

REMEDIACION DE RESIDUOS SÓLIDOS CONTAMINADOS CON Cr(VI) POR UN HONGO FILAMENTOSO

(Remediation of waste contaminated with Cr (VI) by a filamentous fungus)

¹Antonela Márquez A.;¹ Ignacio Busnelli G.; ²Gladys Duca D. & ^{1*}Cristina Rubio M.

¹Instituto de Biotecnología. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia.

²Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Tucumán.

Ayacucho 471 (4000). Tucumán. Argentina. Tel: 54-03814107209.

*Autor para correspondencia: mcrubio@fbqf.unt.edu.ar

RECIBIDO:14 de Diciembre de 2014

APROBADO:10 de Marzo de 2015

LOS AUTORES DECLARAN NO TENER CONFLICTO DE INTERESES

Palabras claves: *Aspergillus niger*, Biorremediación, Cr(VI), residuos sólidos

Key words: *Aspergillus niger*, Bioremediation, Chromium, solid waste

RESUMEN

La biotecnología ambiental recurre a organismos capaces de reducir los niveles de metales pesados, entre ellos el Cr(VI), contenido en residuos y efluentes agroindustriales. El objetivo del trabajo fue estudiar la biorremediación de un residuo como pulpa de limón contaminada con Cr(VI) y el efecto del metal sobre el crecimiento fúngico. Se utilizaron tres hongos filamentosos como *Aspergillus niger*; *Penicillium expansum* y *P. islandicum* para remediar pulpa de limón (residuo) contaminada con Cr(VI) (50 mg/L) que se realizó en las siguientes condiciones de cultivo: la pulpa se suplementó con urea, 0,006; (NH₄)₂SO₄, 0,012; KH₂PO₄, 0,003 y KCl, 0,001 g/g; 10⁵ conidios/g, a pH 2,5, 30°C y 96 h de incubación. Se estudió el efecto tóxico de diferentes concentraciones (5; 10; 20 y 50 mg/L) del metal sobre el desarrollo del hongo de mayor eficiencia de remediación (Ef.%). *Aspergillus niger*; obtuvo mayor EF. de remediación (97%) respecto a *Penicillium expansum* (95%) y *P. islandicum* (94%), del residuo contaminado con 50 mg/L de Cr(VI). Se determinó que la presencia de Cr(VI) y no su concentración estimuló la maduración temprana (48 h) de los conidios (blancos a negros) de *A. niger*, sin que se observe alteraciones en el micelio con

respecto al control (72h), desarrollado en la pulpa sin el metal. En conclusión, *A. niger* fue más resistente y presentó altas Ef. de remediación de Cr(VI) de residuos sólidos, este proceso es una alternativa a las tecnologías físico-químicas, debido que los microorganismos pueden remover selectivamente diferentes iones de zonas contaminadas.

ABSTRACT

Environmental biotechnology uses organisms capable of reducing levels of heavy metals, including the Cr (VI), contained in waste and agro-industrial effluents. The objective of this work was to study bioremediation of waste contaminated with Cr(VI) lemon pulp and the effect of the metal on the fungal growth. We used three filamentous fungi such as *Aspergillus niger*; *Penicillium expansum* and *P. islandicum* to remedy pulp from lemon (residue) contaminated with Cr(VI) (50 mg/L) that was conducted in the following conditions of cultivation: the pulp is supplemented with urea, 0.006; (NH₄)₂SO₄, 0.012; KH₂PO₄, 0.003 and KCl, 0.001 g / g; 10⁵ conidia/g, at pH 2.5, 30 ° C and 96 h of incubation. We studied the toxic effect of different concentrations (5, 10, 20 and 50 mg/L) of the metal on the

development of the fungus increased efficiency of remediation (Ef.%). *Aspergillus niger*; obtained greater EF. remediation (97%) with respect to *Penicillium expansum* (95%) and *P. islandicum* (94%), 50 mg/L of Cr (VI)-contaminated waste. It was determined that the presence of Cr (VI) and not its concentration stimulated early maturation (48 h) of conidia (white on black) from *A. niger*, unless you observe alterations in the mycelium as compared to the control (72 h), developed in the pulp without the metal. In conclusion, *A. niger* was stronger and presented high Ef. remediation of Cr (VI) waste, this process is an alternative to physico-chemical technologies, due to the micro-organisms be removed selectively different ions from contaminated areas.

INTRODUCCION

El cromo, es un metal pesado, que se aplica en procesos industriales como el curtido de cueros, electrónica, fabricación de colorantes, plaguicidas y fotograbados, por lo cual es el contaminante común de los desechos y efluentes industriales en forma de Cr(VI) (1). Las principales vías de intoxicación de éste metal, son por ingestión, inhalación y contacto con la piel, produciendo irritación del conducto gastrointestinal, perforaciones de la mucosa respiratoria y úlceras dérmicas. Por el contrario, otra especie del cromo, el Cr(III), es relativamente inocuo debido a la incapacidad para atravesar las membranas biológicas. Nutricionalmente, es un componente esencial en la dieta de todos los organismos, porque interviene en el metabolismo de la glucosa, proteínas y lípidos (2). La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (International Agency for Research on Cancer IARC), clasificó al Cr(VI) en el Grupo I, que corresponde a sustancias comprobadamente cancerígenas, mientras que al Cr(III) se incluyó en el Grupo II, como no cancerígenos (3). Los metales pesados no son ni química ni biológicamente degradables, por lo cual, una vez emitidos, pueden permanecer en el ambiente y ser adsorbido o asimilado por los vegetales u otros organismos, que al ser ingeridos por los animales, se transmiten a la cadena alimentaria.

Las industrias reducen el contenido de metales pesados, de los efluentes o residuos, por tratamientos

físicos y químicos como precipitación, ósmosis inversa, adsorción, etc. Estos métodos son efectivos pero tienen la desventaja de tener elevados costos, debido al precio de los productos químicos (4). Una alternativa a estos tratamientos, es la biorremediación, tecnología emergente que utiliza organismos vivos (plantas, algas, hongos y bacterias) que adsorben, degradan o transforman los contaminantes para eliminarlos, inactivarlos o atenuar su efecto (5). Los microorganismos, desempeñan un papel importante en la captación de metales tóxicos del medio ambiente, mediante mecanismos de biotransformación, bioacumulación, biosorción (bioadsorción) e inmovilización. Estos mecanismos se aplican en los ciclos biogeoquímicos en los cuales aparecen variantes microbianas capaces de tolerar los efectos nocivos de los metales, de allí surgen los microorganismos resistentes, caracterizados por poseer mecanismos de detoxificación codificados genéticamente e inducibles por el metal, y los tolerantes desarrollan indiferentes a la presencia del metal (6). Los microorganismos más estudiados en procesos de remediación son las bacterias debido que reducen el Cr(VI) tóxico a Cr(III) menos tóxico (7,8) y menos estudiados son los hongos filamentosos (9,10). De acuerdo a la bibliografía, las células fúngicas interactúan con el Cr (VI) y Cr(III) a diferentes niveles (Figura 1), desde la pared celular, el periplasma y la membrana plasmática, hasta el citoplasma y las organelas celulares (11). Estos microorganismos necesitan regular los niveles intracelulares de cromo, para mantener un balance entre la incorporación y expulsión del metal. (6,10,12,13,14).

Los metales contenidos en efluentes industriales que son vertidos al suelo o ríos pueden ser adsorbidos por residuos sólidos depositados en el suelo o ser disueltos en el agua. Debido a esto, los microorganismos empleados en procesos de remediación deben tener la capacidad de colonizar y utilizar los residuos sólidos como fuentes de carbono (15). El objetivo del trabajo fue estudiar la biorremediación de un residuo como pulpa de limón contaminada con Cr(VI) y el efecto del metal sobre el crecimiento fúngico.

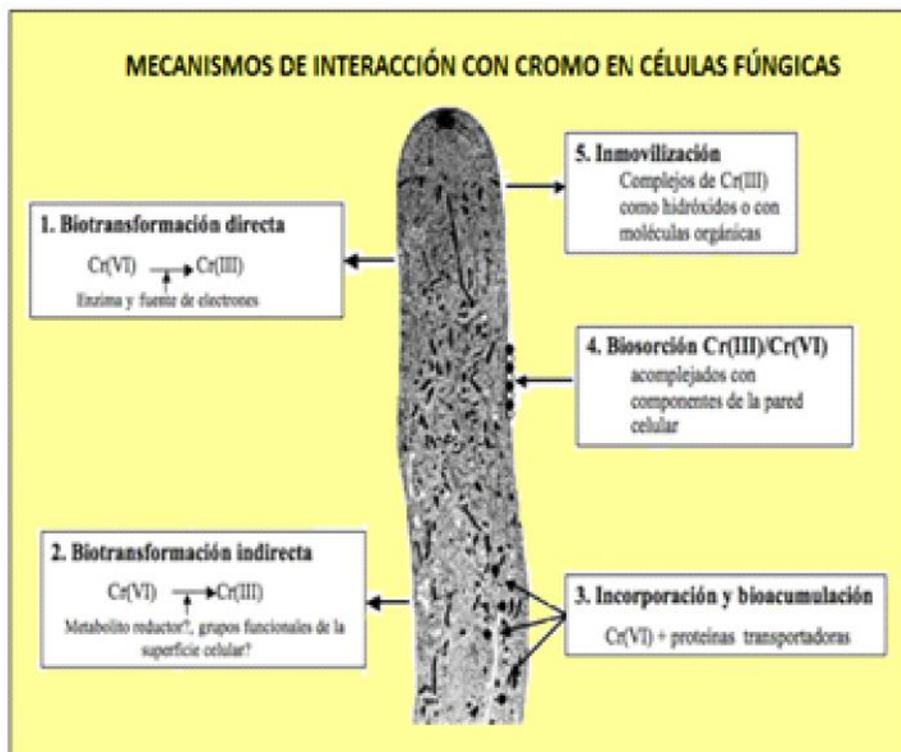


Figura 1: Mecanismos de interacción de la célula fúngica con Cr(VI) y Cr(III) (14)

MATERIALES Y MÉTODOS

I-Evaluación de la adsorción de Cr(VI) en el residuo cítrico: Para este ensayo se siguieron los siguientes pasos:

1-Adsorbente: Se utilizó pulpa de limón residual (residuo) de una Citrícola (Tucumán, Argentina) que se secó hasta un 80% de humedad, para la adsorción de Cr(VI) de una solución acuosa, a fin de obtener un residuo sólido contaminado con el metal para los ensayos de biorremediación.

2-Preparación de las soluciones de Cr(VI): Se preparó una solución patrón de Cr(VI) de 500 mg/L a pH 2,0 (H_2SO_4 al 20%, v/v). De ésta solución se preparó una concentración de Cr(VI) de 50 mg/L para un volumen final de 50 ml. En cada solución se verificó la concentración inicial del metal y el pH inicial.

3-Proceso de adsorción de Cr(VI) por pulpa de limón: Se pesó 20 g de pulpa y se colocó (por duplicado) en frascos de Erlenmeyer con 50 ml de la solución de Cr(VI) de 50 mg/L (a pH 2,0). Para la adsorción del metal, los Erlenmeyer se colocaron en

un agitador rotatorio a 30 °C y 100 rpm durante 1 h. Posteriormente, la pulpa (adsorbente) se separó de la solución por filtración con papel de filtro. En el filtrado obtenido se determinó Cr(VI) residual (Cr(VI)r) y el papel de filtro usado, fue disgregado y colocado en tubo con 5 ml de agua destilada (por triplicado) para determinar si el metal fue retenido por el papel. La cantidad de Cr(VI) adsorbido en la pulpa, fue determinado por la ecuación: $\text{Cr(VI)}_p = \text{Cr(VI)}_i - \text{Cr(VI)}_r$. Donde: Cr(VI)_p, es concentración del metal retenido por la pulpa; Cr(VI)_i, concentración inicial de la solución preparada y Cr(VI)_r, concentración del metal residual en el filtrado, obtenido después de extraer la pulpa (17).

II- Biorremediación de la pulpa contaminada con Cr(VI) por hongos filamentosos:

Para este ensayo se realizaron los siguientes pasos

1-Microorganismos: Se utilizaron *Aspergillus niger* (16); *Penicillium expansum* y *Penicillium islandicum*, del cepario de la Cátedra de Micología.

2-Mantenimiento de las cepas: Los microorganismos se mantuvieron activos por repiques sucesivos en medio Czapek modificado, que contiene,

en g/L: glucosa, 10; NaNO₃, 3; KH₂PO₄, 1; MgSO₄·7H₂O, 0,5; KCl, 0,5; agar, 15 y se llevó a pH 4,5 con H₂SO₄ (20 %,v/v). Las cepas se sembraron en tubos con este medio y se incubaron a 28 °C durante 96 h, posteriormente se mantuvieron a 4°C hasta su utilización.

3- Preparación de la suspensión de conidios: La suspensión se preparó para cada hongo en estudio, adicionando conidios a 50 ml de solución fisiológica y 0,05 ml de tween 80, hasta alcanzar una densidad óptica de 0,250, que equivale a 2x10⁶ conidios/ml, para una longitud de onda de 560 nm.

4- Ensayos de biorremediación: Para cada hongo se usaron distintas cajas de Petri con 20 g de pulpa de limón contaminada con Cr(VI) (50 mg/L) suplementada con urea, 0,006; (NH₄)₂SO₄, 0,013; KH₂PO₄, 0,003 y KCl, 0,001g/g de pulpa. Todas las cajas se esterilizaron a 121 °C por 15 minutos. Posteriormente, se inoculó con 1 ml de suspensión de esporos con 2x10⁶ conidios para obtener 10⁵ conidios/g de adsorbente. Paralelamente, se realizaron ensayos control para cada hongo, en cajas de Petri con pulpa sin Cr(VI), las sales anteriores y el inóculo del microorganismo en estudio. Todos los ensayos se incubaron en estufa a 30° C durante 96 h.

Una vez finalizado el proceso de biorremediación, a la pulpa fermentada (sistema pulpa contaminada con el desarrollo del microorganismo) se agregó 15 mL de agua destilada y se agitó durante 30 minutos para liberar el Cr(VI) adsorbido que pudo haber quedado en la superficie del sistema pulpa-microorganismo. Para separar la pulpa, se filtró usando membranas filtrantes de 0,45 μm, y el filtrado se usó para determinar Cr(VI) residual. La membrana filtrante se lavó con agua destilada (1 mL) y en las aguas de lavado se midió Cr(VI) residual para verificar que el metal no fue adsorbido por dicha membrana.

III-Efecto del Cr(VI) sobre las estructuras macroscópicas del hongo seleccionado: Se realizó una cinética de crecimiento del hongo seleccionado por la Ef. de remoción alta en cultivos en superficie, para determinar posibles modificaciones del micelio y elementos de fructificación, debido a la presencia de diferentes concentraciones de Cr(VI): 5;10; 20 y 50

mg/L. Las cajas de Petri con pulpa contaminada y suplementada con sales fueron inoculadas con 1 mL de una solución de 2x 10⁶ conidios para obtener 10⁵ conidios/ g de pulpa, a pH 2,5 e incubadas a 30 °C. Paralelamente, se realizaron ensayos control, en las mismas condiciones de cultivo anteriores y sin la adición del metal. Se tomaron muestras cada 24 h y se observaron en un microscopio (40x), Leica DM 500.

Determinaciones

Cr(VI) por el Método de Difenilcarbazida: Se tomó 2,5 mL de filtrado, se ajustó a pH 2,0 con H₂SO₄ al 20 % (v/v), se agregó 0,5 mL de 1,5- difenilcarbazida (DFC) (5 mg/mL) y se dejó reposar 10 min. para el desarrollo total de color. Posteriormente, se midió la densidad óptica (DO) de las muestras a una longitud de onda de 540 nm. Los valores se obtuvieron de una curva patrón DO vs Cr(VI), (mg/L) (18).

pH en sólidos: Se pesó 5 g de muestra (pulpa más microorganismo) y se añadió 10 mL de agua destilada, se agitó por 20 min., se dejó reposar 10 min. y se midió el pH en un equipo marca Microtec (19).

Cálculos matemáticos

Determinación de q: se define como cantidad de metal retenido por gramo de adsorbente (en peso seco) y se calcula por la siguiente ecuación: $q = (C_i - C_r) \times V_t / M_s$. Donde C_i, es concentración inicial de Cr(VI) en la solución; C_r, concentración residual de Cr(VI) en la solución remediada; V_t, volumen de la solución a remediar (50 ml expresado en litro) y M_s, masa del bioadsorbente, expresado en gramo de peso seco (p.s.) (17).

Eficiencia de adsorción (Ef) de la pulpa (adsorbente): Es el porcentaje de metal retenido por el adsorbente, y se calcula por: $E_f (\%) = [(C_i - C_r) / C_i] \times 100$. Donde C_i, es concentración inicial de Cr(VI) en la solución; C_r, concentración residual del metal en la solución remediada.

Eficiencia de remediación (Ef_r): Es el porcentaje de remoción de Cr(VI) de la pulpa por el microorganismo y se calcula por: $E_{f_r} (\%) = [(C_i - C_r) / C_i] \times 100$. Donde C_i, es concentración inicial de Cr(VI) retenido por la pulpa; C_r, concentración residual de Cr(VI) en la pulpa fermentada (pulpa más microorganismo)

Reproducibilidad de los resultados: Todos los experimentos se realizaron por duplicado y en ensayos separados. Los valores son el promedio de dos mediciones. Los mismos se analizaron para obtener la desviación estándar con un MS-Excel y calculados para F= 95 % (grado de confianza).

RESULTADOS

I-Evaluación de la adsorción de Cr(VI) en el residuo cítrico: La eficiencia de adsorción de la pulpa para una concentración de Cr(VI) de 50 mg/L fue 98,8 %. Durante la adsorción, el adsorbente no modificó el pH (2,5) de la solución, acidez ideal para la solubilidad del metal y la retención por el adsorbente.

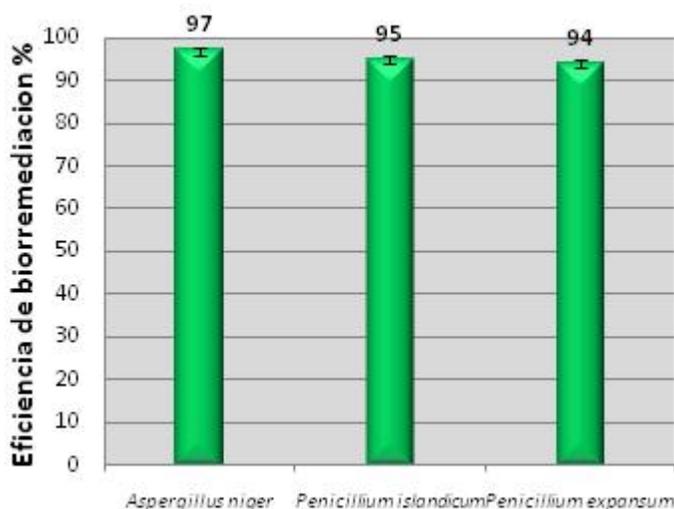


Figura 2: Eficiencia de remediación de Cr(VI) [50 mg/L] en la pulpa con diferentes hongos filamentosos. Valores calculados a las 96 h de incubación.

II- Biorremediación de la pulpa contaminada con Cr(VI) por hongos filamentosos: Los tres hongos, en estudio, mostraron eficiencias de biorremediación mayor al 90%, siendo *Aspergillus niger* el que obtuvo la máxima (Figura 2), mientras que con *Penicillium islandicum* y *P. expansum*, la misma fue 5 y 6% menor, respectivamente. Con todos los microorganismos, el desarrollo microbiano se evidenció por el aumento del pH inicial de la pulpa de 2,5 a pH 7,0 al final del proceso, debido a la asimilación de la urea y desprendimiento de amoníaco como fue reportado en la bibliografía(20).

III-Efecto del Cr(VI) sobre las estructuras macroscópicas del hongo seleccionado: El Cr(VI) adsorbido en la pulpa no produjo inhibición del crecimiento de *Aspergillus niger*, que fue el hongo seleccionado por mayor Ef. de remoción. Todas las concentraciones de Cr(VI) ensayadas produjeron el ennegrecimiento prematuro de los cultivos (figura 3,byc) a las 48 h de incubación, respecto al cultivo control (figura 3a) a ese tiempo. Este oscurecimiento se debe que el metal creó un ambiente de estrés que estimuló la maduración de los conidios de claros a oscuros como se observa en la figura 4b, respecto al control (fig. 4 a). Análisis microscópicos de las hifas y cuerpos de fructificación de *A. niger* no mostraron alteración o engrosamiento de hifas, lo cual indica que el Cr(VI) a 50 mg/L no tuvo un efecto negativo sobre el desarrollo del hongo.

DISCUSION

La pulpa de limón residual de la industria citrícola, presentó un valor de $q = 1,73$ mg/g (peso seco), similar a los reportados con biomasa viva de *Saccharomyces cerevisiae* (2,0 mg/g) (21) y 1,2 mg/g para biomasa inactiva de *Aspergillus niger* A2 (22), pero difiere del valor encontrado ($q = 4,3$ mg/g) para *Rhizopus* sp. (23). La pulpa presentó alta Ef. de adsorción de Cr(VI) y no alteró el pH de la solución a remediar (pH 2,5). Esto es importante porque a ese pH, la superficie del adsorbente adquiere mayor cantidad de protones, que inducen a una fuerte atracción por los iones Cr(VI) de la solución, cargados negativamente, por lo cual la adsorción incrementa. Esto muestra que la pulpa al ser vertida a los suelos puede inmovilizar al metal pesado reteniendo la contaminación en el medio ambiente, resultado que coincide con otras bibliografías (24, 25). La remediación de estos residuos sólidos contaminados es factible con hongos filamentosos, ya que poseen estrategias para la colonización de los residuos, distintas de las levaduras y bacterias. Esto se debe que los hongos tienen gran variedad de enzimas que hidrolizan celulosa, almidón, pectina, hemicelulosa, etc., de residuos agroindustriales, y cubren la superficie de los sólidos por extensiones y ramificaciones de hifas que componen el micelio (26).

Mientras que las levaduras y bacterias, se desarrollan mejor en cultivos líquidos (21,27). Los tres hongos ensayados presentaron Ef. de remediación mayores a 90 %, lo cual indica que en sistemas de cultivo en superficie, la mayor concentración de Cr(VI) empleada

(50 mg/L), no produjo inhibición significativa ($\bar{n} > 0,05$) del crecimiento celular. Pero se evidenció que el Cr(VI) produjo un medio ambiente extremo que influyó sobre la maduración de los elementos de reproducción y diseminación de *A. niger*.

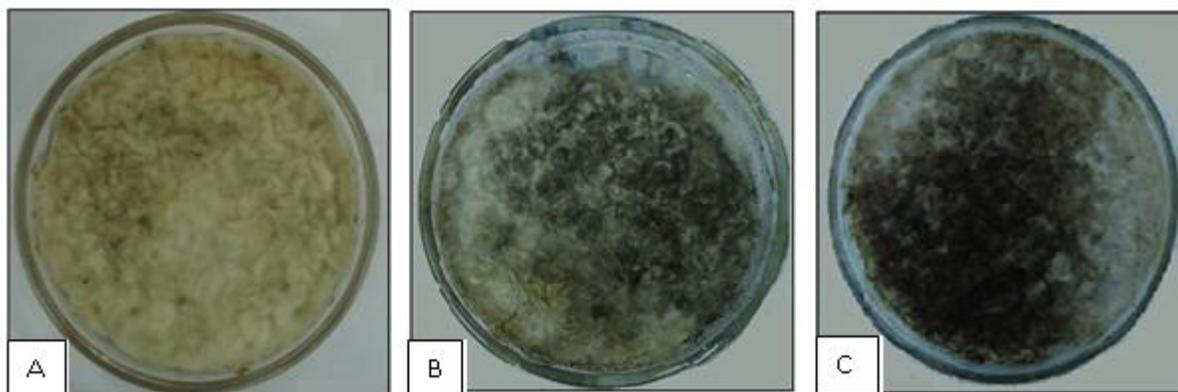


Figura 3: Desarrollo de *Aspergillus niger* en pulpa: **A)** sin adición de Cr(VI); **B)** con 5mg/L y **C)** con 50 mg/L del metal. Fotografías tomadas a las 48 h de incubación.

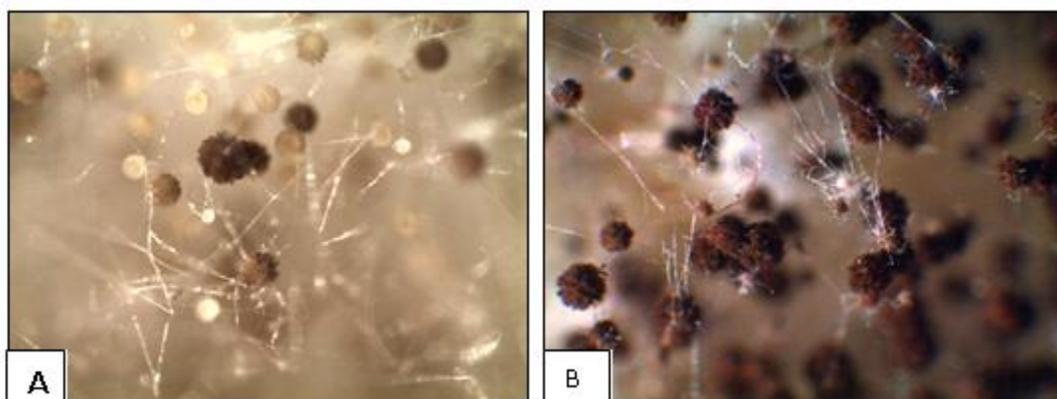


Figura 4: Cabezas aspergílicas e hifas de *Aspergillus niger* desarrollada en, **A:** Control, hongo crecido en pulpa sin Cr(VI). y **B:** pulpa con Cr(VI) [50 mg/L]. Fotografía de 48 h de incubación en cultivos en superficie (40x microscopio Leitz).

CONCLUSION

Los resultados de remediación de residuos contaminados con Cr(VI) mostraron que, *Aspergillus niger* fue más resistente a la acción del Cr(VI) y presentó alta eficiencia de remoción de Cr(VI) a 50 mg/L de residuos (97%) y puede ser empleado en procesos de remediación. Los procesos biotecnológicos aplicados a la purificación de residuos contaminados es una alternativa que tiene grandes

ventajas respecto a las tecnologías físico-químicas, debido que las biomásas fúngicas son naturales, se pueden obtener en grandes cantidades a bajo costo, y pueden remover selectivamente diferentes metales de zonas contaminadas.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la Universidad Nacional de Tucumán y al Centro de investigaciones de la UNT.

REFERENCIAS

1. **Ramírez Ramírez, R.; Calvo Méndez, C.; Avila Rodríguez, M.; Gutiérrez Corona, J.F. (2000).** Chromate resistance and reduction in a yeast strain isolated from industrial waste discharges. In: Environmental Engineering and Health Sciences. Section 4: Environmental Engineering Application. Water Res. Publ. pp.437-445.
2. **Alvarado Gómez, A., Blanco Saénz, R., Mora Moreli, E. (2002).** El cromo como elemento esencial en los humanos. Rev. Costarricense de Cs. Med. 23: 55-68.
3. **EPA/IRIS (2010).** U.S. Environmental Protection Agency. Toxicological Review of Hexavalent Chromium. External Review Draft. Washington.
4. **Wood, T.K. (2008).** Molecular approaches in bioremediation. Cur. Opinion Biotech. 19: 572-578.
5. **Gadd, G.M. (2000).** Bioremediation potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. Curr. Opinion Biotechnol. 11:271-279.
6. **Fukuda, T.; Ishino, Y.; Ogawa, A.; Tsutsumi, K.; Morita, H. (2008).** Chromium (VI) reduction from contaminated soils by *Aspergillus* sp. N2 and *Penicillium* sp. N3 isolated from chromium deposits. J. Gen. Appl. Microbiol. 54: 295-303.
7. **Mabbett, A.; Ping, Y.; Peter, J.; Farr, G.; Macaskie, L. (2004).** Reduction of Cr (VI) by palladized of *Desulfuvibrio desulfuricans* ATCC 29577. Biotechnol. Bioeng. 87: 104-109.
8. **Otiniano, M.; Tuesta, L.; Robles, H.; Luján, M.; Chávez, M. (2005).** Biorremediación de Cr(VI) de aguas residuales de curtiembres por *Pseudomonas* sp. y su efecto sobre el ciclo celular de *Allium cepa*. Rev. Méd. Vallejiana. 4: 32- 42.
9. **Acevedo Aguilar, F.J.; Espino Saldaña, A.E.; León Rodríguez, I.L.; Ávila Rodríguez, M.; Wrobel, K.; Wrobel, K.; Lappe, P.; Ulloa, M.; Gutiérrez Corona, J.F. (2006).** Hexavalent chromium removal in vitro and from industrial wastes; using chromate-resistant strains of filamentous fungi indigenous to contaminated wastes. Canadian J. Microbiol. 52:809-815.
10. **Congeevaram, S.; Dhanarani, S.; Park, J.; Dexilin, M.; Thamaraiselvi, K. (2007).** Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungal and bacterial isolates. J. Hazardous Mat. 146:270-277.
11. **Gutiérrez Corona, J.F.; Espino Saldaña, A.E.; Coreño Alonso, A.; Acevedo Aguilar, F.J.; Reyna López, G.E.; Fernández, F.J.; Tomasini, A.; Wrobel, K.; Wrobel, K. (2010).** Mecanismos de interacción con cromo y aplicaciones biotecnológicas en hongos. Rev. Lat. Biotecnol. Amb. Algal 1:47-63.
12. **Cervantes, C.; Campos García, J.; Devars, S.; Gutiérrez Corona, F.; Loza Tavera, H.; Torres Guzmán, J.C.; Moreno Sánchez, R. (2001).** Interactions of chromium with microorganisms and plants. FEMS Microbiol. Rev. 25:335-347.
13. **Mala, S.M.J.; Unni, N.B.; Puvanakrishnan, R. (2006).** Bioaccumulation and biosorption of chromium by *Aspergillus niger* MTCC 2594. J. Gen. Appl. Microbiol. 52:179-186.
14. **Coreño Alonso, A. (2009).** Caracterización del sistema de reducción de Cr (VI) de la cepa Ed8 de *Aspergillus niger* resistente a cromato. Tesis de doctorado (Biología), Posgrado en Biología Experimental, Universidad de Guanajuato, Guanajuato.
15. **Maldonado, M.C. (2005).** Fermentación en sustrato sólido. Navarro, A.; Maldonado, M. C.; Rubio, M. C. (Eds.) En: Biotecnología Microbiana. Universidad Nacional de Tucumán (Edt.). pp:49-65.
16. **Rubio, MC and Maldonado, MC (1995).** Purification and characterization of invertase from *Aspergillus niger*. Curr. Microbiol. 31: 80-83.
17. **Barrionuevo, M., Daniel, M., Garavaglia, L., Méndez, M., Sosa, G., Candal, R., Cerdeira, S., Ceretti, H., Ramírez, S., Reciculchi, E., Zalts, A., Vullo,**

- D. (2009).** Tratamiento biológico de efluentes industriales con metales: factores a tener en cuenta para un diseño eficiente. *Rev. Qca. Viva.* 2: 106-123.
- 18. Greenberg, A. E.; Clesceri, L., Eaton, A. (1992).** Standard methods for the examination of water and wastewater: American Public Health Association. Washington, D.C. 18:358-360.
- 19. Calderón, F., Pavlova, M. (1999).** Metodologías para análisis químico de suelos. <http://www.drcalderonlabs.com>.
- 20. Suárez, M.S, Rubio, M.C. (2009).** Enriquecimiento de la pulpa de limón con proteína microbiana para alimento animal. Tesis de Licenciatura en Biotecnología. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán. Argentina.
- 21. Ferraz, A.; Tavares, T.; Teixeira, J.A. (2004).** Cr (III) removal and recovery from *Saccharomyces cerevisiae*. *Chem. Eng. J.* 105:11-20.
- 22. Zafar, S., Aquil, F., Ahmad, I. (2007).** Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi from metal contaminated agricultural soil. *Biores. Technol.* 98: 2557-2561.
- 23. Filipovic Kovacevic, Z.; Sipos, L.; Briski, F. (2000).** Biosorption of chromium, copper, nickel and zinc ions onto fungal pellets of *Aspergillus niger* 405 from aqueous solutions. *Food Technol. Biotechnol.* 38:211-216.
- 24. Goyal, N.; Jain, S.C. y Banerjee, U.C. (2003).** Comparative studies on the microbial adsorption of heavy metals. *Adv. Env. Res.* 7:311-319.
- 25. Suárez, M.S., Rubio, M.C. (2011).** Adsorción de iones Cr(VI) con residuos de la industria citrícola y su recuperación como producto enriquecido con proteína microbiana. Proyecto beca de iniciación en la investigación. Consejo de Investigación de la Universidad Nacional de Tucumán. Argentina.
- 26. Sarkar, S., Satheshkumar, A., Premjumar, R. (2013).** Hexavalent chromium removal by live mycelium of *Trichoderma harzianum* strain. *Mol. Soil Biol.* 4: 1-6.
- 27. Srinath, T.; Verma, T.; Ramteke, P.; Garg, S. (2002).** Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. *Chemosph.* 48:427-433.