Estudio de la producción y aplicación del bioagente reductor de Cr(VI) a Cr(III) proveniente de la cepa *Aspergillus tubingensis* Ed8, para reactores de tanque agitado a escala laboratorio

Autores:

Cristian Daniel Borda Bastidas

María Sary Libreros Gordillo

Trabajo de grado para optar por el título de ingeniero químico

Director

Prof. Luis Javier López Giraldo
Ing. Químico, Ph.D

Codirectores

Prof. Héctor Hernández Escoto
Ing. Químico, Ph.D

Prof. Mabel Juliana Quintero Silva
M.Sc en ciencias básicas biomédicas

Universidad Industrial de Santander

Facultad de ingenierías fisicoquímicas

Escuela de ingeniería química

Bucaramanga

2019

A mi mamá, Maria Sención Bastidas García por brindarme palabras de aliento en momentos difíciles, palabras de confianza, gestos de cariño y amor a lo largo de esta etapa de crecimiento personal y profesional. "Un paso a la vez"

A mi papá, Marcos Daniel Borda Parra por apoyarme en cada momento, siempre con sus sabios consejos en momentos adecuados para seguir escalando. "alma, vida y corazón"

A mi hermano, Willie Jonathan Borda Bastidas por mostrarme la resiliencia como un factor para construir éxito y prosperidad en lo que se hace, también por su compañía en todo momento.

A mis primos, Ricardo, Wilson y Yeisson (Flia Borda Morales) por los momentos de aventura vividos a lo largo de estos años y sus llamadas para saber de mi progreso.

A todos mis familiares, por su constante guía, mensajes de apoyo y palabras sabias que en su tiempo me dijeron.

A "The family", Cristian Tinjaca, Yonatan Sarmiento y José Aguilar por su amistad incondicional, solidaridad y apoyo en todo momento.

A mis amigos, Daniel González (Compadre Rafa), Don Fabio Castiblanco, Harold Cárdenas, Ludwing Garcia (El Romie) Ingri Ballesteros, Carlos Bohórquez (Pacquiao), Katherine López, Daniel Monroy, Michael Ariza y Marcos Carrillo por su compañerismo y constante colaboración en actividades académicas.

A mi novia, Sary Libreros, por su constante apoyo y colaboración en el desarrollo de este proyecto, un gran impulso en mi desarrollo personal y profesional.

Cristian Daniel Borda Bastidas

A Dios y al universo, por brindarme una vida tan maravillosa, rodeada de tanta belleza y personas buenas.

A mi madre Luz Mareily, por su amor, sacrificio y apoyo en todo. Eres Mi Guerrera.

A mis abuelos Gladys y Jaimito, sin ellos no sería la mujer de la cual me siento tan orgullosa. Son el pilar de mi vida y yo su princesa guerrera.

A mi hermano Juan, el mejor compañero que la vida me ha podido regalar.

A mis tíos, tías y primos por enseñarme a ser fuerte y a superar cualquier adversidad.

A mi novio Cristian Borda, por enseñarme a trabajar en equipo, a confiar en el amor y a luchar incansablemente por mis sueños. ¡Grandes aventuras nos esperan!

A la Universidad Industrial de Santander, mi alma mater, por formarme y brindarme la mejor educación y acompañamiento en esta etapa de mi vida.

A la UIS sede Barrancabermeja por recibirme cálidamente en sus tierras.

A la Universidad de Guanajuato por abrirme sus puertas y llenarme de tantas experiencias enriquecedoras en tan encantador país, México.

A mis amigas Yanethcita, Linita, Doña Ligia, la Dra. Maria Claudia y la Dra. Nancy por ser tan maravillosas personas y reanimarme en tiempos oscuros.

A mis animales, en especial a ***Poyin****, por dedicar su vida a hacernos feliz.*

A todas aquellas personas que optan por hacer el bien, por brindar sonrisas amables y palabras reconfortantes, por dedicar su tiempo a amar, proteger los animales y cuidar la naturaleza entendiendo el verdadero valor de la existencia.

Maria Sary Libreros Gordillo

Agradecimientos

A Dios, por darnos la vida y fortaleza en todo momento.

A nuestras familias por su apoyo incondicional, amor y cariño que nos llegó a la distancia.

A la Universidad de Guanajuato por abrirnos las puertas y recibirnos con cariño a lo largo de nuestra estadía, especialmente al Departamento de Ingeniería Química y de Biología.

A nuestro director, el profesor Luis Javier López, por su guía y atención en el proyecto.

A nuestra codirectora, la profesora Mabel Juliana Quintero, por su acompañamiento, dedicación y colaboración de principio a fin.

A nuestro codirector, el profesor Héctor Hernández, por la confianza depositada en nosotros y su gran apoyo para lograr este sueño.

Al profesor Félix Corona del departamento de biología por sus enseñanzas, amistad y orientación.

A Juan Carlos Bautista por su guía y acompañamiento, el cual fue clave para entender el trasfondo de nuestro proyecto, y a su familia quien amablemente nos abrieron las puertas de su hogar.

Al Doctor Fernando Santos por su interés diario en el desarrollo del proyecto.

Al equipo de laboratorio de genética molecular de hongos y bacterias por su amistad, ayuda y compañerismo vivido durante la estadía: Yessica, Ere, Carlos, Gabriel, Lorena, Yesenia y Chary.

Al equipo de laboratorio de análisis de bioprocesos industriales (LABPI), a Perla, Rubi y Pepe por su asesoría, ayuda y paciencia al explicarnos el manejo de los equipos.

A la profesora Diana Pedraza, por su incondicional apoyo.

Y a la Universidad Industrial de Santander por ser nuestra alma mater, por formarnos como excelentes profesionales y apoyarnos en nuestros proyectos.

Mil Gracias a Todos.

Tabla de contenido

Introducción 15

1. Objetivos 21

1.1 Objetivo general 21

1.2 Objetivos específicos 21

2. Metodología 22

2.1 Evaluación del potencial reductor del bioagente a escala matraz (Etapa 1) 23

2.1.1 Efecto de la adición de citrato al medio de crecimiento 24

2.1.2 Selección del medio de crecimiento 24

2.2 Evaluación del potencial reductor del bioagente en reactores de tanque agitado (Etapa 2) 29

2.3 Reducción de Cr(VI) presente en residuos industriales reales (Etapa 3) 31

3. Resultados y análisis 32

3.1 Evaluación del potencial reductor del bioagente a escala matraz (Etapa 1) 32

3.1.1 Influencia de la adición de citrato al medio de crecimiento y la selección del mismo 32

3.2 Evaluación del potencial reductor del bioagente en reactores de tanque agitado (Etapa 2) 39

3.2.1 Reactor Air-lift a escala laboratorio 39

3.2.2 Reactor Corning Spinner Flask a escala laboratorio 42

3.2.3 Análisis estadístico tipo Box Behnken con superficie de respuesta para los reactores Air-lift y Corning Spinner Flask realizado por el software estadístico Minitab 19 45

3.3 Reducción de Cr(VI) presente en residuos industriales (Etapa 3) 51

3.3.1 Reactor Air-lift 52

3.3.2 Reactor Corning Spinner Flask 53

4.Conclusiones 55

Referencias Bibliográficas……...56

Apéndices 62

Lista de figuras

Pág.

Figura 1. Mecanismos de interacción con cromo en células fúngicas ……. 18
Figura 2. Etapas del Proyecto ……. 22
Figura 3. Metodología de la obtención del bioagente a escala matraz ……... 23
Figura 4. Curva de calibración ……... 28
Figura 5. Metodología para la obtención del bioagente en reactores de tanque agitado …… 29
Figura 6. Reducción de Cr(VI) en residuos industriales …… 31
Figura 7. Evolución del % de reducción de 200 ppm Cr(VI) conforme se modifica el tiempo de contacto entre el sobrenadante o medio de crecimiento con la solución de cromo en ausencia de citrato y pH 4. 33
Figura 8. Evolución del % de reducción de 200 ppm Cr(VI) conforme se modifica el tiempo de contacto entre el sobrenadante o medio de crecimiento y el cromo con 20 mM de citrato y pH 4 34
Figura 9. Evolución del % de reducción de 200 ppm Cr(VI) conforme se modifica el tiempo de contacto entre el sobrenadante o medio de crecimiento y el cromo con 20 mM de citrato y pH 4. 34
Figura 10. Propuesta para el metabolismo del citrato deducida de los datos del genoma en *Aspergillus niger*. 35
Figura 11. Evolución del crecimiento de la cepa Ed8 en medio PL a pH 5.3 ……. 37
Figura 12. Azúcares reductores del medio PL con pH 5.3 …… 37
Figura 13. Evolución del proceso de reducción de 200 ppm Cr(VI) en reactor Air-lift con medio de crecimiento y sobrenadante PL y nivel de aireación 0,5 Lpm a) pH 2.6 b) pH 4 c) pH 5.3 40
Figura 14. Evolución del proceso de reducción de 200 ppm Cr(VI) en reactor Air-lift con medio de crecimiento y sobrenadante PL y nivel de aireación 1 Lpm a) pH 2.6 b) pH 4 c) pH 5.3 41
Figura 15. Evolución del proceso de reducción de 200 ppm Cr(VI) en reactor Air-lift con medio de crecimiento y sobrenadante PL y nivel de aireación 4 Lpm a) pH 2.6 b) pH 4 c) pH 5.3 42
Figura 16. Evolución del proceso de reducción de 200 ppm Cr(VI) en reactor Spinner Flask con medio de crecimiento y sobrenadante PL y nivel de agitación 60 rpm a) pH 2.6 b) pH 4 c) pH 5.3 43
Figura 17. Evolución del proceso de reducción de 200 ppm Cr(VI) en reactor Spinner Flask con medio de crecimiento y sobrenadante PL y nivel de agitación 120 rpm a) pH 2.6 b) pH 4 c) pH 5.3 44
Figura 18. Evolución del proceso de reducción de 200 ppm Cr(VI) en reactor Spinner Flask con medio de crecimiento y sobrenadante PL y nivel de agitación 180 rpm a) pH 2.6 b) pH 4 c) pH 5.3 45

Figura 19. Superficie de respuesta de la reducción de 200 ppm Cr(VI) con el sobrenadante producido en el reactor Air-lift en 120 h de cultivo 46
Figura 20. Diagrama de pareto para reactor Air-lift ……. 47
Figura 21. Gráfica normal de efectos estandarizados Air-lift ……. 47
Figura 22. Superficie de respuesta del reactor Spinner flask teniendo como valor fijo el tiempo de cultivo 49
Figura 23. Diagrama de pareto para reactor Corning spinner flask …….. 49
Figura 24. Gráfica normal de efectos estandarizados Corning spinner flask ……. 50
Figura 25. Evolución del proceso de reducción del lixiviado de montaña con presencia de Cr(VI) en el reactor Air-lift 52
Figura 26. Evolución del proceso de reducción del lixiviado 2 con presencia de Cr(VI) en el reactor Air-lift 52
Figura 27. Evolución del proceso de reducción del lixiviado de montaña con presencia de Cr(VI) en el reactor Spinner flask 53
Figura 28. Evolución del proceso de reducción del lixiviado 2 con presencia de Cr(VI) en el reactor Spinner flask 54

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1. Condiciones estudiadas durante el proceso a escala matraz …..... 24

Tabla 2. *Reactivos empleados para medio LMM* …….. 24

Tabla 3. Reactivos empleados para medio PL ……. 25

Tabla 4. Reactivos empleados para medio MPF …….. 25

Tabla 5. Reactivos empleados para medio PDA …….. 26

Tabla 6. Determinación de Cr(VI) por el método de difenilcarbazida …… 27

Tabla 7. Parámetros estudiados en los reactores Air-lift y Corning Spinner Flask …….. 30

Tabla 8. Cuantificación de azúcares presentes en el piloncillo (PL) ……. 38

Tabla 9. Mejores condiciones a escala matraz ……. 39

Tabla 10. Resumen del modelo reactor Airlift …… 46

Tabla 11. Mejores condiciones de producción del sobrenadante en el reactor Air-lift ……. 48

Tabla 12. Resumen del modelo reactor Corning spinner flask 49

Tabla 13. Mejores condiciones de producción del sobrenadante en reactor Corning Spinner flask .. 50

Tabla 14. Características de las muestras residuales ……. 51

Tabla 15. Reactivos empleados durante el proyecto …….. 62

Tabla 16. Equipos implementados en el proyecto …….. 63

Lista de apéndices

Pág.

Apéndice A. Reactivos usados ……..... 62

Apéndice B. Equipos utilizados durante el proyecto……..……..... 63

RESUMEN

TÍTULO: ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN Y APLICACIÓN DEL BIOAGENTE REDUCTOR DE CR(VI) A CR(III) PROVENIENTE DE LA CEPA *Aspergillus tubingensis* ED8, PARA REACTORES DE TANQUE AGITADO A ESCALA LABORATORIO*

AUTORES: CRISTIAN DANIEL BORDA BASTIDAS**, MARIA SARY LIBREROS GORDILLO**

PALABRAS CLAVES: REDUCCIÓN, SOBRENADANTE, CROMO, BIOREACTOR.

DESCRIPCIÓN:

Los vertimientos ocasionados por industrias como la minería, metalurgia, galvanoplastia y curtiduría generan grandes cantidades de residuos peligrosos que sin control para su disposición final llegan a suelos y fuentes hídricas. Ejemplo concreto es México en la región del Bajío que es afectada por cromo hexavalente Cr(VI). Es allí, en un sitio contaminado de San Francisco del Rincón, Guanajuato, donde se aisló una cepa de hongo filamentoso descrita como *Aspergillus tubingensis* Ed8, resistente al cromo y con capacidad de reducir Cr(VI) a Cr(III).

Considerando lo anterior, este trabajo se centró en desarrollar un sistema de producción y aplicación de un bioagente reductor, proveniente de la cepa *A. tubingensis* Ed8. Para esto, primero se realizaron estudios a escala matraz teniendo en cuenta la selección del medio de crecimiento y la adición de citrato como agente estimulador en el mismo. Las condiciones seleccionadas en esa primera etapa fueron la base para el escalamiento del crecimiento y producción del bioagente con la mayor capacidad de reducción de Cr(VI) en reactores Air-lift y Corning Spinner Flask a escala laboratorio con características geométricas y de operación similares a los de tipo industrial.

Adicionalmente se evaluó la capacidad reductora del bioagente usando muestras reales obtenidas de los efluentes industriales de la empresa Química Central de México S.A de C.V.

---

* Trabajo de Grado

** Facultad de ingenierías Físico-Químicas. Escuela de Ingeniería Química. Universidad Industrial de Santander. Director: Luis Javier López, Ingeniero Químico PhD. Codirectores: Héctor Hernández, Ingeniero Químico PhD, Mabel Juliana Quintero, Bacterióloga M.Sc.

Este proceso evidenció ser exitoso porque redujo al mínimo la concentración de metales pesados cumpliendo así con las normas ambientales establecidas para efluentes contaminados, siendo este trabajo una alternativa novedosa, limpia, económica y sustentable para tal fin.

ABSTRACT

TITLE: STUDY OF THE PRODUCTION AND APPLICATION OF THE BIOAGENT REDUCING CR(VI) TO CR(III) FROM STRAIN *Aspergillus tubingensis* ED8, FOR LABORATORY-SCALE AGITATED TANK REACTORS*

AUTHORS: CRISTIAN DANIEL BORDA BASTIDAS**, MARIA SARY LIBREROS GORDILLO**

KEYWORDS: REDUCTION, SUPERNATANT, CHROMIUM, BIOREACTOR.

DESCRIPTION:

Discharges from industries such as mining, metallurgy, electroplating and tannery generate large amounts of hazardous waste which, without control for final disposal, reach soils and water sources. One concrete example is México in the Bajio region that is affected by hexavalent chromium Cr(VI). It is there, in a contaminated site of San Francisco del Rincón, Guanajuato, where a strain of filamentous fungus described as *Aspergillus tubingensis* Ed8, resistant to chromium and with the ability to reduce Cr(VI) to Cr(III) was isolated.

Considering the above, this work focused on developing a system of production and application of a bioreducing agent, from the strain *A. tubingensis* Ed8. For this purpose, studies were first carried out on a flask scale taking into account the selection of the growth medium and the addition of citrate as a stimulant agent in the medium. The conditions selected in this first stage were the basis for the scaling up of growth and production of the bioagent with the highest reduction capacity of Cr(VI) in laboratory-scale Air-lift and Corning Spinner Flask reactors with geometric and operating characteristics similar to those of an industrial type. In addition, the reducing capacity of the bioagent was evaluated using real samples obtained from the industrial effluents of the company Química Central de México S.A de C.V.

* Degree work

** Faculty of Physical-Chemical Engineering. School of Chemical Engineering. Universidad Industrial de Santander. Director: Luis Javier López, Chemical Engineering PhD. Codirectors: Héctor Hernández, Chemical Engineering PhD, Mabel Juliana Quintero, Bacteriologist M.Sc.

This process proved to be successful because it reduced to a minimum the concentration of heavy metals in compliance with environmental standards for contaminated effluents, being this work a novel, clean, economical and sustainable alternative for this purpose.

Introducción

Con el aumento poblacional, los avances en ciencia y tecnología han sido la meta de crecimiento de todas las naciones desde la revolución industrial, incrementando el uso de los recursos naturales para satisfacer las necesidades del hombre, esto ha conllevado a una progresiva degradación causada por la gran diversidad de contaminantes tóxicos, orgánicos e inorgánicos, presentes en la atmosfera, suelos y agua que generan un daño irreversible en el planeta y en la salud de la población (Carreño, 2014).

El mayor impacto de estas actividades ha sido la contaminación de las fuentes hídricas por vertimientos producto de la minería y la agricultura, al igual que las aguas residuales provenientes de zonas urbanas y de desechos industriales que contienen sustancias tóxicas, bioacumulables y no biodegradables, como los metales pesados. A diferencia de otros contaminantes, las especies metálicas tienden a persistir indefinidamente, acumulándose en los tejidos vivos a través de la cadena alimentaria (Arias, 2005).

Uno de los metales considerados de mayor toxicidad es el cromo (Cr), sexto elemento más abundante de la corteza terrestre, el cual es de color blanco brillante, frágil y con alta dureza; entre sus propiedades están la resistencia al calor y la corrosión (Pazos, 2007). Este metal pasa al medio ambiente, principalmente por las descargas de los efluentes de numerosas industrias como metalurgia, galvanoplastia, curtiduría, petroquímica y producción de pigmentos; además, de otros usos considerados menores (Galvao, 1987).

La producción mundial de cromo es de 10^7 toneladas por año. De esto, el 85%es utilizado por la industria metalúrgica y química para proporcionar color, inhibición a la corrosión y protección al revestimiento; Por otra parte, el 15% es implementado en la fabricación de refractarios, tratamiento de pieles en la industria curtidura, pigmentos y galvanoplastia (Navarro, 2016).

El cromo presenta diferencias significativas en sus características biológicas, bioquímicas y toxicológicas; además tiene diferentes estados de oxidación que van desde Cr^{+2} hasta Cr^{+6}, siendo las formas más estables Cr(VI) y Cr(III) y considerando menos tóxico el Cr(III) (Joutey et al., 2015).

Más del 70% de la producción de piel curtida en México se produce en la ciudad de León, Guanajuato, es importante destacar que el curtido al cromo es el método más utilizado puesto que alrededor del 80% de las empresas curtidoras lo usan y solo el 20% utilizan taninos vegetales.

Los efluentes de estas industrias contienen cromo en estado hexavalente (Cr (VI)) a los cuales no se les da un tratamiento final adecuado y este es considerado la especie de mayor toxicidad y un posible agente cancerígeno (National Institute of Occupational Safety and Health, 2013).

El estado de Guanajuato, México cuenta con un número elevado de industrias que utilizan compuestos de cromo como materia prima para sus procesos. La acumulación de residuos peligrosos en el suelo sin ningún tipo de control ha generado importantes riesgos a la población, en especial aquellos que contienen sales de cromo hexavalente en grandes concentraciones y han sido reportados en el derecho de vía de León-San Francisco (PROFEPA, 2019).

De ahí que la eliminación de cromo hexavalente en efluentes es uno de los grandes retos y objetivos del desarrollo sostenible en cada comunidad pues los recursos hídricos son más escasos y la mayoría de los cuerpos de agua existentes sufren de algún tipo de contaminación, lo cual impulsa el estudio de alternativas para la reducción de cromo y su posterior remoción.

Algunas de las alternativas más usadas son:

- Remoción de cromo con intercambio iónico.
- Materiales Adsorbentes.
- Biomateriales.
- Electrocoagulación.
- Biorremediación por medio de microorganismos

Frente a estas opciones se impone la biorremediación como alternativa para la reducción de Cr(VI) del ambiente y de residuos industriales.

Hongos, bacterias y algas son capaces de efectuar transformaciones químicas de los metales, tales como oxidación, reducción, metilación y desalquilación (Gradd y White, 1992) y las usan como estrategia de resistencia; estos organismos tienen diversos mecanismos de interacción con cromo los cuales involucran procesos activos y pasivos, incluyendo transporte, acumulación, bioabsorción, y reducción enzimática y no enzimática, de Cr(VI) a Cr(III) (Gutiérrez et al., 2016).

Se ha descrito que los hongos del suelo son de 10 a 50 veces más resistentes que las bacterias a los efectos del Cr(VI). Los datos indican que in vitro, el Cr(VI) inhibe la esporulación y el crecimiento micelial (Coreño, 2009). Las células fúngicas interaccionan con el cromo a diferentes niveles, desde la pared celular, el periplasma y la membrana plasmática hasta el citoplasma y los organelos celulares. Es común que los microorganismos nativos de sitios contaminados con cromato muestren resistencia al ion debido a que poseen mecanismos activos o pasivos que les permiten removerlo o detoxificarlo (Gutiérrez et al., 2016).

De forma general estos mecanismos se muestran en la figura 1.

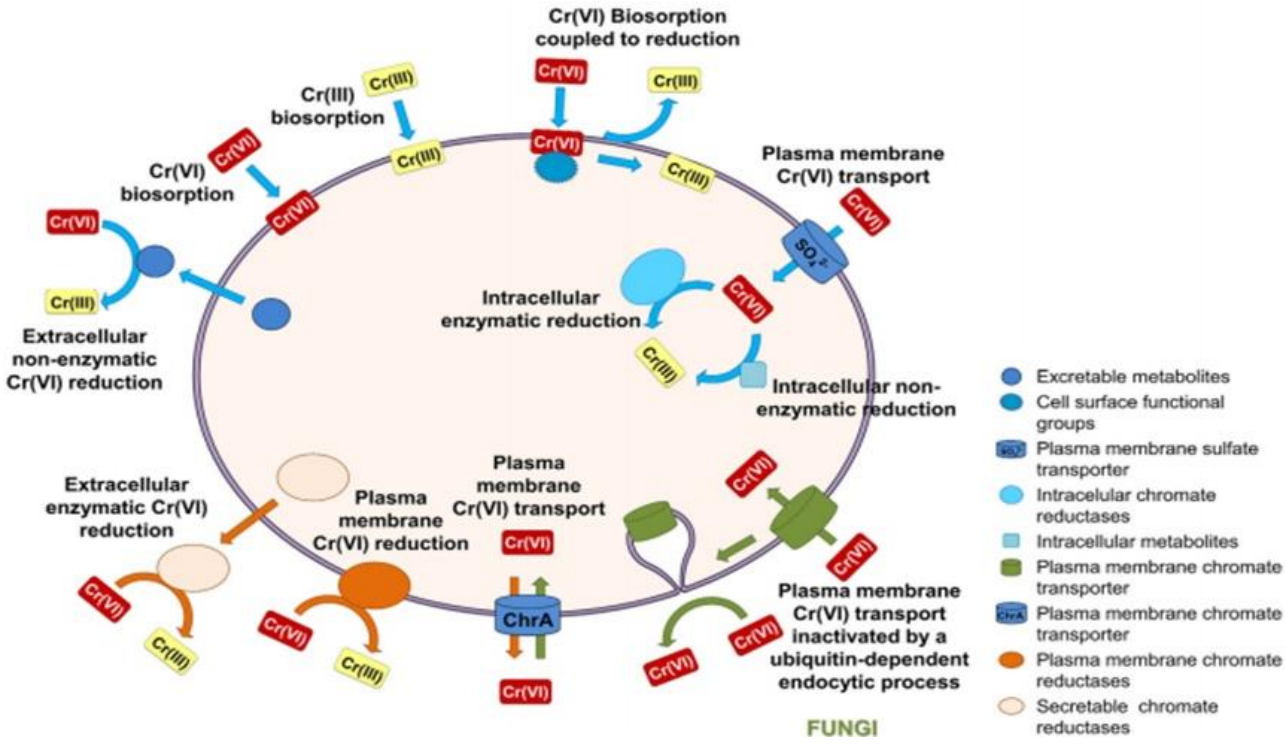


Figura 1. Mecanismos de interacción con cromo en células fúngicas. Tomado de Gutiérrez *et al*. (2016)

Aspergillus niger es uno de los microorganismos más importantes utilizados en biotecnología. Desde hace algunos años este microorganismo es empleado en biotransformaciones para el tratamiento de desechos debido a su capacidad reductora de algunos iones de metales pesados. En general, es un microorganismo seguro que se encuentra documentado por organizaciones internacionales de salud y seguridad ocupacional (Schuster et al., 2002).

En algunos trabajos que describen hongos con capacidad de reducir el Cr(VI) se encuentran levaduras como *Candida utilis* (Rapoport y Muter, 1995) y *Candida maltosa* (Ramírez-Ramírez col., 2004); además de hongos filamentosos como *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.* (Wang y col., 1998; Acevedo y col., 2006; Shrivastava y Thakur, 2006).

Fakuda et al. (2008) lograron disminuir los niveles de Cr(VI) en aproximadamente un 80% de muestras de suelo contaminado en ensayos en fase acuosa y de suspensión por medio de hongos fibrosos resistentes a los cromatos, como lo son *Aspergillus sp.* y *Penicillium sp.*

La absorción y bioreducción son los principales mecanismos considerados para el desarrollo de procesos biotecnológicos de remoción de Cr (Gutiérrez et al., 2016), como una alternativa a los métodos fisicoquímicos actualmente utilizados para su remoción a gran escala, los cuales son costosos y causan generación de una gran cantidad de productos secundarios de desecho (Bai et al., 2003).

La reducción de Cr(VI) mediante la aplicación de procesos biotecnológicos se ha consolidado fuertemente como una alternativa eficiente, económica y práctica en su implementación. A partir de lo anterior, en los sitios contaminados se han aislado y caracterizado cepas fúngicas con el fin de elucidar los mecanismos implicados en su resistencia al cromato, así como indagar sobre las posibles aplicaciones biotecnológicas de dichas interacciones (Espino, 2002). Entre los microorganismos aislados de dichos ambientes se encuentra la cepa *A. tubingensis* Ed8. Este hongo filamentoso ha sido estudiado debido a su tolerancia al Cr(VI) y a su capacidad de reducirlo a Cr(III) con ayuda de la enzima glucosa oxidasa GOX (Barajas, 2017). Estos estudios han encontrado que el proceso ocurre con una acumulación mínima de cromo en la biomasa, menos del 1%, por lo que se ha propuesto que la reducción ocurre en el medio extracelular (Acevedo, 2006).

Por lo tanto, el diseño del proceso de producción de un bioagente reductor de Cr(VI) a partir del hongo *A. tubingensis* se hace vital en la práctica gracias a su viabilidad frente a otras alternativas de reducción. La producción de agentes biorreductores está sujeta a la determinación

de las condiciones en las cuales puede crecer el hongo y producir bivalentes con las características requeridas.

No obstante, su aplicación tiene como fin obtener una concentración mínima de metales pesados y así cumplir las normas ambientales establecidas para efluentes contaminados. Todo esto, mediante la implementación de cultivos de la cepa *A. tubingensis* Ed8 en biorreactores tipo Air-lift (Espino, 2002) y de tanque agitado (AMIDIQ, 2015) con capacidad de biotransformación a Cr(III), lo cual puede constituir una alternativa novedosa, limpia, económica y sustentable (Acevedo et al., 2006).

De ahí que surja la pregunta por ¿Qué sistema de producción y aplicación del sobrenadante de la cepa *A. tubingensis* Ed8 reduce en mayor proporción el Cr(VI) a Cr(III) en reactores de tanque agitado? Basta agregar que la reducción mediante la aplicación de procesos biotecnológicos se ha consolidado fuertemente como una alternativa eficiente, novedosa, económica, limpia, sustentable y práctica en su implementación (Gutiérrez et al., 2010). Por lo tanto y teniendo en cuenta lo anterior, este proyecto propuso desarrollar un sistema de producción y aplicación del sobrenadante reductor de Cr(VI) a Cr(III), proveniente de la cepa *A. tubingensis* Ed8 para reactores de tanque agitado. Con este estudio se aporta un camino de solución al problema ambiental producto de actividades industriales y se espera su futura aplicación en contextos reales de operación.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Desarrollar un sistema de producción y aplicación del sobrenadante reductor de Cr(VI) a Cr(III), proveniente de la cepa *Aspergillus tubingensis* Ed8 para reactores de tanque agitado.

1.2 Objetivos específicos

- Evaluar las condiciones de crecimiento de la cepa Ed8 del *Aspergillus tubingensis* para obtener el sobrenadante con mayor capacidad de reducción de Cr(VI).

- Encontrar las condiciones de producción del sobrenadante con la mayor capacidad de reducción de Cr(VI) en un reactor de tanque agitado mecánicamente y reactor tipo Air-lift a nivel laboratorio con características geométricas y de operación similares a las de uno de tipo industrial.

2. Metodología

La metodología propuesta para dar solución a los objetivos planteados se describe en la figura 2.

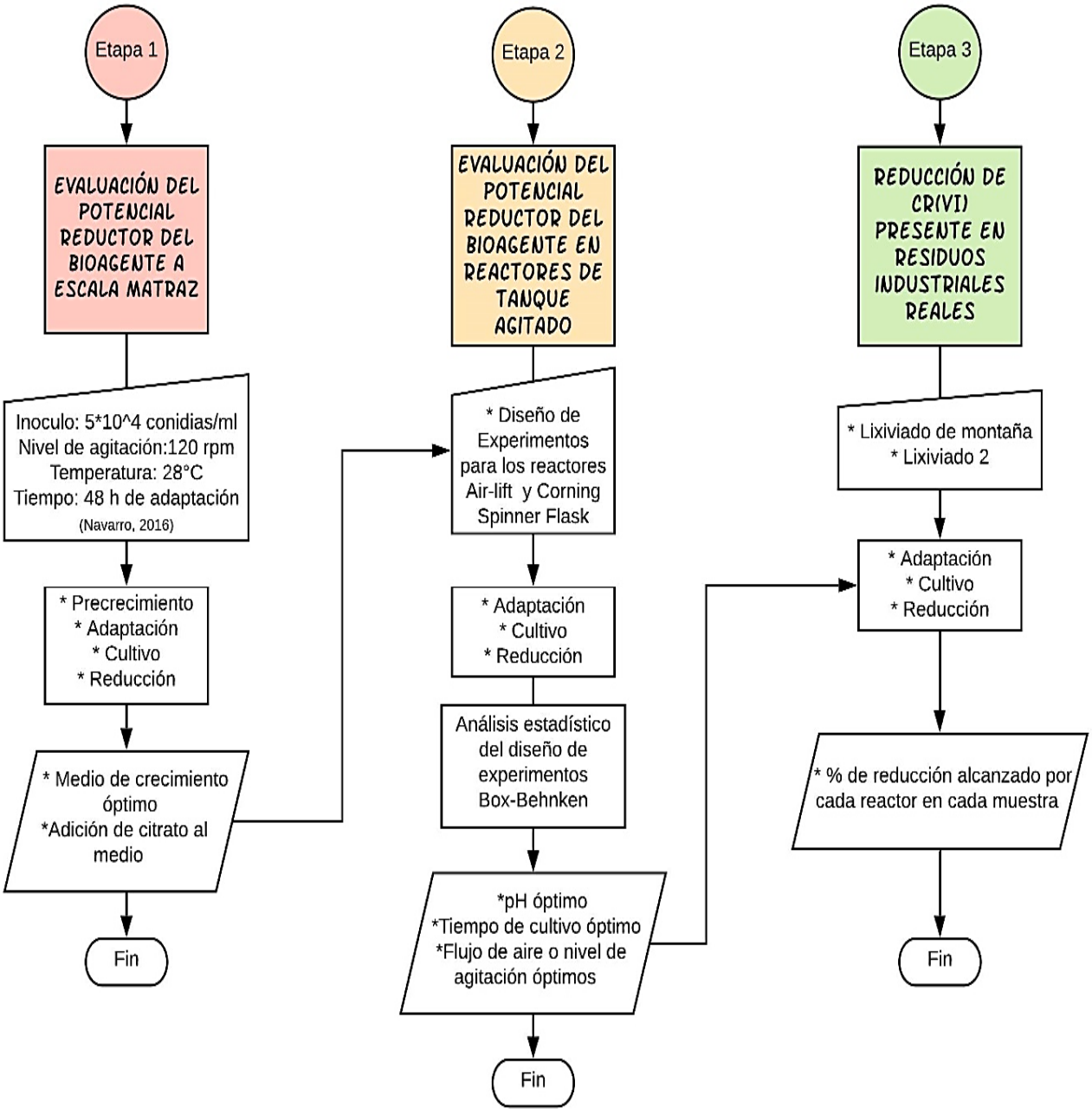


Figura 2. Etapas del proyecto

2.1 Evaluación del potencial reductor del bioagente a escala matraz (Etapa 1)

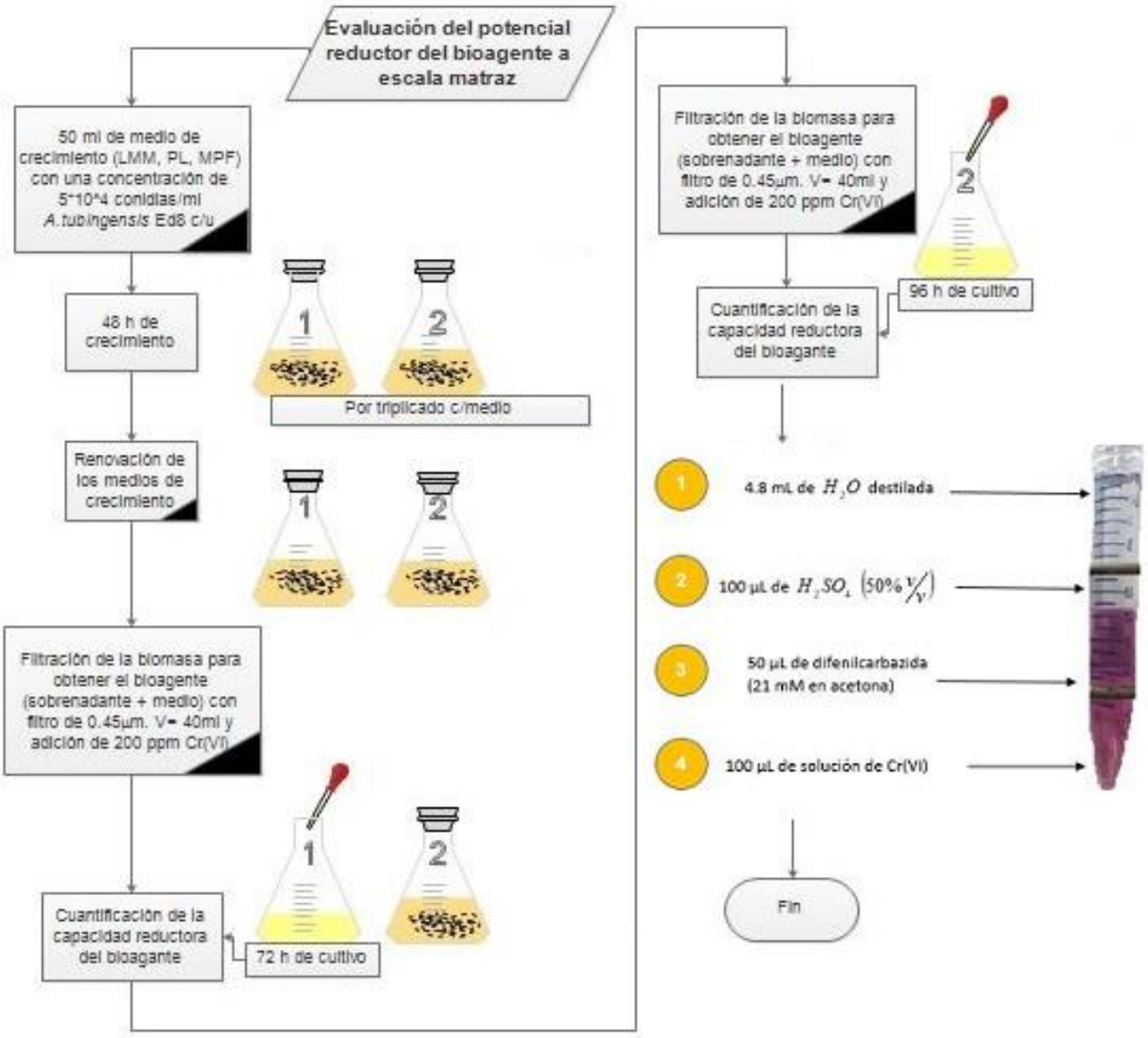


Figura 3. Metodología de la obtención del bioagente a escala matraz

Se realizó la selección del medio de crecimiento y la evaluación del efecto de la adicción de citrato al medio como estimulante de la capacidad reductora; las condiciones se muestran en la tabla 1.

Tabla 1.
Condiciones estudiadas durante el proceso a escala matraz

Condiciones*	Parámetros
Citrato (mM)	0 y 20
Medios de crecimiento	PL – MPF – LMM

Nota: * Cada una de las pruebas se realizó por triplicado en matraces con capacidad de 250 ml con un volumen de trabajo de 50 ml.

2.1.1 Efecto de la adición de citrato al medio de crecimiento. Se ha comprobado que emplear medios de crecimiento ricos en azúcares combinados con el uso de aditivos, como citrato, aumenta la capacidad reductora de la cepa *A. tubingensis* Ed8, ya que cuando el microorganismo crece en un medio con citrato incrementa la velocidad de transformación de Cr(VI) a Cr(III) (Espino, 2002).

Para evaluar este efecto, se realizaron pruebas empleando los medios de crecimiento LMM, PL, MPF. A estos, se les adicionó una concentración de 20 mM de ácido cítrico y posteriormente se les ajustó el pH a 4. Los medios sin ácido cítrico fueron evaluados como blancos.

2.1.2 Selección del medio de crecimiento. Para esta fase se probaron tres diferentes medios: el Medio Mínimo Lee (LMM) (Lee, Buckley y Campbell, 1975) contiene los nutrientes mínimos indispensables para el crecimiento de una colonia. Su pH se ajustó empleando NaOH 1M y posteriormente fue esterilizado en la autoclave a una temperatura de 110 °C durante 5 minutos, como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2.
Reactivos empleados para medio LMM

Reactivos	Concentración
Fosfato monopotásico ($\boldsymbol{KH_2PO_4}$)	0.25%
Sulfato de magnesio heptahidratado ($\boldsymbol{M_gSO_4\ 7H_2O}$)	0.20%
Sulfato de amonio ($\boldsymbol{(NH_4)_2SO_4}$)	0.50%
Cloruro de sodio ($\boldsymbol{N_aCl}$)	0.50%
Dextrosa ($\boldsymbol{CH_2OH(CHOH)_4CHO}$)	0.25%
Ácido cítrico*	20 mM

*Presencia o ausencia sujeta al experimento

El medio PL a base de piloncillo o panela (Navarro, 2016) se empleó por ser rico en azúcares, económico y natural (Petatan, 2006). Se preparó adicionando 2% p/v de piloncillo y aforando con agua destilada (Navarro, 2016). Su pH se ajustó empleando NaOH 1 M y posteriormente fue esterilizado en la autoclave a una temperatura de 110 °C durante 5 minutos para evitar su caramelización, como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3.
Reactivos empleados para medio PL

Reactivos	Concentración
Piloncillo (panela)	2%
Ácido cítrico*	20 Mm

*Presencia o ausencia sujeta al experimento.

Medio MPF (Melaza, Peptona y Fertilizante) (Santos, 2019), está constituido en base a un reactivo residual como lo es la melaza, empleando fuentes de carbono, nitrógeno y micronutrientes de bajo costo. Su pH se ajustó empleando NaOH 1 M y posteriormente fue esterilizado en la autoclave a una temperatura de 110 °C durante 5 minutos. Se decidió emplear peptona biotriptasa en lugar de extracto de levadura (Santos, 2019). Ver tabla 4.

Tabla 4.
Reactivos empleados para medio MPF

Reactivos	Concentración
Melaza	0.3%
Peptona biotriptasa	1%
Fertilizante*	0.035%
Ácido cítrico**	20 mM

*El fertilizante contiene compuestos como nitrógeno, fósforo, potasio, magnesio, hierro, manganeso, zinc, boro, cobre, y molibdeno.
**Presencia o ausencia sujeta al experimento

Cada uno de los medios fueron inoculados con una concentración de $5 * 10^4$ conidias/ml (Navarro, 2016) de la cepa *A. tubingensis* Ed8. Para la obtención de este inóculo se partió de una solución stock de conidias de propiedad del laboratorio de Genética Molecular de Hongos y Bacterias de la Universidad de Guanajuato – México. A partir de estas conidias se realizaron cultivos en medio PDA (Papa, Dextrosa, Agar), el medio se preparó mediante la ebullición de la papa en agua destilada durante 30 minutos. Para la solidificación, se adiciono agar bacteriológico para un volumen de 250 ml. El medio fue esterilizado en la autoclave a una temperatura de 115 °C durante 15 minutos y distribuido en cajas Petri expuestas a temperatura ambiente para su solidificación, ver tabla 5.

Tabla 5.
Reactivos empleados para medio PDA

Reactivos	**Cantidad***
Agua destilada	70 ml
Extracto de papa	50 g
Dextrosa	5 g
Agar bacteriológico	3.75 g

*Para un volumen de 250 ml

Los cultivos se incubaron a una temperatura de 28 °C durante 5 días con el fin de asegurar el ciclo de crecimiento miceliar y la conidiogénesis del hongo. Posterior a ello, se llevó a cabo la recolección agregando 5 ml de agua destilada a cada caja y se raspó la superficie con un asa de vidrio. La suspensión de conidias obtenida fue lavada 3 veces con agua, filtrada y depositada en un tubo Corning. Para obtener la concentración final de conidias, se realizó una dilución 1:100, disponiendo 10 µL del contenido en la cámara de Neubauer para llevar a cabo el conteo por duplicado en el área central. Seguido a esto, se multiplicó por el factor de dilución obteniendo un recuento de $8.32 * 10^7$ *Conidias/ml* . Para su conservación, el stock se mantuvo en refrigeración a una temperatura aproximada de 4 °C hasta su uso. Luego de inoculados, los medios fueron incubados a una temperatura de 28 °C y una agitación de 120 rpm durante 48 h.

Concluido este tiempo, se procedió a realizar un lavado a la biomasa con solución salina y a renovar los medios de crecimiento asegurando las mismas condiciones iniciales. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

Para la obtención del bioagente reductor, a partir de los cultivos anteriores, se tomaron muestras de 40 ml a las 72 y 96 h de crecimiento. Estas muestras fueron filtradas al vacío en un ambiente estéril empleando un filtro de tamaño de poro de 0.45 µm para separar la biomasa del sobrenadante (compuesto por bioagente y medio de crecimiento). Para evaluar la capacidad de reducción del bioagente obtenido en cada uno de los medios de crecimiento, se agregaron 485 µL de solución de cromo hexavalente (200 ppm) en forma de dicromato de potasio a los 40 ml de sobrenadante recuperados de cada medio. Se agitó y luego se tomó una alícuota de 100 µL de cada matraz, diluyendo este en una relación 1:4 con agua destilada en un tubo eppendorf, la cual fue adicionada a un tubo corning que contenía 4.8 ml de agua destilada, 100 µL de ácido sulfúrico y 50 µL de 1.5 difenilcarbazida que se muestra en la tabla 6 (Greenber, 1981). Por último, se agitó cada tubo y se dejaron en reposo por 3 minutos para que la reacción fuera completa. La absorbancia de la solución fue leída en un espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda de 540 nm. Las muestras fueron procesadas en conjunto con una curva de calibración para calcular el porcentaje de reducción de Cr (VI) en cada ensayo a lo largo de cada intervalo de tiempo.

Tabla 6.
Determinación de Cr(VI) por el método de difenilcarbazida

	Agua Destilada	**Muestra**	**Difenilcarbazida***	**Ácido sulfúrico (50%)**
Blanco	4.9 ml	----------	50 µL	100 µL
Muestra/Curva	4.8 ml	100 µl	50 µL	100 µL

*La difenilcarbazida debe disolverse en acetona a una concentración de 21 mM y depositado en un envase ámbar

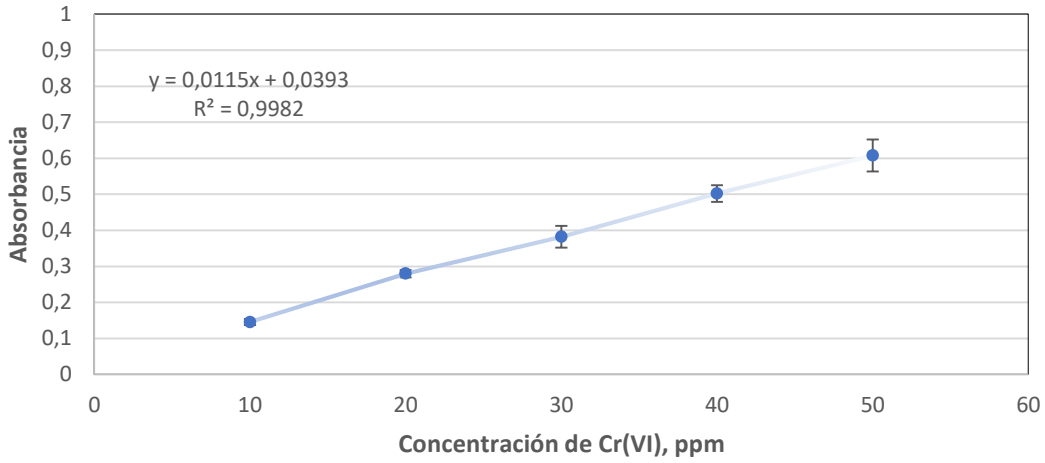


Figura 4. Curva de calibración

Cada uno de los medios fueron inoculados con una concentración de $5x10^4$ conidias/ml de la cepa *A. tubingensis* Ed8 e incubados a una temperatura de 28 °C y una agitación de 120 rpm durante 48 h. Concluido este tiempo, se procedió a realizar un lavado a la biomasa con solución salina estéril y a renovar los medios de crecimiento asegurando las mismas condiciones iniciales. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

La capacidad de reducción de cada uno de los ensayos fue evaluada tomando muestras de 40 ml a las 72 y 96 h de crecimiento. Estas muestras fueron filtradas al vacío en un ambiente estéril empleando un filtro de tamaño de poro de 0.45 µm para separar la biomasa del sobrenadante (compuesto por bioagente y medio de crecimiento). A estas muestras se aplicó el mismo método de $K_2CrO_7 + H_2SO_4$ + 1.5 difenilcarbazida descrito anteriormente. Adicionalmente, se evaluó el efecto del tiempo de contacto del bioagente con la solución de K_2CrO_7. Para esto se tomaron muestras a las 0, 12, 18 y 24 h de contacto.

De igual forma, se registró el comportamiento de los ensayos con medios de crecimiento sin inóculo de *A. tubingensis* Ed8. Por otra parte, se obtuvo la curva de crecimiento de la cepa con el

peso seco de la biomasa registrado en cada intervalo de tiempo y se realizó la cuantificación de azúcares reductores por el método 3,5 Dinitrosalicilico (DNS) (Miller, 1959).

2.2 Evaluación del potencial reductor del bioagente en reactores de tanque agitado (Etapa 2)

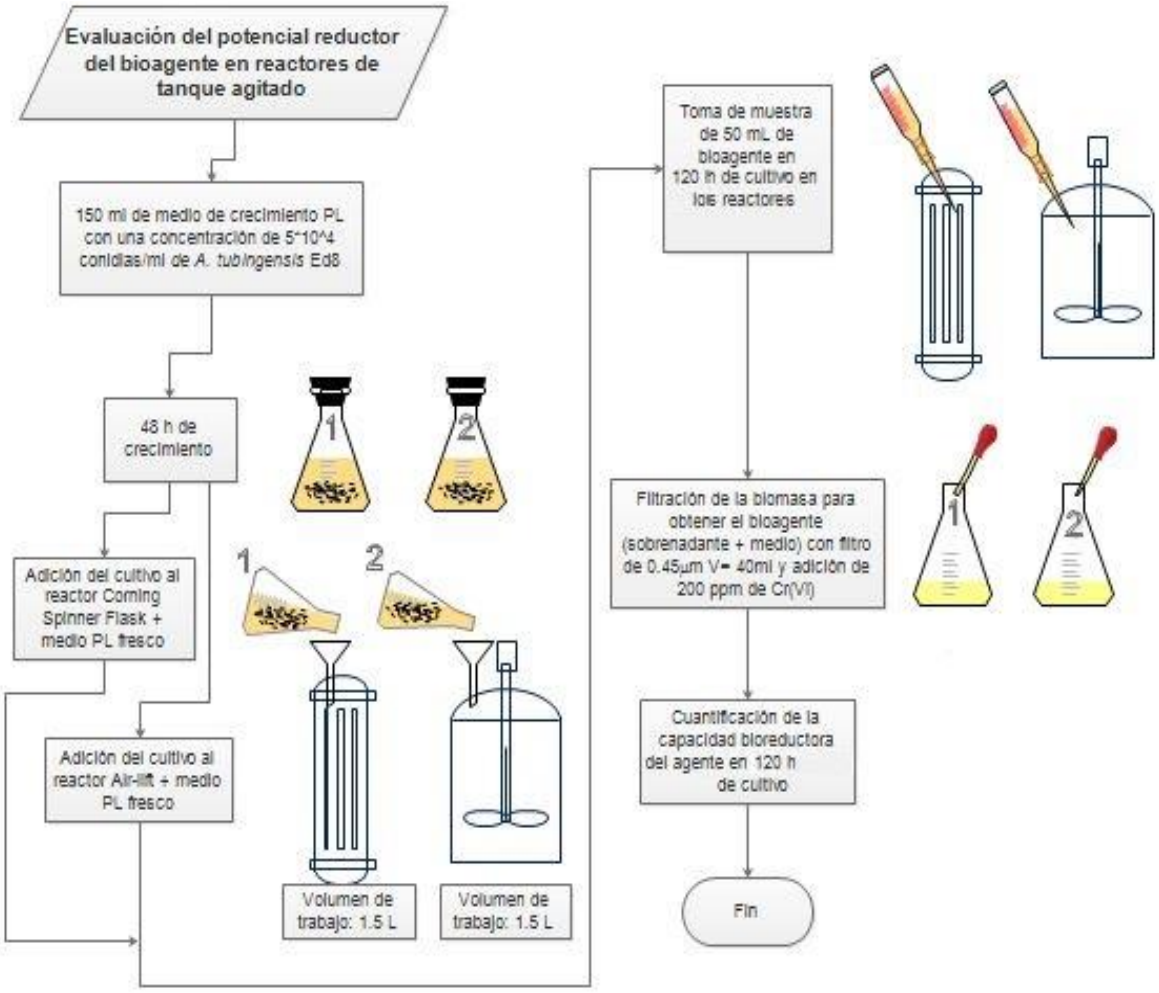


Figura 5. Metodología para la obtención del bioagente en reactores de tanque agitado

Se trabajó con dos biorreactores a escala laboratorio: el Air-lift y el Corning Spinner Flask los cuales tienen características geométricas y de operación similares a los reactores de tipo industrial; los dos reactores tenían una capacidad de 2 L y se operaron con un volumen de trabajo de 1.5 L.

A partir de los resultados obtenidos en la escala matraz se seleccionó el medio de crecimiento PL y el uso de citrato como aditivo al medio de crecimiento. Por lo tanto, en esta etapa fue necesario evaluar otras variables de operación como pH, tiempo de cultivo, nivel de agitación o flujo de aire según sea el reactor, como se muestran en la tabla 7.

Tabla 7.
Parámetros estudiados en los reactores Air-lift y Corning Spinner Flask

Condiciones	Parámetros
Tiempo de cultivo (h)	72 – 96 – 120
Flujo de aire (Lpm) - Air-lift	0.5 – 1 – 4
Nivel de agitación (rpm) - Corning Spinner Flask	60 – 120 – 180
pH	2.6 – 4.0 – 5.3

Los reactores fueron inoculados con una concentración de $5x10^4$ conidias/ml. Se partió de una solución stock de conidias de la cual se preparó un pre-inóculo de 150 ml con medio crecimiento PL el cual se dejó crecer durante 48 h a una temperatura de 28°C y una agitación de 120 rpm. Después de este tiempo este pre-inóculo fue adicionado a los reactores, los cuales contenían 1350 ml de medio fresco. La temperatura de operación de los reactores fue de 28 °C.

Para evaluar el efecto de las variables de operación se propuso un diseño experimental de tipo Box-Behnken con superficie de respuesta. En el caso del pH, los niveles evaluados fueron 2.6, 4.0 y 5.3 para cada uno de los reactores. Para estudiar el efecto del flujo de aire o nivel de agitación, que en cada tipo de reactor fue diferente; para el Air-lift se manejaron flujos de aire de 0.5, 1 y 4 Lpm y para el Corning Spinner Flask niveles de agitación de 60, 120 y 180 rpm. Finalmente, para evaluar el tiempo de cultivo para cada uno de los ensayos realizados, se seleccionaron 72, 96 y 120 h. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

Una vez finalizados estos tiempos se evaluó la capacidad de reducción de cada uno de los ensayos. Se tomaron muestras de 40 ml a las 72, 96 y 120 h de crecimiento. Estas muestras fueron filtradas al vacío en un ambiente estéril empleando un filtro de tamaño de poro de 0.45 µm para

separar la biomasa del bioagente (compuesto por sobrenadante y medio de crecimiento). A estas muestras se aplicó el mismo método $K_2CrO_7 + H_2SO_4 +$ 1.5 difenilcarbazida descrito anteriormente. Adicionalmente, se evaluó el efecto del tiempo de contacto del bioagente con la solución de K_2CrO_7. Para esto se tomaron muestras a las 0, 3, 9 h de contacto. De igual forma, se registró el comportamiento de los ensayos con medios de crecimiento sin inóculo de *A. tubingensis* Ed8.

2.3 Reducción de Cr(VI) presente en residuos industriales reales (Etapa 3)

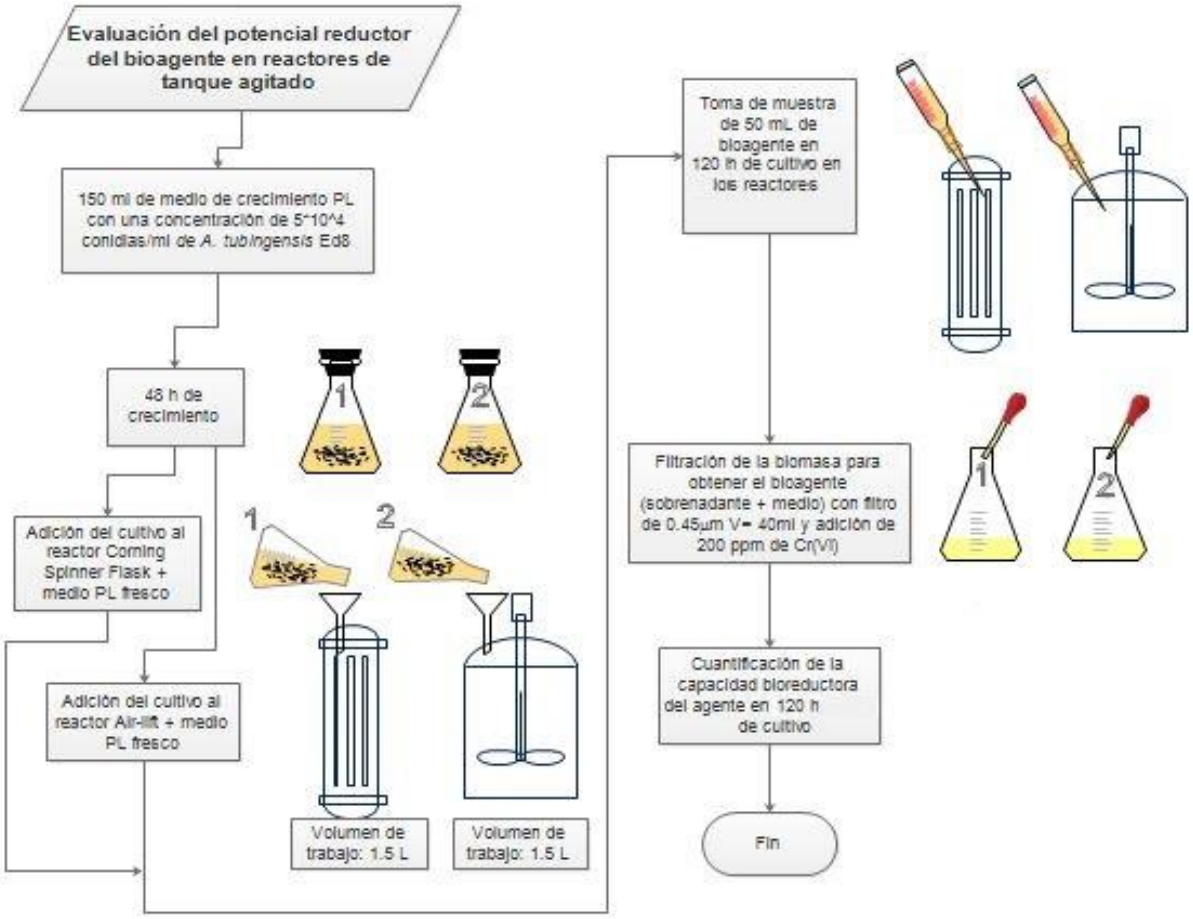


Figura 6. Reducción de Cr(VI) en residuos industriales

Partiendo del resultado del análisis estadístico del diseño de experimentos tipo Box-Behnken para las condiciones de operación en los reactores Air-lift y Corning Spinner Flask donde se tiene la mayor capacidad de reducción de Cr(VI) por parte del bioagente, se evaluaron dos muestras de residuos industriales de Química Central de México que contenían Cr(VI).

3. RESULTADOS Y ANÁLISIS

3.1 Evaluación del potencial reductor del bioagente a escala matraz (Etapa 1)

En esta etapa se evaluó la influencia del medio de crecimiento y el citrato frente a una concentración de 200 ppm de Cr(VI) con el fin de identificar las mejores condiciones de reducción.

3.1.1 Influencia de la adición de citrato al medio de crecimiento y su selección del mismo.

El citrato es considerado uno de los aditivos más económicos y rentables en el mercado, siendo buenos controladores del pH de soluciones básicas. Se ha encontrado que metabolitos fúngicos como citrato y oxalato, participan activamente en la movilidad del cromo en suelos y sedimentos (Coreño, 2009).

Investigaciones previas han demostrado que se requiere una cantidad aproximada de 20 mM de citrato en el medio de crecimiento para acelerar el proceso y obtener un alto porcentaje de reducción de Cr(VI) (Navarro, 2016). Al no implementar este aditivo no se puede superar un umbral de reducción del 52% en todos los medios de crecimiento y sobrenadantes evaluados como se muestra en la figura 7.

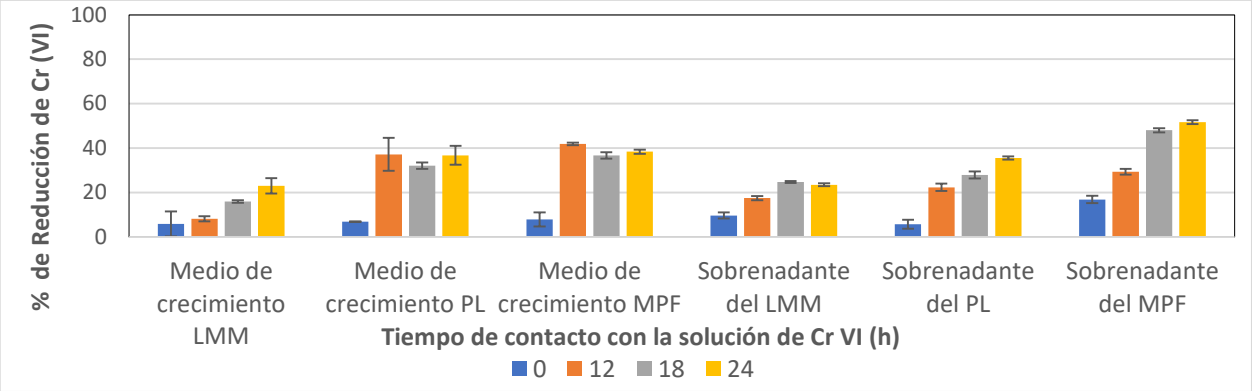


Figura 7. Evolución del % de reducción de 200 ppm Cr(VI) conforme se modifica el tiempo de contacto entre el sobrenadante o medio de crecimiento con la solución de cromo. En todos los casos el sobrenadante fue obtenido después de 96 h de cultivo en ausencia de citrato y pH 4.

Se puede observar una diferencia en la reducción de Cr(VI) por parte de los medios, sin inóculo, MPF del 38%, PL del 36% y LMM del 23%. Similar a estos resultados, el sobrenadante MPF obtuvo la mayor reducción con un 51% comparado con el sobrenadante LMM con un 23%.

La velocidad de reducción de Cr(VI) por parte de la cepa Ed8 cultivada en medio LMM en ausencia de citrato es menor cuando se compara a la cepa Ed8 cultivada con citrato. Habiendo establecido la importancia de adicionar citrato al medio de crecimiento, se procedió a evaluar los medios LMM, PL y MPF con 20mM de citrato y sus respectivos sobrenadantes para determinar el mayor porcentaje de reducción de Cr(VI). Para esto, se trabajaron dos tiempos de cultivo de 72 h (figura 8) y 96 h (figura 9) los cuales fueron monitoreados en diferentes intervalos de tiempo de contacto. Un seguimiento de las primeras 72 h de cultivo mostró una diferencia notable entre la reducción de Cr(VI) por parte de los medios MPF y LMM con sus respectivos sobrenadantes, en donde el medio MPF realizó un mayor aporte a la reducción de Cr(VI); mientras el medio LMM solamente presentó reducción al finalizar las 24 h de contacto. Lo anterior, posiblemente signifique una inhibición en el microorganismo estudiado por parte de algunos de los compuestos que componen estos medios. Por el contrario, sobrenadante PL mostró un porcentaje de reducción de 5% más que el obtenido por el medio de crecimiento PL en 24 h de contacto con Cr (VI).

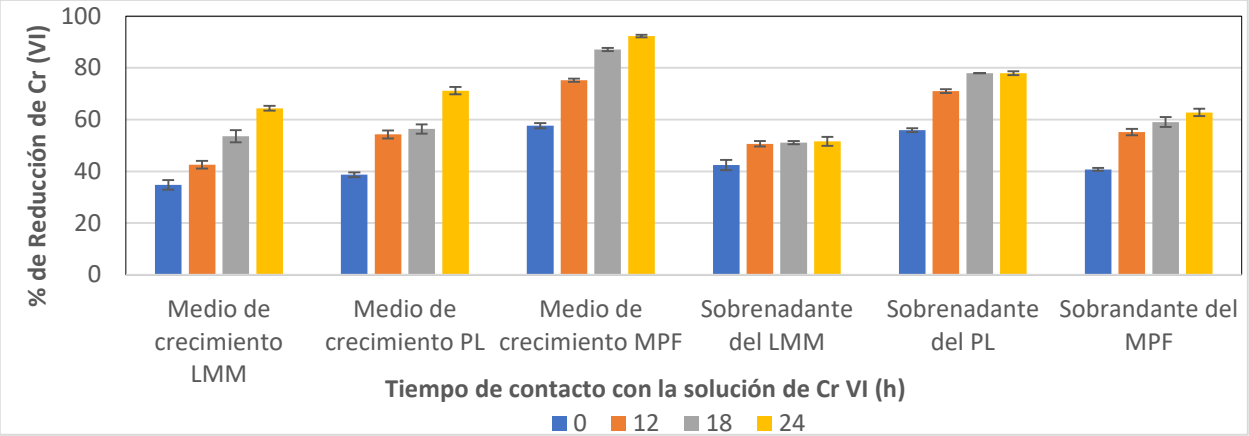


Figura 8. Evolución del % de reducción de 200 ppm Cr(VI) conforme se modifica el tiempo de contacto entre el sobrenadante o medio de crecimiento y el cromo. En todos los casos el sobrenadante fue obtenido después de 72 h de cultivo con 20 mM de citrato y pH 4

El seguimiento a las 96 h de cultivo se destacó por tener mayor capacidad reductora del Cr(VI), especialmente el sobrenadante PL que registra un 40% de reducción mayor que el resto de los sobrenadantes; también logró una reducción del 99.6%. En el periodo comprendido entre 72 y 96 h existió una relación directa en la reducción de Cr(VI) y la duración del cultivo en los sobrenadantes provenientes de medios ricos en azúcares, como MPF y PL. Esto se debe principalmente a la presencia de diferentes fuentes de carbono y aditivos en el medio de crecimiento, como lo es el citrato, que fortalece la reducción de Cr(VI) (Navarro, 2016).

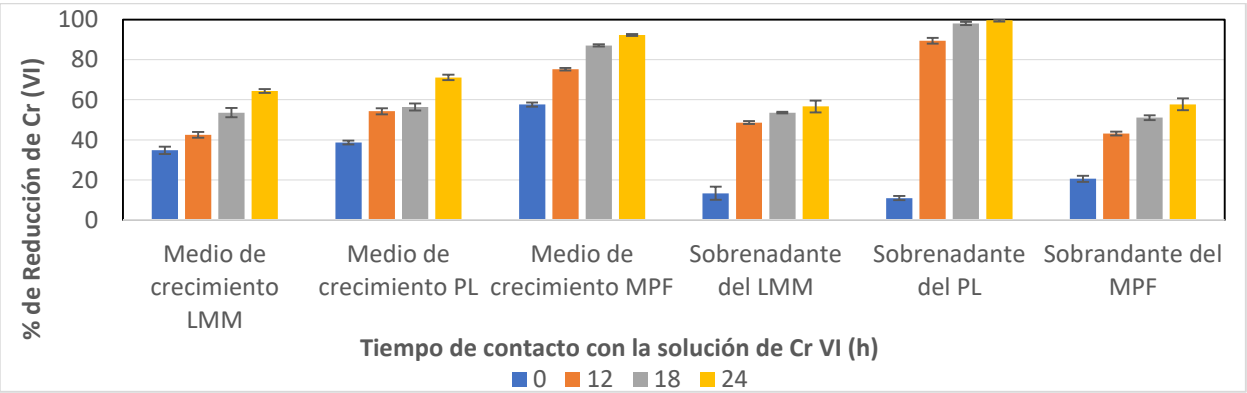


Figura 9. Evolución del % de reducción de 200 ppm Cr(VI) conforme se modifica el tiempo de contacto entre el sobrenadante o medio de crecimiento y el cromo. En todos los casos el sobrenadante fue obtenido después de 96 h de cultivo con 20 mM de citrato y pH 4.

Existen tres posibles explicaciones frente al incremento de la reducción de Cr(VI) en cultivos de Ed8 incubados con citrato.

- El citrato actúa como un agente quelante de Cr(III) que favorece la reducción de Cr(VI) (Mabbett et al., 2002; Coreño, 2009).
- El citrato estimula la producción o actividad de enzimas involucradas en la reducción de Cr(VI) (Rodriguez, 2014; Flores, 2015; Romo et al.,2015).
- Los productos del metabolismo del citrato excretados pueden tener la capacidad de reducir Cr(VI). Ver figura 10.

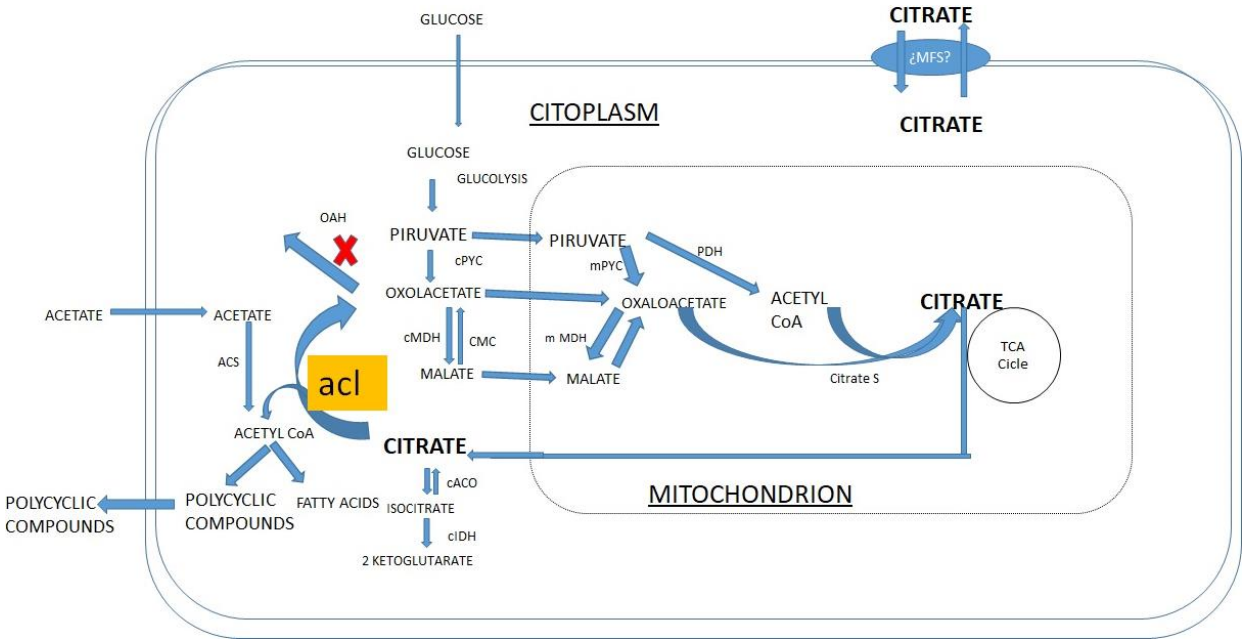


Figura 10. Propuesta para el metabolismo del citrato deducida de los datos del genoma en *Aspergillus niger*. (Pel et al., 2007. Modificado por Bautista 2019)

Se observó que cuando el hongo crece en presencia de glucosa como fuente de carbono, esta glucosa es metabolizada a piruvato por medio de glucolisis, este piruvato es transportado a la mitocondria donde es metabolizado a Acetyl CoA, este ingresa al ciclo de krebbs y forma citrato, además este citrato producido en la mitocondria es excretado al citosol por un transportador.

En el citosol el citrato es metabolizado por el gen acl el cual forma Acetyl coA y oxaloacetato. En caso del oxaloacetato este transformado a través de la oxaloacetato hidrolasa para formar acido oxálico el cual es excretado al medio extracelular. El Acetyl CoA es utilizado como precursor de la síntesis de ácidos grasos, y de estructuras policíclicas que son excretados al medio extracelular (Bautista, 2019).

En contraste al proceso descrito anteriormente, Navarro (2016) en su investigación alcanzó un porcentaje de reducción de 94.6% utilizando 500 ppm de Cr(VI) a 72 h de contacto con una concentración de $5x10^4$ conidias/ml de *A. tubingensis* Ed8 a condiciones de pH 2.6 y medio PL del 2%. Por el contrario, Coreño (2009) logró una reducción de 50 ppm de Cr(VI) a las 24 h de contacto con la biomasa *A. tubingensis* Ed8, en medio Lee (LM) a condiciones de pH 5.3. Se incubó a 28 °C y 200 rpm; no obstante, en cultivos que contenían 75 o 90 ppm de Cr(VI), la reducción fue del 60% y 40% a las 48 h, respectivamente.

Teniendo en cuenta lo anterior y los resultados obtenidos en este trabajo, se puede inferir que el sobrenadante PL presenta una ventaja costo-efectiva en comparación con los demás medios y sobrenadantes evaluados ya que presenta una alta eficiencia de reducción, además, un bajo costo de producción. Por lo tanto, este medio fue utilizado en los siguientes ensayos del presente trabajo.

Para establecer los tiempos de cultivo para la reducción fue necesario realizar una curva de crecimiento de la cepa *A. tubingensis Ed8* en medio PL a pH 5.3 con el peso seco de la biomasa, la cual se filtró y secó en intervalos de 12 h durante 7 días. Cada prueba se realizó por triplicado. Inicialmente, el microorganismo estaba consumiendo una fuente de carbono rica en azúcares que al agotarse entró en un periodo de adaptación; luego procedió a metabolizar una segunda fuente de carbono para llegar al máximo crecimiento exponencial, la fase exponencial resalta en el intervalo de tiempo de 80h y 120h como se muestra en la figura 11.

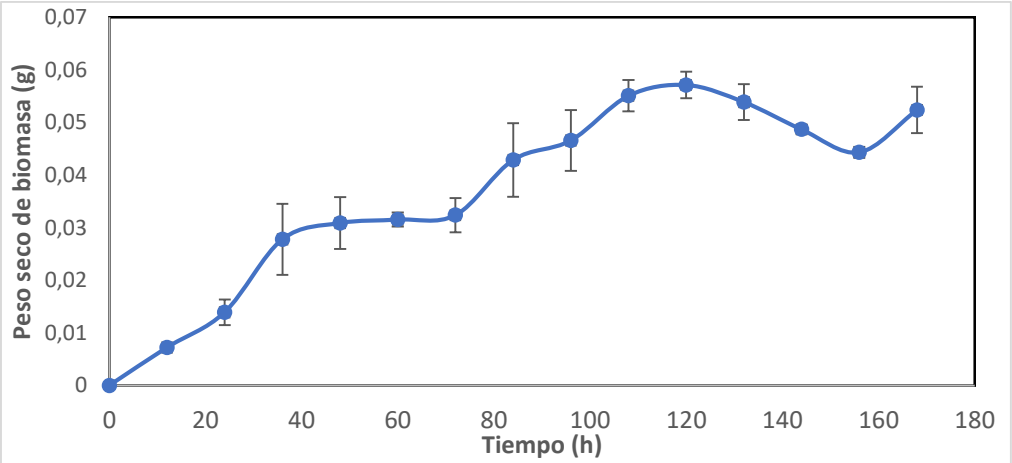


Figura 11. Evolución del crecimiento de la cepa Ed8 en medio PL a pH 5.3

Igualmente, fue necesario determinar el consumo de los azúcares, presentes en el medio PL, por parte del microorganismo *A. tubingensis* Ed8. En la figura 12 se muestra la concentración de azúcares reductores (g/L) a lo largo del tiempo de fermentación. Se puede observar que en las primeras 40 h hubo un aumento en la concentración debido a la acción enzimática del microorganismo sobre los disacáridos de sacarosa (azúcar no reductor) transformándola posiblemente en azúcares reductores, como glucosa y fructosa.

La sacarosa es la única fuente de carbono presente en el medio PL. Esta información es corroborada mediante un análisis por HPLC que determina las concentraciones de azúcares presentes. Ver tabla 8.

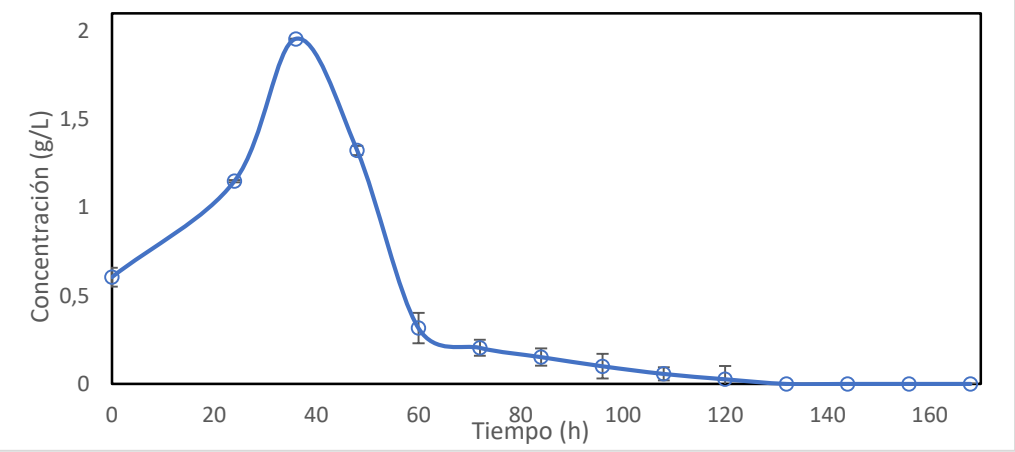


Figura 12. Azúcares reductores del medio PL con pH 5.3

Tabla 8.

Cuantificación de azúcares presentes en el piloncillo (PL)

	LABORATORIO DE ALIMENTOS CICTA	TOMA DE DATOS ANÁLISIS CROMATOGRÁFICOS	FOMETD .05 Versión: 04 Página: 1 de 1

Muestra-sacaridos - Panela

SACAROSA

Fecha inicio:	2019-10-08		Analista:	C

PM (g)	0,5107	PM (g)		0,5099	
ÁREA (mAU)	18,2600	ÁREA (mAU)		18,4500	
CONCENTRACIÓN (mg/mL)	7,6379	CONCENTRACIÓN (mg/mL)		7,7177	
VOLUMEN FINAL (mL)	50,0	VOLUMEN FINAL (mL)		50,0	
SACAROSA (g/100 g muestra)	74,78	SACAROSA (g/100 g muestra)		75,68	
PROMEDIO SACAROSA (g /100 g muestra)	**75,23**	**DRP**	**(%)**	**0,85**	

LACTOSA

Fecha inicio:	2019-10-08		Analista:	

PM (g)	0,5107	PM (g)		0,5099	
ÁREA (mAU)	N.D	ÁREA (mAU)		N.D	
CONCENTRACIÓN (mg/mL)	N.D	CONCENTRACIÓN (mg/mL)		N.D	
VOLUMEN FINAL (mL)	N.D	VOLUMEN FINAL (mL)		N.D	
LACTOSA (g/100 g muestra)	N.D	LACTOSA (g/100 g muestra)		N.D	
PROMEDIO LACTOSA (g /100 g muestra)	**N.D**	**DRP**	**(%)**	**N.D**	

GLUCOSA

Fecha inicio:	2019-10-08		Analista:	

PM (g)	0,5107	PM (g)		0,5099	
ÁREA (mAU)	N.D	ÁREA (mAU)		N.D	
CONCENTRACIÓN (mg/mL)	N.D	CONCENTRACIÓN (mg/mL)		N.D	
VOLUMEN FINAL (mL)	N.D	VOLUMEN FINAL (mL)		N.D	
GLUCOSA (g/100 g muestra)	N.D	GLUCOSA (g/100 g muestra)		N.D	
PROMEDIO GLUCOSA (g /100 g muestra)	**N.D**	**DRP**	**(%)**	**N.D**	

FRUCTOSA

Fecha inicio:	2019-10-08		Analista:	

PM (g)	0,5107	PM (g)		0,5099	
ÁREA (mAU)	N.D	ÁREA (mAU)		N.D	
CONCENTRACIÓN (mg/mL)	N.D	CONCENTRACIÓN (mg/mL)		N.D	
VOLUMEN FINAL (mL)	N.D	VOLUMEN FINAL (mL)		N.D	
FRUCTOSA (g/100 g muestra)	N.D	FRUCTOSA (g/100 g muestra)		N.D	
PROMEDIO FRUCTOSA (g /100 g muestra)	**N.D**	**DRP**	**(%)**	**N.D**	

AZÚCARES TOTALES (g/ 100 g muestra)	**75,23**

REVISIÓN

Fecha:	
REVISADO POR: Arley Villamizar	FIRMA:
OBSERVACIONES:	

De esta etapa, se rescató que las mejores condiciones de crecimiento de la cepa *A. tubingensis* Ed8 son medio PL con 20 mM de citrato, las mejores condiciones de producción de sobrenadante a escala matraz se presentan en la tabla 9.

Tabla 9.
Mejores condiciones a escala matraz

CONDICIÓN	VALOR
Concentración de células inoculadas	5*10^4 conidias/ml
Medio de cultivo	PL
Concentración de ácido cítrico	20 mM
Temperatura	28°C
Agitación	120 rpm
Tiempo de cultivo	96 h
Volumen del sobrenadante	40 ml
Concentración inicial de Cr(VI)	200 ppm
Porcentaje de reducción logrado	99.6%

3.2 Evaluación del potencial reductor del bioagente en reactores de tanque agitado (Etapa 2)

3.2.1 Reactor Air-lift a escala laboratorio.

Este reactor emplea un sistema de flujo de aire que mejora la circulación y la transferencia de oxígeno en todo su volumen igualando las fuerzas de corte en su interior. Se probaron tres niveles de flujo de aire, pH y tiempo de cultivo en el reactor para determinar las condiciones que logran la mayor reducción de Cr(VI).

- Influencia del flujo de aire y del pH en la reducción

Se trabajaron tres valores de pH para cada uno de los flujos de aire del reactor. Inicialmente, con un flujo de 0.5 Lpm se observó que a las 120 h de cultivo y 9 h de contacto el sobrenadante obtenido en los tres niveles de pH superó el 70% de reducción de Cr(VI); el sobrenadante obtenido a pH 2.6 muestra el mismo efecto de reducción que su medio; mientras que en los ensayos a pH 4

y 5.3 la acción del sobrenadante representa un 20% y 30% más de reducción que sus respectivos medios, como se muestra en la figura 13.

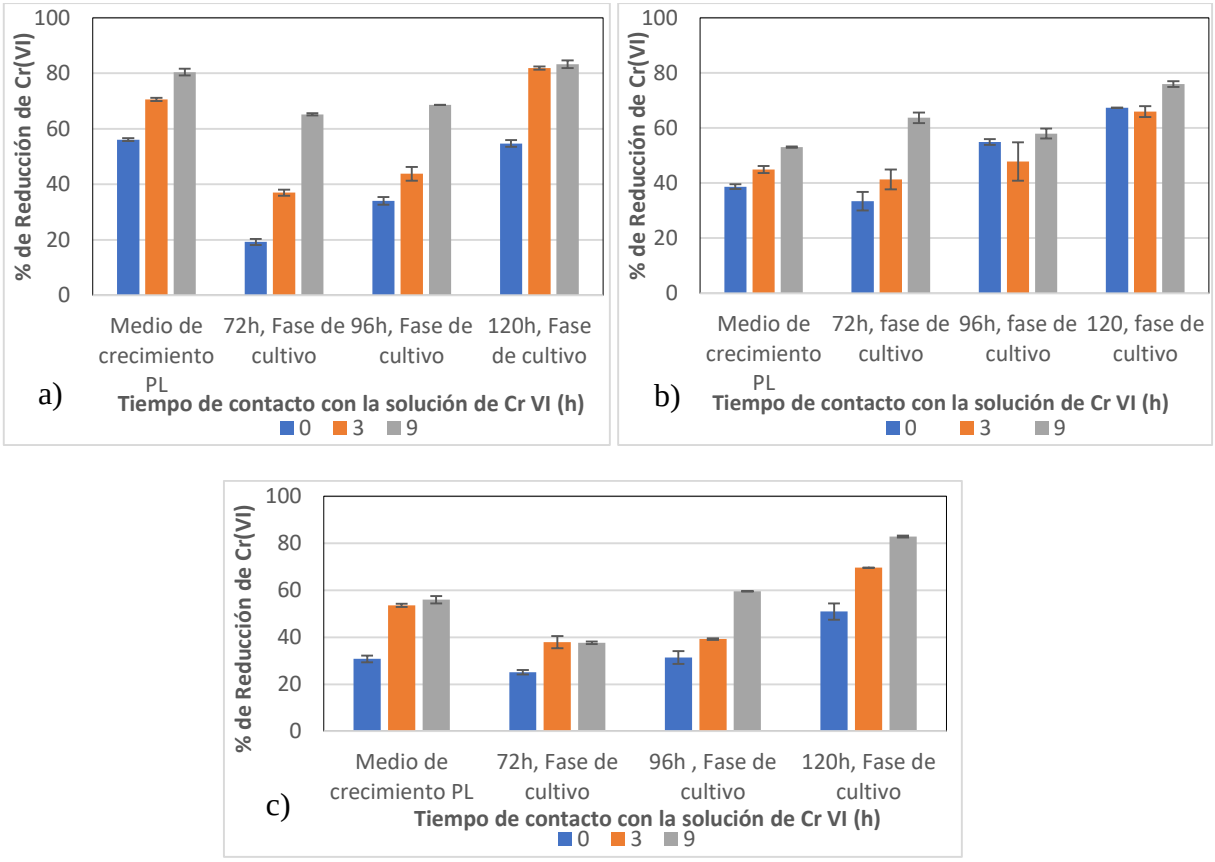


Figura 13. Evolución del proceso de reducción de 200 ppm Cr(VI) en reactor Air-lift con medio de crecimiento y sobrenadante PL y nivel de aireación 0,5 Lpm a) pH 2.6 b) pH 4 c) pH 5.3

En un flujo de aire de 1 Lpm con 120 h de cultivo y 9 h de contacto, entre la solución de Cr(VI) y el sobrenadante, se aprecia un porcentaje de reducción del 90% a pH 2.6, lo que representa un 10% más de reducción por parte del sobrenadante en comparación con el medio. Por el contrario, los sobrenadantes de los ensayos realizados a pH 4.0 y 5.3 no lograron superar el 70% y 50% de reducción respectivamente, como se muestra en la figura 14.

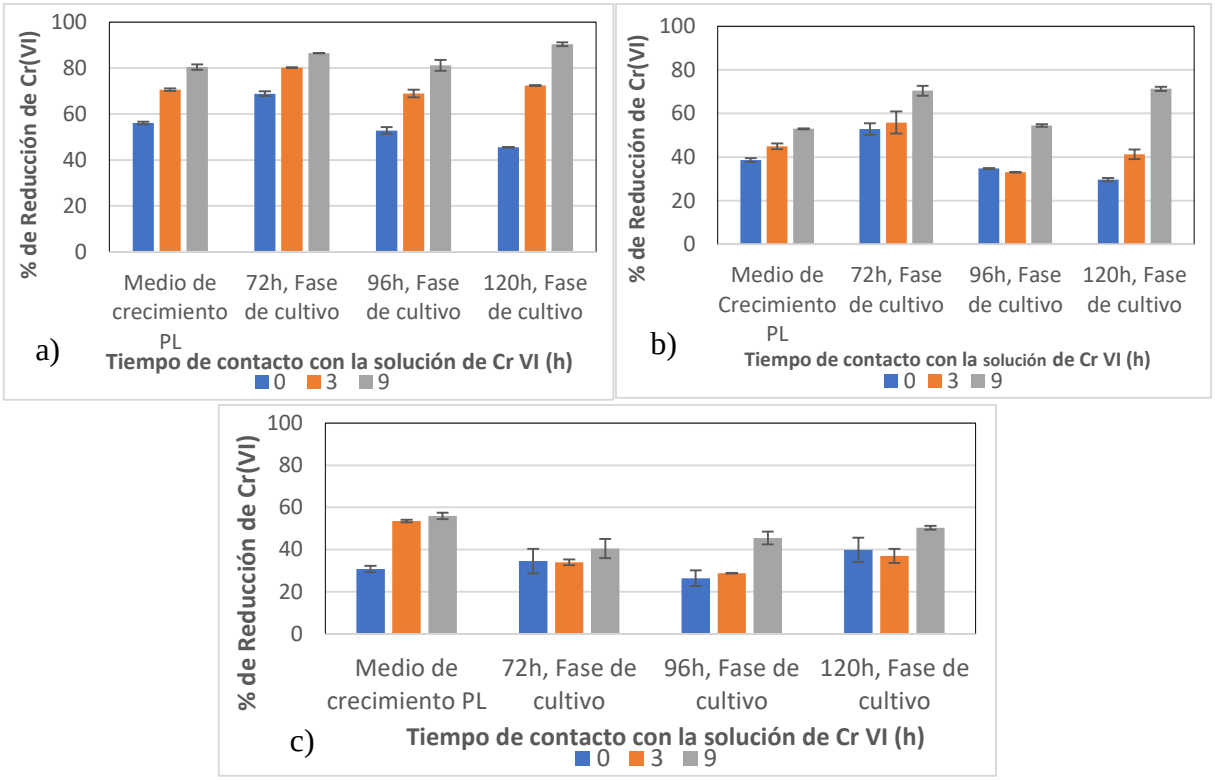


Figura 14. Evolución del proceso de reducción de 200 ppm Cr(VI) en reactor Air-lift con medio de crecimiento y sobrenadante PL y nivel de aireación 1 Lpm a) pH 2.6 b) pH 4 c) pH 5.3

También, se evaluó el porcentaje de reducción a un flujo de aire de 4 Lpm, el cual suministró mayor movimiento y oxígeno al cultivo. Se encontró que, a pH 2.6 el sobrenadante obtenido a las 120 h de cultivo alcanzó una reducción de Cr(VI) mayor al 99% transcurridas 9 h de contacto. Caso contrario ocurre con los sobrenadantes obtenidos a pH 4.0 y 5.3 que no superaron el 80% de reducción, como se muestra en la figura 15.

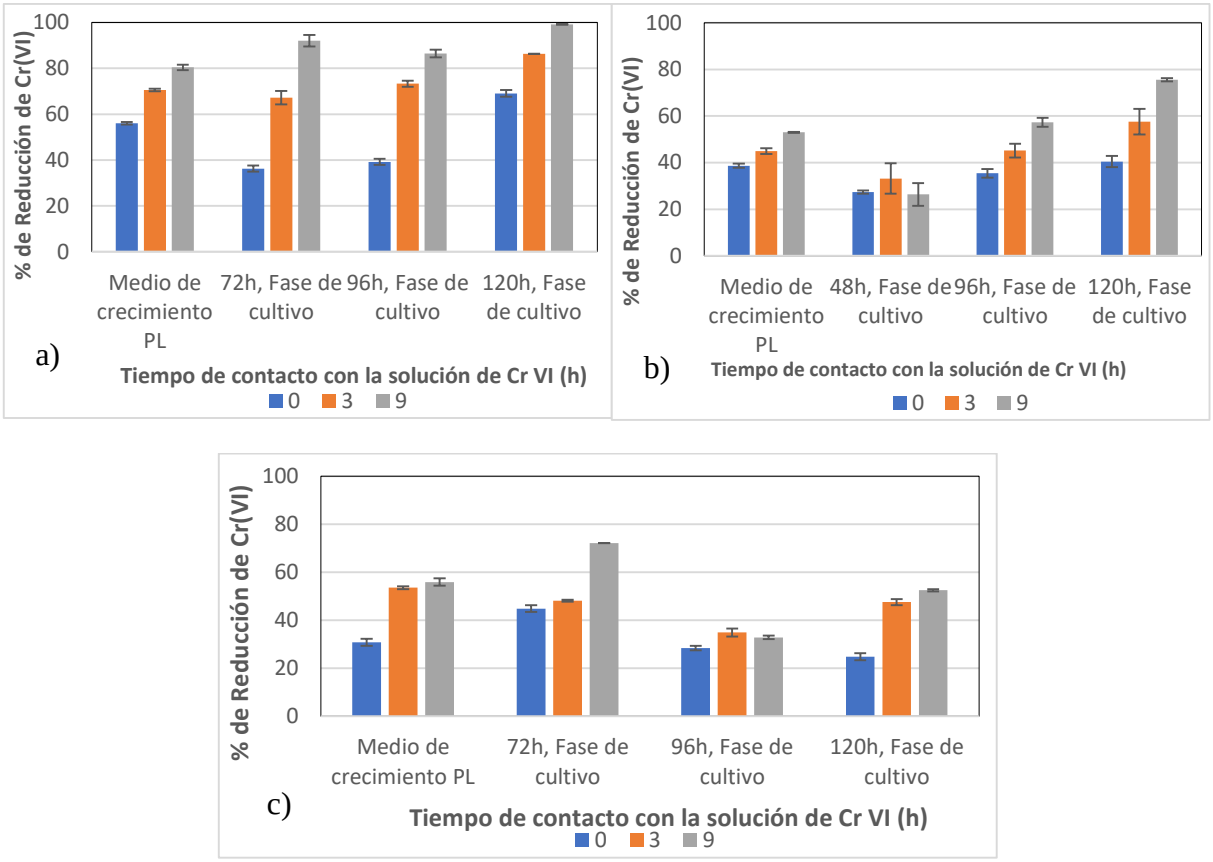


Figura 15. Evolución del proceso de reducción de 200 ppm Cr(VI) en reactor Air-lift con medio de crecimiento y sobrenadante PL y nivel de aireación 4 Lpm a) pH 2.6 b) pH 4 c) pH 5.3

3.2.2 Reactor Corning Spinner Flask a escala laboratorio.

Es un biorreactor que mantiene un ambiente homogéneo en su interior debido a que los agitadores magnéticos crean un flujo convectivo, lo que reduce la capa de células estancadas que se formarían en un ambiente poco mezclado. Están destinados a la producción a pequeña escala creando condiciones dinámicas de cultivo y apoyan la formación de esferoides (Martin, Wendt y Heberer, 2004). En este trabajo se reguló la temperatura y agitación mediante una termocupla en conexión a una plancha térmica. Para este reactor se probaron tres niveles de agitación, pH y tiempo de cultivo con el fin de determinar la mejor condición de reducción de Cr(VI).

- Influencia del nivel de agitación y del pH en la reducción

Inicialmente, se manejó un nivel de agitación de 60 rpm y se evaluaron tres niveles de pH; los sobrenadantes obtenidos a pH 4 y 5.3 presentaron una reducción inferior al 50% y 30% respectivamente. Por el contrario, los medios sin inóculo superaron el 50% de reducción. El sobrenadante obtenido a pH 2.6 supera el 80% de reducción a 72, 96 y 120 h de cultivo a las 9 h de contacto; a este pH el medio de crecimiento muestra resultados similares a los del sobrenadante, como se observa en la figura 16.

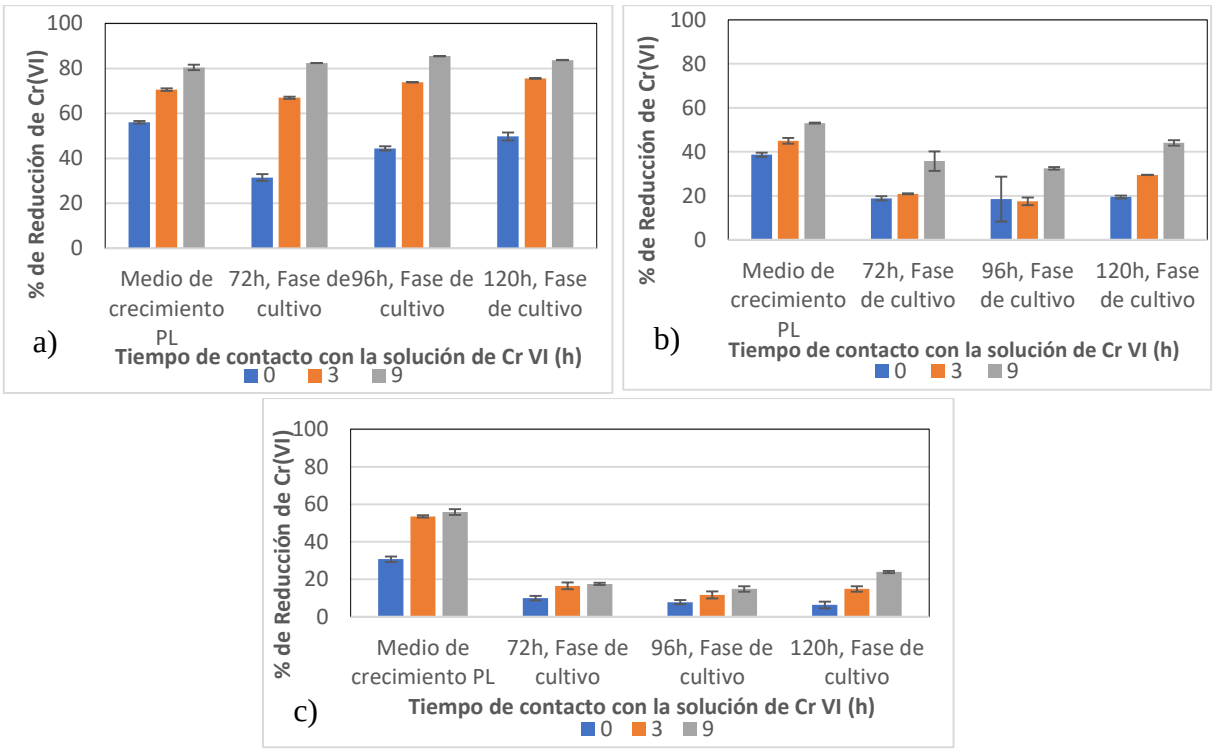


Figura 16. Evolución del proceso de reducción de 200 ppm Cr(VI) en reactor Corning Spinner Flask con medio de crecimiento y sobrenadante PL y nivel de agitación 60 rpm a) pH 2.6 b) pH 4 c) pH 5.3

A 120 rpm los sobrenadantes obtenidos a pH 4.0 y 5.3 registraron porcentajes de reducción del 60% y 50% respectivamente, a 120 h de cultivo y 9 h de contacto. Por el contrario, el sobrenadante a pH 2.6 logró una reducción de Cr(VI) del 88%, como se muestra en la figura 17.

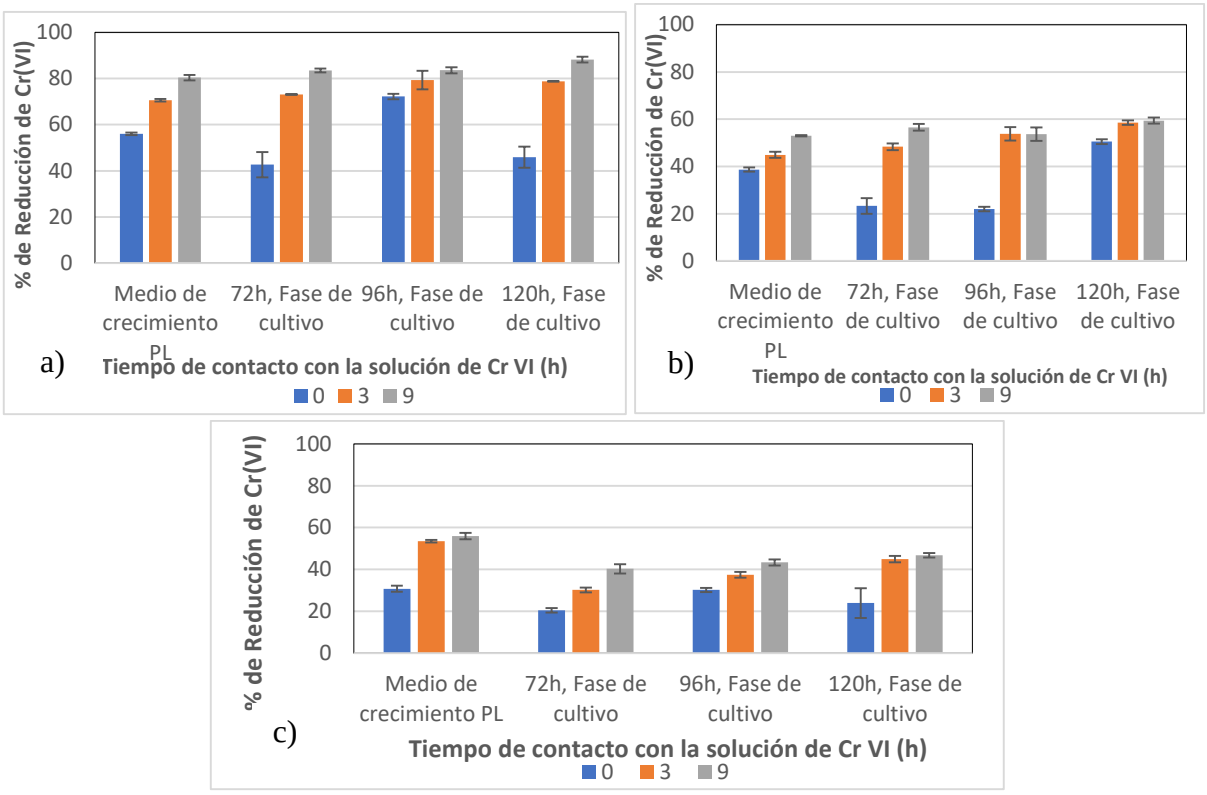


Figura 17. Evolución del proceso de reducción de 200 ppm Cr(VI) en reactor Corning Spinner Flask con medio de crecimiento y sobrenadante PL y nivel de agitación 120 rpm a) pH 2.6 b) pH 4 c) pH 5.3

Ahora bien, al emplear un nivel de agitación de 180 rpm en el reactor se obtiene una reducción del 90% de Cr(VI) a partir del sobrenadante a pH 2.6 a las 120 h de cultivo y 9 h de contacto. Por otra parte, los sobrenadantes obtenidos a pH 4.0 y 5.3 alcanzaron un 50% y 40% de reducción respectivamente. Sin embargo, a pH 5.3 la acción reductora del medio es un 14% mayor a la del sobrenadante, como se muestra en la figura 18.

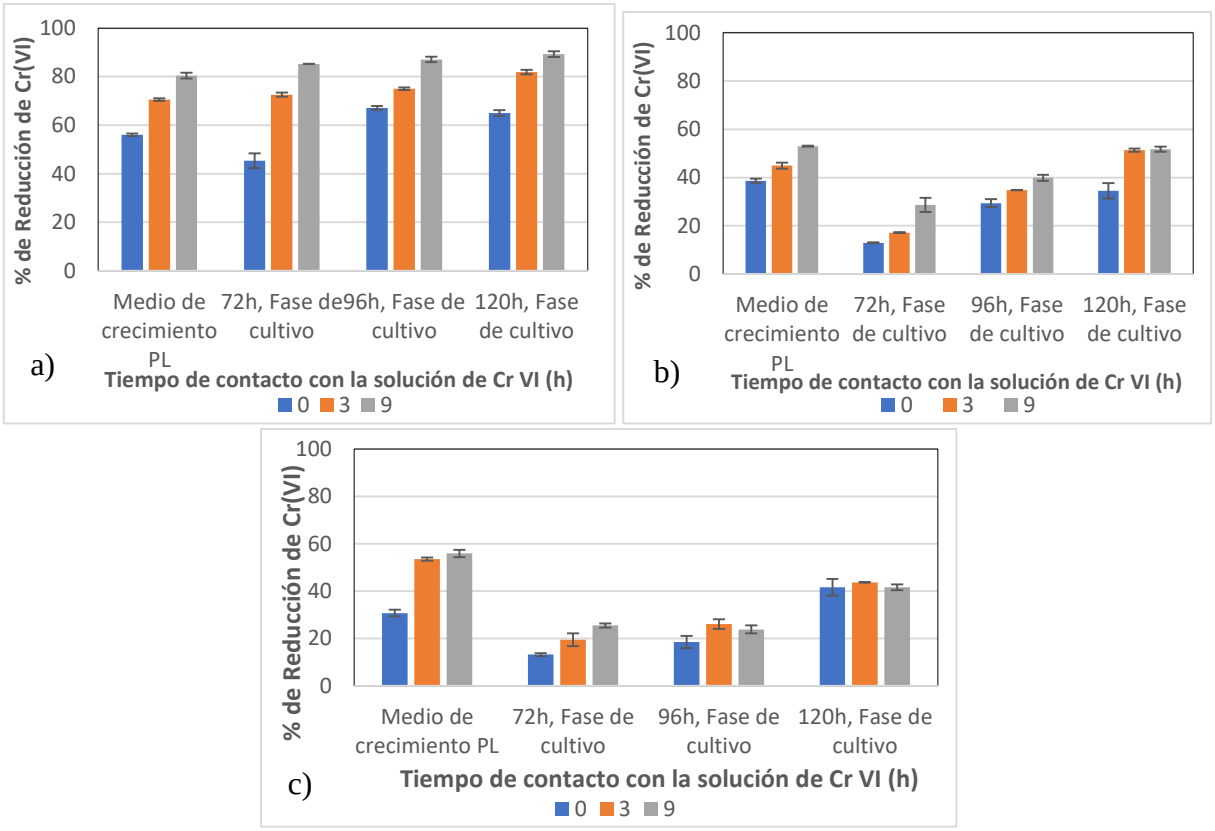


Figura 18. Evolución del proceso de reducción de 200 ppm Cr(VI) en reactor Corning Spinner Flask con medio de crecimiento y sobrenadante PL y nivel de agitación 180 rpm a) pH 2.6 b) pH 4 c) pH 5.3

3.2.3 Análisis estadístico tipo Box Behnken con superficie de respuesta para los reactores Air-lift y Corning Spinner Flask realizado por el software estadístico Minitab 19.

Se realizó un análisis estadístico al diseño de experimentos box Behnken con el fin de tener las mejores condiciones de operación que aumenten la capacidad de reducción de Cr(VI) del bioagente obtenido de la cepa *A. tubingensis* Ed8 en los reactores Air-lift y Corning Spinner Flask.

- Reactor Air-lift

En la figura 19 se observa la superficie de respuesta asociada al porcentaje de reducción de Cr(VI) con 9 h de contacto y se usa un reactor Air-lift para obtener el sobrenadante de 120 h de cultivo.

La ecuación 1 describe la superficie de repuesta considerando los factores con mayor efecto en la reducción.

% Reducción Cr(VI) = 258.9 - 42.6 pH - 2.62 Tiempo (h) + 3.92 pH*pH + 0.01500 Tiempo (h)*Tiempo (h) - 2.09 pH*Flujo de aire (Lpm) + 0.047 pH*Tiempo (h) - 0.0662 Flujo de aire (Lpm)*Tiempo (h)

(Ec.1)

Tabla 10.
Resumen del modelo Air-lift

S	R^2	R^2 (ajustado)	R^2 (pronosticado)
12.0685	72.03%	57.23%	7.59%

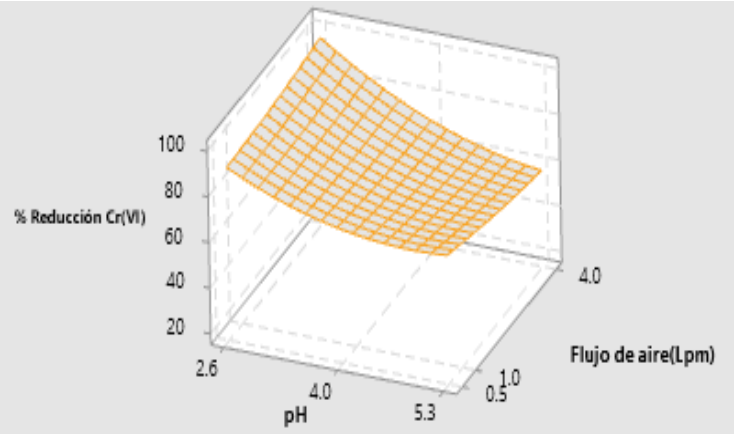


Figura 19. Superficie de respuesta de la reducción de 200 ppm Cr(VI) con el sobrenadante producido en el reactor Air-lift en 120 h de cultivo

El diagrama de Pareto muestra que los factores con mayor efecto sobre el porcentaje de reducción de Cr (VI) en el sobrenadante PL producido en el reactor Air-lift son pH y tiempo de cultivo, como se muestra en la figura 20.

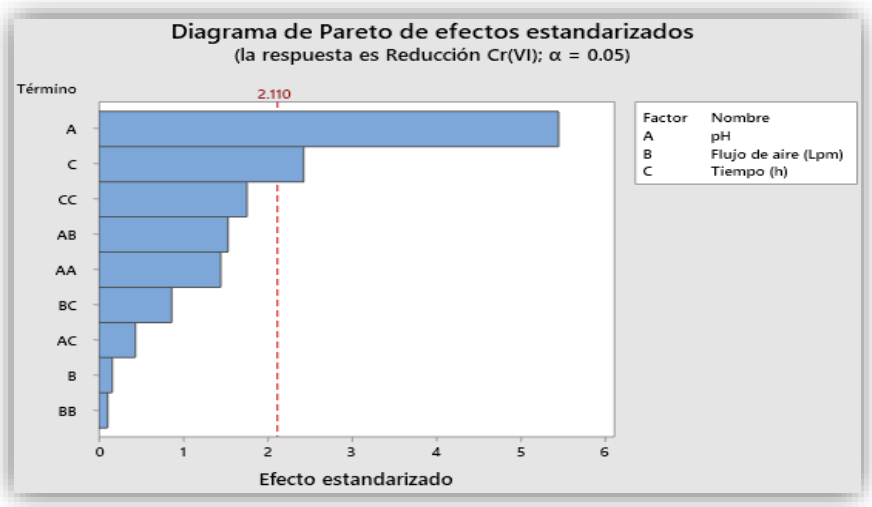


Figura 20. Diagrama de pareto para reactor Air-lift

A medida que el nivel de pH se va volviendo básico la capacidad reductora del sobrenadante disminuye y a mayor tiempo de cultivo la capacidad reductora aumenta, como se muestra en la figura 21.

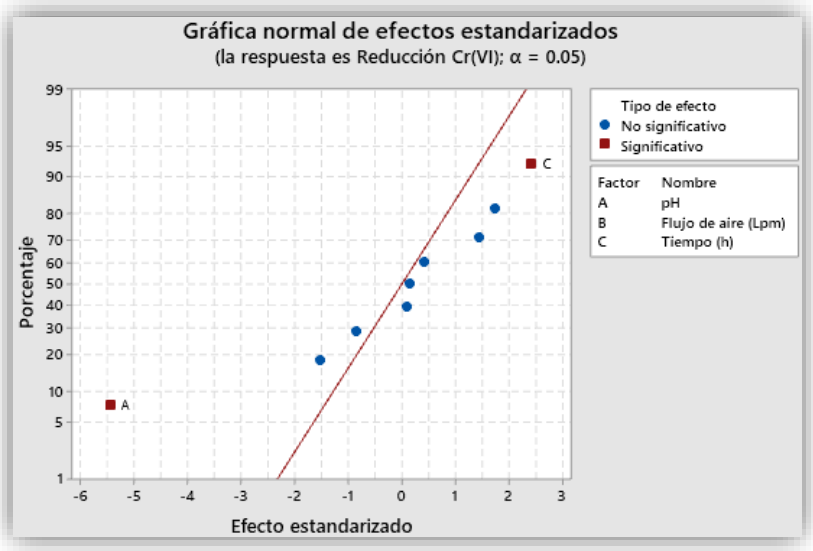


Figura 21. Gráfica normal de efectos estandarizados Air-lift

Las mejores condiciones de producción del bioagente en el reactor Air-lift se muestran en la tabla 11. A 9 h de contacto logró más del 96% de reducción de 200 ppm Cr(VI) en forma de $K_2Cr_2O_7$. En contraste, Uribe (2018) en su investigación logró la reducción de 127.3 ppm de Cr(VI) sintético empleando la cepa *Bacillus Cereus* AM13, en condiciones de densidad óptica 1 y medio MEF (Melaza, Extracto de levadura y Fertilizante) con 24 h de contacto en un reactor Air-lift con un flujo de aire de 2 Lpm y temperatura de 37 °C. Esto demuestra que tanto bacterias como hongos poseen diversos mecanismos de interacción con el Cr que aumentan o disminuyen su capacidad de reducción. En este caso, el hongo mostró un mayor potencial frente a la bacteria reportada como reductora bajo condiciones similares.

Tabla 11.
Mejores condiciones de producción del sobrenadante en el reactor Air-lift

Condiciones de producción del sobrenadante	Valor óptimo
pH	2.6
Flujo de aire	4 Lpm
Tiempo de cultivo	120 h
% de reducción alcanzado	97%

- Reactor Corning Spinner Flask

En la figura 22 se observa la superficie de respuesta asociada al porcentaje de reducción de Cr(VI) cuando hay 9 h de contacto y se usa un reactor Corning Spinner Flask para obtener el sobrenadante de 120 h de cultivo.

La ecuación 2 describe la superficie de repuesta considerando los factores con mayor efecto en la reducción.

$$\text{\% Reducción Cr(VI)} = \begin{aligned} &217.4 - 85.1\ \text{pH} + 0.746\ \text{Nivel de agitación(rpm)} - 0.438\ \text{Tiempo(h)} + 7.41 * pH^2 \\ &- 0.003722\ \text{Nivel de agitación(rpm)} * \text{Nivel de agitación(rpm)} + 0.00408\ \text{Tiempo(h)} * \text{Tiempo(h)} \\ &+ 0.0412\ \text{pH} * \text{Nivel de agitación(rpm)} + 0.0113\ \text{pH} * \text{Tiempo(h)} + 0.00138\ \text{Nivel de agitación(rpm)} \\ &* \text{Tiempo(h)} \end{aligned}$$

(Ec. 2)

Tabla 12.

Resumen del modelo Corning Spinner Flask

S	R^2	R^2 (ajustado)	R^2 (pronosticado)
7.65245	94.72%	91.93%	87.34%

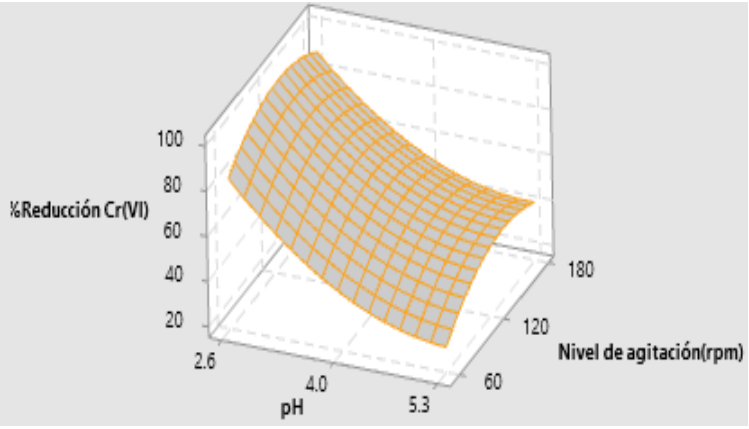


Figura 22. Superficie de respuesta del reactor Spinner flask teniendo como valor fijo el tiempo de cultivo

En el diagrama de Pareto muestra que los factores con mayor efecto sobre el porcentaje de reducción de Cr (VI) en el sobrenadante PL producido en reactor Corning Spinner flask son pH, nivel de agitación y tiempo de cultivo, como se muestra en la figura 23.

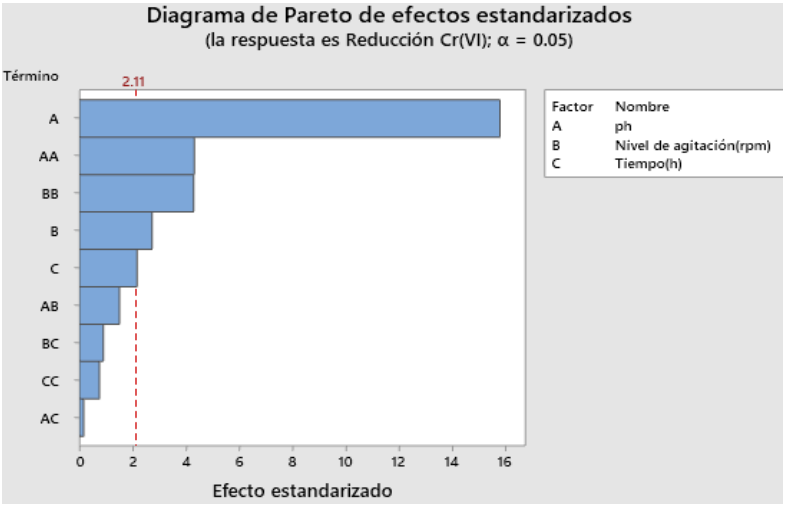


Figura 23. Diagrama de pareto para reactor Corning spinner flask

En consecuencia, a medida que el nivel de pH se va volviendo básico la capacidad reductora del sobrenadante disminuye y a mayor tiempo de cultivo la capacidad reductora aumenta, como se muestra en la figura 24.

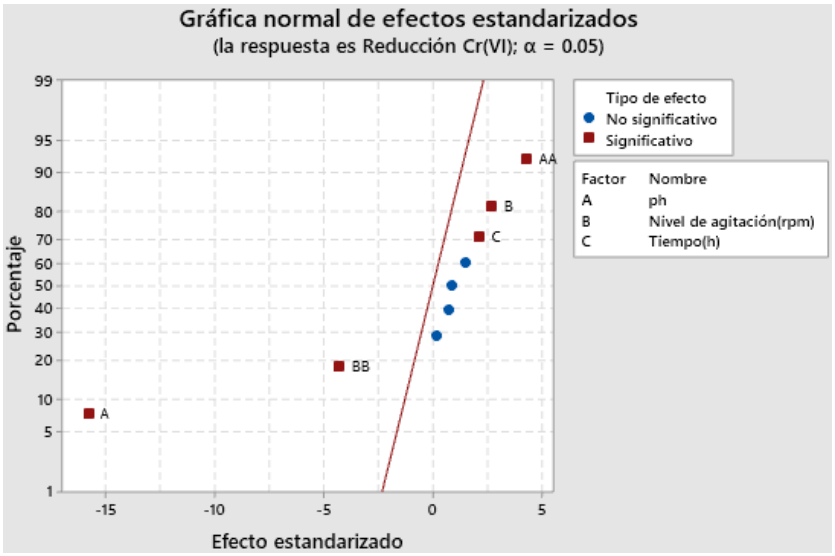


Figura 24. Gráfica normal de efectos estandarizados Corning spinner flask

Entonces, las mejores condiciones de producción del bioagente en el reactor Corning Spinner flask con 9 h de contacto con la solución logró más del 98% de reducción de 200 ppm de Cr(VI) en forma de $K_2Cr_2O_7$ como se muestra en la tabla 13.

Tabla 13.
Mejores condiciones de producción del sobrenadante en reactor Corning Spinner flask

Condiciones de producción del sobrenadante	Valor óptimo
pH	2.6
Nivel de agitación	130 rpm
Tiempo de cultivo	120 h
% de reducción alcanzado	99%

3.3 Reducción de Cr(VI) presente en residuos industriales (Etapa 3)

Usando los bioagentes producidos en reactores Air-lift y Corning Spinner Flask se evaluó el porcentaje de Reducción de Cr(VI) con dos muestras de residuos industriales provenientes de la empresa Química Central de México S.A de C.V.

Estas muestras fueron analizadas en cuanto a su contenido de Cr(VI), usando el método colorimétrico 1.5 difenilcarbazida, por medio del procedimiento de espectrofotometría UV-Vis y en la cuantificación de las concentraciones totales de Fe, Ca y Zn se empleó la técnica de espectrometría de absorción atómica por flama. Los resultados de esta caracterización se presentan en la tabla 14.

Tabla 14.
Características de las muestras residuales

Id de muestra	Características	Concentración del elemento (mg/L)			
		Fe total	Ca total	Zn total	Cr(VI)
Lixiviado montaña	Muestra liquida de color amarillo con cierta turbidez	1.43	0.26	0.263	25628
Lixiviado 2	Muestra liquida de color amarillo-café con cierta turbidez	1.01	0.27	0.939	13283

3.3.1 Reactor Air-lift. Con las mejores condiciones de producción del sobrenadante PL obtenidas del análisis del diseño de experimentos Box-Behnken, como se muestra en la tabla 3. Se evaluó el porcentaje de reducción del bioagente frente a concentraciones de 200, 400 y 600 ppm Cr(VI) en el lixiviado de montaña y de 200 y 400 ppm en el lixiviado 2.

El bioagente obtenido redujo las 200 ppm de Cr(VI) presente en el lixiviado de montaña después de 36 h de contacto y aunque no reduce en su totalidad concentraciones de 400 y 600 ppm registra una reducción de más del 70% y 50% respectivamente en 96 h de contacto, como se muestra en la figura 25.

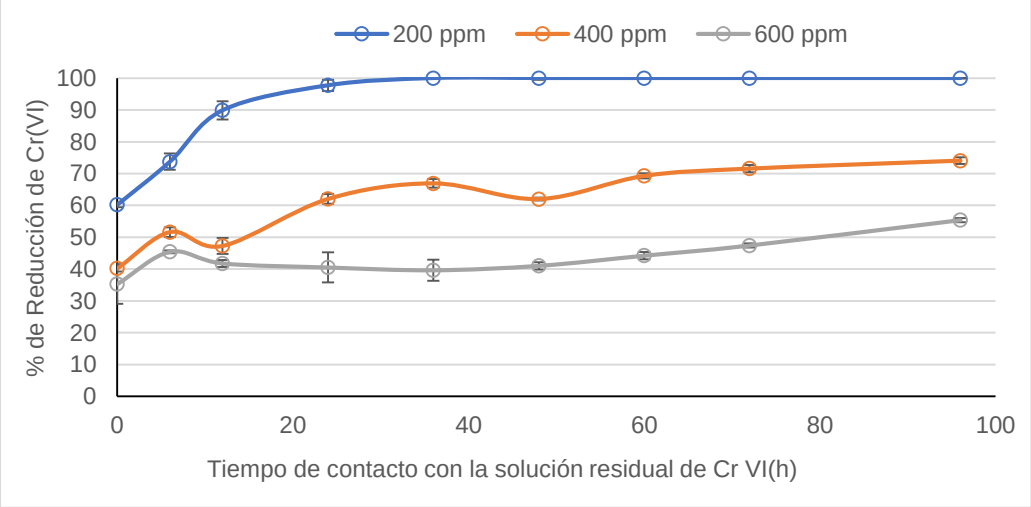


Figura 25. Evolución del proceso de reducción del lixiviado de montaña con presencia de Cr(VI) en el reactor Air-lift

El bioagente obtenido registra porcentaje de reducción de más del 99% de 200 ppm de Cr(VI) presente en el lixiviado 2 en 96 h de contacto y aunque no reduce en su totalidad 400 ppm registra una reducción de más del 30% en 96 h de contacto, como se muestra en la figura 26.

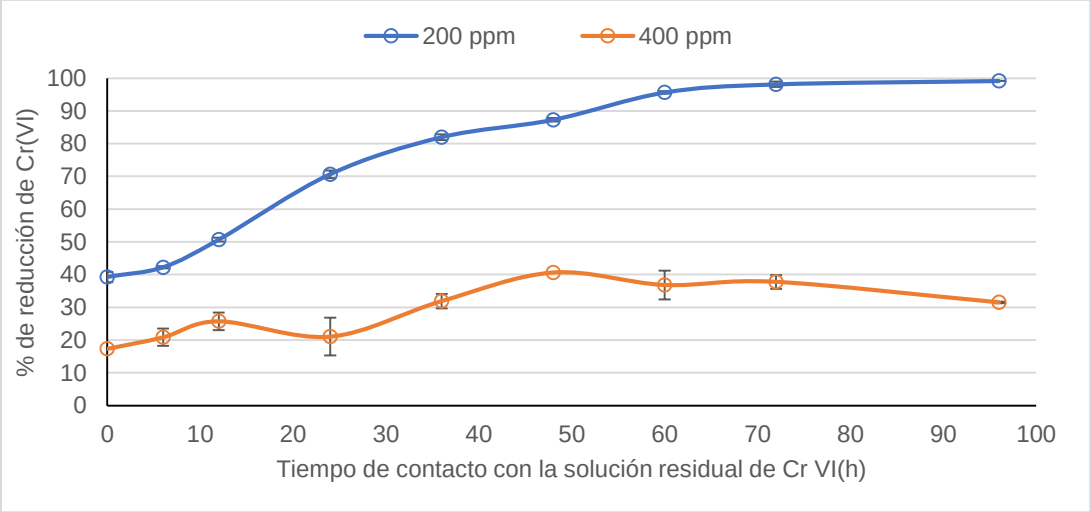


Figura 26. Evolución del proceso de reducción del lixiviado 2 con presencia de Cr(VI) en el reactor Air-lift

Otras investigaciones han logrado la reducción de 130 ppm en 8 h de contacto con ayuda de una bacteria aislada de Química Central S.A cepa *Bacillus Cereus* AM13, con condiciones de densidad óptica 1, en medio MEF con el lixiviado recuperado de Química Central en un reactor tipo Air-lift con un flujo de aire de 2 Lpm a 37 °C (Uribe, 2018). Estos resultados atribuyen la aceleración de la reducción del contaminante al contenido de material en el lixiviado, siendo este proceso más rápido con bacterias que con hongos aislados del sitio contaminado en estudio.

3.3.2 Reactor Corning Spinner Flask.

Con las mejores condiciones de producción del sobrenadante PL que ofrece la mayor capacidad de reductora de Cr(VI) obtenidas del análisis del diseño de experimentos Box-Behnken. Se evaluó el porcentaje de reducción del bioagente frente a concentraciones de 200, 400 y 600 ppm Cr(VI) en el lixiviado de montaña y de 200 y 400 ppm en el lixiviado 2.

El bioagente obtenido reduce las 200 ppm de Cr(VI) presente en el lixiviado de montaña después de 60 h de contacto con la solución y aunque no reduce en su totalidad concentraciones

de 400 y 600 ppm registra una reducción del 60% y 40% respectivamente en 96 h de contacto, como se muestra en la figura 27.

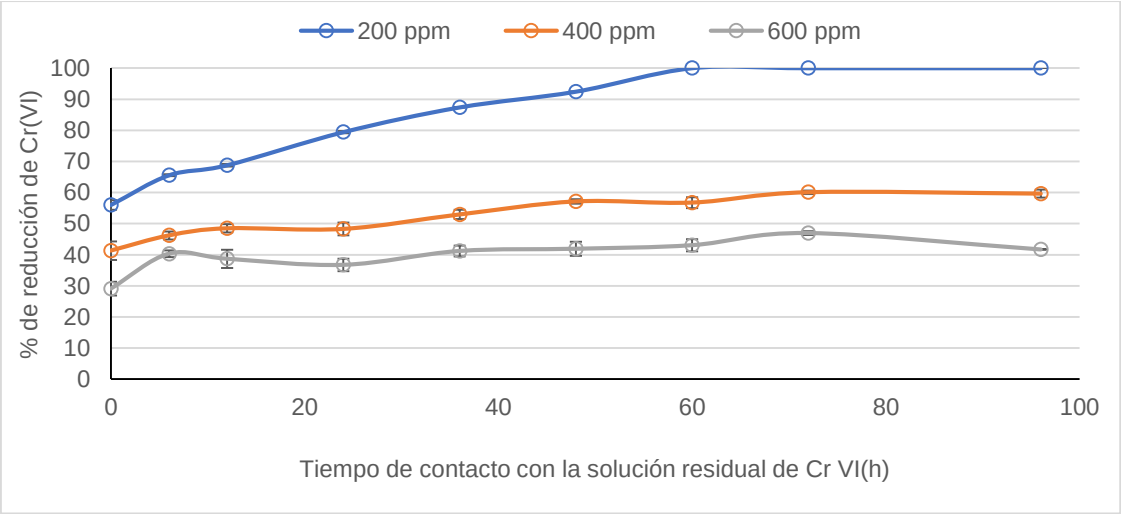


Figura 27. Evolución del proceso de reducción del lixiviado de montaña con presencia de Cr(VI) en el reactor Spinner flask

El bioagente obtenido registra más del 70% de reducción de 200 ppm de Cr(VI) presente en el lixiviado 2 en 96 h de contacto con la solución y más del 30% de reducción de 400 ppm en 96 h de contacto, como se muestra en la figura 28.

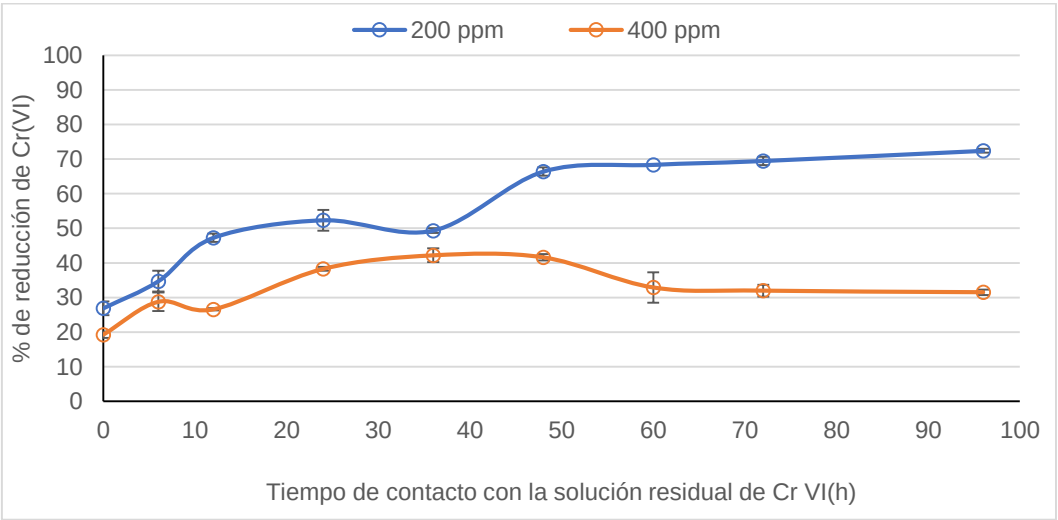


Figura 28. Evolución del proceso de reducción del lixiviado 2 con presencia de Cr(VI) en el reactor Spinner flask

4. Conclusiones

A partir del sistema desarrollado para la producción y aplicación del bioagente reductor de la cepa *A. tubingensis* Ed8, en búsqueda de la mayor capacidad de reducción de Cr(VI) a Cr(III), fue posible obtener entre las mejores condiciones de crecimiento, el medio PL que debe tener citrato a una concentración de 20 mM.

Las anteriores condiciones fueron la base para la operación de reactores Air-lift y Corning Spinner Flask usando además un flujo de aire de 4 Lpm para el primero y un nivel de agitación de 130 rpm para el segundo a pH 2.6 y 120 h de cultivo, alcanzando valores de reducción superiores al 98% de una solución de 200 ppm de Cr(VI) para ambos casos.

Con el desarrollo de este trabajo se logró evidenciar que es posible la reducción de Cr(VI) tanto en soluciones de laboratorio como en muestras reales provenientes de residuos industriales, gracias a la optimización de las condiciones de operación, estableciendo así que para 200 ppm de Cr(VI) en muestras reales es posible obtener el resultado completo de la reducción usando reactores Air-lift. Este fue mejor que el reactor Corning Spinner Flask gracias a su sistema de operación y a la combinación de factores con mayor impacto.

Este proyecto abre la posibilidad de promover investigaciones en reactores que operen con mecanismos de flujo de aire y nivel de agitación cuya combinación pueda aumentar la capacidad de reducción del bioagente producido por la cepa *A. tubingensis* Ed8; así mismo, poder aplicar este estudio directamente en sitios contaminados con cromo como una opción viable, económica y certera.

Referentes bibliográficos

Acevedo-Aguilar, F.J., Espino-Saldaña, A.E., Leon-Rodriguez. I.L., Rivera-Cano, M.E., Avila-Rodriguez, M., Wrobel, K., Wrobel, K., Lappe, P., Ulloa, M. y Gutiérrez, J. (2006). Hexavalente chromium removal in vitro and from industrial wastes using chromate-resistant strains of filamentous fungi indigenous from contaminated wastes. Canadian Journal of Microbiology. 52: 809-815

Arias, M. (2005). Estudio de los mecanismos de captación de cromo con algas pardas del género *Sargassum sp.* (Tesis de maestría). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

Bai, J., Chaipanich, A., Kinuthia, J., O'farrell, M., Sabir, B., Wild, S., y Lewis, M. (2003). Compressive strength and hydration of wastepaper sludge ash–ground granulated blastfurnace slag blended pastes. Cement and Concrete Research, 33(8), 1189-1202.

Barajas, C. (2017). Papel de la producción de ácido oxálico en la interacción con metales en la cepa Ed8 de *Aspergillus niger var. Tubingensis* (Tesis de pregrado). Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México.

Bautista, J. (2019). Laboratorio de genética molecular de hongos y bacterias. Observación inédita. Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México.

Carreño, M. (2014). Evaluación de un sistema de fitorremediación para la remoción de cromo hexavalente y materia orgánica empleando como modelo de estudio aguas residuales sintéticas (Tesis de maestría). Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

Coreño, A. (2009). Caracterización del sistema de reducción de Cr(VI) por cepas de hongos filamentosos resistentes a cromato (Tesis doctoral). Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México.

Encuentro Nacional De la AMIDIQ. En:(XXXVI: 5 al 18 de mayo de 2015: Cancún, Quintana Roo, México). Universidad de Guanajuato. 5 p.

Espino, A. (2002). Aislamiento y caracterización de hongos resistentes a cromato nativos de desechos industriales (Tesis de pregrado). Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México.

Fakuda, T., Tsutsumi, K., Ishino, Y., Satou, T., Ogawa, A., Morita, H. (2008). Removal of Hexavalent Chromium in Vitro and from Contaminated Soils by Chromate-Resistant Fungi from Chromium Deposits. Journal of Environmental Biotechnology, Volumen (8), 111-118. Recuperado de https://www.jseb.jp/wordpress/wp-content/.../08-02-111.pdf

Flores, O. (2015). Purificación y caracterización de la glucosa oxidasa extracelular de la cepa ambiental Ed8 de *Aspergillus niger var. Tubingensis* (Tesis de maestría). Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México.

Galvao, L. y Corey, G. (1987). Cromo [Ebook]. Metepec: Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. OPS. OMS. Recuperado de http://www.bvsde.paho.org/bvsea/e/fulltext/cromo/cromo.pdf

Gradd, G. y White, C. (1992). Removal of thorium from simulated acid process streams by fungal biomass: potencial for thrium desorption and reuse of biomass and desorbent. J. Chem. Technol. Biotechnol. **55**:39-49.

Greenber, A. (1981). Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association. Washington, D.C: joint editorial board, 187-190. Recuperado de: https://trove.nla.gov.au/work/16646325

Gutiérrez, F., Espino, A.,Coreño, A., Acevedo, F., Reyna, G., Fernández, F., Tomasini, A., Wrobel, K., Wrobel, K. (2010). Mecanismos de interacción con cromo y aplicaciones biotecnológicas en hongos. Revista Latinoamericana Biotecnológica ambiental, Vol. 1, 47-63. Recuperado_de_https://www.researchgate.net/publication/268576943_Mecanismos_de_interaccion_con_cromo_y_aplicaciones_biotecnologicas_en_hongos

Joutey, N., Sayel, H., Bahafid, W., y El Ghachtouli, N. (2015). Mechanisms of Hexavalent Chromium Resistance and Removal by Microorganisms. Reviews of Environmental Contamination & Toxicology Vol. 233, 45-69. Recuperado de https://bibliotecavirtual.uis.edu.co/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=edb&AN=100622972&lang=es&site=eds-live

Lee, K., Buckley, H. y Campbell, C. (1975). An aminoacid liquid synthetic medium for the development of mycelial and yeast forms of Candida albicans. Journal of Medical and Veterinary Mycology. Vol. 13, p. 148-153. Disponible en: https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00362177585190271

Martin I., Wendt D., Heberer M. (2004). El papel de los biorreactores en la ingeniería de tejidos (2004) Trends in Biotechnology, 22 (2), 80-86. DOI: 10.1016/j.tibtech.2003.12.001

Mabbett, A., Lloyd, J. y Macaskie, L. (2002). Effect of complexing agents on reduction of Cr (VI) by *Desulfovibrio vulgaris* ATCC 29579. Biotechnology and bioengineering, 79(4), 389-397.

Miller, G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. American Chemical Society (ACS). Vol. 31, 426–428. Recuperado de: https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac60147a030

National Institute of Occupational Safety and Health. (2013). Hexavalent Chromium, Workplace Safety and Health Topics [Ebook]. Atlanta: Centers for Disease Control and Prevention.

Navarro, I. (2016). Aumento de la capacidad de un bioproceso para reducción de Cr(VI) a Cr(III) para un efluente industrial (Tesis de pregrado). Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México.

Pazos, P. (2007) Biodisponibilidad de cromo en sedimentos marinos del rio Arousa (Tesis doctoral). Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España.

Pel J.H., Wind J., Archer B.D., Dyer S.P., Hofmann G., Schaap J.P., Turner G., Vries R., Albang R., Albang R. Albermann K., Andersen R.M., Bendtsen J., Benen A.E., Van den Berg M., Breestraat S., Caddick M.X., Contreras R.M., Cornell M., Coutinho P.M., Danchin G.E., Debets J.M., Dekker P., Van Dijick W.M., Klis F.M., Kools H.J., Kubicek C,P., A. van Kuyk P., Lauber J., Lu X., J. van der Maarel, Meulenberg R., Menke H., Mortimer M.A., Niersen J., G Oliver S., Olsthoorm M., Pal K., Nope van Peij J., Ram A.J., Rinas U., Roubos J.J., Vondervoort., Wedler H., BWosten H.A., Zeng A.P., Albert J.J., Vann Ooyen, Visser J., y Stam, H. (2007) Genome sequencing and analysis of the versatile cell Factory Aspergillus niger CBS 513.88 Nature Biotechnology. 25, 221-231.

Petatan, N. (2006). Efecto de diferentes fuentes de carbono sobre el crecimiento y la reducción de cromo de un hongo filamentoso (cepa nativa) (Tesis de pregrado). Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México.

Procuraduría federal de protección al ambiente. Clausura PROFEPA instalaciones de química central de México, en Guanajuato. México. Disponible en: https://www.profepa.gob.mx/innovaportal/v/6032/1/mx.wap/clausura_profepa__instalaciones_de_quimica_central_de_mexico_en_guanajuato.html

Ramírez, R., Calvo, C., Avila, M., Lappe, P., Ulloa, M. y Guitiérrez, J. (2004). Cr(VI) reduction in a chromate-resistant strain of *Candida maltosa* isolated from leather industry Antonie van Leeuwenhoek. 85:63-68

Rapoport A. y Muter, O. (1995). Biosorption of hexavalent chromium by yeast. Process Biochem. 30:145–149.

Rodríguez, S. (2014). Regulación de la producción de actividad GOX secretable en cepas de *Aspergillus niger* (Tesis de Maestría). Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México.

Romo, P., Acevedo, F., López, A., Wrobel, K., y Gutiérrez, J. (2015). Cr(VI) reduction by gluconolactone and hydrogen peroxide, the reaction products of fungal glucose oxidase: Cooperative interaction with organic acids in the biotransformation of Cr(VI). Chemosphere. 134, 563-570.

Santos, F. (2019). Laboratorio de genética molecular de hongos y bacterias. Observación inédita. Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México.

Shrivastava, S. y Thakur, I. (2006). Isolation and process parameter optimization of *Aspergillus sp.* for removal of chromium from tannery effluent. Bioresour. Technol. 97:1167-73.

Schuster, E., Dunn, N., Frisvad, J. y Van Dijck, P. (2002). On the safety of *Aspergillus niger*. Applied Microbiology And Biotechnology, Vol. 59, 426–435. Recuperado de https://bibliotecavirtual.uis.edu.co/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=mdc&AN=12172605&lang=es&site=eds-live

Uribe, D. (2018). Escalamiento de un proceso económico de reducción de Cr(VI) a nivel biorreactor utilizando la cepa *Bacillus cereus* AM13 tolerante a cromato (Tesis de pregrado). Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México.

Wang, B., Yang, H. y Li, W. (1998). Studies on reduction of hexavalent chromium by fungi. Wei Sheng Wu Xue Bao. 38:108-13.

Apéndices

Apéndice A. Reactivos usados

Los reactivos empleados durante el desarrollo de este proyecto se resumen en la tabla 15.

Tabla 15.
Reactivos empleados durante el proyecto.

Reactivo	Fabricante	Uso
Agar bacteriológico	Solbiosa (microbiología industrial)	Preparación del medio PDA
Dextrosa	Karal	Preparación de los medios PDA y LMM
Papa	-	Preparación del medio PDA
Ácido cítrico	Karal	Preparación de medio PL
Piloncillo	-	Preparación de medio PL
Melaza	-	Preparación de medio MPF
Peptona biotriptasa	Solbiosa (bionutrientes)	Preparación de medio MPF
Fertilizante (inorgánico)	SQM (comercial de México)	Preparación de medio MPF
Fosfato monopotásico	J. T. Baker	Preparación de medio LMM
Sulfato de magnesio heptahidratado	Karal	Preparación de medio LMM
Sulfato de amonio	Karal	Preparación de medio LMM
Cloruro de sodio	Karal	Preparación de medio LMM
Dicromato de potasio	J. T. Baker	Evaluación de la capacidad reductora
Stock de cromo hexavalente	*Residuos del sitio contaminado	Evaluación de la capacidad reductora
Ácido Clorhídrico	Karal	Ajuste de pH en etapa de crecimiento y reducción
Hidróxido de sodio	Karal	Ajuste de pH en etapa de crecimiento y reducción
Difenilcarbazida	Analytyka	Medición de cromo hexavalente
Acetona	Karal	Preparación de difenilcarbazida
Ácido sulfúrico	Golden Bell	Construcción de curva de calibración

*Residuos recuperados de química central de México

Apéndice B. Equipos utilizados durante el proyecto

En la tabla 16 se mencionan los equipos empleados durante la etapa experimental.

Tabla 16.
Equipos implementados en el proyecto.

Equipo	Fabricante	Uso
Balanza	OHAUS Pioneer PA224C	Preparación de medios de cultivo
Campana de flujo laminar UV	BIOBASE BIOINDUSTRY(SHANDONG) CO., LTD	Esterilización de material de reactores
Autoclave	AESA MOD.CV 300	Esterilización de material y medios de cultivo
Potenciómetro	BECKMAN	Ajuste de pH en medios de cultivo
Espectrofotómetro	JENWAY 7315 UV-VIS	Medición de concentración de Cr(VI) por el método de difenilcarbazida
Microscopio	NIKON LABOPHOT	Conteo de conidias
Incubadora	JULABO	Crecimiento de conidias
Incubadora rotacional	MCR	Desarrollo de la reacción de reducción
Mufla	YAMATO SCIENTIFIC AMERICA INC	Secado de la biomasa
Centrifuga	CORNING/LSE	centrifugado de conidias
Vórtex	SCIENTIFIC INDUSTRIES INC	Mezclado de conidias
Bomba de vació	WELCH GEM 1.0	Separación de conidias y sobrenadante
Reactor Air-lift	SEV – PRENDO	Cultivo del sobrenadante
Reactor Corning spinner flask	SIGMA – ALDRICH	Cultivo del sobrenadante
Reactor lab fors	INFORS HT	Cultivo del sobrenadante