

**ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO**

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

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE  
BIORREMOCIÓN DE ZINC EN AGUA SINTÉTICA DE  
DOS CONSORCIOS MICROBIANOS NATIVOS, A  
ESCALA DE LABORATORIO**

**Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:**

**INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**ELABORADO POR**

**DIANA ELIZABETH GARCÍA TUMIPAMBA**

**SANGOLQUÍ, 27 DE ENERO DEL 2011**

**HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS**

**ELABORADO POR**

---

Srta. Diana Elizabeth García Tumipamba

**COORDINADOR DE LA CARRERA**

---

Ingeniero Rafael Vargas

**SECRETARIO ACADÉMICO**

---

Doctor Marcelo Mejía

Sangolquí, 27 de Enero del 2011.

## CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. DIANA ELIZABETH GARCÍA TUMIPAMBA como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA.

Sangolquí, 27 de enero del 2011

---

Dra. Blanca Naranjo  
DIRECTORA

---

Lic. Biol. Alma Koch, MC.  
CODIRECTORA

## **DEDICATORIA**

Dedico mi tesis a Dios, quien me ha guiado durante toda mi vida.

A mis padres, Nelson O. García y Rosita E. Tumipamba Vela, que con su apoyo, amor y ejemplo han sido mi guía y mi mayor motivación a lo largo de mi vida, además de ser el mejor regalo que Dios me ha dado.

A mi hermana, Daniela, que con su valentía y esfuerzo me ha enseñado a valorar muchas cosas y a ser auténtica.

A mi abuelito, Nicolás<sup>†</sup> por siempre cuidar y velar por mí.

**Diana Elizabeth García Tumipamba**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Escuela Politécnica del Ejército, que financió el presente proyecto de tesis.

A la Dra. Blanca Naranjo quien me ha guiado en el desarrollo de este trabajo y quien me ha enseñado que hay que luchar por la vida en los momentos más difíciles y a la MC. Alma Koch, quien me ayudó científicamente para el desarrollo de la presente investigación y me demostró su confianza para el desarrollo del mismo. Gracias a ustedes, por su guía, sugerencias constructivas y conocimientos valiosos.

Al Ing. Enrique Arévalo, por su tiempo y ayuda en la lectura de las muestras.

Al Dr. Alexis Debut, por su colaboración con las micrografías de las muestras.

Al Ing. Pedro Romero, por su valioso tiempo y paciencia en el análisis de los datos estadísticos.

Al Ing. Oswaldo Guzmán, a la Ing. Paulina Guevara y al Dr. Vicente Delgado, por su invaluable ayuda académica y profesional para el desarrollo del presente trabajo.

A los docentes de la Facultad, por brindarme sus conocimientos durante mi época estudiantil y ahora profesional.

A mis padres, para los que no me alcanzan las palabras para agradecerles por todo lo que han hecho por mí y quienes siempre me han apoyado en todo lo que he necesitado. Mi padre por colaborarme en lo que ha podido, por venir en la noche a retirarme del laboratorio, acompañarme y llevarme a casa. A mi madre que siempre estuvo allí para brindarme su apoyo, sus buenas energías, buen ánimo y siempre orar por mí para que todo me salga bien. A mi hermana por brindarme un incondicional cariño y apoyo, por quedarse conmigo hasta muy tarde ayudándome a preparar el material necesario para continuar con mi tesis y por sus palabras de aliento en los momentos que lo necesito. Gracias por estar siempre conmigo, sin ustedes no habría logrado todo lo que he hecho en mi vida!!!

A Erika Murgueitio por todo lo que me ha ayudado, por las bromas y conversaciones de todo un poco que me hacían reír mucho y a mi querida Jessy Maisincho por su gran cariño, alegría y colaboración que siempre me ha brindado. A ambas, muchas gracias por su amistad sincera que me han demostrado desde que las conocí y que sigue perdurando.

A los pasantes, Heidi, Pato D., Aleja C, quienes hicieron del trabajo una tarea más divertida y a quienes de vez en cuando explotábamos con el trabajo de laboratorio y de limpieza continuos.

A mis amigos de la universidad, Pato V. por su amistad sincera e incondicional y porque siempre me ayuda en lo que necesito, sobre todo en cuestiones de avanzada tecnología para mí; Paty G. por su ayuda y colaboración cuando me visitaba en el laboratorio, Fer J. por sus mensajes emotivos, Andrés P. por confiar en mí al recomendarme para hacer la presente investigación, Majo G. por sus palabras de ánimo y amistad, Lore V. por su sincera amistad y ser tan divertida, Leito B. por ser la buena persona que siempre me ha demostrado, Majo C. por su amistad a pesar de no estar en el mismo curso, Adri J. por su amistad y palabras de aliento, Vale V. por brindarme alegría con sus chistes y ocurrencias, Andre M. por su amistad y apoyo, Diani A. e Iri M. por confiar en mí para formar parte de su proyecto. A Andre C. por ayudarme con la descarga de algunos artículos. A Johana M. por su alegría, locuras y momentos divertidos que nos brindó. A Caro P. y Fer P. por su colaboración y amistad sincera.

Finalmente y no por eso menos importante, a mis amigas del colegio, Irene P. por darme consejos, hacerme ver la realidad y siempre estar dispuesta a organizar las reuniones con el resto de amigas, Iva V. por su espontaneidad y alegría, Tefa A. y Andrea P. por su valiosa amistad, Nelly C. por sacarme siempre una sonrisa, salir a divertirnos y ser una excelente amiga, Katy A. por su amistad incondicional, Belén N. por su sinceridad y amistad leal. Gracias a todos ustedes por estar presentes en mi vida y darme ánimos cuando lo necesito....Amig@s lo logre!!!!

**Diana Elizabeth García Tumipamba**

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS.....</b>	<b>II</b>
<b>CERTIFICACIÓN.....</b>	<b>III</b>
<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>IV</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>V</b>
<b>ÍNDICE DE CONTENIDOS.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTADO DE TABLAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTADO DE CUADROS.....</b>	<b>XII</b>
<b>LISTADO DE FIGURAS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>LISTADO DE ANEXOS.....</b>	<b>XIV</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>XV</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>XVI</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XVII</b>
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. Formulación del problema .....	1
1.2. Justificación del problema .....	3
1.3. Objetivos de la investigación .....	5
1.3.1. Objetivo General .....	5
1.3.2. Objetivos Específicos .....	5
1.4. Marco Teórico .....	5
1.4.1. Industria textil .....	5
1.4.2. Aguas residuales de la industria textil .....	6
1.4.3. Metales Pesados .....	8
1.4.4. Zinc.....	9
1.4.5. Papel biológico del zinc .....	9
1.4.6. Toxicidad del zinc .....	10
1.4.7. Tratamientos físico-químicos de los efluentes textiles .....	11
1.4.8. Tratamientos biológicos de los efluentes de la industria textil .....	12
1.4.8.1. Microorganismos.....	12
1.4.8.2. Mecanismos de remoción de zinc mediante los microorganismos .....	15

1.4.8.2.1. Bioacumulación.....	16
1.4.8.2.2. Bioadsorción.....	17
1.5. Sistema de hipótesis.....	17
<b>CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
2.1. Participantes .....	18
2.2. Zona de estudio .....	18
2.3. Período de tiempo de investigación .....	18
2.4. Diseño experimental .....	19
2.5. Procedimientos .....	19
2.5.1. Obtención y activación de los inóculos microbianos nativos compuestos del cepario del Laboratorio de Microbiología con el fin de obtener la biomasa necesaria para el proceso de remoción de zinc.....	19
2.5.1.1. Remoción de 3 mg.L <sup>-1</sup> de zinc por acción de los consorcios microbianos en agitación en presencia de diferentes concentraciones de glucosa .....	21
2.5.1.2. Muestreo de agua contaminada en una industria textil como referencia para la ejecución del diseño experimental.....	22
2.5.2. Ejecución del diseño experimental para la remoción de zinc mediante espectrofotometría de absorción atómica.....	24
2.5.2.1. Preparación de la solución sintética de zinc.....	24
2.5.2.2. Montaje del diseño experimental.....	24
2.5.2.3. Determinación de la concentración de zinc.....	25
2.5.3. Elaboración de las curvas de crecimiento microbiano durante la remoción de zinc.....	26
2.5.4. Análisis adicional: Preparación de los consorcios microbianos I5 y M3 para su observación en Microscopía Electrónica de Barrido.....	27
2.5.4.1. Microscopía Electrónica de Barrido.....	27
2.5.4.2. Microscopía Óptica.....	28
2.6. Análisis de datos .....	28
<b>CAPÍTULO 3: RESULTADOS .....</b>	<b>29</b>
3.1. Activación de los inóculos microbianos nativos compuestos del cepario del Laboratorio de Microbiología con el fin de obtener la biomasa necesaria para el proceso de remoción de zinc.....	29

3.1.1. Remoción de 3 mg.L <sup>-1</sup> de zinc por acción de los consorcios microbianos con agitación en presencia de diferentes concentraciones de glucosa.....	29
3.1.1.1. Remoción de zinc con 5 g.L <sup>-1</sup> de glucosa.....	30
3.1.1.2. Remoción de zinc con 9 g.L <sup>-1</sup> de glucosa .....	31
3.1.2. Datos del muestreo de agua contaminada en una industria textil como referencia para la ejecución del diseño experimental.....	32
3.2. Ejecución del diseño experimental para la remoción de 5, 8 y 10 mg.L <sup>-1</sup> de zinc por acción de los consorcios microbianos I5 y M3 en agitación utilizando 5 g.L <sup>-1</sup> de glucosa en el medio de cultivo.....	32
3.2.1. pH en la remoción de zinc con los consorcios microbianos I5 y M3.....	34
3.3. Elaboración de las curvas de crecimiento microbiano durante la remoción de zinc.....	34
3.3.1. Curva de crecimiento del consorcio M3 en la remoción de zinc .....	34
3.3.2. Curva de crecimiento del consorcio I5 en la remoción de zinc.....	36
3.4. Análisis estadístico de ambos consorcios microbianos para establecer el consorcio microbiano óptimo para la remoción de zinc.....	38
3.4.1. Análisis estadístico del consorcio microbiano M3.....	42
3.4.2. Análisis estadístico del consorcio microbiano I5.....	43
3.5. Análisis adicional: Microscopía Electrónica de Barrido.....	44
<b>CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN.....</b>	<b>47</b>
4.1. Activación de los inóculos microbianos nativos compuestos del cepario del Laboratorio de Microbiología con el fin de obtener la biomasa necesaria para el proceso de remoción de zinc .....	47
4.1.1. Remoción de 3 mg.L <sup>-1</sup> de zinc por acción de los consorcios microbianos con agitación en presencia de diferentes concentraciones de glucosa.....	47
4.1.2. Muestreo de agua contaminada en una industria textil como referencia para la ejecución del diseño experimental.....	48
4.2. Ejecución del diseño experimental para la remoción de 5, 8 y 10 mg.L <sup>-1</sup> de zinc por acción de los consorcios microbianos I5 y M3 con agitación utilizando 5 g.L <sup>-1</sup> de glucosa en el medio de cultivo.....	48
4.2.1. Estudio del pH en la remoción de zinc con los consorcios microbianos I5 y M3.....	50

4.3. Elaboración de las curvas de crecimiento microbiano durante la remoción de zinc.....	51
4.3.1. Curva de crecimiento del consorcio M3 durante la remoción de zinc.....	51
4.3.2. Curva de crecimiento del consorcio I5 durante la remoción de zinc.....	52
4.4. Análisis estadístico de ambos consorcios microbianos para establecer el consorcio microbiano óptimo para la remoción de zinc.....	53
4.4.1. Análisis estadístico del consorcio microbiano M3.....	53
4.4.2. Análisis estadístico del consorcio microbiano I5.....	55
4.5. Análisis adicional: Microscopía Electrónica de Barrido.....	57
<b>CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES .....</b>	<b>59</b>
<b>CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES .....</b>	<b>60</b>
<b>CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>77</b>
<b>DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD .....</b>	<b>79</b>
<b>CERTIFICACIÓN.....</b>	<b>80</b>
<b>AUTORIZACIÓN.....</b>	<b>81</b>

## LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1. Arreglo factorial de 2x3 utilizado en el diseño experimental.....	19
Tabla 3.1. Análisis de varianza del porcentaje de remoción de zinc con 5 g.L <sup>-1</sup> de glucosa utilizando los dos consorcios microbianos.....	30
Tabla 3.2. Medias de remoción de zinc para cada consorcio microbiano con sus intervalos de confianza al 95%.....	30
Tabla 3.3. Análisis de varianza para el porcentaje de remoción de zinc utilizando 9 g.L <sup>-1</sup> de glucosa con ambos consorcios microbianos.....	31
Tabla 3.4. Medias de remoción de zinc para cada consorcio microbiano con sus intervalos de confianza al 95%.....	31
Tabla 3.5. Datos de concentración de zinc, temperatura, pH y caudal de los puntos muestreados en la empresa textil.....	32
Tabla 3.6. Análisis de varianza para los consorcios microbianos, concentración de zinc y su interacción.....	39
Tabla 3.7. Porcentajes de remoción de zinc de cada consorcio microbiano.....	40
Tabla 3.8. Medias para los grupos homogéneos para la concentración de zinc.....	41
Tabla 3.9. Análisis de varianza para los seis grupos en estudio .....	41
Tabla 3.10. Medias para los grupos homogéneos de las interacciones para la remoción de zinc.....	41
Tabla 3.11. Análisis de varianza para el consorcio microbiano M3 en la remoción de zinc.....	43
Tabla 3.12. Medias para los grupos en subconjuntos homogéneos para la concentración de zinc.....	43
Tabla 3.13. Análisis de varianza para el consorcio microbiano I5 en la remoción de zinc.....	44
Tabla 3.14. Medias para los grupos en subconjuntos homogéneos para la concentración de zinc.....	44

## LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1. Consumo de agua en Quito y en algunas ciudades europeas (Alberti, 1994).....	2
Cuadro 1.2. Efluentes de la Industria Textil en el Ecuador (Punte, 2001).....	6
Cuadro 1.3. Consumo de agua por sector de actividad (Punte, 2001).....	7
Cuadro 1.4. Temperatura y pH de dos efluentes de empresas textiles ecuatorianas (Ayala, 2010 y Moncayo, 2010).....	7
Cuadro 2.1. Composición del medio de cultivo de Jiang <i>et al.</i> , 2004, modificada por Ayala (2010) y Moncayo (2010).....	20

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 2.1. Consorcios microbianos nativos utilizados en la presente investigación.....	21
Figura 2.2. Muestras de agua residual textil.....	22
Figura 2.3. Proceso de digestión de las muestras de la industria textil.....	23
Figura 2.4. Montaje del diseño experimental.....	25
Figura 2.5. Diluciones de las muestras del diseño experimental para la determinación de zinc por espectrofotometría de absorción atómica.....	26
Figura 2.6. Recubrimiento de las muestras con (a) carbono adhesivo y con oro (b).....	27
Figura 3.1. Curva de crecimiento de los consorcios microbianos M3 e I5 durante el proceso de activación de su metabolismo.....	29
Figura 3.2. Remoción de zinc con los consorcios I5 y M3, a) 5 mg.L <sup>-1</sup> ; b) 8 mg.L <sup>-1</sup> ; c) 10 mg.L <sup>-1</sup> zinc.....	33
Figura 3.3. pH durante la remoción de zinc con los consorcios microbianos M3 e I5 para las tres concentraciones de zinc.....	34
Figura 3.4. Crecimiento microbiano del consorcio M3 con cada concentración de zinc y el control.....	35
Figura 3.5. Crecimiento microbiano del consorcio M3 y el porcentaje de zinc residual para 5 mg.L <sup>-1</sup> zinc, b) 8 mg.L <sup>-1</sup> zinc y c) 10 mg.L <sup>-1</sup> zinc.....	36
Figura 3.6. Crecimiento microbiano del consorcio I5 con cada concentración de zinc y el control.....	37
Figura 3.7. Crecimiento microbiano del consorcio I5 y el porcentaje de zinc residual para a) 5 mg.L <sup>-1</sup> zinc, b) 8 mg.L <sup>-1</sup> zinc y c) 10 mg.L <sup>-1</sup> zinc.....	38
Figura 3.8. Porcentajes promedio de la remoción de zinc con ambos consorcios microbianos a las diferentes concentraciones de zinc ensayadas.....	40
Figura 3.9. Gráfico de perfil para las medias marginales estimadas del porcentaje de remoción de zinc entre los consorcios microbianos y las concentraciones de zinc.....	42
Figura 3.10. Fotografía en el microscopio óptico del consorcio microbiano I5.....	45
Figura 3.11. Fotografía en el microscopio óptico del consorcio microbiano M3.....	45
Figura 3.12. Micrografía electrónica de barrido del Consorcio I5 (Alexis Debut, Ph. D.).....	46
Figura 3.13. Micrografía electrónica de barrido del Consorcio M3 (Alexis Debut, Ph. D.).....	46

## **LISTADO DE ANEXOS**

ANEXO A: Análisis de zinc por espectrofotometría de absorción atómica de flama....	77
ANEXO B: Ordenanza Municipal del Distrito Metropolitano de Quito (2005) con los límites máximos permisibles por cuerpo receptor.....	78

## ABREVIATURAS

°C:	grado Celsius
DBO:	Demanda Bioquímica de Oxígeno
DQO:	Demanda Química de Oxígeno
EPA:	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
g:	gramo
h:	hora
I5:	Consortio microbiano anaerobio
kg:	kilogramo
L:	litro
M3:	consorcio microbiano aerobio
m <sup>3</sup> :	metro cúbico
mg:	miligramo
min:	minuto
mL:	mililitro
nm:	nanómetro
pH:	potencial de hidrógeno
rpm:	revoluciones por minuto
s:	segundo
µg:	microgramo
µm:	micrómetro

## RESUMEN

En la presente investigación el objetivo principal fue evaluar la capacidad de remoción de zinc de agua sintética a escala de laboratorio mediante la utilización de dos consorcios microbianos nativos vivos, I5 y M3. Los inóculos microbianos fueron proporcionados por el cepario del Laboratorio de Microbiología de la ESPE, los cuales se activaron en medio de cultivo fresco. Para verificar que el metabolismo de los microorganismos se encontraba activo, se probó si eran capaces de remover zinc utilizando 5 y 9 g.L<sup>-1</sup> de glucosa en el medio de cultivo, demostrando que la remoción de zinc con 5 g.L<sup>-1</sup> de glucosa fue menor comparada con la alcanzada con 9 g.L<sup>-1</sup> de glucosa para ambos consorcios microbianos. Además se realizó un muestreo dirigido de agua contaminada en una empresa textil ecuatoriana como referencia para la ejecución del diseño experimental. Finalmente, se empleó un arreglo dos factorial para evaluar el porcentaje de remoción de zinc. Se ensayaron tres concentraciones de zinc: 5, 8 y 10 mg.L<sup>-1</sup>, se monitoreó el pH y el crecimiento microbiano se determinó por siembra profunda. Adicionalmente, los consorcios microbianos I5 y M3 sin metal fueron observados por microscopía electrónica de barrido y microscopía óptica. Los resultados mostraron que los consorcios M3 e I5 fueron capaces de remover 24.9% y 23.6% de zinc en promedio, respectivamente, ambos en condiciones aerobias en un período de 13 días de incubación. Los consorcios microbianos I5 y M3 no mostraron diferencias estadísticas significativas en la remoción de zinc y removieron de igual manera 5 y 8 mg.L<sup>-1</sup> de zinc, mientras que con 10 mg.L<sup>-1</sup> de zinc la remoción fue diferente. Por otro lado, las concentraciones de zinc ensayadas aumentaron el crecimiento microbiano del consorcio M3 respecto del control, mientras que las mismas, disminuyeron el crecimiento del consorcio I5 respecto del control, aunque la remoción del metal existió en todas las concentraciones de zinc con una densidad celular del orden de 10<sup>9</sup>. El pH ácido del medio durante el período de incubación no influyó en la remoción de zinc lograda por los consorcios microbianos en el medio. Las micrografías de microscopía electrónica de barrido y de microscopía óptica de ambos consorcios microbianos sirvieron para observar levaduras y bacilos Gram negativos. Se demostró que los consorcios microbianos estudiados serían un potencial para ser utilizados en el tratamiento de aguas residuales textiles ecuatorianas luego del escalado correspondiente.

## ABSTRACT

In this research work, the primary objective was to evaluate the removal capacity of zinc in synthetic wastewater for laboratory scale by living two native microbial consortiums, I5 and M3. The microbial consortiums were obtained from Microbiology Laboratory from the ESPE and they were activated in a fresh culture medium. To verify the active metabolism of microorganisms, we tested the removal of zinc by assaying 5 and 9 g.L<sup>-1</sup> of glucose, demonstrating that removal of zinc with 5 g.L<sup>-1</sup> of glucose was lower compared to that achieved with 9 g.L<sup>-1</sup> glucose for both microbial consortiums. We also carried out a focused sampling of contaminated water in Ecuadorian textile industry as a reference for the implementation of experimental design. A two factor analysis was applied to evaluate the rate of removal of zinc. We tested three zinc concentrations: 5, 8 and 10 mg.L<sup>-1</sup>, the pH was monitored and the microbial growth was determined by the pour plate method. Furthermore, the microbial consortiums without zinc were observed by scanning electron microscopy and optical microscopy. The results showed that M3 and I5 consortiums were able to remove 24.9% and 23.6% of zinc on average, respectively, both under aerobic conditions in 13 incubation days. The microbial consortiums showed no statistically significant differences in the removal of zinc and they removed the same way 5 and 8 mg.L<sup>-1</sup> of zinc, whereas with 10 mg.L<sup>-1</sup> of zinc removal was different. On the other hand, the test concentrations of zinc increased the growth of consortium M3 regarding the control, while decreased growth of consortium I5 regarding the control, although the removal of metal existed at all zinc concentrations with a cell density to the order of 10<sup>9</sup>. The acid pH of the culture medium did not influence zinc removal. The scanning electron microscopy micrographs and of the optical microscopy of both microbial consortiums were used to observe yeast and Gram-negative bacillus. This study demonstrated that the microbial consortiums will be a potential to be used in the treatment of Ecuadorian textile wastewater after relevant scaling.

# CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

## 1.1. Formulación del problema

La preocupación por la preservación del medio ambiente en los últimos años se ha incrementado. La contaminación antrópica genera desechos contaminantes a cada instante, distorsionando los criterios de calidad de agua y aumentando el riesgo para la salud humana y el medio ambiente a través de efectos tóxicos sobre las plantas, los animales y el ser humano (Pérez, 2008).

Cada vez son más los efluentes que se generan en las diversas actividades industriales, con contenidos de zinc y otros metales pesados, surfactantes y sustancias tóxicas que deben ser tratados antes de ser vertidos, para evitar la toxicidad sobre la fauna y la flora (Castillo, 2004).

El Ecuador tiene varias empresas textiles cuyas aguas residuales deben cumplir con parámetros establecidos por los municipios locales y cuya descarga de residuos contaminantes y tóxicos, sin previo tratamiento o un tratamiento poco eficiente, dañan la vida acuática y el medio ambiente en general. La industria textil ecuatoriana fabrica productos de todo tipo de fibras, siendo las más utilizadas el algodón, el poliéster, el nylon, los acrílicos, la lana y la seda. Las provincias con mayor número de industrias dedicadas a esta actividad están ubicadas en Pichincha, Imbabura, Guayas, Azuay y Tungurahua (Ekos, 2006).

La industria textil es una de las actividades más contaminantes debido a los residuos que genera y a los altos consumos de agua, energía y reactivos químicos y posee uno de los efluentes más difíciles de tratar (Cruz, 2007). De hecho, la EPA en

1989 clasificó a la industria textil entre los diez principales generadores de desechos tóxicos en el inventario de descargas tóxicas sobre medios acuíferos.

El tratamiento físico-químico de los efluentes de una industria textil, debido a la complejidad, los elevados costos y la efectividad parcial que presentan, no suelen ser adecuados. Es necesario buscar nuevas alternativas amigables con el medio ambiente que descontaminen estos efluentes, como el uso de tratamientos biológicos. Según se constata en el primer informe de las Naciones Unidas sobre el desarrollo de los recursos hídricos del mundo, *Agua para todos, agua para la vida* (marzo 2003) se considera que para el 2025, el consumo de agua destinada a uso industrial alcanzará los 1.170 km<sup>3</sup>/año, cifra que en 1995 se situaba en 752 km<sup>3</sup>/año, por lo que es de vital importancia el tratamiento y la reutilización de aguas residuales del sector industrial en el mundo (Rodríguez *et al.*, 2006).

En las ciudades europeas, el consumo total de agua varía entre 100 y 500 L/hab/día, con cifras casi siempre inferiores a 250 (Cuadro 1.1). Al respecto, el consumo de agua en la ciudad Quito se revela elevado (Alberti, 1994).

**Cuadro 1.1.** Consumo de agua en Quito y en algunas ciudades europeas  
(Alberti, 1994).

<b>Ciudad</b>	<b>Consumo (L/hab/día)</b>
Ámsterdam	157
Barcelona	220
Berlín	133
Bruselas	150
Londres	150
París	112
<b>Quito</b>	<b>300</b>

## 1.2. Justificación del problema

Según la Secretaría Nacional del Agua, 2006, los principales usos del agua en el Ecuador son: riego (81.1%), uso doméstico (12.3%) y uso industrial (6.3%), dentro de este último se encuentra la industria textil.

En el Ecuador, la Dirección Metropolitana de Medio Ambiente, en su Ordenanza Municipal del Distrito Metropolitano de Quito (2005), establece el límite máximo permisible de descarga de zinc al alcantarillado y a un cauce de agua con  $2 \text{ mg.L}^{-1}$  de zinc, a lo que se deben acoger las diferentes empresas textileras (Anexo B).

Los metales pesados son utilizados en varios procesos textiles como agentes oxidantes, reductores y componente esencial en los colorantes. Pueden aparecer en el agua residual de las empresas textiles como impurezas de las partes metálicas de las maquinarias (Smith, 1989). Dependiendo de su concentración, inhiben o estimulan las reacciones bioquímicas. Algunos metales pesados como el zinc, son esenciales en cantidades traza para el funcionamiento de enzimas en organismos vivos. En exceso llegan a ser tóxicos e inhibitorios, no sólo por sus características sino por las concentraciones en las que pueden presentarse (Castillo, 2004).

Entre las tecnologías tradicionales para la remoción de metales pesados están la precipitación, coagulación, filtración e intercambio iónico, más costosas en términos energéticos y de consumo de productos químicos en comparación con los tratamientos biológicos. Estas tecnologías no funcionan por debajo de una concentración del metal de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  (Salinas *et al.*, 2000).

La biotecnología en los últimos años ha llamado la atención de la comunidad científica a través de varios procesos de biorremediación que surgen como una nueva alternativa a las técnicas convencionales. Así, algunos microorganismos y sus productos

son de gran aplicación en procesos de biosorción y bioacumulación de metales pesados en solución, ya que las interacciones entre los microorganismos y los metales pueden ocurrir a nivel de la pared celular o a nivel intracelular. El primero es un proceso pasivo netamente físico-químico, llevado a cabo mediante biomasa viva, muerta o inmovilizada, considerada una tecnología “limpia” y económicamente viable. El segundo es un proceso activo que involucra mecanismos metabólicos mediante biomasa viva (Vieira & Volesky, 2000).

El

uso de biomasa viva en la remoción de metales pesados constituye una buena alternativa ya que se auto renueva debido al crecimiento. Además, el transporte activo dentro de la célula puede conducir a mayores niveles de captación del metal y es posible que se excreten productos metabólicos que contribuyan a la remoción del metal. Por otro lado se pueden mejorar las cepas mediante el aislamiento de mutantes o la manipulación genética y emplear dos o más organismos de una manera sinérgica (Lovley, 2000; Macaskie, 1990).

También existen biosorbentes comerciales preparados con biomasa tratada químicamente o mezclada con material sintético que se puede utilizar en el proceso de remoción y desintoxicación de efluentes industriales que contengan metales pesados (Niu & Volesky, 2003).

En esta investigación se trabajó con consorcios microbianos nativos, evitando la incorporación de microorganismos nuevos al medio ambiente y la generación de un impacto ambiental negativo. Esto se realizó mediante la remoción de zinc en agua sintética para una posterior aplicación en el tratamiento de agua residual textil real luego del escalado correspondiente. Se trata de contribuir a solucionar la contaminación que se genera en la industria textil por sus efluentes contaminados que afectan la biodiversidad y la salud humana. Resultaría beneficiada la industria textil al cumplir con la legislación y disminuir los costos de tratamiento de sus efluentes.

### **1.3. Objetivos de la investigación**

#### **1.3.1. Objetivo General**

Evaluar la capacidad de biorremoción de zinc en agua sintética de dos consorcios microbianos nativos, a escala de laboratorio.

#### **1.3.2. Objetivos Específicos**

- Obtener los inóculos microbianos del cepario del Laboratorio de Microbiología de la ESPE.
- Activar los inóculos microbianos nativos compuestos.
- Producir la biomasa suficiente.
- Ejecutar el diseño experimental para la remoción de zinc mediante espectrofotometría de absorción atómica.
- Elaborar la curva de crecimiento microbiano durante la remoción de zinc.
- Analizar estadísticamente los datos obtenidos.
- Establecer el consorcio microbiano óptimo para la remoción de zinc.

### **1.4. Marco Teórico**

#### **1.4.1. Industria textil**

La industria textil es uno de los campos más competitivos a nivel mundial y busca reducir costos de producción. Su actividad está basada en la transformación de fibras naturales o sintéticas en prendas de vestir. La contaminación de sus efluentes

procede de las impurezas o residuos presentes en la materia prima, así como de los productos químicos que se le adicione en el proceso (García, 2010).

Esta industria involucra una serie de procesos, como la fabricación de fibras sintéticas y la producción de tejidos. El primer paso en la fabricación de un producto textil es la fabricación de fibras o en el caso de las fibras naturales, su preparación para volverlas útiles. Después, las fibras se transforman en hilados. Tanto la preparación, tintura y el acabado se pueden hacer en el hilo o en el producto terminado (Hendrickx & Boardman, 1995).

#### 1.4.2. Aguas residuales de la industria textil

Al norte de la ciudad de Quito, en el sector El Inca, se realizó un estudio de descontaminación de aguas de la ciudad en 1995, donde se señala que la industria textil genera aguas residuales con un promedio de 3.655 m<sup>3</sup> al mes y 1.37 mg.L<sup>-1</sup> de metales pesados (Da Ros, 1995).

La carga contaminante de este tipo de efluentes se caracteriza por tener zinc y otros metales pesados, además de fenol, detergentes, transportadores, igualadores y dispersantes (Vilaseca *et al.*, 1989) y de ser muy alcalina, tener alta DBO y DQO y de encontrarse a temperaturas elevadas (Cuadro 1.2).

**Cuadro 1.2.** Efluentes de la Industria Textil en el Ecuador (Punte, 2001).

Parámetro	Unidades	Hilos Acrílicos y Nylon	Hilos Acrílicos, Nylon y Algodón	Algodón y Sintéticos	Algodón	Seda viscosa Acetato
pH		3-5	8-11	9-11	8-11	8-10
DBO <sub>5</sub>	mg.mL <sup>-1</sup>	100-200	400-600	400-600	800-1500	100-300
DQO	mg.mL <sup>-1</sup>	500-800	800-1200	800-1200	800-1200	300-600
Aceites/Grasa	mg.mL <sup>-1</sup>	15-70	20-120	20-70	10-80	40-150
Sólidos en suspensión	mg.mL <sup>-1</sup>	40-100	100-200	200-300	200-300	100-200
Sólidos sedimentables	mL.L <sup>-1</sup>	1-10	1-10	0.1-5	0.1-5	0.1-2

Sólidos Totales	mL.L <sup>-1</sup>	2000-3000	2000-3000	2500-4000	2000-3000	3000-4500
-----------------	--------------------	-----------	-----------	-----------	-----------	-----------

La industria textil consume gran cantidad de agua, especialmente en el proceso de tinción (Cuadro 1.3), dependiendo de la actividad que se realice. El volumen de vertidos que se genera y su composición hacen de este sector industrial uno de los más contaminantes (Punte, 2001).

Los colorantes pueden contener metales como zinc, níquel, cromo y cobalto (ATMI, 1997). En algunos, estos metales son funcionales, es decir, forman parte integrante de la molécula del colorante, pero en la mayoría de los colorantes, los metales son impurezas generadas durante la fabricación de los colorantes (Acosta, 2007).

**Cuadro 1.3.** Consumo de agua por sector de actividad (Punte, 2001)

Teñido	L/Kg producido
Hilos de acrílico y nylon	130
Hilos acrílicos, nylon, algodón	180
Tejidos de punto y algodón	120
Tejidos de algodón y poliéster	110
Tejidos planos de algodón	110
Tejidos planos de seda y viscosa	100

El Cuadro 1.4 muestra información de los efluentes de dos industrias textiles ecuatorianas, muestreadas en Junio de 2009.

**Cuadro 1.4.** Temperatura y pH de dos efluentes de empresas textiles ecuatorianas (Ayala, 2010 y Moncayo, 2010).

Industria Textil	Tipo de tratamiento de sus efluentes	Temperatura (°C)	pH
1	Ninguno	14.5	10.31
2	Biológico	21.2	6.39

#### 1.4.3. Metales Pesados

Son elementos con densidad igual o superior a  $5 \text{ g.mL}^{-1}$  y cuyo número atómico es superior a 20, excluyendo a los metales alcalinos y alcalinos térreos (Escorza, 2007).

Con el creciente desarrollo industrial, los metales pesados han pasado a formar parte de los efluentes de las actividades industriales. Este es un problema que no sólo involucra al Ecuador, sino a nivel mundial, dado que los metales pesados tienden a acumularse y biomagnificarse, afectando directamente a la cadena trófica en un ecosistema. En la industria textil, las concentraciones metálicas de más de  $75 \text{ mg.L}^{-1}$  se encuentran en las fibras de algodón en crudo. Sin embargo, cuando el hilo de algodón o tela ingresan al molino, junto con la maquinaria para su procesamiento, pueden generar incluso concentraciones más elevadas de metales (Smith, 1989).

Los metales pesados no pueden ser degradados, por lo que su tratamiento biológico consiste en la detoxificación e inmovilización del mismo, para disminuir su toxicidad biológica y retardar el transporte del metal (Roane *et al.*, 2001). El grado de peligrosidad de los metales pesados está relacionado con su toxicidad y persistencia. Cañizares, 2000, señala que los metales pesados tienen efectos tóxicos en las células, como resultado de su capacidad para alterar o desnaturalizar proteínas.

Dentro de los metales pesados se identifican dos grupos: los oligoelementos o micronutrientes necesarios en pequeñas cantidades para que los organismos completen su ciclo vital, como por ejemplo, el zinc, el selenio, el manganeso, el boro, entre otros. Por otro lado, están los metales pesados sin función biológica conocida como el cadmio, el mercurio, el níquel, el plomo, entre otras (Orellana, 2009).

En los últimos 20 años, se han estudiado el uso de los metales pesados como biosensores, mediante el uso de sondas que integran un componente biológico con un traductor electrónico convirtiendo una señal bioquímica en una respuesta eléctrica

cuantificable (Vílchez, 2005). Así, se encuentran disponibles en la actualidad biosensores bacterianos comerciales, en forma de *kits* para probar la toxicidad del zinc en una muestra. El *kit BIOMET™* está disponible en los Países Bajos para la determinación de la biodisponibilidad del zinc (Strosnider, 2003).

#### 1.4.4. **Zinc**

Es un metal brillante de color blanco azulado y el vigésimo cuarto elemento más abundante de la corteza terrestre. Tiene una valencia +2 y forma complejos con aniones, aminoácidos y ácidos orgánicos. Su punto de fusión es 419 °C y el de ebullición es 950 °C (NPI, 2010; Smith, 2008). El zinc puro reacciona rápidamente con el oxígeno y la humedad del aire. Como la mayoría de otros metales, el zinc sólido se compone de muchos cristales que son demasiado pequeños para verse a simple vista (Cavendish, 2005).

Se utiliza en la producción de latón, pilas secas y piezas fundidas para artículos de ferretería y automotrices. Así como en fertilizantes, aleaciones, pinturas, tintes y llantas. El zinc es uno de los emisores directos de contaminantes inorgánicos en el agua, principalmente de aquellas que provienen de la industria textil, metálica e instalaciones de calcinación y sintetización de minerales metálicos, industria química, de la madera y papel (Rodríguez *et al.*, 2006).

#### 1.4.5. **Papel biológico del zinc**

El zinc es un microelemento esencial para los organismos vivos que participa en actividades enzimáticas, en animales y plantas. Es uno de los componentes de más de cien enzimas diferentes, entre ellas la fosfatasa alcalina, pero también forma parte de proteínas no enzimáticas (Castillo *et al.*, 2005).

En cantidades traza es esencial para las rutas metabólicas microbianas. De esta forma, cuando la concentración de zinc excede lo requerido por los microorganismos, comienza a ser tóxica. Este metal es uno de los esenciales para el metabolismo, vital para el buen funcionamiento de más de 200 enzimas, para la estabilización del ADN y la expresión de genes y la transferencia de señales nerviosas. El cuerpo humano contiene 2-3 g de zinc y es encontrada en todo el cuerpo, teniendo los niveles más altos en los músculos, el hígado, los riñones y huesos (IZA, 1997).

Se encuentra en los alimentos comúnmente consumidos, en especial los de origen animal, particularmente los de procedencia marina, pero también lo podemos encontrar en ostras, carnes rojas, pescado, aves, leche, mariscos, hígado, cereales y nueces (Mataix, 2005; Verdugo & Yunga, 2009).

#### 1.4.6. Toxicidad del zinc

El zinc es uno de los metales que tiene un papel dual debido a su toxicidad pero a la vez elemento esencial en las células. Es perjudicial en los seres vivos como producto de su acción sobre grupos funcionales vitales, desplazamiento de elementos esenciales del lugar de coordinación, así como modificaciones estructurales de algunos sitios activos o la ruptura de biomembranas (Vílchez, 2005).

Presenta su efecto tóxico en varias especies a diversas concentraciones. El efecto tóxico sobre la trucha de río (*Salmo gairdneri*) es de 26.2  $\mu\text{g.L}^{-1}$  y en un crustáceo (*Daphnia*) es 8.9  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , expresando la toxicidad como la concentración letal en  $\mu\text{g.L}^{-1}$  que mata al 50% de todos los organismos de la especie ( $\text{LC}_{50}$ ) después de 96 h de contacto (Lankford & Eckenfelder, 1992).

No se ha encontrado bioconcentración de zinc en organismos terrestres en niveles significativos, aunque sí en organismos acuáticos, como las ostras, lo que se

explica por su alimentación basada en la acumulación de partículas en suspensión (Muñoz, 2007). La toxicidad del zinc en los microorganismos es causada por su interacción con grupos sulfhidrilo y otros radicales enzimáticos, así como otras proteínas (Nweke, 2009).

#### 1.4.7. Tratamientos físico-químicos de los efluentes textiles

Uno de los problemas que enfrenta la industria textil es la eliminación de materia en suspensión. Una de las alternativas es la adición de ciertos reactivos químicos que la desestabilicen (coagulación) y que favorezcan la floculación de la misma para obtener partículas fácilmente sedimentables (Rodríguez *et al.*, 2006).

Otra tecnología nueva es la ultrafiltración, utilizada para la recuperación de polímeros sintéticos en la industria textil. Es definida como un método de filtración de flujo transversal, similar a la ósmosis inversa pero con presiones más bajas que utiliza una membrana para separar partículas coloidales pequeñas y moléculas grandes del agua y otros líquidos, sin embargo, tiene costos elevados (Brady, 2003).

En la industria textil se utilizan grandes volúmenes de agua, por lo que es necesaria su reutilización para disminuir tal consumo de agua. Por ello, la ósmosis inversa es una buena alternativa para este problema. Sin embargo, cualquier instalación de ósmosis inversa presentará a medio o largo plazo problemas de ensuciamiento de las membranas que hacen necesaria la realización de limpiezas, lo que implica aún más costos, ya que el protocolo de limpieza dependerá del tipo de depósito presente en las membranas (Vigo *et al.*, 2006).

Para la eliminación de metales pesados existen varios tratamientos: la precipitación química, que suele utilizarse como tratamiento primario de eliminación. Otro es el intercambio iónico, en el que la separación de metales se basa en la propiedad

de algunos materiales de intercambiar de forma reversible grupos catiónicos con los metales del efluente y que suele utilizarse como tratamiento secundario después de la precipitación. Además de la adsorción, donde la sustancia adsorbida se une a la superficie del adsorbente mediante fuerzas físicas y la ósmosis inversa, que consiste en separar los iones metálicos del efluente haciéndolos pasar por una membrana semipermeable a alta presión, para que los iones metálicos queden retenidos en la membrana (Castillo, 2004).

#### **1.4.8. Tratamientos biológicos de los efluentes de la industria textil**

Los tratamientos biológicos constituyen procesos que tienen en común el uso de microorganismos para llevar a cabo la eliminación de componentes indeseables del agua. Esto es posible mediante el aprovechamiento de la actividad metabólica de los mismos sobre esos componentes, constituyendo una buena alternativa conjuntamente con procesos físico-químicos para efluentes con baja carga orgánica (Rodríguez *et al.*, 2006; Vilaseca *et al.*, 1989).

La remoción de metales pesados por medio de microorganismos es considerada de gran importancia en los ciclos biogeoquímicos. El uso de microorganismos es benéfico ya que es una técnica menos agresiva para la naturaleza porque no afecta la diversidad natural de la misma, además de ser menos costosa que los métodos tradicionales (Almaguer & Garza, 2004; Toledo, 2009).

##### **1.4.8.1. Microorganismos**

En la década de los ochenta se comenzó a demostrar las capacidades de remoción de metales pesados de varios microorganismos en efluentes líquidos, con la finalidad de desarrollar nuevos tratamientos alternativos a los métodos tradicionales. Los microorganismos pueden adaptarse a agentes contaminantes, como los metales

pesados, que aunque no los pueden destruir, sí pueden influir en su movilidad en el medio ambiente, mediante la modificación de sus características físicas y/o químicas (Wase & Forester, 1997).

Las comunidades microbianas consisten en dos o más organismos que viven en estrecha proximidad e interactúan entre sí y donde generalmente un grupo se beneficia de las acciones del otro (Eweis *et al.*, 1999). Presentan varias características que los diferencian de los cultivos puros, ofreciendo ventajas. Entre ellas se encuentran la provisión de nutrientes específicos por los diferentes miembros de la comunidad y la moderación de la inhibición del crecimiento. Además del cometabolismo y la interacción entre varias especies dominantes (Christian & Capone, 1997).

En Ecuador, la contaminación de los efluentes con metales ha incentivado la línea de investigación de biorremediación de metales pesados mediante su precipitación utilizando consorcios de bacterias sulfato-reductoras (SRB) y sorción fúngica (*Penicillium*) de metales con biomasa viable y no viable (Sanmartín, 2009).

Se han realizado otros estudios con los consorcios microbianos utilizados en este trabajo, comprobándose que son capaces de remover colorantes textiles reactivos, cromo y fenol (Ayala, 2010; Moncayo, 2010; Guevara, 2010; Montenegro, 2010) y se está investigando la posible remoción de cobre y detergentes en agua residual sintética.

En otros lugares del mundo, como en Sudáfrica, se ha utilizado un sistema integrado por un consorcio de bacterias sulfato reductoras y algas para la remoción de zinc, alcanzando valores del 90% (Rose *et al.*, 1998). En Egipto y en Bolivia también se ha investigado la capacidad de remoción de zinc mediante bacterias sulfato reductoras, obteniendo porcentajes de remoción de hasta el 100% (El Bayoumy *et al.*, 1999; Chávez, 2006).

En el 2008, Lee y colaboradores en Corea, emplearon consorcios microbianos en condiciones de agitación para realizar ensayos de remoción de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de zinc y otros metales pesados de aguas contaminadas, obteniendo 99-100% e identificando a uno de los microorganismos presentes en el cultivo como *Ralstonia* sp. HM-1.

Los sistemas por los que los microorganismos expulsan o acumulan zinc cuando se encuentran con concentraciones altamente tóxicas para su sobrevivencia son el transporte, la formación de complejos extracelulares y la precipitación (Cañizares, 2000). Por ejemplo, las metalotioneínas, proteínas ricas en cisteína, han demostrado que se unen al zinc y que son inducidas en situaciones de estrés actuando como un mecanismo de defensa en contra de la toxicidad (Mejía, 2006).

Se ha visto que varias bacterias son capaces de acumular zinc: *Bacillus licheniformis* IAM 11054, *Brevibacterium helvolum* IAM 1637, *Corynebacterium equi* IAM 1038, *Micrococcus luteus* IAM 1056, *Nocardia rugosa* KCC A0193, *Pseudomonas radiola* IAM 12098, entre otras. Así también, existe información documentada de levaduras, hongos y actinomicetos que lo acumulan, como: *Debaryomyces hansenii* AHU 3759, *Endomycopsis fibuligera* AHU 4113, *Hansenula anómala* AHU 3702, *Fusarium oxysporum* IAM 5009, *Rhizopus arrhizus* AHU 6573, *Micromonospora chalcea* KCC A0124, *Streptomyces hirosimensis* HUT 6033, entre otros (Nakajima & Sakaguchi, 1986).

En la Ciudad de Monterrey (México) se aislaron 72 microorganismos con alta capacidad de tolerar zinc a partir de muestras de agua y sedimentos de tres ríos, lodos activados de una planta de tratamiento de agua de una empresa procesadora de hidrocarburos y del agua industrial de una planta productora de pigmentos. De los cuales, 18 bacterias (11 Gram positivas y 7 Gram negativas), 49 hongos filamentosos, 2 levaduras y 3 algas toleraron  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  de zinc (Garza, 2005).

Se han realizado otros trabajos, como el de la Universidad de la Habana (Cuba), donde se estudió la eficiencia de remoción de zinc de *Pseudomonas mendocina* y *Saccharomyces cerevisiae* mediante la combinación de diferentes factores como la edad fisiológica del cultivo, el pH y el efecto de tratamientos físicos y químicos a la biomasa microbiana, obteniendo remociones de zinc del 98% (Carballo *et al.*, 2009). Similares resultados expone Chen & Wang, 2007, al evaluar la capacidad de remoción de zinc con *Saccharomyces cerevisiae*, obteniendo remociones del 76.4-92.8%. Mientras que en la India, Saravanan *et al.*, 2009, investigaron la remoción de zinc con la alga marina *Sargassum* sp., obteniendo remociones del 53% bajo condiciones controladas de pH, temperatura y velocidad de agitación.

En países más desarrollados como Estados Unidos, los efluentes de zinc y otros metales pesados de la mina de Homestake pasan a través de canales que contienen algas, bacterias y plantas superiores, obteniendo remociones de zinc mayores al 99% (Gale & Wixson, 1979).

Además, existen biosorbentes comerciales como BIO-FIX, que utilizan biomasa de diferentes fuentes, como cianobacterias, levaduras, algas y plantas que se mezclan con gomas para dar un producto consistente y luego se inmovilizan. La captación de zinc que se obtiene mediante este proceso supera aproximadamente 4 veces a la alcanzada con una resina de intercambio iónico. Existen otros biosorbentes a la venta como Mediaflex<sub>MC</sub>, reportado como eficiente en el tratamiento de varios tipos de efluentes, actuando como un biofiltro con propiedades de adsorción y precipitación en la remoción de zinc y otros metales pesados (Kawatra & Natarajan, 2001).

#### **1.4.8.2. Mecanismos de remoción de zinc mediante los microorganismos**

Como se ha venido mencionando, los mecanismos que utilizan los microorganismos para evadir los efectos tóxicos del zinc son varios, entre los que se encuentran la adsorción sobre la membrana externa, el transporte mediante bombeo una

vez que el zinc ha sido captado por vías específicas y el secuestro por proteínas periplásmicas o citoplasmáticas u otros ligandos como gránulos de polifosfato (Choudhury & Srivastava, 2001).

#### 1.4.8.2.1. **Bioacumulación**

La bioacumulación es un proceso activo que se basa en la actividad metabólica y requiere de energía celular, por tanto se produce únicamente en los organismos vivos. En este proceso ocurren dos pasos. Primero, existe una unión pasiva de los iones metálicos a la superficie de la pared celular por procesos físicos o químicos. Segundo, estos iones son transportados al interior de la célula por sistemas energéticos microbianos, donde es secuestrado por metalotioneínas (proteínas ricas en grupos sulfhidrilos) o compartimentalizado dentro de una vacuola. *Pseudomonas* y *Thiobacillus* son ejemplos comunes de especies bacterianas que son capaces de realizar este proceso (Vance, 1994).

El proceso de bioacumulación se da debido a la imposibilidad del organismo afectado de mantener los niveles necesarios de excreción del contaminante, por lo que sufre una retención en el interior del mismo (Lankford & Eckenfelder, 1992). En la actualidad se conocen los factores que son vitales en la bioacumulación de los metales pesados, como la composición de la pared celular de los microorganismos, la composición química de la célula o los factores físico-químicos externos. Por tanto se muestran varias ventajas frente a otros métodos biotecnológicos, como la captura eficaz y rápida del metal, absorción selectiva, rápida producción de biomasa y la reutilización de la misma a bajo costo (Vílchez, 2005).

Se ha visto que la tasa de captación de los metales es usualmente más lento que en la bioadsorción, sin embargo, su selectividad es mejor que la bioadsorción (Eccles, 1999).

#### 1.4.8.2.2. **Bioadsorción**

La bioadsorción es uno de los procesos reversibles utilizados por los microorganismos (vivos o muertos) para la remoción del zinc y otros metales pesados, los cuales se adsorben pasivamente a la superficie celular que tiene grupos funcionales expuestos hacia el exterior celular. Se pueden identificar dos tipos de grupos funcionales: débilmente reactivos como lípidos o glucanos en los cuales los grupos hidroxilos son reactivos y los fuertemente reactivos como ácidos carboxílicos, aminoácidos y proteínas (Guibal *et al.*, 1995).

Presenta alta afinidad por los metales si se encuentra bajo condiciones favorables. La tasa de captación del metal es usualmente rápida y sucede a los pocos segundos, ya que se acumula en la pared externa de la célula (Eccles, 1999). Otras de las ventajas de la adsorción son su capacidad de tratar grandes volúmenes de agua contaminada debido a la rapidez del proceso, el uso de materiales renovables que pueden ser producidos con escaso costo, la capacidad de manejar muchos metales pesados y residuos mezclados, la gran reducción en el volumen de los residuos peligrosos producidos, el bajo capital invertido, el no ser afectado por inhibidores del metabolismo y su actuación bajo un amplio rango de condiciones físico-químicas como la temperatura, el pH y la presencia de otros iones (Manzanares & Lozano, 2007).

#### 1.5. Sistema de hipótesis

La concentración de zinc se ve reducida en agua sintética mediante el uso de dos consorcios microbianos nativos, a escala de laboratorio.

## **CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. Participantes**

La investigación fue realizada en la Escuela Politécnica del Ejército, Carrera de Ingeniería en Biotecnología, con la colaboración de la Subsecretaría de Control, Investigación y Aplicaciones Nucleares (SCIAN) y el Centro de Investigaciones Científicas (CEINCI) de la ESPE.

El trabajo experimental, así como la planificación de la investigación fueron realizados por la Señorita Diana García, dirigido por la Doctora Blanca Naranjo (directora de tesis) y la MC. Alma Koch (codirectora de tesis). Con el asesoramiento del Ing. Enrique Arévalo en el manejo del Equipo de Absorción Atómica, del Ph. D. Alexis Debut, quien realizó las micrografías de las muestras en el microscopio electrónico de barrido y del Ing. Pedro Romero que contribuyó al análisis estadístico de los datos.

### **2.2. Zona de estudio**

Los consorcios microbianos utilizados en este estudio fueron aislados de suelo contaminado por agua residual textil y exposición al aire de medio de cultivo con colorante (Ayala, 2010; Moncayo, 2010).

El trabajo de investigación fue realizado en el Laboratorio de Microbiología del Centro de Investigaciones Científicas de la Escuela Politécnica del Ejército.

### **2.3. Período de tiempo de investigación**

La investigación fue realizada desde junio de 2009 hasta julio de 2010.

## 2.4. Diseño experimental

Se empleó un arreglo factorial 2x3 (Tabla 2.1). La variable evaluada en la presente investigación fue el porcentaje de remoción de zinc. Con los datos obtenidos se realizó la prueba de Levene, el análisis de varianza y la prueba de Tukey con un intervalo de confianza del 95% para conocer los grupos de homogeneidad.

**Tabla 2.1.** Arreglo factorial de 2x3 utilizado en el diseño experimental

<b>Factor 1:</b> Inóculo microbiano	<b>Factor 2:</b> Concentración de zinc
I1: Inóculo M3	C1: 5 mg.L <sup>-1</sup>
I2: Inóculo I5	C2: 8 mg.L <sup>-1</sup>
	C3: 10 mg.L <sup>-1</sup>

## 2.5. Procedimientos

### 2.5.1. Obtención y activación de los inóculos microbianos nativos compuestos del cepario del Laboratorio de Microbiología con el fin de obtener la biomasa necesaria para el proceso de remoción de zinc.

Los dos consorcios microbianos nativos: consorcio microbiano en condiciones anaerobias (I5) y el consorcio microbiano en condiciones aerobias (M3) fueron proporcionados por el cepario del Laboratorio de Microbiología de la ESPE (Figura 2.1). Fueron activados en el medio de cultivo de Jiang *et al.*, 2004 modificado (Cuadro 2.1), para comprobar si estaban metabólicamente funcionando y usarlos en la presente investigación.

**Cuadro 2.1.** Composición del medio de cultivo de Jiang *et al.*, 2004, modificada por Ayala (2010) y Moncayo (2010).

Soluciones Madre	Concentración (g.L <sup>-1</sup> )
Glucosa (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	5
Sulfato de amonio ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	4
Fosfato monobásico de potasio (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	2
Fosfato dibásico de potasio (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1
Sulfato de magnesio monohidratado (MgSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O)	0,2
Cloruro de sodio (NaCl)	0,1
Sulfato de calcio (CaSO <sub>4</sub> )	0.06
EDTA sal disódica	0.0014
Sulfato ferroso (FeSO <sub>4</sub> )	0.0010
Solución tampón fosfato a pH 6	

El consorcio M3 fue activado mediante la transferencia de 10 mL del consorcio microbiano madre M3 a un matraz de 500 mL, conteniendo 200 mL de medio de cultivo (5% del volumen), con una agitación constante de 45 rpm a 35°C por 48 h (Ayala, 2010).

El consorcio I5 fue activado mediante la transferencia de 82 mL del consorcio microbiano madre I5 a un frasco tapa rosca de 500 mL, conteniendo 410 mL de medio de cultivo (20% del volumen), sin agitación a 35°C por 72 h (Moncayo, 2010).



**Figura 2.1.** Consorcios microbianos nativos utilizados en la presente investigación.

M3: consorcio microbiano en condiciones aerobias.

I5: consorcio microbiano en condiciones anaerobias.

#### **2.5.1.1. Remoción de 3 mg.L<sup>-1</sup> de zinc por acción de los consorcios microbianos en agitación en presencia de diferentes concentraciones de glucosa**

Con la finalidad de conocer si los consorcios microbianos estaban con su metabolismo activo se procedió a comprobar si eran capaces de remover zinc.

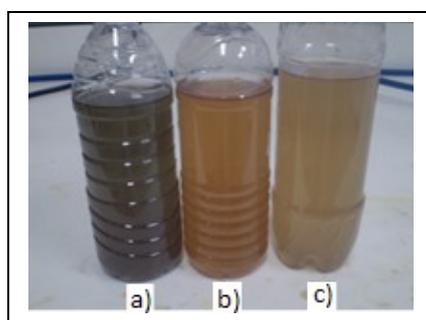
El estudio se realizó en dos partes, la primera se llevó a cabo con una concentración de glucosa de 9 g.L<sup>-1</sup> en el medio de cultivo y se lo hizo en erlenmeyers de 100 mL, en los que se añadió 70 mL de medio de cultivo y se colocó 3 mg.L<sup>-1</sup> de zinc (sulfato de zinc, ZnSO<sub>4</sub>). Además, se inocularon por separado los dos consorcios microbianos: M3 e I5, con una concentración inicial de 4.8x10<sup>6</sup> células.mL<sup>-1</sup> y de 6.6x10<sup>6</sup> células.mL<sup>-1</sup> respectivamente (Ayala, 2010; Moncayo, 2010).

La segunda parte se llevó a cabo con una concentración de glucosa de 5 g.L<sup>-1</sup> en el medio de cultivo, en erlenmeyers de 100 mL. Se colocó 70 mL de medio de cultivo y 3 mg.L<sup>-1</sup> de zinc (sulfato de zinc, ZnSO<sub>4</sub>). Además, se inocularon por separado los dos consorcios microbianos: M3 e I5, con una concentración inicial de 6.8x10<sup>6</sup> células.mL<sup>-1</sup> y de 9.1x10<sup>6</sup> células.mL<sup>-1</sup> respectivamente (Ayala, 2010; Moncayo, 2010).

Los consorcios microbianos se mantuvieron en agitación constante a 150 rpm a 35°C (Chowdhury *et al.*, 2010). Las muestras que fueron tomadas se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 min (Moreno *et al.*, 2002). Se realizaron diluciones para determinar la concentración de zinc residual mediante espectrofotometría de absorción atómica en la solución acuosa, además de realizar recuento por siembra profunda.

### 2.5.1.2. Muestreo de agua contaminada en una industria textil como referencia para la ejecución del diseño experimental.

Se realizó un muestreo dirigido, en el que se tomaron muestras del agua contaminada en una empresa textil. Los sitios muestreados correspondieron a tres puntos de la empresa textil: zona de descarga del área de los procesos textiles, zona de descarga total de la empresa textil sin tratamiento y zona de descarga una vez finalizado el tratamiento químico del agua residual (Figura 2.2).



**Figura 2.2.** Muestras de agua residual textil.

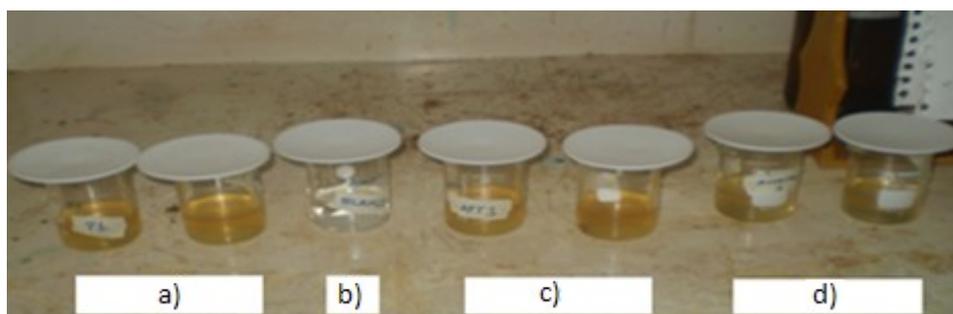
- a) Agua de los procesos textiles. b) Agua antes de ingresar a la planta de tratamiento químico. c) Agua tratada que se descarga.

La toma de muestras de los tres puntos de descarga indicados se realizó de la siguiente manera: se procedió a lavar con el agua del punto de muestreo tanto el balde donde se mezclaron las muestras, como la jarra graduada utilizada para la toma individual de las mismas. Se recolectó 1 L de muestra de agua cada 15 min y se realizaron lecturas de pH y temperatura *in situ*. El muestreo duró 2 h, después del cual se homogeneizaron las muestras y se midió nuevamente el pH y la temperatura final de la muestra compuesta (Moncayo, 2010).

Con los 8 L de muestra, se procedió a enjuagar los envases de plástico con la muestra de agua compuesta y se los llenó hasta el borde. De acuerdo a lo especificado por la Dirección del Medio Ambiente, 1998, las muestras fueron etiquetadas y transportadas en un termo hasta el Laboratorio de Microbiología, donde se preservaron

con ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) concentrado hasta  $\text{pH} \leq 2$  y se almacenaron en un refrigerador a  $4^\circ\text{C}$  hasta su preparación para el análisis.

Las muestras fueron digeridas (Figura 2.3) como lo indican los Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales (1992). Se tomaron 25mL de la muestra, se adicionó 10 mL de ácido nítrico concentrado y se pasó a un vaso de precipitación. Se colocó el vaso sobre una plancha de calentamiento y se evaporó hasta un volumen final de aproximadamente 15 mL, se dejó enfriar por 1 h. Se adicionó 10mL de ácido clorhídrico (35%) y se calentó por 15 min para disolver cualquier posible precipitado o residuo, se dejó enfriar por 1 h, se aforó a 25 mL con agua destilada y se midió la concentración de zinc mediante Espectrofotometría de Absorción Atómica.



**Figura 2.3.** Proceso de digestión de las muestras de la industria textil.

a) Agua de los procesos textiles. b) Control. c) Agua tratada que se descarga. d) Agua antes de ingresar a la planta de tratamiento químico.

## 2.5.2. Ejecución del diseño experimental para la remoción de zinc mediante espectrofotometría de absorción atómica.

### 2.5.2.1. Preparación de la solución sintética de zinc.

Se preparó una solución madre de zinc de  $1000 \text{ mg.L}^{-1}$  con sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) de grado analítico (Fisher Scientific) y se autoclavó por 20 min a  $121^\circ\text{C}$ .

### 2.5.2.2. Montaje del diseño experimental

El diseño experimental para la remoción de zinc se realizó en erlenmeyers de 250 mL, a los que se añadió 140 mL de medio de cultivo y se colocó según el caso, las concentraciones: 5 mg.L<sup>-1</sup>, 8 mg.L<sup>-1</sup> y 10 mg.L<sup>-1</sup> de zinc (sulfato de zinc, ZnSO<sub>4</sub>). Además, se inocularon por separado los dos consorcios microbianos: M3 e I5, con una concentración inicial de 7.4x10<sup>6</sup> células.mL<sup>-1</sup> y de 6.7x10<sup>6</sup> células.mL<sup>-1</sup> respectivamente (Ayala, 2010; Moncayo, 2010) y se colocaron al azar en la incubadora con agitación (Figura 2.4).

Los consorcios microbianos se mantuvieron en agitación constante a 150 rpm a 35°C (Chowdhury *et al.*, 2010). Se tomaron muestras en los días dos, nueve y trece, para esto se centrifugaron las muestras a 13000 rpm durante 5 min (Moreno *et al.*, 2002). Se hicieron diluciones para determinar la concentración de zinc residual en la solución acuosa, además de realizar recuento por siembra profunda y de controlar el valor de pH.



**Figura 2.4.** Montaje del diseño experimental.

### 2.5.2.3. Determinación de la concentración de zinc

La concentración de zinc residual fue determinada por espectrofotometría de absorción atómica con la técnica de flama (SpectrAA-240FS, Varian). Se prepararon estándares de zinc por dilución con agua destilada a diferentes concentraciones, partiendo de un estándar certificado de zinc de  $1000 \text{ mg.L}^{-1}$ , con el fin de realizar la curva de calibración del Equipo de Absorción Atómica (APHA, AWWA y WPCF, 1992)

Para la medición de zinc en el Equipo de Absorción Atómica, se realizaron las lecturas de los estándares en orden ascendente de concentración y luego la lectura de las muestras (Figura 2.5), previamente centrifugadas, a una longitud de onda de  $213.9 \text{ nm}$ , obteniendo la concentración de zinc de la curva de calibración (Anexo A).



**Figura 2.5.** Diluciones de las muestras del diseño experimental para la determinación de zinc por espectrofotometría de absorción atómica.

La variable evaluada fue el porcentaje de remoción de zinc, calculado mediante la siguiente ecuación:

$$\%R = \frac{C_i - C_f}{C_i} * 100$$

Donde:

$C_i$  = concentración inicial de zinc,  $\text{mg.L}^{-1}$

$C_f$  = concentración final de zinc,  $\text{mg.L}^{-1}$

### **2.5.3. Elaboración de las curvas de crecimiento microbiano durante la remoción de zinc.**

Se realizó el método de siembra profunda para elaborar las curvas de crecimiento de los consorcios microbianos, en presencia del zinc en el medio de cultivo (Brown, 2007).

### **2.5.4. Análisis adicional: Preparación de los consorcios microbianos I5 y M3 para su observación en Microscopía Electrónica de Barrido.**

#### **2.5.4.1. Microscopía Electrónica de Barrido**

Los consorcios microbianos I5 y M3 en ausencia de zinc que fueron procesados para su observación en el microscopio electrónico de barrido se encontraban en una fase estacionaria (Carballo *et al.*, 2009). Fueron autoclavados a 121 °C por 30 min (Vásquez, 2005) y lavados tres veces con agua destilada estéril (Dokland *et al.*, 2006). Se tomaron 15 mL del cultivo de los consorcios en tubos plásticos y se centrifugó a 4000 rpm por 10 min a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se dejó en soluciones de alcohol de 50, 60 70, 80 y 90%, durante 1 h en cada uno. El precipitado se dejó en alcohol al 99.5% por una noche (Kuo, 2007).

Las muestras deshidratadas por el alcohol se extrajeron con ayuda de una pinza y se colocaron sobre un cubreobjeto limpio, haciendo cortes con precaución para no dañar la muestra. Posteriormente fueron secadas en una estufa de secado al vacío por 3 h a 30°C (Reed, 2005).



**Figura 2.6.** Recubrimiento de las muestras con (a) carbono adhesivo y con oro (b).

Las muestras secas se colocaron sobre un soporte, se recubrieron con carbono adhesivo y se les colocó en el equipo sombreador de oro (Figura 2.6), luego del cual las muestras estuvieron listas para su observación en el microscopio electrónico de barrido (Bozzola & Russell, 1999).

#### **2.5.4.2. Microscopía Óptica.**

Los consorcios microbianos también fueron observados en el microscopio óptico, para lo cual se realizó la tinción de Gram siguiendo el protocolo tradicional (Prescott *et al.*, 2009).

#### **2.6. Análisis de datos**

Se realizó el análisis de los datos en el programa estadístico SPSS 15.0. Para comprobar la homogeneidad de la varianza del porcentaje de remoción de zinc en todos los grupos estudiados se realizó la Prueba de Levene.

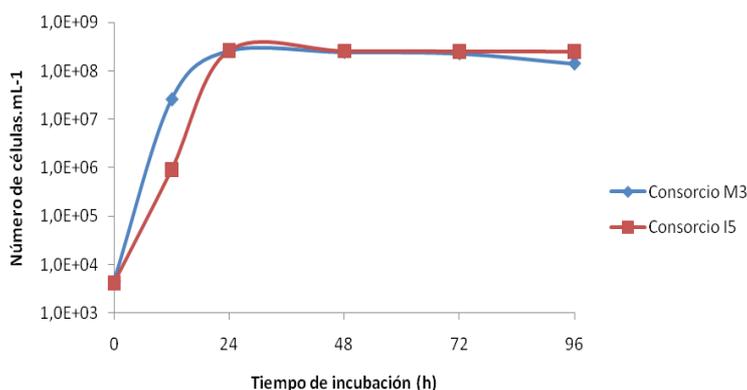
Con el análisis de varianza, para el arreglo factorial 2x3 se pudo revelar si existía algún tratamiento diferente al resto en cuanto al porcentaje de remoción de zinc. Con las pruebas de Tukey se diferenciaron los diversos grupos en función al porcentaje de remoción de zinc. Además, se determinó el mejor de los grupos para la remoción de zinc.

Con el programa estadístico SPSS y el programa Excel 2007 se realizó el gráfico de perfil, el gráfico de barras y los gráficos de crecimiento microbiano y de pH durante la remoción de zinc.

## CAPÍTULO 3: RESULTADOS

### 3.1. Activación de los inóculos microbianos nativos compuestos del cepario del Laboratorio de Microbiología con el fin de obtener la biomasa necesaria para el proceso de remoción de zinc.

Los consorcios microbianos I5 y M3 al ser activados en el medio de cultivo de Jiang *et al.*, 2004 modificado, mostraron luego de 24 h de incubación una densidad celular del orden de  $10^8$  que se mantuvo durante 48 h, después del cual se evidenció una disminución paulatina de su crecimiento (Figura 3.1).



**Figura 3.1.** Curva de crecimiento de los consorcios microbianos M3 e I5 durante el proceso de activación de su metabolismo.

**3.1.1. Remoción de 3 mg.L<sup>-1</sup> de zinc por acción de los consorcios microbianos con agitación en presencia de diferentes concentraciones de glucosa.**

Para comprobar la remoción de zinc por los consorcios microbianos, se trabajó bajo condiciones de agitación, con dos diferentes concentraciones de glucosa.

**3.1.1.1. Remoción de zinc con 5 g.L<sup>-1</sup> de glucosa.**

La prueba de Levene comprobó la homogeneidad de las varianzas en la remoción de 3 mg.L<sup>-1</sup> de zinc con 5 g.L<sup>-1</sup> de glucosa para ambos consorcios con una significancia mayor al 5% (p=0.150). En el ANOVA (Tabla 3.1) de la remoción de zinc con 5 g.L<sup>-1</sup> de glucosa se concluyó que la actuación de los consorcios microbianos fue diferente debido a su significancia estadística.

**Tabla 3.1.** Análisis de varianza del porcentaje de remoción de zinc con 5 g.L<sup>-1</sup> de glucosa utilizando los dos consorcios microbianos.

<b>Fuente de Variación</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de Libertad</b>	<b>Media cuadrática</b>	<b>F</b>	<b>Significancia</b>
Consortio	706,335	1	706,335	1049,0124	<b>5,418E-06</b>
Error	2,693	4	0,673		
Total	2656,630	5			

En el análisis de las medias de cada uno de los consorcios microbianos durante la remoción de zinc se pudo ver que los intervalos de confianza no se traslaparon (Tabla 3.2), esto indicó que cada consorcio microbiano formó un grupo homogéneo distinto para la remoción de zinc.

**Tabla 3.2.** Medias de remoción de zinc para cada consorcio microbiano con sus intervalos de confianza al 95%.

Consortio Microbiano	Media	Intervalo de confianza al 95%.	
		Límite inferior	Límite superior
Consortio M3	7,167	5,851	8,482
Consortio I5	28,867	27,551	30,182

### 3.1.1.2. Remoción de zinc con 9 g.L<sup>-1</sup> de glucosa.

Del mismo modo, la prueba de Levene comprobó la homogeneidad de las varianzas en la remoción de 3 mg.L<sup>-1</sup> de zinc con 9 g.L<sup>-1</sup> de glucosa para los dos consorcios microbianos con una significancia mayor al 5% (p=0.264). En el ANOVA (Tabla 3.3) de la remoción de zinc con 9 g.L<sup>-1</sup> de glucosa se concluyó que la actuación de los consorcios microbianos fue diferente debido a su significancia estadística.

**Tabla 3.3.** Análisis de varianza para el porcentaje de remoción de zinc utilizando 9 g.L<sup>-1</sup> de glucosa con ambos consorcios microbianos.

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Media cuadrática	F	Significancia
Consortio	592,027	1	592,027	147,7604	<b>0,00026284</b>
Error	16,027	4	4,007		
Total	18060,880	5			

En el análisis de las medias de cada uno de los consorcios microbianos en la remoción de zinc y según sus intervalos de confianza al 95% mostró que éstos no se traslaparon (Tabla 3.4), por lo que se concluyó que cada consorcio microbiano formó un grupo homogéneo distinto para la remoción de zinc.

**Tabla 3.4.** Medias de remoción de zinc para cada consorcio microbiano con sus intervalos de confianza al 95%.

Consortio Microbiano	Media	Intervalo de confianza al 95%.	
		Límite inferior	Límite superior
Consortio M3	63,867	60,658	67,075
Consortio I5	44,000	40,791	47,209

La concentración de glucosa según se ha demostrado estadísticamente, estuvo relacionada con su capacidad de remoción de zinc por parte de cada uno de los consorcios microbianos.

### 3.1.2. Datos del muestreo de agua contaminada en una industria textil como referencia para la ejecución del diseño experimental.

La toma de muestras de agua contaminada en la empresa textil se realizó durante los meses de septiembre y octubre del 2009. Se midió el pH del agua antes y después de ingresar a la planta de tratamiento químico, siendo el pH en ambos casos neutro. La temperatura se mantuvo en un rango de 31-34 °C. El caudal tuvo un máximo de 3 m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup>, mientras que la concentración de zinc estuvo en un rango de 0.05-0.2 mg.L<sup>-1</sup> (Tabla 3.5).

**Tabla 3.5.** Datos de concentración de zinc, temperatura, pH y caudal de los puntos muestreados en la empresa textil.

Muestreo	Zinc (mg.L <sup>-1</sup> )			Temperatura (°C)		pH		Caudal (m <sup>3</sup> .h <sup>-1</sup> )	
	1	2	3	1	2	1	2	1	2
I	< 0.05			31		7.66		2.34	
II	< 0.05	< 0.05	0.1614	33.8	34.3	7.46	7.36	2.34	3.19

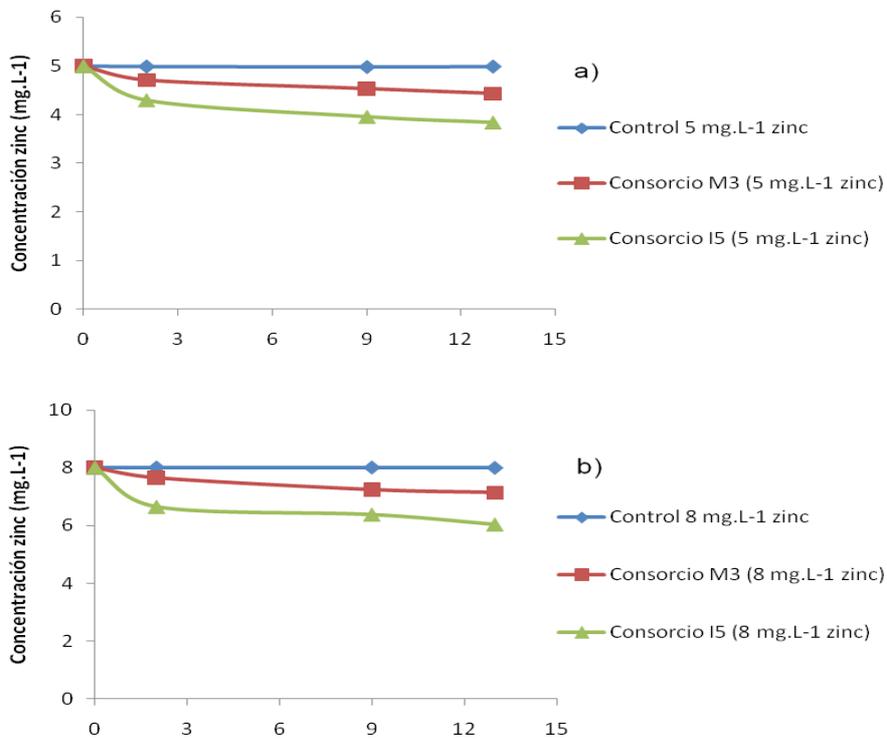
1 = Agua de los procesos textiles.

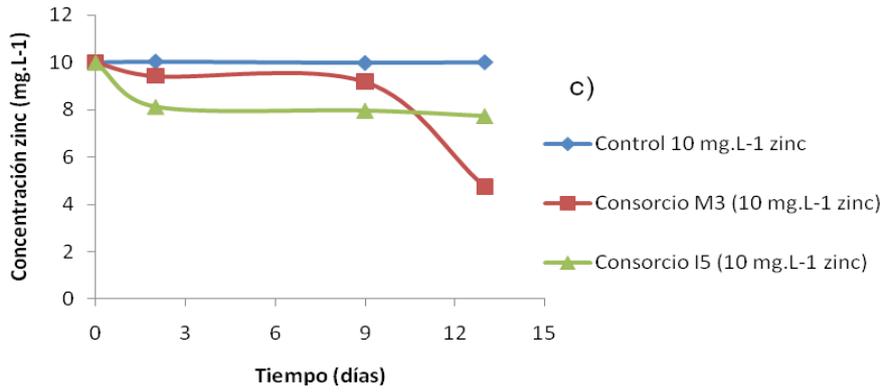
2 = Agua antes de ingresar a la planta de tratamiento químico.

3 = Agua tratada que se descarga

**3.2. Ejecución del diseño experimental para la remoción de 5, 8 y 10 mg.L<sup>-1</sup> de zinc por acción de los consorcios microbianos I5 y M3 en agitación utilizando 5 g.L<sup>-1</sup> de glucosa en el medio de cultivo.**

En el estudio se evaluó la remoción de zinc de los consorcios I5 y M3 a tres diferentes concentraciones del metal: 5 mg.L<sup>-1</sup>, 8 mg.L<sup>-1</sup> y 10 mg.L<sup>-1</sup>. En la Figura 3.2 se muestra que existió una remoción de zinc para cada una de las concentraciones probadas con respecto a sus controles, sin inóculo microbiano.



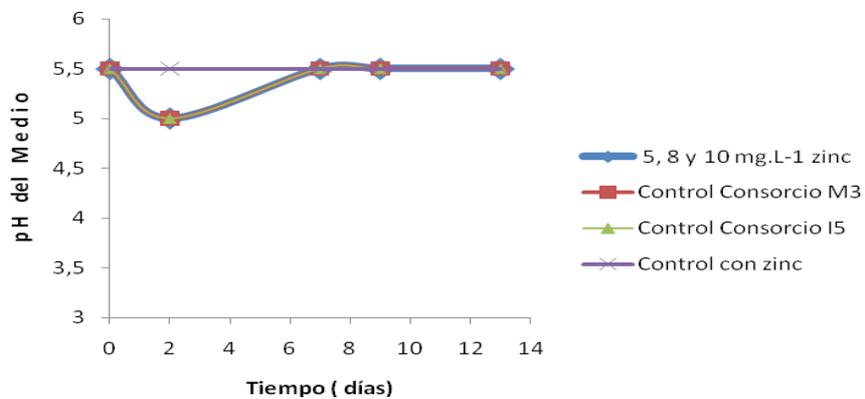


**Figura 3.2.** Remoción de zinc con los consorcios I5 y M3.

a) 5 mg.L<sup>-1</sup>, b) 8 mg.L<sup>-1</sup> y c) 10 mg.L<sup>-1</sup> zinc.

### 3.2.1. pH en la remoción de zinc con los consorcios microbianos I5 y M3.

Para conocer los valores de pH durante la remoción de zinc se realizó una gráfica con los consorcios microbianos (Figura 3.3). El pH se mantuvo en el rango de 5-5.5.



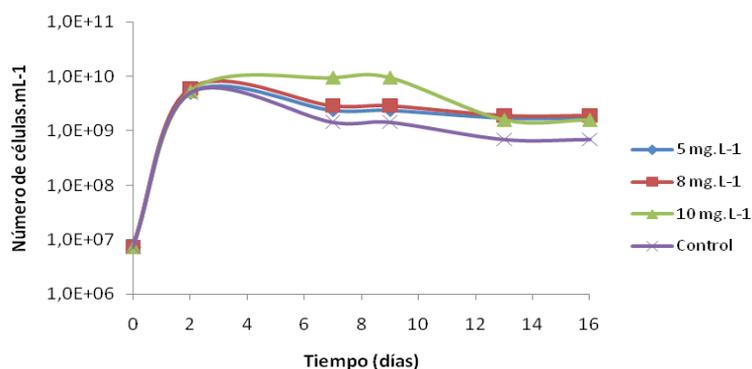
**Figura 3.3.** pH durante la remoción de zinc con los consorcios microbianos M3 e I5 para las tres concentraciones de zinc.

### 3.3. Elaboración de las curvas de crecimiento microbiano durante la remoción de zinc.

Para conocer el crecimiento de los consorcios microbianos durante la remoción de zinc, se elaboraron gráficas con cada concentración de zinc utilizada.

#### 3.3.1. Curva de crecimiento del consorcio M3 en la remoción de zinc.

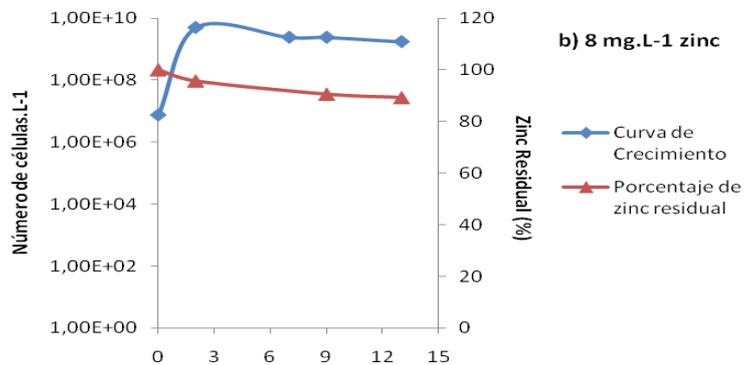
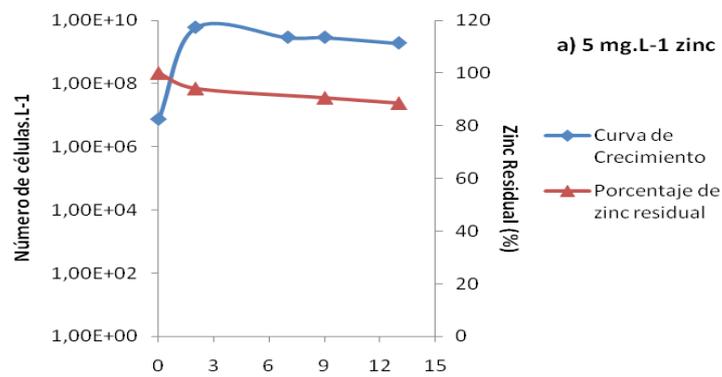
En la Figura 3.4 se muestra el crecimiento microbiano con cada concentración de zinc, observándose que, en ausencia del metal, la densidad celular fue de  $1.6 \times 10^9$  células.mL<sup>-1</sup>. Cuando el consorcio estuvo en contacto con el metal, las densidades celulares fueron de  $2.4 \times 10^9$  células.mL<sup>-1</sup> para las concentraciones de 5 y de 8 mg.L<sup>-1</sup> de zinc y de  $4.6 \times 10^9$  células.mL<sup>-1</sup> para la concentración de 10 mg.L<sup>-1</sup> de zinc.

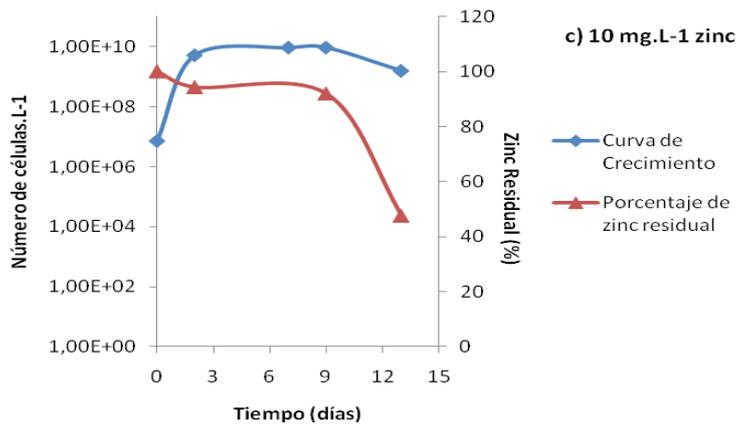


**Figura 3.4.** Crecimiento microbiano del consorcio M3 con cada concentración de zinc y el control (ausencia de zinc).

En la Figura 3.5 se observa que con el consorcio M3 existió una misma tendencia en el crecimiento y en la remoción del metal para las concentraciones de 5 y

8 mg.L<sup>-1</sup> de zinc, mientras que con una concentración de 10 mg.L<sup>-1</sup> de zinc, existió un aumento en el crecimiento y registró una remoción del metal del 52.5% comparada con las otras concentraciones que obtuvieron remociones de alrededor del 11.0%. El consorcio M3 inició con una densidad celular del orden de 10<sup>6</sup> y se fue incrementando hasta el orden de 10<sup>9</sup> hasta finalizar el estudio, con una media de remoción de zinc del 24.9%.

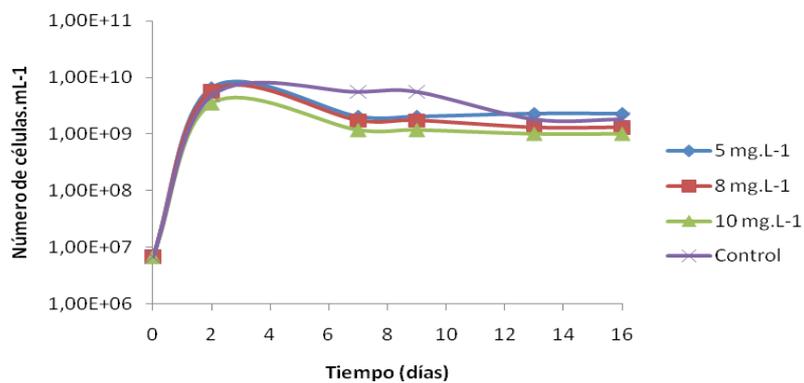




**Figura 3.5.** Crecimiento microbiano del consorcio M3 y el porcentaje de zinc residual para 5 mg.L<sup>-1</sup> zinc, b) 8 mg.L<sup>-1</sup> zinc y c) 10 mg.L<sup>-1</sup> zinc.

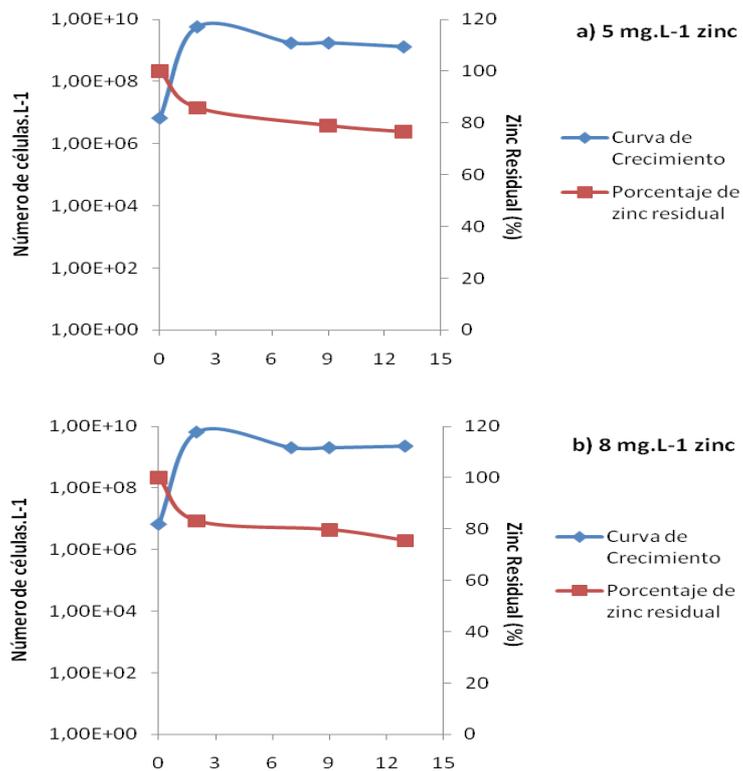
### 3.3.2. Curva de crecimiento del consorcio I5 en la remoción de zinc.

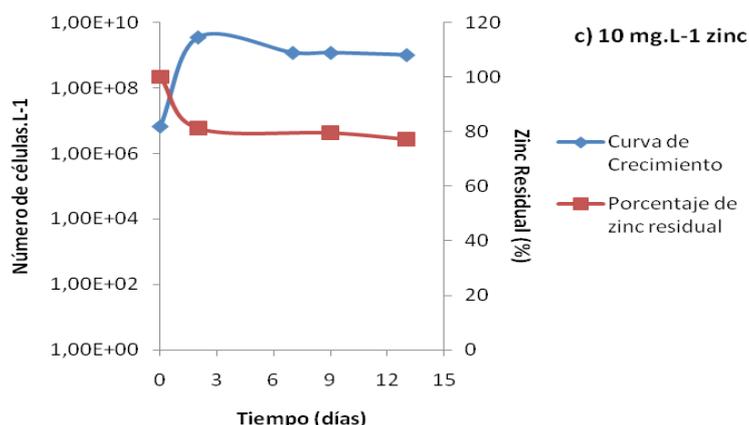
En la Figura 3.6 se evidencia que el consorcio I5 en ausencia del metal presentó una densidad celular de  $3.3 \times 10^9$  células.mL<sup>-1</sup>. Cuando el consorcio estuvo en contacto con las concentraciones de zinc, las densidades celulares fueron de  $1.9 \times 10^9$  células.mL<sup>-1</sup>.



**Figura 3.6.** Crecimiento microbiano del consorcio I5 con cada concentración de zinc y el control (ausencia de zinc).

Como se puede observar en la Figura 3.7, con el consorcio I5 existió una misma tendencia en el crecimiento para las tres concentraciones de zinc, así como en la remoción del metal. El consorcio I5 inició con una densidad celular del orden de  $10^6$  y se fue incrementando hasta el orden de  $10^9$  manteniéndose así hasta finalizar el estudio, con una media de remoción de zinc del 23.6%.





**Figura 3.7.** Crecimiento microbiano del consorcio I5 y el porcentaje de zinc residual para a) 5 mg.L<sup>-1</sup> zinc, b) 8 mg.L<sup>-1</sup> zinc y c) 10 mg.L<sup>-1</sup> zinc.

### 3.4. Análisis estadístico de ambos consorcios microbianos para establecer el consorcio microbiano óptimo para la remoción de zinc.

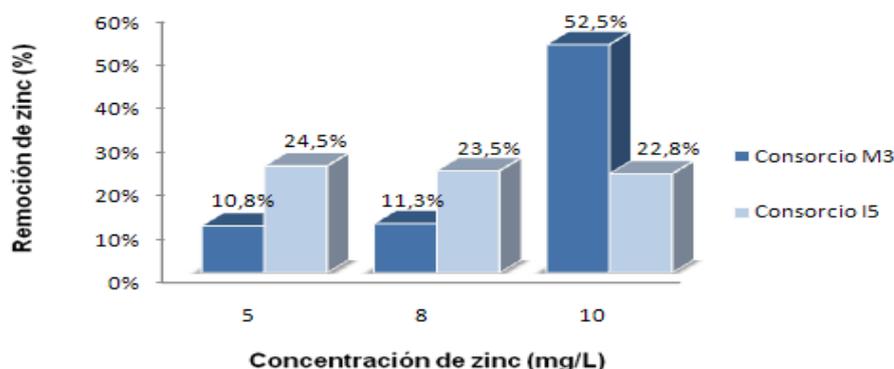
Las pruebas estadísticas permitieron estudiar los factores involucrados en la remoción de zinc. En la prueba de Levene la significancia ( $p=0.373$ ) fue mayor al 5%, por lo que se acepta la hipótesis de que la varianza de la remoción de zinc fue igual durante toda la investigación.

En el ANOVA (Tabla 3.6) se midió el efecto en la remoción de zinc con los consorcios microbianos, las concentraciones de zinc y su interacción doble, observándose que sólo estos dos últimos factores tienen diferencias significativas. El efecto de los consorcios microbianos no presentó diferencias estadísticas significativas en cuanto al porcentaje de zinc removido a las condiciones llevadas a cabo en este estudio.

**Tabla 3.6.** Análisis de varianza para los consorcios microbianos, concentración de zinc y su interacción.

Fuentes de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media Cuadrática	F	Significancia
Consortio microbiano (I)	7,363	1	7,363	0,5752	0,46283342
Concentración de zinc (CM)	1610,079	2	805,039	62,8890	<b>4,3653E-07</b>
I*CM	1819,333	2	909,667	71,0624	<b>2,2277E-07</b>
Error	153,612	12	12,801		
Total	14154,304	17			

De acuerdo con los resultados de remoción indicados en la Figura 3.8 con cada uno de los consorcios microbianos a las diferentes concentraciones de zinc, se pudo ver que con el consorcio M3 se obtuvo una mayor remoción de zinc conforme aumentaba la concentración del metal. Mientras que con el consorcio I5, a mayor concentración del metal en el medio, la remoción fue disminuyendo.



**Figura 3.8.** Porcentajes promedio de la remoción de zinc con ambos consorcios microbianos a las diferentes concentraciones de zinc ensayadas.

Con respecto a los consorcios microbianos, en la Tabla 3.7 se presentan las medias del porcentaje de remoción de zinc con cada uno de los consorcios microbianos. El consorcio M3 presentó una remoción media de zinc del 24.9% y el consorcio I5 tuvo una remoción media de zinc de 23.6%. De acuerdo a lo mostrado en ésta tabla, los valores se traslaparon entre sí, lo que significa que formaron un mismo grupo homogéneo y por lo tanto tuvieron respuestas iguales con respecto a la remoción de zinc en las condiciones en que se llevó a cabo esta investigación.

**Tabla 3.7.** Porcentajes de remoción de zinc de cada consorcio microbiano.

Consortio microbiano	Media	Intervalo de confianza al 95%.	
		Límite inferior	Límite superior
Consortio M3	24,865	22,267	27,464
Consortio I5	23,586	20,988	26,185

Con la prueba Tukey se determinó dónde se encontraban las diferencias significativas con relación a las concentraciones de zinc, mostrando los diversos grupos formados. En la Tabla 3.8 se muestran los grupos correspondientes a la concentración de zinc, formándose dos grupos homogéneos.

**Tabla 3.8.** Medias para los grupos homogéneos para la concentración de zinc.

Concentración de zinc (mg.L <sup>-1</sup> )	Media	Grupos Tukey	
		1	2
5	17.68	A	
8	17.40	A	
10	37.60		B

Con el ANOVA, para los grupos en estudio (Tabla 3.9), se concluyó que existió al menos uno diferente al resto con el 95% de confianza.

**Tabla 3.9.** Análisis de varianza para los seis grupos en estudio

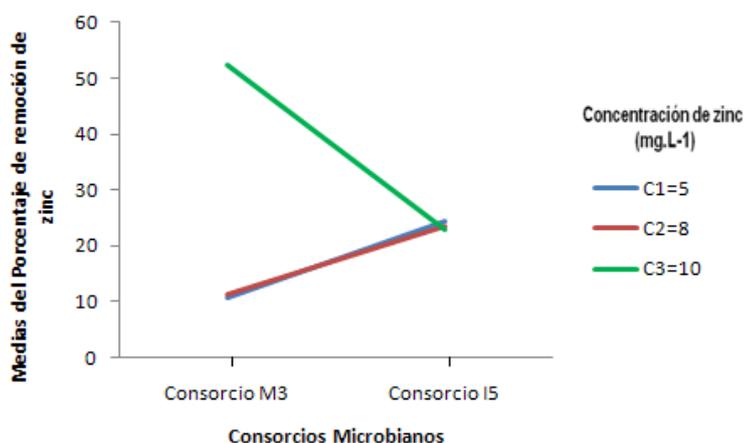
	Suma de cuadrados	Grados de Libertad	Media cuadrática	F	Significancia
Inter-grupos	3436,775	5	687,355	53,6956	<b>8,5033E-08</b>
Intra-grupos	153,612	12	12,801		
Total	3590,387	17			

En la Tabla 3.10 están las medias del porcentaje de remoción de zinc para los grupos homogéneos de las interacciones, en el que se muestra que existieron tres grupos diferentes.

**Tabla 3.10.** Medias para los grupos homogéneos de las interacciones para la remoción de zinc.

Inóculo Microbiano	Concentración de zinc (mg.L <sup>-1</sup> )	Media	Grupos Tukey		
			1	2	3
M3	5	10,81	A		
M3	8	11,33	A		
I5	10	22,75		B	
I5	8	23,47		B	
I5	5	24,54		B	
M3	10	52,45			C

Con los datos estadísticos obtenidos en esta investigación, se realizó una gráfica de perfil de la interacción entre los consorcios microbianos y las concentraciones de zinc (Figura 3.9). La remoción del metal para el consorcio M3 fue mayor cuando la concentración de zinc fue de 10 mg.L<sup>-1</sup> mientras que con el consorcio I5 la remoción se incrementó cuando la concentración de zinc fue de 5 mg.L<sup>-1</sup>. El consorcio M3 a las concentraciones de zinc de 5 mg.L<sup>-1</sup> y de 8 mg.L<sup>-1</sup> removió de una forma similar, mientras que con 10 mg.L<sup>-1</sup> de zinc el porcentaje de remoción aumentó. Por otro lado, la remoción de zinc por parte del consorcio I5 se mantuvo constante y tuvo porcentajes de remoción mayores que el consorcio M3 en todas las concentraciones evaluadas, a excepción de 10 mg.L<sup>-1</sup> de zinc, donde el consorcio M3 presentó un porcentaje de remoción del 52.5% y del 22.8% para el consorcio I5.



**Figura 3.9.** Gráfico de perfil para las medias marginales estimadas del porcentaje de remoción de zinc entre los consorcios microbianos y las concentraciones de zinc.

### 3.4.1. Análisis estadístico del consorcio microbiano M3

En la prueba de Levene, para la remoción de zinc, la significancia ( $p=0.496$ ) fue mayor al 5%, aceptándose la hipótesis de que la varianza de la remoción de zinc fue igual en todo el estudio.

Al realizar el ANOVA (Tabla 3.11), se concluyó con el 95% de confianza que la concentración de zinc, presentó diferencias significativas en la remoción del metal.

**Tabla 3.11.** Análisis de varianza para el consorcio microbiano M3 en la remoción de zinc.

Fuentes de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media Cuadrática	F	Significancia
Concentración de zinc	3424,533	2	1712,266	227,1062	<b>2,216E-06</b>
Error	45,237	6	7,539		
Total	9034,308	8			

Por otro lado, la prueba Tukey mostró los diversos grupos formados. En la Tabla 3.12 se muestran los grupos correspondientes a la concentración de zinc, donde se formaron dos grupos homogéneos.

**Tabla 3.12.** Medias para los grupos en subconjuntos homogéneos para la concentración de zinc.

Concentración de zinc (mg.L <sup>-1</sup> )	Media	Grupos Tukey	
		1	2
5	10.81	A	
8	11.33	A	
10	52.45		B

### 3.4.2. Análisis estadístico del consorcio microbiano I5

El análisis estadístico con el consorcio I5 mostró que en la prueba de Levene, para la remoción de zinc, la significancia ( $p=0.541$ ) fue mayor al 5%, aceptándose que la varianza de la remoción de zinc fue igual durante la investigación.

Al realizar el ANOVA (Tabla 3.13) para el factor concentración de zinc, se concluyó con el 95% de confianza que no existieron diferencias significativas en la remoción de zinc con las concentraciones del metal ensayadas.

**Tabla 3.13.** Análisis de varianza para el consorcio microbiano I5 en la remoción de zinc.

Fuentes de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media Cuadrática	F	Significancia
Concentración de zinc	4,879	2	2,439	0,1351	0,87623975
Error	108,375	6	18,062		
Total	5119,996	8			

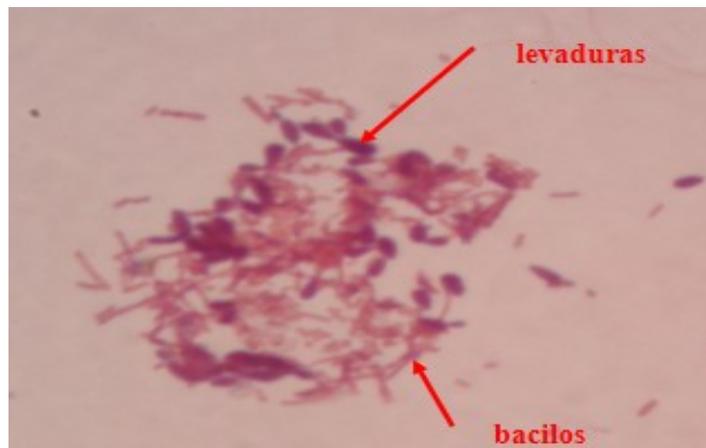
En la Tabla 3.14 se muestra el grupo correspondiente a la concentración de zinc, donde se formó un solo grupo homogéneo.

**Tabla 3.14.** Medias para los grupos en subconjuntos homogéneos para la concentración de zinc.

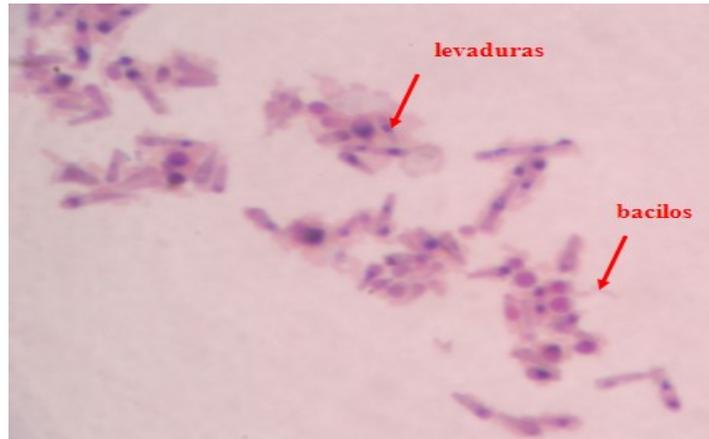
Concentración de zinc (mg.L <sup>-1</sup> )	Media	Grupos Tukey
		1
5	24.5	A
8	23.5	A
10	22.8	A

### 3.5. Análisis adicional: Microscopía Electrónica de Barrido.

Mediante la tinción Gram y la observación en el microscopio óptico realizados a los consorcios microbianos M3 e I5, se pudieron encontrar levaduras y diferentes bacilos Gram negativos (Figura 3.10 y Figura 3.11).

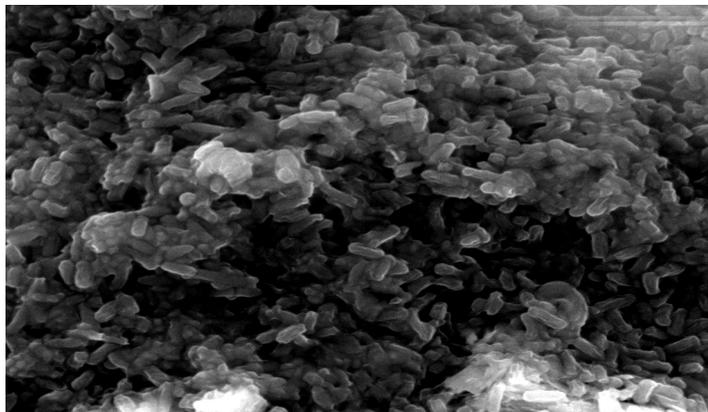


**Figura 3.10.** Fotografía en el microscopio óptico (resolución 100X) del consorcio microbiano I5.

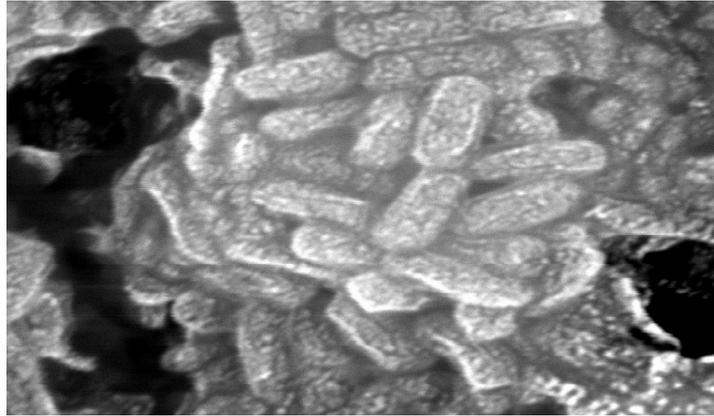


**Figura 3.11.** Fotografía en el microscopio óptico (resolución 100X) del consorcio microbiano M3.

Además, la observación de los consorcios microbianos I5 y M3 fue realizado mediante micrografías (Figura 3.12 y Figura 3.13) obtenidas a través de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), lo que permitió observar bacilos en los dos consorcios microbianos.



**Figura 3.12.** Micrografía electrónica de barrido del Consorcio I5 (Alexis Debut, Ph. D.). La escala muestra una longitud de 5 $\mu$ m.



**Figura 3.13.** Micrografía electrónica de barrido del Consorcio M3 (Alexis Debut, Ph. D.). La escala muestra una longitud de 1 $\mu$ m.

## **CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN**

El objetivo de este trabajo de investigación fue evaluar la capacidad de remoción de zinc en agua sintética usando los consorcios microbianos I5 y M3, para lo cual se analizó el efecto de la concentración del metal, el pH y la concentración de glucosa en el medio de cultivo.

#### **4.1. Activación de los inóculos microbianos nativos compuestos del cepario del Laboratorio de Microbiología con el fin de obtener la biomasa necesaria para el proceso de remoción de zinc.**

##### **4.1.1. Remoción de 3 mg.L<sup>-1</sup> de zinc por acción de los consorcios microbianos con agitación en presencia de diferentes concentraciones de glucosa.**

La glucosa es una fuente de carbono que provee energía para el metabolismo de las células y es primordial para la síntesis de macromoléculas, además de influir en la remoción de metales pesados como el zinc. La mayoría de estudios sobre el efecto tóxico de los metales en microorganismos se han realizado empleando niveles de glucosa de entre 5 a 10 g.L<sup>-1</sup> (Brynhildsen *et al.*, 1988).

Con los resultados obtenidos se puede decir que en la remoción de 3 mg.L<sup>-1</sup> de zinc, la presencia de glucosa incrementó la remoción del metal. Los mayores porcentajes de remoción se obtuvieron al utilizar 9 g.L<sup>-1</sup> de glucosa y los menores con 5 g.L<sup>-1</sup> de glucosa (Figura 3.3 y Figura 3.4). La importancia del uso de glucosa para la remoción de zinc es compartida por varios investigadores. Bucheder & Broda, 1974, mostraron en su investigación que al agregar 8 g.L<sup>-1</sup> de glucosa al medio con 0.65 mg.L<sup>-1</sup> de zinc, la viabilidad de las células de *Escherichia coli* se redujo en un 50%. Atribuyeron este hecho a que la glucosa estimuló la acumulación de zinc dentro de la bacteria dando lugar a concentraciones que alcanzaron niveles tóxicos. Campbell y colaboradores (2000) de igual manera, con *E. coli* pUCD607 evaluaron la toxicidad de 0-3.27 mg.L<sup>-1</sup> de zinc en ausencia y presencia de 3.6 g.L<sup>-1</sup> de glucosa. Notaron que la adición de glucosa incrementaba la toxicidad de zinc en esta bacteria y que los valores de EC<sub>50</sub> se reducían 11 veces, comparados con los ensayos sin la adición de glucosa, debido a que la glucosa estimuló los mecanismos de captación de zinc.

La acumulación de zinc debido a la adición de glucosa en el medio de cultivo no sólo se ha centrado en una bacteria específica, también fue investigada por Donocik *et al.*, 1996 en *Cytophaga johnsonae*. La remoción del metal se incrementó cuando se agregó glucosa al medio, sugiriendo una captación activa del zinc por el proceso de bioacumulación.

#### **4.1.2. Muestreo de agua contaminada en una industria textil como referencia para la ejecución del diseño experimental.**

El muestreo en la empresa textil permitió conocer los efluentes de una industria textil en nuestro país, su pH, temperatura y el caudal de descarga. La información de las concentraciones de zinc de esta industria y de lo que se pudo obtener de otras empresas textiles ecuatorianas, se tomó como referencia para establecer los intervalos de concentración de zinc evaluados en esta investigación usando los consorcios microbianos I5 y M3 para probar la remoción de zinc.

#### **4.2. Ejecución del diseño experimental para la remoción de 5, 8 y 10 mg.L<sup>-1</sup> de zinc por acción de los consorcios microbianos I5 y M3 con agitación utilizando 5 g.L<sup>-1</sup> de glucosa en el medio de cultivo.**

Cuando se utiliza biomasa viva, la remoción no puede ser expresada en términos de metal acumulado por unidad de biomasa, ya que se encuentra en continua variación de crecimiento. La captación del metal es dependiente del crecimiento de la biomasa, que puede ser sensible a otros contaminantes presentes en el medio. El sistema con biomasa viva funciona de una manera no definida y empírica, difícil de modelarla matemáticamente, en términos de predicción (Macaskie, 1990). En este estudio al plantear el diseño experimental se evaluó la capacidad de remoción del zinc de acuerdo al porcentaje de remoción obtenido con cada consorcio microbiano (Bayona, 2008).

Con las concentraciones de zinc ensayadas, los dos consorcios fueron capaces de remover el zinc, dando respuesta así a la hipótesis planteada. Además, los consorcios pudieron sobrevivir, manteniendo su tasa de crecimiento constante con una densidad celular del orden de  $10^9$ . La diferencia en su capacidad de remoción podría deberse al lugar de origen de cada uno de los consorcios microbianos (Marrero & Coto, 2005). El consorcio M3 provino de suelo contaminado por agua residual textil (Ayala, 2010). Debido a los constantes cambios originados en su medio habitual de donde fue aislado, posiblemente debe poseer mecanismos que le permitieron hacer frente a estas continuas alteraciones y se encuentren microorganismos adaptados a altas concentraciones de zinc. El consorcio I5 al provenir de la exposición al aire de medio de cultivo con colorante (Moncayo, 2010) y al no haber estado en contacto anterior con el zinc, probablemente desarrolló mecanismos para sobrevivir a estas concentraciones del metal. Dichas probabilidades están fundamentadas en el trabajo de Moraleda *et al.*, 2005 quien indica que los microorganismos pueden generar mecanismos de resistencia al zinc mediante procesos inducibles. Se utiliza el término resistente a metales pesados para describir la capacidad de un microorganismo de sobrevivir al efecto tóxico de éstos elementos, como resultado de un mecanismo de desintoxicación generado por la exposición directa al metal (Garza, 2005). Estos mecanismos se producen cuando las células han estado en presencia de una concentración del metal suficientemente alta, como las condiciones en que fue aislado el consorcio M3 y que ocasionaría la generación de los mecanismos mencionados. La posible resistencia no podría haber sido inducida en el consorcio I5 debido a que no estuvo en contacto anterior con el metal durante su proceso de aislamiento.

La toxicidad del zinc no sólo puede determinarse mediante el estudio del crecimiento microbiano. Orji *et al.*, 2008, señala que la toxicidad del metal en los microorganismos se puede medir mediante la cuantificación de los cambios metabólicos y de las actividades enzimáticas. Diversos estudios han demostrado en varios microorganismos el efecto de la toxicidad del zinc. En *Escherichia* sp. PLK1, concentraciones  $\leq 26 \text{ mg.L}^{-1}$  inhiben su actividad deshidrogenasa (Nweke *et al.*, 2006), mientras que para *Arthrobacter* sp. SED4, *Bacillus* sp. DISK1 y *Escherichia* DISK2, la inhibición enzimática total se alcanza con  $78.45 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $52.3 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $52.3 \text{ mg.L}^{-1}$  de zinc respectivamente (Nweke, 2009). Una concentración de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  es el límite de

tolerancia para las bacterias: *Bacillus* sp, ZSB-O-1 y *Pseudomonas* sp. ZSB-S-2 (Vankatakrishnan *et al.*, 2003). Para *Pseudomonas aeruginosa*, 654 mg.L<sup>-1</sup> de zinc no afecta su sobrevivencia mientras que, en *Bacillus cereus* mejora su crecimiento (Babich & Stotzky, 1978) y una concentración de 22.88 mg.L<sup>-1</sup> de zinc inhibe completamente el crecimiento de *E. coli* (Lee *et al.*, 2005). Otras investigaciones reportan que 0.52 mg.L<sup>-1</sup> de zinc para *Pseudomonas* sp. DAF1 y 23.8 mg.L<sup>-1</sup> de zinc para *Proteus* sp. PLK2 son el límite de concentración por encima de la cual se observan efectos tóxicos (Nweke, 2009). Como se puede ver, las concentraciones de zinc que ocasionan efectos tóxicos e inhibitorios varían de un microorganismo a otro. En el caso de los consorcios microbianos que se utilizaron en este estudio, al estar formados por una serie de microorganismos que no han sido caracterizados aún, es difícil saber la concentración de zinc que les resulte tóxico al consorcio en conjunto.

Es preciso aclarar que en esta investigación no se utilizaron ecuaciones de adsorción, porque probablemente, la captación del metal no fue estrictamente un fenómeno de superficie, pues debido a que se utilizó biomasa viva, cualquier actividad metabólica pudo haber actuado durante la captación del zinc (Da Costa & Pereira, 2001).

#### **4.2.1. Estudio del pH en la remoción de zinc con los consorcios microbianos I5 y M3.**

Este estudio se llevó a cabo en un intervalo de pH de 5.0 a 5.5 y según lo reportado por Adriano, 2001, en este rango, la especie predominante es Zn<sup>2+</sup>.

El pH es un parámetro que influye en la remoción de los metales pesados ya que afecta su solubilidad o la activación de los grupos funcionales de la biomasa. Por lo tanto, la interacción de los cationes metálicos con los sitios de unión de la biomasa es muy sensible a los valores de pH (Vázquez 2005, Torres y Juvina 2005).

En varias investigaciones sobre remoción de zinc, el rango de pH al que se trabaja con diversos microorganismos es de 5 a 7. Campbell y colaboradores (2000) estudiaron la toxicidad de zinc en *E. coli* pUCD607 a pH de 5.5 para prevenir el efecto del mismo sobre la toxicidad de zinc. Venkatakrishmann *et al.*, 2003, evaluaron el límite de tolerancia de zinc en *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. a pH de 7, obteniendo el valor de 100 mg.kg<sup>-1</sup> de zinc en cultivo *in vitro*. En la levadura *Candida utilis*, se observó una disminución en la remoción de zinc cuando el pH se incrementó de 4.8 a 8.2 (Failla *et al.*, 1976).

Se sugiere que la remoción del metal se debe exclusivamente a la acción microbiana debido a que tanto el control de los consorcios (en ausencia del metal) como las muestras con zinc e inóculo microbiano, mostraron valores de pH en un rango de 5.0 a 5.5.

#### **4.3. Elaboración de las curvas de crecimiento microbiano durante la remoción de zinc.**

##### **4.3.1. Curva de crecimiento del consorcio M3 durante la remoción de zinc.**

El consorcio microbiano M3 con concentraciones de zinc de 5 y 8 mg.L<sup>-1</sup> mostró remociones del 10.8% y del 11.3% respectivamente, mientras que con una concentración de 10 mg.L<sup>-1</sup> de zinc, la remoción fue del 52.5%. Con estas remociones del metal, el consorcio microbiano presentó densidades celulares de 2.4x10<sup>9</sup> células.mL<sup>-1</sup> para las concentraciones de 5 y 8 mg.L<sup>-1</sup> de zinc y de 4.6x10<sup>9</sup> células.mL<sup>-1</sup> para 10 mg.L<sup>-1</sup> de zinc. Estos resultados muestran que mientras mayor fue el crecimiento microbiano, los porcentajes de remoción aumentaron, lo que podría explicarse debido a que a estas concentraciones el zinc no llegó a ser tóxico para el consorcio. Esta posibilidad se deriva del hecho de que estudios como el de Babich & Stotzky, 1978, señalan que uno de los factores para notar la toxicidad de un metal pesado en los microorganismos se puede evidenciar mediante el crecimiento microbiano. La muestra control (en ausencia de zinc) tuvo una densidad celular menor

que las presentadas en las muestras con zinc, mostrando que este metal incrementó el crecimiento del consorcio y le permitió resistir en un medio que contenía hasta 10 mg.L<sup>-1</sup> de zinc.

#### **4.3.2. Curva de crecimiento del consorcio I5 durante la remoción de zinc.**

El consorcio microbiano I5 a diferencia del consorcio M3, con concentraciones de zinc de 5, 8 y 10 mg.L<sup>-1</sup> mostró remociones del 24.5%, 23.5% y 22.8% respectivamente, ubicando a estas tres concentraciones según las pruebas Tukey en un mismo grupo homogéneo. Estos porcentajes de remoción se obtuvieron con densidades celulares de 2.5x10<sup>9</sup>, 2.0x10<sup>9</sup> y de 1.3x10<sup>9</sup> células.mL<sup>-1</sup> para las concentraciones de 5, 8 y 10 mg.L<sup>-1</sup> de zinc respectivamente. Estos resultados muestran que mientras las tasas de crecimiento microbiano decrecieron (aunque no disminuyeron del orden de 10<sup>9</sup>), los porcentajes de remoción disminuyeron. La explicación para esto, puede atribuirse a que las concentraciones ensayadas le comenzaron a resultar tóxico para el consorcio I5 y que a pesar de mantenerse con una densidad celular constante del orden de 10<sup>9</sup>, según se observa en la Figura 3.6, el control (en ausencia del metal) tuvo una densidad celular mayor que las muestras con zinc en el medio de cultivo.

#### **4.4. Análisis estadístico de ambos consorcios microbianos para establecer el consorcio microbiano óptimo para la remoción de zinc.**

##### **4.4.1. Análisis estadístico del consorcio microbiano M3**

La capacidad de remoción del metal por parte de este consorcio pudo haber sido efecto de la selectividad del consorcio M3 como biosorbente. Rodríguez (2005) reporta que los biosorbentes son selectivos y muestran su capacidad de absorber metales pesados si las condiciones apropiadas están presentes, como temperatura, pH, tipo y concentración del metal pesado, edad fisiológica del microorganismo, actuando a ciertas concentraciones específicas. Esto explicaría que a concentraciones de 5 y 8 mg.L<sup>-1</sup> de zinc la remoción fue en promedio del 11.0% y aumentó a 52.5% con 10 mg.L<sup>-1</sup>. Resultados comparables con nuestros resultados son los que obtuvo Andersson, 1999, quien expresa que el biosorbente requiere concentraciones altas del metal para que pueda ocurrir la remoción. El autor presenta dos posibles explicaciones; primero: el sorbente necesita una cantidad límite que active el mecanismo de absorción; segundo: niveles bajos del metal no serían suficientemente tóxicos como para activar un mecanismo de defensa.

Las remociones de zinc obtenidas con 5 y 8 mg.L<sup>-1</sup> estuvieron en un grupo homogéneo, según las pruebas Tukey, mientras que la remoción con 10 mg.L<sup>-1</sup> de zinc formó otro grupo. Esta diferencia en su capacidad de remoción puede atribuirse a que según lo explica Cervantes *et al.*, 2006, un alto nivel de resistencia al metal no está relacionado directamente con una mayor capacidad de removerlo en un medio líquido.

Según lo expuesto, parece ser que el proceso llevado a cabo por el consorcio M3 podría haber sido la bioacumulación, un mecanismo ejecutado netamente por células vivas. Considerando que el consorcio microbiano M3 estuvo formado por bacilos y levaduras, De Nicola *et al.*, 2009 ha comprobado que en ellas, cuando el zinc es absorbido dentro de la célula, es utilizado para funciones metabólicas en el citoplasma y varios organelos. Si los niveles de zinc exceden los requerimientos de la levadura, varios mecanismos se activan para almacenarlo hasta que sea necesario. Según lo reporta Simm *et al.*, 2007, llega a almacenar hasta 6.5 g.L<sup>-1</sup> de zinc en la vacuola, pudiendo movilizarse eficazmente para satisfacer las necesidades de hasta ocho generaciones de descendientes de las células en condiciones de inanición de zinc. Además, se estima que el zinc es requerido para el funcionamiento del proteoma de más del 3% de levaduras existentes (Eide, 1998). Por tal motivo, es posible que el zinc en la

concentración de  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  haya sido el aliciente necesario para que se obtenga la mayor remoción de zinc a esta concentración (Tabla 3.10).

Se conoce que el requerimiento de zinc para las bacterias es menor que para las levaduras, hongos u otras células eucariotas (Hughes & Poole, 1989), siendo las concentraciones requeridas de zinc para un crecimiento bacteriano de  $0.5$  a  $1 \mu\text{M}$  (Lu *et al.*, 1997), por lo que sería difícil pensar que las bacterias estarían acumulando el metal. Por esto se sugiere que las levaduras, habrían podido mantener la homeostasis de zinc a través de la actividad reguladora de las proteínas de transporte que se encuentran en la membrana plasmática y las membranas de los compartimentos intracelulares, como respuesta a los cambios en los niveles de zinc intracelular (MacDiarmid *et al.*, 2003).

Además de la posible implicación del proceso de bioacumulación que se ha explicado anteriormente, no se descarta la posibilidad de que haya habido bioadsorción, tanto por las características de la pared celular de las bacterias Gram negativas presentes en el consorcio, como de los grupos funcionales existentes en las levaduras. Es así que Da Costa & Pereira (2001) estudiaron la remoción de  $1.2$ - $57.5 \text{ mg.L}^{-1}$  de zinc con biomasa viva de *Bacillus sp.* y otros bacilos atribuyendo la remoción no sólo a las interacciones de la superficie de estos microorganismos con el zinc, sino también a posibles implicaciones metabólicas.

#### **4.4.2. Análisis estadístico del consorcio microbiano I5**

La capacidad de remoción de zinc del consorcio I5 pudo deberse a tres posibles mecanismos: la acción de bacterias sulfato reductoras, probablemente presentes en el

consorcio I5 y procesos de bioacumulación y bioadsorción por parte de los microorganismos presentes en este consorcio microbiano.

Según estudios anteriores realizados con este consorcio microbiano, Moncayo, 2010, señala que por la fuente de sulfato presente en el medio de cultivo de Jiang *et al.*, 2004 modificado, es probable la presencia de bacterias sulfato reductoras en este consorcio. Estas bacterias son responsables de la producción de sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S), que fue perceptible durante este estudio como producto del metabolismo de estas bacterias y que según Dolla *et al.*, 2006 a menudo indica la actividad y la presencia de microorganismos sulfato reductores que es utilizado para precipitar metales catiónicos divalentes, formando sulfuro del metal que es estable y de baja solubilidad lo que ocasiona su precipitación.

Las bacterias sulfato reductoras han sido consideradas como anaerobias. Existen pruebas suficientes de que algunas son aerotolerantes, lo que hay que considerar, tomando en cuenta que esta investigación se llevó a cabo con agitación constante. Kjeldsen *et al.*, 2004, estudiaron la tolerancia al oxígeno de bacterias sulfato reductoras. La sulfato reducción no fue detectada en condiciones aerobias, pero se reanudó en condiciones anóxicas. Sin embargo, se observó que mientras las bacterias fueron aireadas por cinco días, el número viable de bacterias sulfato reductoras se mantuvo en un orden constante de 10<sup>6</sup> células.mL<sup>-1</sup>. Durante las nueve primeras horas, la actividad de sulfato reducción no se vio afectada, indicando que la exposición al oxígeno da como resultado una inactivación metabólica de las bacterias, pero no causa la muerte celular.

En otras investigaciones, Sigalevich y colaboradores, 2000, estudiaron la transición de las condiciones de crecimiento de anaerobiosis a condiciones aeróbicas para la bacteria sulfato reductora *Desulfovibrio oxyclinae*. Se mostraron aglutinamientos de las células como resultado de la falta de mecanismos para hacer frente a los radicales del oxígeno. Esto provocó que se formara un espacio de anoxia en su interior, observándose la reducción de sulfato incluso en presencia de muy altas concentraciones de oxígeno disuelto (0.7±0.5 μM). Con lo anterior expuesto, la sulfato reducción pudo

haberse llevado a cabo bajo las condiciones de agitación en que se realizó el estudio. Así también, es posible, debido a la acidez que se mantuvo, con un rango de pH de 5.0 a 5.5, considerado óptimo para el crecimiento de bacterias sulfato reductoras.

Además de las consideraciones tomadas en cuenta y que han sido expuestas para la remoción de zinc de este consorcio, al tratarse de un consorcio microbiano, la acción de remoción no sólo puede atribuirse a las bacterias sulfato reductoras, sino también al resto de microorganismos que forman parte del consorcio microbiano I5. A las concentraciones de zinc ensayadas, a diferencia del consorcio M3, el consorcio I5 reaccionó inmediatamente al estar en un ambiente con estrés ocasionado por el zinc, cuya evidencia se reflejó con las remociones del metal desde la concentración más baja utilizada ( $5 \text{ mg.L}^{-1}$ ). El control (en ausencia de zinc) tuvo densidades celulares mayores que las presentadas en las muestras con zinc, mostrando que a pesar de remover el metal, provocó una disminución en su crecimiento.

En base a los resultados obtenidos, parecería que los procesos llevados a cabo por el consorcio I5 podrían haber sido además de la sulfato reducción, la bioacumulación y la bioadsorción. Éste último proceso se produciría gracias a las características que presentan las bacterias Gram negativas y las levaduras. Entre los bacilos Gram negativos que se observaron, podrían estar bacilos del Género *Bacillus*. Las especies de *Bacillus* son Gram positivos cuando se tiñen a partir de cultivos jóvenes pero se tornan Gram variables o Gram negativos con el paso del tiempo. (Forbes, 2009).

Mediante espectros de infrarrojo, Liñán *et al.*, 2009, determinó que levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, presenta grupos funcionales amino y carboxilo por lo que las levaduras habrían podido facilitar la remoción de zinc.

Se ha demostrado también que los grupos fosforilo de los lipopolisacáridos son los constituyentes de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, los que se

unen a los iones metálicos, además de algunos grupos carboxilo que también interactúan con el metal (Suárez & Reyes, 2002). Con esta información, se sugiere que las bacterias Gram negativas presentes en los consorcios microbianos I5 y M3, tendrían una membrana externa capaz de atraer al zinc y removerlo.

#### **4.5. Análisis adicional: Microscopía Electrónica de Barrido.**

La microscopía electrónica de barrido ha sido efectiva para observar en alta resolución estructuras biológicas y una alternativa para conocer las características de microorganismos. En este estudio se pudo observar bacilos en los dos consorcios microbianos. Moore *et al.*, 2009, mostró la eficiencia de tres tecnologías para la visualización cualitativa de las interacciones metal-biomasa, entre ellas la microscopía electrónica de barrido con rayos X, mediante la cual se observó a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* una vez que removió platino del medio.

Otros autores también han destacado el uso de esta técnica para visualizar la biomasa microbiana. Fude *et al.*, 1994, distinguió los bacilos que formaban parte de un consorcio bacteriano, causantes de la remoción del metal pesado en estudio. En el 2005, Zolgharnein, mostró mediante microscopía electrónica de barrido que las responsables de la remoción de los metales pesados de aquel estudio fueron bacterias y que además, podían acumular en su interior metales, demostrado mediante análisis de rayos X. Sethuraman & Balasubramanian, 2010, utilizó esta técnica para estudiar la morfología de los biosorbentes: *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter cloacae* en la remoción de un metal pesado.

Como se ha podido ver, el microscopio electrónico de barrido además de los beneficios que ya se conocen debido a su alta resolución, hacen que se incremente su importancia al tener incorporado rayos X, con el fin de verificar los procesos de remoción que en realidad estarían ejecutando los microorganismos, ya sea a nivel superficial o a nivel intracelular. En este estudio, las micrografías tomadas a los consorcios microbianos I5 y M3 fueron realizadas sin rayos X, por lo que se pudo observar únicamente la morfología de los bacilos en ambos consorcios microbianos.

## **CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES**

- La activación de los consorcios microbianos se evidenció por su capacidad de remover zinc del medio líquido, la cual fue mejorada cuando al medio de cultivo se agregó  $9 \text{ g.L}^{-1}$  de glucosa.

- El consorcio microbiano M3 en un medio líquido con una concentración microbiana de  $4.8 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> fue capaz de remover tres concentraciones de zinc: 5, 8 y 10 mg.L<sup>-1</sup> en condiciones aerobias, con un promedio de 24.9%.
- El consorcio microbiano I5 en un medio líquido con una concentración microbiana de  $6.6 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup> fue capaz de remover tres concentraciones de zinc: 5, 8 y 10 mg.L<sup>-1</sup> en condiciones aerobias, con un promedio de 23.6%.
- La remoción de zinc de los dos consorcios microbianos no presentó diferencias estadísticas significativas, bajo las condiciones de experimentación llevadas a cabo en este estudio.
- Los consorcios microbianos estudiados mostraron porcentajes de remoción estadísticamente iguales con 5 mg.L<sup>-1</sup> y 8 mg.L<sup>-1</sup> de zinc, mientras que el porcentaje de remoción fue diferente con 10 mg.L<sup>-1</sup> de zinc.
- Los consorcios microbianos M3 e I5 fueron capaces de sobrevivir al estar en contacto con 5, 8 y 10 mg.L<sup>-1</sup> de zinc.
- La remoción de zinc se realizó en agua sintética, mostrando que los consorcios microbianos estudiados tendrían un potencial para ser aplicados en el tratamiento de aguas residuales textiles ecuatorianas, luego del escalado correspondiente.

## **CAPÍTULO 6: RECOMENDACIONES**

- Caracterizar los consorcios microbianos para conocer su interacción con el zinc.

- Ensayar técnicas de inmovilización y remoción de zinc en el medio líquido con los consorcios microbianos.
- Analizar la remoción de zinc con los dos consorcios microbianos a la vez para evaluar su capacidad de remoción.
- Determinar la concentración de sulfatos en el medio de cultivo antes y después de la remoción de zinc para verificar si existe sulfato reducción.
- Medir la actividad enzimática microbiana como valoración de la toxicidad del zinc.

## **CAPÍTULO 7: BIBLIOGRAFÍA**

1. Acosta, E. (2007). Sustitución de materias primas para la industria textil. Extraído el 15 de agosto, 2010, de [http://www.corporacionambientalempresarial.org.co/documentos/Acar\\_sustitucion\\_materias\\_primas.pdf](http://www.corporacionambientalempresarial.org.co/documentos/Acar_sustitucion_materias_primas.pdf)
2. Adriano, D. (2001). Trace elements in terrestrial environments: biogeochemistry, bioavailability, and risks of metals. New York: Springer, 641.
3. Alberti, M. (1994). Environnement urbain et développement durable. Ambiente Italia Research Institute, Milán, 40.
4. Almaguer, V. & Garza, T. (2004). Algas, tecnología para remoción de metales pesados. Revista Sociedad Química de México, 49-52.
5. American Textiles Manufacturers Institute (ATMI, 1997)
6. Andersson, E. (1999). Analysis of various bioreactor configurations for heavy metal removal using the fungus *Penicillium ochro-chloron*. Thesis of Master of Science in Biology. Worcester Polytechnic Institute.
7. APHA, AWWA y WPCF. (1992). Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Madrid: Díaz de Santos.
8. Ayala, D. (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. Escuela Politécnica del Ejército. Departamento de Ciencias de la Vida. Facultad de Ingeniería en Biotecnología. Ecuador.

9. Babich, H. & Stotzky, G. (1978). Toxicity of zinc to fungi, bacteria and coliphages: influence of chloride ions. Applied Environmental Microbiology, 36, 906-914.
10. Bayona, B. (2008). Tratamiento biológico del agua residual procedente de la empresa Celulósicos Centauro mediante la utilización de una columna empacada. Instituto Tecnológico de Durango. Tesis de Ingeniería Bioquímica. México.
11. Bozzola, J. & Russell, L. (1999). Electron microscopy: principles and techniques for biologists. Second Edition. Canadá: Jones and Bartlett Publishers.
12. Brady, F. (2003). Tratamiento de aguas residuales por ultrafiltración en operación de lote modificado. Extraído el 14 de diciembre, 2010, de <http://www.agualatinoamerica.com/docs/pdf/Ultrafiltracion01-03.pdf>.
13. Brown, A. (2007). Benson's Microbiological applications. Laboratory manual in general microbiology. Ninth edition.
14. Brynhildsen, L., Lundgren, B., Allard, B. & Rosswall, T. (1988). Effects of glucose concentrations on cadmium, copper, mercury, and zinc toxicity to a *Klebsiella* sp. Applied and Environmental Microbiology, 54 (7), 1689-1693.
15. Bucheder, F. & Broda, E. (1974). Energy-dependent zinc transport by *Escherichia coli*. European Journal of Biochemistry, 45 (2), 555-559.

16. Campbell, C., Hird, M., Lumsdon, D. & Meeussen, J. (2000). The effect of EDTA and fulvic acid on Cd, Zn, and Cu toxicity to a bioluminescent construct (pUCD607) of Escherichia coli. Chemosphere, 40, 319-325.
17. Cañizares, R. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. Revista Latinoamericana de Microbiología, 42, 131-143.
18. Carballo, M., Martínez, A., Salgado, I. & Cruz, M. (2009). Mejoramiento de la Biosorción de  $Zn^{2+}$  y  $Cd^{2+}$  en microorganismos mediante la caracterización de parámetros asociados al proceso. Memorias del seminario internacional de expertos en tratamiento de efluentes industriales y residuos.
19. Castillo, F., Roldán, M., Blasco, R., Huertas, M., Caballero, F., Moreno, C. & Martínez, M. (2005). Biotecnología Ambiental. Madrid: Tébar, 229.
20. Castillo, S. (2004). Reutilización de raspo procedente de la industria vinícola para la extracción de metales en efluentes líquidos. Extraído el 13 de agosto, 2010, del sitio Web de la Universidad Politécnica de Cataluña: <http://upcommons.upc.edu/~pfc/bitstream/2099.1/2591/1/34316-1.pdf>
21. Cavendish, M. (2005). The elements. Zinc. New York, 7.
22. Cervantes, C., Espino, A., Acevedo, F., León, I., Rivera, M., Avila, M., Wróbel-Kaczmarczyk, K., Wróbel-Zasada, K., Gutiérrez, J., Rodríguez, J. & Moreno, R. (2006). Interacciones microbianas con metales pesados. Revista Latinoamericana de Microbiología, 48 (2), 203-210.

23. Chávez, G. (2006). Precipitación de metales pesados con sulfuro de hidrógeno biogénico producido a partir de la degradación anaeróbica de material celulósico y xilanósico. Tesis de Maestría en ciencias biológicas y biomédicas. Universidad Mayor de San Andrés.
24. Chen, C. & Wang, J. (2007). Characteristics of Zn<sup>2+</sup> biosorption by *Saccharomyces cerevisiae*. Biomedical and Environmental Sciences, 20, 478-182.
25. Choudhury, R. & Srivastava, S. (2001). Zinc resistance mechanisms in bacteria. Current Science, 81 (7), 768-775.
26. Chowdhury, S. Thakur, A. & Chaudhuri, R. (2010). Novel microbial consortium for laboratory scale lead removal from city effluent. Journal of Environmental Science and Technology, 4 (1), 41-54.
27. Christian, R. & Capone, D. (1997). Manual of environmental microbiology: Overview of issues in aquatic microbial ecology. Washington, ASM Press, 245-251.
28. Cruz, J. (2007, Abril). La industria textil. Revista Virtual Pro, 53, 25.
29. Da Costa, A & Pereira, F. (2001). Bioaccumulation of Copper, Zinc, Cadmium and Lead by *Bacillus* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus* and *Bacillus subtilis*. Brazilian Journal of Microbiology, 32, 1-5.
30. Da Ros, G. (1995). La contaminación de aguas en Ecuador: una aproximación económica. Ecuador: Abya Yala.

31. De Nicola, R. & Walker, G. (2009). Interaction between yeast and zinc. *Yeast Biotechnology*. India: Springer, 242-243.
  32. Dirección del Medio Ambiente. (1998). Manual de muestreo del Distrito Metropolitano de Quito, 37-40.
  33. Dirección Metropolitana de Medio Ambiente. Ordenanza del DMQ (2005). Resolución N° 003.
- Dokland, T., Hutmacher, D., Mah-Lee, M. & Schantz, J. (2006). Techniques in microscopy for biomedical applications. Singapore: Jan-Thorsten Schantz.
- Dolla, A., Fournier, m. & Dermoun, Z. (2006). Oxygen defense in sulfate-reducing bacteria. *Journal of Biotechnology*, 126, 87–100.
34. Donocik, A., Ledin, M., Pedersen, K. & Allard, B. (1996). Accumulation of zinc and cadmium by *Cytophaga johnsonae*. *BioMetals*, 9 (2), 169-175.
  35. Eccles, H. (1999). Treatment of metal-contaminated wastes: why select a biological process? *Trends in Biotechnology*, 17, 462-465.
  36. Eide, D. (1998). The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review Nutrition*, 18, 441–469.
  37. Ekos. (2006, Junio). 400 empresas más grandes de Ecuador. Industria Textil: la diversificación de productos amplía el mercado, 41.

38. El Bayoumy, M., Bewtra, J., Ali, H. & Biswas, N. (1999). Removal of Heavy Metals and COD by SRB in UAFF Reactor. Journal of Environmental Engineering, 125 (6), 532-539.
  
39. Escorza, J. (2007). Estudio de inóculos bacterianos como biorremediadores de suelos contaminados con petróleo. Tesis de Ingeniería en Biotecnología Ambiental. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Riobamba Ecuador.
  
40. Eweis, J., Ergas, S., Chang, D. & Schroeder, E. (1999). Principios de biorrecuperación. Tratamientos para la descontaminación y regeneración de suelos y aguas subterráneas mediante procesos biológicos y físico-químicos. España: McGraw-Hill, 82.
  
41. Failla, M., Benedict, C. & Weinberg, E. (1976). Accumulation and storage of Zn<sup>2+</sup> by *Candida utilis*. Journal of General Microbiology, 94, 23-36.
  
42. Fude, L., Harris, B., Urrutia, M. & Beveridge, T. (1994). Reduction of Cr (VI) by a Consortium of Sulfate-Reducing Bacteria (SRB III). Applied and Environmental Microbiology, 60 (5), 1525-1531.
  
43. Forbes, B., Sahm, D. & Weissfeld, A. (2009). Diagnóstico Microbiológico. Madrid: Panamericana.
  
44. Gale, N. & Wixson, B. (1979). Removal of heavy metals from industrial effluents by algae. Developments in Industrial Microbiology, 20, 259-273.

45. García, R. (2010). Tratamientos de aguas residuales industriales. Estudio de un caso real – Aguas residuales de una industria textil. Universidad de Granada, España.
46. Garza, M. (2005). Aislamiento de microorganismos con alta capacidad de tolerar y remover Pb (II), Cr (VI), Cd (II), Cu (II), Zn (II) y Ni (II). Universidad Autónoma de Nuevo León. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas.
47. Guevara, D. (2010). Biorremoción de cromo (cromo total y cromo VI) en agua sintética por dos inóculos bacterianos nativos compuestos, a escala de laboratorio. Escuela Politécnica del Ejército. Departamento de Ciencias de la Vida. Facultad de Ingeniería en Biotecnología. Ecuador.
48. Guibal, E., Roulph, C. & Le Cloirec, P. (1995). Infrared spectroscopic study of uranyl biosorption by fungal biomass and materials of biological origin. Environmental Science and Technology, 29, 2496-2503.
49. Hughes, M. & Poole, R. (1989). Metals and microorganisms. New York: Chapman and Hall, 137.
50. International zinc association. (1997). Zinc in the environment. Extraído el 30 de agosto, 2010, de <http://www.iza.com/Documents/Communications/Publications/Environment-Eng.pdf>
51. Jiang, H., Tay, J. & Tay, S. (2004). Changes in structure, activity and metabolism of aerobic granules as a microbial response to high phenol loading. Applied Microbiology and Biotechnology, 63, 602-608.

52. Kawatra, S. & Natarajan, K. (2001). Mineral biotechnology: microbial aspects of mineral beneficiation, metal extraction, and environmental control. Estados Unidos: SME, 182.
53. Kjeldsen, K., Joulain, C. & Ingvorsen, K. (2004). Oxygen Tolerance of Sulfate-Reducing Bacteria in Activated Sludge. Environmental Science and Technology, 38 (7), 2038-2043.
54. Kuo, J. (2007). Electron microscopy: methods and protocols in molecular biology. Second edition. Australia: Humana Press
55. Lankford, P. & Eckenfelder, W. (1992). Toxicity reduction in industrial effluents. New York: Van Nostrand Reinhold, 18-34, 98-125.
56. Lee, E., Lim, J., Oh, K., Lee, J., Kim, S., Lee, Y. & Kim, K. (2008). Removal of heavy metals by an enriched consortium. Journal of Microbiology, 46 (1), 23-28.
57. Lee, L., Barrett, J. & Poole, R. (2005). Genome-wide transcriptional response of chemostat-cultured *Escherichia coli* to zinc. Journal of bacteriology, 187 (3), 1124–1134.
58. Liñán, A., López, G., Madrigales, R. & Garza, M. (2009). Caracterización de biomasas microbianas y su aplicación en la remoción de colorantes. Memorias del congreso internacional de química industrial. Universidad Autónoma de Nuevo León, México.

59. Lovley, D. (2000). Environmental microbe-metal interactions. ASM Press. Washington, DC.
60. Lu, D., Boyd, B. & Lingwood, C. (1997). Identification of the Key Protein for Zinc Uptake in *Hemophilus influenzae*. Journal of Biological Chemistry, 272 (46), 29033–29038.
61. Macaskie, L. (1990). An immobilized cell bioprocess for the removal of heavy metals from aqueous flows. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 49 (4), 357-379.
62. MacDiarmid, C., Milanick, M. & Eide, D. (2003). Induction of the ZRC1 metal tolerance gene in zinc-limited yeast confers resistance to zinc shock. Journal of Biological Chemistry, 278 (17), 15065–15072.
63. Manual del Equipo de absorción atómica, Varian AA240FS
64. Manzanares, M & Lozano, P. (2007). Desarrollo y optimización de un sistema automático de monitorización del proceso de biosorción del ion cobre (II) en raspo de uva. Extraído el 15 de agosto, 2010, del sitio Web de la Universidad Politécnica de Cataluña: <http://upcommons.upc.edu/pfc/bitstream/2099.1/4551/1/MEMORIA.-pdf>
65. Marrero, J. & Coto, O. (2005). Colección de microorganismos extremófilos con potencialidad de uso en el saneamiento de ambientes contaminados con metales pesados. Estudio molecular del mecanismo de resistencia de una cepa bacteriana. Extraído el 14 de diciembre, 2010, de [http://www.secretariadeambiente.gov.co/sda/libreria/pdf/ecosistemas/restauracion/1\\_ar5.pdf](http://www.secretariadeambiente.gov.co/sda/libreria/pdf/ecosistemas/restauracion/1_ar5.pdf)

66. Mataix, J. (2005). Nutrición para educadores. Díaz de Santos, 180.
67. Mejía, G. (2006, Enero/Junio). Revisión Sistemática. Aproximación teórica a la biosorción de metales pesados por medio de microorganismos. CES, 1 (1), 89-94
68. Moncayo, I. (2010). Remoción de los colorantes textiles reactivos rojo 141, amarillo 84 y azul navy 171 eliminados en el agua residual, utilizando un inóculo compuesto seleccionado, bajo condiciones anaerobias a nivel de laboratorio. Escuela Politécnica del Ejército. Departamento de Ciencias de la Vida. Facultad de Ingeniería en Biotecnología. Ecuador.
69. Montenegro, J. (2010). Evaluación de la disminución de concentración de fenol en agua sintética por medio de dos consorcios bacterianos nativos, aerobio y anaerobio facultativo, a nivel de laboratorio, para su aplicación futura en la biorremediación de efluentes textiles. Escuela Politécnica del Ejército. Departamento de Ciencias de la Vida. Facultad de Ingeniería en Biotecnología. Ecuador.
70. Moore, B., Mack, C., Duncan, J. & Burgess, J. (2009). Metal–biomass interactions: a comparison of visualisation techniques available in South Africa. South African Journal of Science, 105, 115-119.
71. Moraleda, A., Pérez, J., Fontes, M., Murillo, F. & Muñoz, J. (2005). Copper induction of carotenoid synthesis in the Bacterium *Myxococcus Xanthus*. Molecular Microbiology, 56 (5), 1159–1168.

72. Moreno, I., Codd, G., Gadd, G., Lubián, L. (2002). Acumulación de Cu y Zn por células microalgales marinas de *Nannochloropsis Gaditana* (Eustigmatophyceae) inmovilizadas en alginato de calcio. Ciencias Marinas. Vol. 28, No. 001, 107-119
73. Muñoz, C. (2007). Remoción de metales pesados en aguas residuales utilizando una macrófita acuática (*Eleocharis Acicularis*) muerta. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales.
- Nakajima, A. & Sakaguchi, T. (1986). Selective accumulation of heavy metals by microorganisms. Applied Microbiology and Biotechnology, 24 (1), 59-64.
- National Pollutant Inventory. (2010). Zinc and compounds: Overview. Extraído el 08 de noviembre, 2010, de <http://www.npi.gov.au/substances/zinc/index.html>.
74. Niu, H. & Volesky, B. (2003). *Characteristics of anionic metal species biosorption with waste crab shells*. Hidrometallurgy: 71(1-2), 209-215.
75. Nweke, C. (2009). Kinetics of zinc toxicity to environmental bacterial isolates. Journal of Applied Science, 4 (3), 23-34.
76. Nweke, C., Okolo, J., Nwanyanwu, C. & Alisi, C. (2006). Response of planktonic bacteria of New Calabar River to zinc stress. African Journal of Biotechnology, 5 (8), 653-658.
77. Orellana, D. (2009). Precipitación de metales pesados provenientes de un efluente de una Planta de Beneficio, del Rio Guanache y del Rio Siete del Distrito Minero Bella Rica utilizando un consorcio de bacterias sulfato-reductoras del mismo Distrito. Universidad Técnica Particular de Loja.

78. Orji, J., Nweke, C., Nwabueze, R. Anyaegbu, B. Chukwu, J., Chukwueke, C., Nwanyanwu, C. (2008). Impact of some divalent cations on periplasmic nitrate reductase and dehydrogenase enzymes of *Escherichia*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. Journal of Applied Science, 3 (2), 5-18.
79. Pérez, C. (2008). Contaminación por metales: una perspectiva ecotoxicológica y para la salud humana. Extraído el 13 de agosto, 2010, del sitio Web del Instituto Técnico para la acreditación de establecimientos de salud: <http://www.itaes.org.ar-/biblioteca/Contaminacionmetales.pdf>.
80. Prescott, L., Harley, J. & Klein, D. (2009). Microbiología. Séptima edición. España: McGraw-Hill Interamericana, 28-30.
81. Punte, M. (2001). Higiene y seguridad en la industria textil. Universidad Técnica del Norte. Ibarra. Extraído el 22 de agosto, 2010, del sitio Web de ARTISAM, Asesoría y negocios en la industria textil: <http://www.artisam.org/descargas/pdf/HI-GIENE%20Y%20SEGURIDAD%20EN%20EL%20TRABAJO.pdf>
82. Reed, S. (2005). Electron microprobe analysis and scanning electron microscopy in geology. New York: Cambridge University Press.
83. Roane, T., Josephson K., Pepper, I. (2001). Dual-Bioaugmentation strategy to enhance remediation of cocontaminated soil. Applied and Environmental microbiology. Vol. 67, No. 7., 3208-3215.
84. Rodríguez, A., Letón, P., Rosal, R., Dorado, M., Villar, S. & Sanz, J. (2006). Tratamientos avanzados de aguas residuales industriales. Vol. 2. Madrid: CITME.

85. Rodríguez, K. (2005). Eficacia del hongo *Pleurotus ostreatus* como biorremediador de suelos contaminados con metales pesados. Tesis de Maestría en Ciencias en Biología. Universidad de Puerto Rico.
86. Rose, P., Boshoff, G., van Ville, R., Wallace, L., Dunn, K. & Duncan, J. (1998). An integrated algal sulphate reducing high rate ponding process for the treatment of acid mine drainage wastewaters. *Biodegradation*, 9, 247–257.
87. Salinas, E., Elorza, M., Rezza, I., Martínez, L., Marchesvky, E. & Sanz de Tosetti, M. (2000). Removal of cadmium and lead from dilute aqueous solutions by *Rhodotorula rubra*. *Bioresource Technology*, 72 (2), 107-112.
88. Sanmartín, V. (2009). Biorremediación de metales pesados. Área de biotecnología microbiana. Centro de Biología Celular y Molecular (CBCM). Extraído el 14 de noviembre, 2010, del sitio Web de la Universidad Técnica Particular de Loja: <http://www.utpl.edu.ec/utpl/biorremediaciondemetalespesados>.
89. Saravanan, A., Brindha, V., Manimekalai, R. & Krishnan, S. (2009). An evaluation of chromium and zinc biosorption by a sea weed (*Sargassum* sp.) under optimized conditions. *Indian Journal of Science and Technology*, 2 (1).
90. Sethuraman, P. & Balasubramanian, N. (2010). Removal of Cr (VI) from aqueous solution using *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter cloacae*. *International Journal of Engineering Science and Technology*, 2 (6), 1811-1825.

91. Sigalevich, P., Meshorer, E., Helman, Y. & Cohen, Y. (2000). Transition from anaerobic to aerobic growth conditions for the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio oxyclinae* results in flocculation. Applied and Environmental Microbiology, 66 (11), 5005-5012.
92. Simm, C., Lahner, B., Salt, D., LeFurgey, A., Ingram, P., Yandell, B. & Eide, D. (2007). *Saccharomyces cerevisiae* vacuole in zinc storage and intracellular zinc distribution. Eukaryotic Cell, 6 (7), 1166-1177.
93. Smith, B. (1989, Abril). Pollutant source Reduction: Part II - Chemical handling. American Dyestuff Reporter, 78 (4), 26-28, 30-32.
94. Smith, E. (2008). The zinc industry. Bazaar, 139.
95. Strosnider, H. (2003). Whole-Cell Bacterial Biosensors and the Detection of Bioavailable Arsenic. U.S. Environmental Protection Agency. Extraído el 20 de agosto, 2010, de <http://www.bvsde.paho.org/bvstox/fulltext/tdbacterial.pdf>.
96. Suárez, P. & Reyes, R. (2002). La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia para el ambiente. Interciencia, 27 (4), 160-164.
97. Toledo, K. (2009). Aplicación de procesos biológicos como medida de remediación para recuperar suelos limo-arcillosos contaminados con gasolina. Tesis de Ingeniería en Ciencias de la Tierra. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil, Ecuador.

98. Torres, R. & Juvina, P. (2005). Desarrollo e implementación de un sistema de monitorización mediante sensores químicos de un proceso de biosorción para la recuperación de ion cobre (II) en efluentes acuosos. Universidad Politécnica de Cataluña. Tesis de Maestría.
99. U.S. Environmental Protection Agency EPA (1978). Washington D.C., Estados Unidos.
100. Vance, D. (1994). Metals and groundwater part II: In-situ bioremediation of metals contaminated groundwater. 2 The 4 Technology Solutions. The National Environmental Journal, 4 (1), 24-25.
101. Vásquez, V. (2005). Biosorción de metales pesados en solución acuosa mediante biomasa bacteriana muerta. Tesis de Licenciatura en Biología. Universidad de las Américas. Puebla, México.
102. Verdugo, M. & Yunga, G. (2009). Eliminación de metales tóxicos de aguas residuales industriales utilizando zeolitas naturales. Tesis de Ingeniería Ambiental. Universidad Politécnica Salesiana. Cuenca, Ecuador
103. Vieira, R. & Volesky, B. (2000). Biosorption: a solution to pollution?. International Microbiology, 3, 17-24.
104. Vigo, F., Gallego, S. & Sepúlveda, J. (2006). Soluciones al ensuciamiento de membranas en instalaciones de ósmosis inversa. Extraído el 14 de diciembre, 2010, de <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd61/soluciones.pdf>.

105. Vilaseca, M., Más-Castella, J., Hernández, J. (1989) Identificación taxonómica de las bacterias propias de los fangos activados en una depuradora piloto de agua residual Textil. Ingeniería Química, 20 (226): 131-136.
106. Vílchez, R. (2005). Eliminación de metales pesados de aguas subterráneas mediante sistemas de lechos sumergidos: estudio microbiológico de las biopelículas. Tesis Doctoral en Ciencias. Universidad de Granada.
107. Wase, J. & Forester, C. (1997). Biosorbents for metal ions. London: Tylor & Francis.
108. Zolgharnein, H. (2005). Characterization of heavy metal removal bacteria from the Persian Gulf. Tesis de Doctorado. Universidad de Malasia. Extraído el 3 de Septiembre, 2010, de: [http://psasir.upm.edu.my/6594/1/FPV\\_2005\\_2%281-24%29.pdf](http://psasir.upm.edu.my/6594/1/FPV_2005_2%281-24%29.pdf)

## ANEXOS

## ANEXO A: Análisis de zinc por espectrofotometría de absorción atómica de flama

### Condiciones Instrumentales para el análisis de Zn (II) por Absorción Atómica:

Lámpara de cátodo hueco:	Zinc
Modo de calibración:	Concentración
Modo del instrumento:	Absorbancia
Unidades de Conc.	mg.L <sup>-1</sup>
Longitud de onda:	213.9 nm
Anchura de rendija:	1 nm
Corriente de lámpara:	5 mA
Combustible:	Acetileno
Oxidante:	Aire
Tipo de flama:	Oxidante

### Preparación de soluciones estándar de calibración:

- Se utiliza una solución stock certificada a una concentración de 1000 mg.L<sup>-1</sup> de zinc.
- Se preparó una serie de diluciones a partir de la solución stock para obtener concentraciones que cubran el rango óptimo de concentración y así ser utilizados como estándares de calibración al momento del análisis de las muestras problema.

### Desempeño del Método:

Rango óptimo de trabajo: 0.05-1 mg.L<sup>-1</sup> para longitud de onda de 213.9 nm.

Límite de detección: <0.1 mg.L<sup>-1</sup>

ANEXO B: Ordenanza Municipal del Distrito Metropolitano de Quito (2005) con los límites máximos permisibles por cuerpo receptor.

Parámetros	Expresado como	Unidad	Límite Máximo Permissible	
			Alcantarillado	Cauce de Agua

Aceites y grasas	A y G	mg.L <sup>-1</sup>	50	30
Aluminio	Al	mg.L <sup>-1</sup>	5	5
Arsénico total	As	mg.L <sup>-1</sup>	0,1	0,1
Cadmio	Cd	mg.L <sup>-1</sup>	0,02	0,02
Caudal máximo	-	L.s <sup>-1</sup>	1,5 veces el caudal (1)	4,5 dato referencial
Cianuro	CN-	mg.L <sup>-1</sup>	1	0,1
Coliformes fecales	MNP/100mL		-	Remoción > 99% (2)
Cobre	Cu	mg.L <sup>-1</sup>	1	1
Cromo hexavalente	Cr <sup>+6</sup>	mg.L <sup>-1</sup>	0,5	0,5
Compuestos fenólicos	Fenol	mg.L <sup>-1</sup>	0,2	0,2
Color real	color real	unidades de color	-	Inapreciable en dilución: 1/20 (3)
Fósforo total	P	mg.L <sup>-1</sup>	15	10
Hidrocarburos totales	TPH	mg.L <sup>-1</sup>	20	20
Materia flotante	Visible	-	Ausencia	Ausencia
Manganeso	Mn	mg.L <sup>-1</sup>	10	2
Mercurio (total)	Hg	mg.L <sup>-1</sup>	0,01	0,005
Níquel	Ni	mg.L <sup>-1</sup>	2	2
Organoclorados totales	Concentración	mg.L <sup>-1</sup>	0,05	0,05
Organofosforados totales	Concentración	mg.L <sup>-1</sup>	0,1	0,1
Plomo	Pb	mg.L <sup>-1</sup>	0,5	0,2
Potencial de hidrógeno	pH		5-9	5-9
Sólidos sedimentables	-	mL.L <sup>-1</sup>	10	1
Sulfuros	S	mg.L <sup>-1</sup>	1	0,5
Sulfatos	SO <sub>4</sub>	mg.L <sup>-1</sup>	400	1000
Temperatura	-	°C	<40	<35
Tensoactivos	MBAS (4)	mg.L <sup>-1</sup>	0,5	0,5
<b>Zinc</b>	<b>Zn</b>	<b>mg.L<sup>-1</sup></b>	<b>2</b>	<b>2</b>

(1) Caudal promedio horario del sistema de alcantarillado.

(2) Los regulados con descargas de coliformes fecales menores de 3000 quedan exentos de tratamiento.

(3) La apreciación del color se estima sobre 10 cm de muestra diluida.

(4) Sustancias activas al azul de metileno.

## DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

**Diana Elizabeth García Tumipamba**

### **Declaro que:**

La tesis de grado titulada “EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE BIORREMOCIÓN DE ZINC EN AGUA SINTÉTICA DE DOS CONSORCIOS MICROBIANOS NATIVOS, A ESCALA DE LABORATORIO”, ha sido desarrollada con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, 27 de enero del 2011

---

Diana Elizabeth García Tumipamba

### **CERTIFICACIÓN**

Dra. Blanca Naranjo

Lic. Biol. Alma Koch, MC.

**Certifican:**

Que el trabajo titulado **“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE BIORREMOCIÓN DE ZINC EN AGUA SINTÉTICA DE DOS CONSORCIOS MICROBIANOS NATIVOS, A ESCALA DE LABORATORIO”**, realizado por la Srta. **DIANA ELIZABETH GARCIA TUMIPAMBA**, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple con las normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto, el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat (pdf). Autorizan a la Srta. Diana Elizabeth García Tumipamba que lo entregue al Ing. Rafael Vargas, en su calidad de Coordinador de la Carrera.

Sangolquí, 27 de enero del 2011

---

Dra. Blanca Naranjo  
DIRECTORA

---

Lic. Biol. Alma Koch, MC.  
CODIRECTORA

**A U T O R I Z A C I Ó N**

Yo, Diana Elizabeth García Tumipamba

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución de la tesis de grado titulada: “EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE BIORREMOCIÓN DE ZINC EN AGUA SINTÉTICA DE DOS CONSORCIOS MICROBIANOS NATIVOS, A ESCALA DE LABORATORIO”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, 27 de enero del 2011

---

Diana Elizabeth García Tumipamba