* 1P + *Pseudomona veronii* 2E los que mayor remoción obtuvieron. Otros ensayos realizados en este trabajo propone la inmovilización de las bacterias.

Los resultados obtenidos hasta el momento con los consorcios I 5 y M 3 son alentadores, por lo que se debe continuar en llegar a lo real para una verdadera remediación de efluentes textiles el cual sin lugar a dudas se convertirá en un trabajo pionero en el Ecuador.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

Los consorcios bacterianos nativos compuestos crecen en un medio de cultivo adicionado con concentraciones de Cr VI, existiendo inhibición de crecimiento de bacterias en las concentraciones de 10 mg.L^{-1} a 50 mg.L^{-1} .

El inóculo I 5 remueve Cr a 35°C en condiciones anaerobias y el inóculo M 3 a 35°C en condiciones aerobias a 150 rpm, mientras que la biomasa muerta de los consorcios remueve Cr de agua sintética a nivel de laboratorio a un pH 2, 35°C y 150 rpm en condiciones de laboratorio.

Los consorcios bacterianos nativos compuestos I 5 y M 3 remueven concentraciones de Cr VI en un porcentaje de 98% y cromo total para I 5 un 70% y para M 3 23% de una concentración inicial de 10 mg.L^{-1} , en condiciones de laboratorio.

La concentración de 50 mg.L^{-1} es inhibitoria para crecimiento bacteriano de los consorcios y la concentración de 100 mg.L^{-1} es letal para los mismos.

Los consorcios bacterianos I 5 y M 3 son capaces de remover cromo tanto con células vivas como con biomasa muerta. Los porcentajes de remoción están en un rango de 40 a 70% utilizando biomasa muerta para I 5 y entre un 20 a 40% para M 3.

El inóculo más adecuado en la remoción de cromo es I 5, removiendo Cr VI y luego Cr total.

CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES

Caracterizar a los consorcios bacterianos nativos compuestos.

Realizar pruebas con fuente de Cr III para observar el comportamiento de los inóculos bacterianos frente a esta especie de metal.

Utilizar otras fuentes de carbono alternas, para establecer diferencias en eficiencia de remoción de cromo.

Caracterizar el mecanismo utilizado para la remoción de Cr VI y Cr total que realizan los inóculos.

Determinar la concentración máxima de cromo que soportarían los inóculos.

Realizar ensayos con la biomasa muerta de cada tipo de microorganismo del consorcio para realizar las isotermas de adsorción.

Realizar pruebas con agua residual textil real.

Realizar pruebas de toxicidad a cada uno de los consorcios.

Tratar a la biomasa de diferente manera, que pueden ser tratamientos químicos o utilizar una fijación para la biomasa.

CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA

Abbas M, Nadeem R, Zafar M, Arshad M (2008); Biosorption of Chromium (III) and Chromium (VI) by untreated and pretreated *Cassia fistula* Biomass from Aqueous Solutions; Water Air Soil Pollut 191; 139–148.

Akmar Z, Zakaria Z, Surif S, Azlina W (2007); Hexavalent chromium reduction by *Acinetobacter haemolyticus* isolated from heavy-metal contaminated wastewater; Journal of Hazardous Materials 146; 30-38.

Alves de Lima A, Pontes M, Silva R, Hofer E (2007); Utilization of phenol in the presence of heavy metals by metal-tolerant nonfermentative gram-negative bacteria isolated from wastewater; Revista Latinoamericana de Microbiología; Vol 49; 66-73.

Ayala Diana (2010); Obtención de un inóculo bacteriano, proveniente de suelo contaminado por agua residual textil, capaz de degradar colorantes textiles reactivos en condiciones aerobias a escala de laboratorio. Tesis de grado. Ingeniería en Biotecnología. Escuela Politécnica del Ejército.

Baral S, Das S, Gautam Roy Chaudhury , Pradip Rath (2008); Adsorption of Cr (VI) by treated weed *Salvinia cucullata*: kinetics and mechanism; Adsorption 14; 111–121.

Barrionuevo M, Daniel M, Garavaglia L, Méndez N, Sosa G, Candal R, Cerdeira S, Ceretti E, Ramírez S, Reziulski E, Zalts A y Vullo D, (2009); Tratamiento biológico de efluentes industriales con contenido en metales: factores a tener en cuenta para un diseño eficiente; Revista Química Viva Número 2, año 8.

Brown Alfred E, (2007); Benson's Microbiological Applications, Laboratory Manual in General Microbiology Complete Version.

Brady T y J Tobin (1995); Binding of hard and soft metal ions to *Rhizopus arrhizus* biomass; Enz. Microbial Technol; 17; 791-796.

Carmona M, Pereira M, Ferreira S (2005); Biosorption of chromium using factorial experimental design; Process Biochemistry 40; 779-788.

Chirwa Evans y Wang Yi-Tin (2000); Simultaneous chromium (VI) reduction and phenol degradation in an anaerobic consortium of bacteria; Elsevier Science; Vol 34, No.8; 2376-2384.

Das S y Guha A (2007); Biosorption of chromium by *Termitomyces clypeatus*; Colloids Surf 60; 46-54.

Espíndola A. (2009); Remoción de Arsénico de un medio líquido a nivel de laboratorio mediante la utilización de un consorcio y una cepa axénica de Cianobacterias en suspensión aisladas a partir de las hojas de *Polylepis pauta* de bosques nativos del páramo de Papallacta, Ecuador. Tesis de grado. Ingeniería en Biotecnología. Escuela Politécnica del Ejército.

Febrianto J, Kosasih A, Sunarso J, Ju Y; (2009); Review: Equilibrium and kinetic studies in adsorption of heavy metals using biosorbent: A summary of recent studies; Journal of Hazardous Materials 162; 616-645.

Ferrari S, Guzmán G, Silva P, Alcaráz L, Silva H y González D (2004); Captación de Cadmio por biomasa libre o inmovilizada de *Nostoc minutum* (Cianobacteria filamentosa); Acta toxicol. Argent, 12 (1); 19-22.

Garbisu C, Alkorta I, Llama M y J Serra (1998); Aerobic chromate reduction by *Bacillus subtilis*; Biodegradation 9; 133–141.

Gutiérrez F. y C. Cervantes; Interacciones microbianas con el cromo: mecanismos y potencial biotecnológico; Ide@s CONCYTEG; Año 3, Núm. 37; 21-36.

Haq R y Shakoori A.R; (1998); Short Communication: Microbiological treatment of industrial wastes containing toxic chromium involving successive use of bacteria, yeast and algae; World Journal of Microbiology and Biotechnology 14; 583-585.

Higuera O, Flores L, Arroyave J (2009); Estudio de la Biosorción de cromo con la hoja de café, Ingeniería e Investigación [on line], vol 29, citado 2010-10-02. Disponible en internet.

Hossain M, Kumita M, Michigami Y, Mori S (2005); Optimization of Parameters for Cr (VI) Adsorption on used black tea leaves; Adsorption 11; 561-568.

Jiang H, Tay J y Tay S. (2004). Changes in structure, activity and metabolism of aerobic granules as a microbial response to high phenol loading. Applied Microbiology & Biotechnology , 602-608.

Lokeshwari N y Keshava J (2009); Biosorption of heavy metal (chromium) using biomass; Global Journal of Environmental Reserch 3(1); 29-35.

López J, García O, Grima J, Ballesteros B y Pérez M; (sin año); Técnicas de Biorrecuperación in situ en acuíferos contaminados por metales pesados; Instituto Geológico y Minero de España. Oficina de Proyectos de Valencia; 233-243.

López A, Lazaro N, Priego J, Marquez A; (2000); Effect of pH on the biosorption of nickel and other heavy metals by *Pseudomonas fluorescens* 4K39; *Industrial Microbiol. Biotechnol* 24; 146-151.

Mansilla H, Lizama C, Gutarra A, Rodriguez J, (2001); Tratamiento de Residuos Líquidos de la industria de Celulosa y Textil; 285-294.

Moncayo Irina (2010); Selección de un inóculo bacteriano nativo compuesto con la capacidad de remover colorantes reactivos textiles rojo 141, amarillo 84 y azul navy 171, bajo condiciones anaerobias a nivel de laboratorio. Tesis de grado. Ingeniería en Biotecnología. Escuela Politécnica del Ejército.

Monge O, Guerrero P, Almendáriz F; (2009); Capacidad de adsorción del cobre utilizando un consorcio bacteriano aislado del rio San Pedro, Sonora; XXVIII Convención Minera Internacional, Veracruz.

Morales L, Guillen F, Ortiz A, Villegas T, Sandoval A, Hernandez C, Cristiani E, (2008) Isolation, identification and characterization of a *Hypocrea tawa* strain with high Cr (VI) reduction potential; *Biochemical Engineering Journal* 40; 284–292.

Muneer B, Rehman A, Shakoori F, Shakoori A; (2009); Evaluation of consortia of microorganisms for efficient removal of hexavalent chromium from industrial wastewater; *Bull Environ Contam Toxicol* 82; 597–600.

Muter O, Patmalnieks A, Rapoport A; (2001); Interrelations of the yeast *Candida utilis* and Cr (VI): metal reduction and its distribution in the cell and medium; *Process Biochemistry* 36; 963–970.

Núñez Chaves Rafael Ángel; Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología; Técnicas in vitro para la biorremediación de cromo y plomo; CARTAGO, 2007.

Ochie V, Trilestari K, Sunarso J, Indraswati N, Ismadji S; (2008); Review: Recent progress on biosorption of heavy metals from liquids using low cost biosorbents: characterization, biosorption parameters and mechanism studies; *Clean-Journal* 36 (12); 937-962.

Ospina C, Montoya J, García J (2007); Oportunidades de producción más limpia en tintorerías del sector textil; *Scientia Et Technica* Año XIII No.37, Universidad Tecnológica de Pereira; 603-608.

Park D, Yeoung-Sang Y, Park J; (2010); The Past, Present, and Future Trends of Biosorption; *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 15; 86-102.

Pas M, Milacic R, Draslar K, Pollak N & P Raspor; (2004); Uptake of chromium (III) and chromium (VI) compounds in yeast cell structure; *BioMetals* 17; 25-33.

Ramírez M, Díaz C, Vargas E, Riveros H, Campos J, Cervantes C; (2008); Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds; *Biometals* 21; 321-332.

Rehman A, Zahoor A, Muneer B, Hasnain S, (2008); Chromium tolerance and reduction potential of a *Bacillus sp.* isolated from metal contaminated wastewater; *Bull Environ Contam Toxicol* 81; 25–29.

Riva M, Flos R, Crespi M, Balasch J (1980); Contaminación aguda por vertidos textiles: Tratamiento de carpines dorados (*Carassius auratus*) con dicromato potásico; determinación de la toxicidad y niveles de cromo en branquias; Instituto de Investigación Textil; Bol. Inst. Inv. Textil terrassa, No. 78.

Sari A, Tuzen M; (2008); Biosorption of total chromium from aqueous solution by red algae (*Ceramium virgatum*): Equilibrium, kinetic and thermodynamic studies; *Journal of Hazardous Materials* 160; 349-355.

Sharma Arunima y Bhattacharyya Krishna; (2004); Adsorption of chromium (VI) on *Azadirachta indica* (Neem) Leaf Powder; *Adsorption* 10; 327–338.

Sivaprakash A, Aravindhan R, Raghavarao J, Unnainair B, (2009); Kinetics and equilibrium studies on the biosorption of hexavalent chromium from aqueous solutions using *Bacillus subtilis* biomass; *Applied Ecology and Environmental Reserch* 7(1); 45-57.

Song H, Liu Y, Xu W, Zeng G, Aibibu N, Xu L, Chen B (2009); Simultaneous Cr (VI) reduction and phenol in pure cultures of *Pseudomonas aeruginosa* CCTCC AB91095; Bioresource Technology Elsevier.

Soto H (2006); Potencial contaminación por cromo en el proceso de refinación del petróleo; Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad De Química E Ingeniería Química.

Srinath T, Verma T, Ramteke P.W, Garg S.K (2002); Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria; Chemosphere 48, 427-435.

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater; 20th Edition; 1998, 3500-Cr CHROMIUM; 3-65.

Suárez P y R Reyes; (2002); La Incorporación de Metales Pesados en las Bacterias y su importancia para el ambiente; Interciencia; 27; 160-164.

Villegas L, Fernandez P, Amoroso M, C de Figueroa L (2008); Chromate removal by yeasts isolated from sediments of a tanning factory and a mine site in Argentina; Biometals 21; 591–600.

Volesky B. y H. May-Phillips; (1995); Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*; Appl. Microbiol. Biotechnol; 42; 797-806.

Vullo D (2003); Microorganismos y metales pesados: Una interacción en beneficio del Medio Ambiente; Química Viva; Universidad de Buenos Aires; 93-104.

Walters, A., Santillo, D. y Johnston, P; (2005); El tratamiento de textiles y sus repercusiones ambientales; Greenpeace.

Wei-Hua X, Yun-guo L, Guang-Ming Z, Xin L, Hui G; (2006); Cr (VI) reduction by *Bacillus sp.* Isolated from chromium landfill; Process Biochemistry 41; 1981-1986.

Yun-guo L, Cui P, Wen-bin X, Wuang-ming Z, Ming Z, Yuan-yuan L, Jie K, Chao H (2008); Simultaneous removal of Cr (VI) and phenol in consortium culture of *Bacillus sp.* and *Pseudomonas putida Migula* (CCTCC AB92019); Transactions of Nonferrous Metals Society of China 18; 1014-1020.

Zahoor Ahmed y Rehman Adbul; Isolation of Cr (VI) reducing bacteria from industrial effluents and their potencial use in bioremediation of chromium containing wastewater; (2009); Journal of Environmental Sciences 21; 814-820.

Biorremediación: organismos que limpian el ambiente (2006). Edición No.36

http://www.porquebiotecnologia.com.ar/adc/uploads/El%20Cuaderno%2036_1.doc.

Delgado Gian Carlo (2006); Nanotecnología y la disponibilidad de energía y agua en los países del Sur; <http://www.giandelgado.net/2007/02/nanotecnologia-y-la-disponibilidad-de.html>

Los colorantes (2007); [http://www.avqtt.org/Articulos/La%20tintura%20textil%20-%20Los%20colorantes\(11\).pdf](http://www.avqtt.org/Articulos/La%20tintura%20textil%20-%20Los%20colorantes(11).pdf)

Tinitus (2010); http://www.salutia.com.ar/Sitio_Pac/Toxicologia/Toxicologia_es_phs7.htm

Análisis avanzado de Alimentos, Universidad de Buenos Aires (2007);
<http://www.qo.fcen.uba.ar/Cursos/AnAvAl/GuiaTP.pdf> (30 septiembre 2010)

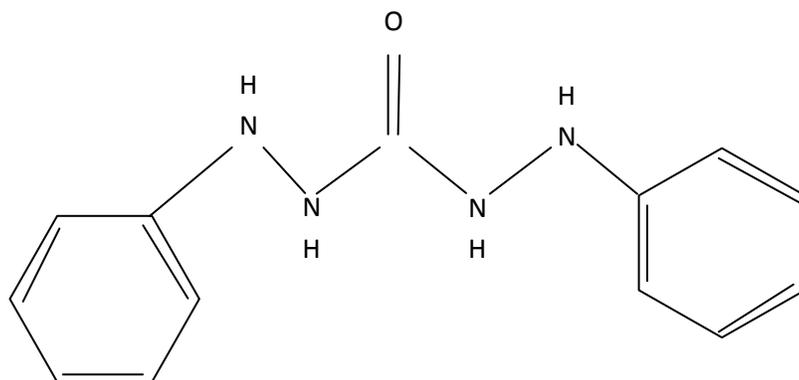
ANEXO A

Ventajas y Desventajas entre biomasa inerte y células vivas (Cañizares R, 2000).

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 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 esta 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 precrecimiento. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. La toxicidad; sólo se pueden tratar los metales a bajas concentraciones, sin embargo su 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.

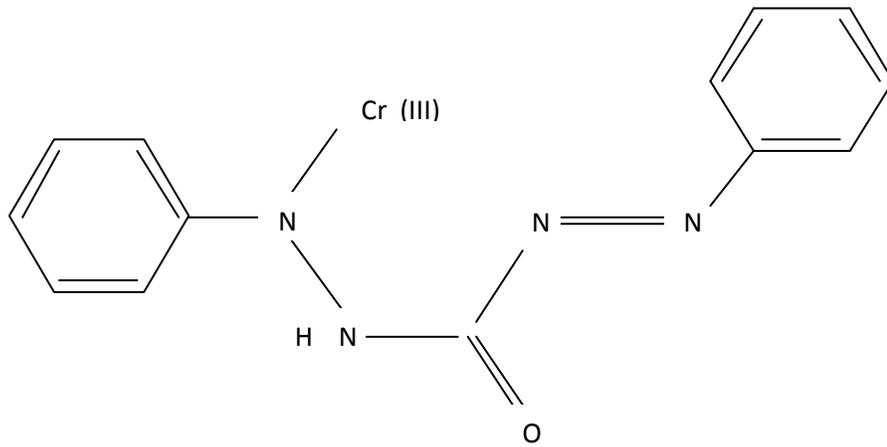
ANEXO B

Estructura de la difenilcarbazona



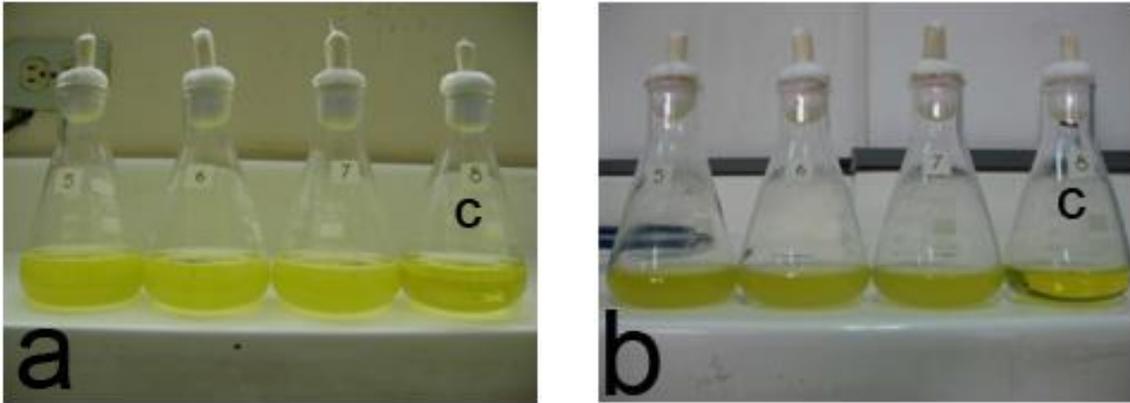
ANEXO C

Estructura de la quelación del Cr III en la difenilcarbazona.



ANEXO D

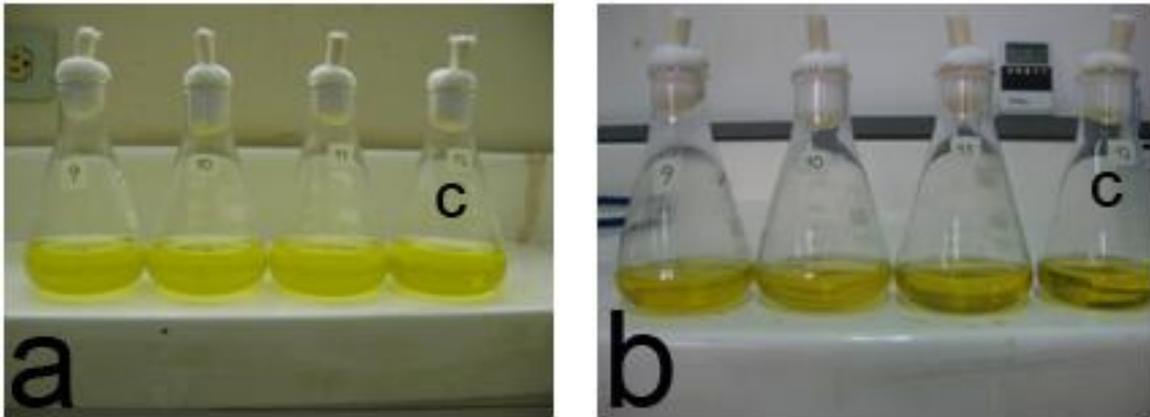
Tratamientos con 50 mg.L^{-1} de cromo.



Inóculo M3 con 50 mg.L^{-1} de Cr (a) 7 días de incubación (b) 30 días de incubación. C=Control.

ANEXO E

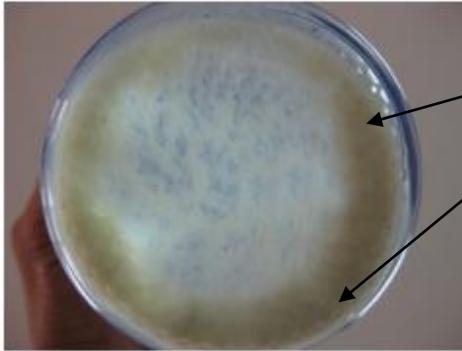
Tratamientos con 100 mg.L^{-1} de cromo.



Inóculo M3 con 100 mg.L^{-1} de Cr (a) 7 días de incubación (b) 30 días de incubación. C=Control.

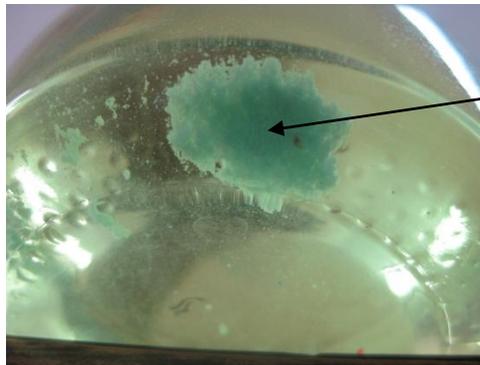
ANEXO F

Precipitado del inóculo I 5.



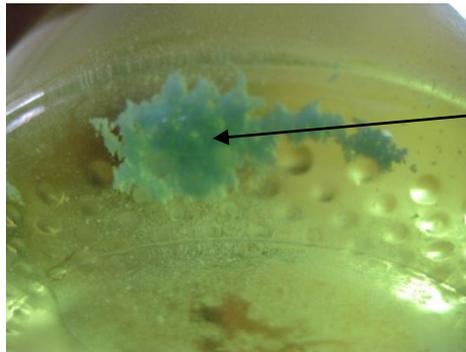
Precipitado

Precipitado en 10 mg.L^{-1}



Precipitado

Precipitado en 50 mg.L^{-1}



Precipitado

Precipitado en 100 mg.L^{-1}