

## Universidad Católica de Santa María

Facultad de Ciencias Farmacéuticas Bioquímicas y Biotecnológicas.

Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica.



**“BIOADSORCIÓN DE CROMO (VI) CON *Saccharomyces cerevisiae*  
INMOVILIZADA, COMO RESIDUO DE LA ELABORACIÓN DE LA CERVEZA,  
PARA SU APLICACIÓN EN BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS  
CONTAMINADAS DE LA INDUSTRIA DEL CURTIDO, AREQUIPA 2016”**

**Tesis presentada por las Bachilleres:**

*Fernandez Chiara, Jehnny Georget.*

*Guzman Ponce, Katherine Susan.*

**Para optar el Título Profesional de  
Ingeniero Biotecnólogo.**

**Asesor:**

*Ing. Cinthia Córdova Barrios.*

**AREQUIPA- PERU**

**2019**

**UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA**  
**Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas**  
**y Biotecnológicas**  
**Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica**

Expediente N°. 2016000049553  
N° Trámite en Fac. 311-2016  
Fecha Recep. Fac. 22-11-2016

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: **FERNANDEZ CHIARA, Jehnny Georget**  
**GUZMAN PONCE, Katherine Susan**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO BIOTECNOLOGO

**“BIOADSORCION DE CROMO (VI) CON *Saccharomyces cerevisiae* INMOVILIZADA, COMO RESIDUO DE LA ELABORACION DE LA CERVEZA, PARA SU APLICACIÓN EN BIORREMEDIACION DE AGUAS CONTAMINADAS”**

DICTAMINADORES: 1) **Blgo. Carlos Eitel Iván Paz Aliaga** 2) **Mgter Fredy Molina Rodríguez**

**DICTAMEN DE PLAN:** Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que, hechas las observaciones y subsanadas las correcciones, sugerimos que el título debe cambiar a: **“BIOADSORCION DE CROMO (VI) *Saccharomyces cerevisiae* INMOVILIZADA, OBTENIDA COMO RESIDUO DE LA ELABORACION DE LA CERVEZA, PARA SU APLICACIÓN EN BIORREMEDIACION DE AGUAS CONTAMINADAS DE INDUSTRIAS CURTIEMBRAS”**, después de lo cual consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

FIRMAS: 737 (Devolver antes de 8 días hábiles) FECHA

ASESOR: **Ing. Cinthia Córdova Barrios**

**DICTAMEN ASESORÍA:** Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesora del trabajo de investigación presentado por las recurrentes, tengo a bien informar que luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes y debiendo cambiar el título a: **“BIOADSORCION DE CROMO (VI) CON *Saccharomyces cerevisiae* INMOVILIZADA, COMO RESIDUO DE LA ELABORACION DE LA CERVEZA, PARA SU APLICACIÓN EN BIORREMEDIACION DE AGUAS CONTAMINADAS DE LA INDUSTRIA CURTIEMBRE. AREQUIPA 2016.”**, considero que el presente trabajo está APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad

FIRMA FECHA 01-04-19

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) **Blgo. Carlos Eitel Iván Paz Aliaga** 3) **Mgter. Jaime Barreda del Carpio**  
2) **Dr. Fredy Molina Rodríguez**

**DICTAMEN FINAL:** Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, habiendo revisado el presente Borrador de Tesis intitolado: **“BIOADSORCION DE CROMO (VI) CON *Saccharomyces cerevisiae* INMOVILIZADA, COMO RESIDUO DE LA ELABORACION DE LA CERVEZA, PARA SU APLICACIÓN EN BIORREMEDIACION DE AGUAS CONTAMINADAS DE LA INDUSTRIA DEL CURTIDO” AREQUIPA 2016** y habiendo realizado las correcciones indicadas se considera APTO para que prosiga con el trámite en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad.

FIRMA (Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA

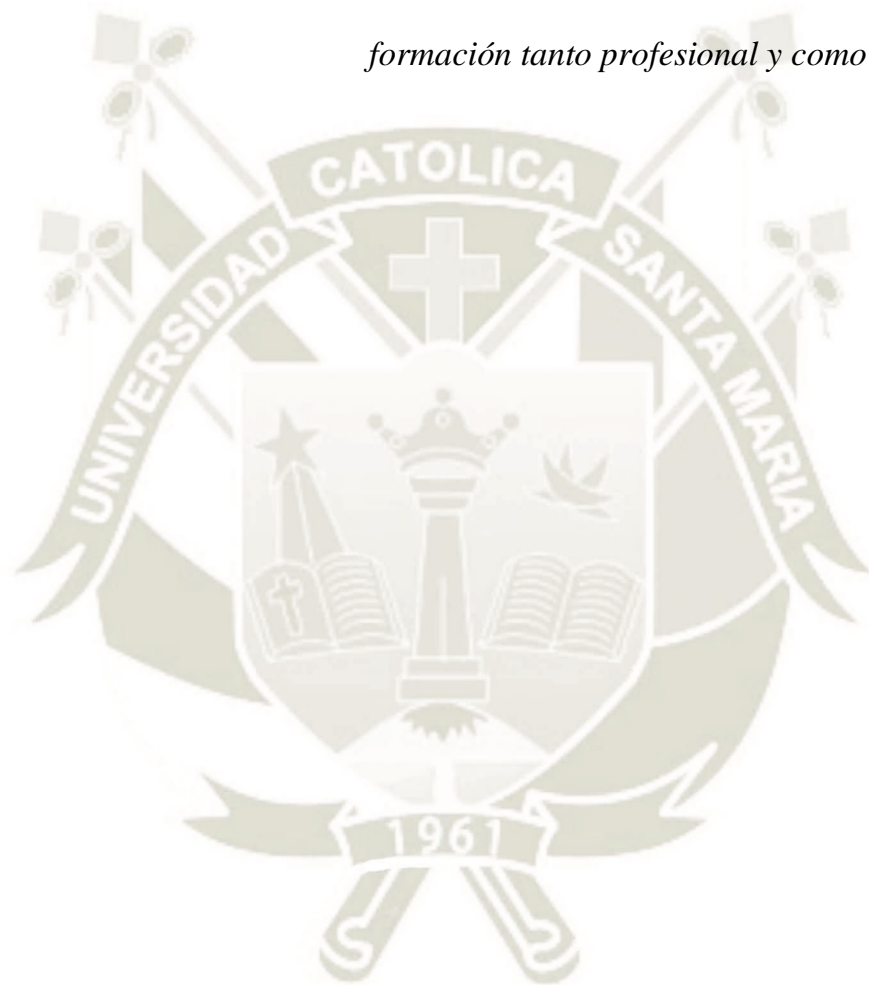
JURADOS: PRESIDENTE **BLGO. CARLOS EITEL IVAN PAZ ALIAGA**  
VOCAL **DR. FREDY MOLINA RODRIGUEZ**  
SECRETARIO **MAG. JAIME BARREDA DEL CARPIO**

FECHA 8/5/19 HORA 19.00 LOCAL C-402

FIRMA DEL DECANO FECHA

## DEDICATORIA

*El presente trabajo está dedicado a nuestras familias por haber sido el apoyo a lo largo de toda nuestra carrera universitaria y a lo largo de nuestras vidas. A todas las personas especiales que nos acompañaron en esta etapa, aportando a nuestra formación tanto profesional y como seres humanos.*



## AGRADECIMIENTO

El presente trabajo de investigación lo dedicamos principalmente a Dios, por ser el inspirador y darnos fuerza para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados.

A nuestros padres, por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años, gracias a ustedes hemos logrado llegar hasta aquí y convertirnos en lo que somos. Ha sido el orgullo y el privilegio de ser sus hijas, son los mejores padres.

A nuestros hermanos por estar siempre presentes, acompañándonos y por el apoyo moral, que nos brindaron a lo largo de esta etapa de nuestras vidas.

A nuestra asesora tesis la ingeniera Cinthia Córdova Barrios que con toda su voluntad, aliento, apoyo incondicional, amistad y que con sus admirables conocimientos, nos brindó para llevar a cabo nuestra investigación realizada

A nuestros jurados, por su tiempo, dedicación, y consejos que nos dieron para la realización de nuestro trabajo de tesis.

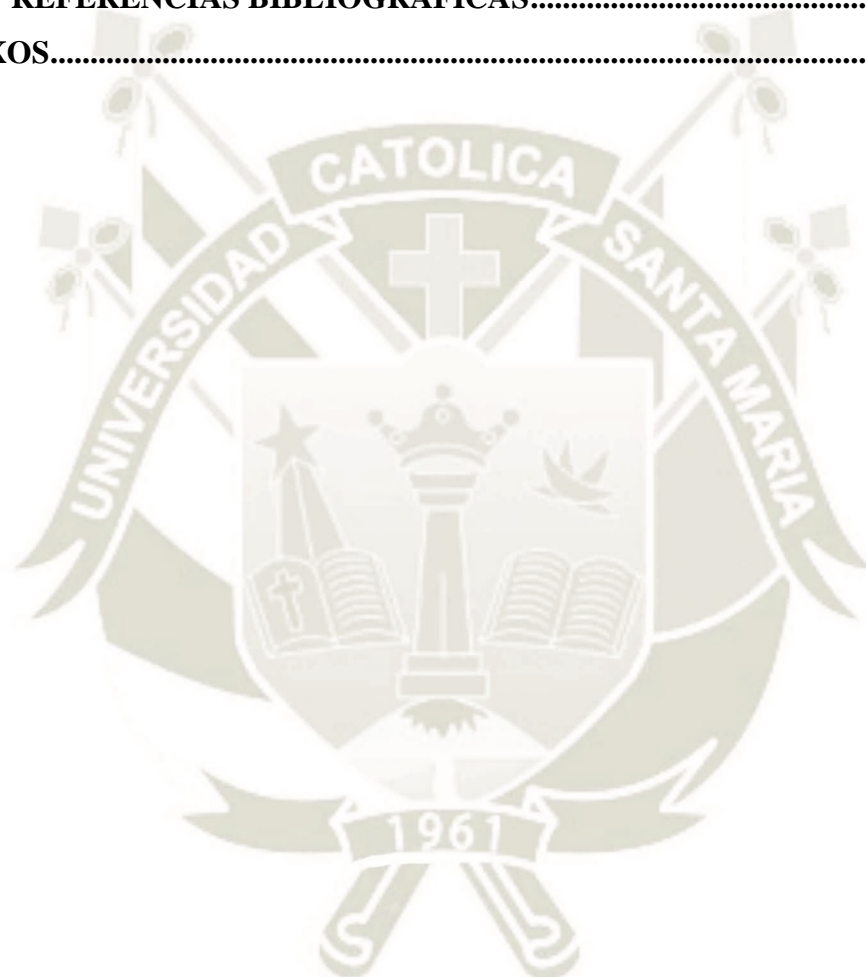
A todas las personas que nos han apoyado y han hecho que el trabajo se realice con éxito en especial a aquellos que nos abrieron las puertas y compartieron sus conocimientos.

## INDICE GENERAL

<b>INDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>viii</b>
<b>INDICE DE TABLAS .....</b>	<b>x</b>
<b>INDICE DE ANEXOS.....</b>	<b>xii</b>
<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>xiii</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xvi</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>3</b>
<b>OBJETIVOS. ....</b>	<b>3</b>
<b>CAPITULO I.....</b>	<b>4</b>
<b>1. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>4</b>
<b>1.1. INDUSTRIA CURTIEMBRE .....</b>	<b>4</b>
<b>1.2. PROCESO DE PRODUCCIÓN .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3. CURTIDO A UN SOLO BAÑO .....</b>	<b>7</b>
<b>1.4. CURTICIÓN A DOS BAÑOS .....</b>	<b>7</b>
<b>1.5. PROCESOS MECÁNICOS DE POST-CURTICIÓN .....</b>	<b>8</b>
<b>1.6. PROCESOS HÚMEDOS DE POST-CURTICIÓN .....</b>	<b>8</b>
<b>1.7. SECADO Y TERMINACIÓN .....</b>	<b>8</b>
<b>1.8. IDENTIFICACIÓN DE FUENTES Y CARACTERÍSTICAS DE LOS RESIDUOS.....</b>	<b>9</b>
<b>1.9. SEGURIDAD Y SALUD OCUPACIONAL.....</b>	<b>10</b>
<b>1.10. PRODUCTOS QUÍMICOS PELIGROSOS .....</b>	<b>11</b>
<b>1.11. METALES PESADOS .....</b>	<b>12</b>
<b>1.11.1. CROMO.....</b>	<b>14</b>
<b>1.11.2. CONTAMINACIÓN AMBIENTAL CON CROMO .....</b>	<b>14</b>
<b>1.11.3. EXPOSICIÓN .....</b>	<b>17</b>
<b>1.11.4. METABOLISMO DEL CROMO EN EL CUERPO.....</b>	<b>17</b>

1.11.5. EFECTOS SOBRE LA SALUD .....	18
1.11.6. EVALUACIÓN DE LA EXPOSICIÓN.....	19
1.12. MÉTODOS CONVENCIONALES UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS CONTAMINADAS.....	19
1.13. MÉTODOS NO CONVENCIONALES UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO DE AGUAS CONTAMINADAS.....	21
1.14. BIORREMEDIACIÓN .....	21
1.15. BIOSORCIÓN O BIOADSORCIÓN .....	24
1.16. TIPOS DE BIOMASA UTILIZADAS.....	28
1.17. MECANISMO DEL PROCESO DE BIOSORCIÓN. ....	29
1.18. MECANISMOS DE RESISTENCIA A LOS METALES PESADOS.....	30
1.19. <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> . ....	32
1.20. CARACTERÍSTICAS GENERALES. ....	33
1.21. CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS. ....	34
1.22. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS.....	35
1.23. CONDICIONES DE CULTIVO.....	35
1.24. INMOVILIZACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	39
1.24.1. PRE-REQUISITOS PARA LOGRAR UNA INMOVILIZACIÓN.....	40
1.24.2. VENTAJAS DE LA INMOVILIZACIÓN DE CÉLULAS.....	40
1.24.3. CONCENTRACIÓN DE BIOMASA.....	41
1.24.4. MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN REVERSIBLE.....	41
CAPITULO II.....	45
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	45
2.1. MATERIALES.....	45
2.2. METODOLOGÍA.....	46
CAPITULO III .....	54
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	54
3.1. RECOLECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE MUESTRAS:.....	54

<b>3.2. ADAPTACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA DE LA CEPA A SOLUCIONES DE CROMO (VI).....</b>	<b>63</b>
<b>3.3. DETERMINACIÓN DE LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA.....</b>	<b>66</b>
<b>4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>86</b>
<b>5. SUGERENCIAS.....</b>	<b>88</b>
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>89</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>98</b>



## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	: Fulones de madera para el curtido del cuero .....	6
<b>Figura 2</b>	: Fisiología de la piel .....	7
<b>Figura 3</b>	: Etapas del proceso de curtido .....	9
<b>Figura 4</b>	: Residuos líquidos de la curtición.....	10
<b>Figura 5</b>	: Acumulación de metales pesados en el ambiente.....	14
<b>Figura 6</b>	: Río contaminado con Cromo.....	17
<b>Figura 7</b>	: Mecanismo de Fitorremediación .....	23
<b>Figura 8</b>	: Mecanismo de interacción entre microorganismos y metales pesados ...	30
<b>Figura 9</b>	: Vista microscópica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	34
<b>Figura 10</b>	: Vista macroscópica de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> en medio YPG. ....	35
<b>Figura 11</b>	: Mapa del lugar de muestreo .....	54
<b>Figura 12</b>	: Recolección de muestra de curtiembre.....	55
<b>Figura 13 A, B</b>	: Crecimiento en medio YPD (A) y micrografía con microscopio con lente 100x de <i>S. cerevisiae</i> (B). ....	56
<b>Figura 14</b>	: Prueba bioquímica SIM.....	57
<b>Figura 15</b>	: Prueba bioquímica OF.....	58
<b>Figura 16</b>	: Prueba bioquímica TSI.....	59
<b>Figura 17</b>	: Prueba bioquímica Urea .....	60
<b>Figura 18</b>	: Prueba bioquímica Citrato de Simmons .....	61
<b>Figura 19</b>	: Prueba bioquímica Gelatina .....	62
<b>Figura 20</b>	: Adaptación de <i>S. cerevisiae</i> a diferentes concentraciones de Cromo (VI) .....	64
<b>Figura 21</b>	: Crecimiento vs Concentración .....	66
<b>Figura 22</b>	: Cinética de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> vs tiempo de evaluación.....	69
<b>Figura 23</b>	: Cinética de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> vs tiempo de evaluación.....	71
<b>Figura 24</b>	: Diseño del sistema batch y especificaciones .....	73
<b>Figura 25</b>	: Pellets de agar-agar con <i>S. cerevisiae</i> .....	74



<b>Figura 26</b>	: Diseño del PFTR modificado y especificaciones.....	77
<b>Figura 27</b>	: Biorreactor flujo pistón.....	77
<b>Figura 28</b>	: Muestras procedentes del sistema PFTR empleando aguas sintéticas: Entrada (1), Salida de prueba sólo agar (2), salida de prueba agar + cepa (3).....	77
<b>Figura 29</b>	: Muestras procedentes del sistema PFTR empleando efluentes curtiembres: salida de prueba agar + cepa (4), Salida de prueba sólo agar (5), entrada (6). ....	78
<b>Figura 30</b>	: Reacción química del Cromo (VI) con la Difenilcarbazida.....	78
<b>Figura 31</b>	: Curva de calibración de dicromato de potasio.....	80
<b>Figura 32</b>	: Concentración residual de Cromo (VI), según tipo de agua en el biorreactor flujo pistón empacado con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> inmovilizada.....	84
<b>Figura 33</b>	: Porcentaje de remoción de Cromo (VI), según tipo de agua en el biorreactor flujo pistón empacado con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> inmovilizada.....	85

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla N° 1</b>	: Ventajas y desventajas de la fitorremediación. ....	24
<b>Tabla N° 2</b>	: Ventajas y desventajas de la biosorción.....	27
<b>Tabla N° 3</b>	: Tabla comparativa entre biosorción y bioacumulación.....	28
<b>Tabla N° 4</b>	: Ventajas de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> .....	29
<b>Tabla N° 5</b>	: Mecanismos de resistencia de las cepas contra metales pesados.....	32
<b>Tabla N° 6</b>	: Clasificación taxonómica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . ....	33
<b>Tabla N° 7</b>	: Tratamientos de Cromo (VI) a diferentes concentraciones sobre <i>Sacharomyces cerevisiae</i> .....	49
<b>Tabla N° 8</b>	: Caracterización de las muestras de efluente curtiembre. ....	55
<b>Tabla N° 9</b>	: Resultados de la identificación bioquímica de <i>Sacharomyces cerevisiae</i> .....	57
<b>Tabla N° 10</b>	: Crecimiento máximo alcanzado a 48 horas de incubación.....	63
<b>Tabla N° 11</b>	: Adaptación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en cultivo de medio YPD determinado mediante recuento en cámara de Newbauer a 600 mg/L de Cromo (VI).....	65
<b>Tabla N° 12</b>	: Cinética de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en cultivo de medio líquido YPD determinado mediante recuento en cámara de Newbauer.....	67
<b>Tabla N° 13</b>	: Cinética de crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en cultivo de medio líquido YPD determinado mediante absorbancias con espectrofotometría.....	70
<b>Tabla N° 14</b>	: Comparación del crecimiento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> según el tiempo y las concentraciones de Cromo (VI), en cultivo de medio YPD.....	72
<b>Tabla N° 15</b>	: Lectura de absorbancias promedio de solución de Dicromato de potasio.....	79
<b>Tabla N° 16</b>	: Determinación de precisión del método.....	81
<b>Tabla N° 17</b>	: Determinación de exactitud del método.....	82
<b>Tabla N° 18</b>	: Concentración y porcentaje de Cromo (VI) removido por cepa inmovilizada.....	82
<b>Tabla N° 19</b>	: Concentración y porcentaje de Cromo (VI) removido por sólo agar-	

	agar .....	83
<b>Tabla N° 20</b>	:Comparación de la concentración residual de Cromo (VI), en aguas sintéticas y aguas de industria curtiembre en el biorreactor flujo pistón empacado con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> inmovilizada. ....	84
<b>Tabla N° 21</b>	: Comparación de porcentaje de remoción de Cromo (VI), en aguas sintéticas y aguas de industria curtiembre en el biorreactor flujo pistón empacado con <i>Saccharomyces cerevisiae</i> inmovilizada. ....	85



## INDICE DE ANEXOS

<b>ANEXO A.</b>	Flujograma de procesos de curtido de cuero.....	98
<b>ANEXO B.</b>	Medio Dextrosa Extracto de Levadura (YPD).....	99
<b>ANEXO C.</b>	Agar Sabouraud Glucosado (ASG).....	100
<b>ANEXO D.</b>	Agar Extracto de Malta (MEA) .....	101
<b>ANEXO E.</b>	Agar Triple Azúcar Hierro (TSI) .....	102
<b>ANEXO F.</b>	Agar Kligler Hierro (KIA) .....	103
<b>ANEXO G.</b>	Agar SIM .....	104
<b>ANEXO H.</b>	Agar Nitrato .....	105
<b>ANEXO I.</b>	Agar Lisina Hierro (LIA).....	106
<b>ANEXO J.</b>	Caldo Rojo de Metilo – Voges Proskauer (MR-VP) .....	107
<b>ANEXO K.</b>	Medio Christensen (Urea Base Agar) .....	108
<b>ANEXO L.</b>	Curva de calibración de Dicromato de Potasio.....	109
<b>ANEXO M.</b>	Determinación de concentración de Cromo (VI) en muestras medidas al espectrofotómetro.....	111
<b>ANEXO N.</b>	Conteo en cámara de Neubauer y Densidad Óptica.....	114
<b>ANEXO O.</b>	Lecturas a 540 nm en el espectrofotómetro UV-vis .....	115
<b>ANEXO P.</b>	Lecturas absorbancias y conteo en cámara de Neubauer en cinéticas de crecimiento.....	117
<b>ANEXO Q.</b>	Lecturas absorbancias para determinación de Cromo (VI).....	119
<b>ANEXO R.</b>	Adaptación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a diferentes concentraciones de Cromo (VI).....	128
<b>ANEXO S.</b>	Informe de ensayo físico químico.....	132

## ABREVIATURAS

<b>YPD</b>	Medio Extracto de Levadura
<b>MEA</b>	Agar Extracto de Malta
<b>TSI</b>	Agar Triple Sugar Iron
<b>KIA</b>	Agar Kliger Iron
<b>LIA</b>	Agar Lisin Iron
<b>NIT</b>	Agar Nitrato
<b>UR</b>	Agar Urea
<b>GEL</b>	Agar Gelatina
<b>DFC</b>	Difenilcarbazida
<b>UFC</b>	Unidades formadoras de colonia
<b>CSTR</b>	Reactor continuo agitado
<b>PFTR</b>	Reactor flujo pistón
<b>SC</b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>SIM</b>	Agar Sulfide Indol Movility
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Ácido sulfhídrico
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>Ppm</b>	Partes por millón



## RESUMEN

En la actualidad, debido al constante incremento de la contaminación ambiental producida por los distintos procesos industriales para la obtención de cuero, se opta por perseguir mecanismos que permitan la remoción total o parcial de los desechos que estas industrias generan, los cuales son directamente vertidos en efluentes o cursos de agua, provocando contaminación de estos, así como también la bioacumulación de los mismos en zonas agrícolas donde se emplean estas aguas como regadío, dichos residuos poseen una elevada concentración de Cromo (VI), el cual, al tener contacto con seres vivos de manera directa, a través de la piel, o al ser ingerido, causa afecciones a la salud, que pueden tener complicaciones tales como cáncer y mutaciones.

El objetivo del presente trabajo de investigación fue bioadsorber Cromo (VI), presente en efluentes de la industria curtiembre, empleando una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* procedente de residuos fermentativos de la industria cervecera, inmovilizada en agar.

La cepa *Saccharomyces cerevisiae* se aisló y caracterizó macroscópica, microscópica y bioquímicamente. Asimismo, se llevó a cabo la adaptación de la cepa aislada, a través de distintas concentraciones de Cromo (VI), donde la cepa logró adaptarse a una

concentración de 600 ppm de Cromo (VI). Posteriormente se determinó su cinética de crecimiento, donde se determinó que el crecimiento exponencial de *Saccharomyces cerevisiae* se detiene a las 48 horas a 37°C.

La producción de biomasa se desarrolló en un sistema batch construido, la cual es útil para la bioadsorción, obteniéndose 300 g de biomasa seca en un volumen de 3 L por un lapso de 48 horas. Finalizada la obtención de la biomasa, se procedió a la inmovilización de la misma, utilizando el método de Gelificación en agar agar, obteniéndose “pellets” de un tamaño promedio de 0.5 cm de diámetro.

Paralelamente se construyó un biorreactor flujo pistón (PFTR), en el cual se puso 18 L de biomasa inmovilizada para evaluar la remoción de Cromo (VI) por parte de la cepa, tanto en aguas sintéticas, como en el efluente de curtiembre. La evaluación de la concentración inicial y final de Cromo (VI) de ambas muestras mediante el método colorimétrico de la Difencilcarbazida, obtuvo una reducción del 83.42% de Cromo (VI) en el sistema donde se empleó agua sintética, mientras que en el sistema donde se emplea efluente de curtiembre redujo un 86.96% de Cromo (VI). De acuerdo a los resultados obtenidos, se concluye que el sistema empleado puede considerarse eficaz para el tratamiento de remoción de Cromo (VI) para efluentes procedentes de la industria curtiembre.

**Palabras clave:** Bioadsorción, *Saccharomyces cerevisiae*, efluente curtiembre, Cromo (VI), concentración, Difencilcarbazida.

## ABSTRACT

Actually, due to the constant increase of the environmental pollution produced by the different industrial processes for leather production, we opt to pursue mechanisms that allow the total or partial removal of the waste that these industries generate, which are directly discharged into effluents or water courses, causing pollution of these, as well as the bioaccumulation of them in agricultural areas where these waters are used as irrigation. These residues have a high concentration of chromium (VI), which, by having contact with living beings directly, through the skin, or being ingested, causes health conditions, which may have complications such as cancer and mutations

The objective of this research work was bioadsorb chromium (VI), present in effluents from the tannery industry, using a strain of *Saccharomyces cerevisiae* from fermentative residues of the brewing industry, immobilized on agar.

The strain *Saccharomyces cerevisiae* was isolated and identified macroscopically, microscopically and biochemically. Likewise, the adaptation of the isolated strain was carried out through different concentrations of chromium (VI), where the strain was adapted to a concentration of 600 ppm of chromium (VI). Subsequently, its growth kinetics were determined, where it was concluded that the exponential growth of *Saccharomyces cerevisiae* is stopped at 48 hours at 37 ° C.

A batch system was built, which was used for the production of biomass in greater quantity to be used for bioadsorption. Where was obtained a volume of biomass production of 3 L of the bottle, corresponding to 300 gr of dry biomass, in a span of 48 hours. Once the biomass was obtained, the immobilization of the biomass was carried out, using the agar agar gelling method, obtaining "pellets" with an average size of 0.5 cm in diameter.

Then, a piston flow bioreactor (PFTR) was built, in which 18 liters of immobilized biomass was placed and the removal of chromium (VI) by the strain was evaluated, both in synthetic waters, and the water obtained from tannery effluent. The initial and final concentration of chromium (VI) of both samples was evaluated by means of the colorimetric method of diphenylcarbazide, where a reduction of 83.42% of chromium (VI) was obtained in the system where synthetic water was used, whereas in the system where tannery effluent was used, reduced 86.96% of chromium (VI). According to the results



obtained, it is concluded that the system used can be considered effective for the treatment of removal of chromium (VI) for contaminated water from the tannery industry.

**Key words:** Bioadsorption, *Saccharomyces cerevisiae*, tannery effluent, Chromium (VI), concentration, Diphenylcarbazide.



## INTRODUCCIÓN

La industria del curtido de pieles es una actividad estrechamente ligada a dos importantes sectores productivos del país, la industria del calzado y el faenamamiento de animales, especialmente bovinos. Para el primero constituye su principal proveedor de materia prima, en cambio para el segundo, es un importante cliente para su subproducto: cuero.

Desde un punto de vista ambiental, el rubro de la curtiembre siempre ha sido visto como una industria contaminante neta. El proceso del curtido genera una importante carga contaminante, la cual, es en muchos casos directamente vertida a efluentes, cursos de agua o desagües<sup>4</sup>.

La gran cantidad de residuos que son vertidos a efluentes de agua por empresas curtiembres en la ciudad de Arequipa, contienen una considerable concentración de metales pesados que generan impacto en el medio ambiente de nuestra localidad. Esto acrecienta por la carencia de acceso a la información sobre la cantidad de contaminantes en el agua y a la violación de las normas establecidas para su uso y tratamiento, generando un problema a nivel social, contaminando de manera irreversible el medio ambiente y provocando daños a la salud<sup>4</sup>.

La contaminación causada por la industria de la curtiembre, se debe principalmente al vertido de sus residuos líquidos en efluentes cercanos a las fábricas, debido al uso de colorantes y compuestos químicos durante el proceso de teñido y acabados, sobre todo en el proceso de cromado, donde se adicionan sales de cromo en elevadas concentraciones. Estos compuestos también presentan cantidades considerables de otros metales pesados, como; Cadmio, Mercurio, Zinc, Manganeso, Plomo, Cobalto, y Cobre, estando presente los dos últimos en mayores concentraciones, junto con el Cromo, siendo estos directamente vertidos sin tener un tratamiento previo. El agua contaminada es utilizada para regar plantaciones que proporcionan alimento a la ciudad, la cual contienen una carga contaminante producto de su crecimiento en condiciones tóxicas<sup>5</sup>.

La exposición a nivel local de Cromo, ocasiona irritación de la piel, mucosa y es sensibilizante de la piel. La exposición generalizada, en casos de intoxicaciones agudas fuertes, produce una intensa irritación en las vías respiratorias<sup>10</sup>.

En la actualidad, entre los métodos de remoción de metales tradicionales, se encuentran: la precipitación química; mediante el empleo de óxido de magnesio o magnesia, procesos electroquímicos; como la electrodeposición, la osmosis inversa y la ultrafiltración, mediante el empleo de membranas, el intercambio iónico; mediante el empleo de sustancias aniónicas, la adsorción en soportes inorgánicos, y el uso de cenizas, subproducto de la industria de horneado, pudiendo reducir entre 50 a 75% del Cromo presente, siendo el más empleado por su viabilidad económica. Otros métodos empleados, son los de origen biotecnológico, tales como el uso de macroalgas asociadas a un soporte de silicatos, los cuales otorgan soporte al alga y evitan su disgregación. La eficiencia de este método oscila entre 40 a 60%. También pudiéndose emplear compuestos de origen animal (plumas de aves, exoesqueletos de crustáceos, pieles o fibras de lana, pelo), de origen vegetal (fitorremediación mediante plantas flotantes mediante bioacumulación) o de origen microbiológico (empleo de microorganismos, tales como bacterias, hongos o levaduras, que permiten la remoción de metales mediante distintos mecanismos de biosorción)<sup>14</sup>.

En el presente trabajo de investigación se propone un método de biorremediación alternativo, donde se empleará biomasa microbiana, constituida por una levadura obtenida a partir de un residuo industrial de la industria cervecera, otorgándole resistencia en un soporte de agar, pretendiendo la remoción del metal pesado en cuestión, reduciendo considerablemente la presencia de éste en los efluentes de la industria curtiembre.

- **Hipótesis.**

Dada la composición química de la pared celular de las levaduras con propiedades de biosorción de metales pesados, es posible que la cepa *Saccharomyces cerevisiae* presente en residuos cerveceros puedan adsorber Cromo (VI) en agua sintética y efluentes procedentes de industria curtiembre.

- **Objetivos.**

**Objetivo general.**

- Bioadsorber Cromo (VI) con *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada, como residuo de la elaboración de la cerveza, para su aplicación en biorremediación de aguas contaminadas de la industria curtiembre.

**Objetivos específicos.**

1. Obtener y caracterizar las muestras de industria cervecera e industria curtiembre.
2. Aislar y caracterizar la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* presente en residuos cerveceros.
3. Adaptar y evaluar la tolerancia de la cepa a soluciones de Cromo (VI).
4. Determinar la cinética de crecimiento de la cepa aislada.
5. Diseñar y construir un sistema batch para la producción de biomasa.
6. Inmovilizar la biomasa mediante el método de gelificación en agar agar.
7. Diseñar y construir un biorreactor flujo pistón (PFTR) para la remoción de Cromo (VI).
8. Evaluar la remoción de Cromo (VI) en agua sintética y efluentes de curtiembres en el biorreactor flujo pistón (PFTR).

## CAPITULO I

### 1. MARCO TEÓRICO

#### 1.1. Industria Curtiembre

En el país, la producción de cueros curtidos ha experimentado un descenso en los últimos años. La menor demanda proveniente de la industria del calzado nacional ha incidido notoriamente en la actividad del curtido. Actualmente, existen cerca de 30 curtiembres, de las cuales aproximadamente el 50% se ubica en la región Metropolitana. Si bien estas últimas representan la mitad de las curtiembres del país, su producción constituye el 75 y 60% de todo el cuero curtido producido de bovino y caprino-ovino, respectivamente<sup>86</sup>.

Es conveniente mencionar que no tan solo la menor actividad o desarrollo del sector curtiembre se debe a factores externos al rubro, sino también, influyen algunos internos<sup>10</sup>.

#### 1.2. Proceso de producción

Luego de ser beneficiados los animales, los cueros son tratados con sal por el lado carne, con lo que se evita la putrefacción y se logra una razonable conservación, es decir, una conservación adecuada para los procesos y usos posteriores a que será sometido el cuero.

Una vez que los cueros son trasladados a la curtiembre, son almacenados en el saladero hasta que llega el momento de procesarlos de acuerdo a las siguientes etapas<sup>86</sup>.

- **Ribera**

En esta etapa el cuero es preparado para ser curtido, en ella es limpiado y acondicionado asegurándole un correcto grado de humedad. La sección de ribera se compone de una serie de pasos intermedios, que son:

- **Remojo**

Proceso para rehidratar la piel, eliminar la sal y otros elementos como sangre, excretas y suciedad en general.

- **Pelambre**

Proceso a través del cual se disuelve el pelo utilizando cal y Sulfuro de sodio, produciéndose, además, al interior del cuero, el desdoblamiento de fibras a fibrillas, que prepara el cuero para la posterior curtición.

- **Desencalado**

Proceso donde se lava la piel para remover la cal y luego aplicar productos neutralizantes, por ejemplo: Ácidos orgánicos tamponados, azúcares, melazas y Acido sulfoftálico.

- **Descarnado**

Proceso que consiste en la eliminación mecánica de la grasa natural y del tejido conjuntivo, esencial para las operaciones secuenciales posteriores hasta el curtido.

- **Purga enzimática**

El efecto principal del rendido tiene lugar sobre la estructura fibrosa de la piel, pero existen una serie de efectos secundarios sobre la elastina, restos de queratina de la epidermis y grasa natural de la piel. Su acción es un

complemento en la eliminación de las proteínas no estructuradas, y una acción sobre la limpieza de la flor, la que se traduce en lisura de la misma, y le confiere mayor elasticidad.<sup>86</sup>

- **Piquelado**

El proceso de piquelado comprende la preparación química de la piel para el proceso de curtido, mediante la utilización de Acido fórmico y Sulfúrico principalmente, que hacen un aporte de protones, los que se enlazan con el grupo carboxílico, permitiendo la difusión del curtiente hacia el interior de la piel sin que se fije en las capas externas del colágeno<sup>86</sup>.

- **Curtido**

El curtido consiste en la estabilización de la estructura de colágeno que compone al cuero, usando productos químicos naturales o sintéticos, los cuales son adicionados en los fulones como se muestra en la Fig. 1. La curtición imparte un particular "tacto" al cuero resultante. Unas variedades de productos químicos son usadas, siendo el Cromo el más importante<sup>86</sup>.

Se le conoce también como wet blue (Cuero húmedo azul), en este punto se le puede guardar sin riesgo a que se pudra. En este método es muy importante las bases para nivelar el pH o alcalinidad de la piel y su solubilidad para que el curtido penetre bien a la piel.



**Figura 1: Fulones de madera para el curtido del cuero**

**Registro de la Investigación.**

### 1.3. Curtido a un solo baño

La curtición a un solo baño consiste en curtir directamente, en una sola operación, con sales básicas de Cromo.

Estas sales básicas de Cromo se pueden encontrar en forma de: combinaciones de Cromo (es lo más utilizado) ya preparadas que se venden en forma líquida o atomizada, como el Sulfato monobásico de Cromo a partir de Dicromato y un reductor a partir de alumbre de Cromo y Carbonato sódico como basificante<sup>86</sup>.

### 1.4. Curtición a dos baños

Ha sido de aplicación fundamentalmente en la fabricación de pieles curtidas de cabrilla para obtener una flor delicada como se muestra en la Fig. 2, y buen efecto rellenante a través de la incorporación del azufre generado en el baño, durante el proceso de reducción del Cromo (VI). En este procedimiento (curtido en dos baños), las pieles se impregnan en el primer baño con Acido crómico que se ha obtenido a partir del Dicromato ( $K_2Cr_2O_7$  ó  $Na_2Cr_2O_7$ ) de potasio (K) ó Sodio (Na).

En el segundo baño se transforma el Ácido crómico en sal de cromo verde (reducción).

El curtido propiamente dicho de la piel tiene lugar en el segundo baño con el concurso de la sal verde de cromo, lo mismo que en el procedimiento de curtido en un baño<sup>86</sup>.



Figura 2: Fisiología de la piel<sup>10</sup>



Posibles defectos de la curtición en Cromo:

- Manchas después de proceso.
- Distribución no uniforme del Cromo en la piel.
- Cueros de flor suelta y tacto esponjoso.
- Estallido de flor.

### **1.5. Procesos mecánicos de post-curtición**

A continuación del curtido, se efectúan ciertas operaciones mecánicas que pretenden dar un espesor específico y homogéneo al cuero. Estas operaciones son:

- Desaguado mecánico para eliminar el exceso de humedad, además permite entregarle una adecuada mecanización al cuero para los procesos siguientes.
- Dividido o partido del cuero para separar el lado flor del lado carne de la piel.
- Raspado para dar espesor definido y homogéneo al cuero.
- Recortes, proceso por el cual se elimina las partes del cuero que no van a tener una utilización posterior<sup>68</sup>.

### **1.6. Procesos húmedos de post-curtición**

Esto consiste en un reprocesamiento del colágeno ya estabilizado, tendiente a modificar sus propiedades para adecuarlas a artículos determinados. Este objetivo se logra agregando otros curtientes en combinación o no con Cromo.

En este grupo de procesos se involucra el neutralizado, recurtido, teñido y engrasado del cuero<sup>86</sup>.

### **1.7. Secado y terminación**

Los cueros una vez recurtidos, son desaguados y retenidos para eliminar el exceso de humedad, además son estirados y preparados para luego secarlos. El proceso final

incluye el tratamiento mecánico del lado flor y el descarne, seguido de la aplicación de las capas de terminación.

La terminación consiste en anilinas o pigmentos dispersos en un binder, típicamente caseína o polímeros acrílicos o poliuretánicos, los que son aplicados por felpa, pistola o rodillo. Lacas nitrocelulósicas o uretánicas pueden ser aplicadas con solventes orgánicos como capas de superficie.

Los sistemas de terminación basados en el no uso de solventes, están siendo desarrollados rápidamente con el consiguiente aumento de su aplicación<sup>86</sup>. En la Fig. 3 podemos apreciar el proceso de curtido.

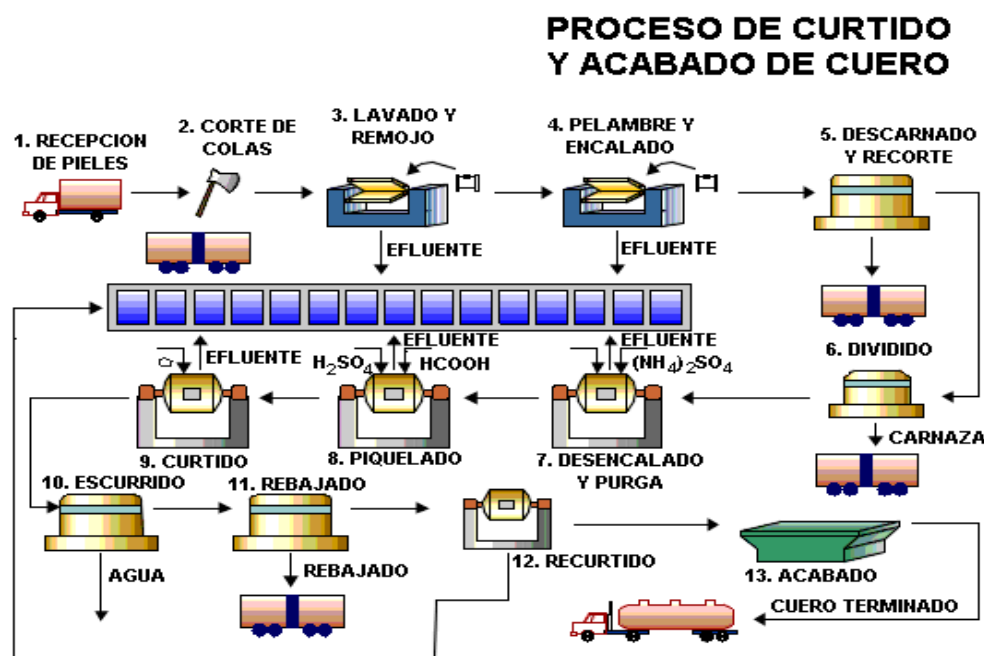


Figura 3: Etapas del proceso de curtido<sup>10</sup>

### 1.8. Identificación de fuentes y características de los residuos

Los desechos de curtiembre contienen un número de constituyentes en cantidades variables y significativas, de acuerdo a la materia prima, proceso y producto final.

Los materiales que pueden aparecer en los desechos de curtiembre, incluyen entre otros: pelo, pedazos de piel y carne, sangre, estiércol, sales, sal común, sales de cromo y sulfuros entre otros.

Los residuos, cuando se presentan, pueden descargarse en estado gaseoso, líquido, o sólido. Los desechos líquidos son los de mayor significación. Sin embargo, los materiales gaseosos y sólidos son importantes en ciertas operaciones individuales y se deben considerar para su disposición.

Después del proceso de curtido, se generan lodos si es que la curtiembre cuenta con planta de tratamiento. Cuando se depuran los efluentes líquidos se produce una gran cantidad de lodo residual, vale decir, aparece un nuevo residuo sólido, que anteriormente no existía por cuanto todos sus componentes eran evacuados en conjunto con el total del agua residual, como se aprecia en la Fig. 4<sup>86</sup>.



**Figura 4: Residuos líquidos de la curtiembre<sup>86</sup>**

### **1.9. Seguridad y salud ocupacional**

La subsistencia de la persona exige la mantención de un equilibrio dentro de ciertos márgenes en el ambiente, y cualquier alteración de este equilibrio trae como consecuencia un desajuste o trastorno en el cuerpo, el cual puede ser general, local o pasar inadvertido, según sea su magnitud<sup>48</sup>.

En este contexto, el hombre o más específicamente el trabajador está expuesto a ciertos riesgos cuando se encuentra inmerso en alguna actividad productiva. En particular, dentro del rubro curtiembre estos riesgos están asociados, principalmente, al manejo de insumos químicos que se emplean en el proceso de producción de cueros, así como por una inadecuada disposición de los residuos al interior y fuera de la planta industrial. Es decir, puede presentarse riesgos para el trabajador derivados; unos por el uso o manipulación de sustancias tóxicas o dañinas que pueden encontrarse y, otros, por exposición a condiciones físicas anormales. Las curtiembres presentan en menor medida problemas de ruido. Por otra parte, el riesgo de accidentes laborales puede ser disminuido con una adecuada capacitación de los trabajadores sobre el manejo de sustancias, maquinaria y equipo, el adecuado comportamiento en los lugares de trabajo y el uso adecuado de sus implementos de seguridad entre otros. Es decir, buenas prácticas al interior de las empresas<sup>52</sup>.

Las sustancias dañinas o tóxicas y las condiciones físicas no usuales constituyen lo que se denomina agentes ambientales, cuya presencia en los lugares de trabajo son las causas potenciales de las enfermedades profesionales<sup>46</sup>.

Existen niveles de tolerancia por parte del organismo humano, para las distintas sustancias tóxicas que pueden encontrarse en el ambiente de trabajo, las cuales de exceder un límite determinado, son capaces de producir enfermedades si ingresan al organismo.

En general, los accidentes y las enfermedades profesionales no constituyen hechos producto del azar, sino que son el resultado de una cadena de hechos que, si son conocidos y analizados, permiten su prevención<sup>48</sup>.

### **1.10. Productos químicos peligrosos**

La existencia de diferentes insumos químicos empleados en el proceso productivo y que pueden causar daño a la salud de los trabajadores, demanda un especial cuidado por parte del trabajador<sup>52</sup>.

Es necesario tomar precauciones en el transporte, almacenamiento y manipulación de estos productos.

El Sulfuro de sodio, las sales de cromo, las bases o álcalis, los ácidos, así como los solventes y pesticidas, son algunos de los insumos que requieren un manejo cuidadoso porque pueden causar intoxicaciones o accidentes a los empleados expuestos a ellos. También con los elementos inflamables debe existir algún tipo de precaución. El buen manejo de los insumos químicos al interior de la industria debe formar parte de un programa de control de la producción industrial.

También, existe el riesgo que algunos residuos dentro de la industria sean nocivos para la salud de los trabajadores, tal es el caso de aquellos que contienen sulfuros, potenciales formadores de gas Sulfhídrico que muchas veces ha provocado desmayos y accidentes fatales durante la limpieza de canaletas y tanques recolectores de efluentes. Los residuos que contienen Cromo, principalmente el polvillo de cuero producido durante la operación de rotación del botal o suavizado del cuero, tienen efectos cancerígenos. Finalmente, los gases o vapores de solventes de la etapa de acabado son también nocivos para la salud<sup>48</sup>.

### 1.11. Metales Pesados

Los metales pesados son elementos químicos con densidades superiores a  $5 \text{ g/cm}^3$ , pesos atómicos mayores a 44.956 y números atómicos superiores a 20, excepto los elementos de los grupos alcalino, alcalinotérreo, lantánidos y actínidos. Los metales pesados se pueden clasificar en esenciales (Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Zn, V), los cuales cumplen alguna función biológica a concentraciones traza y en no esenciales (Cr, Cd, Hg, Pb, As, Sb), cuando no cumplen ninguna función biológica conocida<sup>46</sup>. Los iones metálicos son parte de la geósfera, por lo tanto se encuentran presentes de forma natural en la corteza terrestre (yacimientos) y son extraídos por el hombre para su fundición y posterior uso industrial<sup>52</sup>. Las principales causas de acumulación natural en los ecosistemas son: la erosión, la actividad volcánica y los incendios forestales, que de la misma manera cumplen ciclos de acumulación y remediación, sin presentarse un efecto tóxico y/o nocivo para los ecosistemas. El proceso de transformación de los metales pesados abarca desde su extracción en los yacimientos, hasta la fundición y el refinado de éstos, para obtener los metales de interés y convertirlos en bienes de consumo, que una vez utilizados es desechado. En cada una de estas etapas se liberan metales al ambiente; así, la minería expone las rocas

metálicas a meteorización acelerada, lixiviación y escorrentía; la fundición y el refinado, liberan importantes cantidades de productos secundarios<sup>55</sup>. Las descargas de las industrias de aplicación, transformación, residuos sólidos urbanos y lodos procedentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, contienen una importante carga de diferentes iones metálicos. El aporte atmosférico se da principalmente por la combustión de materias primas energéticas fósiles como carbón, gasolina, etc<sup>6</sup>. Por lo tanto las actividades humanas son las principales causantes de la contaminación producida por la acumulación de estos elementos. Debido a sus características especiales, los metales pesados se convierten en potentes contaminantes ambientales. Algunas de estas características son: su estabilidad, lo cual los hace persistentes y residuales en los ecosistemas, la afinidad por grupos tiólicos (-SH -), presentes en la mayoría de las enzimas de cualquier organismo vivo, la biodisponibilidad en medio acuoso y la capacidad de bioconcentrarse en los organismos acuáticos (peces, crustáceos, algas, etc.) y terrestres (plantas), afectando toda la cadena alimenticia de los ecosistemas. Los metales pesados en los ecosistemas pueden ser detectados en su estado natural o complejados con sales. En las aguas superficiales pueden existir en forma de coloides y/o partículas, apareciendo como hidróxidos, óxidos, silicatos, sulfuros o adsorbidos en minerales del grupo de las arcillas, sílice y materia orgánica<sup>24</sup>. También se pueden encontrar en fase disuelta (debido a la baja solubilidad de estos elementos, las concentraciones presentadas son muy bajas en forma iónica o complejos organometálicos), la cual es dependiente del pH, del tipo de sorbentes en los que se encuentran adsorbidos, y por último del estado de oxidación de las fases minerales y el ambiente redox del sistema<sup>46</sup>. Los alimentos contaminados con metales pesados pueden dañar a humanos y animales aún en bajas concentraciones debido a su acumulación gradual, se ha demostrado la acumulación de iones metálicos (Hg, Cr, Cd, Pb, As, V) en tejido sanguíneo de madres en gestación, en células de cerebro, hígado, riñón, corazón, páncreas, tejido muscular y huesos; formando complejos con unos péptidos llamados metalotieneinas<sup>71</sup>. También se comprobó el efecto genotóxico en plantas como *Tradescantia* y *Arabidopsis* expuestas a As, Pb, Hg, Cd y Cr. En el Japón hay cuatro enfermedades causadas por la polución, Itai itai, Minamata, Niigata Minamata, y asma Yokkaichi; las tres primeras son causadas por metales pesados como Cadmio y Metil mercurio<sup>46</sup>. En la Fig. 5, se puede apreciar la acumulación de metales pesados<sup>15</sup>.

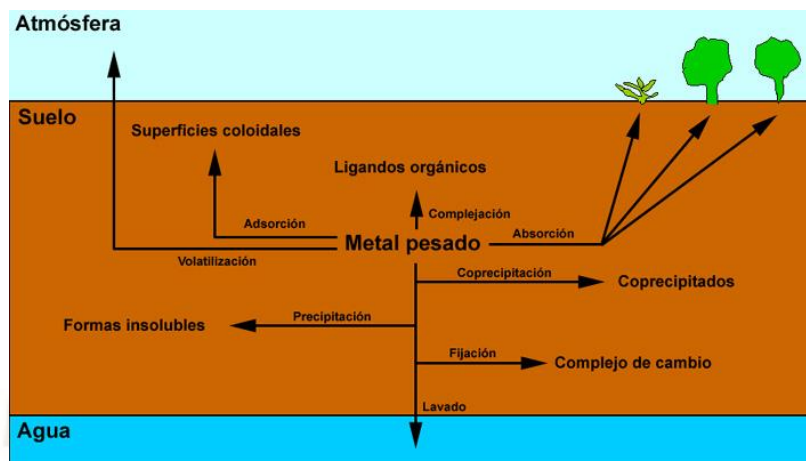


Figura 5: Acumulación de metales pesados en el ambiente<sup>15</sup>

### 1.11.1. Cromo

El Cromo es un elemento que se encuentra normalmente en rocas, animales, plantas y el suelo. Puede existir en formas diferentes y éstas determinan su estado líquido, sólido o gas. El Cromo (III) y Cromo (VI) son las formas más comunes en las que se encuentra este elemento. El Cromo (III) y (VI) se utilizan en el cromado, en colorantes y pigmentos, en curtido del cuero y en la preservación de la madera y, en cantidades pequeñas, en barrenas para la extracción de petróleo, inhibidores de corrosión, en la industria textil y en el tóner para copiadoras. El Cromo (VI) es producido normalmente por procesos industriales, mientras que las formas trivalentes predominan en organismos vivos. El Cromo trivalente (III) es un elemento residual necesario para mantener un buen estado de salud, ya que ayuda al cuerpo a utilizar el azúcar, la grasa y las proteínas<sup>15</sup>.

### 1.11.2. Contaminación ambiental con Cromo

El aire y el agua se contaminan con Cromo (III y VI) a partir de las actividades humanas. La concentración de Cromo en el aire en forma de material particulado puede aumentar como resultado de la quema de carbón y petróleo, la producción de acero, soldadura de acero inoxidable, manufactura de productos químicos y uso de productos que contienen Cromo. La contaminación de las aguas ocurre por la descarga de desechos derivados de la manufactura de colorantes y pigmentos para

el curtido de cueros; la mayor parte de las veces, el Cromo se va al fondo y sólo una pequeña parte se diluye en el agua. El suelo también puede contaminarse, debido al depósito de residuos de la industria y cenizas de carbón provenientes de plantas generadoras de electricidad. Por lo general, el Cromo (III) se elimina de la atmósfera mediante procesos de deposición en húmedo y en seco, las partículas de Cromo (III) de diámetro aerodinámico de menos de 20  $\mu\text{m}$  pueden quedarse suspendidas en el aire durante largo tiempo y viajar a través de grandes distancias. No es factible que el Cromo (III) pase de la tropósfera a la estratósfera; es factible que el Cromo (III) permanezca inmutable después de que se libera y entra en el suelo, la forma que predominantemente tiene el cromo que se deposita en el suelo es la de Oxido de cromo insoluble. Ambientalmente, su estado configura el comportamiento del elemento en distintos compartimentos<sup>15</sup>.

El Cromo (VI) tiene un potencial de oxidación muy grande y se reduce rápidamente a Cromo (III) en cuanto entra en solución con materia orgánica. Éste es menos soluble en agua, aunque también puede enlazarse con moléculas orgánicas lipofílicas, lo que lo vuelve biodisponible. El Cromo (III) se encuentra en las sales de cromo; desde el punto de vista ecológico, el Cromo (III) es un poco más fácil de degradar<sup>29</sup>.

El Cromo en la etapa de curtido, es uno de los contaminantes, que produce impactos negativos en el crecimiento del país, ya que compromete la salud humana, dañando los procesos ecológicos que sostiene la producción de alimentos, y desde el punto de vista económica la descarga de residuos es un desperdicio de recursos que son escasos<sup>2</sup>. Existen referencias sobre el Cromo; que indican que es un metal pesado que funciona químicamente con distintas valencias: Cromo (II,III.VI), siendo este último de gran importancia por su alto poder tóxico. El Cromo (III) y el Cromo (VI) en particular es un desnaturalizador de proteínas y precipitante de los ácidos nucleicos; además, es considerable la acción cancerígena de los Cromatos sobre el pulmón y el aparato digestivo<sup>3</sup>. El Cromo (VI) por ser un poderoso oxidante de sustancias orgánicas, es peligroso para los organismos vivos y para la salud humana. El Ácido crómico y los Cromatos pueden producir intoxicaciones accidentales agudas por vía digestiva. El envenenamiento agudo por ingestión produce vértigo, sed intensa, dolor abdominal, vómito, choque y oliguria o anuria.



La muerte se produce por uremia. La inhalación de vapores de Cromo por largos periodos, causa ulceración indolora, hemorragia y perforación del tabique nasal, acompañado de secreción nasal fétida, También se ha observado conjuntivitis, lagrimeo y hepatitis aguda con ictericia. Los datos de laboratorio indican que en personas que sobrepasan el valor máximo permisible hay hematuria y proteinuria y deterioro de la función hepatocelular; así mismo, que el Cromo y los Cromatos son irritantes y destructores para todas las células del organismo. En las muertes por envenenamiento agudo, se encuentra nefritis hemorrágica. En investigaciones anteriores, se menciona que en el segundo período puede aparecer hipotermia y metahemoglobinuria transitorias<sup>55</sup>. En contraste con la biorremediación de compuestos orgánicos, que destruyen las moléculas, y dan como productos finales  $CO_2$  o  $CH_4$ , los iones de Cromo no son destruidos por procesos microbianos, sin embargo, la molécula que contiene el metal puede ser modificada, inmovilizada, o destoxificada conduciendo a una apreciable o en algunos casos completa remediación del ambiente contaminado. Las principales vías por las cuales se lleva a cabo esta biorremediación incluyen biosorción, bioacumulación, reducción, solubilización (asociada comúnmente con la oxidación de sulfuros o ión ferroso), precipitación y mutilación. Algunas de estas tecnologías son desarrolladas completamente y han sido y siguen siendo usadas en la práctica<sup>55</sup>.

En nuestro medio, una de las industrias que destacan es la de curtido de cueros, industria que se inicia en forma artesanal, alcanzando actualmente un gran desarrollo en cuanto a tecnología moderna y prueba de ello es la obtención de productos de óptima calidad, junto a ello se han presentado nuevos problemas como la contaminación ambiental. La industria de curtiembre es contaminadora y vuelca al ambiente altos contenidos de materia orgánica y concentraciones que alcanzan niveles tóxicos de sustancias como Sulfuros y Cromo, si el proceso es mineral. Las dos primeras etapas del proceso de curtido, son importantes por el volumen y la carga contaminante de los efluentes que descargan al ambiente y el tercero por las cantidades de residuos sólidos generados en las distintas operaciones del acabado del cuero<sup>14</sup>. En nuestro medio existen reportes de la concentración de Cromo en los efluentes de las industrias de curtido de cuero, los cuales sobrepasa los valores

máximos permisibles. En la Fig. 6 podemos apreciar un río contaminado por la presencia de Cromo<sup>14</sup>.



**Figura 6: Río contaminado con Cromo<sup>14</sup>**

### 1.11.3. Exposición

Aunque los niveles de Cromo en agua y en aire son bajos, las personas pueden respirar aire, tomar agua o comer alimentos que contienen Cromo o absorberlo a través del contacto de la piel con este elemento o sus compuestos. Para la población general, la ruta más probable de exposición al Cromo (III) es el consumo de alimentos contaminados, pues los alimentos acídicos en contacto con latas o utensilios de cocina de acero inoxidable pueden contener niveles de Cromo más altos, debido al escape de este material desde el acero inoxidable. Por otra parte, la exposición al Cromo (VI) es frecuente en los ambientes de trabajo en los que se usa este compuesto: industria de cuero, industria textil, industria petrolera e industria de platinado entre otras<sup>107</sup>.

### 1.11.4. Metabolismo del Cromo en el cuerpo

La absorción de Cromo se hace fundamentalmente por tres vías: oral, respiratoria y dérmica. Al entrar en el organismo es distribuido a la médula ósea, pulmones, ganglios linfáticos, bazo, riñón e hígado. El compuesto que más fácilmente se absorbe es el Cromo (VI), ya que es tomado por los eritrocitos e integrado a otras células por el sistema transportador de sulfatos. Como ya se dijo, el Cromo (VI) se reduce en Cromo (III) intracelularmente en las mitocondrias y el núcleo, reductores intracelulares lo degradan en el citoplasma. La reducción intracelular genera

intermediarios reactivos como Cromo (V), Cromo (IV) y Cromo (III), así como radicales libres hidroxilo y oxígeno; estas formas reactivas del Cromo son susceptibles de alterar el ADN. Se elimina por vía renal el 60%, en menor grado por heces (vía biliar), cabello, uñas, leche y sudor. En la orina encontramos fundamentalmente Cromo (III) formando un complejo con el glutatión, pues el Cromo (VI) es reducido en gran parte a Cromo (III)<sup>107</sup>.

#### 1.11.5. Efectos sobre la salud

Los efectos adversos del Cromo para la salud dependen, especialmente, del grado de valencia de este elemento en el momento de la exposición y de la solubilidad del compuesto. Las únicas formas de importancia en toxicología son el Cromo (VI) y el Cromo (III). Una exposición de corta duración al Cromo (III) puede causar irritación mecánica en los ojos y en el tracto respiratorio. Si se presenta inhalación se presenta tos. El Cromo (VI) es un peligro para la salud de los humanos, sobre todo para la gente que trabaja en la industria del acero y textil. La gente que fuma tabaco también puede tener un alto grado de exposición a este elemento. El Cromo (VI) es conocido porque causa varios efectos sobre la salud: cuando se encuentra como compuesto en los productos de la piel, puede causar reacciones alérgicas, por ejemplo, erupciones cutáneas; después de ser respirado el Cromo (VI) puede causar irritación de la nariz y sangrado de ésta. Otros problemas de salud que son causado por el Cromo (VI) son: malestar de estómago, úlceras, problemas respiratorios, debilitamiento del sistema inmune, daño en los riñones e hígado, alteración del material genético, cáncer de pulmón y muerte. Normalmente, el Cromo produce dermatitis, por lo general, debido a una exposición en el ambiente ocupacional, siendo la industria del cemento una de las principales fuentes. De igual forma, la inhalación de vapor con compuestos de Cromo (VI) puede ocasionar irritación del sistema respiratorio, daños en los pulmones y síntomas de tipo asmático. La ingesta de sales de Cromo (VI) puede ocasionar lesiones graves, o incluso, la muerte. Asimismo, el Cromo en forma de polvo puede ocasionar llagas en la piel. Los compuestos de Cromo (VI) pueden ocasionar quemaduras en los ojos. Se estima que del 1 al 3% de la población general presenta alergia al Cromo. El Cromo (VI) posee dos características que explican el grado de toxicidad. La primera de ellas, las membranas celulares son permeables al Cromo (VI), pero no al Cromo (III) y en la

segunda característica el Cromo (VI) se reduce a Cromo (III) en el interior de las células, tanto de las mitocondrias como en el núcleo. La literatura reporta que los compuestos de Cromo (VI) y níquel producen cáncer. Los compuestos de Cromo y níquel están clasificados en el grupo 1 de elementos carcinógenos, de acuerdo con la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC). Los compuestos de Cromo (VI), compuestos de níquel y vapores de soldadura, se deben considerar carcinógenos potenciales según lo establecido en la Norma 29 CFR 1910.1200 de la Administración de Seguridad y Salud Ocupacional (OSHA). Asimismo, OSHA ha determinado, basada en la mejor evidencia posible, el nivel permisible de exposición al Cromo (VI) en 5 microgramos de Cromo (VI) por metro cúbico de aire en un promedio de 8 horas de trabajo (Occupational Safety and Health Administration)<sup>107</sup>.

#### **1.11.6. Evaluación de la exposición**

Sangre y orina son usados comúnmente para el monitoreo biológico de los trabajadores expuestos al Cromo y son, por tanto, las pruebas gold standard para la evaluación de la exposición. Otras técnicas para el monitoreo son la evaluación de la concentración de Cromo en el aliento condensado y la evaluación de Cromo en los eritrocitos, que permite evaluar los biomarcadores inflamatorios y se puede utilizar para investigar el tejido de algunos órganos como los pulmones en trabajadores expuestos al Cromo. El Cromo en orina y Cromo en plasma son los biomarcadores ideales de una exposición reciente, mientras el Cromo en eritrocitos puede representar una fracción del Cromo (VI), el cual alcanza el flujo sanguíneo en una forma no reducida y por esto depende de la dosis inhalada en el aire representada por el Cromo condensado en aliento exhalado. El Cromo medido en eritrocitos puede contribuir significativamente al biomonitoreo tradicional dando información específica en el órgano objetivo e integrando el conocimiento con la toxicocinética del Cromo<sup>107</sup>.

#### **1.12. Métodos convencionales utilizados en el tratamiento de aguas contaminadas**

Actualmente existen técnicas tradicionales al tratamiento de aguas provenientes de efluentes industriales y mineros, con el fin de minimizar el impacto de la

contaminación ambiental por metales pesados. Entre las técnicas de tratamiento de aguas se encuentran las siguientes<sup>5</sup>:

- a) **Precipitación química:** Consiste en la eliminación de una sustancia disuelta indeseable, por la adición de un reactivo apropiado, facilitando así su eliminación por métodos de separación de materia suspendida como la filtración o la coagulación-floculación. En la remoción de Cromo en efluentes contaminados, se emplea la magnesia, o también conocido como óxido de magnesio comercial.
- b) **Procesos Electroquímicos:** Está basado en la utilización de técnicas electroquímicas, haciendo pasar una corriente eléctrica a través del agua (que necesariamente ha de contener un electrolito) y provocando reacciones de oxidación-reducción tanto en el cátodo como en el ánodo. Por tanto, se utiliza energía eléctrica como vector de descontaminación ambiental, siendo su costo uno de las principales desventajas de este proceso. Sin embargo, como ventajas cabe destacar la versatilidad de los equipos, la ausencia tanto de la utilización de reactivos como de la presencia de fangos y la selectividad, pues al controlar el potencial de electrodo permite seleccionar la reacción electroquímica dominante deseada. Se permite la remoción de Cromo (VI) mediante la deposición de éste en un electrodo, acumulándose mediante diferencia de potencial.
- c) **Ósmosis inversa:** Consiste en pasar un efluente por membranas semipermeables, para separar y quitar los sólidos disueltos, los orgánicos, los pirogénicos, la materia coloidal submicro, organismos, virus y bacterias del agua. La ósmosis inversa es capaz de remover hasta el 99.5 % de la contaminación.
- d) **Ultrafiltración:** Es una operación de separación que comparte características de una filtración normal y de la ósmosis inversa. Consiste en la remoción de partículas coloidales y dispersas de un líquido que consiste en hacer pasar el mismo a través de una membrana, de nitrocelulosa en caso de Cromo (VI), aplicando alta presión. Permite la remoción de metales pesados, como el Cromo, empleada muy pocas veces debido a su alto costo de operación.

- e) **Intercambio iónico:** Proceso por el cual ciertos iones no deseados son cambiados por otros iones, que están unidos a las partículas de una resina; normalmente los iones hidrógeno de la resina, se cambian por los cationes y los iones hidroxilo de la resina se cambian por los aniones. Los iones hidrógeno e hidroxilo se combinan formando agua pura.
- f) **Adsorción:** El proceso de adsorción consiste en la captación de sustancias solubles en la superficie de un sólido. Un parámetro fundamental en este caso será la superficie específica del sólido, dado que el compuesto soluble a eliminar se ha de concentrar en la superficie del mismo. La necesidad de una mayor calidad del agua está haciendo que este tratamiento esté en auge. Es considerado como un tratamiento de refinado, y por lo tanto al final de los sistemas de tratamientos más usuales, especialmente con posterioridad a un tratamiento biológico.

### 1.13. Métodos no convencionales utilizados en el tratamiento de aguas contaminadas.

Los métodos convencionales generan gran cantidad de residuos y su costo es muy alto, especialmente cuando se aplican en ambientes con concentraciones de metales por debajo de 100 mg/L. Estos problemas han llevado a desarrollar alternativas ecológicas y económicas, las cuales, además de aprovechar y aplicar los procesos naturales que ocurren en un ecosistema para depurar un residuo contaminante, ofrecen la posibilidad de recuperar los recursos presentes en el mismo para su posterior utilización, generándose, además, un valor económico que contribuye a la sostenibilidad del sistema<sup>4</sup>.

### 1.14. Biorremediación

Según la Environmental Protection Agency (EPA), biorremediación se define como los procesos en los que se usan microorganismos o enzimas producidas por éstos para transformar o degradar contaminantes tóxicos en los ecosistemas<sup>6</sup>. Las interacciones metal-microbiota son estudiadas en profundidad en el contexto de la biotecnología ambiental, con el objeto de implementar métodos de remoción, recuperación o destoxificación de metales pesados y radionúclidos<sup>6</sup>. El estudio de las interacciones de los microorganismos con sus mecanismos de tolerancia, expone el potencial de éstos para ser utilizados en procesos biotecnológicos como la biorremediación de la

contaminación ambiental por metales pesados<sup>45</sup>. Existen en la práctica tres categorías generales de procesos biotecnológicos para el tratamiento de residuos líquidos que contienen metales tóxicos: la biosorción (bioacumulación y bioadsorción), la precipitación extracelular y la captación a través de biopolímeros purificados y de otras moléculas especializadas, derivadas de células microbianas<sup>16</sup>. Estos procesos no son excluyentes y pueden involucrar fenómenos fisicoquímicos y biológicos<sup>13</sup>.

Existen múltiples reportes de estudios de investigación a nivel mundial donde se menciona que los métodos para el tratamiento de aguas residuales con metales incluyen: precipitación, oxidación, reducción, intercambio iónico, filtración, tratamiento electroquímico, tecnologías de membrana y recuperación por evaporación, resultan costosos e ineficientes, especialmente cuando la concentración de los metales es muy baja<sup>19</sup>. Los métodos químicos para la eliminación de metales pesados también resultan costosos debido a que el agente activo no puede ser recuperado para su posterior reutilización<sup>61</sup>. Además, el producto final es un lodo con alta concentración de metales lo que dificulta su eliminación y por ello se propone a los microorganismos y sus productos como bioacumuladores eficientes de metales solubles y particulados, especialmente a partir de concentraciones externas diluidas<sup>16</sup>. La biotecnología ha separado dos grandes áreas dentro del mismo objetivo: bioacumulación y biosorción, la primera es considerada como un proceso activo de eliminación de metales pesados mediante mecanismos metabólicos involucrando biomasa viva, mientras que biosorción es entendido como un proceso pasivo con mecanismos netamente fisicoquímicos, por medio de biomasa muerta. Por tanto, la biosorción es un área de investigación con muchos aportes a la comunidad industrial, por ser una alternativa técnica y económicamente viable, tanto por su capacidad de depuración como por el moderado costo de operación que tiene, y por ser considerada una tecnología “limpia” en la eliminación de metales pesados de aguas residuales o de desecho de actividades productivas<sup>22</sup>. Las variables: pH, concentración de iones, presencia de electrolitos, concentración y tratamiento de biomasa son significativas en la biosorción de iones  $Pb^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$  y  $Cr^{3+}$  en solución cuando se usa biomasa muerta de *Saccharomyces cerevisiae*.

**Fitorremediación:** Es el uso de plantas para limpiar ambientes contaminados como aire, suelo y agua. Constituye una estrategia muy interesante, 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 como se muestra en la Fig. 7. En la Tabla N°1 se tienen algunas ventajas y desventajas de esta técnica<sup>20</sup>.

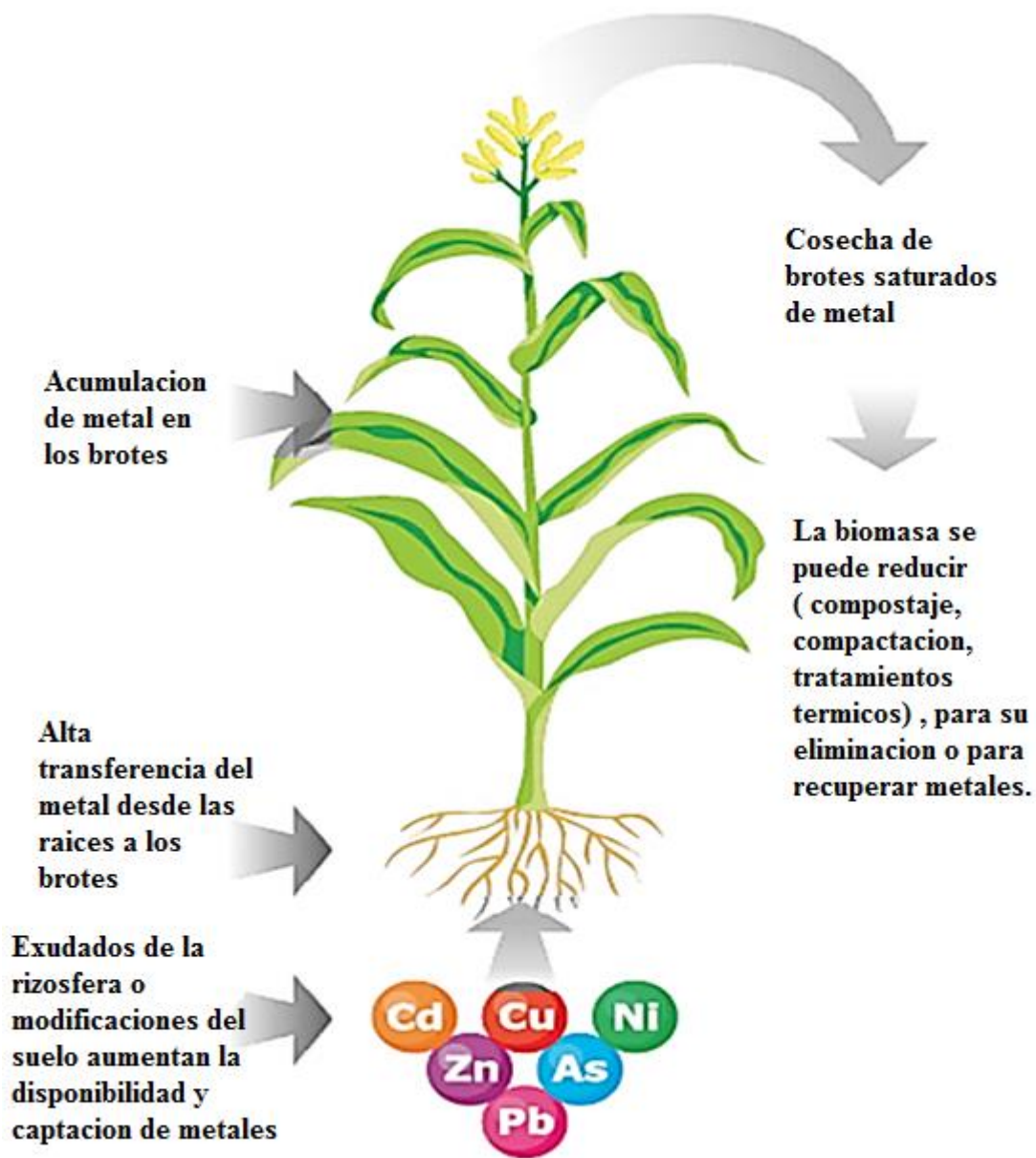


Figura 7: Mecanismo de Fitorremediación<sup>20</sup>



**Tabla N° 1: Ventajas y desventajas de la fitorremediación.**

Ventajas	Desventajas
- Las plantas pueden ser utilizadas para remediar suelos y aguas contaminadas a un bajo costo.	- El proceso se limita a la profundidad de penetración de las raíces o aguas poco profundas.
- Algunos procesos degradativos ocurren de forma más rápida con plantas que con microorganismos.	- Los tiempos del proceso pueden ser muy prolongados.
- Es un método apropiado para descontaminar superficies grandes o para finalizar la descontaminación de áreas restringidas por largos plazos.	- La biodisponibilidad de los compuestos o metales es un factor limitante de la captación.

**Fuente: Mejía, 2006.**

### 1.15. Biosorción o bioadsorción

El término sorción deviene de la capacidad que tienen las sustancias húmicas y arcillas del suelo para unir aniones y cationes, este proceso es denominado adsorción o sorción. En la adsorción una especie química puede ser adsorbida electrostáticamente, mientras que en la sorción una especie química puede ser acumulada en la superficie mediante interacciones electrostáticas, hidrofóbicas y/o de precipitación. La sorción también se puede definir como la transferencia de iones de una fase en solución a una fase sólida<sup>18</sup>. El concepto biosorción de metales pesados, se refiere a la captación de iones metálicos por medio de una biomasa viva o muerta (la diferencia es el poder tóxico de los metales, que puede afectar cuando se trabaja con biomasa viva), a través de mecanismos físicos y químicos, como la adsorción y el intercambio iónico. Cuando se utiliza biomasa viva, los diferentes procesos metabólicos indispensables para el desarrollo de cualquier organismo vivo pueden contribuir en el proceso<sup>58</sup>. El proceso básico de biosorción es igual al proceso de sorción y utiliza los mismos modelos matemáticos para cuantificar la remoción de un metal, en particular de una solución contaminada con éste (modelos de Freundlich y Langmuir).

Los primeros estudios de investigación acerca de biosorción de metales pesados se realizaron en la universidad de Mc Gill en Montreal, donde emplearon biomasa de hongos como *Rhizopus* o de bacterias como *Bacillus subtilis*; y además algas como *Sargasum* y *Ecklonia*<sup>4</sup>.

Los microorganismos que actúan como biosorbentes son puestos en contacto con el medio acuoso contaminado y una vez que esta biomasa ha removido los iones metálicos del medio acuoso, se tiene la opción de recuperar la biomasa viva e introducirla en un nuevo ciclo de biorrecuperación o biorremediación (se utilizan químicos suaves para bajar el pH y retirar los metales, sin destruir las células bacterianas). En caso de que no importe la integridad funcional de la biomasa o se trabaje con biomasa muerta, el o los metales se pueden retirar por métodos más drásticos como la incineración<sup>6</sup>. Desde finales de los 60's se han venido investigando organismos (plantas, microorganismos, hongos y algas) que son potencialmente eficientes en la biorremediación de metales pesados.

Así, mostraron la producción de enzimas bacterianas para la oxidación del hierro<sup>18</sup>, determinaron la concentración y acumulación de iones metálicos en la bacteria *Zoogloea*, estudiaron el mecanismo de oxidación del Hierro por la bacteria *Ferrobacillus ferrooxidans*<sup>27</sup>. En los 80's se profundizó sobre el mecanismo de acción de las bacterias para transformar y/o biosorber iones metálicos; se empezó a investigar más organismos con potencial biorremediador de este modo se encontró la selectividad de *Bacillus subtilis* por algunos iones metálicos<sup>82</sup>, y se investigó la reducción del Hierro y el Manganeso por bacterias fotosintéticas<sup>37</sup>.

A partir de 1986 se estudiaron bacterias, como *Pseudomonas*, diferentes tipos de algas y de hongos como *Penicillium*, *Rhizopus* y levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*.

Además, se empezó a investigar sobre los péptidos involucrados en la retención de iones metálicos, diseñando muchas secuencias de 18 aminoácidos (principalmente secuencias ricas en cisteína, glicina e histidina) para tal fin, y luego expresando los genes que codifican para esos péptidos en bacterias, aumentando así su potencial de biosorción<sup>31</sup>. En el Perú; a nivel laboratorio se ha logrado remover 94.8 % de Sulfatos; 99.60 % de Hierro, 99.23 % de Plomo y 98.57 % de Cobre empleando BSR

(Bacterias Sulfato Reductoras) y mecanismos de biosorción con especies fitorremediadoras<sup>29</sup>. Por otro lado también se ha aportado valiosa información y patentado una nueva tecnología denominada NCD (Neutralización y Coagulación Dinámica) para el tratamiento del DAM basado en procesos fisicoquímicos desarrollados en Canadá, tecnología HDS (Lodos de Alta Densidad), actualmente esta tecnología viene siendo aplicada para descontaminar los ríos Yauli y Mantaro en la principal fuente de contaminación ácida que es el efluente del Túnel Kingsmill “que descarga de 1100 a 1800 L/s de agua ácida, en lo que probablemente constituye en mayor caudal de agua ácida del mundo”<sup>41</sup>.

También se ha reportado la flora heterotrófica acompañante de *Acidithiobacillus ferrooxidans* en muestras de agua de mina, relaves y mineral de la Mina de la Sociedad Minera Condestable en Mala-Lima, encontrando cepas resistentes a Hierro y tolerantes a pH ácido<sup>47</sup>, el comportamiento de los microorganismos heterótrofos en los ambientes de faena minera<sup>31</sup>, estudió la resistencia a diferentes concentraciones de metales pesados encontrando patrones de resistencia variados<sup>11</sup>, se ha demostrado que los métodos químico y biogénico para el tratamiento del drenaje ácido de la mina Cerro de Pasco lograron reducir hasta en 99.99 % la concentración de metales pesados, pero el biogénico no dejó lodos contaminantes. En la Tabla N°2 podemos apreciar ventajas y desventajas de la biosorción.

**Tabla N° 2: Ventajas y desventajas de la biosorción**

Ventajas	Desventajas
- La minimización del volumen de productos químicos y/o lodos biológicos.	- Rápida saturación de los sitios de unión.
- El material biosorbente se puede regenerar.	- El secuestro por adsorción es sensible al pH.
- La remoción de los iones de metales se realiza a bajas concentraciones.	- El mejoramiento de estos procesos biológicos es limitado ya que las células no efectúan un metabolismo.
- El proceso no se encuentra gobernado por restricciones fisiológicas, es decir, no depende del crecimiento.	- El estado de valencia del metal no puede ser alterado biológicamente para dar formas menos solubles.
- No se requieren nutrientes para el proceso.	- No existe capacidad para degradar especies organolépticas.
- Los materiales utilizados como biosorbentes no son caros.	
- Bajo costo de operación.	
- Proceso sencillo.	

**Fuente: Mejía, 2006.**

**Bioacumulación:** Se basa en la absorción de las especies metálicas mediante procesos metabólicos de células de biomasa vivas. La bioacumulación ocurre en dos etapas, en la primera etapa se lleva a cabo la biosorción que es un proceso rápido y en la segunda etapa ocurre el transporte de sorbato (en este caso la especie metálica) en el interior de la célula siendo un proceso lento. Este proceso es más complejo que la biosorción y requiere actividad metabólica de la célula, es decir, cultivar el microorganismo en presencia del sorbato<sup>20</sup>. En la Tabla N°3 se muestra una comparación de la biosorción y la bioacumulación.

**Tabla N° 3: Tabla comparativa entre biosorción y bioacumulación**

Biosorción	Bioacumulación
Proceso pasivo	Proceso activo
Biomasa no viva o inactiva	Biomasa viva
Los metales son enlazados en la superficie de la célula	Los metales pueden ser enlazados en la superficie de la célula y en su interior
Proceso de adsorción	Proceso de absorción
Proceso reversible	Proceso parcialmente reversible
No se requiere nutrientes	Se requiere nutrientes
Ocurre en una sola etapa	Ocurre en dos etapas
Proceso rápido	Proceso lento
No es controlado por el metabolismo	Es controlado por el metabolismo
No hay peligro de efectos tóxicos	Pueden existir efectos tóxicos causados por contaminantes
No hay crecimiento celular	Ocurre crecimiento celular
Concentración de equilibrio intermedio de iones de metales	Equilibrio a muy bajas concentración de iones metálicos

**Fuente: Mejía, 2006.**

### 1.16. Tipos de biomasa utilizadas

En los siglos XVIII y XIX se empezó a estudiar la remoción de metales utilizando como biomasa microorganismos vivos, pero sólo en las últimas tres décadas se han utilizado microorganismos vivos y no vivos como adsorbentes de metales de soluciones acuosas. Las primeras aplicaciones de la técnica de biosorción involucraron tratamiento de agua residual<sup>19</sup> En el primer estudio cuantitativo de la biosorción de metales realizado por L. Hecke en 1902, se utilizaron esporas de *T. tritici* y *U. crameri* como biomasa y Volesky en 1982 patentó la técnica de biosorción para remover Uranio con biomasa de células de *Rhizopus arrhizus*<sup>28</sup>. Con el tiempo se ha estudiado el proceso de biosorción con diferentes tipos de biosorbentes, entre los cuales se encuentran; algas marinas<sup>12</sup> (*Sargassum natans*, *Caulerpa sp.*), bacterias (*Bacillus subtilis*), hongos (*Rhizopus arrhizus*), levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), los residuos microbianos de la fermentación

alcohólica de la industria alimentaria (levadura residual de cerveza) así como residuos agroindustriales (cáscara de toronja)<sup>12</sup>. En la Tabla N°4 se consideran las ventajas para utilizar *Saccharomyces cerevisiae* como biosorbente en biosorción de metales. Por razones económicas, los investigadores han prestado mucha atención a varios de los subproductos de la industria de la fermentación alcohólica, debido a que se producen en grandes cantidades<sup>27</sup>. La aplicación de estos residuos como biosorbentes para la biosorción de metales pesados tiene dos beneficios: las empresas pueden vender sus residuos y biomasa para ganar dinero, al mismo tiempo que se pueden ahorrar los costos asociados con la eliminación de los residuos de biomasa que se produce.

**Tabla N° 4: Ventajas de *Saccharomyces cerevisiae***

<b>Ventajas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>
✓ <i>S. cerevisiae</i> es fácil de cultivar a gran escala. La levadura puede crecer fácilmente utilizando sofisticadas técnicas de fermentación y en media de crecimiento económico. El rendimiento de la biomasa es alto.
✓ La biomasa de <i>S. cerevisiae</i> , se puede obtener fácilmente como subproducto de la industria de la fermentación de distintos alimentos y bebidas. En comparación con otros tipos de residuos, el suministro de <i>S. cerevisiae</i> es básicamente estable.
✓ <i>S. cerevisiae</i> es generalmente considerado como seguro. Por lo tanto, biosorbentes a partir de esta levadura pueden ser fácilmente aceptados por el público cuando se aplican prácticamente.
✓ <i>S. cerevisiae</i> , es un organismo modelo para identificar el mecanismo de biosorción en la eliminación de iones metálicos, especialmente para investigar las interacciones de los metales a nivel molecular.

**Fuente: Park, 2002.**

### **1.17. Mecanismo del proceso de Biosorción.**

El proceso de biosorción involucra una fase sólida (sorbente o biosorbente, por lo general un material biológico) y una fase líquida (disolvente, normalmente agua) que contiene una especie a adsorber (sorbato, un ion de metal)<sup>28</sup>. Debido a la gran afinidad del sorbente por el sorbato, este último es atraído hacia el sólido y enlazado por diferentes mecanismos. Este proceso continúa hasta que se establece un

equilibrio entre el sorbato disuelto y el sorbato enlazado al sólido (a una concentración final o en el equilibrio)<sup>23</sup>. La afinidad del sorbente por el sorbato determina su distribución entre las fases sólida y líquida. La cantidad de sorbente está dada por la cantidad de sorbato que puede atraer y retener en forma inmovilizada. Esto se lleva a cabo a través de distintos procesos físico-químicos, siendo el intercambio catiónico el principal mecanismo de biosorción<sup>25</sup>. Los grupos activos presentes en las paredes celulares son los grupos carbonilo hidroxilo, carboxilo, sulfhidrilo, tioeter, sulfonato, amina, imina, amida, imidazol, fosfonato, fosfodiéster; capaces de unirse a los metales contaminantes<sup>37</sup>, este mecanismo de biosorción lo apreciamos en la Fig. 8.

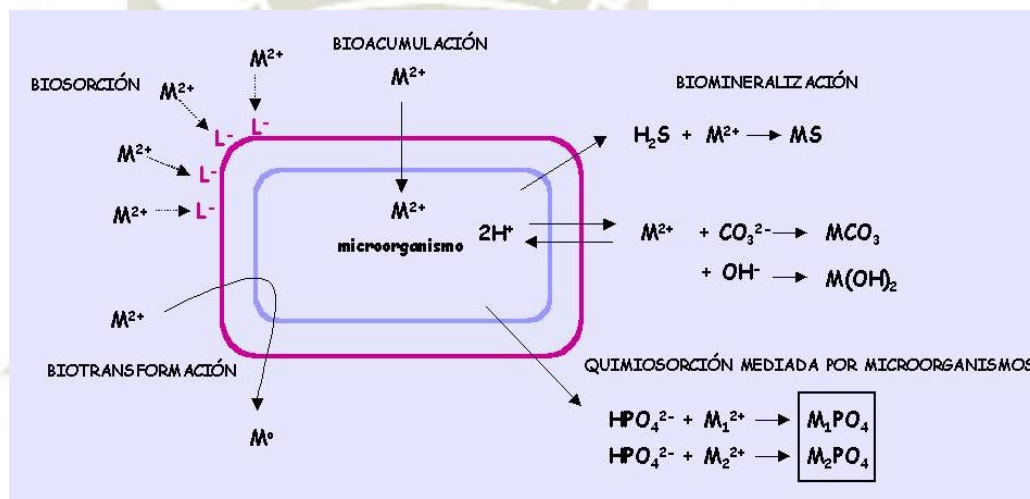


Figura 8: Mecanismo de interacción entre microorganismos y metales pesados<sup>27</sup>

### 1.18. Mecanismos de resistencia a los metales pesados

Existen sólo tres mecanismos a través de los cuales un sistema puede conferir resistencia a metales pesados:

- (i) disminución de la acumulación de un determinado ión mediante su transporte activo fuera de la célula;
- (ii) segregación de los cationes por moléculas que contienen grupos tioles;
- (iii) reducción de algunos iones metálicos pesados a un estado de oxidación menos tóxico.

Sin embargo, (i) y (iii) no pueden funcionar como mecanismos de destoxificación únicos en una célula. Por consiguiente, el “metabolismo” de los metales pesados es llevado cabo fundamentalmente por un “metabolismo” de transporte o en última instancia por una combinación de mecanismos <sup>21</sup>. Algunos metales como Cobalto, cobre, Níquel y Zinc, a concentraciones traza (10<sup>-1</sup> Mmol), son esenciales para algunos procesos celulares, ya que ejercen funciones catalíticas en determinadas reacciones bioquímicas o en conversiones metabólicas, actúan como micronutrientes, cofactores enzimáticos, o pueden estabilizar estructuras proteicas <sup>30</sup>. Sin embargo, a concentraciones superiores ejercen un marcado efecto citotóxico, por lo cual el mantenimiento de las concentraciones adecuadas de ellos constituye un factor importante para lograr la homeostasis celular. Existen dos sistemas de captura de metales pesados, uno es rápido, inespecífico, constitutivo, dependiente del sistema quimiosmótico y utilizado por variedad de sustratos, y el otro es lento, específico, utiliza ATPasas en adición al gradiente quimio-osmótico y es inducible en condiciones desfavorables. Así por ejemplo, si una célula bacteriana se encuentra en un ambiente con elevada concentración de un catión pesado es transportado al citoplasma, por el sistema constitutivo rápido pero inespecífico, donde interactúa con los grupos funcionales de las proteínas de transporte y enzimas, desplazando metales esenciales desde de sus sitios de reacción, la cual es la causa de la citotoxicidad. Si el gen que codifica para este sistema muta, se obtienen mutantes que son tolerantes a metales <sup>14</sup>. La acumulación de metales pesados en los ecosistemas, sumado a este sistema de captación de metales ha conducido durante la evolución de la vida al desarrollo de la homeostasis de los metales pesados. Esto se debe a un proceso de adaptación natural al medio por desarrollo o adquisición de genes que contrarresten la acción de los metales pesados. Resultando microorganismos resistentes quienes se caracterizan por poseer mecanismos de destoxificación codificados genéticamente, constitutivos o inducidos por la presencia del metal mientras que los microorganismos tolerantes son indiferentes a la presencia o ausencia del elemento <sup>19</sup>. La mayoría de los sistemas de resistencia se basan en el eflujo activo de iones tóxicos como Cobalto, Cadmio mediante proteínas facilitadoras de la difusión de cationes (Cation Diffusion Facilitator), ATPasas de tipo P y los transportadores compuestos por proteínas del grupo de resistencia, nodulación y división celular (RND). Los genes



que codifican la resistencia pueden hallarse en el cromosoma, en plásmidos o en transposones, en la Tabla N°5 podemos ver aquellos genes de resistencia ubicados en el cromosoma de algunas bacterias. Los genes de resistencia presentes en plásmidos confieren resistencia a altas concentraciones de metales, son inducibles y muy específicos <sup>20</sup>.

**Tabla N° 5 : Mecanismos de resistencia de las cepas contra metales pesados**

<b>Determinante genético</b>	<b>Metal al que confiere resistencia</b>	<b>Localización</b>	<b>Cepa bacteriana</b>
<b>znt.</b>	Zn II, Co II	Cromosoma	<i>S. aureus</i>
	Zn II Cd II	Cromosoma	<i>C metalidurans</i>
	Zn II Cd II Pb II	Cromosoma	<i>E. coli</i>
<b>eus.</b>	Cu II	Cromosoma	<i>C metalidurans</i>
	Cu II Ag II	Cromosoma	<i>E. coli</i>
<b>eup.</b>	Cu II	Cromosoma	<i>C metalidurans</i>
<b>nir.</b>	Ni II	Cromosoma	<i>K. oxytoca</i> <i>CCUG 15788</i>
<b>ner.nre.</b>	Ni II Co II	Cromosoma	<i>H. alvei 5.5</i>
			<i>S. marcescens</i>
			<i>L. ferriphilum</i>

**Fuente: Marrero-Coto 2010.**

### 1.19. *Saccharomyces cerevisiae*.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo ascomiceto que ha sido ampliamente estudiado dada su importancia en la industria panadera y vitivinícola, así como por su capacidad de producir etanol <sup>52</sup>. Filogenéticamente de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* se ha encontrado que la especie en su conjunto consta de

dos poblaciones, domésticos y salvaje <sup>86</sup>. La clasificación taxonómica de la levadura se puede apreciar en la Tabla N°6.

**Tabla N° 6: Clasificación taxonómica de *Saccharomyces cerevisiae*.**

<b>Taxonomía</b>	
<b>Reino:</b>	<i>Fungi</i>
<b>División:</b>	<i>Ascomycota</i>
<b>Clase:</b>	<i>Hemiascomycetes</i>
<b>Orden:</b>	<i>Saccharomycetales</i>
<b>Familia:</b>	<i>Saccharomycetaceae</i>
<b>Género:</b>	<i>Saccharomyces</i>
<b>Especie:</b>	<i>S. cerevisiae</i>

**Fuente: Hyma K. FEMS Yeast Research, 2011.**

### 1.20. Características generales.

Algunas características de esta levadura que forman parte de su adaptación son el hecho de que pueda metabolizar la glucosa y la fructosa tanto por vía respiratoria como por vía fermentativa, y de crecer en condiciones aerobias o anaerobias.

Levaduras como biomasa: El 80 o 90% de la materia seca de la pared celular de los hongos son polisacáridos, que se componen de aminoazúcares, hexosas, ácido hexurónico, metilpentosas y pentosas <sup>42</sup>. La pared celular de las levaduras está compuesta principalmente de  $\beta$  (1-3) glucano,  $\beta$  (1-6) glucano, manoproteínas y quitina. La quitina está compuesta de monómeros de la N-acetil-D-glucosamina, la cual crea un complejo con el  $\beta$  (1-3) glucano, formando una red fibrosa que le confiere rigidez y resistencia mecánica a la pared celular. Éste complejo es el principal componente de la pared interna. Los componentes que están dentro y

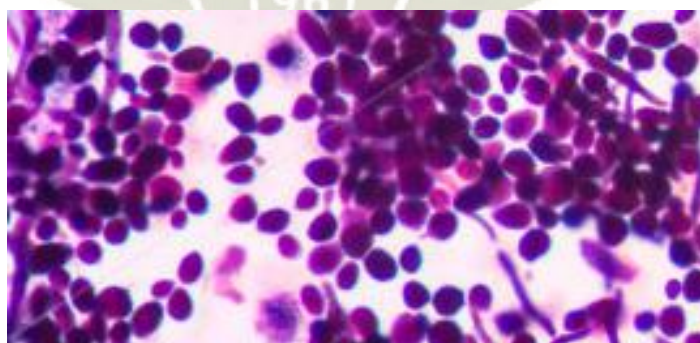
fuera de la pared se unen por medio del  $\beta$  (1-6) glucano. La superficie externa de la pared está compuesta de manoproteínas las cuales son importantes para la impermeabilidad de la pared celular <sup>42</sup>.

Naeem en el 2006 utilizó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para adsorber metales y observó la siguiente afinidad de adsorción: Pb>Zn>Cd>Sr. Este investigador sugirió que *Saccharomyces cerevisiae* representa un biosorbente original y adecuado para la remoción de metales pesados en soluciones acuosas de efluentes <sup>31</sup>. El pH juega un papel importante en la biosorción por lo cual se ha estudiado el efecto del pH en la remoción de metales utilizando *Saccharomyces cerevisiae*, tal es el caso de Hadi en el 2003 que reportó un pH óptimo de 5 para remover cadmio <sup>42</sup>.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es ampliamente utilizada en la industria alimentaria y se genera una gran cantidad de residuos de esta levadura, siendo una biomasa viable para el proceso de biosorción <sup>42</sup>.

#### 1.21. Características microscópicas.

- ✓ Talo unicelular, ovalado, redondo, con gemaciones (yemas), ilustrada en la Fig. 9.
- ✓ Se observan formas redondas y ovoides, elipsoides, a veces cilíndricas y filamentosas.



**Figura 9 : Vista microscópica de *Saccharomyces cerevisiae***<sup>59</sup>

## 1.22. Características macroscópicas

- ✓ *Sacharomyces cerevisiae* es una levadura cuya colonia es de color crema o blanco, apariencia húmeda y brillante, de bordes regulares como se muestra en la Fig.10. La temperatura óptima de crecimiento es de 25 a 30°C.
- ✓ Sus dimensiones son: 2.5- 10 micras de ancho y 4.5- 21 micras de largo.
- ✓ Puede producir ascosporas cuando hay requerimientos nutricionales adecuados.

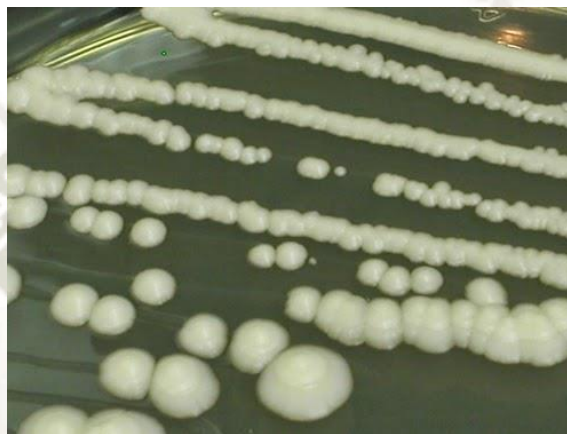


Figura 10 : Vista macroscópica de *Sacharomyces cerevisiae* en medio YPG<sup>42</sup>

## 1.23. Condiciones de cultivo.

- **Requerimientos nutricionales**

*Saccharomyces cerevisiae* requiere ciertos nutrientes y condiciones ambientales para su apropiado crecimiento y reproducción. Algunos elementos son básicamente necesarios como por ejemplo Carbono, Hidrógeno, Oxígeno, Nitrógeno y Fósforo.

El Carbono sirve como fuente de energía y como material constitutivo de la masa celular. El Nitrógeno se encuentra en la célula formando parte esencial de las proteínas, aminoácidos y ácidos nucleicos; el Fósforo se encuentra en los ácidos nucleicos, en la lecitina y en diversos compuestos fosforilados que participan activamente en los procesos de degradación oxidativa y de intercambio energético (ATP, ADP, AMP, NADP). Para que las fuentes de

Nitrógeno, Fosforo y Carbono presentes en el sustrato sean aprovechables por la levadura se requiere que se encuentren en forma asimilable <sup>59</sup>.

- **Condiciones que deben medirse y controlarse durante una fermentación discontinua.**
  - a. **Temperatura:** La temperatura óptima de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* es de 30 a 35°C. La temperatura afecta el crecimiento de manera notable, principalmente porque los microorganismos de una especie dada solo pueden crecer en un rango restringido de temperaturas, esto afecta de manera importante el crecimiento microbiano.
  - b. **pH:** El pH es la medida de la concentración de iones hidrógeno y tiene un marcado efecto en la velocidad de crecimiento y el rendimiento. También el pH es óptimo para algunas especies como la de las levaduras que comprende un rango de 4.0 a 6.0. Un cambio en el valor de pH del medio puede afectar su composición y la naturaleza de la superficie microbiana al disociarse ácidos y bases. Este último, puede afectar la floculación de la biomasa o su adhesión al vidrio. El pH tiene una gran influencia en los productos finales del metabolismo anaeróbico.
  - c. **Nutrientes:** Un medio de cultivo debe tener todos los elementos necesarios para el crecimiento microbiano, pero es conveniente señalar que las relaciones entre ciertos elementos son de particular importancia. Según investigaciones realizadas, se ha encontrado que en un cultivo para levaduras en melazas la relación carbono/nitrógeno debe ser 1:1 para que la productividad celular sea máxima. También la relación fósforo/oxígeno es relevante en lo que refiere a la eficiencia de conversión energética y a la respiración <sup>59</sup>.
  - d. **Aireación:** La ausencia o abundancia de oxígeno permite una selección tanto de microorganismos como de productos del metabolismo. Cuando el cultivo se produce en presencia de oxígeno molecular, la fermentación se denomina aeróbica y cuando éste carece de oxígeno anaeróbica. Si la fermentación es anaeróbica, la mayor parte del carbono se emplea como energía y sólo el 2%

se asimila como material celular. *Saccharomyces cerevisiae* es una levadura que posee alta actividad metabólica, por lo que en un proceso fermentativo en fase aerobia se caracteriza por la producción de biomasa y en fase anaerobia generalmente por la producción de etanol <sup>59</sup>.

- e. **Productividad:** La productividad se define como la producción de biomasa por unidad de volumen, por unidad de tiempo del cultivo; dado en concentración de biomasa (g/L) en función del tiempo (h). Esta depende del diseño del fermentador, ya que afecta la transferencia de oxígeno que se ve reflejada en el rendimiento obtenido al final de la fermentación <sup>52</sup>. Un microorganismo adecuado para su utilización industrial debe producir la sustancia de interés, pero hay muchos otros aspectos a considerar. Es preciso disponer del organismo en cultivo axénico (puro), debe ser genéticamente estable, y debe crecer en cultivo a gran escala <sup>2</sup>.
- f. **Mecanismo de transformación de azúcar en biomasa:** La levadura obtiene la energía a través de dos tipos de metabolismo:
- **Asimilación:** En el cual la levadura toma las sustancias nutritivas que necesita del medio en que se desarrolla.
  - **Desasimilación:** En el cual, se degradan los hidratos de carbono incorporados a la célula. Se distinguen dos formas de desasimilación: la respiración y la fermentación. La respiración se define como un proceso metabólico que conduce a una oxidación total de los hidratos de carbono incorporados bajo formación de dióxido de carbono, agua y energía, generando biomasa. Esta vía se presenta como ruta catabólica de glucosa; la mayoría de las células que convierten glucosa en piruvato pasan al ciclo del ácido tricarbóxico<sup>47</sup>, donde se convierte en dióxido de carbono y agua <sup>42</sup>.

### **Interés de *Saccharomyces cerevisiae* para la investigación en biología y biotecnología.**

Las levaduras son los microorganismos más utilizados en la producción de etanol por la vía fermentativa, debido a que producen un mejor proceso de separación

después de la fermentación, además producen un contenido de toxinas muy inferior a otros microorganismos<sup>98</sup>.

Tal es el caso de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, que bajo condiciones anaerobias reduce el piruvato a etanol con emisiones de CO<sub>2</sub>, obteniéndose un rendimiento estequiométrico teórico de 0.511 g de etanol y 0.489 g de CO, por 1 g de glucosa metabolizada. Sin embargo, se ha observado que a nivel experimental e industrial sólo se alcanza entre el 87% y el 95% del rendimiento teórico para el etanol, ya que esta levadura también utiliza la glucosa en la producción de otros subproductos. No obstante, se prefiere su uso por requerir de menores costos de manejo, ya que la presencia de sacarosa en algunos sustratos no afecta el rendimiento de etanol; asimismo, los subproductos de la fermentación y la concentración a la cual estos se producen no crean efectos colaterales<sup>100</sup>.

En 2012, Kasavi y colaboradores evaluaron cinco cepas de *Saccharomyces cerevisiae* industriales por su sostenibilidad para uso en los procesos de producción de etanol. El crecimiento y el rendimiento de producción de etanol se valoró en diversos residuos agroindustriales incluyendo pasta de azúcar de remolacha, almidón, melaza de remolacha azucarera y residuos biológicos como la zanahoria, tomate y patatas. Unos análisis de componentes principales de los parámetros de fermentación relacionados con el crecimiento y la producción de las cinco cepas cultivadas en glucosa demostraron la superioridad de una de las cepas (Y9) respecto a su rápido crecimiento y los rendimientos más altos de etanol<sup>100</sup>.

Un gran número de referencias han probado que *Saccharomyces cerevisiae* puede remover metales tóxicos, recuperar metales preciosos y destoxificar sistemas acuosos contaminados con materiales radioactivos. Se ha reportado la recuperación de Aluminio empleando como biosorbente a *Saccharomyces cerevisiae*, así mismo se ha demostrado que bajo tratamiento alcalino es capaz de eliminar un gran rango de metales pesados como Fe<sup>3+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Cr<sup>3+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Ni<sup>2+</sup> y Fe<sup>2+</sup><sup>85</sup>.

Dentro de las ventajas de emplear *Saccharomyces cerevisiae* como biosorbente podemos citar las siguientes:

- 1.- Es fácilmente cultivable a gran escala y en medios sencillos, por lo tanto se puede obtener una gran cantidad de biomasa.
- 2.- La biomasa puede ser obtenida de la industria de los alimentos y bebidas. Es sencilla de obtener como subproducto de la industria de la fermentación.
- 3.-Es considerado un microorganismo seguro.
- 4.- Es un microorganismo en el que se puede identificar fácilmente el mecanismo de biosorción, las interacciones microorganismo-metal a nivel molecular.

La determinación de la capacidad de biosorción de metales es frecuentemente basada en el equilibrio que se establece en el sistema de biosorción, el rango de biosorción es “q”, usualmente expresada en miligramos de metal sorbido por gramo de biosorbente <sup>27</sup>. Es importante aclarar que no existe estándar para determinar el peso seco de la biomasa, por ejemplo tiempo y temperatura.

#### **1.24. Inmovilización de microorganismos**

La inmovilización celular puede ser definida como la ubicación física de células en un espacio o región específica, de forma natural o inducida, en la cual son capaces de mantener una actividad catalítica deseada.

Es un evento que se da naturalmente gracias a procesos de adherencia a superficies o a otros microorganismos, debido a estructuras celulares o a sustancias que estos mismos segregan. De forma artificial o inducida, puede darse por atrapamiento en los espacios o poros de fibras y geles, entre muchos <sup>99</sup>.

Bajo muchas condiciones las células inmovilizadas tienen ventajas sobre las células libres y las enzimas inmovilizadas.

El uso de células inmovilizadas permite la operación de biorreactores a velocidades de flujo que son independientes de la velocidad de crecimiento empleadas.



La estabilidad catalítica puede ser mayor para células inmovilizadas que para células libres y algunos microorganismos inmovilizados toleran concentraciones más altas de compuestos tóxicos que su contraparte no inmovilizada <sup>93</sup>.

La inmovilización de microorganismos ha sido estudiada durante las últimas décadas como la solución y el mejoramiento de sistemas de tratamiento de aguas, suelos y aires contaminados.

Algunos de los aspectos más importantes considerados en esta técnica son expuestos a continuación, así como algunas aplicaciones ambientales <sup>100</sup>.

#### **1.24.1. Pre-requisitos para lograr una inmovilización.**

Korkoutas y colaboradores indican que para lograr una inmovilización que sea eficaz para el proceso a realizar, se deben tener en cuenta que los espacios que se usarán como soporte de inmovilización cumplan con ciertos parámetros tales como la presencia de una superficie de adherencia amplia, que sea de fácil operación y regeneración; debe tener buena porosidad con el fin de permitir un intercambio constante de sustratos, productos, gases, etc; debe tener una buena estabilidad química, biológica, mecánica y térmica, así como resistente a enzimas, solventes o cambios de presión <sup>96</sup>.

En cuanto a las células a inmovilizar, afirman que estas deben ser viables y deben mantener un metabolismo activo por periodos largos, así como su metabolismo no debe verse afectado por los procesos de inmovilización <sup>96</sup>.

#### **1.24.2. Ventajas de la inmovilización de células.**

La inmovilización de diferentes microorganismos en diversos soportes que van desde los biodegradables como residuos orgánicos o agroindustriales, hasta aquellos de difícil o nula degradación como plásticos y fibras de vidrio han permitido el interés y el desarrollo de nuevas tecnologías debido a algunas ventajas que presentan como son <sup>103</sup>:

- Concentración de biomasa.
- Actividad metabólica.

- Resistencia a la toxicidad.

### **1.24.3. Concentración de biomasa.**

Algunos estudios han demostrado que en ecosistemas acuáticos, la concentración de biomasa inmovilizada es superior a la encontrada en un sistema donde la biomasa se encuentra libre. Esto posiblemente se deba a que, en los sistemas de agua la biomasa puede ser arrastrada impidiendo que se mantenga o que aumente su concentración <sup>102</sup>.

Sin embargo, Kourkoutas y colaboradores reportan que en la inmovilización de levaduras en perlas de alginato de calcio, la concentración de biomasa adicionada no disminuye, pero tampoco aumenta debido a que las células se encuentran atrapadas impidiendo su crecimiento y reproducción <sup>93</sup>.

En la inmovilización de microalgas en perlas de alginato, la concentración de biomasa también se ve controlada, esto debido a que el espacio dentro de la perla no permite un aumento en la densidad celular; también explican como en este caso la cantidad de luz que sea capaz de pasar a través de la perla será un factor indispensable para el incremento de la biomasa, así como la cantidad de nutrientes disponibles para las microalgas <sup>102</sup>.

### **1.24.4. Métodos de Inmovilización Reversible**

En el método de inmovilización reversible, las enzimas inmovilizadas pueden ser desprendidas del soporte bajo condiciones no extremas. El uso de métodos reversibles para la inmovilización de enzimas es altamente atractivo, principalmente por razones económicas debido a que el soporte puede regenerarse y recargarse con enzimas nuevas cuando la actividad enzimática decae. Existen distintos métodos de inmovilización reversible, que a continuación se describen <sup>101</sup>.

#### **Por adsorción**

El método de adsorción emplea soportes orgánicos o inorgánicos que presentan un adsorbente activo (monocapastiol auto ensambladas, oro, entre otros) en los cuales, las enzimas son atraídas y retenidas por medio de interacciones iónicas o

fuerzas débiles (puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas). Este método consiste en poner en contacto la enzima en solución acuosa con un soporte adsorbente por un lapso de tiempo dado (2-48 h), para después lavar el soporte y eliminar la enzima que no fue inmovilizada. Presenta la ventaja de mantener intacta la actividad de la enzima, ya que la unión es débil y no afecta su conformación, sin embargo, esta característica hace que al mismo tiempo la unión sea reversible y sensible a cambios de pH y temperatura <sup>94</sup>.

#### **Adsorción no específica.**

El método de inmovilización reversible más simple es la adsorción no específica, el cual se basa en la adsorción física o enlace iónico. En la adsorción física las enzimas son unidas a la matriz a través de puentes de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, o interacciones hidrofóbicas; mientras que enlaces iónicos de enzimas son producidos a través de uniones con sales. La naturaleza de las fuerzas involucradas en la inmovilización no covalente resulta en un proceso que puede ser reversible cambiando las condiciones que influyen en la resistencia de la interacción (ej. pH, resistencia iónica, temperatura y polaridad del solvente). La inmovilización por adsorción es fácil de realizar y usualmente preserva la actividad catalítica de la enzima. Dichos métodos son, por lo tanto, atractivamente económicos, pero pueden presentar problemas como la liberación de enzimas cuando las interacciones son relativamente débiles. De igual forma es difícil encontrar condiciones bajo la cuales las enzimas permanecen enlazadas fuertemente y activas <sup>94</sup>.

#### **Adsorción hidrofóbica.**

Otro método es el uso de interacciones hidrofóbicas, donde la adsorción hidrofóbica ha sido utilizada como un principio cromatográfico por más de 3 décadas. Consiste en variables experimentales conocidas como el pH, concentración de sales, y la temperatura. La resistencia de las interacciones radica en la hidrofobicidad del adsorbedor y de la proteína. La hidrofobicidad del adsorbedor puede ser regulada por el grado de sustitución del soporte y por el tamaño de la molécula ligante hidrofóbica. El éxito de la inmovilización reversible de la  $\beta$ -amilasa y amiloglucosidasa en soportes de hexilagarosa ha sido

reportada. Muchos otros ejemplos de enlace reversible con adsorbedores hidrofóbicos ha sido también mostrado en la literatura <sup>94</sup>.

### **Quelación o enlace metálico.**

Sales de metales de transición o hidróxidos depositados en la superficie de soportes orgánicos han podido ser enlazados gracias a la coordinación de los grupos nucleofílicos en la matriz. Se utilizan principalmente sales de titanio y circonio, siendo este método conocido como inmovilización por enlace metálico. La sal metálica o el hidróxido es precipitado en el soporte (ej. celulosa, quitina, ácido algínico y bases de sílice) por calentamiento o neutralización. Debido a los factores estéricos es posible para la matriz ocupar todas las posiciones de coordinación del metal, por lo tanto, algunas de las posiciones permanecen libres para coordinarse con grupos de enzimas <sup>96</sup>.

La elusión de proteínas enlazadas puede ser fácilmente lograda por competencia con ligantes solubles o disminuyendo el pH. El soporte es subsecuentemente regenerado lavándolo con un fuerte quelante como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Estos soportes metálicos han sido utilizados ampliamente en cromatografía de proteínas <sup>96</sup>.

### **Formación de enlaces disulfuro.**

Estos métodos son únicos, porque, aunque se forma un enlace covalente estable entre la matriz y la enzima, es posible que se rompan los enlaces por medio de una reacción utilizando agentes apropiados como el ditioneitol (DTT) bajo suaves condiciones. Además, debido a que la reactividad de los grupos tiol pueden ser modulados mediante la alteración del pH, la actividad es alta para métodos que usan enlaces disulfuro, con la condición de que el apropiado tiol adsorbente con alta especificidad sea utilizado <sup>98</sup>.

**Puntos críticos.** Cabe mencionar que, aunque la inmovilización sea dirigida a un sitio por un método específico, los enlaces químicos y las interacciones entre la enzima y el soporte son complejos, y un método de estabilización único no asegura que las interacciones sean 100% propias del método. La estabilidad de proteínas globulares en una matriz generalmente depende de las interacciones

electrostáticas, interacciones estéricas, cambios en el estado de hidratación y reacomodos en la estructura de la proteína, además, dicha estabilidad es determinada por la combinación de fuerzas electrostáticas globales e interacciones locales específicas. Las fuerzas electrostáticas globales tienen efecto directo en la adsorción de la enzima, y el pH del medio altera el grado de influencia de estas fuerzas electrostáticas, en especial la interacción proteína-sustrato <sup>97</sup>.

En lo que concierne a la mejora de la estabilidad de enzimas han surgido dos conceptos fundamentales, el primero indica que al restringir el movimiento de los segmentos en las cadenas de la proteína se reduce la probabilidad de un cambio estructural irreversible; el segundo, un cambio similar irreversible en la estructura de la proteína ocurre por el choque de los segmentos con la superficie en la que la enzima es inmovilizada o adsorbida <sup>98</sup>.

En algunos casos cuando se estabiliza una enzima por inmovilización, un cambio estructural irreversible puede ser prevenido restringiendo el movimiento de los segmentos al encerrar la enzima en cavidades estrechas. Un tamaño de poro similar al tamaño de la enzima es más apropiado para obtener una buena actividad. Un alto rendimiento en la estabilización puede ser logrado al añadir azúcares a la enzima en solución, ya que estos pueden contribuir a mantener la estructura tridimensional de la proteína, lo que es crucial para su actividad; además el tipo y la cantidad de azúcar utilizado en la estabilización es determinante para generar una alta actividad catalítica <sup>96</sup>.

## CAPITULO II

### 2. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 2.1. Materiales.

✓ **Material biológico.**

- Cepa *Saccharomyces cerevisiae*

✓ **Material de laboratorio.**

- Asa de Kohle, beakers 50, 100, 250, 500, 1000 mL, bagueta, cámara de Neubauer, celdas de cuarzo, crisoles, espátula, frascos de vidrio 50, 300, 1000 mL, luna de reloj, matraces 100, 250, 500, 1000 mL, micropipetas 0.5-50, 20-200, 100-1000 uL, pipetas 1, 5, 10 mL, placas Petri, tips blancos, amarillos y azules, tubos Falcon, tubos Eppendorf.

✓ **Insumos y reactivos.**

- Acetato de sodio anhidro, Acetona, Ácido clorhídrico, Ácido sulfúrico, Alginato de sodio, agar agar, agar citrato Simmons, agar PDA, agar TSI, agua destilada, Cloruro de calcio, Cloruro de sodio, Dextrosa, Dicromato de potasio, Difenilcarbazida, extracto de levadura, extracto de malta, Hidróxido de sodio, medio PDA, medio Sabouraud, medio YPD, Sulfato de amonio, tinción Gram.

✓ **Equipos e instrumentación:**

- Balanza analítica marca KERN® modelo ABS 220 4N, baño maría marca J.P. SELECTA® modelo 6000138, cámara de flujo laminar marca BIOAIR®, cámara de siembra marca BIOAIR® modelo AURA HZ-72, espectrofotómetro marca Mono Feixe® modelo BIOSPECTRO SP-22, estufa marca J.P. SELECTA® modelo 2000207, horno marca J.P. SELECTA® modelo 2000210, pHmetro marca HANNA® modelo pH 213.

## 2.2. Metodología.

La metodología del presente trabajo de investigación se desarrolló en los laboratorios H-302 y H-103 de la Universidad Católica de Santa María.

### a) **Recolección de muestras y caracterización**

#### - **Recolección de muestra de Industria Cervecera**

Se recolecto residuos líquidos post fermentativos de la industria de cervecera ubicada en el distrito de Cerro Colorado, ciudad de Arequipa, para ello se utilizaron 3 frascos de vidrio de 250 mL de capacidad, donde se recolectó 3 muestras de 100 mL, previo a la etapa de filtrado, luego cada uno de los frascos fueron debidamente rotulados con el nombre de la muestra, hora y fecha de recolección, para luego almacenarlos hasta su posterior uso en el aislamiento de cepas.

#### - **Recolección de muestra de Industria Curtiembre**

Se recolectaron muestras de la industria curtiembre ubicada en el distrito de Cerro Colorado, ciudad de Arequipa. Con el equipo necesario de protección personal como guantes de latex y barbijo, se recolectó 3 muestras en botellas de plástico de 3 L de capacidad, para ello se encebieron las botellas enjuagándolas 3 veces con la muestra de curtiembre, llenándolas al ras evitando la formación de burbujas, luego fueron rotuladas con el nombre de la muestra y fecha de recolección.

Posteriormente las muestras fueron sometidas a las siguientes pruebas:

**pH:** Se colocó 50 mL de la muestra en un beaker de 250 mL, en el cual se introdujo el electrodo de vidrio de un pHmetro previamente calibrado.

**Plomo, Cadmio y Cromo:** Se determinó mediante espectrofotometría de absorción atómica, con corrector de lámpara de deuterio y atomizador electrotérmico de horno de grafito.

**b) Aislamiento y caracterización de *Saccharomyces cerevisiae*.**

A partir de las muestras tomadas de la industria cervecera, una vez homogenizadas mediante agitación, se tomó una alícuota de 1 mL y se procedió a inocular en medio de cultivo YPD, el cual se incubó durante 24 horas a 37°C. Finalizado este período, se procedió a examinar macroscópicamente las colonias que mostraron crecimiento en el medio, seleccionando aquellas que presentaron características propias de *Saccharomyces cerevisiae*.

Posteriormente se procedió a realizar repiques de las distintas colonias seleccionadas, sembrándolas en placas de medio YPD estéril e incubando durante 48 horas a 37°C.

Transcurrido este tiempo, se llevó a cabo la caracterización microscópica de las colonias desarrolladas, para esto se realizó un frotis de cada colonia representativa sobre una lámina portaobjetos, y se realizó la tinción de Gram sobre cada una de las láminas. Se procedió a observar en el microscopio con el objetivo de 100x. Posterior a la observación de su morfología microscópica, se realizó su caracterización bioquímica, mediante la siembra de las cepas representativas en las pruebas bioquímicas:

- Agar SIM: Determinación de la movilidad, producción de indol y ácido sulfhídrico.

La cepa aislada se sembró por punción y se llevó a incubar de 24-48 h a 37°C.

- Prueba OF: Determinación del metabolismo fermentativo u oxidativo.

La cepa aislada se sembró en 2 tubos (aerobiosis y anaerobiosis) por punción y se llevó a incubar de 24-48 h a 37°C



- Triple Azúcar Hierro (TSI): Determinación del metabolismo fermentativo de azúcares; glucosa, sacarosa y lactosa, producción de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y ácido sulfhídrico ( $\text{H}_2\text{S}$ ).  
La cepa aislada se sembró por punción y se extendió sobre la superficie del medio. Se llevó a incubar de 24-48 h a  $37^\circ\text{C}$ .
  
- Úrea: Determinación de actividad ureásica, capacidad para hidrolizar úrea.  
La cepa aislada se sembró sobre la superficie del medio por estría y se llevó a incubar de 24-48 h a  $37^\circ\text{C}$ .
  
- Citrato de Simmons: Determinación de la capacidad de la cepa para emplear el citrato como fuente de carbono.  
La cepa aislada se sembró sobre la superficie del medio por estría y se llevó a incubar de 24-48 h a  $37^\circ\text{C}$ .
  
- Gelatina: Determinación de producción de la enzima gelatinasa, encargada de degradar las proteínas para el consumo de la cepa.  
Se incubó la cepa aislada con 12% de gelatina de 24-48 h a  $37^\circ\text{C}$  y se hizo enfriar para comprobar la formación del gel.

**c) Adaptación y evaluación de la tolerancia de la cepa a soluciones de Cromo (VI).**

Se colocó en frascos de vidrio, caldo YPD el cual fue suplementado con concentraciones conocidas de Cromo (VI), a partir de una solución stock de 1000 mg/L de Dicromato de potasio, como se aprecia en la Tabla N°7, con un volumen total de 50 mL. Luego se inoculó cada uno de los frascos con 10 mL de cepa a una concentración de  $10^8$  UFC/mL, posteriormente los frascos se llevaron a incubación durante 48 horas, dentro de las cuales se tomó muestras de 1 mL para determinar el crecimiento de la cepa con respecto al tiempo. Finalizado el tiempo se evaluó el crecimiento de las cepas mediante conteo en cámara de Neubauer, agregándole una alícuota de la muestra.

**Tabla N° 7: Tratamientos de Cromo (VI) a diferentes concentraciones sobre *Saccharomyces cerevisiae***

<b>Tratamiento (mg/L)</b>	<b>Volumen Medio YPD (mL)</b>	<b>Volumen stock <math>K_2Cr_2O_7</math> 1000 mg/L (mL)</b>
0	50.0	0.0
50	47.5	2.5
100	45.0	5.0
200	40.0	10.0
400	30.0	20.0
500	25.0	25.0
600	20.0	30.0

**Registro de Investigación.**

**d) Determinación de la cinética de crecimiento de la cepa.**

Para la determinación de la cinética de crecimiento de la cepa, se preparó un frasco de 500 mL de capacidad, con 400 mL de medio YPD previamente esterilizado en autoclave por 15 minutos a 121°C y 1.5 Bar, suplementado con la concentración de Cromo (VI) que tolera la cepa, determinada en la adaptación de la misma. Se tomaron muestras de 10 mL cada 4 horas durante 3 días para determinar las distintas fases de crecimiento de la cepa. Para determinar la curva de crecimiento se llevó a cabo la cuantificación celular en la cámara de Neubauer, con un aumento de 40x, colocando una alícuota de la muestra con ayuda de una micropipeta, así como también se midió la densidad óptica en un espectrofotómetro UV–visible a 600 nm de longitud de onda, en celdas de cuarzo de 1 cm de paso óptico, empleando como blanco medio de cultivo estéril.

**e) Diseño y construcción del sistema batch para la producción de biomasa.**

Para la producción de biomasa se construyó un sistema batch de 4 L de capacidad, se colocó 3 puertos en la tapa del frasco, el primero para la toma de muestra, con una medida de 19.2 cm de longitud introducida en el frasco y una jeringa de 20 mL de capacidad; el segundo puerto de 6.4 cm de longitud se empleó como escape de gases, compuesto por un filtro de jeringa que posee una membrana de 0.45  $\mu$ m y

finalmente se colocó un puerto de inoculación de 12.8 cm de longitud. Para todos los puertos se empleó tubería de vidrio de 6 mm de diámetro a cuyos extremos se acopló mangueras del mismo diámetro. Se colocó 3.5 L de medio YPD estéril en el frasco de vidrio cuya cepa fue evaluada, y posteriormente se inoculó el medio con 10 mL de medio YPD a una concentración de 600 mg/L con crecimiento de cepa. Se incubó el sistema durante 2 días. Finalizado este tiempo se procedió a la cosecha de la biomasa desarrollada, retirando un volumen de 3 L del frasco correspondiente a 300 g de biomasa seca. Se almacenó este volumen en refrigeración. Posterior a la cosecha, se procedió a la renovación de sustrato para continuar con el crecimiento de la cepa (0.5 L) residual en el frasco, para esto se colocó 3 L de sacarosa a una concentración de 25 g/L para acelerar la producción de biomasa. Se llevó a cabo este procedimiento hasta la obtención del volumen necesario de biomasa para su aplicación en el posterior biorreactor flujo pistón.

**f) Inmovilización de la biomasa mediante gelificación en agar agar.**

Se inmovilizó la biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* obtenida en el sistema batch. Se determinó el volumen teórico del sistema, mediante la siguiente fórmula:

$$V = \pi \cdot r^2 \cdot h$$

Donde:

V: volumen.

$\pi$ : Constante pi.

r: radio.

h: altura.

Dicha fórmula se empleó para obtener el volumen total teórico del sistema PFTR, el cual fue de 38 litros.

Se preparó una solución de agar agar a una concentración de 7.6%, calentando a ebullición la solución para la completa disolución del agar. Posteriormente se procedió al enfriamiento de éste hasta una temperatura de 40°C, se adicionó el mismo volumen preparado de biomasa, llevando la concentración del agar a 3.8%. Una vez llevada a cabo la mezcla con la biomasa, se homogenizo y con ayuda de una jeringa de 20 mL, se recolectó la mezcla y se agregó gota a gota en una probeta

de 500 mL de capacidad, la cual contenía aceite que previamente fue refrigerado, para permitir la formación y estabilización de pellets. Finalizada la adición de la mezcla en el aceite, se procedió al lavado de los pellets con detergente y agua destilada. Se repitió dicho procedimiento hasta la obtención de un volumen de 18 de dichos pellets. Finalmente se almacenó los pellets obtenidos en refrigeración para su posterior uso.

**g) Diseño y construcción del biorreactor flujo pistón (PFTR).**

Para la construcción del biorreactor flujo pistón (PFTR), se empleó los siguientes materiales:

Se utilizó un tubo de plástico (PVC) de 3 metros de longitud por 3 pulgadas de diámetro, 6 tapones de plástico de 3 pulgadas de diámetro, 2 llaves de paso de agua, 1 tubo de agua de 170 cm de longitud por 1 pulgada de diámetro, 5 unidades de cinta teflón, 3 codos de plástico de 1 pulgada de diámetro, un pote de pegamento para PVC color rojo, 3 uniones de PVC de 1 pulgada de diámetro, 1 reductor de 1 pulgada a media, 1 tubo de media pulgada de 5 cm de longitud.

Procedimiento para la construcción de biorreactor flujo pistón:

El tubo de plástico de 3 pulgadas de diámetro fue cortado en 3 piezas de 1 metro de longitud.

Luego de la misma manera el tubo de agua de 1 pulgada de diámetro fue cortado en 10 piezas de 15 centímetros de longitud cada uno, los cuales fueron tarrajeados en sus extremos para ser unidos con las piezas de codos de plástico.

A los tapones de plástico se les hizo un agujero de 1 pulgada de diámetro en el centro de los mismos. Los codos y los tubos de plástico de 1 pulgada de diámetro fueron unidos debidamente utilizando el teflón y el pegamento lo mismo que las llaves de paso.

En los extremos libres de los tubos de 1 pulgada debidamente tarrajeados, fueron aseguradas los tapones reforzados con tuercas elaboradas con las uniones, tanto interna como externamente utilizando siempre teflón y pegamento.

Los extremos de los tubos de 3 pulgadas de diámetro fueron tapados con los tapones en ambos extremos.

Al final de los extremos de una de las llaves de paso se colocó el reductor de 1 pulgada y media y el tubo de media pulgada.

**h) Evaluación de remoción de Cromo (VI) en aguas sintéticas en el biorreactor flujo pistón (PFTR).**

Para conocer la concentración de Cromo (VI) de cada una de las muestras. Se empleó como solución stock de Cromo, una solución de Dicromato de potasio, también se determinó el efecto que posee el agar sobre la remoción del Cromo (VI), para ello se realizó una prueba donde se empleó únicamente pellets de agar, sin poseer la cepa inmovilizada, bajo las mismas condiciones de trabajo.

Se evaluó la concentración de Cromo (VI), tomando una muestra de agua sintética a la salida del biorreactor flujo pistón, poniendo como intervalo entre dichas muestras un tiempo de residencia de 1 hora. Luego se procedió al análisis de la cantidad de cromo residual mediante el método de Difenilcarbazida, para lo cual se colocó 25 mL de la muestra en un tubo Falcón y se añadió 1.25 mL de Difenilcarbazida. Se dejó reposar durante 10 minutos y se efectuó la lectura a 540 nm en el espectrofotómetro. Este proceso se realizó por triplicado.

Para la determinar la linealidad del método espectrofotométrico de detección, se construyó una curva de calibración con concentraciones conocidas de cromo, desde los 0 mg/L hasta los 600 mg/L, en intervalos de 100 mg/L. Para la determinación de la precisión del método, se realizó las lecturas por triplicado, determinando el promedio, desviación estándar y coeficiente de variación. Para la determinación de la exactitud, se evaluaron 3 muestras de concentraciones conocidas, leídas por triplicado, y determinando sus concentraciones. Se adicionó un patrón de 100 mg/L, donde se realizó una lectura final y se evaluó el porcentaje de recuperación.

$$\text{Porcentaje de Recuperación} = \frac{Y - X_i}{X_o} \times 100$$

Donde:

Y: Concentración de muestra y patrón

Xi: Concentración inicial

Xo: Concentración final

**i) Evaluación de remoción de Cromo (VI) en efluentes curtiembres en el biorreactor flujo pistón (PFTR).**

Finalmente se procedió a evaluar el sistema con aguas provenientes de la industria curtiembre. Se tomó muestras en la salida del segundo PFTR finalizando el tiempo de residencia el cual fue de 1 hora en nuestro sistema.

Para determinar la concentración final de Cromo (VI), mediante absorbancia con el método de Difenilcarbazida previamente descrito. Se determinó el efecto que posee el agar sobre la remoción del Cromo (VI), para ello se realizó una prueba donde se empleó únicamente pellets de agar, sin poseer la cepa inmovilizada, bajo las mismas condiciones de trabajo.

Se caracterizó las muestras inicialmente determinando su pH mediante el uso de un pHmetro, colocando 100 mL en un beaker de 250 mL, y se determinó la concentración de cromo de cada muestra empleando el método de determinación de Difenilcarbazida. Se colocó 25 mL de la muestra en un tubo Falcon y se añadió 1.25 mL de Difenilcarbazida. Se dejó reposar durante 10 minutos y se efectuó la lectura a 540 nm en el espectrofotómetro. Se construyó una curva de calibración con concentraciones conocidas de cromo, desde los 0 mg/L hasta los 600 mg/L, en intervalos de 25 mg/L.

## CAPITULO III

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Recolección y caracterización de muestras:

La Fig. 11 muestra la ubicación geográfica de la industria curtiembre donde se obtuvo las muestras, ubicada en el distrito de Cerro Colorado, perteneciente a la Asociación de Pequeñas y Microempresarios de Curtiembres y Derivados de Arequipa. (Latitud: -16.391394, Longitud: -71.580642).



**Figura 11 : Mapa del lugar de muestreo**

### Registro de Investigación.

En el caso de la muestra de efluente curtiembre, se recolectó las muestras previamente homogenizadas en un recipiente (Fig. 12), las cuales fueron caracterizadas con ensayos fisicoquímicos cuyos resultados estan descritos en la tabla N°8:

La Tabla N°8 indica los resultados de los parámetros evaluados. El valor de pH es ácido, esto debido al empleo de compuestos ácidos en las etapas previas al curtido, como el pelambre y el piquelado. La completa ausencia de metales pesados adicionales al cromo, representa un factor beneficioso para el tratamiento de estos efluentes y para su reutilización.

**Tabla N° 8 : Caracterización de las muestras de efluente curtiembre.**

Parámetro	Valor
Color	Azul verdoso
Olor	Acre/rancio
pH	3.7
Plomo	No detectado
Cadmio	No detectado
Cromo	529.35 mg/L

### Registro de Investigación

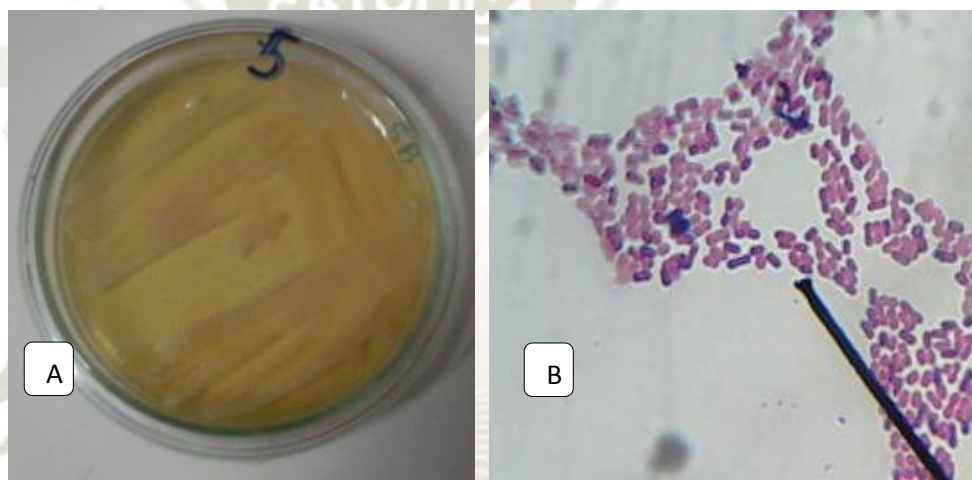


**Figura 12 : Recolección de muestra de curtiembre  
Registro de Investigación.**



- **Aislamiento y caracterización de *Saccharomyces cerevisiae*.**

En la Fig.13 A, se observa la formación de colonias que presentan bordes irregulares, color crema y una textura cremosa. A su vez, en la Fig. 13 B, se muestra las características microscópicas realizadas con tinción Gram con lente de aumento 100x, donde se aprecia la morfología redondeada de las células, debido a su pared celular que retiene los colorantes cristal violeta y safranina, dándole un color violeta oscuro a las células indicándonos que es Gram + . Estos resultados macroscópicos y microscópicos, coinciden con las investigaciones llevadas a cabo por Garzón y Hernández en 2009.



**Figura 13 A, B: Crecimiento en medio YPD (A) y micrografía con microscopio con lente 100x de *S. cerevisiae* (B).**

#### **Registro de Investigación.**

- **Caracterización por pruebas bioquímicas de la cepa *Saccharomyces cerevisiae***

En la Tabla N°9, se presenta los resultados obtenidos en el proceso de identificación bioquímica de las colonias aisladas, donde dichos resultados coinciden con los trabajos de Matiz (2000), quien permite corroborar que la cepa en estudio se trata de *Saccharomyces cerevisiae*, debido al metabolismo que presentó como resultado a las pruebas bioquímicas.

**Tabla N° 9 : Resultados de la identificación bioquímica de *Saccharomyces cerevisiae***

Tratamiento	Pruebas bioquímicas	Resultados
<i>S. cerevisiae</i>	SIM	Indol (-) Motilidad (-) H <sub>2</sub> S (-)
	Citocromo Oxidasa (OF)	Negativo
	TSI	K/A Co <sub>2</sub> (+) H <sub>2</sub> S (-)
	Urea	Negativo
	Citrato Simmons	Positivo
	Gelatina	Positivo

**Registro de investigación**

En las pruebas realizadas, se observa el metabolismo de la cepa *S. cerevisiae*. En la prueba SIM en la Fig. 14, se aprecia que el medio no presenta coloración oscura; por lo cual se determina que la cepa no es productora de ácido sulfhídrico debido a la nula reacción con el tiosulfato de sodio del medio. Además, al presentar crecimiento en la punción de siembra, se determina que la cepa no posee movilidad, ya que la consistencia del medio, al ser semisólido, permite detectar el crecimiento mediante el enturbiamiento del mismo, difundiéndose más allá de la punción. Finalmente se determinó que la cepa es Indol negativo, ya que al adicionar el reactivo de Kovac's no se obtiene variación en el color, esto significa que la cepa no metaboliza tripteína como fuente de nitrógeno para obtener indol. Estos resultados son referenciados por Ewing en 1986 y por Holy y Stanley en 1994, caracterizando bioquímicamente cepas distintas de levaduras, entre las cuales se encontraba *S. cerevisiae*.



**Figura 14: Prueba bioquímica SIM  
Registro de Investigación**

En la Fig. 15 se aprecia que la cepa no posee la enzima citocromo oxidasa, debido al cambio de coloración en el medio Hugh Leifson, de color verde a color azul, así como también la presencia de color amarillo en el pico del medio, lo que indica que la cepa posee un metabolismo fermentativo. En el medio de cultivo, el agregado de una alta concentración de un determinado hidrato de carbono, hace que los microorganismos utilicen para su desarrollo dicha sustancia, evitando que bacterias aeróbicas utilicen la tripteína presente con la consecuente producción de reacción alcalina, la que se neutraliza por la ligera acidez producida por un microorganismo oxidativo. El Fosfato dipotásico agrega capacidad reguladora, el cloruro de sodio mantiene el balance osmótico, y el azul de bromotimol es el indicador de pH que vira al color amarillo en medio ácido. El contenido de agar, da la propiedad de ser un medio semisólido, y permite determinar la movilidad y la distribución de los productos ácidos en el medio de cultivo. La glucosa es el hidrato de carbono más frecuente que se agrega al medio basal O.F. Por oxidación o fermentación de un determinado hidrato de carbono, se acidifica el medio y el indicador de pH vira del color verde al amarillo.



**Figura 15 : Prueba bioquímica OF**  
**Registro de Investigación**

En la Fig.16 se aprecia una pigmentación amarillenta en la base y zona central del medio, lo que nos indica que la cepa es capaz de emplear los azúcares glucosa y sacarosa, lo que no ocurriría con la lactosa ubicada en la parte superior del tubo, donde no ocurrió ningún cambio de coloración, asimismo se apreció ruptura del medio, causada por la producción de dióxido de carbono por parte de la cepa, como producto de la fermentación. En el medio de cultivo, el extracto de carne y la pluripectona, aportan los nutrientes adecuados para el desarrollo bacteriano. La lactosa, sacarosa y glucosa son los hidratos de carbono fermentables. El Tiosulfato de sodio es el sustrato necesario para la producción de ácido sulfhídrico; el sulfato de hierro y amonio es la fuente de iones  $Fe^{+3}$ , los cuales se combinan con el ácido sulfhídrico y producen sulfuro de hierro, de color negro. El rojo de fenol es el indicador de pH mientras el Cloruro de sodio mantiene el balance osmótico. Por fermentación de azúcares, se producen ácidos, que se detectan por medio del indicador rojo de fenol, el cual vira al color amarillo en medio ácido. El Tiosulfato de sodio se reduce a sulfuro de hidrógeno el que reacciona luego con una sal de hierro proporcionando el típico sulfuro de hierro de color negro.



**Figura 16 : Prueba bioquímica TSI**

**Registro de Investigación**

En la Fig. 17 se apreció que no hubo un cambio de color en el medio, confirmando que esta cepa no posee dicha enzima en su metabolismo. En el medio de cultivo, la tripteína y la glucosa, aportan los nutrientes para el desarrollo de microorganismos. El Cloruro de sodio mantiene el balance osmótico, y el rojo de fenol es el indicador de pH. Algunas bacterias hidrolizan la urea por medio de la enzima ureasa liberando amoníaco y dióxido de carbono. Estos productos alcalinizan el medio haciendo virar el rojo de fenol del amarillo al rojo. En este medio, la fermentación de la glucosa activa la enzima ureasa, acelerando la velocidad del metabolismo en aquellos organismos que hidrolizan lentamente la urea



**Figura 17 : Prueba bioquímica Urea**

**Registro de Investigación**

En la Fig. 18 se apreció que hubo un cambio de color en el medio, tornándose de color azul en el pico, lo que indica que la cepa posee la enzima citrato permeasa en su metabolismo. El metabolismo del citrato (presente en el medio como única fuente de carbono) se realiza en aquellas cepas que poseen la enzima citrato permeasa, a través del ciclo del ácido tricarboxílico. El desdoblamiento del citrato genera progresivamente, oxalacetato y piruvato, siendo este último empleado como fuente de carbono, produciéndose carbonatos y bicarbonatos alcalinos. Debido a la presencia de colorante azul de bromotimol, el medio vira a color azul, gracias a la alcalinidad del mismo.



**Figura 18 : Prueba bioquímica Citrato de Simmons**

**Registro de Investigación**

En la Fig. 19 se determinó que posee la enzima gelatinasa al degradar ésta el colágeno aportado por la gelatina, presente en el medio, apreciable mediante la licuefacción de la misma, causando ruptura y desestabilización de la misma en el tubo. La prueba de licuefacción de gelatina se utiliza como medio de cultivo gelatina nutritiva, en esta prueba se pretende determinar la capacidad de un microorganismo de producir enzimas de tipo proteolíticas (gelatinasas) que licuan/hidrolizan la gelatina o muestran cambios característicos debido a los productos de degradación. La gelatina como proteína derivada del colágeno animal es hidrolizada por la gelatinasa en sus aminoácidos constituidos, con pérdida de sus características gelificantes. La peptona y el extracto de carne proporcionan los nutrientes necesarios para el desarrollo de los microorganismos



**Figura 19 : Prueba bioquímica Gelatina**

**Registro de Investigación**

### 3.2. Adaptación y evaluación de la tolerancia de la cepa a soluciones de Cromo (VI).

En el proceso de adaptación, se determinó que la cepa toleró una concentración de 600 mg/L luego de pasar por concentraciones menores con crecimiento adecuado, este resultado contrasta con lo estudiado por Mejía en el año 2000, donde se evaluó la resistencia y adaptación a metales pesados de una cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, obteniendo como mayor valor en Cromo (VI), un total de 480 mg/L. Cabe resaltar que dicho valor es superior al obtenido por Navarro en el 2005, donde se logró una adaptación aproximada a 250 mg/L, y a la obtenida por Cañizares en 1995, donde adaptó con éxito la cepa a 150 mg/L. Otero en 2008, asegura que la cepa, por medio de este tipo de adaptación, podría alcanzar una tolerancia de hasta 1000 mg/L. En la Tabla N° 10 se evidencia que no ha variación significativa en el crecimiento de cepa (UFC) al aumentar las concentraciones de Cromo (VI) una vez que obtiene las 48 horas de incubación

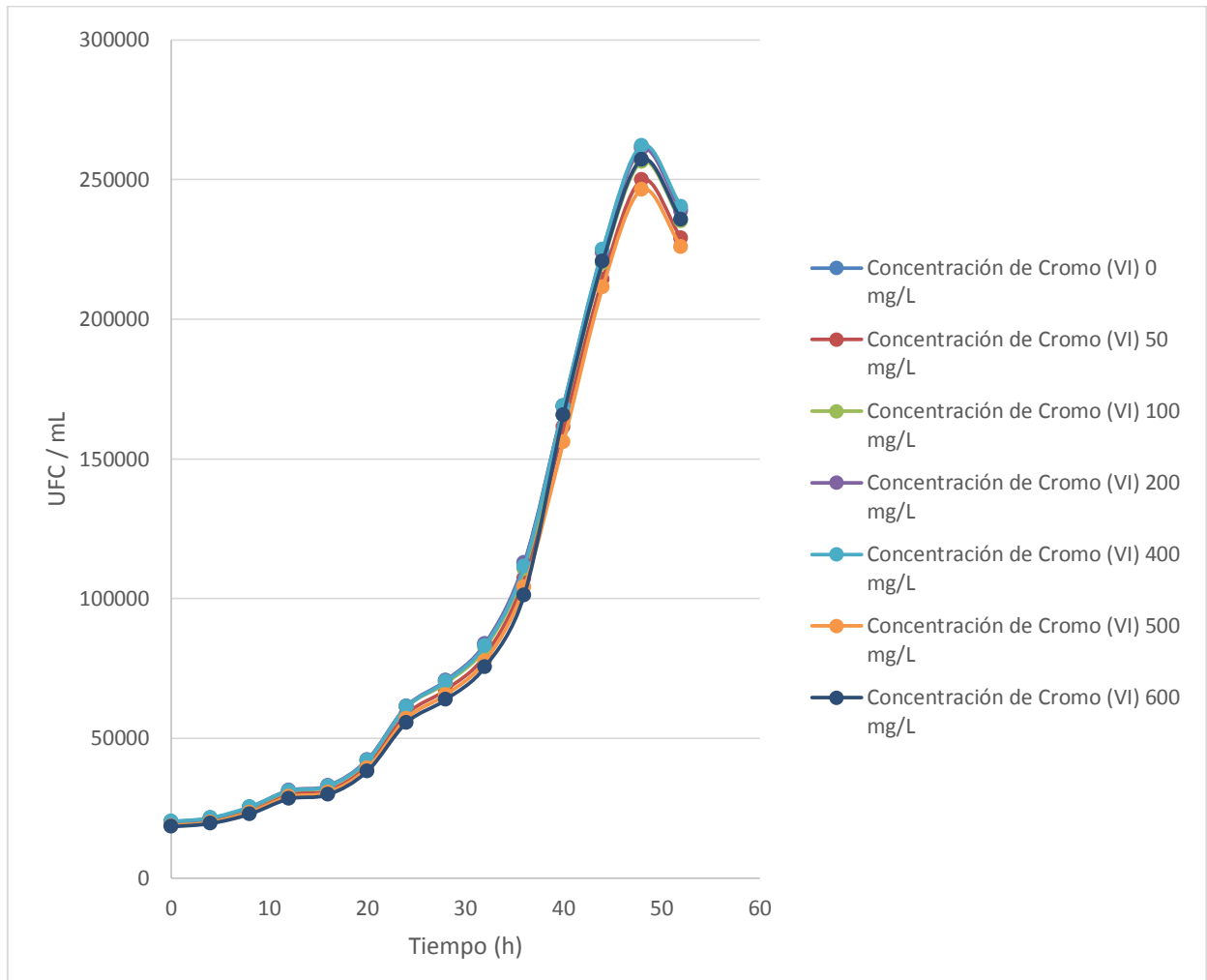
**Tabla N° 10 : Promedio de crecimiento máximo alcanzado a 48 horas de incubación**

<b>Concentración Cromo (VI) (mg/L)</b>	<b>UFC/mL <math>\bar{X}</math></b>
0	261631
50	249789
100	256397
200	260864
400	262097
500	246371
600	257117

#### **Registro de Investigación**



En la Fig. 20 se aprecia la adaptación de la cepa a distintas concentraciones de Cromo (VI), donde se puede observar que al incrementar la concentración se logra un crecimiento de la cepa sin variación significativa en su punto más alto de crecimiento (48 horas).



**Figura 20 : Adaptación de *S. cerevisiae* a diferentes concentraciones de Cromo (VI)**

**Registro de investigación**

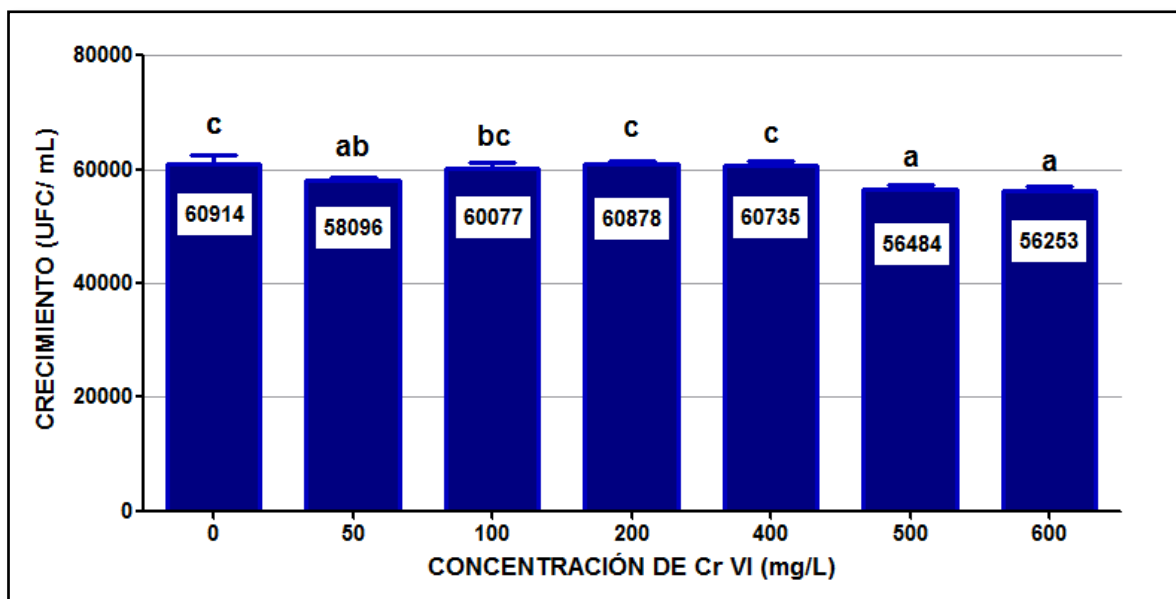
En la Tabla N° 11 se muestra el promedio y la desviación estándar del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, en cultivo de medio YPD determinado mediante recuento en cámara de Newbauer, presentándose un aumento en el crecimiento, desde un recuento inicial de 20 031 UFC/mL hasta 168 998 UFC/mL a 0mg/L de Cromo (VI), y 18 351 UFC/mL hasta 165 576 UFC/mL a 600 mg/L de Cromo (VI) a las 40 h de evaluación, seguido por un descenso en su crecimiento desde el siguiente recuento.

**Tabla N° 11 : Adaptación de *Saccharomyces cerevisiae* en cultivo de medio YPD determinado mediante recuento en cámara de Newbauer a 600 mg/L de Cromo (VI)**

CRECIMIENTO UFC/mL						
CONCENTRACION	0 (h) $\bar{X} \pm SD$	8 (h) $\bar{X} \pm SD$	16 (h) $\bar{X} \pm SD$	24 (h) $\bar{X} \pm SD$	32 (h) $\bar{X} \pm SD$	48(h) $\bar{X} \pm SD$
600 mg/L	18351.00 $\pm 223.24$	22845.67 $\pm$ 254.86	29829.00 $\pm 332.45$	55575.00 $\pm$ 751.24	75513.67 $\pm 1021.60$	165576.67 $\pm 2834.10$

**Registro de Investigación**

La Fig. 21 muestra la prueba de especificidad de Tukey en la que se presentan tres grupos estadísticamente homogéneos (a, b, c), siendo el crecimiento mayor de *Saccharomyces cerevisiae* para las concentraciones de 0, 200 y 400 mg/L (c), mientras que el menor crecimiento se presentó en las concentraciones de 500 y 600 mg/L (a) de Cromo (VI) a partir de  $K_2Cr_2O_7$  pudiendo concluir que la cepa presenta mayor tolerancia al Cromo (VI) a concentraciones menores, pero pudiendo adaptarse a concentraciones mayores.



**Figura 21 : Crecimiento vs Concentración**  
**Registro de Investigación.**

### 3.3. Determinación de la cinética de crecimiento de la cepa.

En la Tabla N° 12 se muestra el promedio y la desviación estándar del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, en cultivo de medio líquido YPD determinado mediante recuento en cámara de Newbauer en intervalos de cada 4 h hasta las 72 h evaluación, presentándose un aumento en el crecimiento, desde un recuento inicial de 27440 UFC/mL, hasta 445860 UFC/mL y posteriormente un descenso hasta 254070 UFC/mL a las 72 h de evaluación, correspondiente a la fase de muerte de la cepa.

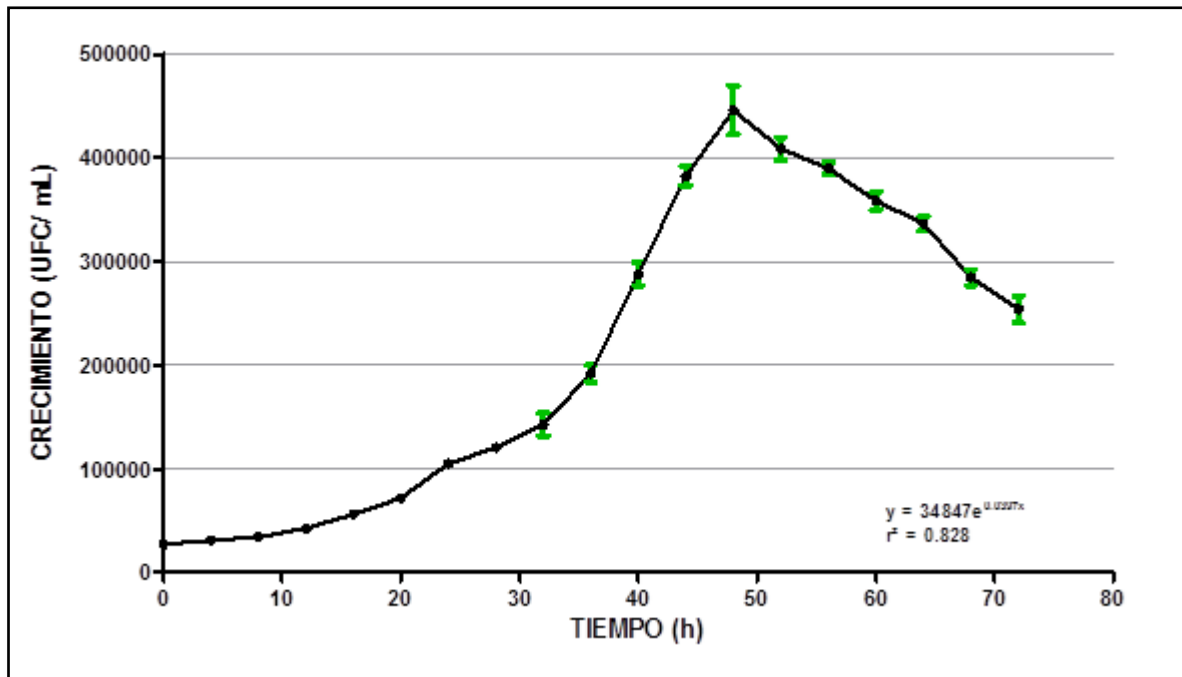
**Tabla N° 12 : Cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en cultivo de medio líquido YPD determinado mediante recuento en cámara de Neubauer**

TIEMPO DE EVALUACIÓN (h)	RECuento	Desviación Estándar
	$\bar{X}$ (UFC/mL)	SD ( $\pm$ )
0	27440	$\pm 973.86$
4	31150	$\pm 3005.01$
8	34440	$\pm 1231.95$
12	42700	$\pm 370.27$
16	56210	$\pm 1215.03$
20	71960	$\pm 141.77$
24	105150	$\pm 1250.12$
28	120750	$\pm 1190.50$
32	142875	$\pm 11003.03$
36	192150	$\pm 7950.08$
40	288000	$\pm 11065.76$
44	382500	$\pm 9055.34$
48	445860	$\pm 23560.01$
52	408690	$\pm 11010.01$
56	389610	$\pm 6010.02$
60	358650	$\pm 8885.11$
64	336600	$\pm 7075.43$
68	284760	$\pm 7805.12$
72	254070	$\pm 13020.10$

En la Fig. 22 se observa que la cepa presenta una etapa de latencia hasta las 24 horas, debido a que la cepa se encuentra en nuevas condiciones, un sustrato rico en carbohidratos y proteínas que reactivan el metabolismo y división celular (etapa exponencial). Con el consumo y agotamiento constante del sustrato finaliza la fase exponencial de los microorganismos, lo cual sucede a partir del segundo día para la cepa *Saccharomyces cerevisiae*, esto debido al metabolismo lento de la levadura. Contreras, en sus investigaciones en el año 2007, menciona que la respuesta positiva en la proliferación de microorganismos se asocia al aporte de aminoácidos, vitaminas y cofactores liberados a medida que las células llegan a la fase de muerte.

Se puede apreciar que la cepa conserva el mismo crecimiento exponencial, debido al método de adaptación, incrementando gradualmente la concentración de Cromo (VI), evitando así la saturación y muerte de la cepa, confirmando lo mencionado por Otero en 2008, que indica que el aumento progresivo de concentración de una sustancia, afecta de manera mínima al crecimiento y desarrollo de la cepa; Cárdenas en 2010 y Saura en 2008 lograron resultados de adaptación exitosos empleando el método de incremento gradual de distintos metales pesados, sin afectar el crecimiento ni metabolismo de la cepa.

La Fig. 22, muestra un crecimiento exponencial del cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* en medio de cultivo líquido YPD, determinado mediante el modelo  $y=34847e^{0.0397x}$  (dicho modelo permite evaluar un determinado valor de crecimiento de la cepa (y) conociendo el tiempo transcurrido (x) o viceversa) que presentó un ajuste de  $r^2=0.828$ , indicando que el 82.8% de los datos explican el modelo exponencial, alcanzándose el crecimiento máximo a las 48 h con 408690 UCF/mL.



**Figura 22 : Cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* vs tiempo de evaluación.**

#### Registro de investigación

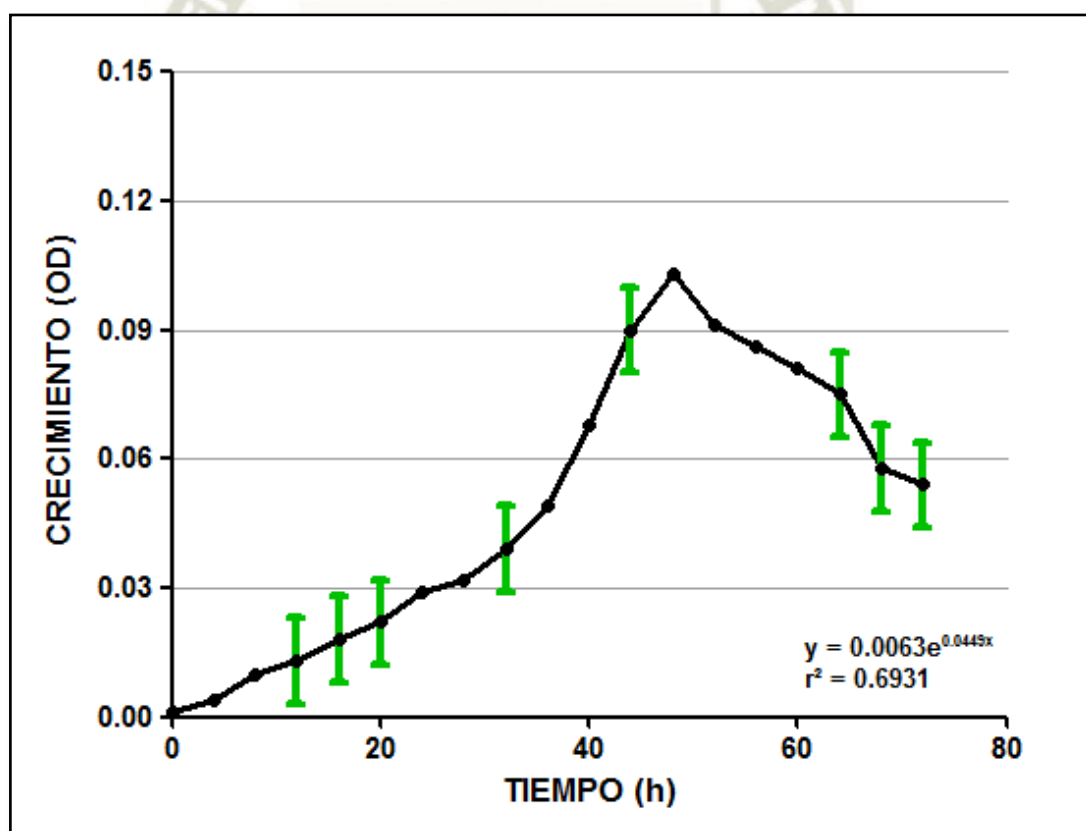
En la Tabla N° 13 se muestra el promedio y la desviación estándar del crecimiento de *Sacharomyces cerevisiae*, en cultivo de medio líquido YPD determinado mediante las absorbancias en intervalos de cada 4 h hasta las 72 h evaluación, presentándose una absorbancia inicial 0.001 Abs, hasta 0.054 Abs a las 72 h de evaluación.

**Tabla N° 13 : Cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* en cultivo de medio líquido YPD determinado mediante absorbancias con espectrofotometría**

TIEMPO DE EVALUACIÓN (h)	ABSORBANCIAS	Desviación Estándar
	$\bar{X}$ (OD)	SD ( $\pm$ )
0	0.001	$\pm 0.00$
4	0.004	$\pm 0.00$
8	0.010	$\pm 0.00$
12	0.013	$\pm 0.01$
16	0.018	$\pm 0.01$
20	0.022	$\pm 0.01$
24	0.029	$\pm 0.00$
28	0.032	$\pm 0.00$
32	0.039	$\pm 0.01$
36	0.049	$\pm 0.00$
40	0.068	$\pm 0.00$
44	0.090	$\pm 0.01$
48	0.103	$\pm 0.00$
52	0.091	$\pm 0.00$
56	0.086	$\pm 0.00$
60	0.081	$\pm 0.00$
64	0.075	$\pm 0.01$
68	0.058	$\pm 0.01$
72	0.054	$\pm 0.01$

La Fig.23 muestra un crecimiento exponencial del cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* en medio de cultivo líquido YPD, determinado mediante el modelo  $y=0.0063e^{0.0449x}$  (dicho modelo exponencial permite calcular un determinado valor de crecimiento de la cepa (y) conociendo el tiempo transcurrido (x), en base a su densidad óptica), que presentó un ajuste de  $r^2=0.6931$ , indicando que el 69.31% de los datos explican el modelo exponencial, alcanzándose el crecimiento máximo a las 48 h con una Abs de 0.103. Dicho modelo exponencial permite calcular un determinado valor de crecimiento de la cepa (y) conociendo el tiempo transcurrido (x), en base a su densidad óptica.

Es importante conocer la cinética de crecimiento de los cultivos microbianos para predecir cómo va a evolucionar un cultivo, cómo va a ir consumiéndose el substrato y cómo se van a ir acumulando los productos del cultivo.



**Figura 23 : Cinética de crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* vs tiempo de evaluación.**

Registro de investigación



La Tabla N° 14 muestra la prueba de comparación estadística de ANOVA de medidas repetidas para el crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* según las concentraciones de Cromo (VI) en medio de cultivo YPD, presentándose diferencias altamente significativas del crecimiento en los diferentes tiempos de evaluación ( $P < 0.01$ ); y la interacción entre el tiempo de evaluación y la concentración de Cromo (VI) ( $P < 0.01$ ) hasta las 48 h de evaluación del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*.

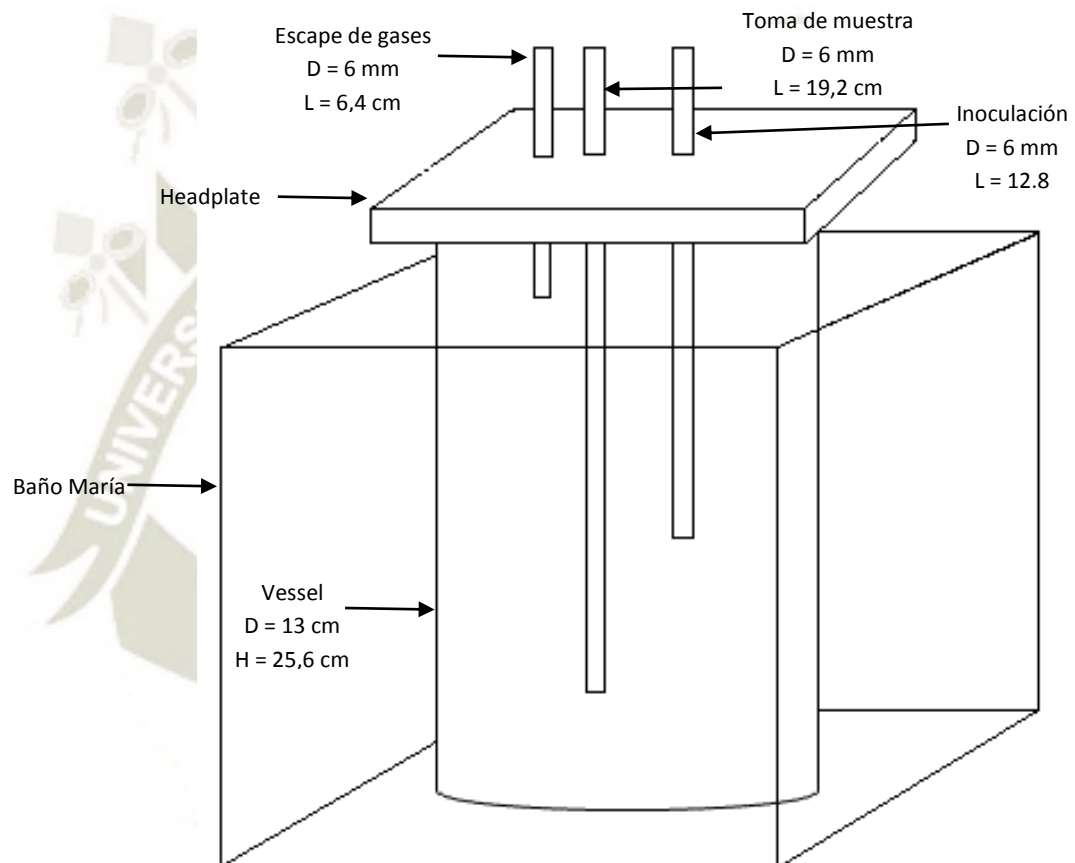
**Tabla N° 14 : Comparación del crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae* según el tiempo y las concentraciones de Cromo (VI), en cultivo de medio YPD**

Fuente de variabilidad	Suma de cuadrados tipo III	Gl	Media Cuadrática	F	Sig.
<b>Tiempo</b>	4.273E11	10	4.273E10	65969.480	0.000...(P<0.01)
<b>Crecimiento</b>	8.587E8	6	1.431E8	15.400	0.000...(P<0.01)
<b>Tiempo/ Crecimiento</b>	4.911E8	60	8185439.841	12.636	0.000...(P<0.01)
<b>Error</b>	9.069E7	140	647793.619		

**a) Diseño y construcción del sistema batch para producción de biomasa.**

Se diseñó y construyó un sistema batch conformado por un vessel de vidrio de 4 L de capacidad, un head plate de madera de 2 cm de grosor, en el cual se colocó 3 puertos, los cuales fueron empleados para: (1) toma de muestra, una tubería de vidrio de 6 mm de diámetro de 19.2 cm de longitud introducida en el frasco y una jeringa de 20 mL de capacidad acoplada a su extremo externo, este puerto tiene como finalidad el retiro de volúmenes determinados del contenido del sistema, para su evaluación externa (2) escape de gases, una tubería de 6.4 cm de longitud, conformado por un filtro de jeringa que posee una membrana de 0.45  $\mu$ m, cuya finalidad es la liberación de dióxido de carbono producido por la cepa como parte de su metabolismo al consumir sustrato, y (3) puerto de inoculación, una tubería de 12.8 cm de longitud, el cual permite la adición inicial de cepa en un volumen determinado para iniciar el funcionamiento del sistema como se muestra en la Fig.

24. Este tipo de biorreactor es empleado en investigaciones realizadas por Gallardo en el año 2008, donde indica que la robustez que posee dicho sistema, permite tanto la adición de cepa y medio de cultivo y la sustracción o cosecha de la cepa producida, sin intervenir ni detener el funcionamiento del sistema.



**Figura 24 : Diseño del sistema batch y especificaciones**

**Registro de investigación**

**b) Inmovilización de la biomasa mediante gelificación en agar agar.**

En la Fig. 25 se aprecia pellets obtenidos, se obtuvo un volumen de pellets de 18 L de tamaño con un promedio de 0.5 cm. de diámetro, los cuales fueron almacenados en solución de Cloruro de sodio al 0.9% hasta su empleo. Este tamaño es aproximado al usado por Malajovich en 2008 donde empleó *Saccharomyces sp.* inmovilizada, optimizando el proceso de sorción; y Fajardo-Ochoa en 2011 donde aseveró que las células inmovilizadas poseen mayor resistencia a condiciones adversas.



**Figura 25 : Pellets de agar-agar con *S. cerevisiae***

**Registro de investigación**

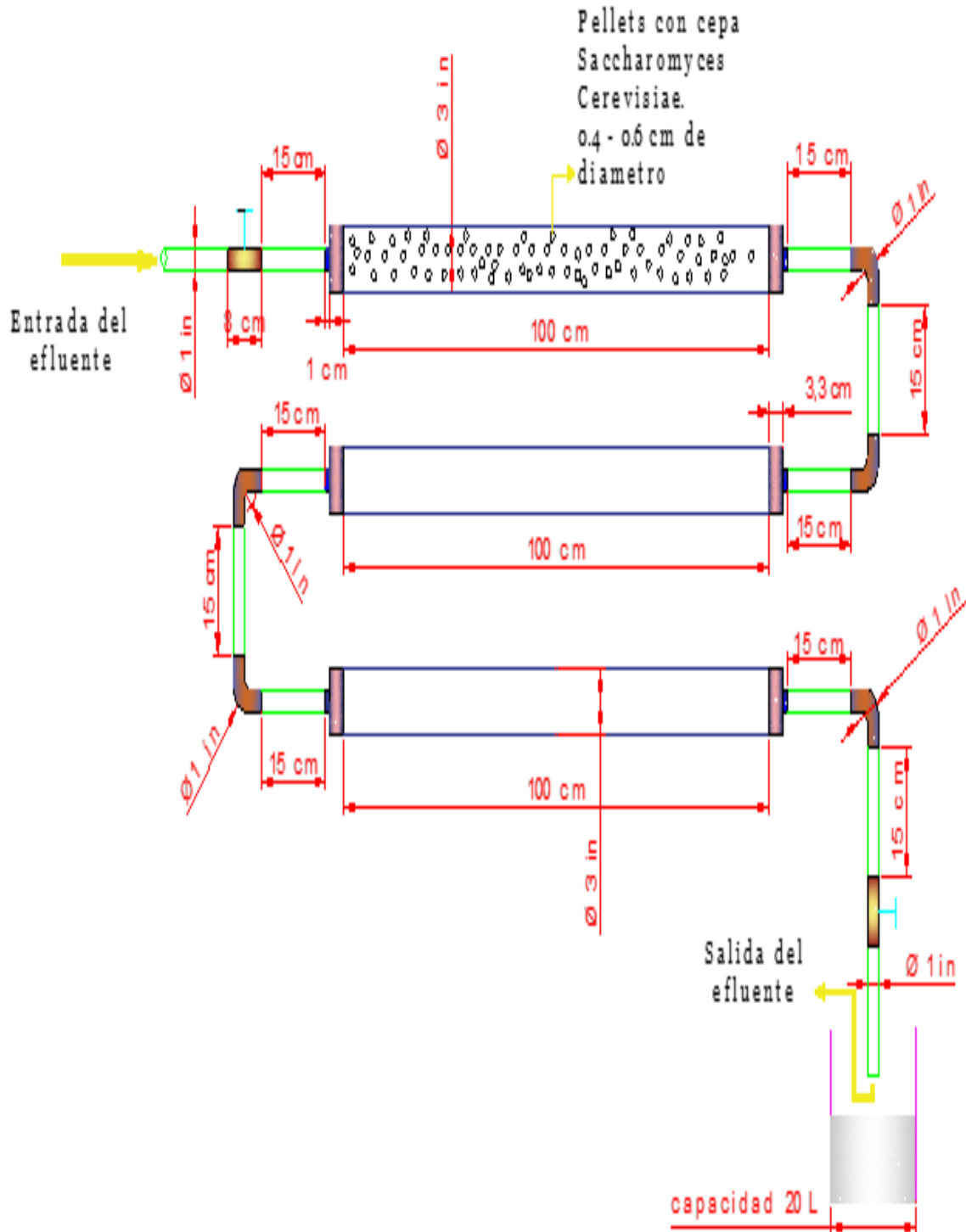
En investigaciones realizadas por Fajardo, Escalante e Ibarra en 2001, se concluye que existen razones técnicas y económicas; la mayoría de los procesos químicos

catalizados por enzimas o llevados a cabo por células, requieren su reutilización o el continuo uso de biocatalizadores durante largos periodos de tiempo. Esto permite concluir que la inmovilización debería ser definida como una técnica capaz de reutilizar o dar uso continuo a biocatalizadores y células. Por lo tanto, la sencillez y el bajo costo de los métodos de inmovilización juegan un papel fundamental en la selección de este tipo de inmovilización para ser empleada. Es por ello que por medio de la inmovilización es posible no solo controlar la ubicación de las células o las enzimas.

Este procedimiento permite evitar el rápido decaimiento que presentan las células en su morfología, tal como prevenir la ruptura de su membrana donde se adsorberán los metales. Las células inmovilizadas presentan una estabilidad mayor, y por lo tanto la inmovilización a su vez permite la reutilización de las células.

**c) Diseño y construcción del biorreactor flujo pistón para la remoción de Cromo (VI)**

Dicho diseño es constantemente empleado por la versatilidad que presenta, además de permitir la adición de múltiples secciones en serie o incluso en paralelo, tal como lo refiere Bird en investigaciones en el año 2002, como se aprecia en la Fig. 26, donde indica que el diseño presenta ventajas superiores a otros diseños de biorreactores que buscan el mismo objetivo. Además, dicho sistema permite maximizar el área de contacto y el tiempo de residencia del efluente a ser tratado, lo que permite alcanzar un elevado porcentaje de remoción, pudiendo ser optimizado al adicionar secciones al PFTR.



**Figura 26 : Diseño del PFTR (Bird, 2002) modificado y especificaciones****Figura 27 : Biorreactor flujo pistón****Registro de investigación****d) Evaluación de remoción de Cromo (VI) en aguas sintéticas y en efluentes de industria curtiembre en el biorreactor flujo pistón (PFTR).**

La biomasa disminuye la concentración inicial del metal, hasta niveles dentro de los límites máximos permisibles como se muestran en la Fig. 28 y Fig. 29. Lo anterior indica que esta biomasa es capaz de bioadsorber el metal en la solución de trabajo. La capacidad de bioadsorber Cromo (VI) se ha reportado ampliamente en la literatura en microorganismos que incluyen levaduras y hongos como *C. maltosa* por estudios de Ramírez-Ramírez en el año 2004, *Candida sp* en investigaciones por Guillén y Jiménez, durante el 2008 y *Aureobasidium pullulans*, cepa investigada por Fukuda y colaboradores en el año 2008.

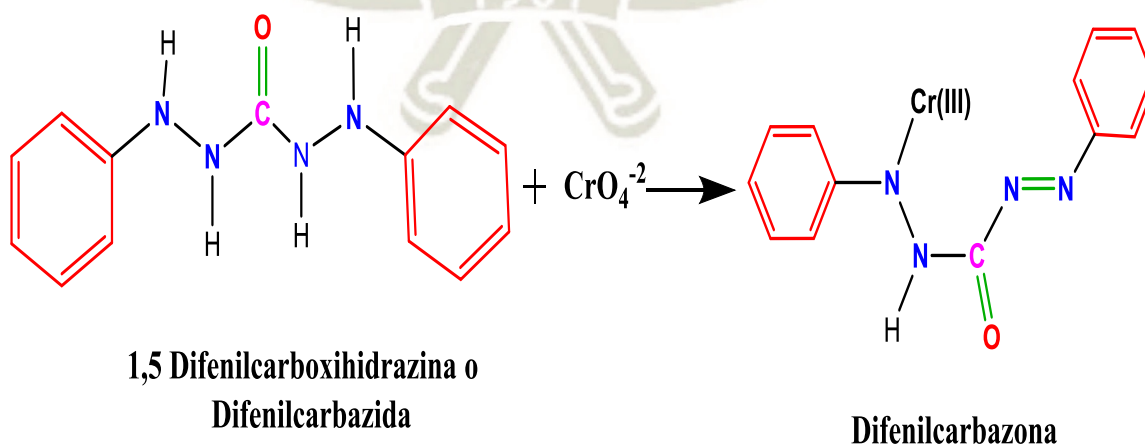
**Figura 28 : Muestras procedentes del sistema PFTR empleando aguas sintéticas: Entrada (1), Salida de prueba sólo agar (2), salida de prueba agar + cepa (3)**

**Registro de investigación**

**Figura 29 : Muestras procedentes del sistema PFTR empleando efluentes curtiembres: salida de prueba agar + cepa (4), Salida de prueba sólo agar (5), entrada (6).**

**Registro de investigación**

Se procedió a la medición de efluente del biorreactor, mediante el método de Difenilcarbazida, donde se determinó la curva de calibración correspondiente a Dicromato de potasio, como fuente de Cromo (VI). Este método colorimétrico se basa en la reacción del cromo hexavalente con 1,5-difenilcarbazida en medio ácido, lo que produce la formación de un compuesto desconocido de color rojo violeta como se aprecia en la Fig. 30. Éste puede ser medido espectrofotométricamente a una longitud de onda de 540 nm y la absorbancia es proporcional a la concentración de cromo en la muestra.



**Figura 30 : Reacción química del Cromo (VI) con la Difenilcarbazida**

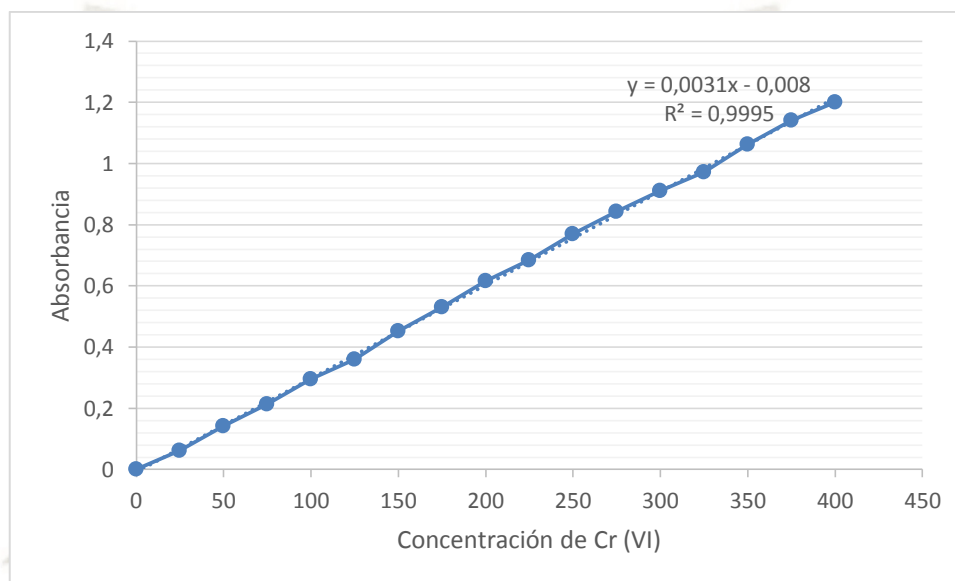
- **Linealidad:** Se determinó la curva de calibración dentro de un rango determinado de concentraciones, cuya variación es lineal y proporcional entre la absorbancia obtenida y la concentración de cromo a determinar, como se muestra en la Tabla N° 15.

**Tabla N° 15: Lectura de absorbancias promedio de solución de Dicromato de Potasio**

<b>Concentración Dicromato de Potasio (mg/L)</b>	<b>Absorbancia (OD)</b>
0	0
25	0.062
50	0.142
75	0.213
100	0.295
125	0.360
150	0.452
175	0.531
200	0.617
225	0.685
250	0.769
275	0.843
300	0.911
325	0.972
350	1.062
375	1.141
400	1.201



En la Fig. 31 observamos la curva de calibración de Dicromato de potasio obteniendo un valor de  $r^2$  igual a 0.99, lo cual garantiza la certeza del ajuste de los puntos experimentales a la recta de calibrado. Asimismo, se determinó el modelo correspondiente a la curva de calibración:  $y = 0.0031x - 0.008$ , el cual permite determinar cualquier valor de Cromo (VI) a partir de una absorbancia determinada, o viceversa.



**Figura 31 : Curva de calibración de dicromato de potasio**

#### **Registro de investigación**

- **Precisión:** Se determinó mediante la lectura de 3 concentraciones teóricas conocidas, por triplicado, para conocer la precisión de trabajo empleando el mismo equipo y bajo las mismas condiciones de trabajo, como se aprecia en la Tabla N° 16.

Concentración (mg/L)	Absorbancia	Concentración determinada	SD	CV
100	0.295	99.3548	0.8535	0.0086
	0.301	99.6774		
	0.284	98.0645		
200	0.617	200.9677	0.6715	0.0033
	0.599	201.9355		
	0.604	200.6452		
300	0.911	299.6774	0.8118	0.0027
	0.920	300.6452		
	0.901	299.0323		

**Tabla N° 16: Determinación de Precisión del método**

- **Exactitud:** Se determinó el grado de aproximación que existe entre el valor real y el valor determinado de las muestras, mediante el cálculo del porcentaje de recuperación: La Tabla N°17, muestra porcentajes de recuperación promedio de 100.08% (100 mg/L), 100.09% (200 mg/L) y 100.12% (300 mg/L). Dichos valores cumplen con lo establecido por la AOAC, que indica que el porcentaje de recuperación indicado debe encontrarse alrededor de 100% (valor mínimo de 75 y máximo de 120%), con lo cual se puede aseverar que los datos son exactos.

**Tabla N° 17 : Determinación de Exactitud del método**

Muestra		Muestra + Estándar (100 mg/L)		Porcentaje de Recuperación (%)	Porcentaje de Recuperación Promedio (%)
Absorbancia	Concentración (mg/L)	Absorbancia	Concentración (mg/L)		
0.300	99.355	0.6101	199.400	100.045	100.08
0.301	99.677	0.6114	199.797	100.120	
0.296	98.065	0.6062	198.143	100.078	
0.615	200.968	0.9254	301.083	100.115	100.09
0.618	201.935	0.9281	301.972	100.037	
0.614	200.645	0.9243	300.756	100.111	
0.921	299.677	1.2313	399.764	100.087	100.12
0.924	300.645	1.2342	400.714	100.069	
0.919	299.032	1.2296	399.229	100.197	

La Tabla N°18 nos muestra la reducción de la concentración total de Cromo (VI) en aguas sintéticas sometidas a *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada, mientras que hubo una reducción de cromo en el efluente de la industria curtiembre. Dichos valores son ampliamente superiores a los presentados por Armienta en el año 1995, empleando aguas residuales con presencia de Cromo, en la ciudad de León, México, así como también superan a los resultados descritos por Nourbakhsh en 1994 y a los de Ramírez en 2004.

**Tabla N° 18 : Concentración y porcentaje de Cromo (VI) removido por cepa inmovilizada**

Efluente evaluado	Muestra	Absorbancia inicial	Concentración de Cromo (VI) inicial (mg/L)	Absorbancia final	Concentración de Cromo (VI) final (mg/L) (%)	Porcentaje de remoción de Cromo (VI) (%)
Aguas sintéticas	1	1.6330	529.35	0.2390	79.68	84.95
	2	1.6330	529.35	0.2790	92.58	82.51
	3	1.6330	529.35	0.2741	91.00	82.81
Efluente de industria curtiembre	1	1.6330	529.35	0.1960	65.81	87.57
	2	1.6330	529.35	0.2369	79.00	85.08
	3	1.6330	529.35	0.1850	62.26	88.24

**Registro de Investigación**

La Tabla N° 19 nos muestra el efecto del agar-agar, como control blanco, sobre el porcentaje de remoción de Cromo (VI), como se aprecia, los valores son inferiores al 0.3%, por lo cual podría asegurarse que el agar-agar, como soporte de inmovilización, no posee efecto sobre la concentración de Cromo (VI) presente en el efluente, contrastado por lo indicado en el año 2008 por Lara, en el 2000 por Cañizares y por Plaza en el 2012, donde se indica que el agar-agar es un soporte de inmovilización óptimo por su elevada resistencia a diferentes condiciones de trabajo, y por su neutralidad respecto a la remoción de contaminantes, permitiendo resultados más precisos que otros soportes empleados para inmovilización.

**Tabla N° 19 : Concentración y porcentaje de Cromo (VI) removido por sólo agar-agar**

Efluente evaluado	Muestra	Absorbancia inicial	Concentración de Cromo (VI) inicial (mg/L)	Absorbancia final	Concentración de Cromo (VI) final (mg/L)	Porcentaje de remoción de Cromo (VI) (%)
Aguas sintéticas	1	1.6330	529.35	1.6291	528.1	0.25
	2	1.6330	529.35	1.6304	528.5	0.17
	3	1.6330	529.35	1.6296	528.25	0.22
Efluente de industria curtiembre	1	1.6330	529.35	1.6284	527.88	0.28
	2	1.6330	529.35	1.6292	528.12	0.23
	3	1.6330	529.35	1.6285	527.9	0.27

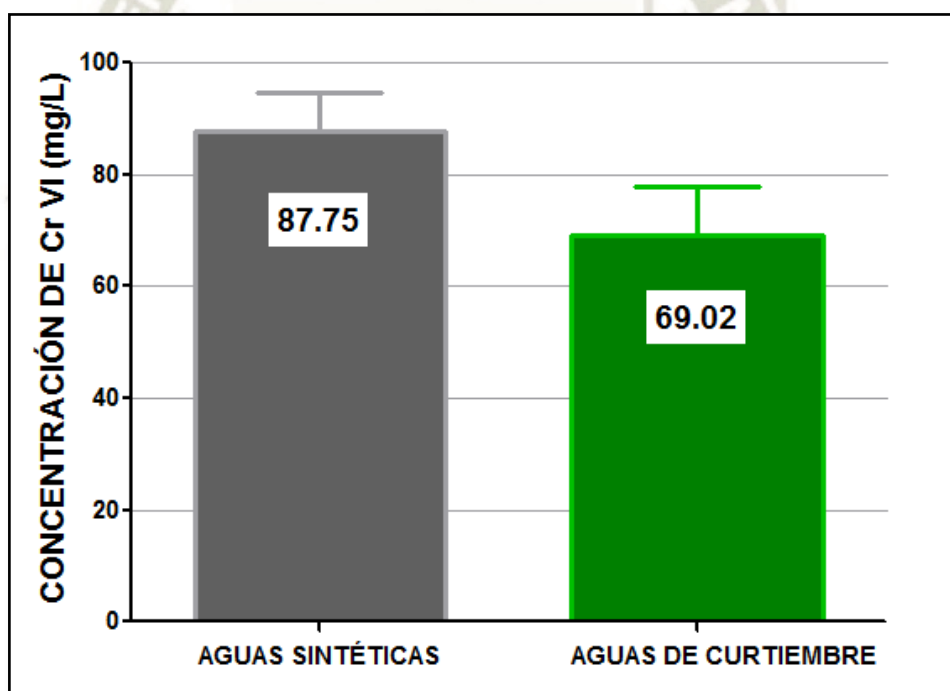
**Registro de Investigación.**

En la Tabla N° 20 y Fig. 32 Se muestran los promedios y desviaciones estándar de la concentración residual de Cromo (VI) para las aguas sintéticas de Cromo (VI) a partir de  $K_2Cr_2O_7$  y aguas de curtiembre, además se muestra la prueba de comparación estadística de t de Student, la indicó que existen diferencias S.S. ( $P < 0.05$ ) significativas en la concentración residual de Cromo (VI), presentándose menor concentración residual de Cromo en aguas de curtiembre 69.02 mg/L en comparación a 87.75 mg/L obtenido para las aguas sintéticas. La concentración residual es determinada mediante la siguiente fórmula:

$$Conc. residual = Conc. Inicial - Conc. Final$$

**Tabla N° 20 : Comparación de la concentración residual de Cromo (VI), en aguas sintéticas y aguas de industria curtiembre en el biorreactor flujo pistón empacado con *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada.**

TIPO DE MUESTRA	CONCENTRACIÓN RESIDUAL ± SD	t Student	SIGNIFICANCIA P
AGUAS SINTÉTICAS	87.75 ± 7.04	2.875	0.045 S.S. (P<0.05)
AGUAS DE CURTIEMBRE	69.02 ± 8.82		



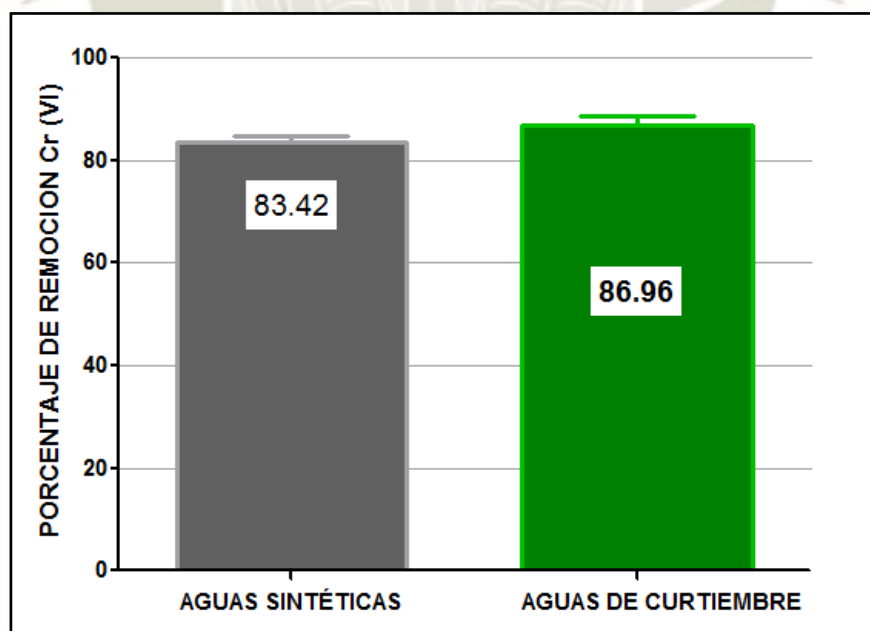
**Figura 32 : Concentración residual de Cromo (VI), según tipo de agua en el biorreactor flujo pistón empacado con *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada.**

Registro de investigacion

En la Tabla N° 21 y Fig. 33 se muestran los promedios y desviaciones estándar de la remoción de Cromo (VI) para las aguas sintéticas de Cromo (VI) a partir de  $K_2Cr_2O_7$  y aguas de curtiembre, además se muestra la prueba de comparación estadística de t de Student, la indicó que existen diferencias S.S. ( $P < 0.05$ ) significativas en la remoción de Cromo (VI), presentándose mayor remoción de Cromo (VI) en aguas de curtiembre 86.96 % en comparación a 83.42% obtenido para las aguas sintéticas.

**Tabla N° 21: Comparación de porcentaje de remoción de Cromo (VI), en aguas sintéticas y aguas de industria curtiembre en el biorreactor flujo pistón empacado con *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada.**

TIPO DE MUESTRA	REMOCION $\pm$ SD	t Student	SIGNIFICANCIA P
AGUAS SINTETICAS	83.42 $\pm$ 1.33		
AGUAS DE CURTIEMBRE	86.96 $\pm$ 1.66	-2.877	0.045 S.S. ( $P < 0.05$ )



**Figura 33 : Porcentaje de remoción de Cromo (VI), según tipo de agua en el biorreactor flujo pistón empacado con *Saccharomyces cerevisiae* inmovilizada.**

Registro de investigación

#### 4. CONCLUSIONES

**Primera:** Se aisló, identificó y caracterizó microscópica, macroscópica y bioquímicamente la cepa *Saccharomyces cerevisiae* de la muestra post-fermentativa, obtenida la industria cervecera.

**Segunda:** Se adaptó la cepa *Saccharomyces cerevisiae*. a una concentración de 600 mg/L de Cromo (VI). Se observó que a dicha concentración la cepa alcanzó un crecimiento máximo de 257 117 UFC/mL a las 48 horas de incubación.

**Tercera:** Se determinó la cinética de crecimiento de la cepa *Saccharomyces cerevisiae*, la cual presentó una etapa exponencial que se extendió hasta las 48 horas.

**Cuarta:** Se diseñó y construyó un biorreactor tipo batch a escala de laboratorio, empleado para la producción de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae*, obteniéndose 3 L de biomasa en 48 horas, que corresponde a 300 gramos de biomasa seca, además se continuó adicionando sustrato para la continuidad de la producción de la biomasa.

**Quinta:** Se inmovilizó 18 L de biomasa de *Saccharomyces cerevisiae* en agar agar, para su aplicación en el PFTR, donde se obtuvo pellets de un tamaño promedio de 0.5 cm.

**Sexta:** Se diseñó y construyó un biorreactor flujo pistón (PFTR) a escala de laboratorio, empleado para la bioadsorción de Cromo (VI). Se observó que dicho diseño de biorreactor permitió alcanzar una mayor área de contacto entre el efluente y la biomasa inmovilizada en un tiempo de residencia de una 1 hora.

**Séptima:** Se determinó que el agar-agar empleado como soporte de inmovilización para la cepa, posee un mínimo efecto en el porcentaje de remoción del Cromo (VI), convirtiéndolo en un óptimo soporte de inmovilización.

**Octava:** Se determinó que el porcentaje de remoción de Cromo (VI) en el sistema con agua sintética fue de 82.45%, mientras que la remoción de Cromo (VI) en el sistema con efluente de la industria curtiembre fue de 86.96%. De acuerdo a los resultados obtenidos, se concluye que el sistema empleado puede

considerarse eficaz para el tratamiento de remoción de Cromo (VI) para aguas contaminadas procedente de la industria curtiembre.





## 5. SUGERENCIAS

- Profundizar la investigación en la recuperación de otros metales pesados, a través de la eficiencia del absorbente en estudio, aportando así una ayuda en la preservación del medio ambiente.
- Realizar dicha investigación en aguas residuales procedentes de otro tipo de industrias donde es empleado o son generados metales pesados, industrias como, por ejemplo: pinturas, colorantes, automotriz, minería, etc.
- Podría emplearse un consorcio de levaduras de distintos géneros y especies, tales como las del género *Candida*, *Schyzosaccharomyces*, *Kluyveromyces* para la maximización de la biosorción de metales pesados u otros contaminantes de efluentes, mediante el uso de biorreactores tipo PFTR.
- Buscar alternativas sustentables para el aprovechamiento de los residuos generados en la industria cervecera, revalorizando dichos residuos, reutilizándolos como materia prima para el tratamiento de otros problemas ambientales generados por otro tipo de industrias, disminuyendo así el impacto ambiental como también los costos que estas investigaciones generen.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Cartaya O, Reynaldo I, Peniche C. Cinética de adsorción de iones cobre (II) por una mezcla de oligogalacturonidos. *Rev. Iberoam. Polímeros*. 2008; 9(5): 473-479.
2. Akar T, Tosun I, Kaynak Z, Kavas E, Incirkus G, Akar ST. Assessment of the biosorption characteristics of a macro-fungus for the decolorization of Acid Red 44 (AR44) dye. *J. Hazard. Mater.* 2009; 171(1-3): 865-71.
3. García VR, Yipmantin AG, Guzmán EF, Pumachagua R, Maldonado HJ. Estudio de la cinética de biosorción de iones plomo en pectina reticulada proveniente de cáscaras de cítricos. *Rev. la Soc. Química del Perú*. 2011; 77(3): 173-181.
4. Farooq U, Kozinski JA, Khan MA, and Athar M. Biosorption of heavy metal ions using wheat based biosorbents - a review of the recent literature. *Bioresour. Technol.* 2010; 101(14): 5043-53.
5. Roig B. Evaluación de las tecnologías de tratamiento de aguas subterráneas contaminadas con Cromo. España: Universitat Politècnica de Catalunya; 2006.
6. Nava C, Méndez M. Efectos neurotóxicos de metales pesados (cadmio, plomo, arsénico y talio). *Arch Neurocién Mex*. 2011; 16(3): 140-147.
7. Gómez V, Velásquez J, Quintana G. Lignina como adsorbente de metales pesados: Revisión del estado del arte. *Rev. Investig. Apl.* 2013; 7(2): 74-85.
8. World Health Organization. Chromium in drinking-water. Guidelines for drinking-water quality. 2<sup>a</sup> ed. Geneva, Switzerland, 2003.
9. Pinzón-Bedoya ML, Cardona AM. Influencia del pH en la bioadsorción de Cr (III) sobre cáscara de naranja: Determinación de las condiciones de operación en proceso discontinuo. *Rev. la Fac. Ciencias Básicas*. 2010; 8(1):21-30.
10. Higuera OF, Arroyave JF, Florez LC. Diseño de un biofiltro para reducir el índice de contaminación por cromo generado en las industrias del curtido de cueros. *Dyna*. 2009; 76(160): 107-119.
11. Dubey SP, Gopal K. Adsorption of chromium (VI) on low cost adsorbents derived from agricultural waste material: a comparative study. *J. Hazard. Mater.* 2007; 145(3): 465-70.
12. Pérez AB, Aguilar MI, Meseguer VF, Ortuño JF, J. Sáez, and M. Lloréns, "Biosorption of chromium (III) by orange (*Citrus cinensis*) waste: Batch and continuous studies," *Chem. Eng. J.*, vol. 155, no. 1-2, pp. 199-206, Dec. 2009.

13. Correa ML, Velásquez JA, Quintana GC. Uncommon Crop Residues as Ni (II) and Cd(II) Biosorbents. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2012; 51(38): 12456-12462.
14. Sala LF, García SI, González JC, Frascaroli MI, Bellú S, Mangiameli F, Blanes P, Mogetta MH, Andreu V, Atria AM, Salas JM. Biosorción para la eliminación de metales pesados en aguas de desecho. *An. La Real Soc. Española Química.* 2010; 106(2): 114-120.
15. Duarte E, Olivero J, Jaramillo BE. Remoción de cromo de aguas residuales de curtiembres usando quitosán obtenido de desechos de camarón. *Sci. Tech.* 2009; 15(42): 290-295.
16. Fiorentin LD, Trigueros DE, Módenes, AN, Espinoza-Quiñones FR, Pereira NC, Barros ST, Santos OA. Biosorption of reactive blue 5G dye onto drying orange bagasse in batch system: Kinetic and equilibrium modeling. *Chem. Eng. J.* 2010; 163(1-2): 68-77.
17. Mao J, Won SW, Vijayaraghavan K, Yun YS. Surface modification of *Corynebacterium glutamicum* for enhanced Reactive Red 4 biosorption. *Bioresour. Technol.* 2009; 100(3): 1463-6.
18. Das N. Recovery of precious metals through biosorption - A review. *Hydrometallurgy.* 2010; 103(1-4): 180-189.
19. Srinivasan A, Viraraghavan T. Decolorization of dye wastewaters by biosorbents: a review. *J. Environ. Manage.* 2010; 91(10): 1915-29.
20. Ramírez JH, Martínez OM, Fernández LM. Remoción de contaminantes en aguas residuales industriales empleando carbón activado de pino pátula. *Av. Investig. en Ing.* 2013; 10(1): 42-49.
21. Aranda E, Netzahuatl AR, Cristiani M, Morales L, Pineda G, Cristiani E. Bioreduction of Cr(VI) and chromium biosorption by acorn shell of *Quercus crassipes* Humb. & Bonpl. *J. Biotechnol.* 2010; 150: 228-228.
22. Kelly K, Cerro M, Reyna S, E. Bandala ER, Sanchez JL. Biosorption of heavy metals in polluted water, using different waste fruit cortex. *Phys. Chem. Earth, Parts A/B/C.* 2012; 37-39: 26-29.
23. Adesola NA, Oyebamiji J, Adebawale S. Biosorption of lead ions from aqueous solution by maize leaf. *Int. J. Phys. Sci.* 2006; 1: 2326, 2006.

24. Johnson PD, Watson MA, Brown J, Jefcoat IA. Peanut Hull Pellets as a Single Use Sorbent for the Capture of Cu (II) from Waste Water. *Water Mangement*. 2002; 22(5): 471-480.
25. Kousalya GN, Rajiv M, Meenakshi S. Sorption of chromium (VI) using modified forms of chitosan beads. *Int. J. Biol. Macromol*. 2010; 47(2): 308-15.
26. Villaescusa I, Fiol N, Martínez M, Miralles N, Poch J, Serarols J. Removal of copper and nickel ions from aqueous solutions by grape stalks wastes. *Water Res*. 2004; 38(4): 992-1002.
27. Cañizares R. Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Rev. Latinoam. Microbiol*. 2000; 42: 131-143.
28. Chojnacka K. Biosorption and bioaccumulation - the prospects for practical applications. *Environ. Int*. 2010; 36(3): 299-307.
29. Acosta I, Cárdenas JF, Martínez VM. El uso de diferentes biomásas para la eliminación de metales pesados en sitios contaminados,” *Ide@s CONCYTEG*. 2012; 7(85): 911-922.
30. Reyes ED, Cerino CF, Suárez MA. Remoción de metales pesados con carbón activado como soporte de biomasa. *Ingenierías*. 2006; 9(31): 59-64.
31. Gautam RK, Mudhoo A, Lofrano G, Chattopadhyaya MC. Biomass-derived biosorbents for metal ions sequestration: Adsorbent modification and activation methods and adsorbent regeneration. *J. Environ. Chem. Eng*. 2014; 2(1): 239-259.
32. Escudero C. Valorisation of industrial wastes for the removal of metals and arsenic from aqueous effluents. Universitat de Girona, 2009.
33. Plaza J. Remoción de metales pesados empleando algas marinas. Universidad Nacional de La Plata, 2012.
34. Appelo CA, Postma D. *Geochemistry, groundwater and pollution*, 2<sup>a</sup> ed. CRC Press, 2005.
35. Agouborde LI. Remoción de metales pesados por medio de adsorbentes no convencionales, Universidad de la Frontera, 2008.
36. Tuñón I. Superficies sólidas: adsorción y catálisis heterogénea. Departamento de Química Física: Univèrsitat de València 2009.
37. Kuyucak N, Volesky B. Accumulation of cobalt by marine alga. *Biotechnol. Bioeng*. 1989; 33(7): 809-14.

38. Garcés LE, Coavas SC. Evaluación de la capacidad de adsorción en la cáscara de naranja (*Citrus sinensis*) modificada con quitosano para la remoción de Cromo (VI) en aguas residuales. Universidad de Cartagena, 2012.
39. Miretzky P, Cirelli AF. Cr (VI) and Cr(III) removal from aqueous solution by raw and modified lignocellulosic materials: a review. *J. Hazard. Mater.* 2010; 180(1-3): 1-19.
40. Foo KY, Hameed BH. Preparation, characterization and evaluation of adsorptive properties of orange peel based activated carbón via microwave induced K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> activation. *Bioresour. Technol.* 2012; 104: 679-86.
41. Meitei MD, Prasad MN. Lead (II) and cadmium (II) biosorption on *Spirodela polyrhiza* (L.) Schleiden biomass. *J. Environ. Chem. Eng.* 2013; 1(3): 200-207.
42. Xiao X, Luo S, Zeng G, Wei W, Wan Y, Chen L, Guo H, Cao Z, Yang L, Chen J, Xi Q. Biosorption of cadmium by endophytic fungus (EF) *Microsphaeropsis* sp. LSE10 isolated from cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L. *Bioresour. Technol.* 2010; 101(6): 1668-74.
43. Park D, Lim S, Yun Y, Park JM. Reliable evidences that the removal mechanism of hexavalent chromium by natural biomaterials is adsorption-coupled reduction. *Chemosphere.* 2007; 70(2): 298-305.
44. Muñoz JC. Biosorción de plomo (II) por cáscara de naranja 'Citrus cinensis' pretratada. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 2007.
45. Lavado C, Sun Kou M, Recuay N. Remoción de cromo (VI) empleando carbones preparados por activación química a partir de las astillas de eucalipto. *Rev. la Soc. Química del Perú.* 2012; 78(1): 14-26.
46. ATSDR. Resumen de Salud Pública, Cinc. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, Atlanta, GA, 2005.
47. Luna AS, Costa AL, da Costa AC, Henriques CA. Competitive biosorption of cadmium (II) and zinc (II) ions from binary systems by *Sargassum filipendula*. *Bioresour. Technol.* 2010; 101(14): 5104-11.
48. ATSDR. Resumen de Salud Pública, Cadmio. Atlanta, GA, 2012.
49. Sari A, Tuzen M. Biosorption of cadmium (II) from aqueous solution by red algae (*Ceramium virgatum*): equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *J. Hazard. Mater.* 2008; 157(2-3): 448-54.

50. Ajmal M, Ali Khan Rao R, Anwar S, Ahmad J, Ahmad R. Adsorption studies on rice husk: removal and recovery of Cd (II) from wastewater. *Bioresour. Technol.* 2003; 86(2): 147-149.
51. Quiñones E, Tejada C, Arcia C, Ruiz V. Remoción de plomo y níquel en soluciones acuosas usando biomasas lignocelulósicas: una revisión. *Rev. U.D.C.A Actual. Divulg. Científica.* 2013; 16(2): 479-489.
52. UNEP. Guide for reducing major uses and releases of mercury. Geneva, 2006.
53. Gaioli M, Amoedo D, González D. Impacto del mercurio sobre la salud humana y el ambiente. *Arch. Argent. Pediatr.* 2012; 110(3): 259-264.
54. Cuizano NA, Llanos BP, Navarro AP. Aplicaciones ambientales de la adsorción mediante biopolímeros naturales: Parte 1 - Compuestos fenólicos. *Rev. la Soc. Química del Perú.* 2009; 75(4): 488-494.
55. ATSDR. Níquel. Atlanta, GA, 2005.
56. Xiao G, Zhang X, Su H, Tan T. Plate column biosorption of Cu (II) on membrane-type biosorbent (MBS) of *Penicillium* biomass: optimization using statistical design methods. *Bioresour. Technol.* 2013; 143: 490-8.
57. Bhuvaneshwari S, Sivasubramonian V, Comparative studies for chitosan yield and chelating ability of *Aspergillus niger* and *Rhizopus oryzae*. *Indian J. Biotechnol.* 2013; 12: 429-431.
58. Marín AB, Ortuño JF, Aguilar MI, Meseguer VF, Sáez J, Lloréns M. Use of chemical modification to determine the binding of Cd(II), Zn(II) and Cr(III) ions by orange waste *Biochem. Eng. J.* 2010; 53(1): 2-6.
59. Acosta I, Martínez VM, Cárdenas JF, Moctezuma M. Biosorption of Arsenic (III) from Aqueous Solutions by Modified Fungal Biomass of *Paecilomyces* sp. *Bioinorg. Chem. Appl.* 2013; 2013: 376-78.
60. Kwon JS, Yun ST, Lee JH, Kim SO, Jo HY. Removal of divalent heavy metals (Cd, Cu, Pb, and Zn) and arsenic (III) from aqueous solutions using scoria: kinetics and equilibria of sorption. *J. Hazard. Mater.* 2010; 174(1-3): pp. 307-13.
61. Selvi K, Pattabhi S, Kadirvelu K. Removal of Cr(VI) from aqueous solution by adsorption onto activated carbon. *Bioresour. Technol.* 2001;80 (1): 87-89.
62. Pehlivan E, Altun T, Parlayici S. Modified barley straw as a potential biosorbent for removal of copper ions from aqueous solution. *Food Chem.* 2012; 135(4): 2229-34.

63. Futralan CM, Kan C, Dalida ML, Hsien KJ, Pascua C, Wan MW. Comparative and competitive adsorption of copper, lead, and nickel using chitosan immobilized on bentonite. *Carbohydr. Polym.* 2011; 83(2): 528-536.
64. Laus R, de Fávère VT. Competitive adsorption of Cu (II) and Cd (II) ions by chitosan crosslinked with epichlorohydrin-triphosphate. *Bioresour. Technol.* 2011; 102(19): 8769-76.
65. Cardona AF, Cabañas DD, Zepeda A. Evaluación del poder biosorbente de cáscara de naranja para la eliminación de metales pesados, Pb (II) y Zn (II). *Ingeniería.* 2013; 17(1): 1-9.
66. Depci T, Kul AR, Önal Y. Competitive adsorption of lead and zinc from aqueous solution on activated carbon prepared from Van apple pulp: Study in single- and multi-solute systems. *Chem. Eng. J.* 2012; 200-202: 224-236.
67. Garzón JA, González LA. Adsorción de Cromo (VI) utilizando carbón activado a partir de cáscara de naranja. Universidad de Cartagena, 2012.
68. Anirudhan TS, Sreekumari SS. Adsorptive removal of heavy metal ions from industrial effluents using activated carbon derived from waste coconut buttons. *J. Environ. Sci. (China)*, 2011; 23(12): 1989-98.
69. Navarro AE, Maldonado HJ, Campos K, Ramos KP. Elucidación del efecto del pH en la adsorción de metales pesados mediante biopolímeros naturales: Cationes divalentes y superficies activas. *Rev. Iberoam. Polímeros.* 2006; 7(2): 113-126.
70. Pratt DY, Wilson LD, Kozinski JA. Preparation and sorption studies of glutaraldehyde cross-linked chitosan copolymers. *J. Colloid Interface Sci.* 2013; 395: 205-11.
71. Kawai K, Hayashi A, Kikuchi H, Yokoyama S. Desorption properties of heavy metals from cement hydrates in various chloride solutions. *Constr. Build. Mater.* 2014; 67: 5560.
72. Zhu B, Fan T, Zhang D. Adsorption of copper ions from aqueous solution by citric acid modified soybean straw. *J. Hazard. Mater.* 2008; 153(1-2): 300-8.
73. Cassidy MB, Lee H, Trevors JT. Environmental applications of immobilised microbial cells: a review. *J. Ind. Microbiol.* 1996; 16: 79-101
74. Karagiannidis N, Nikolaou N. Influence of arbuscular mycorrhizae on heavy metal (Pb and Cd) uptake, growth, and chemical composition of *Vitis vinifera* L. (cv. Razaki). *Am. J. Enol. Vitic.* 2000; 51: 269-275.

75. Lebeau T, Bagot D, Jézéquel K, Fabre B. Cadmium biosorption by free and immobilised micro-organisms cultivated in a liquid soil extract medium with various cadmium concentrations: effects of Cd, pH and techniques of culture. *Sci. Tot. Environ.* 2002; 291: 73-83.
76. Ledin M, Krantz-Rülcker C, Allard B. Micro-organisms as metal sorbent: comparison with other soil constituents in multicompartiment systems. *Soil Biol. Biochem.* 1999; 31: 1639-1648.
77. Lu Y, Wilkins E. Heavy metal removal by caustic-treated yeast immobilised in alginate. *J. Hazard. Mater.* 1996; 49: 165-179.
78. Morra MJ, Chaverra MH, Dandurand LM, Orser CS. Survival of *Pseudomonas fluorescens* 2-79RN10 in clay powders undergoing drying. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 1998; 62: 663-670.
79. Nava Saucedo JE, Audras B, Jan S, Bazinet CE, Barbotin JN, Factors affecting densities, distribution and growth patterns of cells inside immobilization supports. *FEMS Microbiol. Rev.* 1994; 14: 93-98.
80. Pochon J, Tardieux P. *Techniques d'Analyse en Microbiologie du Sol.* Collection Techniques de Base, La Tourelle, France, 1957.
81. Ueno K, Shetty K. Prevention of hyperhydricity in oregano shoot cultures is sustained through multiple subcultures by selected polysaccharide-producing soil bacteria without reinoculation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1998; 50: 119-124.
82. Valentine NB, Bolton H, Kingsley MT, Drake GR, Balkwill DL, Plymale AE. Biosorption of cadmium, cobalt, nickel, and strontium by a *Bacillus simplex* strain isolated from the vadose zone. *J. Ind. Microbiol.* 1996; 16: 189-196.
83. van Elsas JD, Trevors JT, Jain D, Wolters AC, Heijnen CE, van Overbeek LS, Survival of, and root colonization by, alginate-encapsulated *Pseudomonas fluorescens* cells following introduction into soil. *Biol. Fert. Soils.* 1992; 14: 14-22.
84. Vassilev N, Toro M, Vassileva M, Azcon R, Barea JM. Rock phosphate solubilization by immobilized cells of *Enterobacter* sp. in fermentation and soil conditions. *Bioresour. Technol.* 1997; 61: 28-32.
85. Willaert RG, Baron GV. Gel entrapment and microencapsulation: methods, applications and engineering principles. *Reviews in Chemical Engineering.* 1996; 12: 1-205.

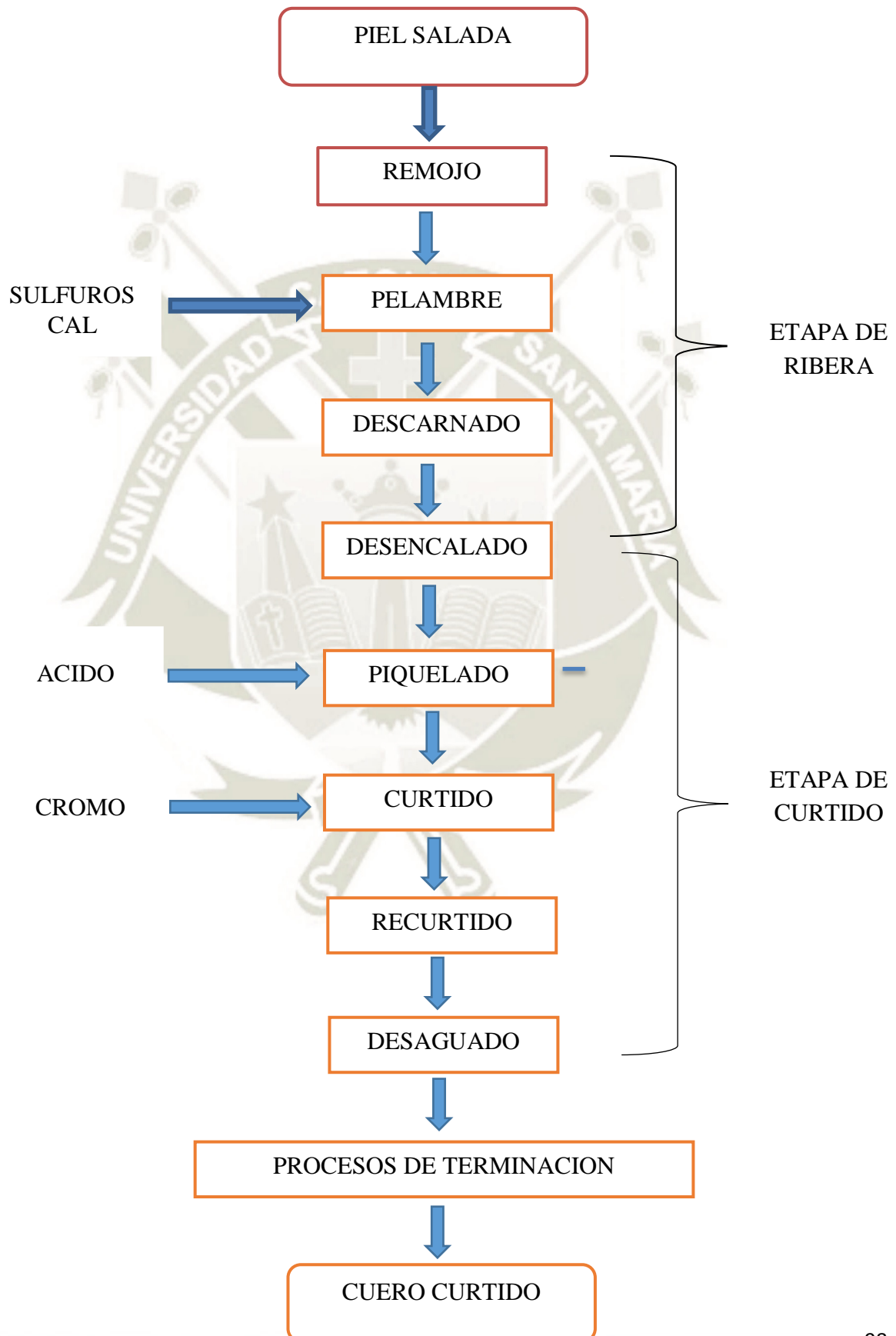


86. Gallegos N. Los procesos de producción y su incidencia en la calidad del producto terminado en la “Curtiduría Gallegos e Hijos” de la ciudad de Ambato. 2012
87. Akhtar N, Iqbal J, Iqbal M. Removal and recovery of nickel (II) from aqueous solution by Loofa sponge immobilized biomass of *Chlorella sorokiniana* characterization studies. *J. Hazard. Mater.* 2004; 94: 108.
88. Angelova MB, Pashov, SB, Slokoska KS. Comparison of antioxidant enzyme biosynthesis by free and immobilized *Aspergillus niger* cells. *Enzyme Microbiology Technology.* 2000; 26:544–549.
89. Annadura, G, Mathalai, S Murugesan T. Design of experiments in the biodegradation of phenol using immobilized *Pseudomonas pictorum* (NICM-2077) on activated carbon. *Bioprocess Engineering.* 2000; 22: 101-107.
90. Bandhyopadhyay K, Das D, Maiti B. Solid matrix characterization of immobilized *Pseudomonas putida* MTCC 1194 used for phenol degradation. *Applied Microbiology Biotechnology.* 1999; 51: 891-895.
91. Barragán-Huerta BE. Degradación de colorantes textiles por cultivos bacterianos. Universidad de Salamanca, Salamanca, España, 2004.
92. Barragán BE. Aportación de los microorganismos asociados al grano verde de café en la degradación de plaguicidas organoclorados y su relación con la capacidad de adsorción del grano. Tesis doctoral. CINVESTAV. México, 2006
93. Barragán BE, Costa C, Márquez. Biodegradation of azo dyes by bacteria inoculated on solid media. *Dyes and pigments.* 2007; 75:73-81.
94. Barragán B, Costa, C, Peralta J, Barrera, J, Esperanza F, Rodríguez R. Bio-degradation of organochlorine pesticides by bacteria grown in microniches of the porous structure of green bean coffee. *International Biodeterioration & Biodegradation.* 2007; 59: 239-244.
95. Blanco A, Sanz B, Llama MJ, Serra JL. Biosorption of heavy metals to immobilized *Phormidium laminosum* biomass. *Journal of Biotechnology.* 1999; 69: 227–240.
96. Castillo L, González K. Evaluación de tres soportes de inmovilización y dos condiciones nutricionales para *Trametes versicolor* en la remoción del colorante Negro Reactivo 5 en columna de burbujeo. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá-Colombia, 2007.
97. Chang J, Chien Ch, Shan-Yu Ch. Decolorization of azo dyes with immobilized *Pseudomonas luteola*. *Process Biochemistry.* 2001; 35:757-763.

98. Chapatwala K, Babu G, Vijaya O, Kumar K, Wolfram, J. Biodegradation of cyanides, cyanates and thiocyanates to ammonia and carbon dioxide by immobilized cells of *Pseudomonas putida*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 1998; 20:28-33.
99. Chitiva L, Dussán J. Evaluación de matrices para la inmovilización de *Pseudomonas* spp. en biorremediación de fenol. *Revista colombiana de biotecnología*. 2003; 2: 5-10.
100. Cohen Y. Biofiltration - the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. *Bioresource Technology*. 2001; 77: 257-274.
101. Couto S, Toca J. Industrial and biotechnological application of laccases: A review. *Biotechnology advances*. 2006; 24: 500-513.
102. Diaz MP, Boyd K, Grigson S, Burgués J. Biodegradation of crude oil across a wide range of salinities by an extremely halotolerant bacterial consortium MPD-M, immobilized onto polypropylene fibers. *Biotechnology and Bioengineering*. 2002; 79: 145-153.
103. Domínguez A, Couto S, Sanromán Ma. Dye decolorization by *Trametes hirsute* immobilized into alginate vedas. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2005; 21:405-409.
104. Doronina N, Nazarov N, Ezhov V, Trotsenko, Y. Biodegradation of Methyl and Ethyl Acetates by Immobilized *Pseudomonas esterophilus* Cells. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2006; 42(1):45-47.
105. Dwyer D, Krumme M, Boyd S, Tiedje J. Kinetics of phenol biodegradation by an immobilized methanogenic consortium. *Applied and environmental microbiology*. 1986; 52(2): 345-351.
106. Fava F, Di Gioia D, Marchetti L, Quattroni G, Aerobic dechlorination of low chlorinated biphenils by bacterial biofilms in packed-bed bath bioreactors. *Applied Microbiology & Biotechnology*. 1996; 45: 562-568.
107. Molina M. Plomo, cromo III y cromo VI y sus efectos sobre la salud humana. *Ciencia & Tecnología para la Salud Visual y Ocular*. 2010; 8(1): 77-88.

## ANEXOS

### ANEXO A. Flujograma de procesos de curtido de cuero



**ANEXO B. Medio Dextrosa Extracto de Levadura (YPD)****Composición:**

<b>Peptona</b>	<b>20 g/L</b>
<b>Extracto de levadura</b>	<b>10 g/L</b>
<b>Dextrosa</b>	<b>20 g/L</b>
<b>Agar agar</b>	<b>15 g/L</b>

**Preparación:**

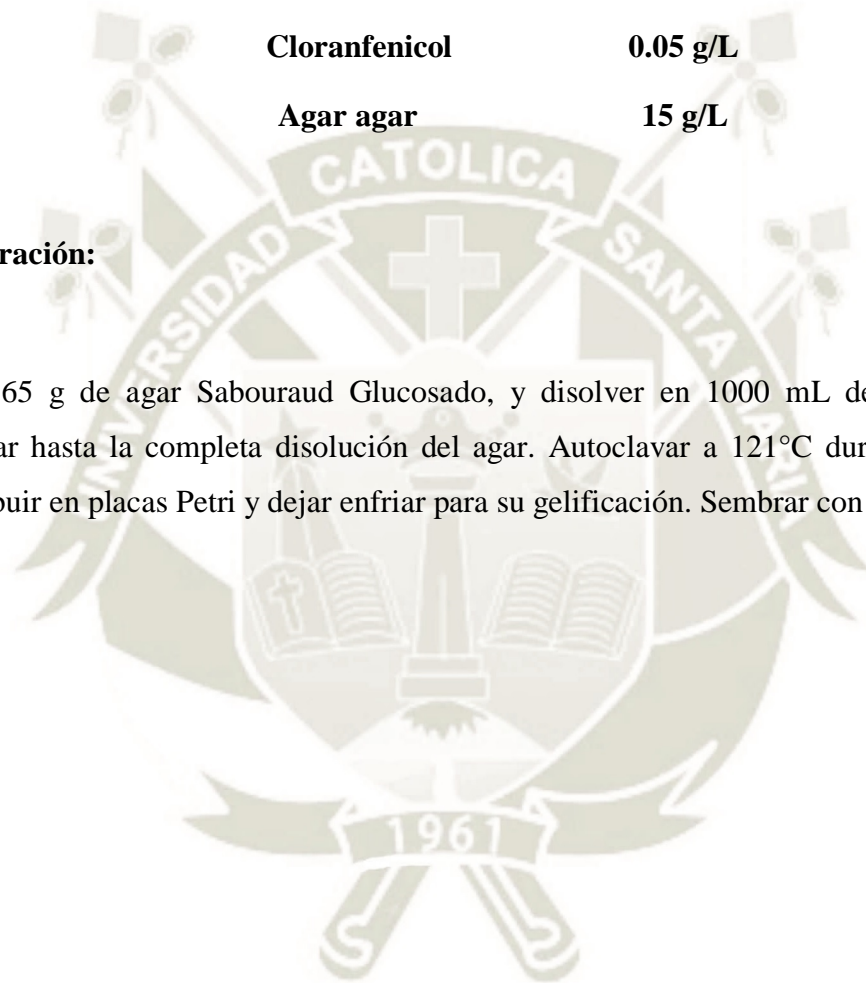
Pesar 65 g de agar Dextrosa Extracto de Levadura, y disolver en 1000 mL de agua destilada, calentar hasta la completa disolución del agar. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos. Distribuir en placas Petri y dejar enfriar para su gelificación. Sembrar con asa de Kohle.

**ANEXO C. Agar Sabouraud Glucosado (ASG)****Composición:**

<b>Pluripeptona</b>	<b>10 g/L</b>
<b>Glucosa</b>	<b>40 g/L</b>
<b>Cloranfenicol</b>	<b>0.05 g/L</b>
<b>Agar agar</b>	<b>15 g/L</b>

**Preparación:**

Pesar 65 g de agar Sabouraud Glucosado, y disolver en 1000 mL de agua destilada, calentar hasta la completa disolución del agar. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos. Distribuir en placas Petri y dejar enfriar para su gelificación. Sembrar con asa de Kohle.



**ANEXO D. Agar Extracto de Malta (MEA)****Composición:**

<b>Maltosa</b>	<b>12.75 g/L</b>
<b>Dextrina</b>	<b>2.75 g/L</b>
<b>Glicerol</b>	<b>2.35 g/L</b>
<b>Peptona</b>	<b>0.78 g/L</b>
<b>Agar agar</b>	<b>15 g/L</b>

**Preparación:**

Pesar 33.6 g de agar Extracto de malta, y disolver en 1000 mL de agua destilada, calentar hasta la completa disolución del agar. Autoclavar a 121°C durante 15 minutos. Distribuir en placas Petri y dejar enfriar para su gelificación. Sembrar con asa de Kohle.

**ANEXO E. Agar Triple Azúcar Hierro (TSI)****Composición:**

<b>Extracto de carne</b>	<b>3.0</b>
<b>Pluripeptona</b>	<b>20.0</b>
<b>Cloruro de sodio</b>	<b>5.0</b>
<b>Lactosa</b>	<b>10.0</b>
<b>Sacarosa</b>	<b>10.0</b>
<b>Glucosa</b>	<b>1.0</b>
<b>Sulfato de hierro y amonio</b>	<b>0.2</b>
<b>Tiosulfato de sodio</b>	<b>0.2</b>
<b>Rojo de fenol</b>	<b>0.025</b>
<b>Agar</b>	<b>13.0</b>

**Preparación:**

Suspender 62.5 g del polvo por litro de agua destilada. Mezclar bien y calentar con agitación frecuente, hervir 1 o 2 minutos hasta disolución total. Llenar hasta la tercera parte de los tubos de ensayo. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Enfriar en pico de flauta profundo.

**ANEXO F. Agar Kligler Hierro (KIA)****Composición:**

<b>Peptona de carne</b>	<b>13.0</b>
<b>Cloruro de sodio</b>	<b>5.0</b>
<b>Lactosa</b>	<b>10.0</b>
<b>Tripteina</b>	<b>10.0</b>
<b>Glucosa</b>	<b>1.0</b>
<b>Citrato de hierro y amonio</b>	<b>0.5</b>
<b>Tiosulfato de sodio</b>	<b>0.3</b>
<b>Rojo de fenol</b>	<b>0.025</b>
<b>Agar</b>	<b>15.0</b>

**Preparación:**

Suspender 54.8 g del polvo por litro de agua destilada. Mezclar bien y calentar con agitación frecuente, hervir 1 o 2 minutos hasta disolución total. Llenar hasta la tercera parte de los tubos de ensayo. Esterilizar a 121°C por 15 minutos. Enfriar en pico de flauta profundo.



**ANEXO G. Agar SIM****Composición:**

<b>Tripteína</b>	<b>20.0</b>
<b>Peptona</b>	<b>6.1</b>
<b>Sulfato de hierro y amonio</b>	<b>0.2</b>
<b>Tiosulfato de sodio</b>	<b>0.2</b>
<b>Agar</b>	<b>3.5</b>

**Preparación:**

Suspender 30 g del polvo por litro de agua destilada. Mezclar hasta disolver; calentar agitando y hervir durante un minuto. Distribuir unos 4 ml en tubos de hemólisis y esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Solidificar en posición vertical.

**ANEXO H. Agar Nitrato****Composición:**

<b>Peptona</b>	<b>10.0</b>
<b>Cloruro de sodio</b>	<b>5.0</b>
<b>Extracto de carne</b>	<b>3.0</b>
<b>Glucosa</b>	<b>10.0</b>
<b>Agar</b>	<b>4.0</b>
<b>Azul de bromotimol</b>	<b>0.01</b>
<b>Nitrato de potasio</b>	<b>1.0</b>

**Preparación:**

Suspender 33 g de polvo por litro de agua destilada. Dejar embeber 2 minutos. Calentar a ebullición hasta disolver. Distribuir en tubos de 10 mm de diámetro, 10 ml por tubo. Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Si no se usa de inmediato, hervir el medio antes de usarlo, a fin de eliminar el oxígeno. Solidificar en posición vertical

**ANEXO I. Agar Lisina Hierro (LIA)****Composición:**

<b>Peptona de gelatina</b>	<b>5.0</b>
<b>Extracto de levadura</b>	<b>3.0</b>
<b>Glucosa</b>	<b>1.0</b>
<b>Lisina</b>	<b>10.0</b>
<b>Citrato de hierro y amonio</b>	<b>0.5</b>
<b>Tiosulfato de sodio</b>	<b>0.04</b>
<b>Púrpura de bromocresol</b>	<b>0.02</b>
<b>Agar</b>	<b>15.0</b>

**Preparación:**

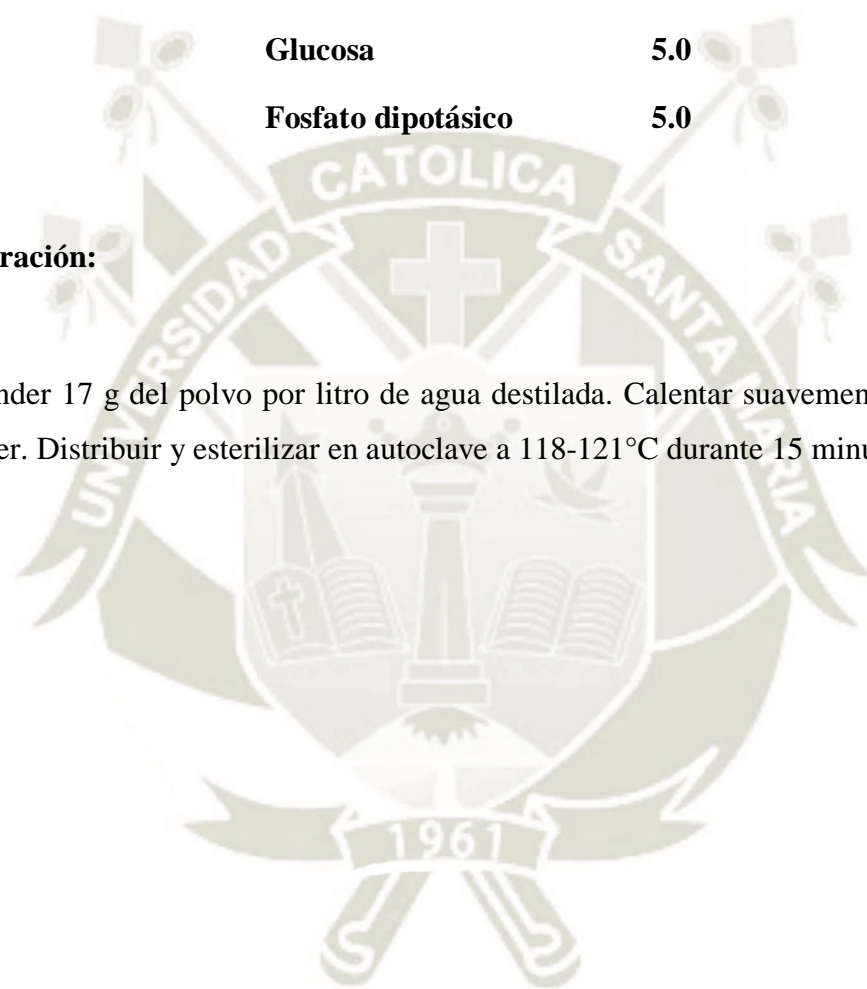
Suspender 35 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada. Dejar embeber unos 15 minutos. Calentar cuidadosamente, agitando con frecuencia y hervir durante un minuto hasta la disolución completa. Distribuir y esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Enfriar en pico de flauta dejando un fondo vertical apto para la punción.

**ANEXO J. Caldo Rojo de Metilo – Voges Proskauer (MR-VP)****Composición:**

<b>Pluripeptona</b>	<b>7.0</b>
<b>Glucosa</b>	<b>5.0</b>
<b>Fosfato dipotásico</b>	<b>5.0</b>

**Preparación:**

Suspender 17 g del polvo por litro de agua destilada. Calentar suavemente agitando hasta disolver. Distribuir y esterilizar en autoclave a 118-121°C durante 15 minutos.



**ANEXO K. Medio Christensen (Urea Base Agar)****Composición:**

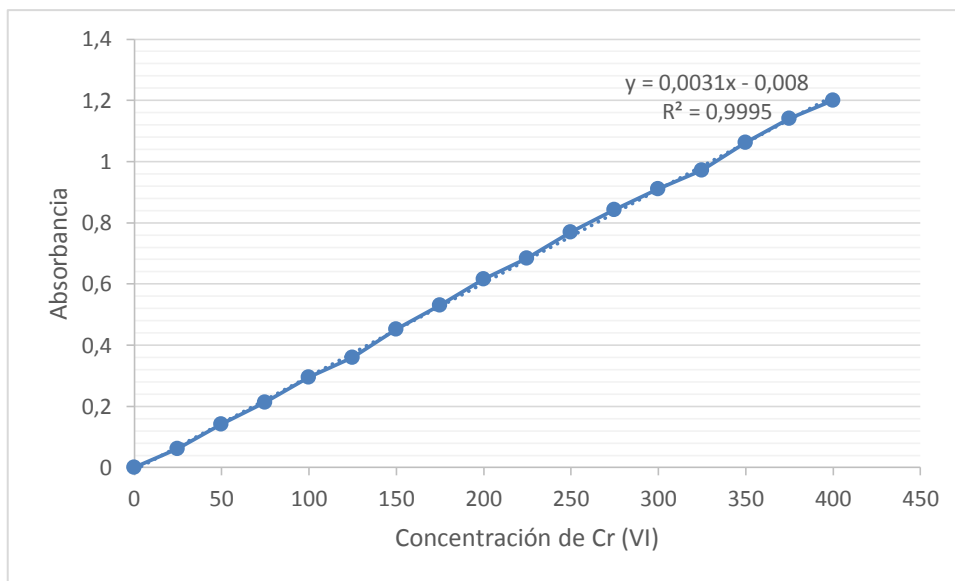
<b>Tripteína</b>	<b>1.0</b>
<b>Glucosa</b>	<b>1.0</b>
<b>Cloruro de sodio</b>	<b>5.0</b>
<b>Fosfato monopotásico</b>	<b>2.0</b>
<b>Rojo de fenol</b>	<b>0.012</b>
<b>Agar</b>	<b>15.0</b>

**Preparación:**

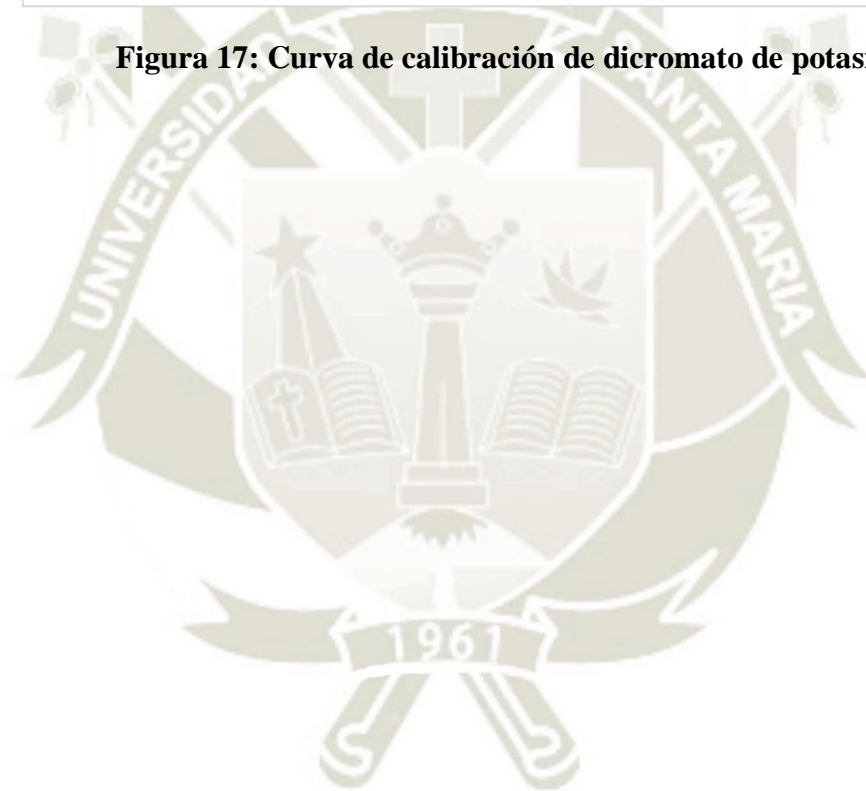
Suspender 24 g de polvo en 950 ml de agua destilada. Dejar reposar 2 minutos. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 50°C y agregar 50 ml de una solución de urea al 40% previamente esterilizada por filtración o cloroformo. Fraccionar en tubos de hemólisis y solidificar en pico de flauta con fondo profundo.

## ANEXO L . Curva de calibración de Dicromato de Potasio

<b>Concentración Dicromato de Potasio (mg/L)</b>	<b>Absorbancia (OD)</b>
<b>0</b>	<b>0</b>
<b>25</b>	<b>0.062</b>
<b>50</b>	<b>0.142</b>
<b>75</b>	<b>0.213</b>
<b>100</b>	<b>0.295</b>
<b>125</b>	<b>0.360</b>
<b>150</b>	<b>0.452</b>
<b>175</b>	<b>0.531</b>
<b>200</b>	<b>0.617</b>
<b>225</b>	<b>0.685</b>
<b>250</b>	<b>0.769</b>
<b>275</b>	<b>0.843</b>
<b>300</b>	<b>0.911</b>
<b>325</b>	<b>0.972</b>
<b>350</b>	<b>1.062</b>
<b>375</b>	<b>1.141</b>
<b>400</b>	<b>1.201</b>



**Figura 17: Curva de calibración de dicromato de potasio**



**ANEXO M . Determinación de concentración de Cromo (VI) en muestras medidas al espectrofotómetro**

- Determinación de Cromo (VI) de salida en muestra de aguas sintéticas y en muestra de efluente curtiembre, empleando cepa inmovilizada:

Absorbancias: Muestra de curtiembre 0.185, muestra de agua sintética 0.208.

Aplicando la fórmula de la pendiente obtenida de la curva de calibración de Dicromato de potasio:

$$y = 0.0031x - 0.008$$

Despejando para hallar X:

$$x = \frac{y + 0.008}{0.0031}$$

Aplicando las absorbancias obtenidas:

Absorbancia muestra curtiembre: 0.185

$$x = \frac{0.185 + 0,008}{0.0031}$$

$$y = 62.26 \text{ mg/L}$$

Porcentaje de Cromo (VI) final:

- Cromo (VI) inicial: 529.35 mg/L
- Cromo(VI) final: 62.26 mg/L
- Porcentaje de Cromo (VI) final: 11.76 %

Absorbancia muestra agua sintética: 0k208

$$x = \frac{0.208 + 0.008}{0.0031}$$

$$y = 69.68 \text{ mg/L}$$



Porcentaje de Cromo (VI) final:

- Cromo (VI) inicial: 529.035 mg/L
  - Cromo (VI) final: 69.68 mg/L
  - Porcentaje de Cromo (VI) final: 13.94 %
- Determinación de Cromo (VI) de salida en muestra de aguas sintéticas y en muestra de efluente curtiembre, empleando sólo agar-agar:

Absorbancias: Muestra de curtiembre 0.005, muestra de agua sintética --01.

Aplicando la fórmula de la pendiente obtenida de la curva de calibración:

$$y = 0.0031x - 0.008$$

Despejando para hallar X:

$$x = \frac{y + 0.008}{0.0031}$$

Aplicando las absorbancias obtenidas:

Absorbancia muestra curtiembre: 0,005

$$x = \frac{0.005 + 0.008}{0.0031}$$

$$y = 4,19 \text{ mg/L}$$

Porcentaje de Cromo (VI) final:

- Cromo (VI) inicial: 529.35 mg/L
- Cromo (VI) final: 525.16 mg/L
- Porcentaje de Cromo (VI) final: 99.21 %

Absorbancia muestra agua sintética: 0n001

$$x = \frac{0.001 + 0.008}{0.0031}$$

$$y = 2.90 \text{ mg/L}$$

Porcentaje de Cromo (VI) final:

- Cromo (VI) inicial: 529.35 mg/L
- Cromo (VI) final: 497.1 mg/L
- Porcentaje de Cromo (VI) final: 99.42 %



**ANEXO N . Conteo en cámara de Neubauer y Densidad Óptica**

<b>UFC/mL</b>	<b>OD</b>	<b>Tiempo (h)</b>
<b>27440</b>	0.001	0
<b>31150</b>	0.004	4
<b>34440</b>	0.01	8
<b>42700</b>	0.013	12
<b>56210</b>	0.018	16
<b>71960</b>	0.022	20
<b>105150</b>	0.029	24
<b>120750</b>	0.032	28
<b>142875</b>	0.039	32
<b>192150</b>	0.049	36
<b>288000</b>	0.068	40
<b>382500</b>	0.09	44
<b>445860</b>	0.103	48
<b>408690</b>	0.091	52
<b>389610</b>	0.086	56
<b>358650</b>	0.081	60
<b>336600</b>	0.075	64
<b>284760</b>	0.058	68
<b>254070</b>	0.054	72

**ANEXO O . Lecturas a 540 nm en el espectrofotómetro UV-vis**

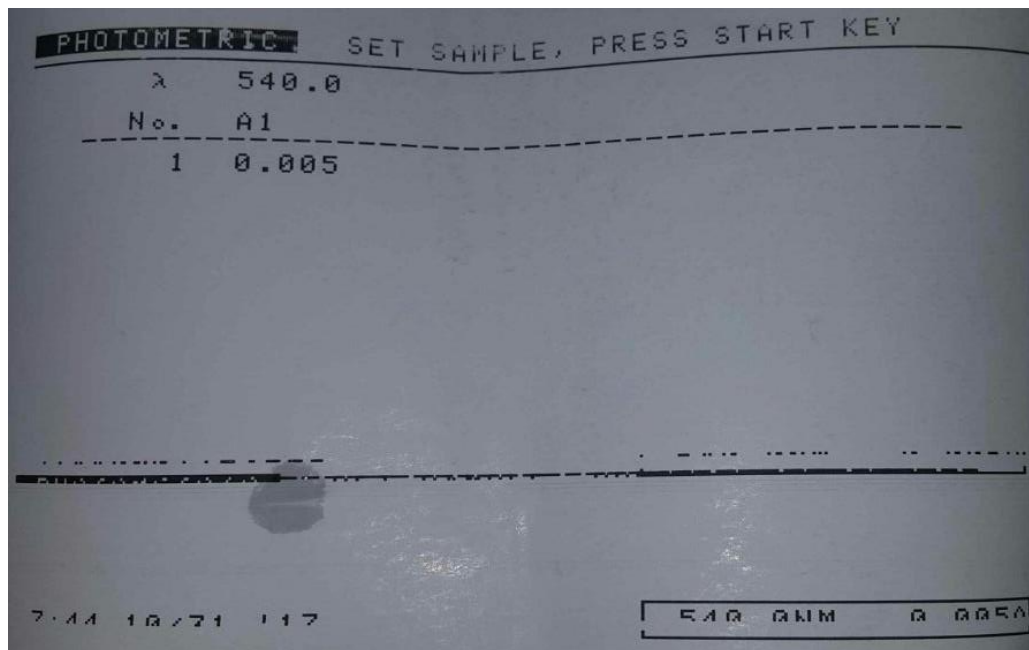
- Lectura de muestra de agua sintética, sistema agar-agar:



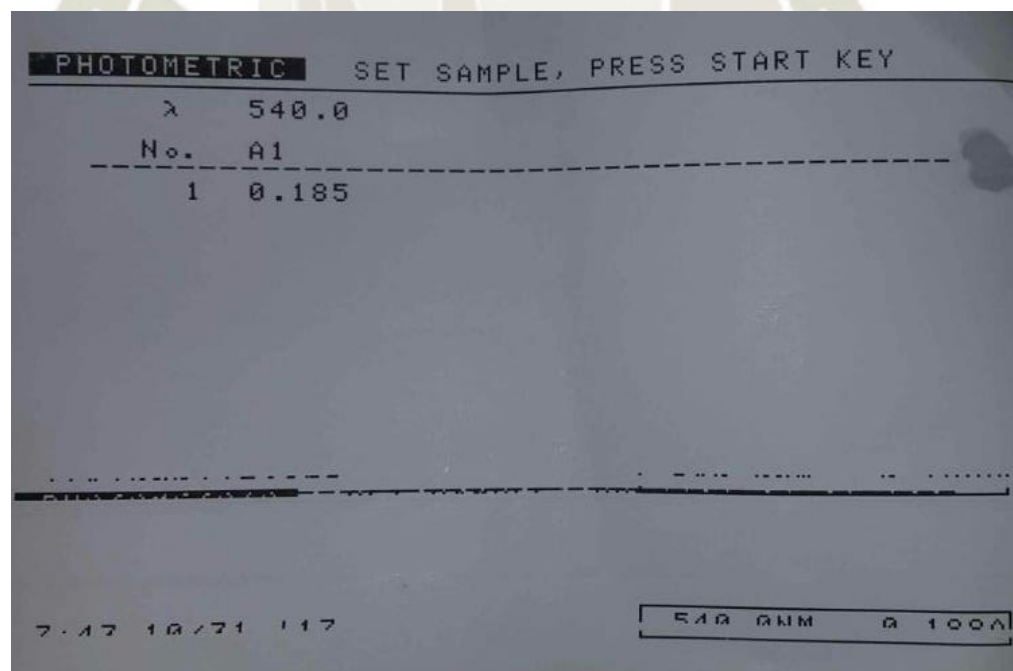
- Lectura de muestra de agua sintética, sistema cepa inmovilizada:



- Lectura de muestra de efluente curtiembre, sistema agar-agar:



- Lectura de muestra de efluente curtiembre, sistema cepa inmovilizada:



**ANEXO P . Lecturas absorbancias y conteo en cámara de Neubauer en cinéticas de crecimiento**

TIEMPO (h)	CRECIMIENTO (UFC / ml)			
	1	2	4	PROMEDIO
0	27540	26420	28360	27440
4	31160	34150	28140	31150
8	34360	35710	33250	34440
12	42600	42390	43110	42700
16	56220	57420	54990	56210
20	71850	71910	72120	71960
24	105130	106410	103910	105150
28	120710	121960	119580	120750
32	142750	153940	131935	142875
36	192110	184220	200120	192150
40	288150	298990	276860	288000
44	382410	391600	373490	382500
48	445880	469410	422290	445860
52	408670	419710	397690	408690
56	389590	395630	383610	389610
60	358700	367510	349740	358650
64	336510	343720	329570	336600
68	284810	292540	276930	284760
72	254010	241080	267120	254070

TIEMPO (h)	OD			
	1	2	3	PROMEDIO
0	0.001	0.001	0.001	0.001
4	0.003	0.008	0.001	0.004
8	0.010	0.007	0.013	0.010
12	0.011	0.021	0.007	0.013
16	0.016	0.009	0.029	0.018
20	0.019	0.018	0.029	0.022
24	0.027	0.027	0.033	0.029
28	0.034	0.032	0.030	0.032
32	0.037	0.035	0.045	0.039
36	0.047	0.046	0.054	0.049
40	0.065	0.068	0.071	0.068
44	0.080	0.084	0.106	0.090
48	0.104	0.104	0.101	0.103
52	0.088	0.089	0.096	0.091
56	0.084	0.083	0.091	0.086
60	0.079	0.079	0.085	0.081
64	0.073	0.069	0.083	0.075
68	0.058	0.049	0.067	0.058
72	0.051	0.063	0.048	0.054

**ANEXO Q . Lecturas absorbancias para determinación de Cromo (VI)**

<b>AGUA SINTETICA</b>				
	<b>Concentración Cromo (VI) Inicial (mg/L)</b>	<b>Concentración Cromo (VI) final (mg/L)</b>	<b>Porcentaje de Cromo (VI) residual</b>	<b>Porcentaje de remoción Cromo (VI)</b>
<b>M1</b>	529.35	79.68	15.05	84.95
<b>M2</b>	529.35	92.58	17.49	82.51
<b>M3</b>	529.35	91	17.19	82.81

<b>EFLUENTE DE CURTIEMBRE</b>				
	<b>Concentración Cromo (VI) Inicial (mg/L)</b>	<b>Concentración Cromo(VI) final (mg/L)</b>	<b>Porcentaje de Cromo (VI) residual</b>	<b>Porcentaje de remoción de Cromo (VI)</b>
<b>M1</b>	529.35	65.81	12.43	87.57
<b>M2</b>	529.35	79	14.92	85.08
<b>M3</b>	529.35	62.26	11.76	88.24




**ANEXO R . Adaptación de *Saccharomyces cerevisiae* a diferentes concentraciones de Cromo (VI).**

mg/L / h	UFC/ mL														PROMEDIO
	0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48	52	
0	19551	20715	24539	30424	32040	41017	59936	69190	81867	110102	165024	219173	255478	232953	59491.36
0	20580	21805	25830	32025	33726	43176	63090	72450	85725	115290	172800	229500	267516	245214	62408.82
0	19963	21151	25055	31064	32714	41881	61197	70277	83925	112869	169171	224681	261898	240065	60842.45
50	19248	20394	24159	29953	31227	39977	58415	67081	79373	106747	161620	214651	250208	229349	58017.64
50	19345	20497	24280	30104	31702	40585	59305	68103	80582	108373	162432	215730	251465	230501	58664.36
50	19055	20189	23916	29652	31068	39774	58119	66741	78970	106205	159996	212494	247693	227044	57607.73
100	19683	20854	24704	30629	32256	41294	60339	68870	80816	108689	162906	216359	252198	231173	59185.45
100	20312	21522	25494	31609	33288	42615	62270	71073	84096	113099	169517	225140	262433	240555	61354.09
100	19805	20983	24857	30818	32455	41549	60713	69297	81994	109707	164431	218385	254560	233338	59691.73
200	20068	21263	25188	31229	32888	42103	61025	70577	83509	112310	168334	223568	260602	237189	60772.18
200	20395	21609	25598	31737	33422	42787	62017	71218	84268	113330	169862	225599	262968	241045	61476.64
200	19966	21155	25060	31070	32721	41889	60715	69723	83004	111630	167314	222215	259024	237430	60386.09
400	20477	21696	25701	31545	33220	42528	62144	71363	84439	113561	171936	228353	266178	243988	61691.82
400	20211	21414	25135	30851	32489	41593	60776	69793	82581	111062	168153	225384	262718	240816	60368.91

<b>400</b>	19986	21436	25392	31166	32821	42018	60652	69651	82413	109813	166262	220817	257395	235936	60146.36
<b>500</b>	18920	20046	23746	29441	31005	39693	58000	66605	78809	105988	158858	214651	250208	229349	57373.73
<b>500</b>	18674	19785	23224	28794	30323	38819	56724	65139	77075	103657	155364	211861	246955	226367	56143.45
<b>500</b>	18466	19805	23461	29088	30633	39216	56608	65006	76917	102491	153616	207568	241951	221780	55937.00
<b>600</b>	18580	19686	23108	28650	30171	38625	56440	64814	76690	103138	168669	224014	261121	239352	57142.82
<b>600</b>	18339	19430	22599	28019	29507	37775	55199	63388	75002	100869	164958	221102	257726	236241	55916.82
<b>600</b>	18134	19450	22830	28306	29809	38162	55086	63258	74849	99735	163103	216621	252504	231454	55702.00



**ANEXO S . Informe de ensayo físico químico.**

 **UNSA**  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN DE AREQUIPA

UNIDAD DE PRODUCCION DE BIENES Y  
PRESTACION DE SERVICIOS  
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN Y SERVICIOS  
LABINVSERV

**INFORME DE ENSAYO FÍSICO QUÍMICO**

Nº DE REPORTE: 18901-17

NOMBRE DEL CLIENTE	: SUSAN GUZMAN
DIRECCIÓN	:
ASUNTO	: ANÁLISIS FÍSICO QUÍMICO
PRODUCTO	: AGUA
CANTIDAD DE MUESTRAS	: 01
LUGAR Y FECHA DE RECEPCIÓN	: AREQUIPA, 2017-10-06
CARACTERÍSTICAS Y CONDICIONES	: BOTELLA DE PLÁSTICO
FECHA DE ENTREGA DE RESULTADOS	: AREQUIPA, 2017-10-27
REFERENCIA	: MUESTRA PROPORCIONADA POR EL CLIENTE
PROCEDENCIA	: AGUA CURTIEMBRE
OBRA	:
CODIGO DE REGISTRO DE MUESTRA	: 24620

- LOS RESULTADOS OBTENIDOS CORRESPONDEN AL ANÁLISIS SOLICITADO EN LA MUESTRA RECIBIDA.
- ESTE FORMATO NO SERÁ REPRODUCIDO SIN AUTORIZACIÓN DEL LABORATORIO SERVILAB

Dr. Juan Pablo Larrea  
Jefe de Laboratorio

Dr. César Pablo Angulo Urbina  
Químico

PAGINA 1 DE 2

Av. Independencia s/n Ciudad Universitaria Laboratorio 108-Primer Piso  
Teléfono: 220360 E-mail: fenf\_labinvserv@unsa.edu.pe



**UNESA**  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN DE AREQUIPA

UNIDAD DE PRODUCCION DE BIENES Y  
PRESTACION DE SERVICIOS  
LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN Y SERVICIOS  
LABINVSERV

## INFORME DE ENSAYO

Nº DE REPORTE: 18901-17

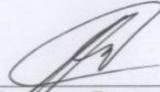
DETERMINACIÓN DE :	MG/L			
	CROMO	529.40		
CADMIO	N / D			
PLOMO	N / D			
OBSERVACIONES:				

### METODO DE ENSAYO

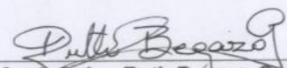
DETERMINACIÓN	METODO DE ENSAYO APLICADO NORMA /REFERENCIA / NOMBRE
METALES PESADOS	METALES PESADOS POR ABSORCION ATOMICA

Emitido en Arequipa (Perú), el 27 de octubre del 2017

PAGINA 2 DE 2

  
**Dr. Juan Reyes Larico**  
Jefe de Laboratorio  
RCQP - 348



  
**Anal. Quim. Ruth Begazo Guillén**  
Químico Responsable

Av: Independencia s/n Ciudad Universitaria Laboratorio 108 -Primer Piso  
Teléfono: 220360 E-mail: fenf\_labinvserv@unsa.edu.pe