

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



**TÉCNICAS *IN VITRO* PARA BIORREMEDIACIÓN
DE CROMO Y PLOMO**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

Rafael Ángel Núñez Chaves

CARTAGO, 2007

TÉCNICAS *IN VITRO* PARA BIORREMEDIACIÓN DE CROMO Y PLOMO

Rafael Ángel Núñez Chaves ¹

RESUMEN

La biorremediación es el proceso por el cual los organismos vivos son empleados para la descontaminación efectiva de un sistema. Los metales pesados como plomo y cromo son tóxicos en altas concentraciones, pero mediante técnicas de biorremediación es posible reducirlas. El objetivo de este trabajo fue ensayar técnicas *in vitro* para biorremediación de cromo y plomo. Para esto se aislaron cepas de microorganismos resistentes a altas concentraciones de cromo y plomo y se evaluó su potencial biorremediador en un medio líquido contaminado con los metales.

Se definieron dos cepas de hongos filamentosos del género *Penicillium* sp, identificadas como C1Cr y C1Pb como las más eficientes en reducir la concentración de cromo y plomo respectivamente. En estas cepas también se ensayaron técnicas de biorremediación mediante inmovilización en superficies inertes, obteniéndose buenos resultados utilizando esponjas vegetales (paste) y alginato de calcio como medios para la inmovilización. Estas cepas tienen la capacidad de biosorber y/o bioacumular los metales en su biomasa, reduciendo así su concentración en el medio, esto se da más rápidamente por la cepa C1Cr que por C1Pb.

Palabras claves: *in vitro*, biorremediación, *Penicillium* sp, *Aspergillus* sp

¹ Informe de Trabajo Final de Graduación, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2007.

**TÉCNICAS *IN VITRO* PARA BIORREMEDIACIÓN
DE CROMO Y PLOMO**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

Miembros del Tribunal

**Dra. Virginia Montero
Profesora Asesora-ITCR**

**Ing. María Porras
Asesora- Empresa**

**Ing. Olga Rivas
Lectora**

DEDICATORIA

A DIOS

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer sinceramente:

A los funcionarios del CEQIATEC por su ayuda y compañerismo durante la realización del proyecto.

A los funcionarios del Centro de Investigación en Biotecnología, especialmente a la Dra. Ana Abdelnour por la facilitación del reactivo necesario en el ensayo de inmovilización.

A los miembros del Tribunal evaluador, especialmente a la Dra. Virginia Montero por su guía durante la realización el proyecto.

INDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN.....	2
ACREDITACIÓN.....	3
DEDICATORIA.....	4
AGRADECIMIENTOS.....	5
INDICE GENERAL.....	6
INDICE DE CUADROS.....	8
INDICE DE FIGURAS.....	9
INDICE DE ANEXOS.....	11
INTRODUCCION.....	12
REVISION DE LITERATURA.....	13
Proceso de biorremediación.....	13
Contaminación por metales pesados.....	14
El cromo como contaminante.....	15
El plomo como contaminante.....	15
Biorremediación de metales pesados.....	16
OBJETIVOS: GENERAL Y ESPECIFICOS.....	18
MATERIALES Y METODOS.....	19
Obtención de muestras contaminadas con cromo y plomo.....	19
Aislamiento de microorganismos resistentes a altas concentraciones de cromo y plomo.....	19
Determinación de la resistencia a cromo y plomo de los microorganismos aislados en placa.....	20
Ensayo de reducción de cromo y plomo en medio líquido.....	20
Inmovilización de los microorganismos con mayor potencial de biorremediación.....	22
Ensayos de reducción de cromo y plomo en medio líquido por los microorganismos inmovilizados.....	24
Evaluación de la capacidad de remoción de cromo y plomo de las cepas en un influente a diferentes velocidades de flujo.....	26
RESULTADOS.....	28
Obtención de muestras ambientales contaminadas con cromo y plomo.....	28
Aislamiento de microorganismos resistentes a altas concentraciones de cromo y plomo.....	28
Determinación de la resistencia a cromo y plomo de los microorganismos aislados en placa.....	32
Ensayo de reducción de cromo y plomo en medio líquido.....	34
Inmovilización de los microorganismos con mayor potencial de biorremediación.....	39
Ensayos de reducción de cromo y plomo en medio líquido por los microorganismos inmovilizados.....	41
Evaluación de la capacidad de remoción de cromo y plomo de las cepas en un influente con diferentes velocidades de flujo.....	44

	Pág.
DISCUSION DE RESULTADOS.....	45
Obtención de microorganismos resistentes.....	45
Biorremediación en medio líquido.....	47
Biorremediación mediante cepas inmovilizadas.....	50
Remoción de metales en un influente con diferentes velocidades de flujo.....	53
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	54
Conclusiones.....	54
Recomendaciones.....	55
BIBLIOGRAFIA.....	56
ANEXOS.....	60

INDICE DE CUADROS

Núm.	Título	Pág.
1	Cepas aisladas resistentes a altas concentraciones de cromo (VI) y plomo (II) a partir de las muestras	31
2	Determinación semicuantitativa del crecimiento de las cepas aisladas en medio APD suplementado con diferentes concentraciones de cromo (VI) luego de 5 días de incubación.	32
3	Determinación semicuantitativa del crecimiento de las cepas aisladas en medio APD suplementado con diferentes concentraciones de plomo (II) luego de 5 días de incubación.	33
4	Capacidad de retención de cromo total en la biomasa de las cepas.	37
5	Capacidad de retención de plomo en la biomasa de las cepas.	39
6	Inmovilización de las cepas en tela de poliéster	39
7	Inmovilización de las cepas en esponja	40

INDICE DE FIGURAS

Núm.	Título	Pág.
1	Microorganismos aislados resistentes a altas concentraciones de cromo (VI) luego de 72 horas de incubación	29
2	Observación macroscópica y microscópica de las cepas C1Cr y C2Cr	29
3	Microorganismos aislados resistentes a altas concentraciones de plomo (II) luego de 72 horas de incubación	30
4	Observación macroscópica y microscópica de las cepas C1Pb, C2Pb y C3Pb.	31
5	Crecimiento de las cepas C1Cr y C2Cr en placa con diferentes concentraciones de cromo (VI) luego de 5 días de incubación	32
6	Crecimiento de las cepas C1Pb, C2Pb y C3Pb en placa con diferentes concentraciones de plomo (II) luego de 5 días de incubación.	34
7	Cinética de disminución de cromo total en medio líquido por la cepa C1Cr y C2Cr.	35
8	Ensayo de reducción de cromo en medio líquido a las 0 horas y al día 6 por las cepas C1Cr y C2Cr.	36
9	Porcentaje de remoción de cromo en medio líquido por cada cepa resistente a cromo	36
10	Concentración de cromo total, hexavalente y trivalente en la biomasa de las cepas.	37
11	Cinética de disminución de plomo en medio líquido por las cepas C1Pb, C2Pb y C3Pb.	38
12	Porcentaje de remoción de plomo en medio líquido por cada cepa resistente a plomo.	38
13	Ensayo de inmovilización en esponja. A: cepa C1Cr, B: cepa C1Pb	40
14	Pellets de las cepas C1Cr y C2Pb encapsulados en esferas de alginato de calcio.	40

Núm.	Título	Pág.
15	Cinética de disminución de cromo total en medio líquido en los ensayos de inmovilización.	41
16	Ensayo de reducción de cromo en medio líquido a las 0 horas y al día 6 por la cepa C1Cr inmovilizada.	42
17	Porcentaje de remoción de cromo total en medio líquido por la cepa C1Cr en los ensayos de inmovilización.	42
18	Cinética de disminución de plomo en medio líquido en los ensayos de inmovilización.	43
19	Porcentaje de remoción de plomo en medio líquido por la cepa C1Pb en los ensayos de inmovilización.	43
20	Porcentaje de remoción de cromo total en un influente a diferentes velocidades de flujo	44
21	Porcentaje de remoción de plomo en un influente a diferentes velocidades de flujo	44

INDICE DE ANEXOS

Núm.	Título	Pág.
1	Preparación del medio de cultivo Agar Papa Dextrosa	61
2	Preparación del medio de cultivo M1	61
3	Tela y esponja vegetal (paste) empleados en los ensayos de inmovilización	62
4	Preparación del medio de cultivo M1 modificado con alginato de sodio	62
5	Ensayo de reducción de cromo y plomo en medio líquido por las cepas inmovilizadas	63
6	Ensayo diseñado para determinar la remoción de cromo y plomo en un influente con diferentes velocidades de flujo	64
7	Muestra colectada contaminada con cromo	64
8	Muestra colectada contaminada con plomo	65
9	Comparación entre la bacteria identificada como C2Cr y <i>Thiocapsa sp (A)</i>	65

INTRODUCCIÓN

Actualmente uno de los mayores problemas que afrontamos es el deterioro constante del medio ambiente a causa de contaminantes que son vertidos sobre la superficie terrestre y el agua. Muchos de estos contaminantes son metales pesados que en altas concentraciones, son tóxicos para el ser humano y demás organismos que habitan el medio ambiente, trayendo como consecuencia una alteración en la vida natural de los ecosistemas.

A pesar de su toxicidad, en la naturaleza existen organismos que tienen la capacidad de crecer en medios que contengan estos contaminantes, de transformarlos en sustancias menos tóxicas e incluso de acumularlas dentro de sus células, ello permite disminuir la concentración del contaminante en el medio.

A esta manera de reducir los contaminantes presentes en un medio natural a través de organismos vivos se le llama biorremediación. La biorremediación de ambientes contaminados con metales pesados es factible utilizando microorganismos como hongos o bacterias, especialmente cierto tipo de hongos filamentosos.

Es por esto que es necesario desarrollar técnicas de biorremediación como las presentadas en este proyecto llevadas a cabo en las instalaciones del Centro de Investigación y de Servicios Químicos y Microbiológicos (CEQIATEC) del ITCR durante el segundo semestre del curso lectivo 2007.

Este proyecto, mediante pruebas de laboratorio, permitirá desarrollar estas técnicas útiles para biorremediar y que podrían ser implementadas *in situ* para descontaminar una zona natural. Además, los conocimientos generados en el proyecto podrán ser transmitidos a los estudiantes del Instituto Tecnológico de Costa Rica mediante prácticas de laboratorio en microbiología ambiental.

REVISIÓN DE LITERATURA

PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN

Biorremediación es el proceso por el cual los organismos vivos son empleados para la descontaminación efectiva de un sistema contaminado. Dicho proceso explota la diversidad genética y la versatilidad metabólica de los microorganismos para transformar contaminantes en productos finales menos tóxicos, los cuales son integrados en los ciclos biogeoquímicos naturales o de acumularlos en su biomasa reduciendo la concentración del contaminante en el medio (Rivera *et al.*, 2003).

Se pueden mencionar diferentes formas de biorremediación, ya sea empleando enzimas en el sitio contaminado con el fin de degradar las sustancias nocivas, usando microorganismos directamente en el foco de la contaminación los cuales pueden existir en ese sitio o pueden provenir de otros ecosistemas. En este caso generalmente se emplean mezclas de microorganismos, aunque algunos se basan en la introducción de cepas definidas de bacterias u hongos. También cabe mencionar la biorremediación empleando plantas o fitorremediación debido a la capacidad que tienen algunas especies vegetales de absorber, acumular y/o tolerar altas concentraciones de contaminantes como metales pesados, compuestos orgánicos y radioactivos (De Oliveira y Narasimha, 1999).

Otra forma de clasificar la biorremediación es según el lugar donde se lleve a cabo, de esta forma cuando el tratamiento se hace en el mismo lugar natural donde ocurre la contaminación se le llama biorremediación *in situ* y cuando se toman muestras de suelo o agua contaminada y se trasladan a otro lugar para ser tratadas en un biorreactor, plantas de tratamiento o bioláminas, se habla de biorremediación *ex situ*. A nivel experimental se practica la biorremediación *in vitro* como una manera de mantener las condiciones de trabajo controladas (Rodríguez y Sánchez, 2004).

Dentro de los microorganismos empleados en biorremediación se encuentran bacterias, protozoos, algas y hongos. Los hongos tienen muchas ventajas que facilitan el estudio de su uso en la biorremediación, por ejemplo: están presentes en sedimentos acuáticos y en hábitats terrestres, además poseen ventaja sobre las bacterias por el hecho de que sus hifas pueden penetrar el suelo contaminado y producir enzimas extracelulares que degradan los contaminantes (Garon *et al.*, 2004). Los hongos son además, muy buenos en la acumulación de metales pesados como cadmio, cobre, mercurio, plomo, cromo y zinc (Rodríguez, 2005)

CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS

Las actividades industriales generan una contaminación a gran escala con metales pesados (Cu, Zn, Pb, Cd, Cr, Ni, Hg, Co, Ag, Au) en el medio ambiente. En el caso particular de los suelos, suelen afectar la fertilidad y el uso posterior de los mismos, mientras que en el caso de los acuíferos y aguas superficiales, pueden comprometer seriamente el uso de este recurso como fuente de agua para el consumo humano (Hursthouse, A. 2001).

El impacto ambiental de los contaminantes metálicos en suelos y sedimentos es estrictamente dependiente de la capacidad de acomplejamiento de éstos con componentes del medio ambiente y su respuesta a las condiciones fisicoquímicas y biológicas de su entorno. Los metales son especies químicas no degradables, por tal motivo, una vez volcados al medio ambiente, sólo pueden distribuirse entre los entornos aire - agua - suelo, a veces cambiando su estado de oxidación, o bien pueden incorporarse a los seres vivos (Vullo, 2003).

La remediación de estos ambientes contaminados mediante la utilización de métodos químicos involucra procesos de costos excesivamente altos debido a la especificidad requerida. Por otra parte, la utilización de métodos biológicos para remediar un ambiente contaminado (biorremediación) ofrece una alta especificidad en la remoción del metal de interés con flexibilidad operacional, tanto en sistemas *in situ* como *ex situ* (Kalbitz y Wennrich, 1998).

EL CROMO COMO CONTAMINANTE

El cromo es de amplia importancia, ya que es utilizado en distintas actividades industriales, como el curtido de cueros y pieles, elaboración de colorantes y pigmentos, cromado electrolítico, etc. Aunque el cromo puede existir en diferentes estados de oxidación, en el ambiente solo se encuentran en forma estable los estados +3 [Cr(III)] y +6 [Cr(VI)] (Cervantes *et al.*, 2001).

El comportamiento ambiental del cromo depende de su estado de oxidación; los compuestos con cromo hexavalente [principalmente cromatos $[(CrO_4)^{2-}]$ y dicromatos $[(Cr_2O_7)^{2-}]$ son altamente tóxicos para organismos acuáticos y terrestres, en los que pueden inducir alteraciones genéticas y son más móviles en sistemas suelo/agua que los compuestos de cromo trivalente (Katz y Salem, 1993).

Esto es debido a las diferentes propiedades químicas de dichos iones: los compuestos de Cr(VI) son oxidantes fuertes y altamente solubles, con capacidad de atravesar fácilmente las membranas biológicas, mientras que los compuestos de Cr(III) tienden a formar precipitados relativamente inertes a pH cercanos a la neutralidad (Rivera *et al.*, 2003).

EL PLOMO COMO CONTAMINANTE

El plomo, en las cadenas tróficas, está presente en dos grupos de especies químicas, las inorgánicas, de mayor trascendencia y, las orgánicas, con características diferentes.

Las especies inorgánicas, dentro de las cadenas tróficas, están constituidas principalmente por Pb metal, los óxidos y una única especie iónica, el catión divalente Pb^{2+} . Las especies orgánicas son habitualmente las alquiladas (Doadrio, 2006)

El plomo es un contaminante tóxico que no se degrada y permanece en el ambiente siendo peligroso para el hombre a niveles tan bajos como 5 ppm. Llega a los cuerpos de agua por procesos industriales o por la extracción de minerales, siendo esta última la fuente primaria de contaminación, afecta la cadena alimenticia y provoca la bioacumulación en organismos de la cadena trófica (Rivas *et al.*, 2002).

BIORREMEDIACION DE METALES PESADOS

Uno de los mayores problemas ambientales es la acumulación de metales pesados en los ecosistemas producto de desechos industriales mal tratados y su tratamiento a través de técnicas de biorremediación es una alternativa eficiente y rentable (Castro *et al.*, 2003; Romero *et al.*, 2006).

A diferencia de otras tecnologías convencionales, como por ejemplo la incineración, la biorremediación se puede llevar a cabo en el lugar mismo del problema y aunque el número de compuestos tóxicos que esta tecnología puede manejar es limitado, es costo-efectiva cuando aplica, además según la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), la biorremediación y la fitorremediación son las técnicas de control de contaminación más económicas disponibles hoy día (Rodríguez, 2005).

El rol de los microorganismos es fundamental en los ciclos biogeoquímicos de los metales y su utilización en los procesos de biorremediación de desechos sólidos y líquidos es esencial para el cuidado del medio ambiente. Dentro de la amplia diversidad microbiana, existen microorganismos resistentes y/o tolerantes que son de particular interés como captadores de metales en sitios contaminados, debido a que ambos pueden extraer los contaminantes y participar en el proceso de biorremediación (Lovley, 2000).

Los microorganismos pueden transformar los metales de dos formas, una es la movilización del metal en la que se hace pasar de un estado insoluble inicial a otro soluble final, proceso conocido también como lixiviación microbiana. La otra forma

de transformación es la inmovilización del metal, es decir, el paso de un estado soluble inicial a uno insoluble final en fase sólida, y existen diferentes mecanismos que utilizan los microorganismos para lograr la inmovilización del metal, como la biosorción, bioacumulación, biomineralización, biotransformación y quimiosorción (Vullo, 2003).

La biosorción es un fenómeno ampliamente estudiado en la biorremediación de diversos metales pesados como el cadmio, cromo, plomo, níquel, zinc y cobre (Jianlong *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2003). Consiste en la incorporación del metal a las células de manera pasiva (independiente de energía), mediante interacción química con componentes de la pared celular (Rosales *et al.*, 2002).

La biomasa capaz de participar en estos procesos puede ser fácilmente extraíble de sistemas acuosos como cursos de aguas o efluentes de diversos orígenes, por lo que el proceso global de biorremediación sería rentable. Es por ello que la búsqueda de este tipo de microorganismos se encuentra en crecimiento constante, junto con el estudio de sistemas biosorbentes como por ejemplo la utilización de consorcios microbianos, o sistemas mixtos formados por microorganismos y macromoléculas (polímeros) sorbentes, que incrementarían los rendimientos en la captación de mezclas de metales pesados (Lebeau *et al.*, 2002).

La bioacumulación es otro mecanismo conocido que involucra un sistema de transporte de membrana que internaliza al metal pesado presente en el entorno celular con gasto de energía. Una vez incorporado el metal pesado al citoplasma, éste es secuestrado por la presencia de proteínas ricas en grupos sulfhidrilos llamadas metalotioneínas o también puede ser compartimentalizado dentro de una vacuola, como ocurre en hongos. La biotransformación es un proceso que involucra un cambio químico sobre el metal pesado, como por ejemplo en el estado de oxidación o metilación mediada por enzimas microbianas, puede dar como resultado compuestos poco solubles en agua o bien compuestos volátiles (Vullo, 2003).

OBJETIVOS

Objetivo General

- Ensayar técnicas *in vitro* para biorremediación de cromo y plomo

Objetivos específicos

- Aislar cepas de microorganismos resistentes a altas concentraciones de cromo y plomo.
- Determinar el potencial biorremediador de estas cepas en medio líquido.
- Ensayar técnicas de inmovilización en las cepas con mayor potencial de biorremediación.
- Determinar el potencial biorremediador de las cepas inmovilizadas.
- Evaluar la capacidad de remoción de cromo y plomo de las cepas con mayor potencial de biorremediación en un influente a diferentes velocidades de flujo.

MATERIALES Y METODOS

1. Obtención de muestras contaminadas con cromo y plomo.

Para obtener las muestras contaminadas con estos metales, se visitaron dos empresas que generan desechos con altas concentraciones de cromo y plomo.

1.1. Muestras contaminadas con cromo

Se colectaron muestras de desechos del tratamiento de cueros de la tenería El Molino, ubicada en Cartago centro, en bolsas de plástico de 100 ml. Se transportaron al laboratorio y se almacenaron a baja temperatura.

1.2. Muestras contaminadas con plomo

Se visitó la empresa Baterías Irazú, ubicada en La Lima de Cartago, y se tomaron muestras del líquido interno de baterías desechadas de vehículos. Estas se almacenaron en recipientes de plástico de 250 ml, fueron trasladadas al laboratorio y almacenadas a baja temperatura.

2. Aislamiento de microorganismos resistentes a altas concentraciones de cromo y plomo.

Para aislar los microorganismos presentes en las muestras con resistencia a los metales, se empleó el método de cultivo en placa empleando un medio simple suplementado con una concentración definida del metal a probar la resistencia.

2.1. Microorganismos resistentes a cromo

Se prepararon diluciones 1:10 y 1:100 de las muestras contaminadas con cromo. Se tomaron 100 µl de cada dilución y de la muestra sin diluir, se inocularon en placas con medio de cultivo Agar Papa dextrosa (APD) y 50 ppm de cromo (VI). (anexo 1). Se dejaron incubar por 72 horas.

Los hongos aislados se identificaron mediante la observación de sus estructuras reproductivas.

2.2. Microorganismos resistentes a plomo

Se prepararon diluciones 1:10 y 1:100 de las muestras contaminadas con plomo, se tomaron 100 µl de cada dilución y de la muestra sin diluir, se inocularon en

placas con medio de cultivo APD y 50 ppm de plomo (II) (anexo 1). Se dejaron incubar por 72 horas.

Los hongos aislados se identificaron mediante la observación de sus estructuras reproductivas.

3. Determinación de la resistencia a cromo y plomo de los microorganismos aislados en placa.

Se determinó el nivel de resistencia de los microorganismos aislados mediante el método de cultivo en placas con medio APD y concentraciones crecientes del metal a evaluar.

3.1. Resistencia a cromo

Debido a que la muestra contaminada con cromo resultó ser muy pura y solo se observó el crecimiento de dos cepas de microorganismos en todos los aislamientos, se tomaron 100 µl directamente de la muestra y se inocularon en placas con medio de cultivo APD y diferentes concentraciones de cromo (VI): 0, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 y 500 ppm. Se dejaron incubar por 5 días.

3.2. Resistencia a plomo

En el caso de los microorganismos presentes en la muestra contaminada con plomo, éstos se aislaron mediante subcultivos en placas con medio de cultivo APD y 50 ppm de plomo (II). Posterior a su purificación se prepararon soluciones de 1×10^8 esporas/ml de cada cepa en agua peptonada, se tomaron 100 µl de cada una y se inocularon en placas con medio de cultivo APD y diferentes concentraciones de plomo (II): 0, 50, 100, 150, 250, 500, 750 y 1000 ppm. Se dejaron incubar por 5 días.

4. Ensayo de reducción de cromo y plomo en medio líquido.

Para determinar el potencial biorremediador de los microorganismos aislados, se siguió el método de cultivo en medio líquido empleando un medio simple suplementado con una concentración definida del metal a evaluar y se calculó la concentración del metal en el medio a diferentes intervalos de tiempo durante 15

días. Además, se determinó la concentración del metal en la biomasa de los microorganismos al final del ensayo para obtener la capacidad de retención del metal en la biomasa.

Reducción de cromo

Se inocularon matraces con 125 ml de medio de cultivo M1 (anexo 1), suplementado con 50 ppm de cromo (VI), con 1×10^8 esporas/ml de las cepas resistentes a cromo.

En caso de que la alta concentración de cromo inhibiera el crecimiento del microorganismo, se preparó un precultivo en medio M1 sin cromo para lograr el desarrollo de biomasa. Posteriormente se traspasó la biomasa al medio M1 suplementado con 50 ppm de cromo (VI).

Los medios se incubaron a 28°C con agitación (200 rpm) y a diferentes intervalos de tiempo durante 15 días se tomaron alícuotas de 10 ml del medio de cultivo y se determinó la concentración de cromo total por espectrofotometría de absorción atómica.

Además, se aisló, mediante centrifugaciones y filtraciones, la biomasa de las cepas al final del ensayo y se determinó la concentración de cromo total para obtener la capacidad de retención del metal en su biomasa.

4.1.1. Determinación de cromo hexavalente y trivalente

Al final de los 15 días del ensayo de reducción de cromo en medio líquido, la biomasa de las cepas se obtuvo por centrifugación y filtración, se le realizó una digestión con ácido sulfúrico 20% y calentamiento (70°C) para extraerle el cromo y mediante una valoración química, empleando sulfato ferroso amoniacal y ferroin (complejo ferroso de orto-fenantrolina) como indicador, se determinó la concentración de cromo hexavalente (Cr^{6+}) en la biomasa de las cepas. Además, por diferencia con la concentración de cromo total se obtuvo la concentración de cromo trivalente (Cr^{3+}).

4.2. Reducción de plomo

Se inocularon matraces con 125 ml de medio de cultivo M1 suplementado con 50 ppm de plomo (II) con 1×10^8 esporas/ml de las cepas resistentes a plomo.

Los medios se incubaron a 28°C con agitación (200 rpm) y a diferentes intervalos de tiempo durante 15 días se tomaron alícuotas de 10 ml del medio de cultivo y se determinó la concentración de plomo total por espectrofotometría de absorción atómica.

Además, se aisló, mediante centrifugaciones y filtraciones, la biomasa de las cepas al final del ensayo y se determinó la concentración de plomo para obtener la capacidad de retención del metal en su biomasa.

5. Inmovilización de los microorganismos con mayor potencial de biorremediación.

Se ensayaron técnicas de inmovilización en la cepa con mayor potencial de biorremediación de cromo (C1Cr) y en la cepa con mayor potencial de biorremediación de plomo (C1Pb).

Se ensayó la inmovilización en diferentes materiales:

5.1. Inmovilización en tela de poliéster

5.1.1. Cepa C1Cr

Se inocularon 125 ml de medio de cultivo M1 con 1×10^8 esporas/ml de la cepa C1Cr. Al medio se le añadieron 8 secciones de tela de poliéster de 4 cm² cada uno (anexo 3) y de un mismo peso inicial. Se incubaron a 28°C con agitación (200 rpm), se tomó una muestra de estas secciones de tela a diferentes intervalos de tiempo, se le hicieron lavados con agua destilada para remover la biomasa no inmovilizada y se determinó la biomasa inmovilizada por diferencia con respecto al peso inicial de las secciones de tela.

5.1.2. Cepa C1Pb

Se inocularon 125 ml de medio de cultivo M1 con 1×10^8 esporas/ml de la cepa C1Pb. Al medio se le añadieron 8 secciones de tela de poliéster de 4 cm² cada uno y de un mismo peso inicial. Se incubaron a 28°C con agitación (200 rpm), se tomó una muestra de estas secciones de tela a diferentes intervalos de tiempo, se le hicieron lavados con agua destilada para remover la biomasa no inmovilizada y se determinó la biomasa inmovilizada por diferencia con respecto al peso inicial de las secciones de tela.

5.2. Inmovilización en esponja:

5.2.1. Cepa C1Cr

Se inocularon 125 ml de medio de cultivo con 1×10^8 esporas/ml de la cepa C1Cr. Al medio se le añadieron 8 secciones de esponja vegetal (paste) de 1 cm^3 cada uno (anexo 3) y de un mismo peso inicial. Se incubaron a 28°C con agitación (200 rpm), se tomó una muestra de estas secciones de esponja a diferentes intervalos de tiempo, se le hicieron lavados con agua destilada para remover la biomasa no inmovilizada y se determinó la biomasa inmovilizada por diferencia con respecto al peso inicial de las secciones de esponja.

5.2.2. Cepa C1Pb

Se inocularon 125 ml de medio de cultivo con 1×10^8 esporas/ml de la cepa C1Pb. Al medio se le añadieron 8 secciones de esponja vegetal (paste) de 1 cm^3 cada uno y de un mismo peso inicial. Se incubaron a 28°C con agitación (200 rpm), se tomó una muestra de estas secciones de esponja a diferentes intervalos de tiempo, se le hicieron lavados con agua destilada para remover la biomasa no inmovilizada y se determinó la biomasa inmovilizada por diferencia con respecto al peso inicial de las secciones de esponja.

5.3. Inmovilización de microorganismos mediante encapsulamiento de pellets en esferas de alginato de calcio:

5.3.1. Cepa C1Cr

Se inocularon 125 ml de medio de cultivo M1 con 1×10^8 esporas/ml de la cepa C1Cr. Se incubaron a 28°C con agitación (200 rpm). Luego de 72 horas, los pellets obtenidos se transfirieron a un medio de cultivo líquido M1 modificado al que se le añadió alginato de sodio 3%(m/v) (anexo 4) y se incubaron durante 6 horas a 28°C con agitación (200 rpm).

Posteriormente con una pipeta se tomaron muestras del medio que contenía pellets y se dejaron caer en forma de gotas a una solución de CaCl_2 0.1M. Los pellets encapsulados de la cepa C1Cr se mantuvieron en la solución de CaCl_2

0.1M durante 24 horas para dar mejor consistencia a las esferas de alginato de calcio.

5.3.2. Cepa C1Pb

Se inocularon 125 ml de medio de cultivo M1 con 1×10^8 esporas/ml de la cepa C1Pb. Se incubaron a 28°C con agitación (200 rpm). Luego de 72 horas, los pellets obtenidos se transfirieron a un medio de cultivo líquido M1 modificado al que se le añadió alginato de sodio 3%(m/v) y se incubaron durante 6 horas a 28°C con agitación (200 rpm).

Posteriormente con una pipeta se tomaron muestras del medio que contenía pellets y se dejaron caer en forma de gotas a una solución de CaCl_2 0.1M. Los pellets encapsulados de la cepa C1Pb se mantuvieron en la solución de CaCl_2 0.1M durante 24 horas.

6. Ensayos de reducción de cromo y plomo en medio líquido por los microorganismos inmovilizados.

Para determinar el potencial biorremediador de los microorganismos inmovilizados, se siguió el método de cultivo en medio líquido empleando una disolución acuosa con una concentración definida del metal a evaluar y se calculó la concentración del metal en el medio a diferentes intervalos de tiempo durante 15 días.

6.1. Microorganismos inmovilizados en tela de poliéster (anexo 5).

6.1.1. Cepa C1Cr

Luego de 72 horas del proceso de inmovilización en tela de poliéster de la cepa C1Cr, los trozos de tela se extrajeron del medio y se hicieron lavados con agua destilada para eliminar la biomasa no inmovilizada.

Luego del lavado, fueron colocados en un medio con agua sin destilar ni esterilizar y 50 ppm de cromo (VI).

El ensayo se mantuvo a 28°C y en agitación (200 rpm) durante 15 días y se tomaron muestras del medio a diferentes intervalos de tiempo para determinar la concentración de cromo total por espectrofotometría de absorción atómica.

6.1.2. Cepa C1Pb

Luego de 72 horas del proceso de inmovilización en tela de poliéster de la cepa C1Pb, los trozos de tela se extrajeron del medio y se hicieron lavados con agua destilada para eliminar la biomasa no inmovilizada.

Luego del lavado, fueron colocados en un medio con agua sin destilar ni esterilizar y 50 ppm de plomo (II).

El ensayo se mantuvo a 28°C y en agitación (200 rpm) durante 15 días y se tomaron muestras del medio a diferentes intervalos de tiempo para determinar la concentración de plomo total por espectrofotometría de absorción atómica.

6.2. Microorganismos inmovilizados en esponja (anexo 5).

6.2.1. Cepa C1Cr

Luego de 72 horas del proceso de inmovilización en esponja de la cepa C1Cr, los trozos de esponja se extrajeron del medio y se hicieron lavados con agua destilada para eliminar la biomasa no inmovilizada.

Luego del lavado, fueron colocados en un medio con agua sin destilar ni esterilizar y 50 ppm de cromo (VI).

El ensayo se mantuvo a 28°C y en agitación (200 rpm) durante 15 días y se tomaron muestras de los medios a diferentes intervalos de tiempo para determinar la concentración de cromo total por espectrofotometría de absorción atómica.

6.2.2. Cepa C1Pb

Luego de 72 horas del proceso de inmovilización en esponja de la cepa C1Pb, los trozos de esponja se extrajeron del medio y se hicieron lavados con agua destilada para eliminar la biomasa no inmovilizada.

Luego del lavado, fueron colocados en un medio con agua sin destilar ni esterilizar y 50 ppm de plomo (II).

El ensayo se mantuvo a 28°C y en agitación (200 rpm) durante 15 días y se tomaron muestras de los medios a diferentes intervalos de tiempo para determinar la concentración de plomo total por espectrofotometría de absorción atómica.

6.3. Microorganismos inmovilizados mediante encapsulamiento en esferas de alginato de calcio (anexo 5).

6.3.1. Cepa C1Cr

Luego de 24 horas de mantener los pellets de la cepa C1Cr encapsulados en esferas de alginato de calcio, fueron aislados y colocados en un medio con agua sin destilar ni esterilizar y 50 ppm de cromo (VI).

El ensayo se mantuvo a 28°C y en agitación (200 rpm) durante 15 días y se tomaron muestras del medio a diferentes intervalos de tiempo para determinar la concentración de cromo total por espectrofotometría de absorción atómica.

6.3.2. Cepa C1Pb

Luego de 24 horas de mantener los pellets de la cepa C1Pb encapsulados en esferas de alginato de calcio, fueron aislados y colocados en un medio con agua sin destilar ni esterilizar y 50 ppm de plomo (II).

El ensayo se mantuvo a 28°C y en agitación (200 rpm) durante 15 días y se tomaron muestras del medio a diferentes intervalos de tiempo para determinar la concentración de plomo total por espectrofotometría de absorción atómica.

7. Evaluación de la capacidad de remoción de cromo y plomo de las cepas en un influente a diferentes velocidades de flujo.

Para esto, se diseñó una columna (anexo 6) donde se colocaron las cepas a evaluar y se le hizo pasar una disolución acuosa, a diferentes velocidades de flujo, con una concentración definida de cada metal y se calculó su concentración a la salida de la columna.

Por diferencia entre la concentración del metal a la entrada y a la salida de la columna, se calculó la cantidad de metal removido de la disolución.

7.1. Remoción de cromo por la cepa C1Cr

Se inocularon 125 ml de medio de cultivo M1 con 1×10^8 esporas/ml de la cepa C1Cr. Luego de 5 días, los pellets se colocaron dentro de pipetas de 10 ml los cuales funcionaron como columnas a través de las cuales se iba hacer pasar el influente contaminado que consistió en una disolución con 50 ppm de cromo (VI) (anexo 6).

Esta disolución se hizo pasar a través de la columna a diferentes velocidades de flujo y se determinó la concentración de cromo total por espectrofotometría de absorción atómica a la salida de la misma para obtener el porcentaje de remoción del metal. Las velocidades de flujo que se evaluaron fueron: 60, 10, 5, 1, 0.5 y 0.25 ml/min.

7.2 Remoción de plomo por la cepa C1Pb

Se inocularon 125 ml de medio de cultivo M1 con 1×10^8 esporas/ml de la cepa C1Pb. Luego de 5 días, los pellets se colocaron dentro de pipetas de 10 ml las cuales funcionaron como columnas a través de las cuales se iba hacer pasar el influente contaminado que consistió en una disolución con 50 ppm de plomo (II).

Esta disolución se hizo pasar a través de la columna a diferentes velocidades de flujo y se determinó la concentración de plomo total por espectrofotometría de absorción atómica a la salida de la misma para obtener el porcentaje de remoción del metal. Las velocidades de flujo que se evaluaron fueron: 60, 10, 5, 1, 0.5 y 0.25 ml/min.

RESULTADOS

1. Obtención de muestras ambientales contaminadas con cromo y plomo

1.1. Muestras contaminadas con cromo

Las muestras se colectaron en tanques de 200 L de capacidad, usados para el almacenamiento de los desechos producto del curtido del cuero en la tenería. En estos tanques se almacenaban aproximadamente 125 L de desecho el día de muestreo, que consistía en un líquido turbio ácido de coloración azul-verdoso. El pH del líquido era de 3.5.

Se colectaron un total de 600 ml de muestra en bolsas plásticas de 100 ml cada una (anexo 7).

1.2. Muestras contaminadas con plomo

La empresa visitada dispone de un sitio para el almacenamiento de baterías desechadas de vehículos. A través de una bomba de succión se obtuvo el líquido interno ácido (pH 3) de las baterías con mayor tiempo en desuso, el cuál presentaba pequeñas partículas grisáceas no disueltas que le daban turbiedad al medio.

Se colectaron un total de 400 ml de muestra en recipientes de plástico de 250 ml de capacidad (anexo 8).

2. Aislamiento de microorganismos resistentes a altas concentraciones de cromo y plomo.

2.1. Microorganismos resistentes a cromo

Se aislaron dos cepas de microorganismos resistentes a altas concentraciones de cromo (VI). En todas las placas, tanto en las que se inoculó la muestra de manera directa como diluida, se observó el crecimiento de un hongo filamentoso (C1Cr) y de una bacteria (C2Cr) (figura 1).

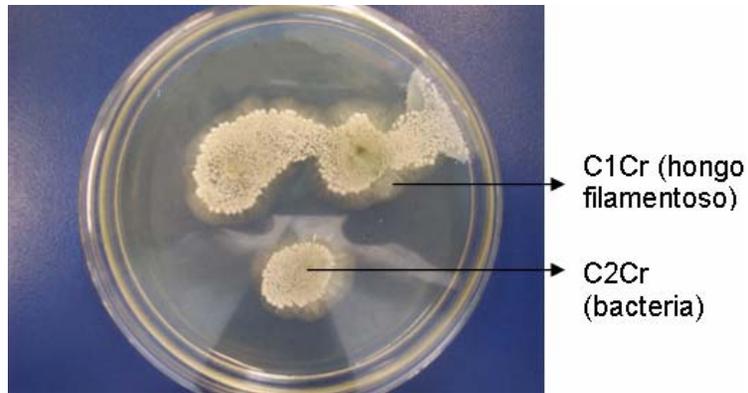


Figura 1. Microorganismos aislados resistentes a altas concentraciones de cromo (VI) luego de 72 horas de incubación

La cepa C1Cr, mediante la observación de sus conidias, se identificó dentro del género *Penicillium sp* y la cepa C2Cr no se determinó su ubicación taxonómica, sin embargo se clasificó como una bacteria gram positiva similar morfológicamente a *Thiocapsa sp.* (anexo 9), luego de su observación con una tinción de Gram. Las cepas aisladas se purificaron en placa (figura 2).

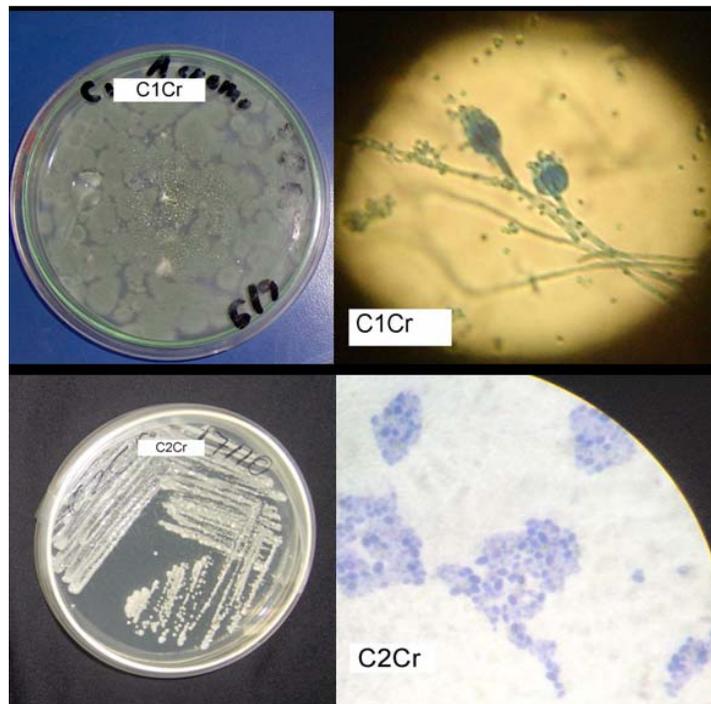


Figura 2. Observación macroscópica y microscópica de las cepas C1Cr y C2Cr

2.2. Microorganismos resistentes a plomo

Se aislaron 3 diferentes microorganismos resistentes a altas concentraciones de plomo (II).

Tanto en las placas donde se inoculó la muestra de manera directa como diluida se evidenció el crecimiento de una cepa de un hongo filamentoso (C1Pb). Además, en las placas donde se inoculó la muestra sin diluir, se obtuvo el crecimiento de dos cepas de hongos filamentosos más (C2Pb y C3Pb) (figura 3). Además, se presentó el crecimiento de otras bacterias con las cuales no se trabajó.

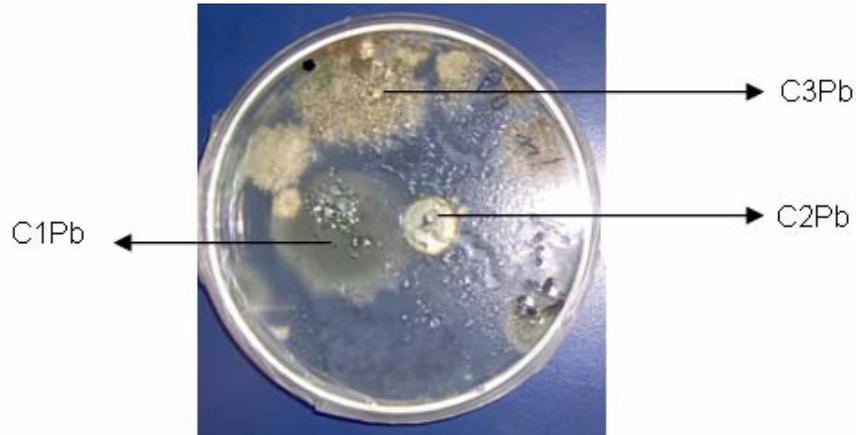


Figura 3. Microorganismos aislados resistentes a altas concentraciones de plomo (II) luego de 72 horas de incubación

Los hongos se identificaron mediante la observación de sus estructuras reproductivas, las cepa C1Pb y C2Pb se identificaron dentro del género *Penicillium* sp y la cepa C3Pb como *Aspergillus* sp. Las cepas aisladas se purificaron en placa (figura 4).

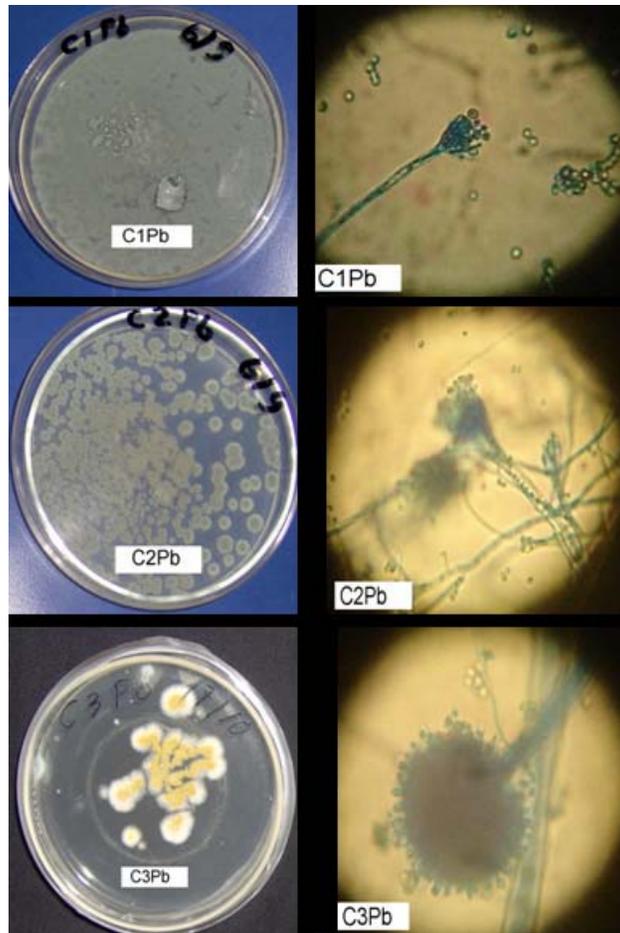


Figura 4. Observación macroscópica y microscópica de las cepas C1Pb, C2Pb y C3Pb.

El cuadro 1 resume el total de cepas aisladas en las muestras.

Cuadro 1. Cepas aisladas resistentes a altas concentraciones de cromo (VI) y plomo (II) a partir de las muestras

Muestra	Resistencia al metal	Cepas aisladas	Identificación
Desechos de tenería	Cromo	C1Cr	<i>Penicillium sp</i>
		C2Cr	Similar a <i>Thiocapsa sp</i>
		C1Pb	<i>Penicillium sp</i>
Líquido de baterías	Plomo	C2Pb	<i>Penicillium sp</i>
		C3Pb	<i>Aspergillus sp</i>

3. Determinación de la resistencia a cromo y plomo de los microorganismos aislados en placa.

3.1. Resistencia a cromo

El nivel de resistencia a cromo de las cepas C1Cr y C2Cr se determinó por su capacidad de crecer en medio APD suplementado con diferentes concentraciones de cromo (VI) luego de 5 días de incubación.

Cuadro 2. Determinación semicuantitativa del crecimiento de las cepas aisladas en medio APD suplementado con diferentes concentraciones de cromo (VI) luego de 5 días de incubación.

cepa	Concentración de cromo (VI) en el medio (mg/L^{-1})								
	0	25	50	75	100	150	200	250	300
C1Cr	++	++	++	±	±	-	-	-	-
C2Cr	++	++	++	++	++	+	±	±	-

* (+), crecimiento; (-), no crecimiento; (±), crecimiento pobre.

La figura 5 muestra las diferencias en el crecimiento de las cepas a diferentes concentraciones de cromo (VI).

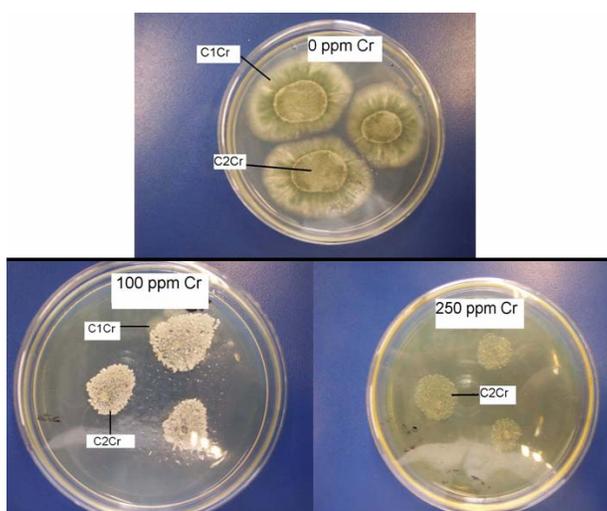


Figura 5. Crecimiento de las cepas C1Cr y C2Cr en placa con diferentes concentraciones de cromo (VI) luego de 5 días de incubación

Luego de los primeros tres días de incubación, la cepa C1Cr mostró un crecimiento muy agresivo en aquellas placas donde la concentración de cromo no inhibía su crecimiento, cubriendo a la cepa C2Cr y dificultando su visualización tal como ocurre en la placa con 0 ppm de cromo (VI).

A partir de estos resultados, se determinó el nivel de resistencia de 100 ppm de cromo (VI) para la cepa C1Cr y de 250 ppm de cromo (VI) para la cepa C2Cr.

3.2. Resistencia a plomo

El nivel de resistencia a plomo de las cepas C1Pb, C2Pb y C3Pb se determinó por su capacidad de crecer en medio APD suplementado con diferentes concentraciones de plomo (II).

Cuadro 3. Determinación semicuantitativa del crecimiento de las cepas aisladas en medio APD suplementado con diferentes concentraciones de plomo (II) luego de 5 días de incubación.

Cepa	Concentración de plomo (II) en el medio (mg/L ⁻¹)						
	0	100	150	250	500	750	1000
C1Pb	++	++	++	++	+	±	-
C2Pb	++	++	++	++	+	±	-
C3Pb	++	++	++	++	±	-	-

* (+), crecimiento; (-), no crecimiento; (±), crecimiento pobre.

La figura 6 muestra las diferencias en el crecimiento de las cepas a diferentes concentraciones de plomo (II).

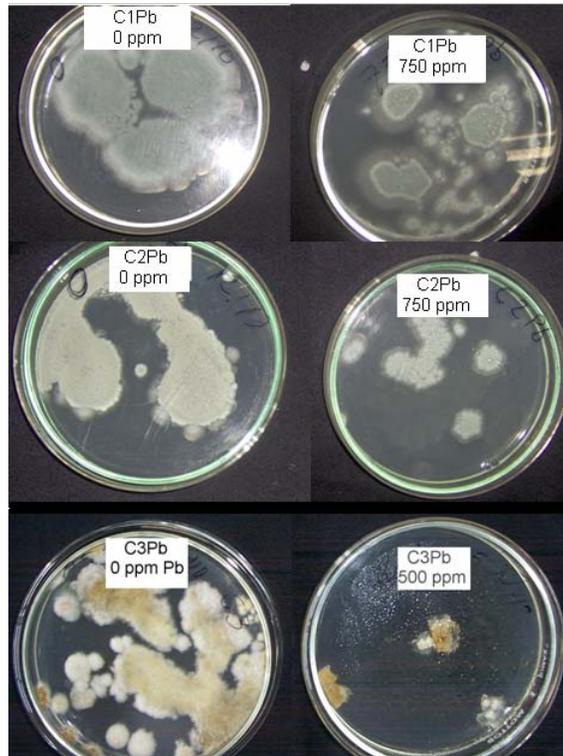


Figura 6. Crecimiento de las cepas C1Pb, C2Pb y C3Pb en placa con diferentes concentraciones de plomo (II) luego de 5 días de incubación.

A partir de estos resultados, se determinó el nivel de resistencia de 750 ppm de plomo (II) para las cepas C1Pb y C2Pb y de 500 ppm de plomo (II) para la cepa C3Pb.

4. Ensayo de reducción de cromo y plomo en medio líquido.

4.1. Reducción de cromo

En el caso de la cepa C1Cr fue necesario preparar un precultivo en medio M1 sin cromo ya que la concentración 50 ppm de cromo (VI) inhibía su crecimiento en medio líquido. Luego de 72 horas la biomasa obtenida fue traspasada a otro medio de cultivo M1 suplementado con 50 ppm de cromo (VI) para iniciar el ensayo.

Ambas cepas mostraron alta capacidad para disminuir la concentración de cromo en medio de cultivo líquido. La figura 7 muestra la cinética de disminución de cromo total durante el transcurso del ensayo.

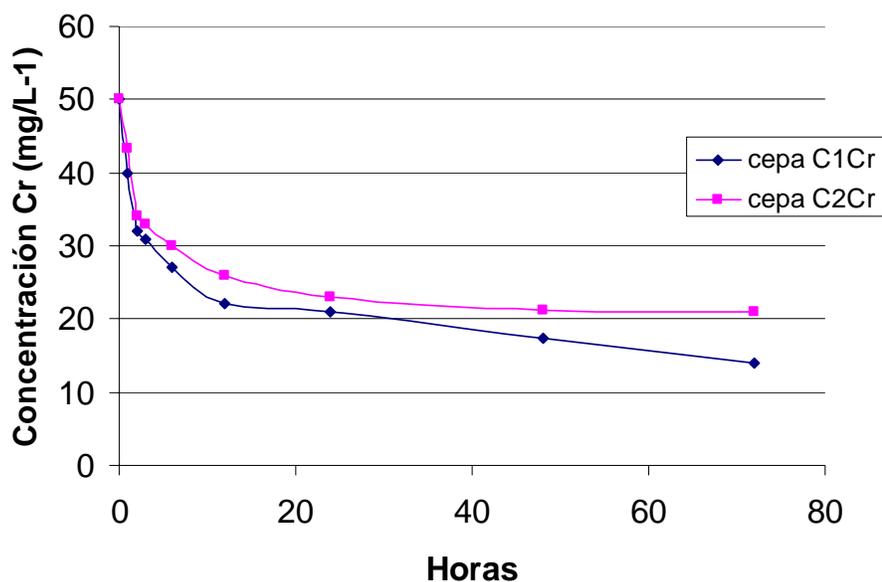


Figura 7. Cinética de disminución de cromo total en medio líquido por la cepa C1Cr y C2Cr.

Luego de las primeras 72 horas y hasta el final de los 15 días del ensayo, las concentraciones de cromo total en el medio no mostraron variación significativa, tanto con la cepa C1Cr como con C2Cr.

El cromo (VI) en disolución genera una coloración amarilla. La figura 8 muestra los cambios en la coloración de los medios durante el ensayo.



Figura 8. Ensayo de reducción de cromo en medio líquido a las 0 horas y al día 6 por las cepas C1Cr y C2Cr.

Con base en la concentración de cromo total en el medio al inicio al final del ensayo, se obtuvo el porcentaje de remoción del metal por cada cepa.

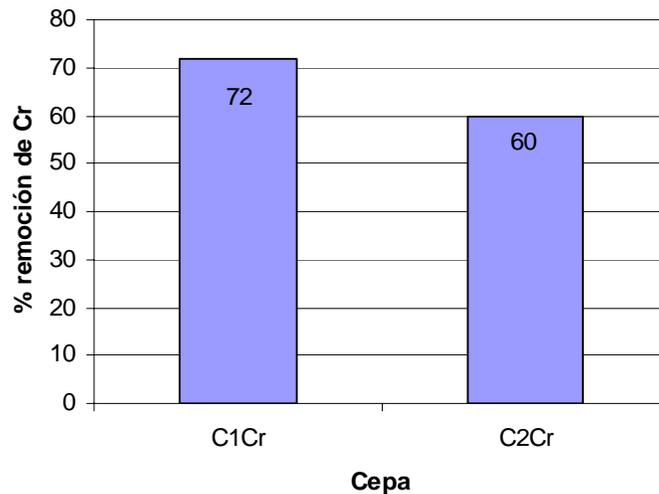


Figura 9. Porcentaje de remoción de cromo en medio líquido por cada cepa resistente a cromo

Además se calculó la concentración de cromo total en la biomasa de las cepas al final del ensayo para obtener la capacidad de retención del metal en su biomasa.

Cuadro 4. Capacidad de retención de cromo total en la biomasa de las cepas.

Cepa	Capacidad de retención de Cr en la biomasa
C1Cr	0.45 mg Cr /g biomasa
C2Cr	1.88 mg Cr / g biomasa

4.1.1. Determinación de cromo hexavalente y trivalente

La figura 10 resume los resultados obtenidos en la determinación de cromo total, hexavalente y trivalente en la biomasa de las cepas.

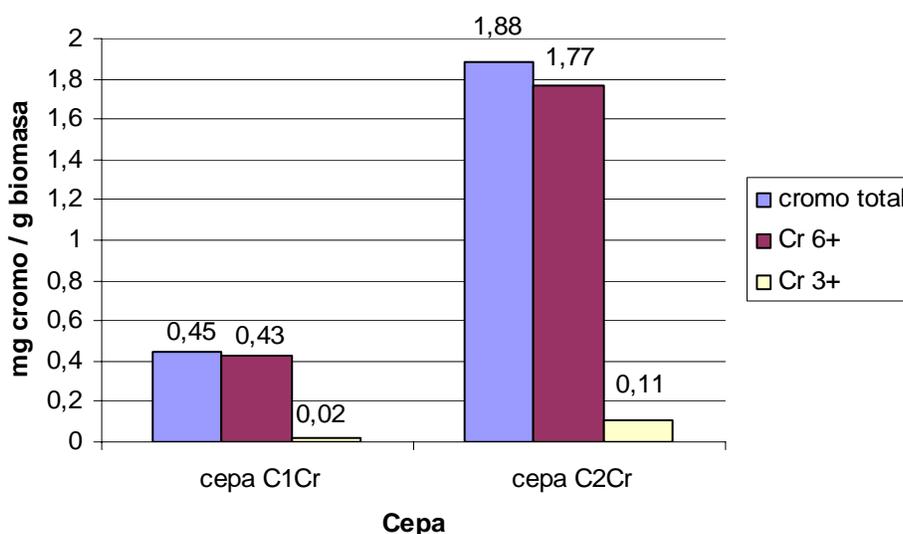


Figura 10. Concentración de cromo total, hexavalente y trivalente en la biomasa de las cepas.

4.2. Reducción de plomo

La cepa C1Pb mostró la mayor disminución de plomo en medio líquido. La figura 11 muestra la cinética de disminución de plomo durante el transcurso del ensayo por cada cepa.

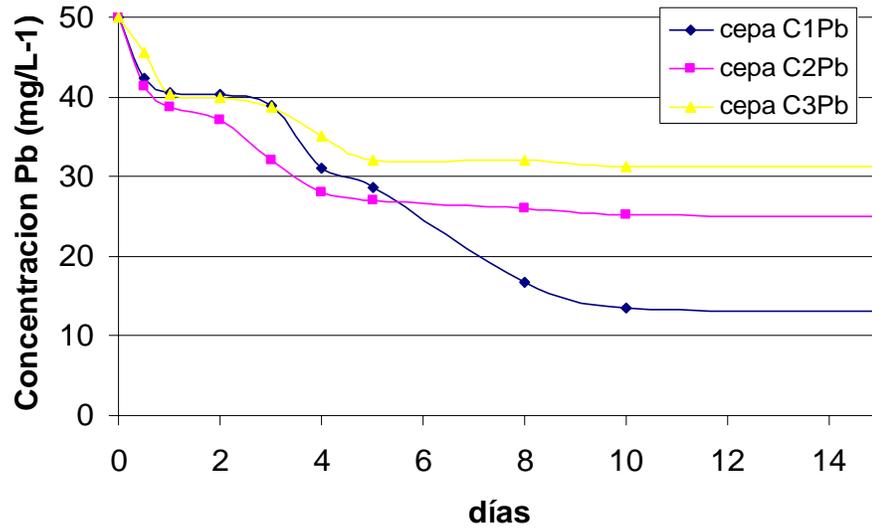


Figura 11. Cinética de disminución de plomo en medio líquido por las cepas C1Pb, C2Pb y C3Pb.

Con base en la concentración de plomo en el medio al inicio al final del ensayo, se obtuvo el porcentaje de remoción del metal por cada cepa.

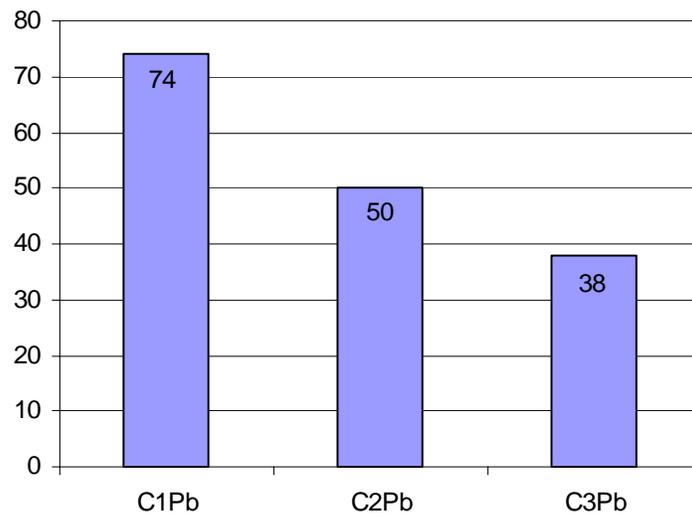


Figura 12. Porcentaje de remoción de plomo en medio líquido por cada cepa resistente a plomo.

Además se calculó la concentración de plomo en la biomasa de las cepas al final del ensayo para obtener la capacidad de retención del metal en su biomasa.

Cuadro 5. Capacidad de retención de plomo en la biomasa de las cepas.

cepa	Capacidad de retención de Pb en la biomasa
C1Pb	0.93 mg Pb / g biomasa
C2Pb	0.63 mg Pb / g biomasa
C3Pb	0.47 mg Pb / g biomasa

5. Inmovilización de los microorganismos con mayor potencial de biorremediación.

Las cepas con mayor potencial de biorremediación fueron C1Cr y C1Pb.

Con estas cepas se realizaron los posteriores ensayos de inmovilización empleando diferentes superficies inertes: tela de poliéster, esponjas, alginato.

5.1 Inmovilización en tela de poliéster

En este ensayo, no se logró inmovilizar con éxito una cantidad considerable de biomasa en tela.

Cuadro 6. Inmovilización de las cepas en tela de poliéster
(mg biomasa / cm² tela)

Cepa	tiempo		
	24 horas	48 horas	72 horas
C1Cr	2.85	2.93	3.55
C1Pb	1.65	1.67	2.73

5.2. Inmovilización en esponja

Se logró inmovilizar cantidad considerable de biomasa en esponjas. La figura 13 muestra como la mayoría de los pellets de ambas cepas no se encuentran disueltos en el medio sino adheridos a las esponjas que además.

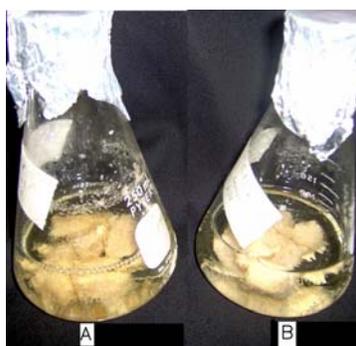


Figura 13. Ensayo de inmovilización en esponja.

A: cepa C1Cr, B: cepa C1Pb

El cuadro 7 presenta la cantidad de biomasa inmovilizada en las secciones de esponja durante el ensayo

Cuadro 7. Inmovilización de las cepas en esponja
(mg biomasa / cm³ esponja)

Cepa	tiempo		
	24 horas	48 horas	72 horas
C1Cr	117	147	148
C1Pb	111	147	156

5.3. Inmovilización de microorganismos mediante encapsulamiento de pellets en esferas de alginato de calcio

La figura 14 muestra las esferas de alginato de calcio que contienen encapsulados los pellets de las cepas C1Cr y C1Pb.

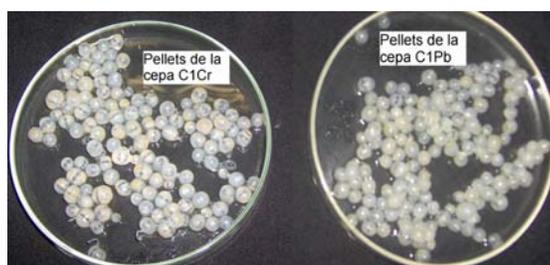


Figura 14. Pellets de las cepas C1Cr y C2Pb encapsulados en esferas de alginato de calcio.

6. Ensayos de reducción de cromo y plomo en medio líquido por los microorganismos inmovilizados.

6.2. Ensayos con la cepa C1Cr inmovilizada

Se evaluó la cinética de disminución de cromo total en los medios con la cepa C1Cr inmovilizada en tela, esponja y encapsulada en esferas de alginato de calcio.

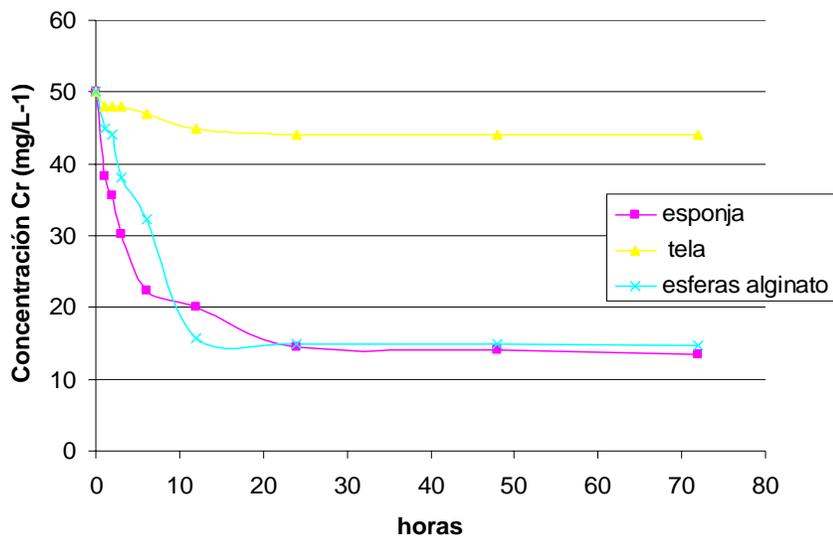


Figura 15. Cinética de disminución de cromo total en medio líquido en los ensayos de inmovilización.

Al igual que en el ensayo con la cepa sin inmovilizar (figura 7), luego de las primeras 72 horas y hasta el final de los 15 días del ensayo, la concentración de cromo total en el medio no varió significativamente.

La figura 16 muestra los cambios en la coloración del medio durante el ensayo.

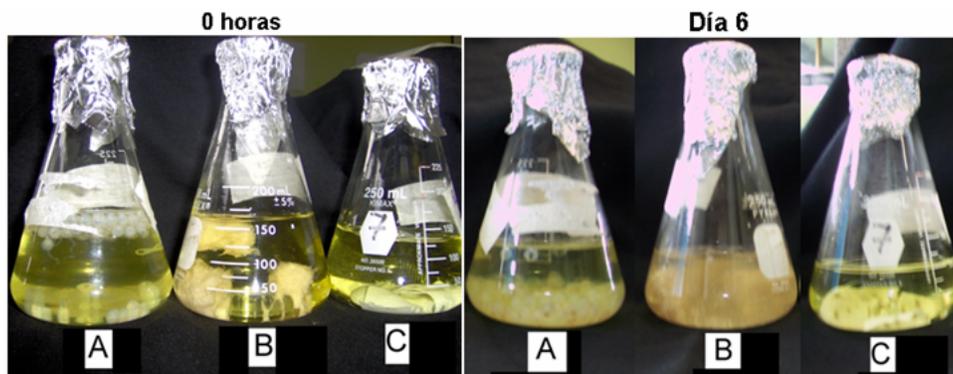


Figura 16. Ensayo de reducción de cromo en medio líquido a las 0 horas y al día 6 por la cepa C1Cr inmovilizada.

A: esferas de alginato, B: esponjas, C: tela

Los ensayos de inmovilización de la cepa en esponja y en esferas de alginato de calcio fueron los que lograron la mayor disminución de cromo total del medio.

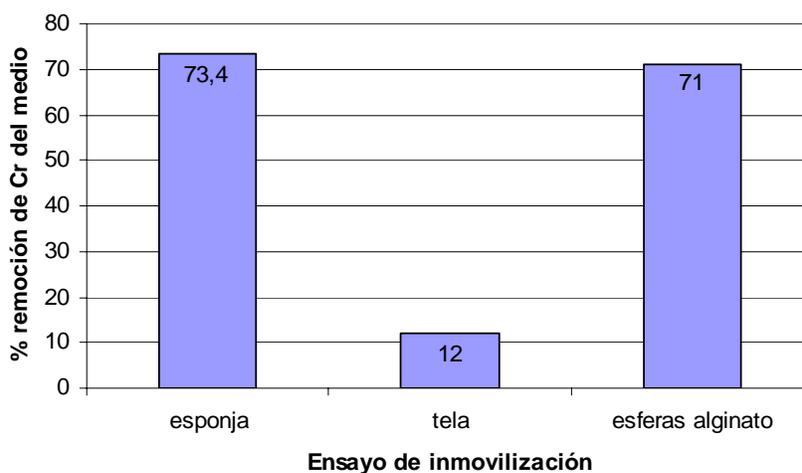


Figura 17. Porcentaje de remoción de cromo total en medio líquido por la cepa C1Cr en los ensayos de inmovilización.

6.3. Ensayos con la cepa C1Pb inmovilizada

Se evaluó la cinética de disminución de plomo en medios con la cepa C1Pb inmovilizada en tela, esponja y encapsulada en esferas de alginato de calcio.

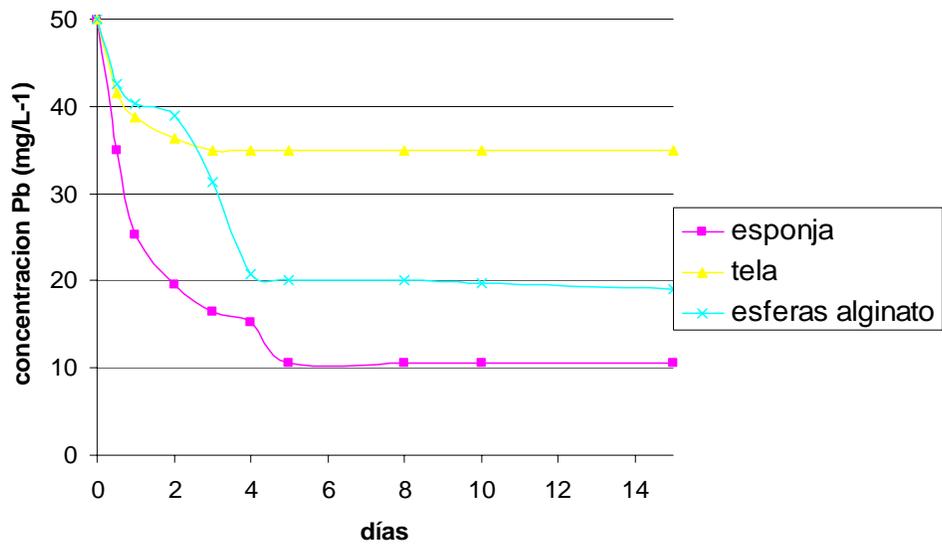


Figura 18. Cinética de disminución de plomo en medio líquido en los ensayos de inmovilización.

El mayor porcentaje de remoción de plomo del medio se presentó en el ensayo con la cepa C1Pb inmovilizada en esponjas.

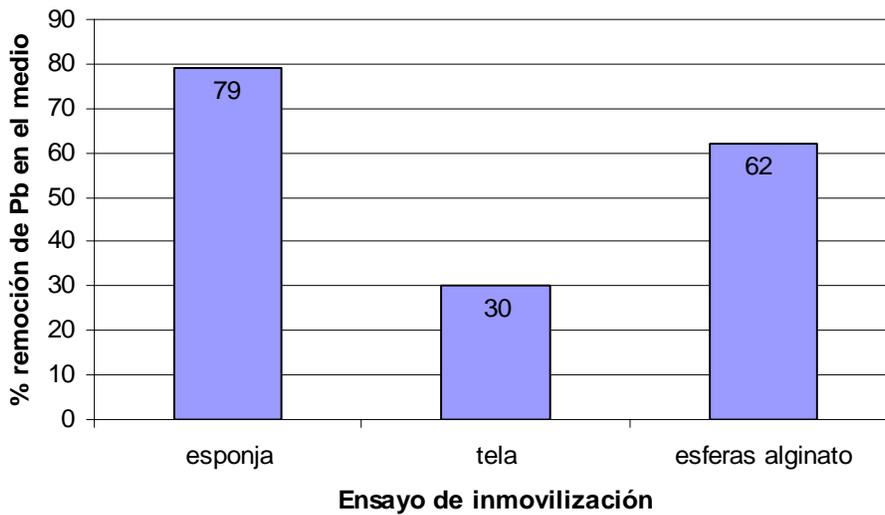


Figura 19. Porcentaje de remoción de plomo en medio líquido por la cepa C1Pb en los ensayos de inmovilización.

7. Evaluación de la capacidad de remoción de cromo y plomo de las cepas en un influente con diferentes velocidades de flujo.

7.2. Remoción de cromo por la cepa C1Cr

Con base en la concentración de cromo total a la entrada y a la salida del flujo (ver anexos), se calculó el porcentaje de remoción del metal por la cepa C1Cr a diferentes velocidades de flujo.

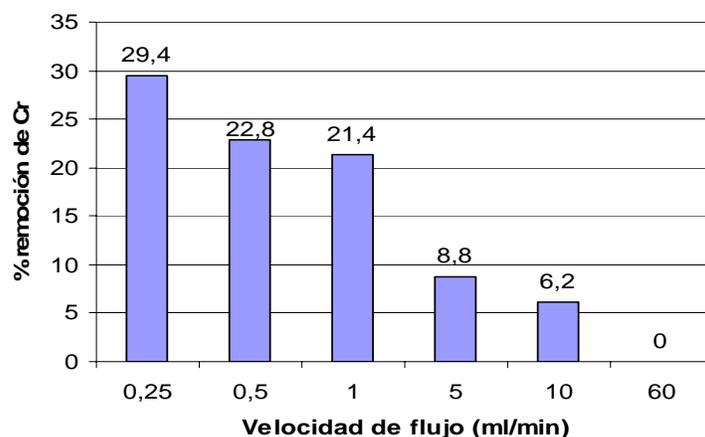


Figura 20. Porcentaje de remoción de cromo total en un influente a diferentes velocidades de flujo

7.3. Remoción de plomo por la cepa C1Pb

De la misma forma se calculó el porcentaje de remoción de plomo por la cepa C1Pb a diferentes velocidades de flujo.

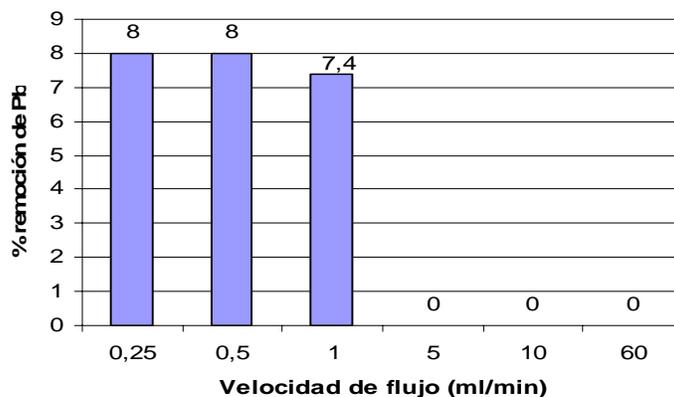


Figura 21. Porcentaje de remoción de plomo en un influente a diferentes velocidades de flujo

DISCUSION DE RESULTADOS

Obtención de microorganismos resistentes

Uno de los rasgos característicos de la sociedad moderna es la creciente emisión de productos químicos al medio ambiente. Existen dos fuentes principales para estas emisiones: los productos químicos creados para uso ambiental y el material residual (Manacorda y Cuadros, 2005). En las empresas visitadas el cromo y plomo son parte del material residual que requiere ser desechado.

En una tannería, durante la etapa de curtido se estabiliza el colágeno de la piel del animal transformándola en cuero, para esto se utiliza sales de cromo como dicromato de potasio en medio ácido, el material residual de este proceso es almacenado en tanques donde solo los microorganismos con resistencia a altas concentraciones de cromo podrán proliferar (Saenz, 2005). De la misma forma, el contenido ácido de una batería para vehículo contiene altas concentraciones de plomo (PbO_2 y Pb puro), por lo que los microorganismos que se desarrollen pueden ser potenciales biorremediadores del metal. Los microorganismos indígenas son los principales descomponedores del ecosistema, es así como la biorremediación se fundamenta en la obtención de estos microorganismos que de forma natural participan en la degradación de los contaminantes (Vullo, 2003).

Con respecto a la muestra contaminada con cromo, en todas las placas inoculadas para los aislamientos (figura 1) siempre se observó el crecimiento de únicamente dos cepas de microorganismos (C1Cr y C2Cr), lo cual indica el desarrollo y distribución homogénea de solamente estas cepas en la muestra con resistencia a cromo. En el caso de la muestra contraminada con plomo fue necesario aislar primeramente las cepas (C1Pb, C2Pb y C3Pb) debido a que ésta presentaba una cantidad más diversa de microorganismos, especialmente bacterias, resistentes al metal. Sin embargo, se decidió trabajar solamente con las cepas de hongos filamentosos ya señaladas debido a su mayor facilidad de manejo en los ensayos posteriores en medio líquido ya que forman pellets y por su

alto potencial en biorremediación de metales señalado por diversos autores (Castro *et al.*, 2003; Rivera *et al.*, 2003; Rivas *et al.*, 2002).

Se aislaron cepas de hongos filamentosos de los géneros *Penicillium sp* y *Aspergillus sp* (Figura 2 y 4). Estos hongos son capaces de crecer en un rango amplio de pH y tolerar altos grados de acidez como los que presentaban las muestras (Rivera *et al.*, 2003).

Se han descrito procesos de interacción de metales con hongos filamentosos como biosorción, bioacumulación y la modificación química. La biosorción es la incorporación del metal a las células de manera pasiva (independiente de energía), mediante interacción química con componentes de la pared celular. La bioacumulación consiste en la incorporación del metal a la célula de manera activa (dependiente de energía), a través de transportadores ubicados en la membrana plasmática. La modificación química consiste en un cambio en el estado de oxidación del metal (Cervantes *et al.*, 2001).

En este trabajo se aisló una cepa bacteriana resistente a cromo, cuya clasificación taxonómica no se ubicó, pero para efectos de comparación morfológica se identificó como similar a *Thiocapsa sp*. Las bacterias han desarrollado diversos mecanismos de resistencia asociados a plásmidos para tolerar los efectos nocivos de los metales tóxicos. Entre ellos se encuentran principalmente los que involucran componentes celulares que capturan los iones, neutralizando su toxicidad, enzimas que modifican el estado redox de los metales, convirtiéndolos en formas menos tóxicas y transportadores de la membrana que expulsan las especies nocivas del citoplasma celular (Cervantes *et al.*, 2006).

En la literatura se utiliza el término “resistente” a metales pesados para describir la capacidad de un microorganismo para sobrevivir al efecto tóxico de dichos elementos, esto es resultado de un mecanismo de desintoxicación generado a partir de la exposición directa al metal, o sea, codificado genéticamente. El término “tolerante” se emplea para referirse a aquellos microorganismos que poseen propiedades estructurales y bioquímicas intrínsecas que les permiten sobrevivir en

presencia de metales, tales como poseer paredes celulares impermeables, capacidad de excretarlo, o capacidad de producir modificaciones ambientales con efecto sobre la toxicidad del metal. No obstante, en muchas ocasiones la diferencia entre ambos términos resulta difícil de establecer, ya que ambos implican mecanismos biológicos y bioquímicos indirectos y directos, para la supervivencia del microorganismo (Garza, 2005). Para efectos de este trabajo, se hace uso del término resistencia a metales, a pesar de que no se determinó si corresponde a tolerancia o resistencia según la definición presentada para estos términos.

Los hongos y la cepa bacteriana aislados, a través de los mecanismos mencionados anteriormente, lograron alcanzar los niveles de resistencia presentados en los ensayos (cuadros 2 y 3).

Las cepas de hongos filamentosos resistentes a plomo crecieron a concentraciones significativamente más altas que la cepa de hongo filamentoso resistente a cromo (C1Cr) lo cual sugiere un menor potencial tóxico del plomo para este tipo de hongos aunque también es posible que las cepas resistentes a plomo cuenten con mecanismos de resistencia que no posee la cepa resistente a cromo.

Además, el hecho de que la cepa bacteriana C2Cr pueda crecer en medios con cromo más concentrados que la cepa fúngica, sugiere la presencia de mecanismos de resistencia bacterianos que le brindan ventaja con respecto a la cepa C1Cr.

Biorremediación en medio líquido

A pesar de que la cepa bacteriana presentó un nivel mayor de resistencia a cromo que la cepa fúngica, ésta última logró disminuir mayor cantidad de cromo disuelto en medio líquido (figura 7). Debido a esto, la cepa fúngica tiene un mayor potencial biorremediador. De manera parecida, las cepas C1Pb y C2Pb mostraron niveles de resistencia a plomo semejantes, sin embargo, la cantidad de plomo removido

del medio líquido fue significativamente mayor para el caso de la cepa C1Pb (Figura 11).

Lo anterior muestra que, tal como se ha señalado en otros trabajos, un alto nivel de resistencia al metal no está relacionado directamente con mayor capacidad de removerlo en un medio líquido (Castro *et al.*, 2003; Cervantes *et al.*, 2006).

Debido a que el medio M1 suplementado con 50 ppm de cromo inhibió el desarrollo de biomasa de la cepa C1Cr, ésta no alcanzó un crecimiento significativo en las primeras 72 horas de ensayo como sí lo presentó C2Cr y las cepas con resistencia a plomo en medio M1 suplementado con 50 ppm de Pb. Por esta razón se preparó un precultivo de la cepa C1Cr en medio M1 sin metal y luego de 72 horas la biomasa se traspasó a otro medio M1 pero con 50 ppm de cromo para realizar el ensayo de reducción del metal en medio líquido.

A pesar de que la cepa fúngica es capaz de remover un 12% más cantidad de cromo del medio líquido que la cepa bacteriana (figura 9), ésta genera menor cantidad de biomasa por lo que tiene mayor capacidad para retener cromo por unidad de biomasa que la cepa fúngica (cuadro 4).

Se ha descrito que la biomasa de algunos hongos, entre los que se incluyen *Rhizomucor arrhizu*, *Candida tropicalis*, *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus carbonarius* y *Mucor hiemalis*, posee la capacidad de unir cromo pasivamente (Rivera *et al.*, 2003). A este proceso de unión de metales a la biomasa de microorganismos, vivos o muertos, denominado biosorción se le ha señalado de importancia biotecnológica en el contexto de nuevos procedimientos para la remoción de metales (Volesky y Holan, 1995; Park *et al.*, 2005; Ahmad *et al.*, 2006).

En bacterias, han sido reportadas cepas resistentes a cromato aisladas del medio ambiente; en estos aislados naturales la tolerancia a cromato usualmente ha sido asociada con plásmidos (Cervantes *et al.*, 2001). En las bacterias *Pseudomonas aeruginosa*, *Alcaligenes eutrophus* y *Enterobacter cloacae* se han identificado

genes de resistencia a cromo, localizados en plásmidos, que codifican proteínas membranales que participan en la remoción del cromo del citoplasma celular. La reducción de Cr(VI) a Cr(III) ha sido sugerida como un mecanismo de resistencia adicional codificada en los cromosomas (Othake y Silver, 1994).

La reducción de Cr (VI) a Cr (III) es un mecanismo potencialmente útil en el contexto de biorremediación de cromo y ha sido reportado para varias cepas de hongos filamentosos y bacterias (Wakatsuki, 1995). Sin embargo, en este ensayo no se evidenció la reducción de Cr (VI) a Cr (III) de manera significativa. La figura 10 muestra como prácticamente todo el cromo captado por la biomasa de las cepas permaneció de la forma hexavalente y muy pocas cantidades fueron reducidas a cromo trivalente. Además, durante el proceso de extracción de cromo de la biomasa de las cepas se recurre a una digestión donde se usó ácido sulfúrico 20% y durante este proceso parte del cromo hexavalente pudo haber sido reducido a cromo trivalente. Por lo tanto, se determinó que las cepas resistentes a cromo no participan en el proceso de reducción de Cr (VI) a Cr (III), sino que tienen el potencial de biosorción y/o bioacumulación del metal en su biomasa.

Es posible determinar visualmente la disminución de cromo en el medio debido a la pérdida de coloración amarilla característica de una solución con Cr (VI). En la figura 8 se aprecia la pérdida de intensidad de esta coloración luego de 6 días de iniciado el ensayo. Además, al observar la biomasa de la cepa C1Cr al inicio y al día 6 se nota que ha adquirido una coloración amarilla, lo cual sugiere que el Cr (VI) que inicialmente estaba disuelto en el medio a pasado a formar parte de su biomasa. Lo anterior no se visualiza tan claramente en la cepa C2Cr, donde si bien se observa la disminución en la coloración amarilla del medio al día 6 producto de que la concentración de Cr (VI) ha disminuido, no es posible apreciar claramente la biomasa bacteriana y es probable que la acumulación del metal se dé de manera interna en las células no logrando observar la coloración amarilla con claridad.

Al comparar la cinética de disminución de cromo con la de plomo (figura 7 y 11), se observa que las cepas resistentes a cromo llevan a cabo la reducción en la concentración del metal en el medio durante las primeras 48 horas del ensayo y que luego de este tiempo no hay una disminución adicional significativa, en el caso de las cepas resistentes a plomo, la reducción del metal se da en los primeros 10 días del ensayo y posterior a este tiempo, al igual que las cepas resistentes a cromo, no hay una reducción adicional significativa de metal. Esto sugiere que las cepas, tanto resistentes a cromo como a plomo, poseen una capacidad limitada de retención del metal en su biomasa, que en el caso de las resistentes a cromo se alcanza más rápidamente.

También se han reportado trabajos de biorremediación de plomo exitosos donde los microorganismos tienen la capacidad de biosorción y/o bioacumulación del metal (Rivas *et al.*, 2002; Jianlong *et al.*, 2001). En este trabajo, las cepas resistentes a plomo también mostraron capacidad de remover el metal del medio, especialmente la cepa C1Pb con un 74% de remoción (Figura 12), esta cepa también fue capaz de retener mayor cantidad de plomo por unidad de biomasa (Cuadro 5)

Con base en las figuras 9 y 12 se determinó que las cepas C1Cr y C1Pb son las que pueden reducir mayor cantidad de cromo y plomo, respectivamente, en medio líquido y es por esta razón que los ensayos posteriores se realizaron con estas cepas.

Biorremediación mediante cepas inmovilizadas

Muchos hongos filamentosos están naturalmente adaptados al crecimiento sobre superficies. Los hongos que crecen sobre superficies constituyen biopelículas y como tales, muestran características fisiológicas particulares derivadas probablemente de una expresión diferencial de genes. Las biopelículas son sistemas formados por microorganismos adheridos a superficies (Villena y Gutiérrez, 2003).

Se ha demostrado la efectividad de sistemas biosorbentes de metales que utilizan una mezcla de microorganismos inmovilizados en materiales sorbentes inertes que colaboran junto con los microorganismos en la captación de metales, de esta forma se incrementan los rendimientos en la descontaminación del medio (Lebeau *et al.*, 2002).

En los ensayos de inmovilización, se utilizó tela de poliéster y esponja vegetal o paste (*Luffa cilíndrica*) (anexo 3) como superficies inertes que colaboran en la captación de metales del medio y que además funcionan como superficies de adhesión para la inmovilización de los microorganismos y formación de biopelículas.

En general la formación de biopelículas sigue un proceso en el cual puede distinguirse, tres fases que incluyen la adhesión inicial de células, el desarrollo y crecimiento y la maduración. Aunque esta afirmación es válida principalmente para bacterias y levaduras, también puede aplicarse a las biopelículas de hongos filamentosos a pesar de no haber sido descritas en detalle. Sin embargo, por la forma de crecimiento de estos microorganismos sobre sustratos naturales puede inferirse que presentan una tendencia a la formación de biopelículas, las cuales pueden desarrollarse aun sobre materiales sintéticos (Villena y Gutiérrez, 2003).

La formación de biopelículas por los hongos es un proceso complejo que se inicia con la adhesión de esporas a una superficie, la cual está influenciada por factores físicos, químicos y medioambientales. Tanto los microorganismos como las superficies tienen un potencial negativo que generarían repulsión electrostática, la cual podría contrarrestarse con fuerzas de atracción temporales tipo Van der Waals o atracción hidrofóbica (Wosten y Willey, 2000).

Cuando la espora llega a la superficie se adhiere para iniciar la germinación, las superficies naturales son comúnmente hidrofóbicas, y la adhesión y germinación de las esporas está determinada por la presencia de proteínas hidrofóbicas de pared denominadas hidrofobinas. Las hidrofobinas se caracterizan por conservar ocho residuos de cisteína y patrones hidropáticos típicos (Clement *et al.*, 1994). La

propiedad característica de las hidrofobinas es la formación de una membrana anfipática en contacto con una interfase hidrofílica-hidrofóbica lo cual permite cambiar la naturaleza de la superficie (Lugones *et al.*, 1998).

Tal como se muestra en los cuadros 6 y 7, en ambas cepas se inmovilizó mayor cantidad de biomasa en las esponjas que en tela. Lo anterior influyó notablemente en el ensayo de reducción de cromo y de plomo con la cepa C1Cr y C2Pb respectivamente (figuras 15 y 18), ya que la reducción de los metales con las cepas inmovilizadas en tela fue menor en comparación con los ensayos de inmovilización en esponja y en esferas de alginato.

Por otro lado, la mayor cantidad de biomasa inmovilizada en las esponjas permitió disminuir considerablemente la concentración de los metales en los ensayos en medio líquido, mostrando porcentajes de remoción de 73.4% por C1Cr y 70% por C1Pb (figuras 17 y 19), valores semejantes a los presentados por las cepas sin inmovilización.

La figura 13 muestra como las cepas permanecen inmovilizadas en las esponjas, las cuales han aumentado su volumen favoreciendo mayor cantidad de biomasa fúngica inmovilizada y mayor superficie de contacto para que los metales establezcan interacción con los hongos inmovilizados.

La utilización de biomasa inmovilizada en esferas de alginato presenta ventajas frente a la biomasa en suspensión tales como: fácil regeneración y posterior reutilización de la biomasa, fácil separación de las células del efluente, simple manejo operacional y escalado directo desde las experiencias de laboratorio (Ferrari *e al.*, 2004)

En los ensayos con los pellets encapsulados en esferas de alginato, se requiere que las hifas de los hongos se desarrollen y establezcan contacto con el medio externo para que participen en el proceso de retención de los metales y disminuyan la concentración en el medio. En el caso de la cepa C1Cr, se alcanzó un porcentaje de remoción del metal de 71% y en C1Pb 62%, lo cual demuestra el

potencial de este método para ser aplicado en futuros ensayos de biorremediación *in situ*, al igual que las cepas inmovilizadas en esponjas.

Remoción de metales en un influente con diferentes velocidades de flujo

Finalmente, se evaluó la capacidad de las cepas C1Cr y C1Pb para remover metales en un influente con diferentes velocidades de flujo.

Para ambas cepas, las figuras 20 y 21 muestran que a velocidades de flujo menores el proceso de remoción del metal es mejor debido a que se favorece una mayor interacción del metal con la biomasa de las cepas.

La cepa C1Cr mostró tener alta capacidad de remover cromo incluso cuando el influente fluye a 10 ml/min, lo cual sugiere que el proceso de retención del metal en su biomasa se da rápidamente. Por otro lado, en la cepa C2Pb el proceso de retención de plomo es más lento ya que mostró bajos porcentajes de remoción del metal incluso a lentas velocidades de flujo.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

- Las cepas aisladas resistentes a altas concentraciones de cromo y plomo son útiles en procesos de biorremediación de metales debido a su capacidad para incorporar el metal en su biomasa.
- Las cepas C1Cr y C1Pb son las que muestran un mayor potencial de biorremediación de cromo y plomo respectivamente.
- La inmovilización de las cepas C1Cr y C1Pb en esponja (paste) resulta ser un sistema eficiente para biorremediar un medio contaminado con cromo y plomo respectivamente.
- El encapsulamiento de las cepas C1Cr y C1Pb en esferas de alginato de calcio resulta ser una forma práctica y eficiente de biorremediar un medio contaminado con cromo y plomo respectivamente.
- La cepa C1Cr puede captar rápidamente el cromo presente en una disolución mientras que la cepa C1Pb requiere de mayor tiempo de contacto con el medio contaminado con plomo para incorporarlo a su biomasa y reducir su concentración en el medio.

RECOMENDACIONES

- Ensayar las técnicas de inmovilización y remoción de metales en medio líquido con las cepas C2Cr y C2Pb.
- Ensayar las cepas C1Cr y C1Pb inmovilizadas en esponjas y esferas de alginato de calcio en ensayos de biorremediación *in situ* de ambientes naturales contaminados con cromo y plomo.
- Emplear los ensayos de remoción de cromo y plomo en medio líquido utilizando las cepas C1Cr y C1Pb respectivamente en prácticas de laboratorio para cursos de microbiología ambiental.
- Diseñar metodologías eficientes de extracción de cromo y plomo de las cepas que acumulan estos metales en su biomasa de tal forma que sea posible la reutilización de los metales.
- Utilizar las cepas C1Cr y C1Pb inmovilizadas en esponjas como potenciales soluciones biotecnológicas en las empresas que generan desechos con altas concentraciones de cromo y plomo.

BIBLIOGRAFIA

- Ahmad, I., M.I. Ansari y F. Aqil. 2006. Biosorption of Ni, Cr and Cd by metal tolerant *Aspergillus niger* and *Penicillium* sp. using single and multi-metal solution. *Ind. J. Exptl. Biol.* 44:73-76.
- Castro, Silva; Oliveira de Souza; Gerchenski; Batista Jaques; Rodrigues; Lima de Souza y Leonardo Rubi Rörig. 2003. Heavy metal resistance of microorganisms isolated from coal mining environments of Santa Catarina. *Brazilian Journal of Microbiology* 34 : 45-47
- Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzmán, J. C. y Moreno-Sánchez R. 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 335-347.
- Cervantes, C.; Espino, A.; Acevedo, F.; León, L.; Rivera, E.; Avila, M.; Wróbel, K; Gutiérrez, J.; Rodríguez, S. y Zavala, R. 2006. Interacciones microbianas con metales pesados. *Revista Microbiología Latinoamericana.* 48 (2). pp. 203 - 210
- Clement, J.; R. Porter, T. Butt, A. Beckatt. 1994. The role of hidrofobicity in attachment of uredinospores and sporelings of *Uromyces viciae-fabae*. *Mycological Research* 98:1217-1228
- De Oliveira, E y Narasimha, M. 1999. Feasible biotechnological and bioremediation strategies for serpentine soils and mine spoils. *Electronic Journal of Biotechnology.* 2(1) pp 3-5
- Doadrio, A. 2006. Ecotoxicología y acción toxicológica del plomo. *Acad. Nac. Farm.*, 72: 409-422
- Ferrari, G., Guzmán, P., Silva, L., Alcaráz, H. y González, D. 2004. Captación de cadmio por biomasa libre o inmovilizada de *Nostoc minutum* (cianobacteria filamentosa). *Acta Toxicol. Argent.* 12 (1): 19-22

- Garon, D., Sage, L., Seigle, F., 2004. Effects of fungal bioaugmentation and cyclodextrin amendment on fluorine degradation in soil slurry. *Biodegradation*. 15: 1-8.
- 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). Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Nuevo León. México
- Hursthouse, A. 2001. The Relevance of Speciation in the Remediation of Soils and Sediments Contaminated by Metallic Elements-An Overview and Examples from Central Scotland, UK. *Journal of Environmental Monitoring* 3(1): 49-60.
- Jianlong, W., Xinmin, Z., Decai, D., Ding, Z., 2001. Bioadsorption of lead (II) from aqueous solution by fungal biomass of *Aspergillus niger*. *Journal of Biotechnology* 87:273-277.
- Kalbitz, K. y Wennrich, R., 1998. Mobilization of heavy metals and arsenic in polluted wetland spills and its dependence on dissolved organic matter. *The Science of the Total Environment* 209 : 27-39.
- Katz, S. y Salem, H. 1993. The toxicology of chromium with respect to its chemical spectation: a review. *J. Appl. Toxicol.*
- Lebeau, T., Bagot, D., Jézéquel, K. y Fabre, B., 2002. Cadmium biosorption by free and immobilised microorganisms cultivated in a liquid soil extract medium: effects of Cd, pH and techniques of culture. *The Science of the Total Environment* 291: 73-83.
- Liu, Y., Xu, H., Yang, S., Tay, J., 2003. A general model for biosorption of Cd, Cu, and Zn by aerobic granules. *Journal of Biotechnology* 102:233-239.
- Lovley, D. 2000. *Environmental Microbe-Metal Interactions*. American Society for Microbiology, Washington D.C.

- Lugones, L.; H. Wostwn, G. Wessels. 1998. A hydrphobin (ABH·) specifically secreted by vegetatively growing hyphae of *Agaricus bisporus* (common white button mushroom). *Microbiology*. 144:2345-2353.
- Manacorda, A. y Cuadros, D. 2005. Técnicas de Remediación Biológicas. *Microbiología Ambiental*. 33 (2) pp 201-207
- Ohtake, H. y Silver, S. 1994. Bacterial detoxification of toxic chromate. In: *Biological Degradation and Biorremediation of Toxic Chemicals*. pp. 403-415.
- Park, D., Y.S. Yun, J.H. Jo and J.M. Park. 2005. Mechanism of hexavalent chromium removal by dead fungal biomass of *Aspergillus niger*. *Water Res*. 39:533-540.
- Rivas, G., Gutierrez, S. y Merino, F. 2002. Bioremoción de plomo en solución por *Pseudomonas Fluorescens* M1A-4S aisladas de ambientes minero. Lab. de Microbiología y Biotecnología Microbiana de la Facultad de C.C.B.B UNMSM
- Rivera, M.; Sandoval, C.; Guzmán, J.; Avila, M. y Gutiérrez, F. 2003. Utilización de hongos resistentes a cromato para la eliminacion de cromo hexavalente en tierra de desechos industriales. Instituto de Investigaciones Científicas Universidad de Guanajuato. México.
- Rodríguez, Katthia. 2005. Eficacia del hongo *Pleurotus ostreatus* como biorremediador de suelos contaminados con metales pesados. Tesis para grado de maestro en Ciencias en Biología Universidad de Puerto Rico.
- Rodríguez, Jose y Sánchez, Jesús. 2004. Biorremediación. Aspectos tecnológicos y aplicación al vertido del Prestige. Universidad de Oviedo.
- Romero, M.; Reinoso, H.; Urrutia, M y Moreno, A. 2006. Biosorption of heavy metals by *Talaromyces helicus*: a trained fungus for copper and biphenyl detoxification. *Electronic Journal of Biotechnology*. 9 (3).

- Rosales, L., Mendoza, J., Katarzyna, W. y Gutierrez, F. 2002. Implementación de un Procedimiento citoquímico para la detección in situ de la reducción de Cr VI por cepas de hongos resistentes a cromato. . Instituto de Investigaciones Científicas Universidad de Guanajuato. México.
- Saenz, P. 2005. El proceso del curtido. Universidad Nacional del Nordeste. Hipertextos del área de la biología. <http://www.biologia.edu.ar/> (05/08/07)
- Villena, G. y Gutiérrez, M. 2003. Biopelículas de *Aspergillus niger* para la producción de celulasas: algunos aspectos estructurales y fisiológicos. Rev. peru. biol. 10 (1): 78-87
- Volesky, B. y Holan, Z.R.1995. Biosorption of heavy metals. Biotechnol Prog 11:235-250
- Vullo, Diana. 2003. Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. Revista Química Viva. 2 (3)
- Wosten, H. and J. Willey. 2000. Surface active proteins enable microbial aerial hyphae to grow in the air. Microbiology 146: 767-773.

ANEXOS

ANEXO 1

Preparación del medio de cultivo Agar Papa Dextrosa

Suspender 36 g de medio Agar Papa Dextrosa Oxoid® en polvo en 1 L de agua destilada, pH 7. Calentar hasta ebullición y autoclavar a 121°C durante 15 minutos. Chorrear 20 ml de APD en placas petri.

Preparación del medio de cultivo Agar Papa Dextrosa suplementado con un metal a diferentes concentraciones

En el caso de la preparación de medio suplementado con cromo se utiliza una solución madre de cromato de potasio (K_2CrO_4) 2000 mg/L y para la preparación del medio suplementado con plomo una solución madre de nitrato de plomo (II) ($Pb(NO_3)^{2-}$) 2000 mg/L.

Se añade el volumen necesario de cada solución madre a las placas petri con medio APD para alcanzar la concentración deseada del metal según cada caso.

ANEXO 2

Preparación del medio de cultivo M1

Calentar a ebullición por 10 minutos 200 gramos de papa pelada y en trozos en 500 ml de agua destilada, pH 7. Filtrar el medio, agregar 10 g de glucosa y completar hasta 1 L con agua destilada. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos.

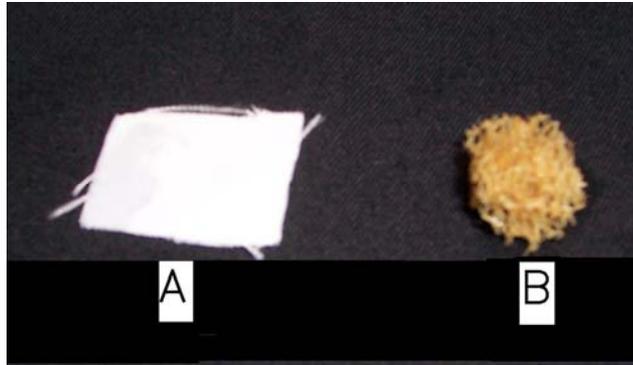
Preparación del medio de cultivo M1 suplementado con un metal a diferentes concentraciones

En el caso de la preparación de medio suplementado con cromo se utiliza una solución madre de cromato de potasio (K_2CrO_4) 2000 mg/L y para la preparación del medio suplementado con plomo una solución madre de nitrato de plomo (II) ($Pb(NO_3)^{2-}$) 2000 mg/L.

Se añade el volumen necesario de cada solución madre al medio M1 para alcanzar la concentración deseada del metal según cada caso.

Anexo 3

**Tela y esponja vegetal (paste) empleados en los ensayos de inmovilización.
A: tela, B: esponja**



Anexo 4

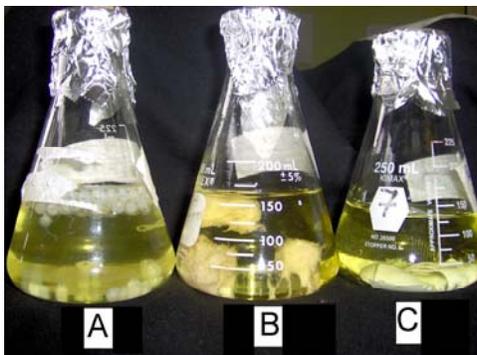
Preparación del medio de cultivo M1 modificado con alginato de sodio

Calentar a ebullición por 10 minutos 25 gramos de papa pelada y en trozos en 100 ml de agua destilada. Filtrar el medio, agregar 1,25 g de glucosa, 3.75 g de alginato de sodio y completar hasta 125 ml con agua destilada, calentar con agitación hasta disolver el alginato de sodio. Autoclavar a 121 °C durante 15 minutos.

Anexo 5

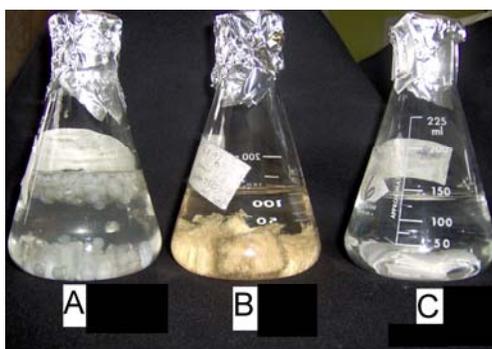
Ensayo de reducción de cromo en medio líquido por la cepa C1Cr inmobilizada.

A: pellets en esferas de alginato, B: cepa inmobilizada en esponjas,
C: cepa inmobilizada en tela.



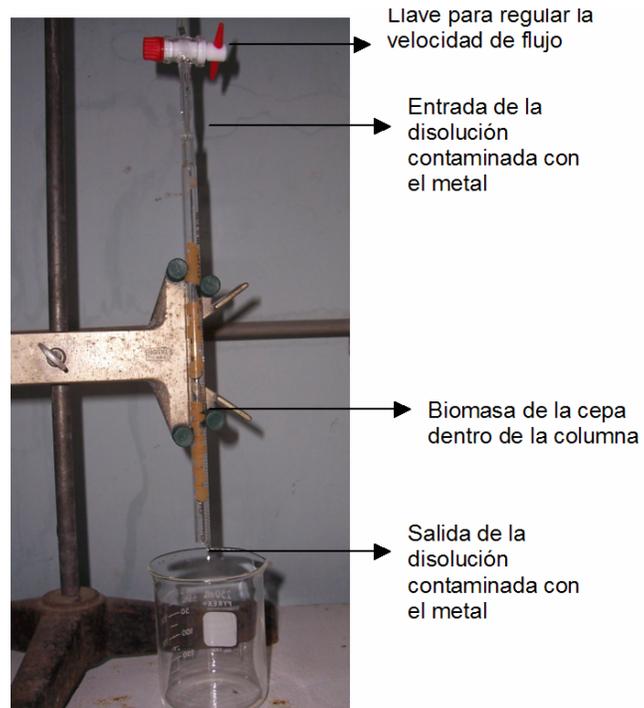
Ensayo de reducción de plomo en medio líquido por la cepa C1Pb inmobilizada.

A: pellets en esferas de alginato, B: cepa inmobilizada en esponjas,
C: cepa inmobilizada en tela.



Anexo 6

Ensayo diseñado para determinar la remoción de cromo y plomo en un influente con diferentes velocidades de flujo



Anexo 7

Muestra colectada contaminada con cromo



Anexo 8

Muestra colectada contaminada con plomo



Anexo 9

Comparación entre la bacteria C2Cr y *Thiocapsa sp* (A)

