



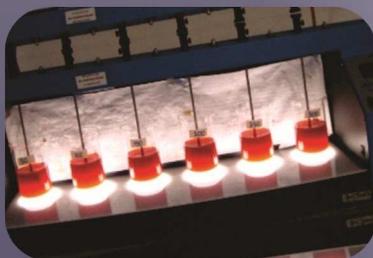
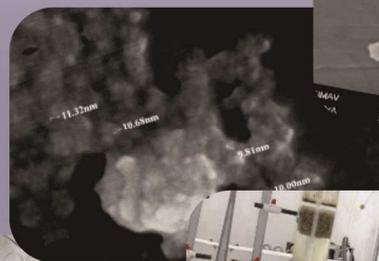
## Aplicaciones en

# Bioingeniería

## Ambiental

SIBA, el ambiente de discusión y de intercambio de conocimiento entre expertos, profesores y estudiantes, en el área de procesos aplicados en la ingeniería Ambiental.

- Metodologías Innovadoras aplicadas a Bioprocesos
- Tratamiento de Residuos
- Tecnologías Anaerobias y Aerobias
- Energía
- Bioprocesos
- Nanotecnología
- Bioremediación
- Biotecnología
- Tratamiento de Agua



### *Cuerpo Académico "Gestión Ambiental"*

Arodí Bernal Martínez  
Germán Cuevas Rodríguez  
Sergio Antonio Silva Muñoz  
Elcia Margareth Souza Brito

Departamento de Ingeniería Civil  
División de Ingenierías  
Campus Guanajuato



# “APLICACIONES EN BIOINGENIERÍA AMBIENTAL”

ISBN: 978-607-441-276-5



9 786074 412765

DR. © 2013 Universidad de Guanajuato

Memorias del Primer Simposio Internacional de Bioingeniería Ambiental,  
organizado por el Cuerpo Académico de Gestión Ambiental  
Guanajuato, Guanajuato, México  
4 al 6 de Septiembre del 2013

**“APLICACIONES EN BIOINGENIERÍA AMBIENTAL”**  
Primera edición 2013

D.R. © 2013, Universidad de Guanajuato  
Lascuráin de Retana 5, Zona Centro  
Guanajuato, Gto., C.P. 36000

Edición: Cuerpo Académico “Gestión Ambiental”  
Arodí Bernal Martínez  
Germán Cuevas Rodríguez  
Sergio Antonio Silva Muñoz  
Elcia Margareth Souza Brito

ISBN: 978-607-441-276-5

## APLICACIÓN DE UN CONSORCIO BACTERIANO ANAEROBICO EN LA BÚSQUEDA DE LA BIORREMEDIACIÓN DEL CR(VI)

*Liliana G. Hernández Espino*<sup>1</sup>, *Elcia M. Souza Brito*<sup>2</sup>, *German Cuevas-Rodriguez*<sup>3</sup>  
Ing. Ambiental, Div. Ingenierías, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato, Guanajuato, Gto., México  
E-mails (1) [lili\\_12vic@hotmail.com](mailto:lili_12vic@hotmail.com); (2) [emsbrito@gmail.com](mailto:emsbrito@gmail.com); (3) [germancuevasenator@gmail.com](mailto:germancuevasenator@gmail.com)

### ABSTRACT

The Cr(VI) is consider as a harzadous residue and the treatments usually used is expensive and based on chemical reduction. On the other hand, there are microorganisms capable to carry out the oxido-reduction reactions as part of its natural physiology, such as, the sulfate-reducing bacteria, thase use sulfate as terminal electron acceptor. The ability of these microorganisms to mediate redox reactions put them in the spotlight to search for new technologies for the biotransformation of metals and metalloids. Here, a group of BSR from the geothermal site was used to study the Cr(VI) biotransformation on different pH valous (2, 4, 6, 8, 10 and 12). For obtaining biomass allowed to incubate for 16 days at room temperature, on anaerobic atmosphere; after was added Cr(VI) as a  $K_2Cr_2O_7$ , to obtain a final concentration of Cr (VI) of 50 ppm. The Cr(VI) reduction was evaluated spectrophotometric method (1-5, diphenylcarbazide,  $C_{13}H_{14}N_4O$ ). The system that presented a better efficiency in the reduction of Cr (VI) was the pH 4 with a 96% reduction in 24 h and the worse efficiency was on pH 12, where after a time of 48 h only 33% Cr(VI) were lost. From these results we selected the system with pH 4 to try different carbon sources, and then move to a pilot bioreactor, to treat leachate at laboratory level.

**Keywords:** *Biotechnology, Chrome, sulfate-reducing microrganisms.*

### RESUMEN

The Cr(VI) es considerado como un residuo peligroso, y los procesos para el tratamiento de estos residuos normalmente utilizan la reduccion quimica, la cual es cara y resuelve el problema real, ya que el Cr(III) puede ser re-oxidado a forma hexavalente. Por otro lado, hay microorganismos capaces de realizar naturalmente reacciones de oxico-reduccion, tal como las bacterias sulfato reductoras (BSR). La capacidad que tienen estos microorganismos de intermediar reacciones de óxido-reducción los ponen como blanco en la búsqueda de nuevas tecnologías para la biotransformación de metales y metaloides. En ese trabajo, un grupo de BSR provenientes del sitio geotérmico fue usado para estudiar la biotransformación del Cr(VI) en diferentes valores de pH (2, 4, 6, 8, 10 y 12). Para la obtención de biomasa se dejaron incubar los microcosmos anaerobisoc durante un periodo de 16 días (a temperatura ambiente); a seguir, se les adiciono el Cr(V) en la forma de **dicromato de potasio** ( $K_2Cr_2O_7$ ) hasta la obtención de una concentración final de Cr(VI) de 50 ppm. Se evaluó la disminucíon del Cr(VI) del medio con la técnica de 1-5, difenilcarbazida ( $C_{13}H_{14}N_4O$ ). El sistema que presento una mejor eficiencia en la reduccíon de Cr(VI) fue el pH 4 con una reduccíon del 96% en 24 h y la de menor eficiencia fue el de pH 12, donde pasado un tiempo de 48 h solo había reducido un 33% del Cr(VI). A partir de estos resultados se seleccionó el sistema con pH 4 para probar diferentes fuentes de carbón, y posteriormente pasar a un biorreactor piloto, para poder tratar lixiviados a nivel laboratorio.

**Palabras clave:** Biotecnología, Cromo, Bacterias Sulfato Reductoras

### INTRODUCCION

El cromo puede presentarse en los estados de oxidación de II a VI, donde los mas frecuentes en el ambiente son Cr(VI) y Cr(III), los cuales son fácilmente interconvertibles dependiendo del pH, de las condiciones de aerobiosis y de la temperatura [2]. De estos, el Cr(III) es un oligoelemento

indispensable para procesos bioquímicos y fisiológicos, ya que tiene específicamente acciones en el metabolismo de la glucosa, del colesterol y de los ácidos grasos. En contra parte, el Cr(VI) es un elemento altamente tóxico clasificado por la IARC (3) como un elemento cancerígeno comprobado en humanos y es un metal que ha sido integrado a la lista de sustancias tóxicas de la Agencia de Protección Ambiental de EEUU (EPA) [4]. El uso de compuestos de Cr(VI) con fines industriales ha provocado la introducción de altas concentraciones de cromo oxidante al ambiente.

Anualmente grandes cantidades de cromo se utilizan en la producción de acero inoxidable, de metales cromados, en la industria del cuero para el curtido de las pieles, etc. La industria peletera, especialmente las curtidoras, generan miles de toneladas de desechos sólidos, potencialmente tóxicos, debido a su alto contenido en cromo. En México, el costo de los contaminantes emitidos por la industria de acabado de metales asciende a los 1,000 millones de pesos, que equivale al 0.1% del Valor Agregado Bruto Total Nacional. Se estima que las pérdidas de estas empresas son de aproximadamente 1 millón de pesos anuales debido a la emisión y descarga de compuestos químicos contaminantes al agua, aire y suelo.

Actualmente el método más usual para el tratamiento de los efluentes con cromo es la precipitación (Figura 1), en la cual se utiliza un agente alcalino (sosa, cal o hidróxido de aluminio) para precipitar el cromo. En general en este proceso, se utiliza ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) y el hidróxido de sodio (NaOH) como agente precipitante. Al final se recupera el cromo como sulfato de cromo, y se produce una agua residual con un alto contenido de sales disueltas, un producto de poco valor económico agregado (5).

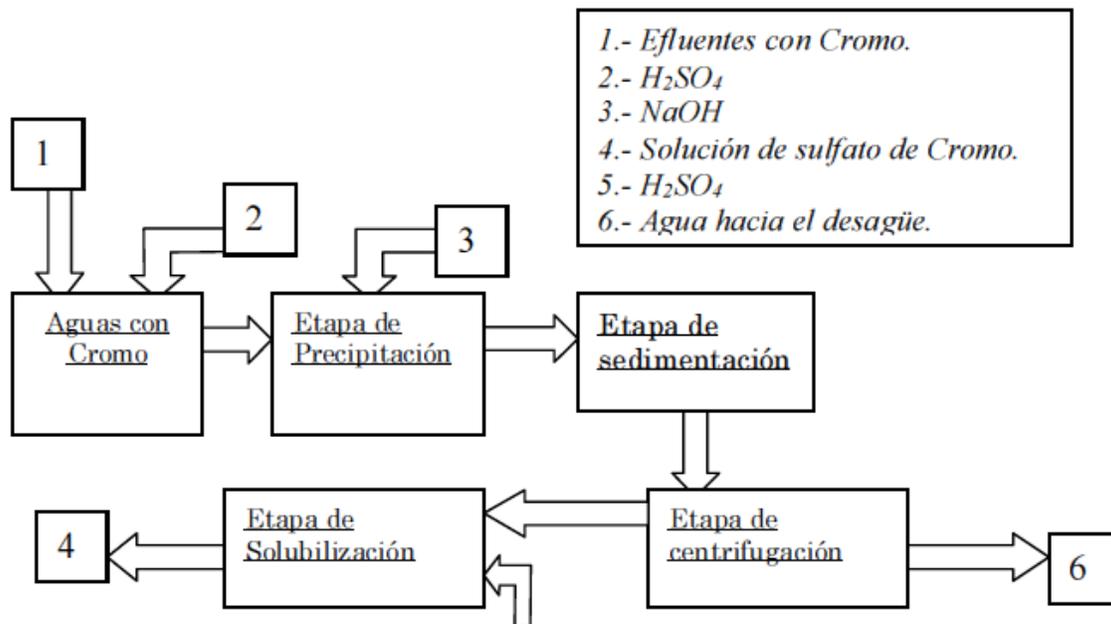
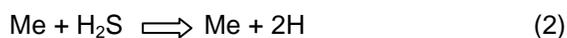
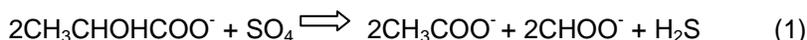


Figura 1 – Esquema de un tratamiento de residuos líquidos contaminados con cromo por la técnica de precipitación (8)

Además de la precipitación, existen otros tratamientos menos usuales, como por ejemplo, el uso de resinas de intercambio iónico [6], tratamiento con carbón activado, reducción química y la bioadsorción [7]. Entre los materiales con propiedades de intercambio iónico, la aplicación de la sílice modificada para la remoción de sustancias orgánicas y compuestos metálicos presentes en

disoluciones acuosas, ha sido ampliamente utilizada. Se ha investigado la extracción del  $\text{Cr}^{3+}$  a partir de soluciones de sulfato de cromo para la depuración de aguas industriales procedentes del curtido de pieles [6]. En la técnica que se utiliza el carbón activado, que es químicamente estable y se sabe que adsorben complejos metálicos de soluciones, y se han aplicado para la adsorción de cromo de soluciones con 5000 ppm a  $50^{\circ}\text{C}$  y ha alcanzando rendimientos superiores al 99% tras un tiempo de contacto de 10 minutos [6]. El proceso de reducción química, por su vez, consiste primero en oxidar el  $\text{Cr(III)}$  a  $\text{Cr(VI)}$  usando persulfato de sodio, a seguir el efluente líquido pasa a través de una resina de intercambio catiónico, donde el  $\text{Na}^{+}$  es removido y el  $\text{Cr(VI)}$  es reducido al  $\text{Cr}^{+3}$ . Luego, ese es removido por una segunda resina de intercambio iónico, y en el efluente final aparecerían sulfato y formiato. Por fin, la bioadsorción emplea sólidos de origen natural para fijar metales pesados. Es un método alternativo prometedor para tratar efluentes industriales principalmente por su bajo costo y su alta capacidad para fijar metales [6].

Una alternativa prometedora en el tratamiento de aguas residuales conteniendo elevadas concentraciones de metales es la aplicación de microorganismos sulfato reductores. Estas son un grupo heterogéneo que comprenden bacterias y archaeas con la habilidad para usar sulfato como aceptor terminal de electrones. De tal forma que cuando el sulfato está presente, estos microorganismos juegan un papel muy importante en el ciclo biogeoquímico del azufre. Las BSR son bacterias anaerobias y utilizan iones de sulfato como aceptor final de electrones para el metabolismo de sustratos orgánicos (Ecuación No. 1). Aunque una pequeña cantidad de azufre en forma reducida es asimilada por la bacteria, la mayor cantidad es liberado como ion sulfuro, que se combina con metales pesados divalentes presentes en el medio. Ese proceso es el que se puede reproducir en el biotratamiento de metales intermediado las BSR, como por ejemplo en las piscinas de precipitación, sean naturales o artificiales, que es de bajo costo. Otra ventaja de ese bioproceso es que estos microorganismos pueden utilizar varios sustratos como fuente de carbono y de electrones, tal como ácidos carboxílicos, alcoholes, diferentes tipos de azúcares y compuestos aromáticos [7]. Adicionalmente, hay estudios que reportan también el uso de sustancias complejas, tal como, agua residuales, alfalfa, composta, celulosa, residuo de industria de papel, etc, para estimular las BSR, que puede reducir aun más el costo del bioproceso. Sin embargo, es necesario tener los consorcios microbianos de BSR para poder acondicionarlos y aplicarlos en estos tratamientos.



La capacidad que tienen estos MSR de intermediar reacciones de óxido-reducción los ponen como blanco en la búsqueda de nuevas tecnologías para la biotransformación de metales y metaloides. En el presente trabajo se busca adecuar en laboratorio un grupo de BSR provenientes del sitio geotérmico "Los Azufres, Michoacán" para intermediar la biotransformación del  $\text{Cr(VI)}$  [4].

## **METODOLOGIA**

**Los consorcios microbianos** – El consorcio bacteriano anaerobico utilizado en ese trabajo fue fornecido por Galvan-Rodriguez [4]. Estos, fueron clasificados como Bacterias Sulfatos Reductoras, acidofilas, organotroficas y anaerobicas y utilizan el  $\text{Fe}_2\text{SO}_4$  como aceptor de electrone y una mezcla de fuentes de carbono (Lactato-Na, Piruvato-Na, Acetato de Sodio, glicerol

y extracto de levadura, a una concentración final de 5mM).

**Medios de cultivos:** Se utilizó como medio de cultivo una solución mineral preparada a partir del agua de los azufres (MMA). Esta agua fue sometida tres procesos de esterilización por autoclave 15 Psi por 2 h, en intervalos de 24 horas. Se preparó el medio de cultivo en un matraz de Widel (Figura 2), el cual se esterilizó por 20 minutos. Este posee la ventaja de poder preparar volúmenes grandes del medio y acondicionarlo después de esterilizado, manteniendo una atmósfera anaerobia y estéril. Con el medio mineral recién esterilizado y aún caliente, se burbujeó  $N_2$  gaseoso, hasta que la temperatura del medio llegara a la temperatura ambiente (aproximadamente 15 min.). Una vez a la temperatura ambiente, se le adicionó una solución de vitaminas estéril (5mM c/u Biotina, Ácido nicotínico, Tiamina, Riboflavina, Inositol), y de minerales traza estéril (5mM EDTA, 4mM  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ , 8mM  $MnSO_4 \cdot H_2O$ , 3mM  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 3mM  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ , 4mM  $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ , 2mM  $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ , Agua). A seguir, se adicionó sulfato ferroso estéril ( $FeSO_4$ , 1mM) como aceptor terminal de electrones y las fuentes de carbono estériles (0.1M lactato, piruvato, acetato y glicerol) a una concentración final de 5mM de cada una de estas. Después se controló el pH de la solución, y se distribuyó en los frascos de 200 mL estériles. Durante todo el procedimiento se mantuvo el medio anaeróbico con burbujeo constante de  $N_2$  gaseoso.



Figura 2. Matraz de widell. *El matraz de Widdel (Widdel, 1990) es frecuentemente utilizado para preparar medios de cultivo estériles con una atmósfera controlada. Su diseño permite una atmósfera sin oxígeno, mayor que la se obtendría en una simple desgasificación por sistema de inyección*

Condiciones de los sistemas: Se colocaron 4 sistemas, cada uno con pH controlado a 2, 4, 6, 8, 10 o 12. De cada sistema también se preparó 2 controles. Uno de ellos fue para la verificación de la disminución del Cr(VI) sin la presencia de los microorganismos (biotransformación química). El otro, nombrado control del crecimiento biológico, fue utilizado para verificar el crecimiento bacteriano independiente de la presencia del xenobiotico Cr(VI).

Pre-cultivos y microcosmos: Todos los sistemas con microorganismos se prepararon a partir de un pre-cultivo. En estos, se utilizaron el medio descrito anteriormente, a un pH controlado específico de cada sistema. Cada sistema se inoculó con una perlita cedida de los cultivos de Galvan-Rodríguez. Estos sistemas se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 16 días. Se separó el control (sin xenobiotico), y a los restantes se les adicionó el xenobiotico dicromato de potasio ( $K_2Cr_2O_7$ ), hasta la concentración final de Cr(VI) de 50 ppm.

Determinación de cromo: Se extrajo el Cromo según la norma mexicana NMX-AA-044-SCFI-2001. Este se basa en una reacción de óxido-reducción, donde el Cr(VI) reacciona con la 1,5-difenilcarbazida en medio ácido para dar  $Cr^{6+}$  DFC. El complejo formado ( $Cr^{6+}$  DFC) es de color violeta y se puede medir espectrofotométricamente a una  $\lambda$  540 nm. La intensidad de color es

directamente proporcional a la concentración de Cr(VI) de la solución.

### RESULTADOS Y DISCUSSION

La en la Figura 2 se resume los resultados obtenidos en los diferentes microcosmos con pH que variaron de 2 a 12.

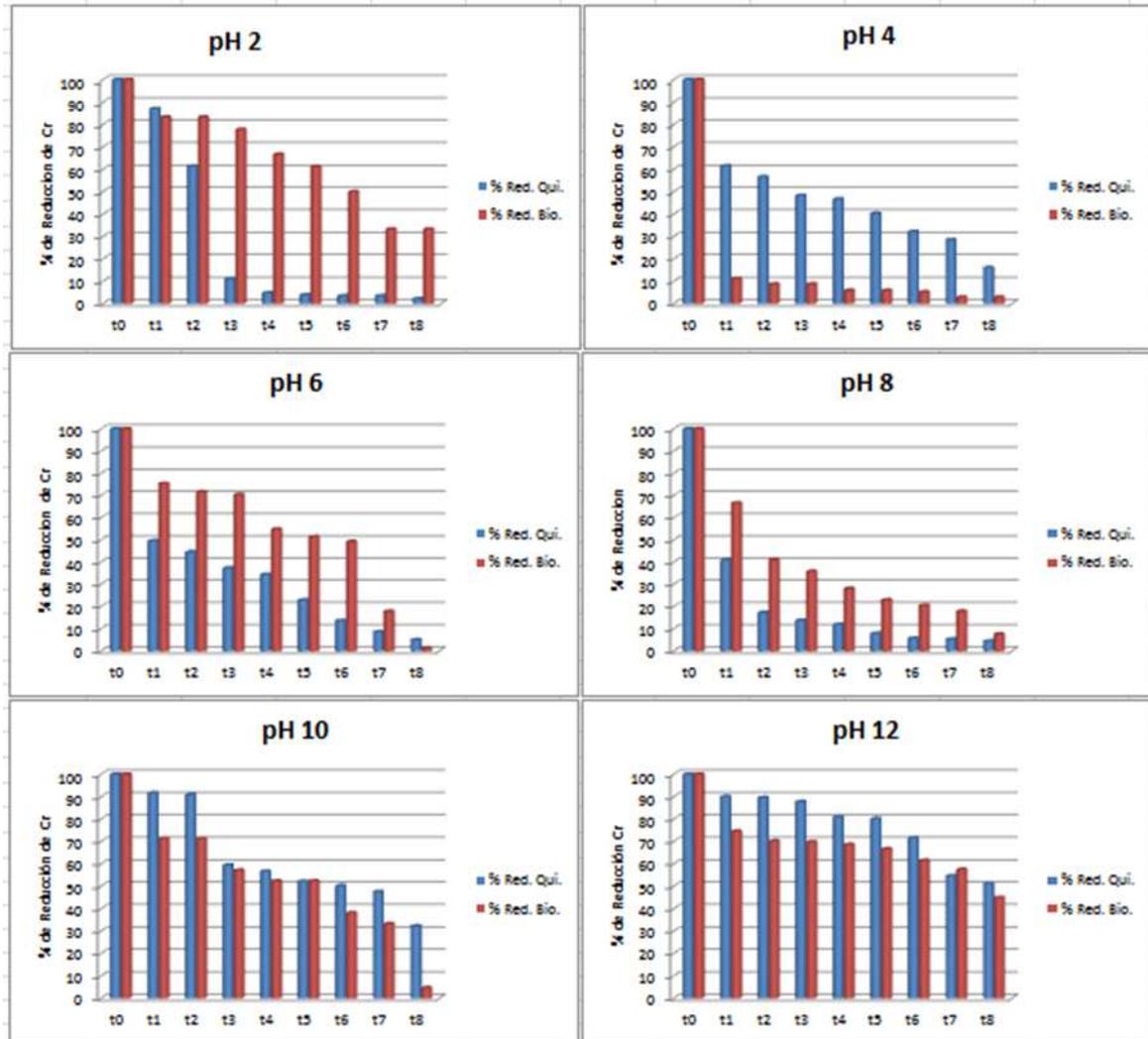


Figura 3 – comportamiento de la disminución del Cr(VI) del medio en los distintos pH estudiados. Las barras azules son los resultados de la reducción química y las rojas de la reducción microbiana.

Los resultados sugieren que el sistema con un mejor desempeño en la biotransformar el Cr(VI) a Cr(III) es al pH 4, presentando una reducción del 90% en un tiempo estimado de 6 hr de contacto. Por otro lado se toma en cuenta que este es un pH muy cercano al pH que presenta originalmente el consorcio sulfato reductor, a condiciones naturales (pH 3). Puede ser que la reducción pueda haber sido influenciada por la biomasa presente, sin embargo, sería necesario verificar la relación entre la biomasa bacteriana en cada sistema y la reducción del Cromo. Hay algunas dificultades en realizar ese experimento, ya que la lectura de la densidad óptica, o

cualquiera metodología de lectura espectrofotométrica podrá ser influenciada por el indicador de condiciones reductoras (el cual torna el medio más rosado en presencia de oxígeno) o por la presencia del precipitado de  $\text{Fe}^{3+}$ . Una alternativa podría ser el cultivo y contero de colonia (UFC), sin embargo esta técnica no aplica a condiciones anaerobias. También se observa que las condiciones básicas, como lo son los pH 10 y 12, igualmente se llevó a cabo la disminución del Cr(VI) del medio. Pero aun así, mejores tajos se observaron en el pH 4.

En general la reducción química fue muy evidenciada en los sistemas más ácidos, por ejemplo, en el pH 2. Esto se puede deber a que los compuestos de Cr(VI) son fuertemente oxidantes y, en presencia de un adecuado donador de electrones, son reducidos a la forma trivalente estable. Resultados similares también se observaron en los pH 6 y 8, en los cuales podemos observar una reducción química favorable. Distinto del sistema de pH 2, en estos valores de pH se presumiría que la reducción química sería menor que la reducción microbiana, sin embargo, puede ser que las condiciones del sistema tengan inhibido el crecimiento bacteriano ya que los consorcios bacterianos estudiados son acidófilos y no alcalófilos.

## CONCLUSIONES

Los sistemas que presentaron mejor porcentaje de reducción están en un rango de pH 3 a pH 6, eligiéndose el pH 4 como mejor sistema ya que presentó una reducción del 90% en un tiempo estimado de 6 hr de contacto.

## AGRADECIMIENTOS

A las instituciones como Universidad de Guanajuato, CONACYT y spa Los Azufres, por su apoyo en la realización de esta investigación.

## REFERENCIAS

1. Gutierrez R. Alvaro Víctor, Terrazas S. Luis Enrique, Álvarez A. María Teresa, (2007), "Aislamiento y cultivo de bacterias sulfato reductoras acidófilas para la producción de Sulfuro Biogénico para la precipitación de metales" pesados
2. G.H Ayres, "Análisis Químico Cuantitativo", Ed. Harla; México 1978
3. Nourbakhs, M., et al., A comparative study of various biosorbents for removal of chromium (VI) ions from industrial waste waters. *Process Biochem.*, 29 (1994): 1-5.
4. Rodríguez-Galván, Marissa (2013) - "Búsqueda de bacterias formadoras de biopelículas para estimular la transformación de metales y metaloides". Tesis para obtención de título de QFB Universidad de Guanajuato.
5. NMX-AA-044-SCFI-2001 Análisis De Aguas - Determinación De Cromo Hexavalente En Aguas Naturales, Potables, Residuales Y Residuales Tratadas - Método De Prueba (CANCELA A LA NMX-AA-044-1981)
6. [www.igme.es/internet/RecursosMinerales/panoramaminero/historico/94-95/CROMO.pdf](http://www.igme.es/internet/RecursosMinerales/panoramaminero/historico/94-95/CROMO.pdf)
7. Aksu, Z., et al., Investigation of biosorption of Cu (II), Ni (II) and Cr (VI) ions to activated sludge bacteria. *Environ. Technology*, 12 (1991); 915 – 921.
8. Volesky, B., Removal of heavy metals by biosorption. In: M.R. Ladish and A. Bose (Editors), *harnessing Biotechnology for the 21 st Century*, American Chemical Society, Washington, D. C (1992).