

Aislamiento, Evaluación y Selección de Microorganismos con Capacidad de Detoxificación de Cromo a Partir de Muestras de Agua Contaminadas con Metales Pesados.

Una Tesis Presentada Para Obtener El Título De
Ingeniero Ambiental
Universidad Nacional Abierta y a Distancia - UNAD, Bogotá

Brusbly Rodrigo Guatibonza Hernández &
Diana Marcela Torrijos Gómez
Abril 2018.

A mi madre, por quererme mucho, por estar conmigo en todos los momentos difíciles que he pasado y siempre creer en mí. A mi padre por ser un ejemplo de esfuerzo y trabajo para conseguir las cosas que nos proponemos. A mis hermanos, especialmente a Yenifer, por todas sus demostraciones de cariño y entrega. A todos mis sobrinos, para que vean en mí un ejemplo a seguir. A mis amigos, pero principalmente a Diana, por haberme tenido en cuenta para hacer parte de esta investigación. Y a todos aquellos amigos y familiares que no recordé al momento de escribir esto. Ustedes saben quiénes son. ¡Gracias a todos!

Brusbly Rodrigo Guatibonza Hernández

A Dios, que me brindo la fortaleza, la inteligencia y la sabiduría para superar los obstáculos que se presentaron a lo largo de este camino; a mi padre, por su apoyo y esfuerzo, quien ha sacrificado todo para hacer de mi el ser que soy; a mi madre, por ser la persona que siempre con su paciencia y amor me ha guiado y me ha enseñado a tener fe en mi y en mis capacidades; a mi hermana por su paciencia y compañía, por ser ese ejemplo de que no hay límites, por demostrarme que todo es posible si así se propone, a mi abuelita por que sin su ayuda hubiera sido imposible alcanzar este objetivo y al hombre que amo por su apoyo incondicional en este proceso.

Diana Marcela Torrijos Gómez

Agradecemos a la Universidad Nacional Abierta y a Distancia UNAD y a la Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente ECAPMA, por brindarnos los espacios, el acompañamiento y la financiación necesaria para el adecuado desarrollo de esta investigación.

Al Semillero de Investigación METAMORFO y a la docente Carolina Rubiano por su guía y apoyo en la elaboración de la propuesta de investigación y por ofrecernos las bases iniciales de la misma.

A nuestro director de Tesis, el docente Carlos Fajardo por su paciencia, dedicación y entrega durante este largo y difícil proceso que se ha llevado a cabo para la realización y posterior finalización del proyecto.

Finalmente a nuestros familiares y amigos más cercanos por brindarnos su apoyo y motivación para poder culminar con éxito esta carrera.

Heavy metal contamination in water sources is very common due to industries, agriculture, livestock and mining, thus, the research about decontamination processes is vital; These chemicals are not biodegradable and have genotoxic, mutagenic and carcinogenic characteristics, which end up becoming a threat to both human health and the environment. The aim of this work is to identify those microorganisms capable of decomposing or degrading hexavalent chrome provided as potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$); several native bacterial strains from the Jaboque Wetland, the Muña Reservoir and a Tabio Thermal Spring were isolated. Laboratory tests were performed and it was observed that the strains JB1-1, EM2-2 and MT1 presented a efficiency of 76%, 60% and 49% respectively, on a concentration of 30 mg / L of chromium (IV).

Keywords: *Detoxification, Heavy Metals, Chromium, Bioremediation, Microorganisms.*

La contaminación por metales pesados en las fuentes hídricas que están cerca a industrias, sectores agrícolas, ganaderos y mineros es muy común, por eso es de vital importancia investigar procesos que ayuden a su descontaminación; estos químicos no son biodegradables y presentan características genotóxicas, mutagénicas y carcinógenas, que terminan convirtiéndose en una amenaza tanto para la salud humana como para el medio ambiente. El objetivo de esta investigación es identificar microorganismos capaces de descomponer o degradar cromo hexavalente suministrado como dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$); para esto se aislaron varias cepas bacterianas nativas provenientes del Humedal Jaboque, del Embalse del Muña y de un Manantial Termal de Tabio, se realizaron varios ensayos de laboratorio y se observó que las cepas JB1-1 y 2, EM2-2 y MT1 y 2 presentaron una eficiencia de 76%, 60% y 49% respectivamente a una concentración de 30 mg/L de cromo (IV).

Palabras claves: *Detoxificación, Metales Pesados, Cromo, Biorremediación, Microorganismos.*

Tabla de Contenido

vii

1.	Introducción	1
2.	Justificación	3
3.	Objetivos	8
3.1	Objetivo general	8
3.2	Objetivos específicos	8
4.	Marco conceptual	9
5.	Marco teórico	12
5.1	Contaminación por metales pesados	12
5.1.1	Contaminación mundial por metales pesados	13
5.1.2	Situación actual en Colombia	18
5.2	Antecedentes de aislamiento de microorganismos con capacidad detoxificadora de cromo	22
5.3	Definición de metales pesados	24
5.3.1	Cromo (Cr)	25
5.4	Técnicas de remediación	28
5.4.1	Técnicas físico-químicas	29
5.4.2	Técnicas biológicas	31
5.5	Medio de cultivo	34
5.5.1	Medio Luria-Bertani (LB)	35
6.	Metodología	36
6.1	Población y muestras	36

6.1.1 Embalse del Muña.....	viii
6.1.2 Humedal Jaboque.....	37
6.1.3 Manantial termal	38
6.1.4 Otras muestras.....	38
6.2 Recolección de muestras.....	39
6.3 Determinación de la concentración impuesta para la selección de microorganismos degradadores.	39
6.4 Aislamiento de cepas microbianas resistentes a cromo (Cr)	40
6.5 Caracterización fenotípica de las cepas aisladas.....	41
6.5.1 Descripción macroscópica:	41
6.5.2 Morfología y motilidad	42
6.5.3 Tinción de Gram	42
6.6 Curva de crecimiento	43
6.7 Metodología para determinar la capacidad de detoxificación de cromo de las cepas aisladas	43
6.7.1 Materiales y equipo.....	44
6.7.2 Reactivos.....	44
6.7.3 Procedimiento	45
6.8 Análisis estadístico de los datos.....	46
6.8.1 Regresión lineal simple y correlación.....	46
6.8.2 Análisis de varianza simple ANOVA	48
7. Resultados y discusión.....	49
7.1 Información puntos de muestreo.....	49

7.2 Enriquecimiento de cepas	57
7.3 Aislamiento y caracterización de cepas	60
7.4 Curva de crecimiento	66
7.5 Determinación de la capacidad de detoxificación de cromo de las cepas aisladas.....	70
7.5.1 Curva de calibración	70
7.5.2 Determinación de cromo hexavalente en muestras.....	71
8. Conclusiones	77
9. Recomendaciones	78
Lista de referencias	79
Anexos	90

Tabla 1. Microorganismos con capacidad detoxificadora de cromo	23
Tabla 2. Técnicas Físico-Químicas.....	30
Tabla 3. Estrategias microbianas de descontaminación.....	33
Tabla 4. Protocolo tinción de Gram	42
Tabla 5. Características Climáticas del Punto de Muestreo JB	49
Tabla 6. Análisis de la calidad de agua Humedal Jaboque	51
Tabla 7. Características Climáticas del Punto de Muestreo EM.....	53
Tabla 8. Resultados Monitoreo de nutrientes y metales en el Embalse del Muña.....	55
Tabla 9. Descripción de los puntos de muestreo.....	57
Tabla 10. Número de Colonias Aisladas por Cepa	60
Tabla 11. Caracterización morfológica de las colonias aisladas.....	62
Tabla 12. Velocidad Máxima de Crecimiento de las Cepas	68

Figura 1. Humedal Jaboque.	50
Figura 2. Recolección de Muestras Jaboque.....	52
Figura 3. Embalse del Muña	54
Figura 4. Recolección de Muestras Muña.....	56
Figura 5. Medios Inoculados con las muestras	58
Figura 6. Morfología de las cepas: A. Vista macroscópica de las cepas,	61
B. Vista microscópica de las cepas.	61
Figura 7. Comparación Velocidad Máxima Específica de Crecimiento: A. Grupo 1 evaluado, ..	67
B. Grupo 2 Evaluado.....	67
Figura 8. Comparación Velocidad Máxima Específica de Crecimiento de las cepas	69
Figura 9. Análisis colorimétrico curva de calibración	70
Figura 10. Curva de Calibración.....	71
Figura 11. Concentración de cromo.....	73
Figura 12. Porcentaje de degradación biológica.....	74
Figura 13. Área bajo la curva para fijación de cromo.....	75

1. Introducción

Uno de los principales problemas ambientales que se vienen presentando en los últimos tiempos tanto en Colombia como en el mundo, es la contaminación del recurso hídrico por metales pesados a raíz de actividades mineras e industriales, trayendo consigo efectos negativos que afectan directamente a los organismos y los ecosistemas.

Estos efectos dependen generalmente de la dosis, pero algunos metales pesados en cantidades relativamente pequeñas puede tener efectos toxicológicos nocivos (Boyd, 2010), los cuales están directamente relacionados con el grado de exposición ambiental u ocupacional, que pueden generar alteraciones principalmente en la salud humana, dentro de las cuales están incluidos varios tipos de cáncer y afectaciones al sistema respiratorio y nervioso.

Aunque existen gran variedad de métodos fisicoquímicos para el tratamiento de aguas contaminadas con metales pesados, han resultado costosos e ineficientes, especialmente cuando la concentración de metales pesados es muy baja. Otro factor que dificulta la descontaminación es la producción de subproductos como lodos con altas concentraciones de metales que dificulta su posterior recuperación y/o eliminación (Cañizares, 2000).

Los métodos biológicos para la recuperación de metales pesados se han venido desarrollando durante las últimas tres décadas como una buena opción para el tratamiento de aguas residuales, teniendo entre sus principales ventajas que son métodos respetuosos con el medio ambiente, pues no tiene un gran consumo energético ni de materias primas y además disminuye la producción de lodos a eliminar, teniendo un mayor rendimiento en el reciclaje y la recuperación de metales (Tsezos, Hatzikioseyan, & Remoudaki, 2012).

Lamentablemente, una de las principales limitantes de la aplicación de los métodos biológicos en el tratamiento de aguas contaminadas con metales, es que no se conoce a profundidad los mecanismos que controlan el crecimiento y la actividad de los microorganismos en ambientes contaminados, así como también el poco conocimiento de los metabolismos de las cepas con potencial de remoción, generando que tratamientos exitosos en laboratorio no lo sean al ser extrapolados a los estudios de campo (Ortiz, Sanz, & Dorado, 2007), por lo que se hace necesario desarrollar investigaciones que permitan predecir la actividad microbiana y los parámetros de crecimiento de nuevas cepas efectivas (pH, temperatura, humedad, concentración del contaminante, suplementos, aireación, etc.) durante los tratamientos de biorrecuperación, lo cual permitiría resolver muchas de las cuestiones que hasta hoy se desconocen para que la aplicación de estos métodos sea más efectivos (Ortiz et al., 2007).

2. Justificación

La degradación del medio ambiente es una crisis generada por el hombre a raíz de prácticas productivas encaminadas a cubrir las necesidades materiales y de supervivencia de la población humana (López, 2002).

Las actividades antropogénicas como la industria, la agricultura, la minería, la extracción petrolera y el inadecuado manejo de los residuos peligrosos han generado problemas de contaminación que afectan los recursos agua, suelo y aire, ocasionando una enorme cantidad de sustancias tóxicas que alteran el pH, la conductividad térmica y el intercambio catiónico dentro de los recursos, limitando la formación de nueva vida, la reproducción y la subsistencia de muchas de las especies.

La contaminación por metales pesados es uno de los principales problemas ambientales que se presentan en la actualidad, debido a que estos elementos químicos no son biodegradables y presentan características genotóxicas, mutagénicas y carcinógenas, convirtiéndose en una amenaza tanto para la salud humana como para el medio ambiente; el término “metales pesados” se aplica a cualquier elemento metálico que tenga una densidad relativamente alta y que sea tóxico o venenoso, aun en bajas concentraciones (Duruibe, Ogwuegbu, & Egwurugwu, 2007).

Uno de los principales metales pesados más estudiados es el cromo (Cr), se emplea en su mayor parte en las industrias químicas de aleaciones de acero, galvanoplastia, tinción de textiles, construcción de maquinarias, en radio electrónica, efluentes de torres refrigerantes de estaciones generadoras de energía eléctrica, curtido de pieles, blindajes para proyectiles, taladros y cajas fuertes, entre otras aplicaciones. (Otiniano, Tuesta & Robles, 2007).

El impacto del cromo en los ecosistemas está directamente relacionado con el medio. En los ecosistemas acuáticos, el cromo se presenta principalmente en su estado hexavalente (Cr^{+6}) de forma soluble, es suficientemente estable para ser transportado por el agua y finalmente es reducido a cromo trivalente (Cr^{+3}) mediante la intervención de especies orgánicas. Por lo general, esa forma trivalente no migra de forma significativa, sino que se precipita rápidamente y es absorbida por partículas en suspensión y sedimentos del fondo de ríos y lagos (Chávez, A., 2010).

En los suelos, el cromo trivalente (Cr^{+3}) es relativamente inmóvil debido a su capacidad de adsorción, las reacciones de oxidación reducción afectan la biodisponibilidad y la toxicidad del mismo, en muy bajas dosis constituye un micronutriente esencial para procesos metabólicos de plantas y animales, pero en su forma hexavalente es altamente tóxico (Chávez, A., 2010).

Se ha comprobado que el cromo se acumula en muchas especies, principalmente acuáticas (Chávez, A., 2010) y puede verse transferido por medio de la cadena trófica de unas especies a otras (Arauzo, M., Rivera, M., Valladolid, M., Noreña, C., & Cedenilla, O., 2003); los efectos toxicológicos están directamente relacionados con la concentración del contaminante, a nivel internacional las Concentraciones Máximas Permitidas en el ambiente son 0,1 mg/L de Cr (VI) y 0,5 mg/L de Cr (III) (Otiniano, et al., 2007)

La recuperación de estos metales va desde la precipitación química, oxidación o reducción, intercambio iónico, filtración, tecnologías de membrana (osmosis inversa) hasta la recuperación por evaporación. Sin embargo estos procesos pueden llegar a ser ineficientes, especialmente en la disposición y almacenamiento de sus desechos (Cobos, Hernández, & Laverde, 2005).

Una alternativa eficiente, económica, mucho más selectiva y menos contaminante para reducir, eliminar, contener o transformar metales pesados presentes en suelo, agua y aire, es mediante el uso de grupos de microorganismos resistentes o tolerantes a estos, por medio del uso de sus propiedades naturales.

Los microorganismos pueden ser bioacumuladores muy eficientes de metales solubles y particulados, especialmente a partir de concentraciones externas diluidas. Las células vivas pueden presentar una variedad amplia de mecanismos para la acumulación de metales como el transporte, la formación de complejos extracelulares y la precipitación,

permitiendo la recuperación de una biomasa íntegra que permite retirar los metales sin destruirla (Cañizares, 2000).

Las investigaciones sobre microorganismos con capacidad detoxificadora de ambientes contaminados por metales pesados se realiza con la finalidad de comprobar la eficacia de los tratamientos de biorrecuperación, esto debido a que las estrategias que este proceso realiza funcionan en un lugar determinado, pero no funcionan en otros, y los procesos de biorrecuperación que se llevan a cabo en el laboratorio puede que no tengan el mismo éxito cuando se extrapolan a los estudios de campo.

En cualquier caso, un factor limitante para la biorrecuperación es que todavía no se conocen a profundidad los mecanismos que controlan el crecimiento y la actividad de los microorganismos en ambientes contaminados. Si se dispusiera de modelos capaces de predecir la actividad de los microorganismos durante los tratamientos de biorrecuperación, se resolverían muchas de las cuestiones que hoy se desconocen (Ortiz et al., 2007).

De acuerdo a lo anterior se hace importante seguir desarrollando estudios que permitan establecer métodos de aislamiento y análisis de cepas de microorganismos, con la finalidad de determinar de una forma más concreta que tipo de microorganismos tienen capacidad detoxificadora, que niveles de remoción puede tener cada uno estos sobre el contaminante, así como también describir los parámetros en los cuales se desarrolla todo

el proceso, de manera que se puedan resolver los interrogantes existentes para empezar a desarrollar futuros tratamientos de biorrecuperación de manera más eficiente.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

- Evaluar microorganismos con capacidad de detoxificar ambientes contaminados por cromo.

3.2 Objetivos específicos

- Aislar microorganismos con capacidad de detoxificar Cromo.
- Identificar microorganismos que se encuentren en ambientes contaminados por cromo.
- Determinar la capacidad de retención, reducción o transformación que tienen los microorganismos aislados sobre el contaminante cromo.

4. Marco conceptual

Absorbancia: Es un concepto relacionado con la muestra, que indica la cantidad de luz que es absorbida por la misma. La cantidad de luz absorbida dependerá de la distancia que atraviesa la luz a través de la solución del cromóforo y la concentración que este tenga (Moreno, A., Forero, V. & Eliana, F., 2017).

Alícuota: Parte que se toma de un volumen para posteriormente ser usada en una prueba de laboratorio, cuyas propiedades físicas y químicas, así como su composición, representan las de la sustancia original. Esta se suele medir en mililitros (ml) o gramos (g) (Moreno, A., Forero, V. & Eliana, F., 2017).

Carcinógeno: se refiere a las sustancias químicas o mezclas de sustancias que inducen cáncer o aumentan su incidencia (Naciones Unidas, 2005).

Citotóxico: agente o sustancia que daña o mata las células o los tejidos (Universidad de Navarra, 2015).

Detoxificación: Proceso de eliminación de sustancias tóxicas (Diccionario Médico, Universidad de Salamanca).

Difenilcarbocida: Esta sustancia se utiliza en el análisis de la espectrofotometría de cromo hexavalente (Cr VI), que oxida el producto dando una coloración violeta; la absorbancia de estos puede ser percibida a una longitud de onda de 540 nm (Moreno, A., Forero, V. & Eliana, F., 2017).

Espectrofotómetro: Instrumento que permite comparar la radiación absorbida o transmitida por una solución que contiene una cantidad desconocida de soluto, y una que contiene una cantidad conocida de la misma sustancia (Moreno, A., Forero, V. & Eliana, F., 2017).

Genotóxico: es todo aquel agente que, a niveles subtóxicos de exposición, producen algún tipo de alteración en el material genético o en sus componentes asociados (Martínez, S., 2005).

Mutagénico: designa aquellos agentes que aumentan la frecuencia de cambios genéticos en los tejidos celulares o en los orgánicos (Naciones Unidas, 2005).

Oligoelemento: elemento traza que se considera esencial para el desarrollo de la vida (Saz, P., Gálvez, J., Ortiz, M. & Saz, S., 2010).

Teratogéno: (del griego teratos, “monstruo” y genos o génesis, “nacimiento u origen”) es todo aquel agente ambiental capaz de desviar el desarrollo hacia la anormalidad (Rodríguez, M., Tamayo, M. & Rivadeneira, F.).

Tóxico: Es cualquier sustancia sólida, líquida o gaseosa que en una concentración determinada puede perjudicar a los seres vivos (Moreno, A., Forero, V. & Eliana, F., 2017).

5. Marco teórico

5.1 Contaminación por metales pesados

Desde la revolución industrial, los avances en ciencia y tecnología han generado que el hombre exceda sus límites en la explotación de recursos naturales, generando alteraciones en los ciclos biogeoquímicos elementales. La introducción de compuestos químicos y la extracción de recursos alteran la autorregulación de los ecosistemas, dando como resultado la acumulación de contaminantes a niveles perjudiciales (Cañizares, 2000).

De acuerdo a la CEPAL, 1999, en los últimos años diferentes estudios internacionales de calidad de los sistemas de aguas continentales (ríos, lagos, embalses, etc.) han mostrado un creciente interés en aspectos tales como: el aumento de la población ubicada en las riveras, el creciente grado de industrialización y la contaminación que genera algunos sectores agrícolas, ganaderos y mineros. El estudio de la contaminación por metales pesados ha ganado gran importancia, debido a que estos contaminantes presentan una alta toxicidad, recalcitrancia (resistencia a la degradación) y rápida acumulación en los organismos vivos.

La contaminación industrial, tecnológica, agropecuaria, minera y el uso indiscriminado de diversos fertilizantes químicos con alto contenido de metales pesados, tiene como resultado la incorporación de dichos metales a los cuerpos de agua y

finalmente su acumulación en tejidos vegetales y animales, alterando la sostenibilidad de la cadena trófica y provocando potenciales riesgos en la naturaleza y en la sociedad.

El alto porcentaje de metales pesados que se presenta en el ambiente como el cromo, el plomo, el mercurio, el cadmio, el arsénico, entre otros, ha contribuido a aumentar los índices de la problemática antes mencionada los cuales están asociados a los procesos industriales, de producción agrícola y minera; aunque los metales pesados se encuentran de forma natural en el medio ambiente, en concentraciones que, por lo general, no generan ningún daño a las diferentes formas de vida, su acumulación en grandes dosis dentro de los organismos vivos si es tóxica.

Los metales pesados no pueden ser degradados o destruidos, pueden ser disueltos por agentes fisicoquímicos y ser lixiviados. Algunos pueden formar complejos solubles y son transportados y distribuidos a los ecosistemas hasta incorporarse en la cadena trófica (suelo, agua, plantas, semillas y forrajes), primordialmente aquellos procedentes de áreas contaminadas (Londoño, Londoño, & Muñoz, 2016).

5.1.1 Contaminación mundial por metales pesados

➤ *China*

China a pesar de su desarrollo industrial, es uno de los países más afectados por contaminación, actualmente se enfrenta a numerosos retos en la gestión del agua como sequías, inundaciones, contaminación acuática y erosión de suelos. Al mismo tiempo, el

conflicto entre el desarrollo socioeconómico, la capacidad de transporte de agua y el medioambiente acuático se sigue intensificando. El rápido aumento de la población y la urbanización está agravando la escasez de recursos hídricos en este país.

El consumo de agua actual no es sostenible y prueba de ello es la desaparición de numerosos ríos de china en las últimas décadas. La sobre extracción de agua es un asunto grave, especialmente en el norte del país donde los recursos de agua per cápita se reducen rápidamente. Existe una gran demanda de agua de calidad y una gestión sostenible de los recursos naturales. El consumo de agua viene aumentando en los últimos años, siendo los sectores con mayor demanda la agricultura y la industria (Mart, & Tecnol, 2016).

Este país tiene una afectación severa de contaminación por metales pesados. De acuerdo a Reyes, et al., 2016 *“Se estima que unos 600 millones de personas se encuentran en alto riesgo por exposición al agua contaminada, la cual corresponde al 70% del recurso hídrico del país”*. Además, el Ministerio de Protección del Ambiente y el Ministerio de Recursos de la Tierra anunciaron que de acuerdo a un estudio realizado en 2005 *“el 20% de las tierras cultivables se encuentran afectadas por presencia de metales pesados”*. Es tan delicada la problemática, que ha llevado a las diferentes organizaciones encargadas del medio ambiente a la puesta en marcha de proyectos enfocados a evaluar los niveles de contaminación por metales pesados en agua, aire y suelos (Reyes, Vergara, Torres, Díaz & González, 2016).

Todo esto ha hecho que el sector de tratamiento de aguas incluya productos y servicios de ingeniería aplicados en los procesos de tratamiento de aguas para su uso doméstico, industrial, agrícola o incluso recreativo. Las actividades de I+D tienen cabida tanto en los servicios pertenecientes a este sector (diseño, construcción y operación de plantas de tratamiento, montaje de equipos, servicios técnicos, consultoría, auditoría, etc.) como en el desarrollo de nuevos productos (membranas, filtros, válvulas, productos químicos, software de monitorización, contadores, etc.) (Mart & Tecnol, 2016).

➤ *España*

Madrid al ser una de las ciudades más industrializadas de España, tiene varios problemas con los ríos que la atraviesan, pues gran parte de los sistemas colectores de aguas residuales no tienen la posibilidad de separar los efluentes urbanos e industriales, y esto tiene como consecuencia que las aguas residuales de las zonas urbanas se mezclen con las aguas industriales. La presencia de cromo en el agua de entrada a la estación depuradora de aguas residuales ha tenido como resultado la afectación de la cuenca receptora y de los ecosistemas aledaños debido al vertido del agua contaminada (Arauzo, 2003).

Debido a esto, han realizado varios estudios sobre la dispersión del cromo, en sus formas total y hexavalente, desde las aguas del cauce del río Jarama (Comunidad de Madrid, España) hacia otras partes del ecosistema: medio intersticial, sedimentos y lagunas de gravera adyacentes a los ríos. Para ello utilizaron estaciones de monitoreo,

ubicadas a lo largo de los tramos del río. Después de estos análisis determinaron que las concentraciones de cromo fueron superiores a las establecidas en la norma vigente, además de la alta concentración del mismo hallada en los lodos generados en la EDAR. (Arauzo, 2003)

En las aguas del Jarama observaron concentraciones de cromo total entre 0.05 y 0.10 mg L⁻¹. Todas las estaciones del río previas a su confluencia con el Manzanares presentaron concentraciones de cromo total superiores a las establecidas en los objetivos de calidad para determinadas sustancias contaminantes en aguas superficiales (Real Decreto 995/2000). La proporción de Cr VI con respecto al cromo total era del 100% en la mayor parte de las estaciones del Jarama, presentando concentraciones superiores, en uno y dos órdenes de magnitud, a los valores establecidos como los objetivos de calidad para aguas superficiales. (Arauzo, 2003)

Muchas de las personas que cultivan la zona, dicen que no hace falta añadirles fertilizantes a los terrenos, debido a la alta carga orgánica del agua que usan para riego y este supe el uso de estos productos. Pero donde realmente radica el problema sanitario es en la alta carga de metales pesados que se acumula en los alimentos que cosechan. Al derivarse desde Madrid los excesos de aguas urbanas junto con las industriales, el porcentaje de metales pesados sobrepasa los límites exigidos por la legislación y los tolerables por el organismo. (Arauzo, 2003)

➤ *Argentina*

En Buenos Aires, una de las principales causas de contaminación por metales pesados está relacionada con el desarrollo industrial; una de las cuencas más afectadas por la contaminación es el Río Matanza – Riachuelo, el cual recorre 80 kilómetros y atraviesa 14 municipios y parte de la ciudad Autónoma de Buenos Aires, desembocando en el Río de la Plata (Greenpeace, 2012).

Según la autoridad Cuenca Matanza – Riachuelo, ACUMAR (2012), aproximadamente 24.000 establecimientos industriales y comerciales están ubicados en esta zona, siendo los sectores curtiembres, frigoríficos, galvanoplásticos y petroquímicos los que contribuyen a generar mayor contaminación (Greenpeace, 2012).

De acuerdo a la Secretaria de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación (2006), el sector curtiembre fue identificado como el responsable del 50% de la degradación ambiental de la cuenca, los establecimientos vinculados a la industria del cuero y pieles son más de 200, de los cuales, más de 170 están dedicados al curtido del cuero (Greenpeace, 2012).

En el 2011, más de 80 curtiembres fueron declaradas como agentes contaminantes por la Autoridad Cuenca Matanza – Riachuelo (ACUMAR), ya que se comprobó que realizaban emisiones contaminantes a través de efluentes líquidos, emisiones gaseosas y residuos sólidos. Aunque algunos establecimientos se encuentran implementando

programas de reconversión, no se ha visto una efectiva recuperación de la cuenca, debido a que la normatividad vigente admite niveles permisibles de sustancias contaminantes y no contempla una gran variedad de sustancias tóxicas (Greenpeace, 2012).

5.1.2 Situación actual en Colombia

Una de las principales problemáticas ambientales que presenta actualmente el país se refiere al uso indiscriminado de contaminantes químicos con alto contenido de metales pesados en actividades industriales, de producción agrícola y minería. De acuerdo a lo anterior, la contaminación química se ha constituido en una de las más peligrosas para los diferentes ecosistemas, especialmente los acuáticos, así como también para la salud de la población que se encuentra directamente expuesta a dichos contaminantes.

Actualmente la contaminación por metales pesados en las fuentes hídricas del país es muy relevante, debido a que es una de las formas de contaminación que más amenaza el medio ambiente, pues no es biodegradable y puede ser acumulada en los organismos vivos por largos periodos de tiempo (Campos, 1990).

La minería es una de las principales fuentes de contaminación por metales pesados; en Colombia la minería existe desde antes de la época de la conquista y se ha mantenido hasta nuestros días (Güiza, 2013), el modelo extractivista ha generado grandes impactos a nivel ambiental y social, pues la minería genera impactos adversos sobre la salud y el medio ambiente.

Gracias a los procesos geológicos que formaron valles, cordilleras y costas, Colombia es un país rico en recursos minerales. Esta riqueza se hizo evidente desde tiempos precolombinos, pues nuestros indígenas ya realizaban la explotación artesanal de la sal utilizando implementos de madera, explotaban oro de playas y rocas, extraían esmeraldas artesanalmente de los yacimientos, entre otras actividades mineras, además de la sorprendente forma en que algunas de estas comunidades trabajaron la orfebrería.

La minería en Colombia en un alto porcentaje es ilegal, se estima que el 67% carece de títulos mineros, lo que indica que no hay un control directo por parte del estado, tanto en los procesos de exploración, como en los de extracción, trayendo consigo una serie de efectos negativos para la economía y para la sociedad por carecer de licencias ambientales (Villegas, 2013). La minería ilegal se extiende aproximadamente por el 65% de territorio nacional, las bandas de buscadores de oro, coltán y uranio, que en su mayoría hacen parte de grupos al margen de la ley, están regados por 12 regiones del país que incluye 20 departamentos (El Tiempo, 2015).

Una de las principales actividades mineras en el país es la aurífera, según el Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible (2012), la principal fuente de exposición nacional por mercurio proviene de este tipo de minería, siendo el país el segundo productor de oro en América Latina, con una producción aproximada de 51.6 toneladas al año entre 2008 y 2011, alcanzando una cifra record de producción de 66 toneladas en 2012 (Goñi, Sabogal, & Asmat, 2014). De acuerdo a la Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo

Industrial (ONUDI) *“Colombia es el tercer país del mundo que más contamina con este metal ya que libera entre 50 y 100 toneladas anuales en el proceso de extracción y amalgamación artesanal de oro”* (López, Suárez, Hoyos & Montes, 2013).

Otra fuente de contaminación antropogénica en el país la representa la industria manufacturera, está equivale aproximadamente al 11,3% del PIB, a pesar que viene presentando un decrecimiento desde el año 2011, sus principales divisiones económicas siguen siendo la fabricación de combustible nuclear, la elaboración de sustancias y productos químicos, los productos de refinación del petróleo, el procesamiento de productos metalúrgicos básicos y por último la fabricación y transformación de productos textiles (Vásquez, 2014), de los cuales se deriva las causas principales de contaminación por metales pesados.

Tanto en Colombia como en el mundo, el cromo y sus compuestos son ampliamente utilizados en diversos procesos industriales debido a sus características químicas y por los beneficios que brindan en la elaboración de múltiples productos (Téllez et al., 2004). En el país se estima que *“el 56% de los usos del cromo corresponde a la industria metalúrgica, el 20% a la industria refractaria y el 15% al sector manufacturero, que lo utiliza como producto químico”* (Téllez et al. 2004).

De acuerdo al Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible (2012), en Colombia la principal fuente de exposición al cromo es de origen industrial. Una de las industrias que

más utiliza este metal son las fábricas de curtiembres; se calcula que en Colombia funcionan aproximadamente 800 empresas dedicadas a esta labor, concentrándose el 60% de estas empresas en Bogotá y su sabana, estas empresas se caracterizan por que su proceso productivo es de tipo artesanal, en su mayoría son microempresas y carecen de sistemas técnicos de salud y seguridad para los trabajadores expuestos (Téllez et al. 2004).

“En la localidad de Tunjuelito, especialmente en el barrio San Benito, se concentra el 90% de las curtiembres de la ciudad de Bogotá”, estas realizan descargas que pueden ser en total de 4000 m³/día, la producción de sólidos es de 50 ton/día y los líquidos que no tienen ningún tipo de tratamiento son descargados directamente a la red de alcantarillado que desemboca en el río Tunjuelito (Téllez et al., 2004), contribuyendo a la afectación de la salud de la población adyacente a la zona y a la contaminación y deterioro del medio ambiente.

Los efectos nocivos del cromo en la salud son muy diversos. Para el caso de Colombia, los efectos sobre la salud reportados en un estudio de 2005 detectó que: *“el 34.3% de los sujetos evaluados presentaba alteraciones sobre la salud que podían guardar alguna relación con la exposición al metal. Con una frecuencia de exposición a cromo cuatro veces mayor en aquellos individuos con enfermedades relacionadas al metal, y en comparación con aquellos sujetos sanos o con alteraciones no relacionadas.*

Las alteraciones clínicas más frecuentemente presentadas fueron la hipertrofia de cornetes e irritaciones de mucosas y dermis” (Collazos & Montaña, 2017).

5.2 Antecedentes de aislamiento de microorganismos con capacidad detoxificadora de cromo

En los últimos años se han realizado diversos estudios que han reportado aislamiento de microorganismos con capacidad detoxificadora de cromo, tal es el caso de la bacteria *Escherichia coli*, que fue aislada de aguas residuales contaminadas con cromo (VI) provenientes de una planta metalmeccánica. En este estudio después de varios ensayos de laboratorio pudieron determinar que para concentraciones de 5 y 10 mg/L se logro una eliminación del 100% de cromo (VI), mientras que para concentraciones mayores, 25 mg/L, se alcanzaron valores de reducción del 77,8% (Panigatti, M., Torres, J., Griffa, C., Boglione, R., & Gentinetta, F., 2007).

De igual manera, un estudio desarrollado en la Universidad del valle evaluó el potencial de la bacteria *Bacillus cereus* para remover cromo (VI); este microorganismo presento una gran capacidad de tolerar altas concentraciones del metal, removiendo el 100% del contaminante en concentraciones de 10, 30, 50 y 100 ppm, evidenciando que, el proceso de reducción pudo estar asociado a un fenómeno de absorción - expulsión del contaminante (Ramírez, A. & Benítez, N., 2013).

Otro estudio de remediación biológica de efluentes con altas concentraciones de cromo (VI) fue el desarrollado por Benazir et al. (2010) en la india, en este se analizó la capacidad que tienen las bacterias *Bacillus subtilis*, *Pseudomona aeruginosa* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* para reducir cromo. *B. subtilis* mostro una eficiencia de remoción de 99,6%, pero la reducción de los niveles de cromo no fue constante, presentando fluctuaciones en el tiempo evaluado; por su parte *P. aeruginosa* también tuvo una eficiencia del 99,6%, presentando un comportamiento muy similar a *B. subtilis*; finalmente *S. cerevisiae* mostró una eficiencia del 95,6% en la remoción de cromo, presentando un comportamiento más constante.

Otros microorganismos que han presentado niveles óptimos de remoción de cromo (VI) están relacionados en la Tabla 1.

Tabla1. Microorganismos con capacidad detoxificadora de cromo

Microorganismo	Fuente de cromo y concentración	Proceso de reducción y eficiencia
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , aislada de una mina de cromita.	Solución sintética $K_2Cr_2O_7$, 100 mg / L	100 ml de medio Luria Bertani en Erlenmeyer de 250 ml; condiciones: temp. 30°C, 100 rpm, tiempo de incubación 24 h y pH 8; Eficiencia 85%
<i>Alcaligenes faecalis</i> y <i>Pseudochrobactrum saccharolyticum</i> aisladas de un efluente contaminado.	Solución sintética $K_2Cr_2O_7$, 10 y 100 mg / L; efluente industrial, 10 mg / L.	Medio de cultivo Luria Bertani en botella de 300 ml a 180 rpm; otros parámetros tenidos en cuenta: temperatura, suplementos nutricionales y tiempo de incubación; Eficiencia 100% para solución sintética y de efluentes.
<i>Acinetobacter sp.</i> aislada de un	Solución sintética $K_2Cr_2O_7$, 200 mg / L	100 ml de medio LB en Erlenmeyer; condiciones: temp. 37

aireador líquido de un proceso de lodo activado		°C, 150 rpm y Cr (VI) inicial 200 mg / L; Eficiencia 100%
<i>Pseudomonas</i> aisladas de la circulación del sistema de refrigeración de una planta de hierro y acero	Solución sintética K ₂ CrO ₄ , concentración de 0.5 a 3 mmol / L	100 ml de medio LB en Erlenmeyer de 250 ml; condiciones óptimas evaluadas: pH 7 a 9, concentración inicial de Cr (VI) 3 mmol / L, y dosis de inoculación 10% (v / v) para ambos cultivos de células; Eficiencia: 100%

Fuente: (Pradhan, D., Sukla, L., Sawyer, M., & Rahman, P., 2017).

5.3 Definición de metales pesados

Los metales pesados son elementos químicos que presentan propiedades metálicas como ductilidad, conductividad, densidad, estabilidad como catión y especificidad a ligando (Garbisu et al, 2003 citado por Beltrán-Pineda & Gómez-Rodríguez, 2016). Bajo esta la denominación se encuentran 65 elementos de la tabla periódica con características tales como número atómico mayor a 20 y alta densidad relativa, mayor o igual a 5 g/cm³ en su forma elemental.

Estos elementos presentan diferentes propiedades fisicoquímicas y biológicas, se encuentran formando complejos como iones libres o participando en reacciones redox que resultan potencialmente tóxicas para los organismos (Beltrán & Gómez, 2016), su presencia en la corteza terrestre es inferior al 0,1% (Yagnentkovsky, 2011).

Por otra parte, los metales pesados son imprescindibles para el desarrollo de microorganismos, plantas y animales pues ejercen roles importantes en algunas

reacciones bioquímicas y son esenciales para su crecimiento y desarrollo (Beltrán & Gómez, 2016). Sin embargo, cuando se presentan en altas concentraciones pueden formar compuestos inespecíficos creando efectos citotóxicos, genotóxicas, mutagénicas y carcinógenas, convirtiéndose en una amenaza tanto para la salud humana como para el medio ambiente. Es importante anotar que, si bien algunos metales no tienen influencia biológica, otros como el cromo (Cr) y el mercurio (Hg) son tóxicos (Beltrán & Gómez, 2016).

5.3.1 Cromo (Cr)

El cromo (Cr), es un metal blanco brillante muy duro y quebradizo, resistente a la corrosión, de número atómico 24, peso molecular 51,996, punto de fusión 1875°C y punto de ebullición 2665°C; no se altera al aire, pero a altas temperaturas se oxida recubriéndose de óxido crómico, Cr_2O_3 . Presenta números de oxidación +2, +3 y +6 (Cuberos, Rodríguez, & Prieto, 2009). De esos estados, únicamente el Cromo hexavalente, Cr (VI) y el Cromo trivalente, Cr (III) tienen importancia desde el punto de vista ambiental, pues son las formas de oxidación más estables en el medio ambiente (Rivera, Cárdenas, Martínez & Acosta, 2015).

El estado hexavalente Cr (+6) es el más importante toxicológicamente, lo presentan los cromatos, dicromatos y el ácido crómico (Cuberos et al., 2009), es un potente oxidante de materia orgánica, es sumamente carcinogénico, mutagénico y teratogénico. Se ha demostrado que es 100 veces más tóxico y 1000 veces más mutagénico que la

forma trivalente y actualmente es considerada como un contaminante prioritario en muchos países (Netzahuatl, Pineda, Barragán & Cristiani, 2009).

El cromo no existe libre en la naturaleza, se encuentra principalmente en la cromita ($\text{Fe}(\text{CrO}_2)_2$) y en el cromato de plomo (PbCrO_4). Los compuestos que contienen cromo se emplean en su mayor parte en las industrias químicas de aleaciones de acero, galvanoplastia, tinción de textiles, construcción de maquinarias, en radio electrónica, efluentes de torres refrigerantes de estaciones generadoras de energía eléctrica, curtido de pieles, blindajes para proyectiles, taladros y cajas fuertes, entre otras aplicaciones (Arauzo, Rivera, Valladolid, Noreña, & Cedenilla, 2003).

Una de las industrias que más genera contaminación por cromo en el mundo es la curtiembre, esta contribuye especialmente a la contaminación al consumir aproximadamente el 32% del cromo total mundial (Benitez, 2013).

Esta industria genera descargas de agua con grandes volúmenes de sales de cromo altamente concentrado, que emergen del proceso de curtido de las pieles (Cobos, Londoño, & Garcia, 2009), las cuales son vertidas a los sistemas colectores de agua residual; estos sistemas colectores de agua generalmente no posibilitan la separación de los efluentes industriales de las aguas residuales urbanas (Arauzo et al., 2003), desembocando directamente en los ríos sin ningún tipo de tratamiento, acumulándose en

los sedimentos y transformase en el ambiente causando efectos nocivos en el entorno y en la salud humana.

El cromo trivalente ($\text{Cr}+3$) es un oligoelemento presente en los organismos vivos e indispensable en procesos metabólicos de la glucosa, colesterol, ácidos grasos y cristalinos, e involucrado en otros múltiples procesos biológicos (Cuberos et al., 2009); El cromo trivalente ($\text{Cr}+3$) no es de gran toxicidad, pero bajo ciertas condiciones del medio se oxida, transformándose en cromo hexavalente ($\text{Cr}+6$), elemento altamente oxidante de sustancias orgánicas, el cual es altamente peligroso para los organismos vivos y la salud humana (Cobos et al., 2005).

A los derivados del cromo hexavalente $\text{Cr} (+6)$ se le atribuyen las principales manifestaciones tóxicas que afectan especialmente la dermis, los pulmones y el ADN. Las afectaciones en la dermis se generan por la acción cáustica al contacto directo con algunos compuestos, los problemas pulmonares se producen por la acción citotóxica e inflamatoria que produce el cromo sobre los neumocitos, y las modificaciones en el ADN se presentan debido a que el $\text{Cr} (+6)$ induce alteración de cromátidas hermanas, alteraciones cromosómicas y reacciones cruzadas en la cadena de ADN (Cuberos et al., 2009).

El ácido crómico y los cromatos son irritantes y destructores para todas las células del organismo, pueden producir intoxicaciones accidentales agudas por vía digestiva o

respiratoria. Dentro de la sintomatología por intoxicación aguda se encuentra vértigo, sed intensa, dolor abdominal, vómito, choque y oliguria o anuria. Generalmente la muerte se puede producir por uremia. La exposición por largos periodos a vapores de cromo causa ulceración indolora, hemorragia y perforación del tabique nasal, lo cual puede ir acompañado de secreción nasal fétida (Otiniano et al., 2007).

También se ha observado algunas alteraciones leves como conjuntivitis y lagrimeo, y otras alteraciones mayores como hepatitis aguda con ictericia. Algunos datos de laboratorio demuestran que en personas que sobrepasan los valores máximos permisibles por la norma, se pueden presentar índices de hematuria, proteinuria y de deterioro de la función hepatocelular. Una de las principales causas de muerte por envenenamiento agudo es la nefritis hemorrágica (Otiniano et al., 2007).

5.4 Técnicas de remediación

El término “tecnología de tratamiento” o “técnica de remediación” implica una serie de procesos que alteran la composición de una sustancia peligrosa o contaminante a través de acciones químicas, físicas o biológicas con la finalidad de reducir la toxicidad, movilidad o volumen del material contaminado (Volke, & Velasco, 2002). Es posible clasificar las técnicas de remediación teniendo en cuenta los siguientes parámetros: (i) estrategia de remediación; (ii) lugar en que se realiza el proceso de remediación, y (iii) tipo de tratamiento. (Agency & Office, 2001).

Las tecnologías que se usan de acuerdo a la estrategia de remediación son tres, y tienen en cuenta los siguientes principios: primero, la destrucción de los contaminantes, que busca alterar o modificar su estructura química; segundo, la extracción o separación, que aprovecha las propiedades químicas o físicas del medio para volatilizar, solubilizar u oxidar el contaminante; y tercero, el aislamiento o inmovilización, que busca por medio de procesos fisicoquímicos o biológicos estabilizar, solidificar o contener los contaminantes (Volke, & Velasco, 2002).

Por su parte las tecnologías que se usan de acuerdo a su ubicación son dos y cumplen las siguientes características: *In situ*, las cuales se llevan a cabo en el mismo lugar donde se encuentra el contaminante, y *Ex situ*, que requiere que el medio contaminado sea trasladado a otro lugar para realizar su proceso de descontaminación (Rodríguez & Sánchez, 2003).

Finalmente, las tecnologías que se usan de acuerdo al tipo de tratamiento son dos: fisicoquímicas y biológicas, estas tecnologías con las anteriormente descritas se pueden usar por separado o en conjunto para optimizar los procesos de descontaminación.

5.4.1 Técnicas físico-químicas

Este tipo de tratamientos utiliza las propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes o del medio contaminado para destruir, separar o contener la

contaminación (Volke, & Velasco, 2002); son técnicas generalmente efectivas y sus costos varían según la técnica que se utilice y si el contaminante requiere un tratamiento posterior o la disposición final del mismo. En la Tabla 2 se encuentra la descripción de los principales tratamientos.

Tabla 2. Técnicas Físico-Químicas

<i>Técnica</i>	<i>Descripción</i>
Sedimentación o Decantación	Es un proceso físico que aprovecha la fuerza de gravedad que se puede ejercer sobre una partícula más densa que el agua, con el fin de precipitarla, depositándola en el fondo de un sedimentador. Su efectividad depende del tamaño y la densidad de la partícula.
Filtración	Es un proceso mediante el cual el agua pasa a través de una matriz de filtrado con la finalidad de retener la mayor cantidad de material posible; su efectividad depende del material filtrante y del tamaño de las partículas a filtrar.
Flotación	Es un proceso químico por medio del cual se generan burbujas de aire que permiten a las partículas menos densas que el agua flotar hacia la superficie de donde son arrastradas y sacadas del sistema. Su efectividad depende directamente de la densidad de la partícula.
Coagulación-Floculación	Muchas veces la materia en suspensión está formada por partículas muy pequeñas ($10^{-6} - 10^{-10}$ m); estas suspensiones coloidales suelen ser muy estables y tienen una velocidad de sedimentación muy lenta, por lo que requiere la adición de algunos agentes químicos que permiten desestabilizar la suspensión coloidal (coagulación) y posteriormente favorece la floculación de la misma para obtener partículas fácilmente sedimentables. Esta técnica funciona gracias a que la solución química aporta una carga eléctrica contraria a la del coloide.
Precipitación Química	Consiste en la eliminación de una sustancia disuelta en el agua por medio de la adición de un reactivo que forma un compuesto insoluble en el medio, lo que facilita su eliminación por medio de cualquier método físico.

Proceso Electroquímico	Consiste en hacer pasar una corriente eléctrica a través del agua para producir una reacción de oxidación – reducción tanto en el cátodo como en el ánodo. Como desventaja tiene su alto costo de operación y que muchas veces los productos formados en la electrolisis deben ser nuevamente tratados.
Intercambio Iónico	Es un método que utiliza habitualmente unas resinas de intercambio iónico, donde se retienen selectivamente en la superficie los iones disueltos en el agua, manteniéndolos unidos a la superficie y cediéndolos exclusivamente por medio de una disolución con un fuerte regenerante.
Adsorción	Es un tratamiento que permite por medio del carbón activo eliminar micro contaminantes solubles que se encuentran en la superficie del agua. Una de sus limitantes de aplicación son los costes de la tecnología, debido a que las propiedades del carbón se deterioran y se hace necesario reponer parte del mismo cada cierta cantidad de tiempo.

Fuente: (Rodríguez, A.; Letón, P.; Rosal, R.; Dorado, M.; Villar, S. & Sanz, J., 2006)

5.4.2 Técnicas biológicas

Las técnicas de remediación biológica consisten principalmente en el uso de sistemas biológicos que pueden ser bacterias (biorremediación), hongos (micorremediación), algas (ficorremediación) o plantas (fitorremediación) (Paisio, González, Talano, & Agostini, 2012), o incluso, sustancias derivadas de ellas, que permiten descomponer o degradar sustancias peligrosas en sustancias menos tóxicas o inocuas para el medio ambiente y la salud humana (Volke, & Velasco, 2002).

Los procesos de biorremediación pueden emplear organismos propios del sitio contaminado (microorganismos autóctonos) o provenientes de otros sitios (microorganismos exógenos), se pueden realizar en presencia de oxígeno (aerobios) o en

condiciones anóxicas (anaerobios), y al igual que los procesos fisicoquímicos se pueden llevar a cabo *in situ* o *ex situ* (Volke, & Velasco, 2002).

Estas técnicas de descontaminación están basadas en los procesos metabólicos que pueden realizar los microorganismos, en los cuales obtienen la fuente de carbono necesaria para el crecimiento de sus células y una fuente de energía para llevar a cabo todas las funciones metabólicas que necesitan sus células para su crecimiento. (Rogel & Maroto, 2008).

Los microorganismos pueden modificar la concentración de los metales pesados en el ambiente, por medio de procesos enzimáticos y no enzimáticos (Rajendran, Muthukrishnan, & Gunasekaran, 2003), que actúan directamente sobre la biodisponibilidad y remediación del elemento, alterando la toxicidad, solubilidad en agua y la movilidad del mismo (Bolan, Kunhikrishnan, Thangarajan, Kumpiene, Park, Makino, & Scheckel, 2014).

Las bacterias presentan diversos sistemas para tolerar los efectos nocivos generados por los metales pesados, entre ellos se encuentran principalmente: la captura en la célula bacteriana (bioadsorción), las transformaciones mediadas por enzimas (bioacumulación, biolixiviación y biometilación) y la expulsión de iones metálicos (Marrero, Díaz, & Coto, 2010), en la Tabla 3, se presentan las principales estrategias que presentan los microorganismos para realizar los procesos de descontaminación.

Tabla 3. Estrategias microbianas de descontaminación

<i>Estrategia</i>	<i>Descripción</i>
Bioadsorción o Biosorción	Es un tipo específico de adsorción en cuyo método participa una fase sólida (bioadsorbente) y una fase líquida (solvente), que retiene las especies diluidas que conviene separar de la disolución (adsorbatos). Los bioadsorbentes son materiales de origen biológico que presentan propiedades adsorbentes o de intercambio iónico y que poseen altas capacidades de retención de metales pesados (Izquierdo, M., 2010). Las ventajas que presenta esta técnica con respecto a las convencionales son que los bioadsorbentes son de bajo costo, fácil adquisición y alta eficiencia (Tejada, C., Villabona, Á., & Garcés, L., 2015).
Bioacumulación	Es un aparato celular que comprende un sistema de transporte de membrana que internaliza el metal pesado en el entorno celular y permite el consumo de energía dentro de la célula (Marrero et al., 2010). Una vez incorporado el metal pesado en el citoplasma, es retenido por la presencia de proteínas ricas en grupos sulfhídricos o es compartimentizado dentro de las vacuolas (Vullo, D. L., 2003). Las ventajas son: es un proceso que presenta alto rendimiento, es de bajo costo, mínima generación de lodos y fácil reutilización (Beltrán, M., & Gómez, A., 2016).
Biometilación	La metilación es un proceso biológico relacionado con la movilización de ciertos metales para su eliminación, esto ocurre cuando los metales son transformados a derivados de metilo que posteriormente pueden ser removidos por volatilización (Bolan et al., 2014). Los microorganismos en el medio actúan como agentes metiladores ya que la materia orgánica provee una fuente de grupos metilo para que se dé el proceso (Beltrán, M., & Gómez, A., 2016). La metilación biológica se considera un proceso dominante para la descontaminación de suelos y ambientes acuáticos, que da como resultado la detoxificación del metal (Bolan et al., 2014).
Biolixiviación	Es un grupo de reacciones químicas que da como producto la generación de minerales mediante el uso de microorganismos (Quiroga, B., 2014). El proceso se origina gracias a la catálisis que los microorganismos ejercen en la fase de disolución de algunas menas minerales, usando al mineral como fuente de energía y utilizando la transferencia de electrones para propósitos de supervivencia y a su vez liberando metales (Rodríguez, Y., Ballester, A., Blázquez, M., González, F., & Muñoz, J., 2001). Es un método económico para la recuperación de metales, requiere de equipos simples, inversión y costo de operación menores, y rendimientos razonables (Rivera, R., Camejo, P., Moya, F., López, J., & Munguía, M., 2011).

Fuente: El Autor

5.5 Medio de cultivo

Para aislar e identificar una especie bacteriana y diferenciarla de aquellas otras con las que pudiera confundirse morfológicamente, es preciso obtener cultivos que, por características macro y microscópicas nos permitan establecer su identidad (Martos, Del Barrio, & Salido, 1996).

Los medios líquidos se preparan disolviendo en agua unos gramos de una serie de componentes químicamente definidos y posteriormente se esterilizan (Tortora, Funke, & Case, 2007), este medio favorece el desarrollo y multiplicidad de las bacterias debido a que se les facilita encontrar las sustancias que necesitan para nutrirse (Martos et al., 1996).

Por su parte a los medios sólidos se les agrega un agar gelificante que se disuelve por ebullición en el medio líquido (Prats, 2006), en ellos las bacterias crecen con mayor dificultad, pero son de gran utilidad para el estudio de características de crecimiento y otras particularidades del microorganismo (Martos et al., 1996).

Los medios de cultivo pueden ser químicamente definidos o complejos. En los medios químicamente definidos se conoce la composición química exacta, estos suelen reservarse para el trabajo experimental de laboratorio o para el crecimiento de bacterias autótrofas. Por su parte los medios complejos están compuestos por nutrientes como

extractos de levaduras, carne o plantas, digeridos de proteínas de estas y otras fuentes, estos medios suelen usarse para el cultivo de bacterias heterótrofas y de hongos (Tortora et al., 2007).

5.5.1 Medio Luria-Bertani (LB)

El medio Luria-Bertani (LB), es un medio químicamente definido, está constituido por tres componentes, de los cuales uno es mineral, el NaCl, y dos son orgánicos: la peptona y el extracto de levadura. Es uno de los medios más usados debido a que es rico en nutrientes, de fácil elaboración y permite el crecimiento de una gran variedad de cepas. (Garboza, Frontado, Noguera, Ávila, Ojeda, Ramírez, & Triana, 2011).

6. Metodología

6.1 Población y muestras

La población de estudio son los microorganismos con capacidad de detoxificar cromo. Las muestras fueron obtenidas del Embalse del Muña, del Humedal Jaboque, de un Manantial Termal de Tabio, de una industria metalmecánica y de explotaciones mineras cuyas aguas se encuentran contaminadas con residuos industriales con alto contenido de metales pesados.

Los puntos de muestreo se seleccionaron teniendo en cuenta un estudio bibliográfico previo que permitió de bases de datos como ADDESA, el DANE, la empresa de acueducto y alcantarillado de Bogotá - EAAB e investigaciones previas realizadas desde el semillero Metamorfo de la universidad, establecer características específicas sobre la calidad física, química y microbiológica de cada uno.

6.1.1 Embalse del Muña

El Embalse del Muña, está ubicado en el municipio de Sibaté, Cundinamarca, entre las coordenadas geográficas 4°30'50.8''N, 74°15'00,66''O; esta recibe la contaminación producto de los vertimientos generados por los diferentes municipios de la Sabana de

Bogotá, así como también los provenientes de los ríos Fucha, Salitre y Tunjuelo que hacen parte del sistema hídrico de la ciudad.

Dentro de las fuentes de contaminación identificadas está la proveniente de las curtiembres de Villapinzón y San Benito, de la zona industrial, comercial y domestica de Bogotá (Colmenares & Torres, 2012). En el área norte del embalse existe una zona industrial en la cual se localizan empresas cuyos procesos (manufactura de llantas, elaboración de tejas y productos de fibrocemento, siderurgia, productos químicos) también generan vertimientos con un potencial de contaminación significativo (Bayona, 2007).

6.1.2 Humedal Jaboque

El humedal Jaboque, se encuentra ubicado en la zona noroccidental de la ciudad de Bogotá, en la Localidad de Engativá, entre las coordenadas geográficas 4° 32' 0.426" N 73°56'57.53" W y 4° 33' 10.613" N 73°58'32.337" W; se localiza entre el aeropuerto el Dorado, el río Juan amarillo y la autopista Medellín, en una pequeña cuenca encerrada (ADESSA, 2006). Ha sido receptor de vertimientos de aguas residuales, tanto domésticas como industriales, sin ningún tratamiento previo (Acherman, 2007). La contaminación hídrico-química, generada por vertimientos industriales, se caracteriza por su contenido mineral, como metales pesados y sales vertidas directamente al espejo de agua (DANE, 2003).

El humedal funciona como un sistema de amortiguación de inundaciones del río Bogotá en épocas de lluvias, la entrada de agua de este río trae consigo problemas graves de contaminación como lo son cargas orgánicas y metales pesados (ADDESA, 2006).

6.1.3 Manantial termal

El Manantial Termal está ubicado en el municipio de Tabio, Cundinamarca ($4^{\circ}55'23.52''N$, $74^{\circ}06'17.86''O$); sus aguas son provenientes de la fisura de la nariz de un volcán inactivo, lo que da como resultado un nacedero de agua con aproximadamente 12 minerales naturales que son aprovechados en piscinas y Jacuzzi's de atractivo turístico. La temperatura es de aproximadamente $32^{\circ}C$ (Jimenez, 2014).

6.1.4 Otras muestras

Las muestras de aguas residuales de minas ubicadas en Monguí y Paz del Río del departamento de Boyacá, así como de las aguas residuales de los dos procesos de una industria metalmeccánica (proceso de enfriamiento cementación y proceso de enfriamiento arandela) ubicada en la zona sur de la ciudad de Bogotá, fueron tomadas de la investigación “Búsqueda de bacterias oxidadoras de ácido sulfhídrico para su potencial uso en la producción de biogás de alta pureza” desarrollada por Aura Hurtado y José Salamanca.

6.2 Recolección de muestras

Las muestras del Embalse del Muña y el Humedal Jaboque fueron tomadas usando recipientes de plástico estériles de 50 ml, se transportaron en nevera portátil a temperatura ambiente y el muestreo se realizó bajo los parámetros establecidos por la Norma Técnica Colombiana NTC-ISO 5667-1 (ICONTEC, 1995), que trata respectivamente de las técnicas de muestreo, la preservación y el manejo de muestras de agua.

6.3 Determinación de la concentración impuesta para la selección de microorganismos degradadores.

Con base en la revisión bibliográfica realizada, se encontró que el medio Luria Bertani es ampliamente usado en investigaciones que buscan la aplicación de sistemas biológicos para la degradación de cromo (Mishra, H. & Sahu, H., 2013), (Carlos, F., Giovanella, P., Bavaresco, J., de Souza Borges, C. & de Oliveira Camargo, F., 2016), (Narayani, M., 2012), (Pradhan, D., Sukla, L., Sawyer, M., & Rahman, P., 2017).

En la mayoría de las investigaciones consultadas en las que se usa este medio para el aislamiento y evaluación de cepas degradadoras de cromo, se aplican concentraciones de cromo dentro de un rango de 10 mg/L a 150 mg/L (Pradhan, et al., 2017).

En esta investigación se definió una concentración de 80 mg/L de cromo hexavalente, para las fases iniciales del aislamiento, posteriormente se aumentó la concentración a 140 mg/L con el fin de ejercer mayor presión selectiva sobre los microorganismos.

La concentración final de Cr^{+6} en el medio se calculó teniendo en cuenta que solo una fracción del peso molecular del **dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)** corresponde a **cromo hexavalente**.

6.4 Aislamiento de cepas microbianas resistentes a cromo (Cr)

Con el objetivo de enfocar el aislamiento a cepas resistentes a cromo, se adicionó a los medios de cultivo una solución de **dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)** a una concentración de 20 g/L. La estrategia de aislamiento utilizada se describe a continuación:

Pre-enriquecimiento: Para el pre-enriquecimiento, una alícuota de cada muestra de agua (5 ml) se adiciona a 50 ml de medio LB líquido con una concentración 80 mg/L calculada a partir de una solución madre de **dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)** de 20 g/L. Los cultivos se incubaron durante 5 días a 37°C sin ningún tipo de agitación.

Pasado el periodo de incubación se procedió a hacer la siembra en placas de Petri con medio LB en la misma concentración de cromo que se utilizó en el cultivo líquido

anterior. Diluciones seriadas a partir del cultivo enriquecido fueron aplicadas para posteriormente proceder a sembrar en medio solido.

Las colonias aisladas en cada muestra se transfirieron a agar LB con una concentración de 140 mg/L de **dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)**, esto con el fin de asegurar que las colonias aisladas presentaran resistencia a altas concentraciones de cromo.

Los criterios que se tuvieron en cuenta para determinar los cultivos positivos fueron: visualización del aumento de la turbidez del medio, verificación macroscópica del crecimiento de microorganismos en medio sólido y verificación microscópica, tanto en medio líquido como sólido, utilizando el microscopio óptico (Rubiano, 2006).

6.5 Caracterización fenotípica de las cepas aisladas

6.5.1 Descripción macroscópica:

Para la descripción macroscópica se tuvo en cuenta el tamaño, la forma de la colonia (circular, irregular o filamentosa), los bordes (ondulados, en sierra o dentados, o lisos) y la superficie (plana, convexa, mamelonada o umbilicada). También se tuvo en cuenta la pigmentación que adquieren (verde, amarillo, blanco o grisáceo) y su comportamiento frente a la luz (brillante u opaco) (Pérez & Mota, 2010).

6.5.2 Morfología y motilidad

Para el estudio de la morfología se utilizó un microscopio óptico, el cual permitió observar las células en fresco para determinar su forma, tinción de Gram, motilidad y presencia de esporas.

6.5.3 Tinción de Gram

Para la caracterización morfológica, se realizó la tinción de Gram teniendo en cuenta la siguiente secuencia: 1) Realizar la extensión de una fina capa sobre el porta, secar al aire y fijarlo con calor, posteriormente se realizó la coloración con cristal violeta (Pérez & Mota, 2010); 2) Se realizó un lavado con agua, y se le aplicó lugol como mordiente; 3) Se lavó nuevamente con agua y se decoloró con alcohol o acetona; y 4) Se escurrió y se cubrió con safranina o fucsia (Cavallini, 2005); la tinción se realizó teniendo en cuenta los tiempos explicados en la Tabla 4.

Tabla 4. Protocolo tinción de Gram

Solución	Tiempo de aplicación	Bacterias Grampositivas	Bacterias Gramnegativas
Colorante: cristal violeta	1 min	Violeta	Violeta
Mordiente: lugol	1 min	Violeta	Violeta
Decolorante: alcohol acetona	10 – 15 seg	Violeta	Incolora

Colorante de Contraste: Colorante de contraste: safranina	30 seg	Violeta	Rosada
--	--------	---------	--------

Fuente: (Pérez & Mota, 2010)

6.6 Curva de crecimiento

Para determinar los microorganismos con mejor índice de crecimiento las cepas se incubaron en medio LB más 80 mg/L de **dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$)** a 37°C durante 8 horas por duplicado con agitación constante, se realizó una medición inicial de la densidad óptica en un espectrofotómetro (RIGOL Ultra – 3660) a 610 nm utilizando las celdas de 5 cm de paso óptico para establecer t_0 (Valor de la concentración en un tiempo inicial) y posteriormente se realizó una medición cada 2 horas para establecer la tasa de crecimiento de biomasa en las cepas.

6.7 Metodología para determinar la capacidad de detoxificación de cromo de las cepas aisladas

El cromo hexavalente fue determinado colorimétricamente por una reacción con difenilcarbazida en solución acida en donde se produce un color rojo violeta de composición desconocida. La reacción fue muy sensible, siendo la capacidad de absorción molar, basada en el cromo, de aproximadamente $40.000 \text{ l.g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a 540 nm (Díaz de Santos, Siaka, & Owens, 2001).

6.7.1 Materiales y equipo

Espectrofotómetro ultravioleta-visible UV-VIS para trabajar a 540 nm con celdas de 5 cm de paso óptico, pH-metro digital de laboratorio, vasos de precipitados, agitadores de vidrio, probeta graduada y micro pipetas.

6.7.2 Reactivos

➤ *Solución patrón de Cromo hexavalente*: se utilizó una solución trazable de 0.02 a 5 mg/L. De forma alternativa se pesó 141.45 mg de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$), se disolvieron y enrasaron con agua en un matraz aforado de 100 mL, previa adición de HNO_3 concentrado para ajustar el $pH < 2$ (2-5 mL). Un mL de esta solución contiene 0.5 mg de Cr+6. (Sierra & García, 2013).

➤ *Solución de Difenilcarbazida al 0.5% (m/v)*: esta solución debe prepararse al momento de su uso, por lo cual se tendrá en cuenta el volumen necesario. Habitualmente 10 mL son suficientes, lo que implica pesar 50 mg de 1.5-difenilcarbazida (difenilcarbohidrazida) y disolverlos en 10 mL de acetona (Sierra & García, 2013).

➤ *Solución de Acido Sulfúrico 1:1 ó de 50%*: se utilizó una solución comercial de ácido sulfúrico concentrado y se tomó 100 mL y se llevó hasta 200 mL en balón aforado con agua (Sierra & García, 2013).

6.7.3 Procedimiento

➤ *Curva de calibración:* Se pipeteó volúmenes graduales de la solución patrón de cromo, empleando pipetas mecánicas previamente calibradas, completando con agua desionizada hasta el aforo, para obtener al menos seis concentraciones comprendidas en el intervalo de 0.000 a 0.200 mg/L (Sierra & García, 2013).

Posteriormente se transfirieron las soluciones patrón a vasos de precipitado de 100 mL, a cada una se adicionó 0.5 mL de ácido sulfúrico 1:1 y se agitó con varilla de vidrio. El pH debe ser alrededor de 2. Se añadió 1.0 mL de solución de difenilcarbazida, se agitó y dejó reposar de 5 a 10 minutos para desarrollar color. Se realizó la lectura en espectrofotómetro (RIGOL Ultra – 3660) a 540 nm con celdas de 5 cm (50 mm) de paso óptico (Sierra & García, 2013).

➤ *Cultivo líquido para la determinación de la degradación de cromo*

Se cultivaron las cepas por triplicado utilizando el medio líquido LB incubando a una temperatura de 37° usando una concentración de 30 mg/L de cromo hexavalente, la cual se ajustó a partir de una solución madre dicromato de potasio. En el ensayo se definió un control abiótico, también por triplicado en donde no se inculó ninguna cepa, para determinar si existía una degradación abiótica, debido a procesos físico – químicos. Se realizaron mediciones durante 8 horas tomando muestras cada dos horas y haciendo

diluciones respectivas para no exceder los límites de detección de la técnica utilizada para la cuantificación.

➤ *Determinación de cromo hexavalente en muestras:* Inicialmente en 50 ml de agua desionizada se transfirieron 100 µl de muestra (previamente filtrada o centrifugada) a un vaso de precipitados de 100 mL, se le adicionó 0.5 mL de ácido sulfúrico 1:1, se agitó para mezclar bien y se ajustó el pH a 2. Posteriormente se añadió 1 mL de solución de difenilcarbazida, se agitó y se dejó reposar de 5 a 10 minutos para desarrollar color (Sierra & García, 2013).

Se preparó y se analizó un blanco de reactivos con agua. Se leyó de 5 a 10 minutos en el espectrofotómetro (RIGOL Ultra – 3660) a 540 nm con celdas de 5 cm de paso óptico respecto a la curva de calibración de cromo hexavalente (Sierra & García, 2013).

6.8 Análisis estadístico de los datos

Para llevar a cabo la interpretación de los datos arrojados en cada uno de los procesos y poder sacar conclusiones, se tendrán en cuenta los siguientes análisis estadísticos:

6.8.1 Regresión lineal simple y correlación

Para analizar el crecimiento máximo específico de cada una de las 10 cepas aisladas, se realizó una curva de crecimiento, en ella se graficaron los valores de absorbancia por

cada momento de muestreo, el cual se realizo cada 2 horas, durante un tiempo total de 8 horas.

La técnica de regresión proporciona los medios legítimos a través de los cuales se puede establecer asociaciones entre las variables de interés (Canavos, G., 1988); la regresión lineal simple busca medir el grado de relación que pueda existir entre dos variables, una variable independiente “X” y una variable dependiente “Y”, para lo cual se debe tener en cuenta la ecuación de la recta $y_i = B_1X_i + B_0$ (Salazar, B., 2016).

Para cuantificar la calidad de la dependencia entre las dos variables, el indicador más acostumbrado es el coeficiente de correlación, definido como:

$$r_{xy} = \frac{S_{xy}}{S_x S_y}$$

r_{xy} = *Coficiente de correlación entre Xy "Y"*

S_x = *Desviación típica de "X"*

S_y = *Desviación típica de "Y"*

$S_x S_y$ = *Covarianza entre Xy "Y"*

El coeficiente de correlación es un indicador del grado de la relación entre las dos variables, el cual oscila en el intervalo cerrado de $[-1,1]$. Cuando r toma un valor extremo, ya sea $r=1$ o $r=-1$, existe una correlación perfecta (Guarín, N.2002).

6.8.2 Análisis de varianza simple ANOVA

Para cada tratamiento correspondiente a cada una de las tres bacterias evaluadas, fue calculada la concentración de cromo remanente presente en el medio cultivo líquido. De esta manera se graficaron los valores de concentración para cada momento de muestreo, el cual se hizo cada 2 horas. A partir de estos resultados se calculó el área bajo la curva de la disminución de la concentración de cromo (ABCPC) en donde: $ABCPC = \sum [n_i (x_i + x_{i+1}) / 2] (t_{i+1} - t_i)$ (Campbell & Maddem, 1990), como: X_i es la medida de la concentración en la i ésima observación, t es la unidad de tiempo (2 horas) y n el total de número de observaciones con el propósito de determinar la reducción de la concentración de cromo. Se utilizó análisis de varianza de las áreas bajo la curva, realizándose comparación de medias entre los tratamientos, mediante análisis de DMS ($\alpha = 0,05$). También a partir de los valores de ABCPC se calcularon los porcentajes de degradación de cada uno de los tratamientos aplicados.

7. Resultados y discusión

7.1 Información puntos de muestreo

➤ *Humedal Jaboque (JB)*

Las muestras se tomaron el 25 de septiembre de 2016, a las 11:37 am, en el barrio Villas del Dorado de la localidad de Engativa, específicamente en las coordenadas geográficas 4.707281, -74.12794.

Tabla 5. Características Climáticas del Punto de Muestreo JB

Temperatura	Precipitación	Humedad	Vientos
17°C	81%	59%	13 Km/h

Fuente: (El Autor)

La zona se encontró altamente contaminada, con un color de agua verde oscuro, y un olor característico de materia orgánica en descomposición. No se visualizó fauna dentro del agua, la flora de la ronda se encontraba bastante quemada y la avifauna bebía del agua contaminada. De acuerdo a ADDESA, el sistema presentaba tres grados de eutrofización y va de eutrófico a oligotrófico, su pH estaba entre neutro a ácido (6 – 4), tenía presencia de altas concentraciones de cationes de Nitrógeno, Fósforo, Calcio, Manganeso y otros compuestos; con anoxia total, la mayor parte de su vegetación estaba formada por macrófitas, juncuales y pastos, que reducían significativamente el espejo de agua (ADDESA, 2006).



Figura 1. Humedal Jaboque.

En muestreos y análisis realizados por la Empresa de Acueducto y Alcantarillado de Bogotá – EAAB para determinar la calidad de los vertimientos de los humedales de la ciudad, el humedal Jaboque presentó los más altos niveles de vertimientos de Cadmio, Aluminio total, Zinc, Cobre, Cromo, Níquel y Plomo en comparación con los demás humedales (Acherman, 2007).

Tabla 6. Análisis de la calidad de agua Humedal Jaboque

Parámetro	Unidad	Norma	Valor
Aluminio Total	Al(mg/l)		48.85
Plomo	Pb(mg/l)	0.1	1.746
Cadmio	Cd(mg/l)	0.003	0.181
Cobre	Cu(mg/l)	0.25	0.009
Cromo Total	Cr(mg/l)	1	10.886
Zinc	Zn(mg/l)	5	5.586
Níquel	Ni(mg/l)	0.2	0.804

Fuente: (Acherman, 2007).

Se recolectaron 5 muestras para dar inicio al proceso de aislamiento y selección de microorganismos, JB1 y JB2 fueron tomados de la corriente de agua la cual va sentido occidente oriente, y las muestras JB3, JB4 y JB5 se tomaron en el agua estancada que se encontraba en la parte baja de la rampa de acceso al canal.



Figura 2. Recolección de Muestras Jaboque

➤ ***Embalse del Muña***

Las muestras se tomaron el 30 de septiembre de 2016, a las 2:05 pm, en la vereda San Benito, en el municipio de Sibaté, Cundinamarca, específicamente en las coordenadas geográficas 4.508546, -74.246432.

Tabla 7. Características Climáticas del Punto de Muestreo EM

Temperatura	Precipitación	Humedad	Vientos
20°C	87%	77%	10 Km/h

Fuente: (El Autor)

La represa estaba altamente contaminada, el espejo de agua era negro, tenía olor característico de materia orgánica en descomposición, no se observó ningún tipo de fauna y la vegetación era mínima. De acuerdo a muestreos realizados por ENGESA E.S.P en diferentes puntos del Embalse, se evidenció que debido a la carga contaminante que recibe, presenta altas concentraciones de nutrientes (fosforo y nitrógeno) que genera procesos de eutrofización, lo cual está directamente asociado al crecimiento de macrófitas y algas que afectan negativamente la calidad del agua (Zapata, 2008).



Figura 3. Embalse del Muña

Por otra parte, el monitoreo de otros parámetros como metales pesados realizados por ENGESA E.S.P, mostró valores por encima de la norma para cromo, plomo y mercurio, restringiendo el uso del agua para consumo humano (Zapata, 2008).

Tabla 8. Resultados Monitoreo de nutrientes y metales en el Embalse del Muña

Parámetro	Afluente	Efluyente	Pablo Neruda	Laguna Aireada	Laguna Macrofitas	Decreto 1594/84
Fosforo Total (mg P/l)	3.79	3.68	4.02	4.24	3.90	N/A
Nitrógeno Kjendahl (mg N/l)	35.9	38.3	38.3	38.9	38.0	N/A
Cromo (VI) (mg Cr/l)	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.05
Plomo (mg Pb/l)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.16	0.05
Arsénico ($\mu\text{g/l}$)	1.5	1.28	1.62	2.13	1.37	5.0
Mercurio ($\mu\text{g/l}$)	2.36	1.14	4.1	4.2	3.34	2.0

Fuente: (Zapata, 2008).

Para iniciar con el proceso de aislamiento y selección de microorganismos se tomaron 5 muestras en la orilla de la zona occidental de la laguna, el agua se encontraba estancada.



Figura 4. Recolección de Muestras Muña

➤ ***Otras muestras***

En otras investigaciones realizadas en el semillero METAMORFO de la Universidad Nacional Abierta y a Distancia, se realizaron muestreos de un manantial termal ubicado en Tabio, Cundinamarca; de aguas residuales de minas ubicadas en Monguí y Paz del Río del departamento de Boyacá; y aguas residuales de dos procesos de una industria metalmecánica ubicada en la zona sur de la ciudad de Bogotá; las muestras fueron

preservadas a temperatura ambiente sin la adición de ningún reactivo, estas muestras también fueron procesadas para realizar el aislamiento de microorganismos potencialmente degradadores de cromo y se tuvieron en cuenta debido a que las investigaciones también se encontraban en desarrollo.

Tabla 9. Descripción de los puntos de muestreo

Tipo de Muestra	Ubicación	Nomenclatura
Agua del Embalse del Muña	Sibaté, Cundinamarca	EM
Agua del Humedal Jaboque	Engativá, Bogotá	JB
Agua de Manantial Termal	Tabio, Cundinamarca	MT
Agua Residual de Mina 1	Monguít, Boyacá	MS
Agua Residual de Mina 2	Paz del Río, Boyacá	MP
Agua Residual Industria Metalmecánica 1	Bogotá, Cundinamarca	MQ1
Agua Residual Industria Metalmecánica 2	Bogotá, Cundinamarca	MQ2

Fuente: El Autor

7.2 Enriquecimiento de cepas

Los cultivos se llevan a cabo sobre sustratos óptimos para el crecimiento bacteriano y están constituidos generalmente por sustancias complejas, las cuales permiten al microorganismo obtener las fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo, potasio, sodio, magnesio y otras sustancias necesarias para su nutrición (Martos et al., 1996).

Para el adecuado desarrollo del microorganismo en el medio de cultivo se requiere garantizar una serie de factores como disponibilidad de nutrientes necesarios, existencia o ausencia de oxígeno, grado de humedad apropiado, valores de pH adecuados, temperatura de incubación precisa y condiciones de esterilidad y aislamiento óptimas (Martos et al., 1996).

Es por lo anterior que para el aislamiento de microorganismos con capacidad detoxificadora de cromo se inoculó una alícuota de 5 ml de cada una de las muestras en 50 ml de medio líquido LB suplementado con 80 mg/L de cromo hexavalente, los cuales fueron incubados a 37°C por 5 días.



Figura 5. Medios Inoculados con las muestras

Después del periodo de incubación, se evidenció crecimiento de biomasa bacteriana en los medios inoculados con las muestras JB1 y JB2 provenientes del Humedal Jaboque, EM1 y EM2 provenientes del Embalse del Muña y MT provenientes del Manantial Termal; las otras muestras provenientes de las industrias metalúrgicas de Bogotá y de las Minas de Boyacá solo mostraron formación de masa bacteriana después de 20 días de haberse inoculado el medio, probablemente debido a que las condiciones extremas de las muestras no permitían el desarrollo de los organismos.

En los medios inoculados con las muestras JB1 y JB2, después del periodo de incubación, se evidencio al microscopio una presencia mínima de microorganismos, principalmente de tipo bacilar. En los medios EM1 y MT se observó gran cantidad de microorganismos, con presencia tanto de tipo bacilar como de cocos, mientras que en EM2 se observaron muy pocos microorganismos, principalmente bacilos; finalmente de las muestras de la industria metalúrgica MQ2-3 se evidenció crecimiento de gran cantidad de microorganismos, principalmente cocos y de las muestras de las minas MS1 presento presencia de microorganismos tanto de tipo bacilar como cocos.

De otra parte, las otras muestras provenientes de la industria metalmecánica MQ1-1, MQ1-2 y MQ2-8 y las provenientes de las minas de Boyacá MP2 no presentaron crecimiento o presentaron un crecimiento muy lento.

7.3 Aislamiento y caracterización de cepas

➤ *Aislamiento*

A partir de los medios que presentaron crecimiento microbiano se realizaron los aislamientos en medio sólido LB suplementado con 80 mg/L de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) haciendo repiques continuos hasta obtener colonias puras, en la Tabla 10 se relaciona el número de colonias encontradas en cada una de las cepas:

Tabla 10. Número de Colonias Aisladas por Cepa

Cepa	Número de Colonias Aisladas
EM1	3
EM2	2
JB1	2
JB2	3
MT	2
MS	2
MP	2
MQ1-1	No presento crecimiento
MQ1-2	2
MQ2-3	2
MQ2-8	No presento crecimiento

Fuente: El Autor

➤ **Morfología**

La descripción morfológica de las cepas se encuentra en la Tabla 11, comprende la descripción tanto macroscópica como microscópica de cada una de las colonias aisladas, así como los resultados obtenidos en la Tinción de Gram. Como se puede observar, en la figura 6, la morfología de algunas de las cepas es muy parecida o casi idéntica. En casos donde la morfología macroscópica era idéntica, y donde la cepa aislada provenía de la misma muestra, se asumió que se trataba del mismo microorganismo, con la finalidad de ir reduciendo el número de colonias para aplicar análisis de remoción. Se evidenció que de las 12 cepas que quedaron en total, la mayoría son bacilos gram negativos con excepción de dos de las cepas EM (EM1-1 y EM2-1) y las cepas MQ1-2, y que muchas de ellas no presentaron movilidad a excepción de la cepa JB que todas son móviles.

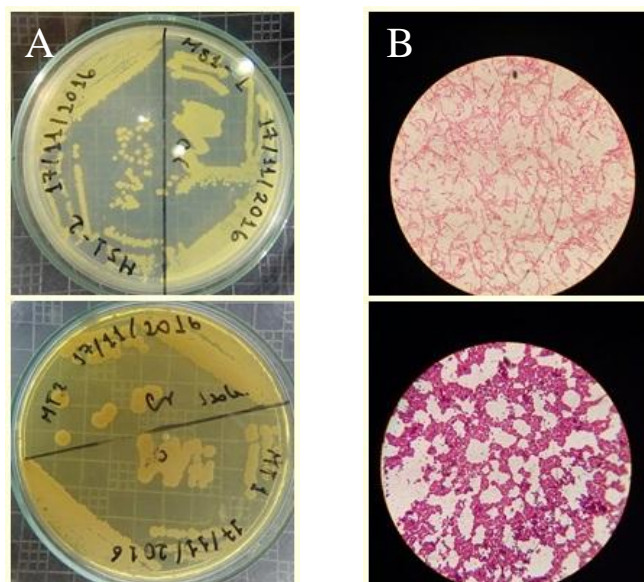


Figura 6. Morfología de las cepas: A. Vista macroscópica de las cepas,

B. Vista microscópica de las cepas.

Tabla 11. Caracterización morfológica de las colonias aisladas

Cepa	Colonia	Morfología Colonia	Morfología Celular	Coloración Gram
EM1	EM1-1	Tiene forma circular elevada, de margen ondulado y color amarillo oscuro, con un diámetro aproximado de 1,5 mm.	Son bacilos largos, gruesos, que forman cadenas, no móviles.	Gram positivo
	EM1-2	Tiene forma puntiforme convexa, de margen entero y color blanco, con diámetro aproximado de 0,2 mm.	Son bacilos delgados, largos, que forman enramadas, no móviles.	Gram negativos
	EM1-3	Tiene forma irregular plana, de margen lobulado y color amarillo, con diámetro de 3 mm.	Son bacilos delgados, largos, que forman enramadas, no móviles.	Gram negativos
EM2	EM2-1	Tiene forma rizoide convexa, de margen lobulado color amarillo brillante, con diámetro 0,1 a 2 mm.	Son bacilos pequeños, delgados, forman cadenas, no móviles.	Gram positivo
	EM2-2	Tiene forma irregular umbonada, de margen ondulado, color blanco, con diámetro de 4 mm.	Son bacilos delgados, de diferentes tamaños, predominan los cortos, forman cadenas, no móviles.	Gram negativos
JB1	JB1-1	Tiene forma irregular elevada, de margen ondulado, color anaranjado, con diámetro de 1 a 8 mm.	Son bacilos delgados, largos, algunos forman cadenas en L, son móviles.	Gram negativos

	JB1-2	Tiene forma irregular plana, de margen lobulado, color amarillo, con diámetro de 0,1 a 2 mm.	Son bacilos delgados, largos, algunos forman cadenas en L, son móviles.	Gram negativos
	JB2-1	Tiene forma circular elevada, de margen entero, color amarillo oscuro que brilla a la luz, con diámetro aproximado de 1 mm.	Son bacilos delgados, largos, forman cadenas, son móviles.	Gram negativos
JB2	JB2-2	Tiene forma irregular elevada, de margen ondulado, color blanco, con diámetro aproximado de 2 mm.	Son bacilos delgados, largos, forman cadenas, son móviles.	Gram negativos
	JB2-3	Tiene forma irregular plana, de margen ondulado, color blanco con diámetro aproximado de 2 mm.	Son bacilos delgados, largos, forman cadenas, son móviles.	Gram negativos
MT	MT1	Tiene forma puntiforme convexa, de margen entero, color blanco brillante, con diámetro aproximado de 0,2 mm.	Son bacilos cortos, hacen esporas, forman cadenas, son móviles.	Gram negativos
	MT2	Tiene forma irregular plana, de margen ondulado, color blanco, con diámetro aproximado de 0,2 mm.	Son bacilos cortos, hacen esporas, forman cadenas, son móviles.	Gram negativos

2	MQ1- 2-1	Tiene forma circular pulvinada, de margen entero y color blanco, con diámetro aproximado de 1 mm.	Son cocos pequeños forman colonias, no móviles.	Gram positivo
	MQ1- 2-2	Tiene forma circular pulvinada, de margen ondulado y color amarillo, con diámetro aproximado de 1,8 mm.	Son cocos pequeños forman colonias, no móviles.	Gram positivo
3	MQ2- 3-1	Tiene forma puntiforme elevada, de margen entero, color blanco brillante y diámetro aproximado de 0,1 mm.	Son bacilos delgados, cortos, forman cadenas, hay presencia de esporas, no móviles.	Gram negativos
	MQ2- 3-2	Tiene forma puntiforme plana, de margen entero, color blanco, con diámetro de 0,3 mm.	Son bacilos delgados, cortos, forman cadenas, hay presencia de esporas, no móviles.	Gram negativos
MS1	MS1-1	Tiene forma puntiforme convexa, de margen entero, de color amarillo brillante, con diámetro de 0,2 mm.	Son bacilos cortos, pequeños, forman cadenas, no móviles.	Gram positivo
	MS1-2	Tiene forma puntiforme plana, de margen entero, color amarillo brillante, con diámetro aproximado de 0,1 mm.	Son bacilos cortos, pequeños, forman cadenas, no móviles.	Gram positivo
MP2	MP2-1	Tiene forma puntiforme elevada, de margen entero, color blanco, brilla a la luz, con diámetro	Son bacilos cortos, pequeños, forman cadena, con poca movilidad.	Gram negativos

de 0,1 mm.

MP2-2	Tiene forma puntiforme elevada, de margen entero color amarillo opaco, con diámetro de 0,1 mm.	Esta cepa desde el principio del ensayo presento poca resistencia al cromo, por lo que con el tiempo no volvió a evidenciar crecimiento y fue imposible realizar el estudio microscópico.
-------	--	---

Fuente: El Autor

Luego de realizarse los análisis morfológicos, cada una de las cepas se inocularon en medio líquido LB suplementado con 140 mg/L de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) y se dejaron en incubadora a $37^\circ C$ por una semana, con el fin de asegurar que las colonias aisladas presentaran resistencia a altas concentraciones de cromo.

El ensayo dio como resultado que de las 12 cepas inoculadas solo 10 de ellas dieron resultado positivo para la concentración evaluada, éstas fueron EM1-1, EM1-2 y 3, EM2-2, JB1-1 y 2, JB2-1, MT1 y 2, MQ1-2-1 y 2, MQ2-3-1 y 2, MS1-2 y MP2-1; las otras dos cepas EM2-1 y JB2-3 no resistieron la concentración tan elevada del cromo.

7.4 Curva de crecimiento

Para determinar los microorganismos con mejor índice de crecimiento, las 10 cepas aisladas EM1-1, EM1-2 y 3, EM2-2, JB1-1 y 2, JB2-1, MT1 y 2, MQ1-2-1 y 2, MQ2-3-1 y 2, MS1-2 y MP2-1 fueron evaluadas en dos grupos mediante una curva de crecimiento, la cual se construyó por medio de un análisis de densidad óptica, por medio de un espectrofotómetro marca RIGOL Ultra – 3660, estableciendo cuáles de ellas presentaban una mayor velocidad de específica crecimiento (μ_{max}^{-1}).

Para analizar los resultados se tuvo en cuenta la correlación lineal entre el tiempo que permanecieron las cepas en incubadora observando su crecimiento en fase exponencial y la densidad óptica del espectrofotómetro a 610 nm; de acuerdo a la Figura 7, el crecimiento microbiano fue proporcional a la turbidez del medio, en el eje horizontal muestra el tiempo de cultivo transcurrido en horas y el vertical la densidad óptica medida por el espectrofotómetro, a simple vista parece existir una relación entre ambas variables, conforme aumenta el tiempo, mayor es la turbidez del medio.

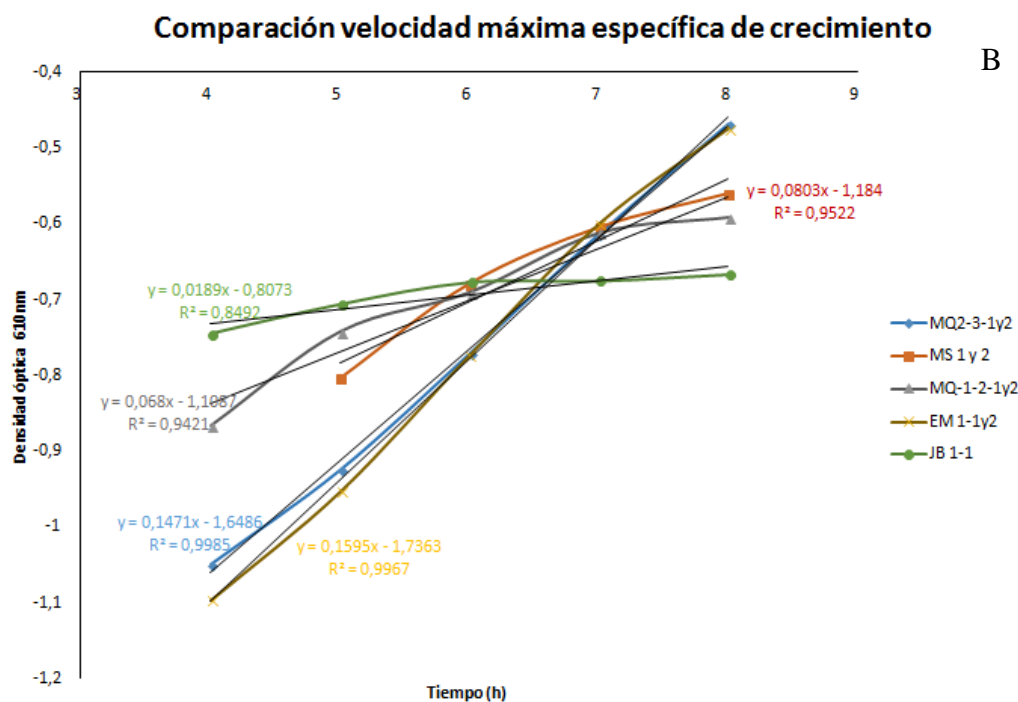
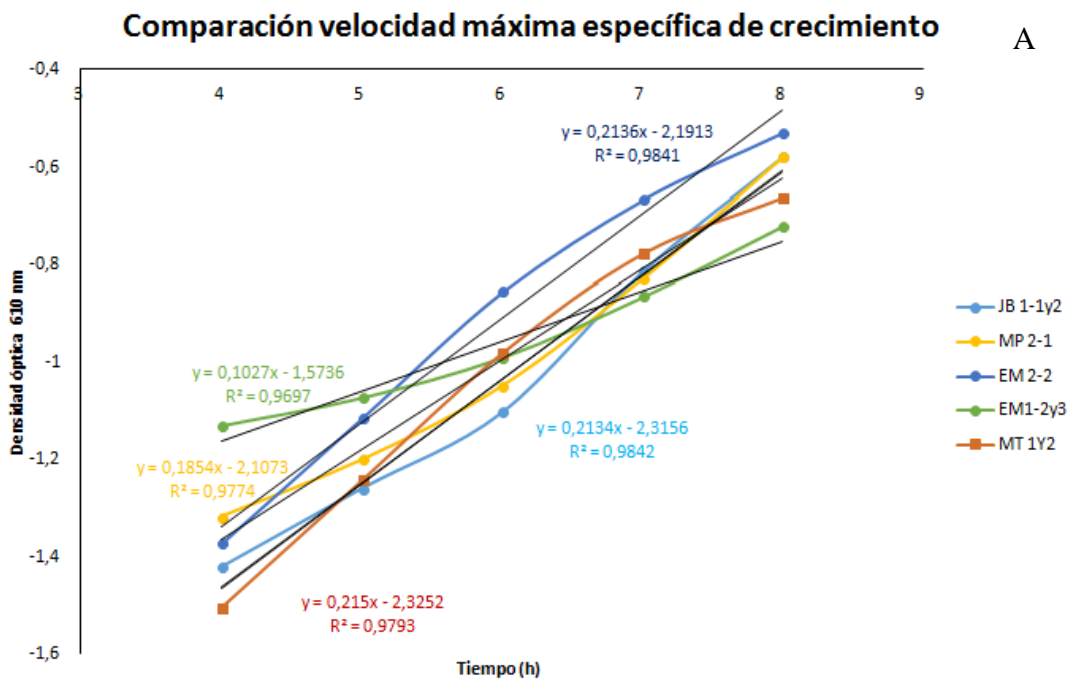


Figura 7. Comparación Velocidad Máxima Específica de Crecimiento: A. Grupo 1 evaluado,

B. Grupo 2 Evaluado.

Para analizar el comportamiento de la relación de los datos, se debe tener en cuenta la ecuación de la recta $y_i = B_1X_i + B_0$, donde y_i es la densidad óptica, B_1 es la pendiente de la recta, X_i el tiempo transcurrido en horas y B_0 es el punto donde la recta corta el eje vertical, que corresponde al número medio de absorbancia que corresponde a un tiempo 0.

Se puede observar que en general la recta hace un buen seguimiento de los datos; la fórmula de la recta aparece al lado de la gráfica de cada una de las cepas evaluadas en la Figura 7, la pendiente de la curva indica la velocidad máxima específica de crecimiento de cada una de las cepas la cual se encuentra resumida en la Tabla 12 y el grado de fidelidad con que la recta describe la relación existente entre los datos está dada por el coeficiente de determinación R^2 , el cual en la mayoría de las cepas está por encima del 98%.

Tabla 12. Velocidad Máxima de Crecimiento de las Cepas

Cepa	μ (Max) h^{-1}
JB 1-1y2	0,2134
MP 2-1	0,1854
EM 2-2	0,2136
EM1-2y3	0,1027
MT 1Y2	0,215
MQ2-3-1y2	0,1471
MS 1 y 2	0,0803
MQ-1-2-1y2	0,068
EM 1-1y2	0,1595
JB 1-1	0,0189

Fuente: El Autor

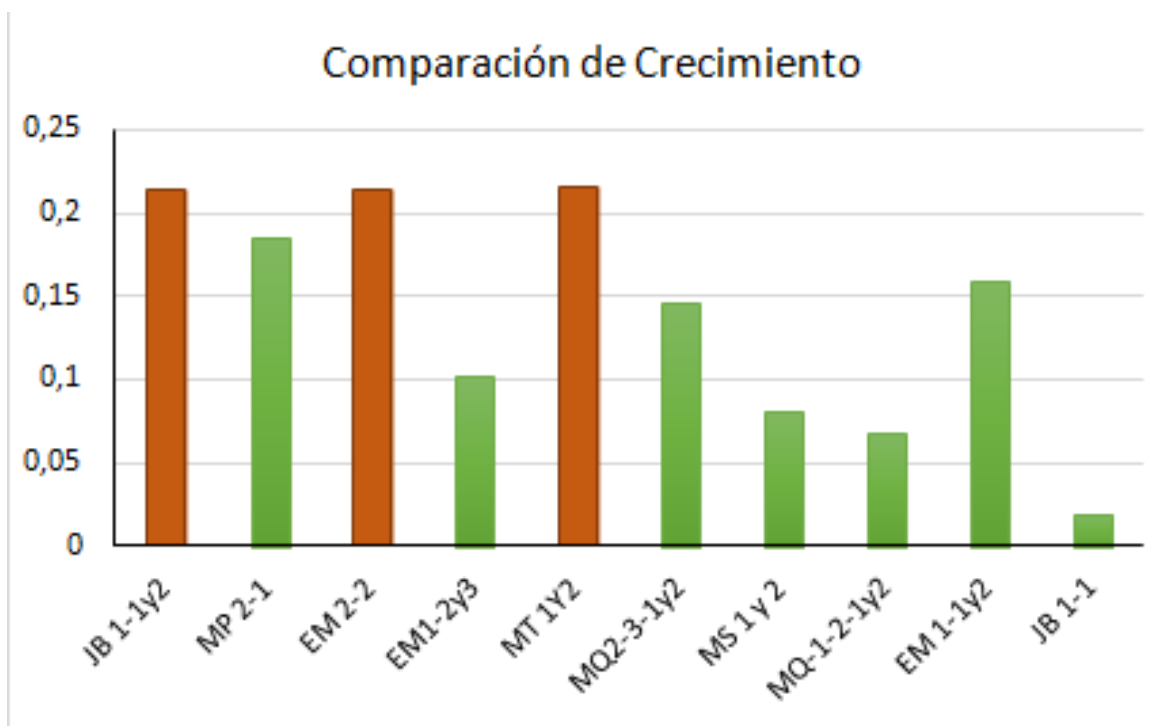


Figura 8. Comparación Velocidad Máxima Específica de Crecimiento de las cepas

De acuerdo a los datos obtenidos se eligieron las 3 cepas que presentaron una mayor velocidad máxima específica de crecimiento JB1-1 y 2, EM2-2 y MT1 y 2 con respecto a las otras (Figura 8) para iniciar con las pruebas de determinación de detoxificación de cromo, pues se espera que estas sean las que presenten un mayor porcentaje de detoxificación ya que tras la consulta realizada, se encontró que la degradación de cromo está relacionada con la producción de biomasa y su capacidad de biosorción, en donde mayores velocidades de crecimiento pueden conllevar a mayores tasas de descontaminación de cromo (Mishra, et al., 2013), (Carlos, et al., 2016), (Narayani, M., 2012), (Pradhan, et al., 2017).

7.5 Determinación de la capacidad de detoxificación de cromo de las cepas aisladas

7.5.1 Curva de calibración



Figura 9. Análisis colorimétrico curva de calibración

Se realizó una curva de calibración teniendo en cuenta lo establecido por Díaz de Santos, Siaka & Owens (2001) para la determinación de cromo hexavalente por método colorimétrico en espectrofotómetro a 540 nm, en este ensayo se midieron 6 concentraciones de Cr^{+6} (de 6 μl a 40 μl), las cuales permitieron establecer el rango de absorbancia comprendido de 0 a 0,2 mg/L, la variación de color permitió determinar que la absorbancia mínima es aproximadamente 0,0241 y la máxima 0,1286, tal como lo muestra la Figura 10.

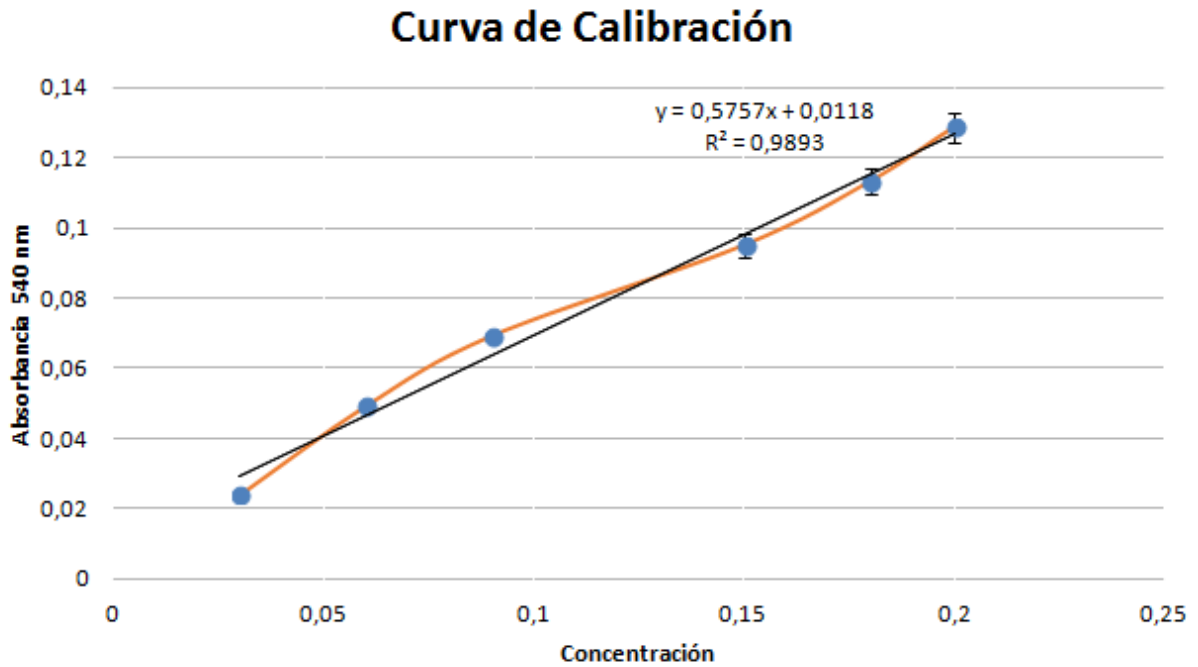


Figura 10. Curva de Calibración

7.5.2 Determinación de cromo hexavalente en muestras

Se prepararon tres controles abióticos (sin inoculo) en 50 ml de medio LB suplementado con una concentración de 30 mg/L de cromo hexavalente (Cr^{+6}). El control 1 se dejó en nevera a 4°C y los controles 2 y 3 se dejaron en incubadora a 37°C , esto con el propósito de determinar si el medio LB y la temperatura afectaba el comportamiento del cromo en el medio.

Posteriormente se inocularon 50 ml de medio LB con 5 ml de inóculo de las cepas JB1-1 y 2, EM2-2 y MT1 y 2 suplementado con una concentración de 30 mg/L de cromo hexavalente (Cr^{+6}), cada una por triplicado. Se colocaron en incubadora por 8 horas a

37°C, se realizó muestreo de cada una cada 2 horas, y la concentración de cromo Cr^{+6} se determinó por el método colorimétrico con difenilcarbazida en el espectrofotómetro (RIGOL Ultra – 3660) a 540 nm con celdas de 5 cm de paso óptico. En la figura 11 se muestran los resultados de la cuantificación de la concentración de cromo a través de las 8 horas que duró el ensayo.

Se logró determinar que en los tres cultivos analizados se presentó la disminución de la concentración de cromo, JB1-1 y 2 presentó una eficiencia de remoción del 76,3%, EM2-2 presentó un 60,2% y MT1 y 2 presentó un 49,8%. Se puede apreciar que JB1-1 y 2 mostró una mayor eficiencia con respecto a las otras dos cepas evaluadas.

Si se tiene en cuenta otros estudios reportados en la literatura, JB1-1 y 2 presentó una alta eficiencia de remoción. En una revisión bibliográfica elaborada por Pradhan, et al., 2017, se encontró que los porcentajes de degradación obtenidos en diversas investigaciones exitosas al detoxificar cromo (VI), se encuentran en un rango entre el 70 y el 100% de eficiencia de eliminación. En esta investigación se encontraron porcentajes de degradación 76%, 60% y 49% para las cepas analizadas JB1-2, MT1-2 y EM 2-2 respectivamente, resultado que no es despreciable y que se puede comparar con otras investigaciones internacionales.

Panigatti, et al. 2007, en su estudio “Bioremediación de efluentes con cromo (VI) provenientes de industrias metalmeccánicas” muestra que la bacteria *E. coli* tuvo una

eficiencia de remoción de 77,8% de cromo (VI) a una concentración de 25 mg/L, resultado muy similar al arrojado por JB1-1 y 2 a 30 mg/L.

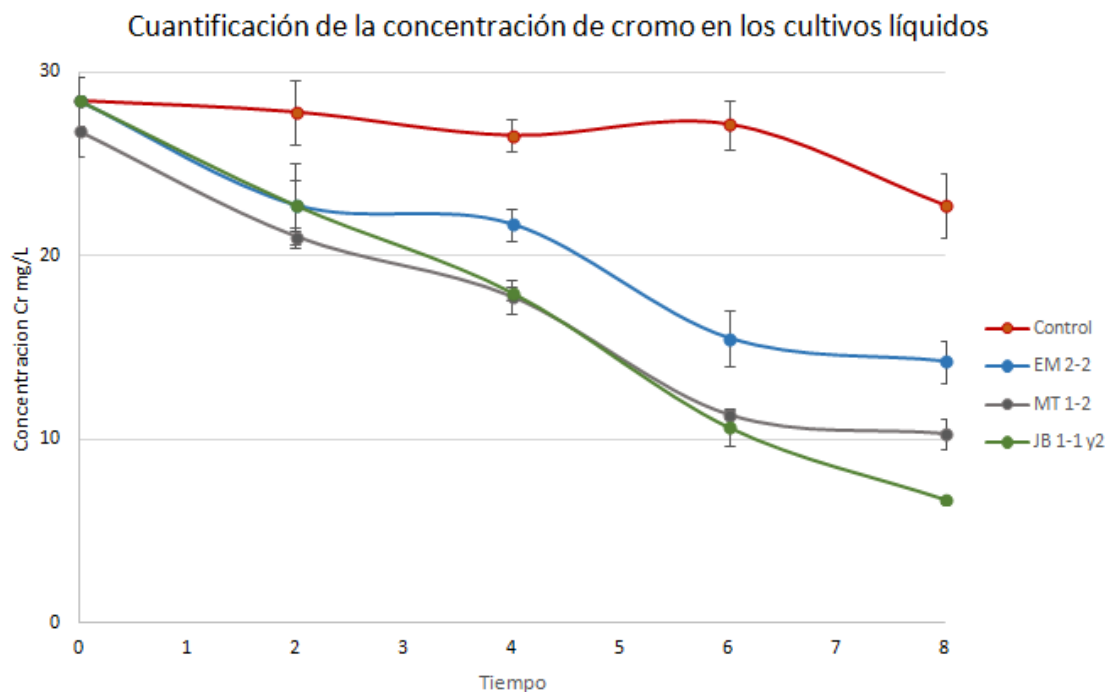


Figura 11. Concentración de cromo

Con respecto al resultado observado, se puede afirmar que la presencia de microorganismos en el medio acelera la reducción de cromo (VI) con respecto al control abiótico, pero también se observa que el control entre la hora 6 y la hora 8 presentó una disminución de la concentración de cromo, esto pudo estar asociado probablemente a los componentes del medio de cultivo, según Murugavelh, S. & Mohanty, K. (2013), el extracto de levadura presente en LB participa en la reducción de cromo (VI) gracias al aporte de aminoácidos libres, los cuales han actuado como

donadores de electrones para la reducción de cromo hexavalente en ensayos realizados previamente con algunas bacterias.

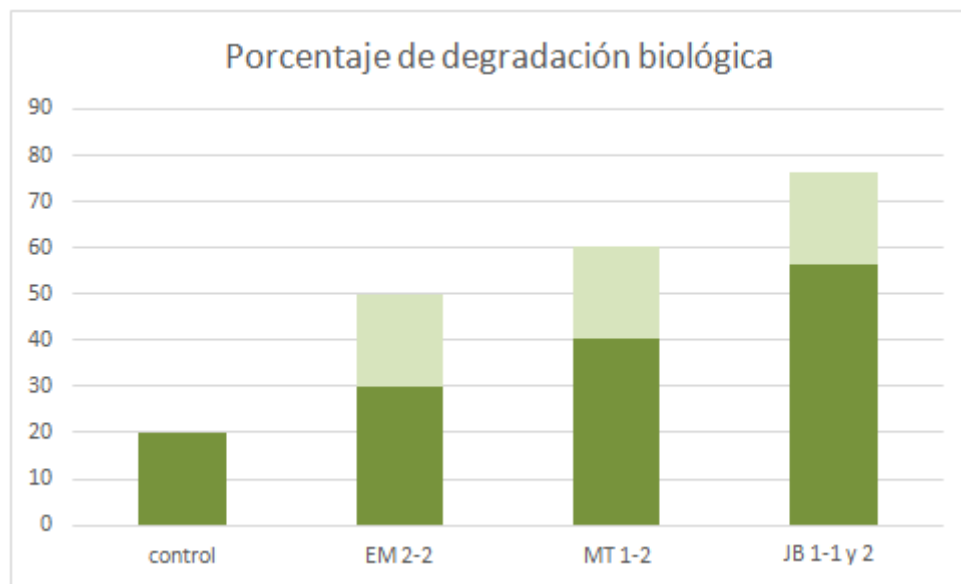


Figura 12. Porcentaje de degradación biológica

Con el fin de tener en cuenta solo la disminución del cromo relacionada a los tratamientos biológicos, se hizo la diferencia entre el porcentaje de cada cepa y el porcentaje obtenido en el control abiótico. En la figura 12 se puede observar que los porcentajes de degradación exclusivamente biológica son de 56,4% para JB1-1 y 2, 40,3% para MT1 y 2 y de 29,9% para EM2-2.

Para analizar si se presentaban diferencias significativas entre los tratamientos JB1-1 y 2, EM2-2 y MT1 y 2 y el control, se determinó el área bajo la curva de degradación de cada una de las réplicas de los tratamientos aplicados, al igual que en las de los controles

y se aplicó un análisis de varianza simple ANOVA one way, comparando las medias entre los tratamientos y entre los tratamientos y el control. El intervalo de confianza utilizado fue de un 95%. (Figura 13)

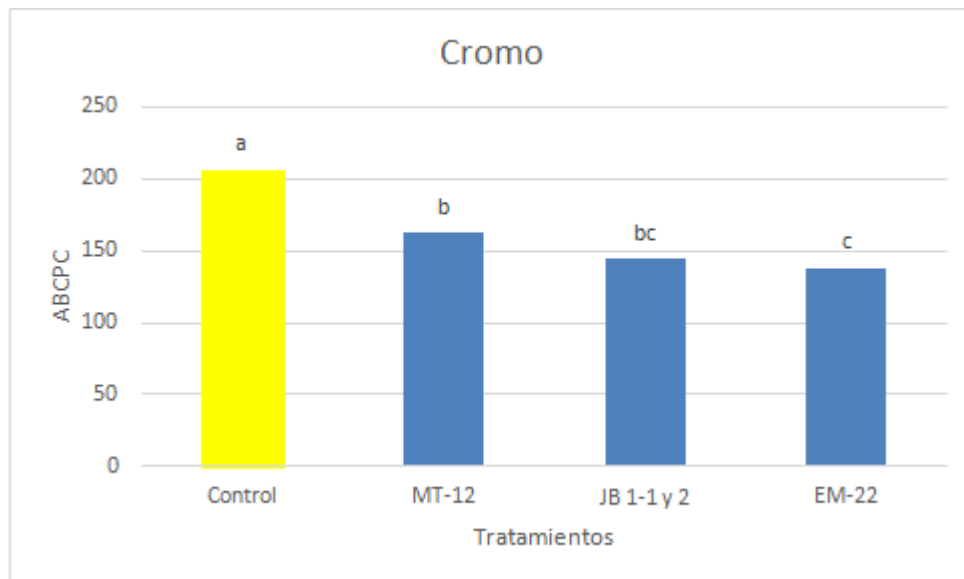


Figura 13. Área bajo la curva para fijación de cromo

De acuerdo al análisis realizado, los tratamientos con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo a la prueba DMS (diferencia mínima significativa $\alpha=0,005$). Como se observa en la figura 11, todos los tratamientos, es decir, las cepas analizadas, presentan diferencias significativas con el control abiótico a un intervalo de confianza del 95%. Esto indica que los tratamientos biológicos aplicados si tienen un efecto estadísticamente apreciable frente a la disminución de la concentración de cromo.

Al comparar las medias entre los tratamientos no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos JB y MT al igual que entre los tratamientos JB y EM.

Al observar la muestra de origen de los aislamientos, se encontró que las cepas provienen de las muestras tomadas del humedal Jaboque (JB); del embalse de muña (EM) y del manantial termal (MT). Es probable que la mayor eficiencia en la descontaminación de cromo en el medio presentada en el tratamiento con la cepa JB 1-1 se deba a que la misma tuvo contacto con el contaminante, ya que como se mostró en el ítem 7.1 información punto de muestreo, en un análisis desarrollado por Acherman en 2007, tuvo como resultado la presencia de cromo a una concentración de 10,88 mg/L.

El genoma de cada organismo contiene no solo información para su funcionamiento, sino también el potencial para adaptarse a las condiciones ambientales, por medio del proceso de evolución. Los microorganismos por poseer tiempos muy cortos de duplicación, logran realizar estas adaptaciones en poco tiempo (Sauer, 2001). Así, la muestra tomada del humedal Jaboque probablemente presentó condiciones para estimular la adaptación de la cepa JB1-1, permitiendo que en condiciones de laboratorio presentara los porcentajes de degradación obtenidos en este trabajo.

8. Conclusiones

Como estrategia para aislar microorganismos con capacidad detoxificadora de cromo (VI) se empleo un medio LB suplementado con una sal de cromo la cual permitió el adecuado crecimiento y aislamiento inicial de 20 cepas que presentaban resistencia a la presencia de cromo en el medio. Por medio de la presión selectiva y de los análisis morfológicos se logró disminuir este número a 10 cepas resistentes y morfológicamente diferentes.

De las 10 cepas a las que se les evaluó el crecimiento, se evidencio que EM2-2, JB1-1 y 2 y MT 1 y 2, presentaron una velocidad máxima específica de crecimiento mayor en comparación con las otras cepas evaluadas, lo que permitió seleccionarlas para las pruebas de determinación de reducción de cromo (VI).

La curva de calibración permitió establecer que el rango de absorbancia del método colorimétrico estaba entre 0,0241 y 0,1286, por lo que se decidió medir la determinación de reducción de cromo a una concentración de 30 mg/L, a esta concentración se obtuvieron porcentajes de remoción real a 10 horas de 56,4% para JB1-1 y 2, 40,3% para EM2-2 y de 29,9% para MT1 y 2.

Los resultados obtenidos demuestran que la cepa JB1-1 y 2 es un microorganismo promisorio para el tratamiento de efluentes con altos contenidos de cromo (VI).

9. Recomendaciones

Se espera que a futuro se puedan realizar estudios morfológicos específicos de las tres cepas evaluadas en la determinación de la reducción de cromo, con la finalidad de conocer el género y la especie a la que pertenecen.

También se recomienda hacer pruebas moleculares que permitan comprobar lo que está sucediendo en la degradación, para así poder determinar qué tipo de estrategia de descontaminación está empleando el microorganismo (Biosorción, bioacumulación, etc.).

Por otra parte, se recomienda emplear otros medios de cultivo como estrategia de aislamiento, esto con la finalidad de observar el comportamiento de las tres cepas evaluadas para ver si se presenta una mayor reducción de cromo (VI) con respecto a la presentada en medio LB.

Lista de referencias

- Acherman, J. (2007). *Análisis del Estado de Alteración y Contaminación del Humedal Jaboque*. Recuperado de:
https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjokfKj36HPAhULez4KHYylCr0QFggpMAI&url=http://oab.ambientebogota.gov.co/apc-aa-files/57c59a889ca266ee6533c26f970cb14a/alteracion_jaboque.pdf&usg=AFQjCNErZCfO7FT4UvD0x
- ADESSA. (2006). Plan De Manejo Ambiental Humedal Jaboque. *Acueducto*, (9). Recuperado de:
<http://ambientebogota.gov.co/documents/10157/2316609/Diagnóstico+PMA+Humedal+Jaboque+06-13.pdf>
- Agency, U. S. E. P., & Office. (2001). Public Data Release Report Public Access to the Toxics Release Inventory (TRI), 30. Recuperado de:
https://www.epa.gov/sites/production/files/documents/2001_national_analysis_executive_summary.pdf
- American Public Health Association, American Water Works Association, & Water Environment Federation. (1999). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater Standard, (1). Recuperado de:
http://www.efn.unc.edu.ar/otros/bibliocentro/index_archivos/LS44.pdf
- American Public Health Association. (1992). Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. *Madrid, Spain: Daz de Santos. Birch, G., Siaka, M., & Owens, C.(2001). The source of anthropogenic heavy metals in fluvial sediments of a rural catchment: Coxs River, Australia. Water, Air, and Soil Pollution, 126, 1335.*
- Arauzo, M., Rivera, M., Valladolid, M., Noreña, C., & Cedenilla, O. (2003). Contaminación por cromo en el agua intersticial, en el agua del cauce y en los sedimentos del río Jarama. *limnetica*, 22(3-4), 85-98. Recuperado de: http://limnetica.com/fulltext/Limnetica_22v3-4_2003.pdf#page=94
- Artuz, L. A., Martínez, M. S., & Morales, C. J. (2011). Las Industrias Curtiembres Y Su Incidencia En La Contaminación Del Río Bogotá. *ISOCUANTA*, 1(1). Recuperado de:
<http://revistas.usantotomas.edu.co/index.php/isocuanta/article/view/1387/1582>
- Bayona, A. (2007). *Contaminacion Por Metales Pesados En El Embalse Del Muña Y Su Relacion Con Los Niveles En Sangre De Plomo, Mercurio Y Cadmio Y Alteraciones De Salud En Los Habitantes Del Municipio De Sibaté (Cundinamarca) 2007*. Recuperado

de: <http://www.bdigital.unal.edu.co/2341/1/597588.2009.pdf>

Beltrán-Pineda, M. E., & Gómez-Rodríguez, A. M. (2016). Biorremediación de Metales Pesados Cadmio (Cd), Cromo (Cr) y Mercurio (Hg), Mecanismos Bioquímicos e Ingeniería Genética: Una Revisión. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 12(2), 172–197. Recuperado de: <http://doi.org/10.18359/RFCB.2027>

Benazir, J. F., Suganthi, R., Rajvel, D., Pooja, M. P., & Mathithumilan, B. (2010). Bioremediation of chromium in tannery effluent by microbial consortia. *African journal of biotechnology*, 9(21), 3140-3143. Recuperado de: <https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/80576>

BENITEZ-CAMPO, N. E. Y. L. A. (2013). Producción limpia y biorremediación para disminución de la contaminación por cromo en la industria de curtiembres. *Ambiente y sostenibilidad*, 1(1), 25-31. Recuperado de: <http://revistaingenieria.univalle.edu.co/index.php/ays/article/view/4335/6555>

Bolan, N., Kunhikrishnan, A., Thangarajan, R., Kumpiene, J., Park, J., Makino, T., & Scheckel, K. (2014). Remediation of heavy metal (loid) s contaminated soils—to mobilize or to immobilize?. *Journal of Hazardous Materials*, 266, 141-166. Recuperado de: https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/41140288/2014_Bolanetal_JHM.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1508633959&Signature=JOiW2k4IwGE4CKqDHYJ2Q5fmpXk%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DRemediation_of_Heavy_Metal_loid_s_Contam.pdf

Boyd, R. S. (2010). Heavy metal pollutants and chemical ecology: Exploring new frontiers. *Journal of Chemical Ecology*, 36(1), 46–58. Recuperado de: <http://doi.org/10.1007/s10886-009-9730-5>

Campbell, C. L., & Maddem, L. V. (1990). Temporal Analysis of Epidemic I, Description and Comparison of Disease Progress Curves. En C. L. Campbell, & L. V. Maddem, *Introduccion to Plant Disease Epidemiology* (págs. 161-202). John Wiley & Son, Inc. Recuperado el 4 de Agosto de 2015

Canavos, G. C. (1988). *Probabilidad y estadística: aplicaciones y métodos* (No. 519.2 C3P7 QA273). Recuperado de: <https://estadisticaunicaes.files.wordpress.com/2012/05/george-canavos-probabilidad-y-estadistica-aplicaciones-y-mc3a9todos.pdf>

Cañizares, R. O. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 42(3), 131–143. Recuperado de: <http://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.02.024>

Carlos, F. S., Giovanella, P., Bavaresco, J., de Souza Borges, C., & de Oliveira Camargo, F. A.

(2016). A comparison of microbial bioaugmentation and biostimulation for hexavalent chromium removal from wastewater. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227(6), 175.
Recuperado de: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11270-016-2872-5>

Carlos, G., & Ignacio, L. (2005). Manual práctico de Microbiología. *Exposición Barcelona-España. 3ra Edición. Editorial MASSON SA Año*, 195-208. Recuperado de: <https://books.google.com.co/books?id=MfW3TuHL4gC&printsec=frontcover&dq=Medios+de+cultivo&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwjLp8X55oDZAhXCxFkKHXYUAfoQ6AEIKzAB#v=onepage&q=Medios%20de%20cultivo&f=false>

Cerra, H., Fernández, M. C., Horak, C., Lagomarsino, M., Torno, G., & Zarankin, E. (2013). Manual de Microbiología aplicada a las Industrias Farmacéutica, Cosmética y de Productos Médicos. Recuperado de: <http://www.aam.org.ar/download-archivos/manual-microbiologia-aplicada.pdf>

Chávez Porras, Á. (2010). Descripción de la nocividad del cromo proveniente de la industria curtiembre y de las posibles formas de removerlo. *Revista Ingenierías Universidad de Medellín*, 9(17). Recueprado de: <http://www.redalyc.org/html/750/75017164003/>

Clinica universidad de Navarra. (2015). Definición Citotóxico. Recuperado de: <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/citotoxico>

Cobos, O. F. H., Hernández, H. E., & Laverde, D. (2005). Reducción del cromo contenido en efluentes líquidos de la industria del cuero, mediante un proceso adsorción – desorción con algas marinas. *Scientia et Technica*, 3(29), 115–120. Recuperado de: <http://200.21.217.140/index.php/revistaciencia/article/view/6631>

Collazos, A. M., & Montaña, E. B. (2017). CON POTENCIAL PARA REDUCIR CROMO HEXAVALENTE Isolation of Electrogenic Microorganisms with Potential to Reduce Hexavalent Chromium, 22(Vi), 27–36. Recuperado de: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-548X2017000100003

Colmenares, H., & Torres, V. (2012). *Evaluación de Contaminación en Agua, Suelo y Sedimentos, Asociada a Plomo y Cadmio en la Subcuenca Embalse del Muña. Río Bogotá*. Recuperado de: <http://repository.lasalle.edu.co/bitstream/handle/10185/17165/T41.12C711e.pdf?sequence=1>

Crespo-López, M. E., Herculano, a. M., Corvelo, T. C., & Do Nascimento, J. L. (2005). Mercurio y neurotoxicidad. *Revista de Neurologia*, 40(7), 441–447. Recuperado de: https://www.researchgate.net/profile/Maria_Crespo-Lopez/publication/7887504_Mercury_and_neurotoxicity_Mercurio_y_neurotoxicidad/links/00b7d51e326ed40181000000/Mercury-and-neurotoxicity-Mercurio-y-

[neurotoxicidad.pdf](#)

Cuberos, E., Rodríguez, A. I., & Prieto, E. (2009). Niveles de Cromo y Alteraciones de Salud en una Población Expuesta a las Actividades de Curtiembres en Bogotá, Colombia. *Revista de Salud Pública*, 11(2), 278–289. Recuperado de: <http://doi.org/10.1590/S0124-00642009000200012>

Dourojeanni, A., & Jouravlev, A. (1999). Gestión de cuencas y ríos vinculados con centros urbanos. Recuperado de:

https://repositorio.cepal.org/bitstream/handle/11362/31384/1/S99120968_es.pdf

Duruibe, J. O., Ogwuegbu, C., & Egwurugwu, Y. (2007). Contaminación de Metales Pesados y Efectos Biotóxicos Humanos. *International Journal of Physical Sciences*, 2(5), 112–118. Recuperado de:

[http://www.cefce.com.ar/agrupacionamu/publicaciones/documentosvarios/mineria/Contaminacion de Metales Pesados y Efectos Biotoxicos Humanos.pdf](http://www.cefce.com.ar/agrupacionamu/publicaciones/documentosvarios/mineria/Contaminacion%20de%20Metales%20Pesados%20y%20Efectos%20Biotoxicos%20Humanos.pdf)

El Tiempo. (2015). *La minería ilegal tiene infestado el 65 % del país*. Recuperado de:

<https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjex472urDXAhWJ6yYKHUv4DQAQFgguMAE&url=https%3A%2F%2Ftiempo.vlex.com.co%2Fvid%2Fmineria-ilegal-infestado-65-568422842&usg=AOvVaw14wldBbQbkQ0qZm5JifNzv>

Elizabeth Paisio, C., Solange González, P., & Andrea Talano Elizabeth Agostini, M. (2012). Remediación biológica de Mercurio: Recientes avances. *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal*, 3(2), 119–146. Recuperado de:

http://www.solabiaa.org/web/ARCHIVOS/documentos/relbaa/RELBAA_-_V3N2.pdf#page=30

Garboza, F., Frontado, R., Noguera, N., Ávila, H., Ojeda, L., Ramírez, N., & Triana, F. (2011). Uso de medios alternativos a base de hidrolizado de caseína y extracto de *Aspergillus niger* y su efecto sobre la expresión genética de una cepa de *Escherichia coli*. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 31(2). Recuperado de:

http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1315-25562011000200010

García Niño, C. G. (2010). Determinación de mercurio por generación de vapor frío y detección vía absorción y fluorescencia atómica., 1–88. Recuperado de:

<https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjex8W0u7DXAhUB7SYKHfPrDRcQFggoMAA&url=http%3A%2F%2F159.90.80.55%2Ftesis%2F000149413.pdf&usg=AOvVaw2I7Y8eBjFHu7XHnEQ9wVfC>

Greenpeace. (2012). Cueros Tóxicos: Nuevas evidencias de contaminación de curtiembres en la cuenca Matanza – Riachuelo. Recuperado de:

<http://www.greenpeace.org/argentina/Global/argentina/report/2012/contaminacion/Cueros-Toxicos-Riachuelo.pdf>

Guarín, N. (2002). Estadística Aplicada. Universidad Nacional de Colombia, Medellín.

Recuperado de:

http://fcbi.unillanos.edu.co/proyectos/Facultad/php/tutoriales/upload_tutos/Curso%20De%20Estadistica%20Aplicada.pdf

GÜIZA, L. (2013). LA PEQUEÑA MINERÍA EN COLOMBIA: UNA ACTIVIDAD NO TAN PEQUEÑA. *DYNA*, 80(181), 109-117. Recuperado de

<https://revistas.unal.edu.co/index.php/dyna/article/view/35819/45320>

<http://doi.org/10.4067/S0718-07642015000400003>

ICONTEC. (1995). NTC-ISO: 5667-1: Gestión ambiental. Calidad del Agua. Muestreo.

Directrices para el diseño de programas de muestreo., 17. Recuperado de:

<https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&cad=rja&uact=8&ved=0>

<ahUKEwir4PiB2bTVAhXBKCYKHQk7DCYQFgggMAE&url=http%3A%2F%2Ffiles.control-ambiental5.webnode.com.co%2F200000140-e3b67e5121%2FNTC-ISO%25205667-03-2004.%2520Directrices%2520para%2520la%2520preservacion%2520y%2520manejo%2520de%2520muestras.pdf&usg=AFQjCNFo0CIBM0SUMwkaLQ8NbueEGqxQqQ>

Idrovo, A. J., Manotas, L. E., García, G. V., Ortiz, J. E., Silva, E., Romero, S. a., & Azcárate, C. E. (2001). Niveles de mercurio y percepción del riesgo en una población minera aurífera del Guainía (Orinoquía colombiana). *Biomédica*, 11, 134–141. Recuperado de:

<http://doi.org/10.7705/biomedica.v21i2.1101>

Izquierdo, M. (2010). *Eliminación de metales pesados en aguas mediante bioadsorción.*

Evaluación de materiales y modelación del proceso. Recuperado de:

<http://roderic.uv.es/bitstream/handle/10550/23403/izquierdo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Juárez, F. (2016). La minería ilegal en Colombia: un conflicto de narratives. (Spanish). *El Ágora USB*, 16(1), 135-146. Recuperado de:

<http://bibliotecavirtual.unad.edu.co:2139/eds/pdfviewer/pdfviewer?vid=3&sid=ee7fc58f-a3c1-415c-9c7d-4d61e571b919%40sessionmgr120>

Londoño, L. F., Londoño, P. T. & Muñoz, F. G. (2016). Los Riesgos De Los Metales Pesados En La Salud Humana Y Animal. *Bioteconoloía En El Sector Agropecuario Y Agroindustrial*, 14(2), 145. Recuperado de: [http://doi.org/10.18684/BSAA\(14\)145-153](http://doi.org/10.18684/BSAA(14)145-153)

López Ariás, A., Suárez Medina, O. Hoyos, M. & Montes cortés, C. (2013). *Perfil Nacional de Sustancias Químicas en Colombia.* *Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol.

53). Recuperado de: <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>

- López Gonzalez, A. (2002). *LA PREOCUPACIÓN POR LA CALIDAD DEL MEDIO AMBIENTE. UN MODELO COGNITIVO SOBRE LA CONDUCTA ECOLÓGICA*. Madrid: Departamento de Psicología Social CALIDAD DEL MEDIO AMBIENTE, UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID. Recuperado de: <http://pendientedemigracion.ucm.es/BUCM/tesis/psi/ucm-t26479.pdf>
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Barrachina, C., Berlanga, M., Gonzalo, M., Diaz, C., & Ruiz Berraquero, F. (2009). *Brock: Biología de los microorganismos*. Pearson Educación. Recuperado de: <https://es.slideshare.net/Hernanrf/biologa-de-los-microorganismos-brock-10ed>
- Mancera-Rodríguez, N. J., & Álvarez-León, R. (2006). Current state of knowledge of the concentration of mercury and other heavy metals in fresh water fish in Colombia. *Acta Biológica Colombiana*, 11(1), 3–23. Recuperado de: <http://doi.org/doi.org/toc/1900-1649/11/0>
- Marrero-Coto, J., Díaz-Valdivia, A., & Coto-Pérez, O. (2010). Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 41(1), 67–78. Recuperado de: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=53990538&lang=es&site=ehost-live>
- Mart, A. M., & Tecnol, D. (2016). Tratamiento de Aguas. *Centro Para El Desarrollo Tecnológico Industrial*, 1–46. Recueprado de: https://www.cdti.es/recursos/doc/Programas/Cooperacion_internacional/Chineka/Documentacion_relacionada/25520_292920161167.pdf
- Martínez, S. (2005). El cerdo joven como bioindicador de concentraciones bajas de genotóxicos mediante la prueba de micronúcleos en eritrocitos de sangre periférica. *MD Thesis. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad de Colima, México*. Recuperado de: http://digeset.ucol.mx/tesis_posgrado/Pdf/Dr_Sergio_Martinez_Glz.pdf
- Martos, P. G., Del Barrio, M. T. F., & Salido, F. P. (1996). *Microbiología clínica aplicada*. Ediciones Díaz de Santos. Recuperado de: https://books.google.com.co/books?id=O1pigUGRprwC&printsec=frontcover&dq=Microbiolog%C3%ADa&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwidkNW_iLDXAhXGxFQKHUe3Co0Q6AEIRzAG#v=onepage&q=Microbiolog%C3%ADa&f=false
- Mishra, H., & Sahu, H. B. (2013). Environmental scenario of chromite mining at Sukinda Valley—a review. *Int. J. Environ. Eng. Manag*, 4, 287-292. Recuperado de: http://www.ripublication.com/ijeem_spl/ijeemv4n4_03.pdf

- Moreno Torres, A. C., Forero, V., & Eliana, F. (2017). Correlación entre las concentraciones de cromo hexavalente en los sedimentos, las concentraciones de este elemento y de parámetros fisicoquímicos en la columna de agua en puntos del río Tunjuelo impactado por las actividades de curtiembre del barrio San Benito, Bogotá. Recuperado de: <http://repository.usta.edu.co/bitstream/handle/11634/2961/Morenoandrea2016.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Murugavelh, S., & Mohanty, K. (2013). Isolation, identification and characterization of Cr (VI) reducing *Bacillus cereus* from chromium contaminated soil. *Chemical Engineering Journal*, 230, 1-9. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138589471300822X>
- Naciones Unidas. (2005). Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA). Recuperado de: https://books.google.com.co/books?id=WnQ_Cia8YdoC&printsec=frontcover&hl=es#v=onepage&q&f=false
- Narayani, M. (2012). Characteristics of a novel *Acinetobacter* sp. and its kinetics in hexavalent chromium bioreduction. *Journal of microbiology and biotechnology*, 22(5), 690-698. Recuperado de: <http://www.jmb.or.kr/journal/viewJournal.html?doi=JMB022-05-17>
- Netzahuatl-Muñoz, A. R., Pineda-Camacho, G., Barragán-Huerta, B. E., & Cristiani-Urbina, E. (2009). REMOCIÓN DE CROMO HEXAVALENTE Y CROMO TOTAL POR LA CORTEZA DE *Pyrus communis*. (Spanish). *HEXAVALENT AND TOTAL CHROMIUM REMOVAL BY Pyrus Communis BARK*. (*English*), 40(4), 1–10. Recuperado de: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=54307568&lang=es&site=ehost-live>
- Nordberg, G. (2001). Metales: propiedades químicas y toxicidad. In *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo* (p. 76). SEAS. Recuperado de: <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo2/63.pdf>
- Ortiz, I., Sanz, J., & Dorado, M. (2007). Técnicas de Recuperación de Suelos Contaminados, 1–109. Recuperado de: https://www.madrimasd.org/informacionidi/biblioteca/publicacion/doc/VT/vt6_tecnicas_recuperacion_suelos_contaminados.pdf
- Otiniano, M., Tuesta, L., & Robles, H. (2007). Biorremediación de cromo VI de aguas residuales de curtiembres por *Pseudomonas* sp y su efecto sobre el ciclo celular de *Allium cepa*. *Rev. Med. Vallejiana*, 4(1), 32–42. Recuperado de: <http://200.62.146.19/BVRevistas/rmv/v04n1/pdf/a04v4n1.pdf>

- Paisio, C., González, P., Talano, M., & Agostini, E. (2011). *Remediación Biológica de Mercurio: Recientes Avances*. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal* (Vol. 1). Recuperado de:
http://www.solabiaa.org/web/ARCHIVOS/documentos/relbaa/RELBAA_-_V3N2.pdf#page=30
- Panigatti, M. C., Torres, J. M., Griffa, C., Boglione, R., & Gentinetta, F. (2007). Biorremediación de efluentes con cromo (VI) proveniente de plantas metalmeccánicas. *Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: investigación, desarrollo y práctica*, 1(2). Recuperado de:
<http://revistas.unam.mx/index.php/aidis/article/viewFile/13558/12902>
- Pérez, M., & Mota, M. (2010). Morfología y estructura bacteriana. *Revista de Actualización Clínica Investiga*, 49, 1–9. Recuperado de:
<http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/MorfologiayEstructuraBacteriana.pdf>
- PNUMA, P. de L. N. U. P. el M. A.-, & MADS, M. de A. y D. S.-. (2012). Sinopsis Nacional de la Minería Aurífera Artesanal y de Pequeña Escala, (Mc), 1–72. Recuperado de:
http://www.minambiente.gov.co/images/AsuntosAmbientalesySectorialyUrbana/pdf/mercuro/Sinopsis_Nacional_de_la_ASGM.pdf
- Pradhan, D., Sukla, L. B., Sawyer, M., & Rahman, P. K. (2017). Recent bioreduction of hexavalent chromium in wastewater treatment: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 55, 1-20. Recuperado de:
<https://www.cheric.org/research/tech/periodicals/view.php?seq=1567647>
- Prats, G. (2006). *Microbiología clínica*. Ed. Médica Panamericana. Recuperado de:
https://books.google.com.co/books?id=TdsoWPEYaoUC&printsec=frontcover&dq=Microbiolog%C3%ADa&hl=es&sa=X&ved=0ahUKewidkNW_iLDXAhXGxFAQKHUe3Co0Q6AEINjAD#v=onepage&q=Microbiolog%C3%ADa&f=false
- Quiroga Jara, B. D. (2014). *Diseño de una planta de lixiviación de polvos de acería con ácidos orgánicos para recuperación de zinc* (Bachelor's thesis, Quito: EPN, 2014.). Recuperado de: <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/8120/4/CD-5706.pdf>
- Rajendran, P., Muthukrishnan, J., & Gunasekaran, P. (2003). Microbes in heavy metal remediation. *Indian Journal of Experimental Biology*, 41(9), 935–944. Recuperado de:
[http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/17153/1/IJEB%2041\(9\)%20935-944.pdf](http://nopr.niscair.res.in/bitstream/123456789/17153/1/IJEB%2041(9)%20935-944.pdf)
- Ramírez, A. R., & Benítez-Campo, N. (2013). Tolerancia y Reducción de Cromo (Vi) por *Bacillus Cereus* B1, Aislado de Aguas Residuales de una Curtiembre. *Revista de Ciencias*, 17(2), 51-63. Recuperado de:
http://manzanadiscordia.univalle.edu.co/index.php/revista_de_ciencias/article/view/486

- Reyes, Y., Vergara, I., Torres, O., Díaz, M., & González, E. (2016). Contaminación Por Metales Pesados : Implicaciones En Salud , Ambiente Y Seguridad Alimentaria. *Investigacion Y Desarrollo*, 16(2), 66–77. Recuperado de:
http://revistas.uptc.edu.co/index.php/ingenieria_sogamoso/article/download/5447/4518
- Rivera, R. E., Camejo, P. Y., Moya, F. J., López-Méndez, J. L., & Munguía-Bravo, M. (2011). Estudio de biolixiviación de un mineral de sulfuros de cobre de baja ley con bacterias Tio-y Ferro-oxidantes en condiciones termófilas. *Revista de la Facultad de Ingeniería de la Universidad de Atacama Chile*, 26, 65-73. Recuperado de:
https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/43999460/biolix_leer.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1510180262&Signature=jKwXJMbLNo6yqkqDYEFWnQ%2BdLSY%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DESTUDIO_DE_BIOLIXIVIACION_DE_UN_MINERAL.pdf
- Rivera-Martínez, E., Cárdenas-González, J. F., Martínez-Juárez, V. M., & Acosta-Rodríguez, I. (2015). Remoción de cromo (VI) por una cepa de *Aspergillus Niger* resistente a cromato. *Informacion Tecnologica*, 26(4), 13–20. Recuperado de:
https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0718-07642015000400003&script=sci_arttext
- Rodríguez Gallego, J. L., & Sánchez Martín, J. (2003). Biorremediación. Aspectos tecnológicos y aplicación al vertido del Prestige. *Industria y Minería*, (351), 17-21. Recuperado de:
http://ingenierosdeminas.org/docu/documentos/aspectos_tecnologicos_%20biorremediacion.pdf
- Rodríguez, A.; Letón, P.; Rosal, R.; Dorado, M.; Villar, S. & Sanz, J.(2006). Tratamientos Avanzados de Aguas Residuales Industriales. Dirección General de Universidades e Investigación – CEIM. Madrid, España. Recuperado de:
https://www.madrimasd.org/uploads/informacionidi/biblioteca/publicacion/doc/VT/VT2_Tratamientos_avanzados_de_aguas_residuales_industriales.pdf
- Rodríguez, M., Tamayo, M. & Rivadeneira, F. (s.d.). Agentes Teratogénicos y Teratogenicidad. Pontificia universidad javeriana, Bogotá. Recuperado de:
<http://www.javeriana.edu.co/documents/5782625/5901279/10+-+Teratogeno.pdf/8d22feb3-096b-4ddf-b31c-94a9bba1357c>
- Rodríguez, Y., Ballester, A., Blázquez, M. L., González, F., & Muñoz, J. A. (2001). Mecanismo de biolixiviación de sulfuros metálicos. *Revista de Metalurgia*, 37(6), 665-672. Recuperado de:
<http://revistademetalurgia.revistas.csic.es/index.php/revistademetalurgia/article/view/534/540>

- Rogel, J., & Maroto, E. (2008). Aplicación de Sistemas de biorremediación de Suelos y Aguas Contaminadas por Hidrocarburos, 297–305. Recuperado de: <http://uniciencia.ambientalex.info/infoCT/Aplsisbiosueaguconhidint.pdf>
- Rubiano, C. (2006). Aislamiento Y Caracterización De Microorganismos Termofílicos Anaerobios Lipolíticos, Proteolíticos Y Amilolíticos De Manantiales Termominerales De Paipa E Iza (Boyacá).
- Salazar, B. (2016). Herramientas para el Ingeniero Industrial: Regresión Lineal o Mínimos Cuadrados. Recuperado de: <https://www.ingenieriaindustrialonline.com/herramientas-para-el-ingeniero-industrial/pron%C3%B3stico-de-ventas/regresi%C3%B3n-lineal/>
- Saz, P., Gálvez, J., Ortiz, M. & Saz, S. (2010). Oligoterapia. Fundamentos. Revista Offarm. Vol. 29. Núm. 6. Noviembre 2010. Recuperado de: <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-oligoterapia-fundamentos-X0212047X10875698#elsevierItemBibliografias>
- Sierra, C. A. S., & García, H. G. (2013). Verificación analítica para las determinaciones de cromo hexavalente en aguas por espectrofotometría. *Ingenierías USBmed*, 4(1), 22-26. Recuperado de: <http://www.revistas.usb.edu.co/index.php/IngUSBmed/article/view/279>
- Tejada-Tovar, C., Villabona-Ortiz, Á., & Garcés-Jaraba, L. (2015). Adsorción de metales pesados en aguas residuales usando materiales de origen biológico. *Tecno Lógicas*, 18(34), 109-123. Recuperado de: <http://www.scielo.org.co/pdf/teclo/v18n34/v18n34a10.pdf>
- Téllez, J., Carvajal, M., & Gaitán, A. (2004). Aspectos toxicológicos relacionados con la utilización del cromo en el proceso productivo de curtiembres. *Rev Fac Med Univ Nac Colomb*, 52(1), 50–61. Recuperado de: <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/revfacmed/article/download/43297/44595>
- Tortora, G. J., Funke, B. R., & Case, C. L. (2007). *Introducción a la Microbiología*. Ed. Médica Panamericana. Recuperado de: <https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=Nxb3iETuwpIC&oi=fnd&pg=PR24&dq=Introducci%C3%B3n+a+la+microbiolog%C3%ADa&ots=zaZjnKa-hE&sig=T85DZg-Qjuomt2YIL-kdray940k#v=onepage&q=Introducci%C3%B3n%20a%20la%20microbiolog%C3%ADa&f=false>
- Tsezos, M., Hatzikioseyan, A., & Remoudaki, E. (2012). Biofilm reactors in mining and metallurgical effluent treatment: biosorption, bioprecipitation, bioreduction processes., 279–291. Recuperado de: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.617.231&rep=rep1&type=pdf>

- Universidad de Salamanca. (2014). Detoxificación significado. Ediciones Universidad de Salamanca. Dpto. de Sistemas de la Fundación General de la Universidad. Salamanca (España). Recuperado de: <https://dicciomed.usal.es/palabra/detoxificacion>
- Vasquez, H. (2014). Industria Manufacturera en Colombia. Escuela nacional Sindical. Recuperado de: https://www.academia.edu/9624747/La_industria_manufacturera_en_Colombia
- Villegas, G. (2013). La minería en Colombia en un alto porcentaje es ilegal. In *Congreso de la República de Colombia*. Recuperado de: www.senado.gov.co/http://senado.gov.co/sala-de-prensa/opinion-de-senadores/item/16562-la-mineria-en-colombia-enun-alto-porcentaje-es-ilegal
- Volke, T., & Velasco, J. (2002). *Tecnologías de Remediación Para Suelos Contaminados*. Recuperado de: <http://www.inecc.gob.mx/descargas/publicaciones/372.pdf>
- Vullo, D. L. (2003). Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Química viva*, 2(3). Recuperado de: <http://www.redalyc.org/html/863/86320303/>
- Yagnentkovsky, N. (2011). Aplicación de técnicas de biorremediación para el tratamiento de residuos industriales con alto contenido de metales pesados. Recuperado de: <http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/2706/all-0001.pdf?sequence=1>
- Yarto M, Gavilán A, C. J. (2004). La contaminación por mercurio en México. *Gaceta Ecológica*, (72), 21–34. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/pdf/539/53907202.pdf>
- Zapata Perez, D. M. (16 de Mayo de 2008). *Resolución 0786 del 16 de Mayo de 2008 “POR LA CUAL SE OTORGA UNA LICENCIA AMBIENTAL PARA L*. Recuperado el 21 de Noviembre de 2017, de Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial: http://www.anla.gov.co/sites/default/files/res_0786_160508.pdf

Anexos

Anexo 1. Resultados Curva de Crecimiento

JB 1-1					
	M1	M2			
Tiempo (h)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Media	Desviación st	Log Abs
0	0,0699	0,0765	0,0732	0,004666905	-1,13548892
2	0,0727	0,0777	0,0752	0,003535534	-1,12378216
4	0,1755	0,1838	0,17965	0,005868986	-0,74557278
5	0,1924	0,2009	0,19665	0,006010408	-0,70630605
6	0,2038	0,2169	0,21035	0,009263099	-0,67705748
7	0,2049	0,2174	0,21115	0,008838835	-0,67540891
8	0,2099	0,2209	0,2154	0,007778175	-0,6667543

JB 1-1Y2					
	m1	m2			
Tiempo (h)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Media	Desviación St	Log Abs
0	0,423	0,0541	0,23855	0,260851692	-0,62242058
2	0,0273	0,0424	0,03485	0,010677312	-1,45779722
4	0,03	0,0457	0,03785	0,011101576	-1,42193412
5	0,0474	0,0625	0,05495	0,010677312	-1,2600323
6	0,0841	0,0737	0,0789	0,007353911	-1,102923
7	0,1507	0,1571	0,1539	0,004525483	-0,81276138
8	0,2537	0,274	0,26385	0,014354268	-0,5786429

MQ-2-3-1y2					
	M1	M2			
Tiempo (h)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Media	Desviación St	Log Abs
0	0,1048	0,0944	0,0996	0,007353911	-1,00174066
2	0,0633	0,0961	0,0797	0,023193102	-1,09854168
4	0,0742	0,1043	0,08925	0,021283914	-1,04939178
5	0,1048	0,133	0,1189	0,019940411	-0,92481815
6	0,1548	0,1836	0,1692	0,020364675	-0,77159964
7	0,2339	0,2524	0,24315	0,013081475	-0,61412573
8	0,3352	0,3439	0,33955	0,006151829	-0,46909627

MS 1 Y 2					
	M1		M2		
Tiempo (h)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Media	Desviación St	Log Abs
0	0,0327	0,0449	0,0388	0,008626703	-1,41116827
2	0,0328	0,0555	0,04415	0,016051324	-1,35506929
4	0,0815	0,0934	0,08745	0,008414571	-1,05824019
5	0,1467	0,1677	0,1572	0,014849242	-0,80354746
6	0,1952	0,2235	0,20935	0,020011122	-0,67912703
7	0,2331	0,2634	0,24825	0,021425335	-0,60511074
8	0,2555	0,2946	0,27505	0,027647875	-0,56058835

MP 2-1					
	M1		M2		
Tiempo (h)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Media	Desviación St	Log Abs
0	0,0227	0,0441	0,0334	0,015132085	-1,47625353
2	0,0257	0,0488	0,03725	0,016334167	-1,42887372
4	0,0384	0,0576	0,048	0,01357645	-1,31875876
5	0,0522	0,0736	0,0629	0,015132085	-1,20134935
6	0,0778	0,1009	0,08935	0,016334167	-1,04890544
7	0,1467	0,1506	0,14865	0,002757716	-0,82783509
8	0,2454	0,2822	0,2638	0,02602153	-0,57872521

EM 2-2					
	M1		M2		
Tiempo (h)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Media	Desviación St	Log Abs
0	0,002	0,0207	0,01135	0,013222897	-1,94500414
2	0,0125	0,0211	0,0168	0,006081118	-1,77469072
4	0,0336	0,0508	0,0422	0,012162237	-1,37468755
5	0,0657	0,0871	0,0764	0,015132085	-1,11690664
6	0,1312	0,1467	0,13895	0,010960155	-0,85714145
7	0,2095	0,2202	0,21485	0,007566043	-0,66786464
8	0,2877	0,3011	0,2944	0,009475231	-0,53106219

EM 1-2Y3					
	M1	M2			
Tiempo (h)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Media	Desviación St	Log Abs
0	0,0399	0,06	0,04995	0,014212846	-1,30146451
2	0,0462	0,0603	0,05325	0,009970206	-1,27368039
4	0,0616	0,0859	0,07375	0,017182695	-1,13223798
5	0,0724	0,0961	0,08425	0,016758431	-1,07443009
6	0,0916	0,1124	0,102	0,014707821	-0,99139983
7	0,1248	0,1471	0,13595	0,015768481	-0,86662079
8	0,1753	0,2034	0,18935	0,019869701	-0,72273469

MQ-1-2-1y2					
	M1	M2			
Tiempo (h)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Media	Desviación St	Log Abs
0	0,0355	0,0451	0,0403	0,006788225	-1,39469495
2	0,0398	0,0476	0,0437	0,005515433	-1,35951856
4	0,1281	0,1437	0,1359	0,011030866	-0,86678054
5	0,174	0,1878	0,1809	0,009758074	-0,74256143
6	0,1971	0,2104	0,20375	0,00940452	-0,69090238
7	0,2309	0,2572	0,24405	0,018596908	-0,61252119
8	0,2508	0,2609	0,25585	0,007141778	-0,59201458

EM 1-1y2					
	M1	M2			
Tiempo (h)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Media	Desviación St	Log Abs
0	0,0731	0,0702	0,07165	0,00205061	-1,14478381
2	0,0755	0,0716	0,07355	0,002757716	-1,13341732
4	0,0755	0,0849	0,0802	0,006646804	-1,09582563
5	0,1069	0,1161	0,1115	0,006505382	-0,95272513
6	0,1636	0,1736	0,1686	0,007071068	-0,77314243
7	0,2415	0,2609	0,2512	0,013717872	-0,59998036
8	0,3267	0,3438	0,33525	0,012091526	-0,47463121

MT 1y2					
	M1	M2			
Tiempo (h)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Media	Desviación St	Log Abs
0	0,0164	0,0277	0,02205	0,007990307	-1,65659141
2	0,0186	0,0254	0,022	0,004808326	-1,65757732
4	0,0246	0,0377	0,03115	0,009263099	-1,50654195
5	0,0502	0,0638	0,057	0,009616652	-1,24412514
6	0,0944	0,1143	0,10435	0,014071425	-0,98150755
7	0,1626	0,1701	0,16635	0,005303301	-0,77897719
8	0,204	0,2296	0,2168	0,018101934	-0,66394072

Anexo 2. Resultados Curva de Calibración

	M1	M2			
Concentración (mg/L)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Media	Desviación St	Lisos
0,03	0,0243	0,0239	0,0241	0,000282843	0,0241
0,06	0,0496	0,0492	0,0494	0,000282843	0,0494
0,09	0,0693	0,0694	0,06935	7,07107E-05	0,06935
0,15	0,0927	0,0975	0,0951	0,003394113	0,0951
0,18	0,1158	0,1106	0,1132	0,003676955	0,1132
0,2	0,1317	0,1255	0,1286	0,004384062	0,1286

Anexo 3. Resultados Determinación de Cromo Hexavalente en Muestras

Tiempo (h)	Control 1	Control 2	Control 3	Media	Desviación st	Concentración Cr +6 diluido
0	0,0456	0,0457	0,0429	0,04473333	0,0015885	0,056858317
2	0,0417	0,0455	0,0449	0,04403333	0,002042874	0,055642406
4	0,0414	0,0431	0,0432	0,04256667	0,001011599	0,053094783
6	0,0415	0,044	0,0443	0,04326667	0,001537314	0,054310694
8	0,0326	0,0368	0,0396	0,03633333	0,003523256	0,042267385
10	0,033	0,0364	0,0383	0,0359	0,002685144	0,041514678
ABCPA	0,393	0,4209	0,4252			

Tiempo (h)	EM 2-2 Replica 1	EM 2-2 Replica 2	EM 2-2 Replica 3	Media	Desviación st	Concentración Cr +6 diluido
0	0,0456	0,0457	0,0429	0,04473333	0,0015885	0,056858317
2	0,0394	0,0388	0,0364	0,0382	0,001587451	0,045509814
4	0,0372	0,0379	0,0359	0,037	0,001014889	0,043425395
6	0,0309	0,0309	0,0278	0,02986667	0,001789786	0,031034682
8	0,029	0,0293	0,0269	0,0284	0,00130767	0,028487059
10	0,1237	0,1393	0,1186	0,1272	0,010784711	0,200104221
ABCPA	0,4423	0,4588	0,4155			

Tiempo (h)	MT 1-2 replica 1	MT 1-2 replica 2	MT 1-2 replica 3	Media	Desviación st	Concentración Cr +6 diluido
0	0,0456	0,0457	0,0429	0,04473333	0,0015885	0,056858317
2	0,0374	0,0371	0,0363	0,03693333	0,000568624	0,043309594
4	0,0345	0,034	0,0325	0,03366667	0,001040833	0,037635342
6	0,0257	0,0255	0,0251	0,02543333	0,000305505	0,023333912
8	0,0255	0,0256	0,0239	0,025	0,000953939	0,022581205
10	0,1011	0,0727	0,0919	0,08856667	0,014490457	0,13299751
ABCPA	0,3929	0,3628	0,3704			

Tiempo (h)	JB1-1 y 2 replica 1	JB1-1 y 2 replica 2	JB1-1 y 2 replica 3	Media	Desviación st	Concentración Cr +6 diluido
0	0,0456	0,0457	0,0429	0,04473333	0,0015885	0,056858317
2	0,0412	0,0369	0,0364	0,03816667	0,002638813	0,045451914
4	0,0326	0,0332	0,0323	0,0327	0,000458258	0,035956227
6	0,0253	0,0245	0,023	0,02426667	0,001167619	0,021307394
8	0,0199	0,0198	0,0195	0,01973333	0,000208167	0,013432922
10	0,1169	0,1052	0,0937	0,10526667	0,011600144	0,162005674
ABCPA	0,4005	0,3797	0,359			

Anexo 4. Resultados ANOVA Cromo

ONE-WAY AOV FOR: CONTROL EM22 JB112 MT12

SOURCE	DF	SS	MS	F	P
BETWEEN	3	8687.77	2895.92	19.05	0.0005
WITHIN	8	1216.44	152.055		
TOTAL	11	9904.21			

CHI-SQ DF P
 BARTLETT'S TEST OF -----
 EQUAL VARIANCES 3.24 3 0.3558

COCHRAN'S Q 0.6876
 LARGEST VAR / SMALLEST VAR 13.967

COMPONENT OF VARIANCE FOR BETWEEN GROUPS 914.622
 EFFECTIVE CELL SIZE 3.0

VARIABLE	SAMPLE MEAN	GROUP SIZE	STD DEV
CONTROL	206.62	3	20.450
EM22	137.86	3	7.7735
JB12	144.00	3	5.4719
MT12	162.64	3	9.9820
TOTAL	162.78	12	12.331

CASES INCLUDED 12 MISSING CASES 0

Anexo 5. Resultados LSD Cromo

LSD (T) COMPARISON OF MEANS

VARIABLE	HOMOGENEOUS MEAN	GROUPS
CONTROL	0.3408	I
MT12	0.2833	.. I
JB12	0.2618 I
EM22	0.2547 I

THERE ARE 3 GROUPS IN WHICH THE MEANS ARE NOT SIGNIFICANTLY DIFFERENT FROM ONE ANOTHER.

CRITICAL T VALUE 2.306 REJECTION LEVEL 0.050
 CRITICAL VALUE FOR COMPARISON 0.0185
 STANDARD ERROR FOR COMPARISON 8.027E-03