



Pontificia Universidad Católica del Ecuador
Sede Ibarra

ESCUELA DE CIENCIAS AGRICOLAS Y AMBIENTALES “ECAA”
INFORME FINAL DEL PROYECTO

TEMA:

“AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE BACTERIAS REMEDIADORAS DE
CROMO PRESENTES EN EL AGUA RESIDUAL DE TEXTILES”

PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE
INGENIERIA EN CIENCIAS AMBIENTALES Y ECODESARROLLO

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN:

Línea 3. Conservación de la Biodiversidad

Sublínea 3.1 Estudio, conservación y manejo de la biodiversidad

AUTOR: BAYRON ORLANDO GUEVARA GARZÓN

ASESOR: M.Cs. SANTIAGO XAVIER MAFLA ANDRADE

IBARRA, 2018



Ibarra, 26 de noviembre de 2018

M.Cs Santiago Xavier Mafla Andrade

ASESOR

CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final de investigación, el mismo que se ajusta a las normas vigentes en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales (ECAA), de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI); en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.

(f).....

M.Sc. Santiago Xavier Mafla Andrade

C.C: 1002658399



APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

El jurado examinador, aprueba el presente informe de investigación en nombre de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra (PUCESI):

(f):.....
M.Sc. Santiago Mafla (Asesor)
C.C. 100265839-9

(f):.....
Ph.D. Ruben del Toro Deniz
C.C. 175759497-1

(f):.....
M.Sc. Hector Daniel Fuertes
C.C. 100197669-3



ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo Bayron Orlando Guevara Garzón, declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 165 del Código Orgánico de la Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, que manifiesta textualmente: “Se reconoce facultad de los autores y demás titulares de derechos de disponer de sus derechos o autorizar las utilidades de sus obras o prestaciones, a título gratuito u oneroso, según las condiciones que determinen. Esta facultad podrá ejercerse mediante licencias libres, abiertas y otros modelos alternativos de licenciamiento o la renuncia”.

Ibarra 26 de noviembre de 2018

f)
(Firma manuscrita)

Bayron Orlando Guevara Garzón

C.C.: 100299907-4



AUTORÍA

Yo, Bayron Orlando Guevara Garzón, portador de la cédula de ciudadanía N°100299907-4, declaro que la presente investigación es de total responsabilidad del autor, y que se ha respetado las diferentes fuentes de información realizando las citas correspondientes.

f) 

Bayron Orlando Guevara Garzón

C.C.: 100299907-4



DECLARACIÓN Y AUTORIZACIÓN

Yo: Bayron Orlando Guevara Garzón, con CC: 100299907-4, autor del trabajo de grado titulado: “Aislamiento e Identificación de Bacterias Remediadoras de Cromo Presentes en el Agua Residual de Textiles”, previo a la obtención del título profesional de Ingeniero en Ciencias Ambientales y Ecodesarrollo, en la Escuela de Ciencias Agrícolas y Ambientales “ECAA”.

1.- Declaro tener pleno conocimiento de la obligación que tiene la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra, de conformidad con el artículo 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior de entregar a la SENESCYT en formato digital una copia del referido trabajo de graduación para que sea integrado al Sistema Nacional de Información de la Educación Superior del Ecuador para su difusión pública respetando los derechos de autor.

2.- Autorizo a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra a difundir a través de sitio web de la biblioteca de la PUCESI el referido trabajo de graduación, respetando las políticas de propiedad intelectual de la universidad.

Ibarra, 26 de noviembre de 2018

(f.).....

Bayron Orlando Guevara Garzón

C.C.100299907-4



DECLARACIÓN DE COMPORTAMIENTO ÉTICO EN LA LABORACIÓN, DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE TRABAJOS DE TITULACIÓN

Por medio de la presente declaro conocer y aplicar en la elaboración, desarrollo y evaluación del Proyecto de Titulación: Aislamiento e Identificación de Bacterias Remediadoras de Cromo Presentes en el Agua Residual de Textiles; lo propuesto en el Código de Ética de la Investigación y el Aprendizaje de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, aprobado por el Consejo Superior de la PUCE con fecha 15 de enero de 2018.

Para Constancia firma:

f).....


Bayron Orlando Guevara Garzón

CC: 100199307-4

Ingeniería Ciencias Ambientales y Ecodesarrollo

DEDICATORIA

Mi tesis está dedicada primero a Dios y a la Virgen María por ayudarme a culminar con éxito esta gran etapa de mi vida.

A mis padres Byron y Mirian que me brindaron todo su amor y apoyo incondicional en el transcurso de toda mi vida estudiantil para poder alcanzar el objetivo que me propuse de ser un ingeniero ambiental.

A mis queridos Abuelitos; a mis hermanas Belén y Gabriela por ser unas personas de grandes virtudes y maravillosas conmigo, por su apoyo incondicional que me da fortaleza para seguir adelante

A mis primos y amigos con los que he vivido las mejores experiencias de vida llenas de alegrías y momentos únicos que los recordare siempre

Este triunfo quiero dedicar también a todos mis queridos ingenieros que a lo largo de mi carrera universitaria supieron brindarme ánimos, consejos, valores y conocimientos que me van a ayudar a ser un excelente profesional.

AGRADECIMIENTO

Con mucho esfuerzo, dedicación y felicidad he culminado una etapa más en mi vida y quiero expresar mi profundo agradecimiento a todas las personas que estuvieron conmigo dándome ánimos y aliento para alcanzar este sueño que ahora es realidad.

Agradeceré eternamente a Dios por brindarme unos padres maravillosos y por guiar mi camino dándome fortaleza para salir adelante en aquellos momentos de debilidad.

A mis padres Byron Guevara y Mirian Garzón, que supieron inculcarme desde niño los mejores valores para ser un buen hijo, hermano, compañero, amigo; y sobre todo gracias por ese sacrificio, por su constancia y apoyo incondicional que me dieron día tras día para llegar a ser lo que soy ahora.

De igual manera a mis hermanas Belén y Gabriela gracias por su apoyo y cariño sincero, y a toda mi familia en general, gracias por todos sus consejos y por haber estado conmigo en el transcurso de esta etapa de mi vida.

Además, quiero expresar mi gratitud infinita a mi asesor de tesis el M.Cs. Santiago Mafla Andrade, al Doctor Rubén del Toro y un gran amigo el Ing. Héctor Fuertes por haberme ayudado de una forma desinteresada en todo momento, también a los distintos docentes que fueron partícipes de una u otra manera en el progreso de mi aprendizaje para llegar a ser un buen profesional.

Y por último a mis queridos primos y amigos que fueron partícipes en toda la trayectoria de mi vida, por haber compartido conmigo los mejores momentos y haberme brindado su apoyo incondicional en todo momento, gracias infinitas a todos.

INDICE DE CONTENIDOS

1.	Resumen y palabras claves	5
2.	Abstract.....	6
3.	Introduccion.....	7
4.	Estado del arte	9
4.1.	Descripción de la zona de estudio	9
4.2.	Contaminación de agua por Textiles.....	9
4.3.	Principales contaminantes.....	10
4.3.1.	Los metales pesados presentes en el agua.....	10
4.3.2.	Contaminación del agua por cromo.	11
4.3.3.	Toxicidad del cromo.	11
4.3.4.	Distribución del Cr (VI) en el medio ambiente	12
4.4.	Características de las aguas residuales de la industria textil.....	12
4.5.	Legislación ambiental de aguas.	15
4.6.	Métodos biológicos para el tratamiento de agua residual textil.....	17
4.6.1.	Microorganismos Asociados.....	17
4.6.2.	Microorganismos usados en la remoción de colorantes.	17
4.6.2.1.	Resistencia y tolerancia a metales pesados	17
4.7.	Movilización de metales pesados por bacterias	18
4.7.1.	Secuestro intracelular y extracelular	19
4.7.2.	Biosorción	19
4.7.3.	Bioacumulación	20
4.7.4.	Biotransformación.....	20
4.8.	Microorganismos usados en la remoción de metales pesados	23
4.8.1.	Bacterias en la reducción de cromo.	23
5.	Materiales y métodos	26
5.1.	Materiales de campo	26
5.2.	Materiales y equipos laboratorio.....	26
5.3.	Metodología	27
5.3.1.	Metodología para la fase de campo	27

5.3.2.	Metodología para la fase de laboratorio.....	28
5.3.3.	Caracterización del Agua residual de textiles.....	28
5.4.	Aislamiento de cepas bacterianas resistentes al cromo.....	32
5.4.1.	Determinación de crecimiento celular	35
5.4.2.	Análisis de Cromo por Equipo de Absorción Atómica	36
5.5.	Identificación molecular	38
5.5.1.	Extracción de ADN.....	38
5.5.2.	Tinción de Gram	38
5.5.3.	Preparación de lisado de bacterias Gram positivas.....	39
5.5.4.	Unión de ADN	39
5.5.5.	Lavado de ADN	39
5.5.6.	Elución de ADN.....	40
5.5.7.	Amplificación del ADNr 16s.....	40
5.5.8.	Electroforesis en gel de agarosa.....	42
6.	Resultados y discusión.....	43
6.1.	Caracterización del agua residual	43
6.2.	Aislamiento y crecimiento bacteriano	44
6.3.	Evaluación del crecimiento celular.....	45
6.4.	Análisis de secuencia	59
6.5.	Socialización de la Investigación.....	60
7.	Conclusiones	65
8.	Recomendaciones	66
9.	Bibliografía.....	67
	Anexos	73

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Metales típicos encontrados en colorantes	9
Tabla 2. Clasificación general de los contaminantes de las industrias textiles.....	14
Tabla 3. Límites máximo-permisibles TULSMA.....	16
Tabla 4. Bacterias resistentes y tolerantes	18
Tabla 5. Microorganismos usados en la degradación de colorantes textiles.	22
Tabla 6. Organismos implicados en la Biorremediación de metales pesados.	25
Tabla 7. Análisis de variables en estudio.....	31
Tabla 8. Técnica de medición utilizada para lectura de Cromo.....	37
Tabla 9. Reactivos utilizados para la PCR.....	40
Tabla 10. Límite máximo permisible de agua para consumo humano y uso domestico.	43
Tabla 11. Análisis de varianza para Reducción de Cromo	47
Tabla 12. Análisis de Varianza para Reducción de Cromo de la Cepa O8	53
Tabla 13. Secuencias cercanas analizadas por BLAST	59

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de interacción entre metales pesados y microorganismos	19
Figura 2. Secuencia de eventos en un proceso de biotransformación bacteriana	21
Figura 3: Transporte y toxicidad del cromo en la célula bacteriana.	24
Figura 4. Agua tinturada de lana textil.....	28
Figura 5. Siembra de bacterias con 0,05 de Cromo.	33
Figura 6. Aislamiento por estrías de cepas bacterianas	34
Figura 7. Aislamiento de cepas por su morfología.	35
Figura 8. Equipo para detección de metales pesados (EAA).....	36
Figura 9. Curva de calibración para lectura de Cromo	38
Figura 10. Maquina Termociclador para PCR.....	41
Figura 11. Electroforesis en gel de Agarosa	42
Figura 12. Crecimiento bacteriano de la Cepa O1 en un tiempo de duplicación de 12 h.....	46
Figura 13. Prueba Tukey al 5% de remoción de Cromo de la Cepa O1.	48
Figura 14. Crecimiento Microbiano de la Cepa O2 en tiempo de duplicación de 12 h.	49
Figura 15. Crecimiento microbiano de la Cepa O4 en tiempo de duplicación de 12 h	50
Figura 16. Crecimiento bacteriano de la Cepa O5 en tiempo de duplicación de 12h.....	51
Figura 17. Crecimiento bacteriano de la Cepa O8 en un tiempo de duplicación de 12h.....	52
Figura 18. Prueba de Tukey al 5 % de remoción de Cromo de la Cepa O8.	54
Figura 19. Crecimiento bacteriano de la Cepa O10 en un tiempo de duplicación de 12h.....	55
Figura 20. Gráfico de barras de error al 5% (Prueba de Kruskal Wallis).	56
Figura 21. Gráfico de la relevancia que tiene el tema investigado en la sociedad	61
Figura 22. Gráfico de las perspectivas de la investigación para estudios complementarios	62
Figura 23. Grafico de si el tema investigado presenta un beneficio a futuro concreto para alguna organización.	63
Figura 24. Gráfico de cumplimiento de objetivos propuestos en la investigación.	64

1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVES

El cromo es uno de los metales pesados más tóxicos que existen en las aguas residuales de textiles, es un elemento que debido a su persistencia en el ambiente no puede ser degradado fácilmente, sin embargo, existen microorganismos presentes en el propio medio acuoso contaminado capaz de interactuar entre ellos provocando una serie de transformaciones químicas que favorezcan la eliminación o transformación de su compuesto cancerígeno. La presente investigación tuvo como objetivo el aislar e identificar cepas bacterianas remediadoras presentes en el agua residual de textiles, donde se evaluó su uso en la remoción del cromo, para esto se caracterizó el agua residual de textiles a través de la obtención de una muestra de agua compuesta dando como resultado los siguientes parámetros, esta agua tiene un color de 1100 unidades, un pH de 2,73 y una DQO de 21056 mg.l⁻¹ todos los parámetros fueron tomados en los laboratorios de la PUCESI bajo manipulación adecuada de la muestra, primero se aislaron seis cepas bacterianas a través de medios de cultivo en Agar LB (Laura Bertani) y caldo (Nutrient both) con una concentración de 0,05 mg.l⁻¹ de cromo (límite máximo permisible), posterior a esto las seis cepas bacterianas fueron sometidas a distintas pruebas de estrés donde se utilizó concentraciones duplicadas de Cromo en un (0,5 - 0,10 - 0,20 y 0,40)ppm, se realizó pruebas de crecimiento para evaluar su desarrollo frente a la presencia del metal. Se identificaron 6 cepas bacterianas de las cuales *Pseudomona sp.*, mostro los mejores resultados en cuanto a la remoción y crecimiento, con valores de 94,5 % de remoción del cromo y un crecimiento $3,0 \times 10^7$ cél.ml⁻¹ en un tiempo de 12 horas de incubación, para la identificación de las cepas aisladas se hizo una extracción de ADN de las seis cepas encontradas, las cuales fueron sometidas a una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación del ADNr 16s e identificadas por medio del programa BLAST donde se encontraron los géneros: *Maribacter*, *Bacillus*, *Pseudomona*, *Enterococcus*, *Amycolatopsis* y *Staphylococcus*,. Por otra parte, las seis cepas remediadoras fueron evaluadas en el equipo de Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA) por la técnica de llama donde sus resultados indicaron que las mejores cepas bacterianas fueron *Pseudomona sp.*, con valores de remoción de 94,5% y *Bacillus Cereus* con una remoción de 93,25% de Cromo.

Palabras Claves: Cromo, identificación, remoción, cepas, inoculación, desarrollo

2. ABSTRACT

The chrome is one the most toxic heavy metals and it is present in textile residual waters. It cannot be degraded easily because of its residuality, but there are microorganisms in the contaminated environment which interact promoting the chrome chemical transformation and remove the heavy metal from the environment. The objective of this investigation was identify and isolate bacteria strains which are present in the textile residual water. Analyzed a sample of the water where these microorganisms live, in the PUCESI labs facilities. The water characterization results were 1100 units of color, pH 2,73 and 21056 mg.l⁻¹ of oxygen chemical demand. The bacteria cultivation was developed using agar LB y and nutrient broth with 0,05 ppm of concentration like a top limit allowed. Then, these bacteria were exposed to some chrome concentrations (0,05ppm, 0,10ppm, 0,20 ppm y 0,40ppm) and evaluated its growth. The experiment allowed to isolate 6 bacteria strains of which *Pseudomonas* sp showed the best rake over and growth results. The chrome rake over value was 94,5% and 3,0x10⁷ of cellular bacteria growth in 12 hours. The DNA analyze helped to identify the 6 funded bacteria strains. The amplification of DNAr 16s was made using the PCR technic and the BLAST program identified which the selected strains belonged to the generous *Maribacter*, *Bacillus*, *Pseudomona*, *Enterococcus*, *Amycolatopsis* and *Staphylococcus*. The rake over bacteria strains were evaluated the absortion atomic spectro using the flame technic. The best results were *Pseudomona* sp with 94,5% of chrome rake over and *Bacilus Cereus* with 93,25%.

Keywords: chrome, identify, rake over, metalloid, strains, cultivation.

3. INTRODUCCION

La industria textil es una de las actividades de importancia de nuestro país; sin embargo, es una de las industrias con mayor consumo de agua y las aguas residuales que se generan contienen un gran número de contaminantes de diferente naturaleza. Entre los contaminantes se destacan los colorantes. Estos compuestos se diseñan para ser altamente resistentes, incluso a la degradación microbiana, por lo que son difíciles de eliminar en las plantas de tratamiento convencionales. (Anjaneyulu y Suman, 2005)

El tratamiento de aguas residuales de la industria textil es un problema ambiental al que se le ha dado atención, ya que muchos colorantes que contienen metales pesados y aditivos textiles son tóxicos y no biodegradables y, en consecuencia, son descargados a canales y ríos, permaneciendo en el ambiente. (Chung y Stevens, 1993).

La industria textil generadora de estas descargas, no les proporcionan tratamiento alguno debido a los altos costos en el uso de productos químicos en los sistemas de depuración convencionales, o porque no cuentan con sistemas adecuados de reducción de colorantes (Dos Santos, Cervantes y Van-Lier, 2006)

Hoy en día, se aplican métodos de tratamiento como los fisicoquímicos y químicos sin mucho éxito.

Los procesos fisicoquímicos utilizan compuestos llamados coagulantes para remover la contaminación y se forman sedimentos donde quedan atrapados. Esto significa que los compuestos que contienen cromo solo son transferidos de la parte líquida hacia los sedimentos y como contiene toda la contaminación, necesitan ser tratados, lo cual resulta difícil y muchas veces se envían a confinamiento (Mendez, 2003).

Los tratamientos biológicos han sido reconocidos como métodos efectivos para el tratamiento de decoloración y degradación de metales pesados en aguas residuales industriales altamente contaminadas, este se considera un tratamiento efectivo ya que es considerado un tratamiento amigable con el medio ambiente, de baja producción de lodos y competitivo en cuanto a los costos requeridos. (Kuhad, Sood, Tripayhi, Singh y Ward, 2005).

Objetivo general:

Identificar bacterias remediadoras para el tratamiento de cromo en agua residual de textiles.

Objetivos específicos:

- 1) Caracterizar el agua de la tintorería textil mediante pruebas fisicoquímicas en laboratorio verificando las condiciones iniciales del cromo.
- 2) Aislar cepas bacterianas del agua problema resistente al cromo, mediante placas con un medio inducido.
- 3) Comprobar la capacidad de remoción de cromo en las bacterias aisladas a diferentes concentraciones del metal.
- 4) Socializar los resultados obtenidos a la comunidad de la PUCESI.

Hipótesis

La presencia de las 6 cepas aisladas en el proceso de remediación de aguas residuales de textiles eliminara cantidades iguales del metal en el medio inducido.

4. ESTADO DEL ARTE

4.1. Descripción de la zona de estudio

La Ciudad de Atuntaqui pertenece al cantón Antonio Ante, provincia de Imbabura, se ubica al Noreste de la provincia el cual presenta un clima Templado con una altitud media de 2.360 msnm, se encuentra situado en la Larga llanura de la base occidental del volcán Imbabura con una temperatura de 15.4° C (Buitrón, 2014).

4.2. Contaminación de agua por Textiles

La industria textil consume gran cantidad de agua en sus operaciones de teñido y acabado. Se estima que se usan alrededor de 100-150 litros de agua para procesar un kg de materia textil. Se asume que la pérdida de colorantes durante el proceso de teñido es de alrededor del 10% y el 15% y muchos de estos colorantes escapan los procesos convencionales de tratamiento de agua, persistiendo en el entorno. (Xicota, 2015)

Muchas actividades industriales generan cantidades considerables de aguas contaminadas con colorantes que van directamente al medio ambiente. Estas aguas residuales presentan concentraciones significativas de metales pesados como cromo, cobre, zinc, níquel o plomo.

Tabla 1.

Metales típicos encontrados en colorantes.

Directo	Cobre
Reactivo	Cobre y níquel
Ácidos	Cobre, cromo, cobalto
Premetalizados	Cobre, cromo, cobalto
Mordante	Cromo

Nota. Recuperado de (Anjaneyulu, Sreedhara y Suman, 2005).

4.3. Principales contaminantes

En la industria textil los efluentes generados se caracterizan por fluctuaciones extremas en parámetros, tal es el caso: la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), la demanda química de oxígeno (DQO), salinidad y pH, color. Algunos de los parámetros característicos de estos efluentes de acuerdo con lo que indican (Kuhad, Sood, Tripathi, Singh y Ward, 2004)

- Color visible (1100-4500 unidades).
- Demanda química de oxígeno (800-1600 mg. l⁻¹).
- pH alcalino (9-11).
- Sólidos totales (6000-7000 mg. l⁻¹).

El agua procedente de las industrias textiles posee una composición que depende de las sustancias químicas que se usen a lo largo del proceso ya que estos efluentes contienen variedad de contaminantes que provienen de los diversos procesos implicados en la elaboración de fibras (Manu y Chaundhari, 2002)

Sales como cloruro de sodio (NaCl) y sulfato de sodio (Na₂SO₄) (provenientes del teñido), biocidas como el pentaclorofenol (proveniente de fibra de lana contaminada), aniones tóxicos como el sulfuro y metales pesados, compuestos orgánicos como solventes clorados (provenientes del lavado y la limpieza de máquinas) y agentes surfactantes como fenoles etc., son principales compuestos que causan un impacto negativo provocando que se altere la calidad de agua por conductividad eléctrica (Bae, Freeman y Kim, 2006)

4.3.1. Los metales pesados presentes en el agua.

Los colorantes son fuente principal de metales pesados empleados para los acabados en textiles, se utilizan metales de transición como el cobre, el cromo, el cobalto y el níquel de esta manera estos metales forman enlaces múltiples con las materias colorantes y/o fibras orgánicas. (Ranganathan, Jeyapaul y Sharma, 2007)

Varios de estos metales pesados se encuentran en niveles de ppm, a manera de impurezas en las fibras crudas, impurezas en colorantes empleados como catalizadores en la síntesis de colorantes (De Moraes, Freire y Duran, 2000)

4.3.2. Contaminación del agua por cromo.

Este metal posee estados de oxidación que van de 2^+ a 6^+ . Las formas más abundantes y estables son las especies trivalentes Cr (III) y hexavalentes Cr (VI) son consideradas como cancerígenas al ser humano. El Cr (VI) se caracteriza por ser un anión soluble en agua, el mismo que puede persistir en el ambiente durante largos periodos de tiempo, además es considerado como un principal contaminante por el departamento de energía en sitios de desecho de EUA (Dönbak, Rencuzogullari, Topaktas y Sahin, 2006)

El Cr (VI) es un metal utilizado en metalurgia para garantizar resistencia a la corrosión y obtener un acabado brillante. El cromo metálico es usado para la fabricación de acero, en el caso del cromo trivalente y hexavalente son empleados para la fabricación de pigmentos y pinturas, cromados, curtidos de cuero, chapado, galvanoplastia, en torres de refrigeración de purga, baños, anodización, como catalizadores y para la conservación de madera (Mohan, Pittman, y Steele, 2006)

4.3.3. Toxicidad del cromo.

El estado de oxidación del cromo influye directamente en los efectos tóxicos de este metal, el Cr (VI) a nivel molecular es altamente tóxico para la mayoría de las bacterias debido a que destruye el citoplasma de estas; en el caso del Cr (III) es relativamente inofensivo ya que es insalubre y no es capaz de traspasar las membranas celulares (Matur, Krishanatreya y Sharma, 2002)

El cromo (VI) es considerado el más tóxico para el medio ambiente y perjudicial para el ser humano en elevadas concentraciones. Los compuestos de cromo (VI) más conocidos y utilizados por las industrias son: dicromato sódico, dicromato potásico y trióxido de cromo. Entre los efectos que ocasionan a la salud son de tipo alérgico, irritación cutánea, ulceraciones de la piel y corrosión cutáneo-mucosa que se dan de manera inmediata una vez que se ha absorbido este metal (Rehman, Bhatti y Rehman, 2008)

El ion Cr^{6+} es la valencia más dañina del metal por su facilidad de atravesar membranas biológicas y ser transportado activamente al interior celular por el transportador de sulfato (Borst, 1981).

4.3.4. Distribución del Cr (VI) en el medio ambiente

El Cr (VI) es un metal de alta toxicidad que, dependiendo de condiciones normales de temperatura, y materia orgánica oxidable se reducen a compuestos de Cr (III) más solubles y estables, sin embargo, la movilidad del Cr (VI) en el suelo depende de su pH debido a que en un suelo ácido el metal se vuelve más soluble y disponible causando su fácil migración a cuerpos de agua subterránea (Mathur y Krisshnatrey, 2003).

La movilidad del cromo en el sistema edáfico también va a depender de la capacidad de reducción, adsorción, porosidad, composición química y uso del suelo. Es así como en el caso de suelos en donde abunda la materia orgánica se retienen de mejor manera dichos metales y en suelos que han sido fertilizados con productos a base de amonio o abonos fosfatados se produce una acidificación del suelo provocado un incremento de Cr (VI) al suelo (Gavril y Hodson, 2007).

4.4. Características de las aguas residuales de la industria textil

De los 200 mil millones de m³ de agua dulce que es destinada a la industria a nivel mundial, 2.5 mil millones de m³, dicho en otro modo el 1,25% pertenece a industrias textiles, la misma que esta notablemente contaminada después de dichos procesos (Ademoroti, Ukponmwan, Omode, 1992). Para fabricar una tonelada de producto textil se utiliza aproximadamente 200 toneladas de agua y del total de productos químicos empleados cerca del 90% es vertido como desecho después de cumplir con su función.

Las industrias textiles contaminan en términos de volumen y complejidad de sus efluentes es decir que cada una de las actividades genera agua residual de características variables.

De acuerdo con (López y Crespi, 2015) las aguas residuales que se generan por los diferentes procesos de tintura y acabados textiles poseen las siguientes características:

- Las aguas residuales generan carga contaminante y variabilidad de caudal.
- Bajo contenido de materia coloidal y en suspensión.
- La mayoría de los contaminantes presentes en el agua son moderadamente biodegradables y solubles.
- Su carga orgánica media (DQO) se caracteriza por tener el doble de concentración a comparación de un efluente urbano.
- Su toxicidad es baja a diferencia de otros sectores industriales.
- El agua que se genera de las actividades textiles contiene bajas concentraciones de nutrientes como el nitrógeno y el fósforo.
- Como unas de las características más evidentes del sistema hídrico procedentes de una industria textil son su elevada salinidad y coloración.
- Exentas de microorganismos patógenos.

Tabla 2.

Clasificación general de los contaminantes de las industrias textiles.

Clasificación	Efectos contaminantes
<p>Materiales en suspensión: residuos minerales, fibras, sustancias insolubles. Son relativamente escasas en los efluentes textiles excepto en los lavaderos de lana.</p>	<p>Las materias disueltas se depositan en los cursos de agua. Cuando estas materias son de carácter orgánico se descomponen agotando el oxígeno generando gas tóxico y mal oliente.</p>
<p>Materias flotantes: Aceites, grasas y espumas.</p>	<p>Disminuyen el crecimiento de la flora acuática al impedir el paso de luz. Los aceites al ser tóxicos perturban la aireación de los cuerpos acuáticos y destruyen la vegetación. La industria textil genera grasas y aceites en el lavado de lana y en procesos de estampación en los que intervienen pastas de petróleo. En el caso de los tensos activos son de uso generalizado y en concentraciones bajas (1-3 mg/l) para producir espuma al verter agua y en proceso de depuración. Los Tensoactivos desaparecen después de muy pocos metros de vertido.</p>
<p>Impurezas disueltas:</p>	<p>Los reductores y la materia orgánica consumen el oxígeno. Los productos contaminantes disueltos pueden ser tóxicos como es el caso de los derivados fenólicos, cromo, aceites, grasas, transportadores de tintura metales pesados etc.</p>

Nota. Recuperado de (Aristizabal y Bermudez, 2007)

4.5. Legislación ambiental de aguas.

Como indica la tabla 1 en El Anexo 6 del Libro VI del Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente, Norma de Calidad Ambiental de agua de consumo humano y uso doméstico determina o establece:

1. Los principios básicos y enfoque general para el control de la contaminación del agua.
2. Las definiciones de términos importantes y competencias de los diferentes actores establecidos en la ley.
3. Los criterios de calidad de aguas para sus distintos usos.
4. Los límites permisibles, disposiciones y prohibiciones para las descargas en cuerpos de aguas o sistemas de alcantarillado.
5. Permisos de descarga.
6. Los parámetros de monitoreo de las descargas a cuerpos de agua y sistemas de alcantarillado de actividades industriales o productivas, de servicios públicas o privadas.
7. Métodos y procedimientos para determinar parámetros físicos, químicos y biológicos con potencial riesgo de contaminación del agua.

Se toma como referencia la Tabla 8. Límites de descarga al sistema de alcantarillado público y la Tabla 9. Límites de descarga a un cuerpo de agua dulce del TULSMA para tomar en cuenta los parámetros de real importancia para las descargas de agua provenientes de industrias textiles mostrados en la tabla 3.

Tabla 3.

Límites máximo-permisibles TULSMA.

Parámetros	Expresado como	Unidad	Límite máximo permisible	
			Descarga al sistema de alcantarillado público	Descarga a un cuerpo de agua dulce
Aceites y grasas	Sust. solubles en hexano	mg.l ⁻¹	0,3	30,0
Color real	Color real	Unidades de color		Inapreciable en disolución: 1/20
Cromo hexavalente	Cr ⁺⁶	mg.l ⁻¹	0,05	0,05
Demanda Bioquímica de Oxígeno (5 días)	DB05	mg.l ⁻¹	2,0	100
Demanda Química de Oxígeno	DQO	mg.l ⁻¹	500	200
Potencial de Hidrogeno	pH		6-9	6-9
Solidos suspendidos totales	SST	mg.l ⁻¹	220,0	130
Temperatura	°C		< 40,0	Condición natural+/- 3
Tensoactivos	Sustancias Activas al azul de metileno	mg.l ⁻¹	2,0	0,5

Nota. Recuperado de Tulsma Libro VI tabla 9, límites permisibles para agua de consumo humano y uso domestico.

4.6. Métodos biológicos para el tratamiento de agua residual textil.

El método biológico o biorremediación hace uso de seres vivos para restaurar ambientes que han sido contaminados por lo tanto se puede utilizar dichos seres vivos como principales agentes depuradores de esta manera se puede dar tratamiento al agua residual textil antes de que el agua sea destinada al medio ambiente (Méndez, 2015).

4.6.1. Microorganismos Asociados

Para los procesos de remediación del agua residual textil se emplean variedad de organismos entre los más destacados son los microorganismos (tanto bacterias, como algas y hongos), en el caso de las bacterias poseen una capacidad metabólica para degradar sustancias transformando compuestos en el agua considerados peligrosos, tóxicos o nocivos, organismos como los nematodos (vermiremediación) y plantas (en procesos denominados fitorremediación), todos estos organismos contribuyen a la transformación de sustancias perjudiciales a compuestos que son amigables para el ambiente (Cortázar, González, Olivares, Escalante y Castro, 2012)

4.6.2. Microorganismos usados en la remoción de colorantes.

Las investigaciones que se encaminan a desarrollar procesos para la decoloración de aguas residuales textiles tienen como objetivo remover un alto nivel de colorantes, así como también un alto porcentaje de metales pesados y decoloración. (Cruz y Buitrón, 2001)

Los factores ambientales pueden tener una gran influencia en la decoloración de las aguas residuales, así tenemos el pH, cantidad de oxígeno disponible en el agua y temperatura, puesto que a ciertas condiciones las moléculas de los colorantes llegan a descomponerse en compuestos con un bajo peso molecular, a esto se le conoce como biotransformación (De la Peña, Ducci y Zamora, 2013)

4.6.2.1. Resistencia y tolerancia a metales pesados

Es común utilizar indiscriminadamente los términos de resistencia y tolerancia bacteriana, sin embargo, la diferencia sustancial radica en los mecanismos involucrados como se indican en la tabla 4.

Tabla 4.

Bacterias resistentes y tolerantes

Bacterias resistentes	Bacterias tolerantes
Mecanismos codificados genéticamente, constitutivos o inducidos por la presencia del metal.	Mecanismos indiferentes a la presencia o ausencia del metal.

Nota. Recuperado de (Marrero, 2010).

Dentro de los mecanismos de resistencia existen dos tipos de sistemas de captura de cationes de metales pesados: el primero es rápido, inespecífico y depende del gradiente quimiosmótico existente a través de la membrana citoplasmática bacteriana, el segundo posee una gran especificidad de sustrato, es más lento, generalmente utiliza la hidrólisis de ATP como fuente de energía en adición al gradiente quimiosmótico y se induce bajo condiciones nutricionales desfavorables o en alguna situación metabólica especial. (Nies, 1995).

A nivel genético, la resistencia a metales pesados se encuentra codificada por secciones del genoma bacteriano denominadas “determinantes genéticos”. Estos pueden ser plásmidos, transposones o ambos (Amoroso y Nies., 2000).

En el caso de los determinantes plasmídicos pueden llegar a ser altamente específicos confiriendo resistencia a concentraciones elevadas de metales pesados (Mergeay, 1991) y tiene la ventaja de pasar de una célula a otra por transferencia horizontal favoreciendo a corto plazo la adaptación bacteriana en ambientes contaminados (Marrero, 2010).

4.7. Movilización de metales pesados por bacterias

Se ha comprobado la existencia de microorganismos resistentes y microorganismos tolerantes a metales. Los microorganismos resistentes se identifican por poseer mecanismos de detoxificación codificados genéticamente, inducidos por la presencia del metal. Por el contrario, los microorganismos tolerantes son indiferentes a la presencia o ausencia de metal. Tanto los microorganismos resistentes como tolerantes poseen un gran interés como captadores de metales en ambientes contaminados, gracias a que tienen la capacidad de eliminar los contaminantes. La resistencia o tolerancia de estos microorganismos se debe a la acción de diferentes mecanismos

como se indican en la figura 1 son: biosorción, bioacumulación, biomineralización, biotransformación y quimio sorción mediada por microorganismos (Vullo, 2003)

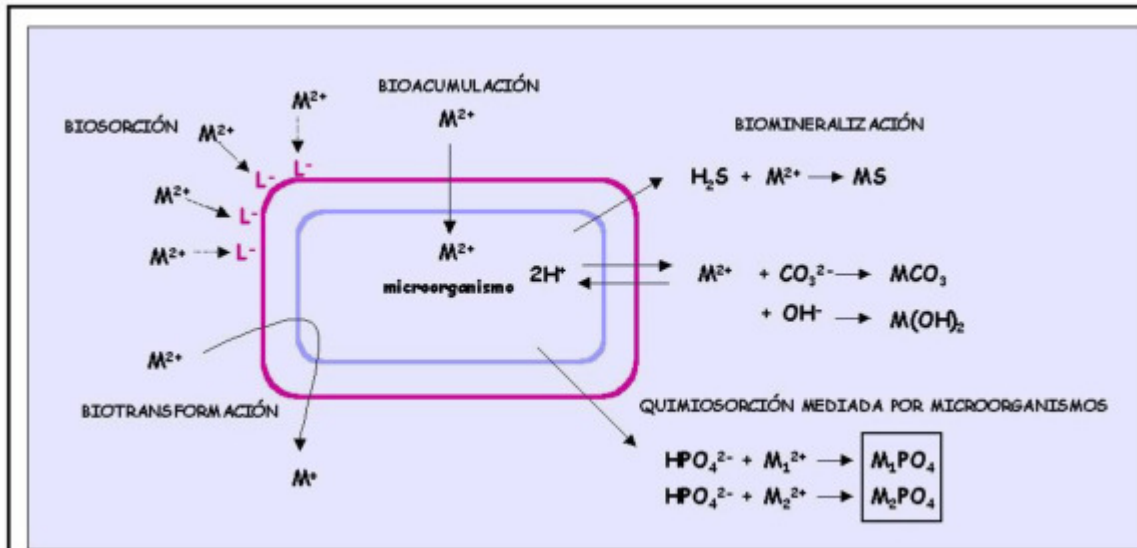


Figura 1. Mecanismo de interacción entre metales pesados y microorganismos. Fuente (Vullo, 2003)

4.7.1. Secuestro intracelular y extracelular

Las proteínas plasmáticas cumplen diversas funciones dentro de la célula bacteriana, una de ellas es prevenir la exposición de componentes celulares esenciales a compuestos que pudieren resultar nocivos. El mecanismo involucrado en este proceso se conoce como secuestro intracelular o extracelular (dependiendo donde se lleve a cabo) mediante la unión a proteínas (Sueiro y Morel, 2009) observaron la presencia de un exopolisacarido producido por *Stenotrophomonas sp.* con la capacidad de secuestrar Cr^{6+} .

4.7.2. Biosorción

La biosorción es un mecanismo estudiado en la biorremediación de diversos metales pesados como el cadmio, cromo, plomo, níquel, zinc y cobre. Los microorganismos utilizados como biosorbentes, aislados a partir de ambientes contaminados, inmovilizan los metales pesados a intervalos de tiempo cortos al entrar en contacto con soluciones de dichos metales. El potencial de biosorción de metales por microorganismos es indiscutible, algunos de estos absorben metales en cantidades elevadas, además resultan de particular interés ya que resultan económicos en

comparación a los métodos tradicionales; haciendo de su uso la forma más eficiente para la detoxificación de efluentes industriales que contienen (Cañizares, 2000).

4.7.3. Bioacumulación

En vista de que los metales pesados no pueden ser degradados de forma biológica o química actualmente se está considerando un nuevo enfoque: donde a través de la utilización de microorganismos capaces de acumular iones metálicos con ciertos grados de especificidad se brinda una alternativa para la contaminación ambiental. Esta capacidad de acumulación se debe a que las membranas de dichos microorganismos poseen un polisacárido de naturaleza poli aniónica que es susceptible de ligar metales (Modrego, 1994). Las especies metálicas son retenidas al interactuar con los fosfatos, proteínas y lípidos en el citoplasma celular compitiendo con los iones Na, K y Ca en los mecanismos biológicos; sus posibilidades de desarrollar una mayor capacidad absorbente dependen del tipo de microorganismo y su etapa de crecimiento (Soto, 2010).

4.7.4. Biotransformación

A lo largo del proceso de biotransformación, las enzimas tienen capacidad reductora la misma que se encuentra en las células de las bacterias que inmediatamente se unen con el compuesto químico para formar un complejo, y este al reaccionar, genera derivados que al ser liberados extracelularmente, influyen en la velocidad de reacción así como también en la disponibilidad del compuesto, por lo tanto la biotransformación se lleva a cabo gracias a la capacidad enzimática de la bacteria por cambios genéticos y al crecimiento bacteriano (Cheung y Gu, 2011)

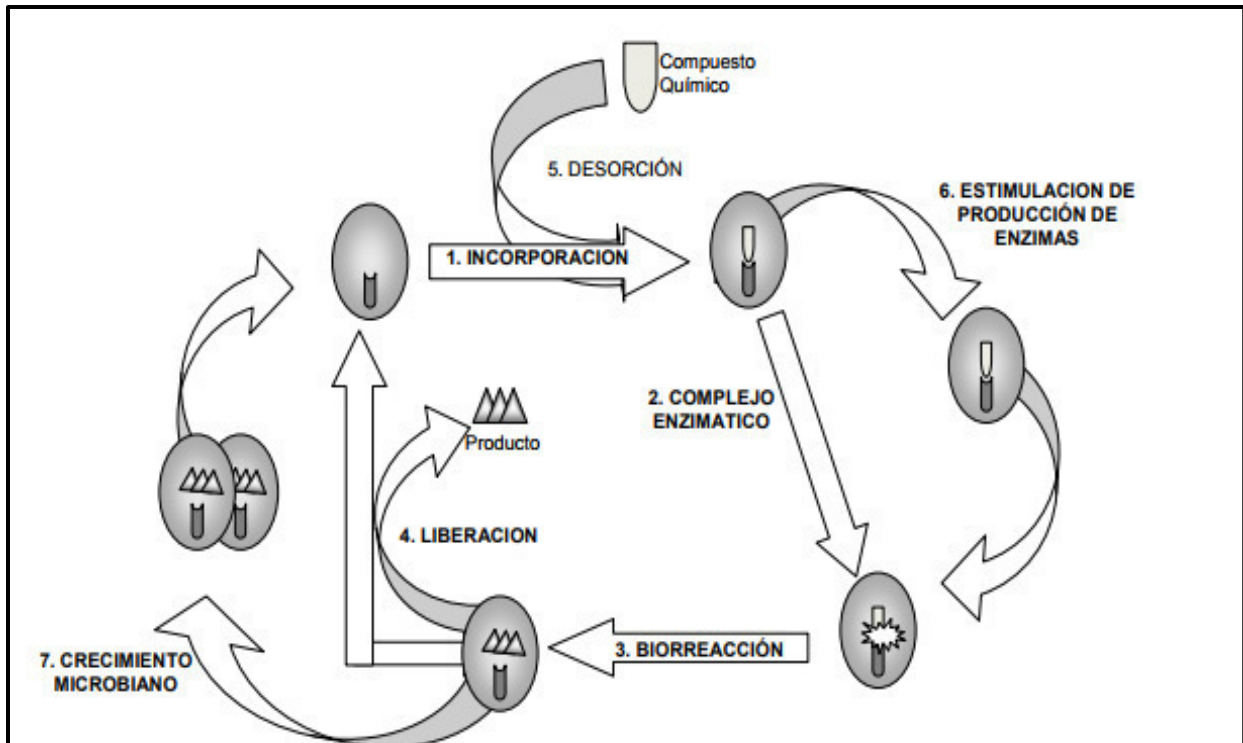


Figura 2 Secuencia de eventos en un proceso de biotransformación bacteriana. Fuente: (Rivas, 2000)

Durante el proceso de biotransformación como se indica en la figura 2 las enzimas con el poder reductor que se encuentran en células bacterianas se unen con el compuesto químico para formar un complejo, (1), (2) el cual al reaccionar (3) produce derivados que pueden ser liberados extracelularmente (4). Algunos procesos pueden influenciar en la velocidad de la reacción como la disponibilidad del compuesto (5), la capacidad enzimática del microorganismo por cambios genéticos (6) y el crecimiento de la población bacteriana que lleva a cabo la biotransformación (7) (Pearce y Lloyd, 2001)

Los microorganismos con esta capacidad dependiendo del estado de oxidación en que se presenta un metal y la especie que este conformando; puede realizar dos transformaciones: la primera donde moviliza al metal transformándolo de un estado insoluble inicial (correspondiente a una fase sólida) a un estado soluble final (en fase acuosa), el segundo es conocido como lixiviación microbiana e inmoviliza al metal transformándolo de un estado soluble inicial en fase acuosa a uno insoluble en fase sólida (Soto, 2010).

Varios de los colorantes que contienen cromo empleados en la tinturación no pueden ser degradados fácilmente bajo condiciones aerobias, por lo que se procede a emplear otros métodos como por ejemplo anaerobios y aerobios (Robinson, McMullan, Marchnt y Nigman, 2001)

La biodegradación de los colorantes que contienen metales pesados por bacterias es posible mediante la presencia de enzimas con poder reductor. Estas enzimas son más efectivas cuando están bajo condiciones medio ambientales específicas como pH de 7 -8, temperaturas de 30 – 40 °C, agitación entre otras especificaciones y aireación (Pant y Adholeya, 2007)

En los últimos años, la biosorción basada en la habilidad de ciertas biomasas de capturar especies metálicas de soluciones acuosas, han recibido especial atención por su potencialidad para el tratamiento de aguas residuales. Varios estudios han demostrado que la biomasa de diferentes especies de bacterias, hongos, y algas es capaz de concentrar, en su estructura, iones metálicos que se encuentran en ambientes acuáticos (Monge, 2009).

Tabla 5.

Microorganismos usados en la degradación de colorantes textiles.

Especie	Mecanismo	Referencia
<i>Citrobacter sp.</i>	Biodegradación-bioabsorción	(Galli, 2002)
<i>Proteus mirabilis</i>	Biodegradación-bioabsorción	(Golvleva y Aharonson, 1990)
<i>Streptomyces sp</i>	Peroxidasa	(Lai y Scrimhaw, 2002)
<i>S. chromofuscus</i>	Peroxidasa	(Vasques y Reyes, 2002).
<i>Pseudomonas mendocinas</i>	Biodegradación aerobia	(Halden y Tepp, 1999)
<i>Bacillus subtilis</i>	Biodegradación aerobia	

Nota. Recuperado de (Nies y Silver, 1995)

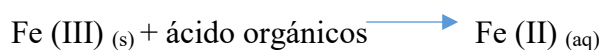
4.8. Microorganismos usados en la remoción de metales pesados

Los metales pesados son todos los elementos químicos que contienen una densidad relativamente alta, tóxica o venenosa en concentraciones pequeñas. Es importante mencionar que los microorganismos como se indica en la tabla 5, son de vital importancia en la transformación de metales pesados ya que las bacterias influyen en su remediación y biodisponibilidad para reducir su toxicidad, mejorar la movilidad del elemento y la solubilidad en agua. (Abed, Safi, Koster, Beer, Nahal, Rullkotter y García, 2002)

Los microorganismos permiten modificar la concentración de metales pesados en el medio ambiente, es así como las bacterias al poseer mecanismos como enzimas y no enzimas contribuyen a la remoción de metales en solución (Brune y Bayer, 2012)

4.8.1. Bacterias en la reducción de cromo.

La reducción del Cr (VI) se puede dar mediante condiciones aerobias o anaerobias, además puede estar relacionada a la fracción soluble o de membrana celular. Las bacterias capaces de oxidar sulfuro son eficientes para Cr (VI) a Cr (III) gracias a una precipitación reductiva indirecta vía agentes biogénicos: S⁻² o Fe (II), generadas por bacterias (Alam y Ahmad, 2011)



En la figura 3 se muestra el proceso de transporte y toxicidad del cromo en la célula bacteriana en donde se lleva a cabo el siguiente procedimiento: A) Captación del Cr (VI) (CrO_4^{2-}) a través del sistema de transporte del sulfato (SO_4^{2-}). B) Las membranas biológicas son impermeables al Cr (III), por lo que éste resulta inocuo extracelularmente. C) Reducción intracelular de Cr (VI) a Cr (III). D) Estrés oxidativo causado por la generación de especies reactivas de oxígeno como consecuencia de la reducción de Cr (VI). E) Daño ocasionado por la interacción del Cr (III) con las proteínas o F) con el DNA.

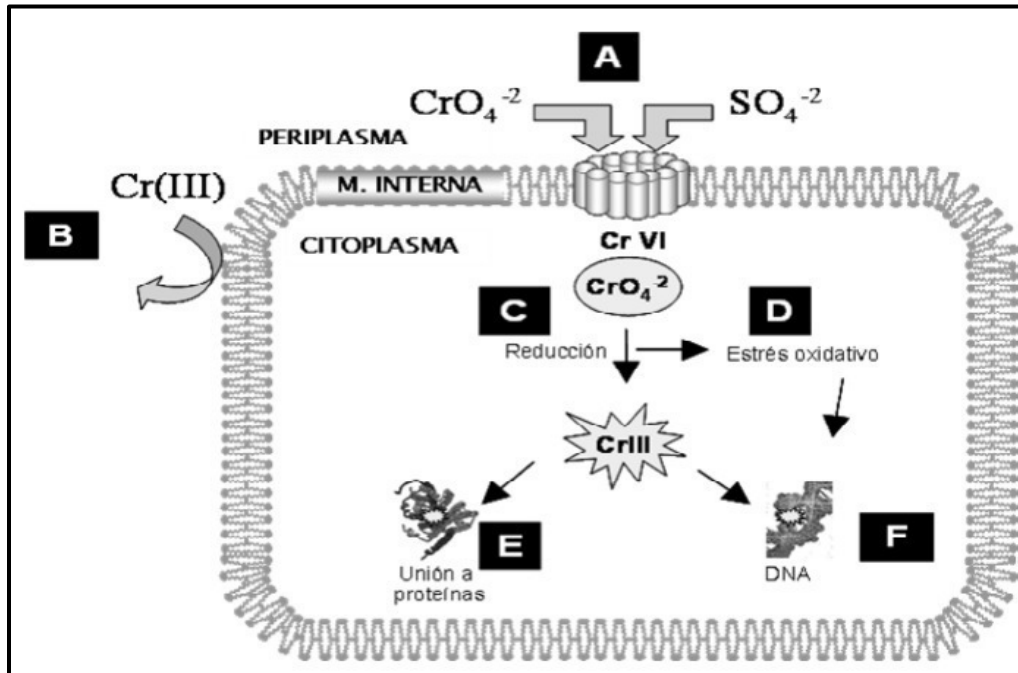


Figura 3: Transporte y toxicidad del cromo en la célula bacteriana. Fuente: (Huang, Chai, Chen y Logan, 2011)

Tabla 6.

Organismos implicados en la Biorremediación de metales pesados.

Microorganismo	Metal	Referencia
<i>Pseudomonas ambiguas</i>	Cr	(Nies y Silver, 1999)
<i>E. Coli</i>	Cr	(Nies y Silver, 1999)
<i>C. metallidurans</i>	Cr	(Bruins, Kapil y Oehme, 2000)
<i>Micrococcus sp</i>	Cr (VI)	(Bruins, Kapil y Oehme, 2000)
<i>Bacillus sp</i>	Cr (VI)	(Silver, 1998)

Nota. Recuperado de organismos implicados en la biorremediación. Fuente (Cervantes, Espinosaldana, Acevedo y León, 2006)

Como se indica en la tabla 6 además de estas especies existen bacterias listas para ser aisladas del suelo, sedimentos y aguas contaminadas que contienen propiedades para reducir cromatos y dicromatos, como es el caso de *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Enterobotcer*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, entre otras (Otiniano, 2007).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación tuvo dos fases, la fase de campo donde se obtuvo la muestra de agua se realizó en la provincia de Imbabura, Cantón Antonio Ante, en la cabecera cantonal Atuntaqui, mientras que la fase de laboratorio se hizo en la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede-Ibarra.

5.1. Materiales de campo

- Cooler de plástico
- pH métrico (Sper Scientific)
- Conductímetro (Sper Scientific)
- Botella plástica
- Registro de Apuntes

5.2. Materiales y equipos laboratorio

- Frasco Boeco 500ml
- Vasos de precipitación 250ml
- Cajas Petri
- Papel Aluminio
- Asa metálica
- Parafilm
- Guantes
- Mascarilla
- Mechero de bunsen
- Tirillas de pH

Equipos

- Autoclave (icanCLAVE)
- Cámara de Neubauer (Micros)
- Cámara de flujo Laminar (N-Biotek)
- Balanza Analítica (ae- Adam)

- Equipo de Absorción Atómica (SensAA)
- Contador de Colonias (Stuart)
- Cámara de Electroforesis (C.B.S. Scientific)
- Termociclador (Multigen Optimax)
- Microcentrífuga (Prism Microcentrifuge)
- Vortex (Vortex Mixer)
- Cabina Estarctora (Labconco)

Reactivos

- Agar nutritivo (Nutrient Both)
- Caldo Lb (Lauria Bertani)
- Agua destilada
- Trazas de Cromo 10ppm (Accu Trance)
- Gel de agarosa
- Kit de extracción PureLink ® Genomic DNA Mini Kit (InvitrogenR)

5.3. Metodología

5.3.1. Metodología para la fase de campo

Esta investigación se realizó en el Cantón Antonio Ante, parroquia de Atuntaqui donde se recolecto una muestra compuesta de varios colorantes de agua residual textil, se procedió a tomar una muestra de una tinturadora de lana de la ciudad de Atuntaqui, se colocó dentro de un recipiente de plástico esterilizado de 1000ml, el cual fue abierto en la fuente y se homogenizado con el agua de la tinturadora textil, se obtuvo la muestra, se etiqueto la botella de la muestra, y a la vez fue evaluado su pH. en el lugar de muestreo para determinar su estado original para posteriormente caracterizar físico químicamente el agua en los laboratorios de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Ibarra.

La muestra compuesta fue trasladada a través de un cooler de plástico con refrigerante en su interior para no alterar las condiciones físicas de la muestra en el traslado de la muestra a la PUCESI.



Figura 4. Agua tinturada de lana textil. Elaborado por: Guevara, B. 2018 (El Autor)

5.3.2. Metodología para la fase de laboratorio

5.3.3. Caracterización del Agua residual de textiles

a) Análisis físicos y químicos:

- **pH:**

La medición de pH tuvo lugar en la fuente de generación donde se utilizó un envase plástico de 1000ml en el que se trasvaso suavemente la muestra de agua y fue medida con prontitud con el potenciómetro para minimizar cualquier variación.

La muestra fue llevada y medida en los laboratorios de la PUCESI bajo condiciones adecuadas para caracterizar este parámetro.

- **Conductividad eléctrica:**

La medición se realizó en la fuente de generación de agua contaminada el que fue medido con un conductímetro (In situ) para lo que se procedió a introducir el sensor directamente en el cuerpo de agua donde se encuentra la muestra compuesta, se procede anotar la lectura por el instrumento en la libreta de campo.

- **Color:**

Esta medición se realizó en el Colorímetro Smart 3, Estándar APHA, primero se elaboró la solución de blanco, después se procedió a tomar el colorímetro para dar lectura de su calibración, se insertó la opción color en la pantalla y se colocó el blanco, se colocó 10 ml de muestra en el recipiente y se procedió a leer el valor.

- **Turbiedad:**

Se tomó 10 ml de muestra de agua de la botella original y fue colocada en un frasco de vidrio del Colorímetro Smart 3, Estándar APHA, el que fue trasvasado suavemente para no alterar las condiciones originales como el pH.

- **Cromo:**

Para la medición de Cromo total se trabajó con el equipo de Absorción Atómica el cual se hizo un análisis de cromo por metodología de EAA (Espectrometría de Absorción Atómica) se siguió los siguientes pasos para la preparación de la muestra para su análisis (Schrenk, 1986)

Transferir 50 ml de la muestra (homogenizar) bien, mezclada en un recipiente de digestión de 50 ml.

- ❖ Añadir 1ml de ácido nítrico Instra Pure y 2,5 ml de ácido clorhídrico Insta Pure.
- ❖ Cubrir el recipiente con un vidrio de reloj de crucería y en el calor en un bloque caliente precalentado a 90 – 95 °C hasta que el volumen sea reducido a 10 - 15 ml.
- ❖ Retire los buques del bloque caliente y deje enfriar.
- ❖ Llenar hasta un volumen final de 50 ml en el recipiente de digestión con agua Mili-Q y el filtro usando el aparato de embolo.
- ❖ Se puede obtener muestra atreves sobrante obtenido de centrifugación de las cepas bacterianas a diferentes concentraciones, quedar un pellet en la base y el líquido sobrante será el adecuado para la medición de la muestra.

- **DQO:**

Se colocará la muestra en una incubadora que contendrá en una dilución en un tubo correcto Hr 1 durante 3 horas y una temperatura de 180°C, luego de 20 min de enfriamiento adecuadamente tratado se tomó el dato expresado en mg. l⁻¹ a partir de una longitud de onda de 420nm (Harris, 2005)

- **DBO₅:**

La muestra fue colocada en tres botellas vidrio eppendoff, se colocó 100 ml de muestra con las siguientes soluciones: solución de cloruro de calcio, solución de cloruro férrico, solución de sulfato de magnesio y solución tampón de hidróxido de sodio, se introdujo un agitador en la botella y se colocó en él, por 5 días en la incubadora donde se tomó los datos a diario (Harris, 2005)

5.3.4. Diseño experimental

En esta investigación el diseño experimental aplicado es completamente al azar (DCA) con arreglo factorial A x B.

Para la realización de esta investigación se tomó en cuenta la concentración permisible para uso de consumo humano y uso doméstico del Tulsma libro VI, el cual permite que el 0,05 ppm de cromo puede estar en el agua para consumo humano y uso domestico, a partir de esta concentración se trabajó en concentraciones por duplicado y se fue probando la resistencia que tienen al metal las cepas encontradas y posteriormente verificar su crecimiento en las diferentes concentraciones colocadas.

Dicho modelo experimental consistió en la aplicación de 6 cepas de bacterias a 5 diferentes concentraciones de cromo con 3 repeticiones dando un total de 89 unidades experimentales (UE).

Tabla 7.

Análisis de variables en estudio

Factor A = 6 Cepas	Código	Factor B= Tratamientos (Cr)
<i>Pseudomona sp.</i>	O1	0 ppm
<i>Amycolaptosis a.</i>	O2	0,05 ppm
<i>Enterococcus h.</i>	O4	0,10 ppm
<i>Staphylococcus h.</i>	O5	0,20 ppm
<i>Bacilus c.</i>	O8	0,40 ppm
<i>Maribacter ch.</i>	O10	

Fuentes de variación	Formula	Grados de libertad
Total	(n-1)	89
Tratamiento	(t -1)	29
Factor A	(Fa-1)	5
Factor B	(Fb-1)	4
Inter AxB	(axb)	20
Error Exp.	(T-t)	60

Nota. Elaborado por Guevara, B. 2018 (El Autor)

5.3.5. Variable dependiente

CEPAS

- Cepa O1
- Cepa O2
- Cepa O4
- Cepa O5
- Cepa O8
- Cepa O10

Se obtuvo 6 variables dependientes de cepas bacterianas las cuales fueron codificadas con una letra y un número para su identificación y fácil manipulación de las variables.

5.3.6. Variable independiente

Tratamientos (Concentración de Cr)

- T1= 0 ppm
- T2= 0,05 ppm
- T3= 0,10 ppm
- T4= 0,20 ppm
- T5= 0,40 ppm

5.4. Aislamiento de cepas bacterianas resistentes al cromo.

Para el aislamiento de las bacterias remediadoras de cromo, se preparó una solución madre de cromo con una solución de cromo de 100 ml/10ppm Cr, el Agar LB(Luria Bertani) contenía 100 ml y fue preparada con una concentración de [0,05] ppm de Cromo (Límite máximo permisible) el dispensado inicial fue en 5 cajas Petri, cada caja contenía 20 ml de agar y 1 ml de muestra de agua como se indica en la figura 5, las cajas fueron previamente esterilizadas en el autoclave a 121°C y 1,5 atm por 45min. Las cajas fueron selladas con Parafilm y fueron incubadas por 24 horas a una temperatura de 35°C como se indica en la figura 5.

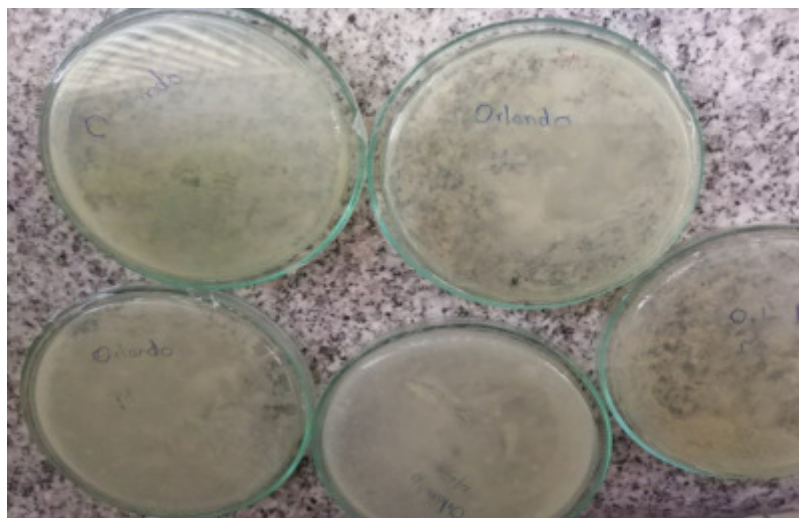


Figura 5. Siembra de bacterias con 0,05 ppm de Cromo. Fuente: Guevara, B. 2018 (El Autor)

Luego de las 24 horas de incubación las bacterias que crecieron en las cajas fueron aisladas en cajas Petri con agar LB (Laura Bertani) y con concentración de Cromo 0,05 ppm; mediante el método de siembra de agotamiento por estrías como se indica en la figura 6 permitió tener un número reducido de bacterias remediadoras las que fueron distribuidas por toda la superficie de la placa. Una vez realizada la siembra, las placas Petri fueron incubadas a 37°C por 24 horas en posición invertida, esto se lo hace con el fin de evitar que la condensación que se forma en la tapa gotee en la superficie del agar solidificado y fueron selladas adecuadamente para evitar la contaminación.

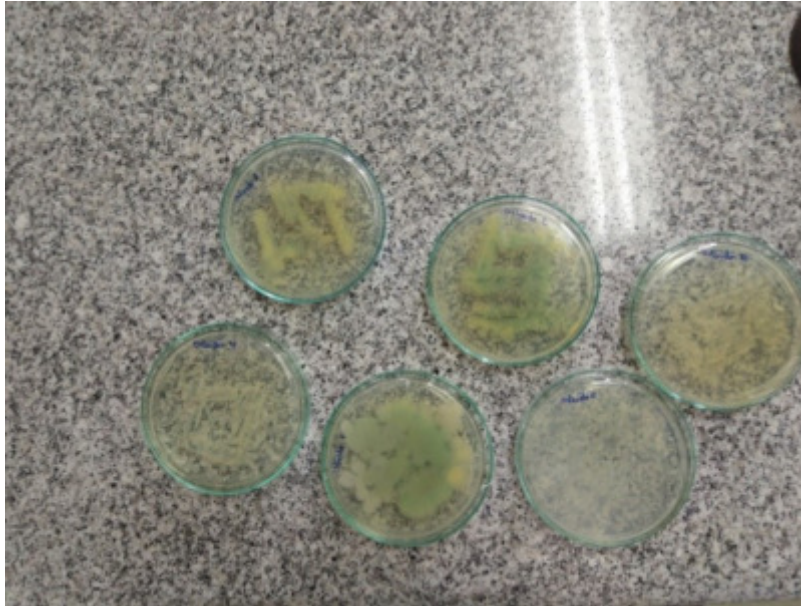


Figura 6. Aislamiento por estrias de cepas bacterianas. Fuente: Guevara, B. 2018 (El Autor)

El aislamiento que se realizó identificó 6 cepas las que fueron aisladas en tubos de ensayo con caldo LB (Lauria Bertani) como se indica en la figura 7, la identificación de las bacterias se realizó de acuerdo con sus características morfológicas (forma, tamaño, borde, coloración y consistencia) una vez identificada, con un asa estéril se raspó suavemente sobre la cepa, se sembró 6 bacterias en tubos de ensayo, cada cepa en tubo diferente rotulados por su código de identificación. Este procedimiento se repitió dos veces para obtener cepas bacterianas puras. Todo el procedimiento se realizó bajo condiciones asépticas dentro del laboratorio, cerca del mechero y en un ambiente adecuado para evitar la contaminación de los cultivos.

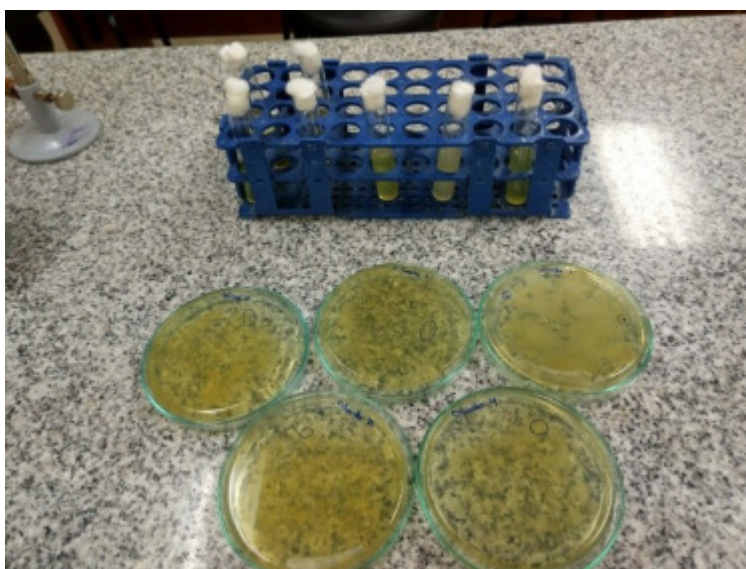


Figura 7. Aislamiento de cepas por su morfología. Fuente: Guevara, B. 2018 (El Autor)

5.4.1. Determinación de crecimiento celular

Obtenidas las 6 cepas bacterianas tolerantes a la concentración de cromo en el medio inducido (0,05 ppm LMP) fueron aisladas en tubos de ensayo que contenían 9 ml de caldo (Nutrient Both) previamente esterilizados, se tomaron diferentes concentraciones de cromo (0,05ppm, 0,10 ppm, 0,20ppm y 0,40 ppm), fueron llevadas de inmediato a la cámara de Neubauer donde se evaluó su crecimiento celular cada dos horas. Las bacterias aisladas sin concentración del metaloide fueron aisladas en 6 tubos con caldo (Nutrient Broth), e inmediatamente se procedió a contar en tiempos de 0 – 2 – 4 – 6 – 8 – 10 – 12 horas para evaluar su crecimiento, el conteo se realizó una vez colocada la concentración de cromo y fue observada cada dos horas para obtener una mejor persuasión de su crecimiento y ver sus niveles de desarrollo, las concentraciones colocadas fueron basadas a partir del Límite Máximo permisible de cromo para uso de agua para consumo humano y uso doméstico 0.05 ppm (100%) a partir de esta concentración, se duplico las concentraciones en un 200%, 400%, 800%, para determinar su resistencia al medio y ver su crecimiento celular. Las bacterias que no contenían cromo fueron contadas desde la colocación de la muestra dentro de los tubos con caldo Nutrient both.

5.4.2. Análisis de Cromo por metodología de EAA (Espectrometría de Absorción Atómica)

Para medir la cantidad de remoción de cromo a concentraciones de (0,00 ppm, 0,05 ppm, 0,10 ppm, 0,20 ppm y 0,40 ppm) se realizó un pellet en tubos Eppendorf de 2,0 ml, los que fueron centrifugados a 10.000 rpm durante 30 segundos, el proceso se repitió 5 veces hasta obtener una cantidad adecuada de pellet. Este proceso se hizo en todas las muestras con el propósito de sedimentar las bacterias desarrolladas en el medio inducido formando un pellet el cual ayudara a la identificación molecular, mientras que el líquido sobrante se transfirió a otro tubo Eppendorf para el análisis de remoción de Cromo.

Para este análisis se trabajó con un Espectrómetro de Absorción Atómica SensAA^o de GBC Scientific Equipment como se indica en la figura 8. Según la naturaleza del metal los métodos espectroscópicos atómicos se clasifican con la forma en cómo se atomiza la muestra, para esto uso la técnica de Espectros de Absorción Atómica por llama en la que se emplea una fuente de radiación externa que emite ondas de radiación de la misma longitud de onda que las de absorción del analito, se selecciona una de estas ondas que se hace pasar a través de la llama donde los átomos de analito absorben la radiación.



Figura 8. Equipo para detección de metales pesados (EAA) Fuente: Guevara, B. 2018 (El Autor)

5.4.3. Estándares de calibración método Llama

La técnica de medición de lectura concentración y absorbancia de cromo se detalla a continuación:

Corriente de lampara:6 mA

Tipo de llama: Acetileno (altamente reductora

Tabla 8.

Técnica de medición utilizada para lectura de Cromo.

Longitud de onda	Ancho de hendidura	Rango de trabajo	Sensibilidad
nm.	nm.	µg/ml	µg/ml
357.9	0.2	2 – 15	0.05
359.3	0.2	4 – 20	0.09
360.5	0.2	5 – 30	0.10
425.4	0.2	7 – 40	0.17
428.9	0.2	15 – 60	0.35

Nota. Técnica de medición para Cromo. Elaborado por Guevara, B.2018 (El Autor)

Para la calibración de la curva y el blanco como se puede apreciar en la figura 9 se utilizó un estándar de 10 ppm, a partir del cual se preparó 5 estándares; el primero con una concentración de 3ppm y una absorbancia de 0.117, el segundo estándar con una concentración de 4.5ppm y una absorbancia de 0.175, el tercero una concentración de 6ppm y una absorbancia de 0.232, el cuarto con una concentración de 7,5ppm y una absorbancia de 0.280,y el quinto con una concentración de 9ppm y una absorbancia de 0.337.

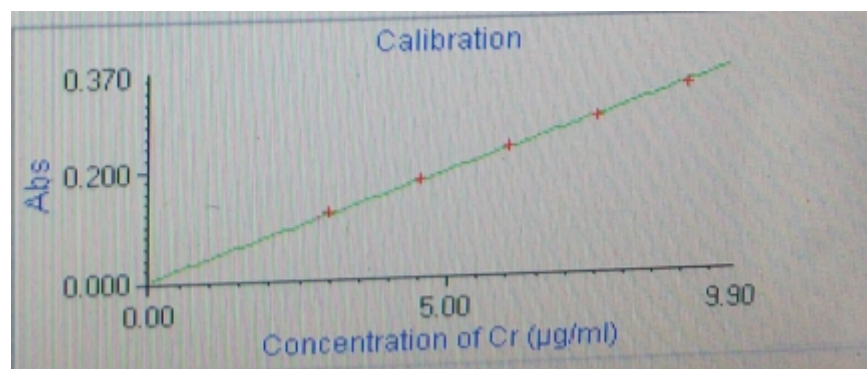


Figura 9. Curva de calibración para lectura de Cromo. Fuente: Guevara, B. 2018 (El Autor)

El modo de calibración fue “Linear LS (Least Squares) Through Zero” con un máximo error de 0.1356. Este valor se obtiene del valor entre R y R^2 donde R es el valor de la concentración y R^2 es el valor de la absorbancia del blanco en el instante de la calibración. Siendo R : 0,9985 y R^2 :0,9971

5.5. Identificación molecular

5.5.1. Extracción de ADN

Para empezar la caracterización molecular se utilizaron cepas cultivadas en caldo Lb sin concentración del metal e incubadas por 24 horas.

Se trabajó con el kit comercial PureLink® Genomic DNA Mini Kit (InvitrogenR) el cual provee 7 reactivos (Genomic Lysis/binding buffer, Genomic Digestion Buffer, Wash Buffer 1, Wash Buffer 2, Genomic Elution Buffer, RNase A y Proteinase K) para la extracción de ADN

5.5.2. Tinción de Gram

Para elegir el adecuado protocolo de preparación de lisado se realizó una prueba de tinción de Gram para clasificar a las bacterias en Gram positivas o Gram Negativas

Mediante un asa bacteriológica se expandió la muestra de la primera bacteria sobre el centro de un portaobjetos de vidrio, debidamente limpio y seco. Una vez colocadas las bacterias se fijó la muestra por la llama de un mechero pasando varias veces de forma horizontal hasta fijar a él portaobjetos. Fijada la muestra de bacterias se tiñó cubriendo con cristal violeta durante 45 segundos luego se eliminó el exceso de colorante lavado con agua destilada. Seguido la muestra

se cubrió con Lugol dejándola en reposo por 45 segundos y se eliminó el exceso de colorante con agua destilada. Se colocó la muestra agregando alcohol al frotis durante 15 segundos y luego lavado inmediatamente. El portaobjetos se tiñó con una solución contraste llamada (Safranina,) se dejó reaccionar durante 45 segundos y se retiró el exceso lavándolo con agua destilada. Finalmente se colocó un cubreobjetos, se colocó aceite de inmersión por encima del cubre objetos y se procedió a observar bajo el microscopio a 100x. Las bacterias Gram (-) se tiñen de rojo debido a la safranina, mientras que las bacterias Gram positivas se tiñen de púrpura gracias al cristal violeta.

5.5.3. Preparación de lisado de bacterias Gram positivas

Para la preparación del lisado de bacterias se agregó 1.5 del cultivo bacteriano sin concentraciones en un tubo Eppendorf de 2 ml y se centrifugo a 10000 rpm durante 1 min. Para formar un pellet. Una vez obtenido el pellet se re suspendió las células bacterianas en 200 μ l. de lysozyme Digestion Buffer (Tris-HCL 25 mM, pH8, 2,5nM EDTA, Triton X – 100 al 1%) con una concentración de Lisozima de 20mg.mL⁻¹. Esta solución se mezcló con el equipo disponible en los laboratorios de Biotecnología, Vortex por 5 segundos y luego se incubó a 37°C, durante 30 min. Una vez terminado el proceso de incubación se añadió al preparado 20 μ l. de Proteinase K (suministrada con el kit) y se mezcló rápidamente por agitación, seguido se colocó 200 μ l. Genomic Lysis/Binding Buffer (Suministrado por el kit), se mezcló en el equipo Vortex por 5 segundos y se procedió a incubar a 55°C durante 30 minutos. Finalmente se agregó 200 μ l. de etanol (96 – 100%) y se mezcló bien hasta obtener una solución homogénea.

5.5.4. Unión de ADN

Para realizar la unión del ADN se transfirió 640 μ l. de lisado en una columna giratoria con tubo de recogida (suministrado por el kit) y se centrifugo a 10000 rpm a temperatura ambiente. Se desecho el tubo de recolección y se colocó una columna giratoria en un tubo de recolección esterilizado de 2 ml (suministrado por el kit).

5.5.5. Lavado de ADN

Se añadió 500 μ l. de Wash Buffer 1 (Suministrado por el kit) a la columna giratoria con el tubo de recolección, se centrifugo a 10000rpm durante un minuto a temperatura ambiente. El tubo de recolección con el flujo obtenido fue descartado y se colocó la columna giratoria en un nuevo tubo

de recolección, a este tubo se añadió 50 µl. de Wash Buffer 2 (suministrado por el kit) y se centrifugo a velocidad máxima durante 3 minutos.

5.5.6. Elución de ADN

Finalizado el proceso de centrifugación se desechó el tubo de recolección y la columna giratoria fue colocada en un tubo Eppendorf estéril de 1.5 ml. se añadió 100 µl. de Genomic Elution Buffer (suministrado por el kit) en el centro de la columna giratoria y se incubo a temperatura ambiente por el lapso de un minuto, seguido se procedió a centrifugar a velocidad máxima en el tubo Eppendorf el cual fue refrigerado a -30°C

5.5.7. Amplificación del ADNr 16s

A través de una PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se realizó la amplificación de ADN ribosomal 16s, para la cual se utilizó los partidores universales P3 (341f) y 907r (926r) para el dominio de bacterias.

Para la reacción de PCR se utilizó un volumen de 25 µl. para obtener una concentración ideal de ADN de 10 n molar µl., los 25 µl. se repartieron de la siguiente manera:

Tabla 9.

Reactivos utilizados para la PCR

Reactivos	Volumen
Tag Polimerasa	12,5 µ
Partidores 907r (926r a una concentración de 0.10 µM)	1 µ
P3 (341f a una concentración de 0.10 µM)	1 µl
ADN	5 µ
Agua libre de nucleasas (Dnase, Rnase)	5,5 µ
VOLUMEN TOTAL	25 µ

Nota. Reactivos utilizados en laboratorio por Guevara, B.2018 (El Autor)

La amplificación del ADN de las bacterias se realizó en el termociclador Multigene, Optimax de Labnet como se indica en la figura 10. El protocolo de amplificación en el termociclador consistió en una desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos; luego de 35 ciclos de desnaturalización 94°C durante 30 segundos, seguido un lineamiento a 55.6°C por 45 segundos y una elongación a 72°C por 90 segundos. Posterior a este proceso se realizó una desnaturalización a 94°C durante 30 segundos seguido de un alineamiento a 55.6°C por 45 segundos. Para finalizar se realizó una extensión a 72°C por 90 segundos.

Estas muestras fueron colocadas en el Refrigerador del Laboratorio de Biotecnología a -30°C para luego ser enviadas a secuenciar a Macrogen Inc. Corea para determinar el taxón al que pertenece cada una de las cepas aisladas.



Figura 10. Termociclador para PCR. Elaborado por: Guevara, B.2018 (El Autor)

5.5.8. Electroforesis en gel de agarosa

Las cepas separadas en los pocillos del gel de agarosa al 2% LE Analytical Grade, se agregó 5µl de Diamond™ Nucleic Acid Dye y se dejó polimerizar durante 15 minutos, una vez polimerizado el gel se introdujo en el equipo de electroforesis, el cual tiene una cámara de electroforesis cargada con buffer TAE 1X (40 mM Tris-acetato) y 1mM EDTA, pH8.3 a 25°C)

Se utilizó una micropipeta mediante la cual se cargó en el primer pocillo del gel 5µl del indicador de peso molecular DNA Ladder 100ppb, seguidamente fueron cargados a los pocillos restantes muestras de 8µl, compuestas por una mezcla de 5µl de los productos de la PCR más 3 µl del buffer de carga Orange (Gel Star™Nucleic Acid Gel Stain) Loading Dye 6X. Una vez colocadas las muestras se procedió a tapar la cámara de electroforesis y se colocó los electrodos en la fuente de energía. La electroforesis corrió a un voltaje de 160v (voltios) y 500 A (Amperios) durante un lapso de 120 minutos.

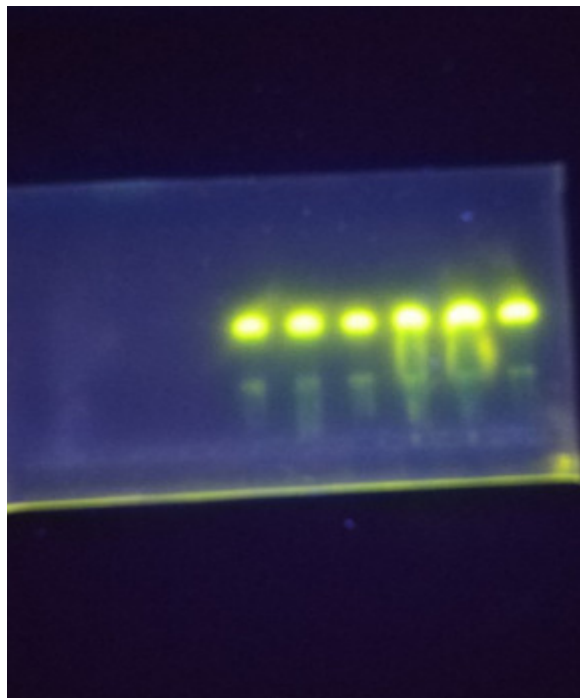


Figura 11. Electroforesis en gel de Agarosa. Elaborado por: Guevara, B. 2018 (El Autor)

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Caracterización del agua residual

El agua fue obtenida de una muestra compuesta de colores como es el verde militar, turquesa, Vino de la industria textil recogida en la ciudad de Atuntaqui, una industria que realiza la actividad de tintura de lana a la que, igual que las demás industrias de la ciudad utiliza colorantes sintéticos, tensoactivos, ácido para fijar el color a la materia prima y a su vez genera grandes cantidades de agua la que presentan contaminación como se indica a continuación:

Tabla 10.

Límite máximo permisible de agua para consumo humano y uso doméstico. TULSMA LIBRO VI

Parámetro	unidad	cantidad obtenida	LMP descarga en Alcantarillado
Potencial de hidrogeno	pH	2,73	6-9
Conductividad Eléctrica	μs	362	
Color	unidades de color	1100	0
Demanda Biológica			
De Oxigeno (5 días)	mg.l ⁻¹	145	250
Demanda Química			
de Oxigeno	mg.l ⁻¹	21056	500
Cromo	mg.l ⁻¹	1,25	0,05

Nota. Recuperado del TULSMA LIBRO VI ANEXO 1. Elaborado por (El Autor).

6.2. Aislamiento y crecimiento bacteriano

A partir de la muestra compuesta de agua contaminada por textileras se logró aislar e identificar 6 cepas bacterianas las que fueron inducidas a una concentración de 0,05 ppm de cromo (límite máximo permisible para consumo humano y uso doméstico Tulsma Libro VI) en cultivo de agar nutritivo, las cepas presentaron coloración poco similar por lo que se diferenciaron mediante su forma, bordes, textura, color, y ubicación, fueron incubadas nuevamente por 24 horas sin concentración de cromo lo que concuerda con la investigación realizada por (Bojórquez, 2010) donde se dejaron conservar las cepas en agar y sin una fuente de Cr (VI).

Según (Stewart, 2012) las bacterias que se pueden cultivar en el laboratorio representan una pequeña fracción de la diversidad existente en la naturaleza y las especies no cultivadas que no crecen en los medios estándares juegan papeles críticos en el ciclo de carbono, nitrógeno y otros elementos.

Las 6 cepas bacterianas que fueron cultivadas a la concentración de 0,05 ppm en agar donde presentaron una perfecta adaptabilidad a las diferentes concentraciones, (Zamágurra, 2010) dice que la sobrevivencia y la estabilidad de los microorganismos es mayor en presencia del metal debido a que cada cepa presenta diferencias fisiológicas como metabólicas entre las cepas presentes. Estas bacterias tuvieron un seguimiento de crecimiento en el tiempo de incubación de 0 horas y luego en duplicación de tiempo hasta llegar a las 12 horas. Debido a que no se conocía los nombres de las cepas aisladas, se le asignó a cada una un código para poder diferenciar unas con otras.

De acuerdo con los resultados obtenidos se realizó el aislamiento de las 6 cepas bacterianas resistentes a cromo presente en el agua residual de textileras, ya que no se ha realizado un estudio similar se verificó que de acuerdo con (Kocberber, 2004) en su investigación dice que el 80 % de las cepas aisladas de agua de vertidos industriales resultaron ser bacterias resistentes a altas concentraciones de metales pesados, específicamente el cromo donde se puede evidenciar el crecimiento bacteriano y la capacidad que tienen las cepas aisladas de reducir o transformar el metal. Por lo tanto, las bacterias aisladas en esta investigación tienen la capacidad de resistencia

y su crecimiento extraordinario, demostrando tener una buena resistencia a las diferentes concentraciones de cromo, lo que nos indica que las bacterias encontradas son ideales para remover el metal de medios contaminados.

6.3. Evaluación del crecimiento celular

El crecimiento de las 6 cepas aisladas fue determinado por conteo de bacterias en el equipo contador de colonias, esta evaluación se realizó en intervalos regulares de tiempo, cada dos horas en el transcurso de 12 horas. Los datos obtenidos en las diferentes repeticiones presentaron un alto grado de homogeneidad por lo que previo a realizar el diseño estadístico de análisis de varianza fue necesario crear modelos lineales generalizados (Nelder, 1989) relacionando la variable “X” (Cepas bacterianas, concentración del metal) y la variable independiente “Y” (Crecimiento bacteriano).

El resultado de este modelo lineal permitió medir el nivel de interacción entre variables dependientes y de esta forma determinar que interacción ejerce mayor significancia en el crecimiento bacteriano como sugiere (Girden, 1992) donde su investigación fue sometida a un ANOVA para medir la influencia de las variables explicativas en la varianza y determinar si existen diferencias significativas entre tratamientos..

Para esta investigación se realizó una preparación de solución madre que contenía 10 ppm de trazas del metal en 100 ml de agua destilada, a partir de esta dilución se preparó tubos con caldo lb (laurea Bertani) a 5 concentraciones de cromo (0,00 ppm, 0,05ppm, 0,10ppm, 0,20ppm, 0,40ppm) respectivamente.

A continuación, en las figuras siguientes se muestran los resultados de crecimiento celular en medios sin concentración y con concentración de cromo con distintas dosis del metal (0,00ppm, 0,05ppm, 0,10ppm, 0,20ppm, 0,40ppm) durante 12 horas que duró el conteo de bacterias. De igual manera se puede diferenciar las tres fases características de crecimiento celular: latencia (0 horas), exponencial (2 a 10 horas) estacionaria (12 horas) la fase de muerte no se pudo evidenciar en las figuras ya que en el estudio se hizo un conteo por 12 horas.

6.3.1. Crecimiento microbiano de la Cepa O1 en tiempo de duplicación de 12 horas en presencia de Cromo y la Reducción del metal.

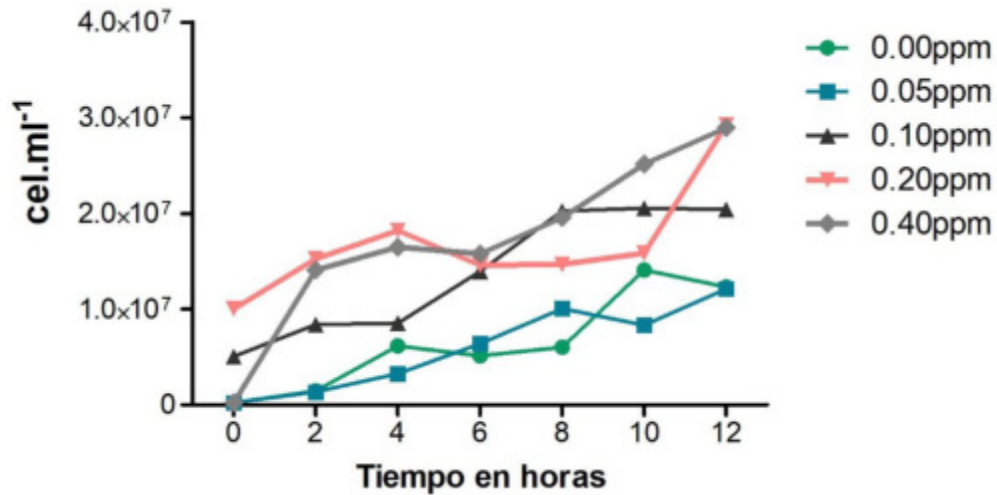


Figura 12. Crecimiento bacteriano de la Cepa O1 en un tiempo de duplicación de 12 h. en diferentes concentraciones de Cromo. Elaborado por Guevara, B. 2018 (El Autor)

La figura 12, indica el crecimiento bacteriano de la cepa O1 (*Pseudomona sp*) en las diferentes concentraciones de cromo probadas, esta cepa presento dos crecimientos significativos, el mejor crecimiento bacteriano fue de $3,0 \times 10^7$ cel.ml⁻¹ a una concentración de 0,20ppm indicando una buena adaptación en presencia de cromo, el segundo mejor crecimiento fue de aproximadamente $2,8 \times 10^7$ en una concentración de 0,40 ppm el cual crece de manera espontánea en tiempo de cero a dos horas.

6.3.1.1. ADEVA para Reducción de Cromo para la Cepa O1

Tabla 11.

Análisis de varianza para Reducción de Cromo

FV	GL	SC	CM	F calculado	F (0.05)	F(0.01)	(P < 0.05)	
Tratamiento	4	17090	4273	28870	3,478	5,99	0.0001	***
Residual	10	1.480	0.1480					
Total	14	17090						
				<u>C.V</u>	<u>0,02%</u>			

Nota. Datos obtenidos de Graphpad prism por Guevara, B. 2018 (El Autor)

Simbología: **FV:** Factor de las variables, **GL:** Grados de Libertad, **SC:** Sumatoria de Cuadrados, **CM:** Cuadrado Medio, **C.V:** Coeficiente de variación.

La tabla 11, indica el análisis de varianza y el coeficiente de variación realizado a cada uno de los tratamientos, en este caso el CV corresponde a 0.02% lo cual permite afirmar que el ensayo estuvo bien elaborado ya que existe homogeneidad entre la medición de la variable, se evidencia que existen diferencias significativas (*) entre el porcentaje de reducción de Cromo de los 5 tratamientos.

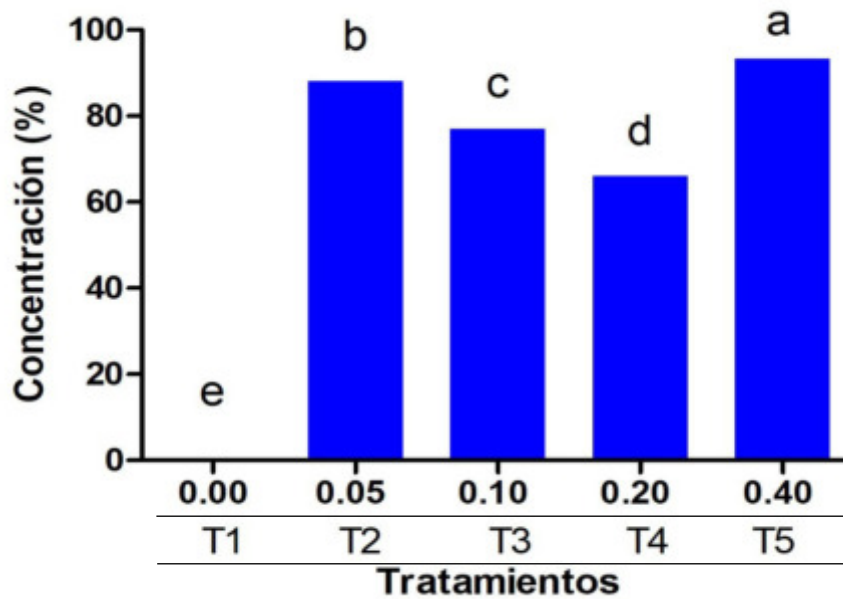


Figura 13. Prueba Tukey al 5% de tratamientos de Cromo de la Cepa O1. Elaborado por Guevara, B. 2018 (El Autor)

La figura 13, indica la prueba de significancia Tukey al 5 % determinando la presencia de cinco grupos, de los cuales el más representativo fue primero el grupo “a” perteneciente al T5 (concentración de cromo de 0,40 ppm) con un porcentaje de reducción de 93,25%, en un intervalo medio se encontraron los grupos “b” representado por T2 (concentración 0,05 ppm) donde se produjo una remoción del 88,00%, los grupos “c y d” representando las concentraciones de 0,10 y 0,20 ppm respectivamente, mientras que el menos representativo fue el grupo el T1 (concentración 0 ppm) debido a que no contenía concentración inicial del metal.

6.3.2. Crecimiento microbiano de la Cepa O2 en tiempo de duplicación de doce horas en presencia de Concentraciones de Cromo.

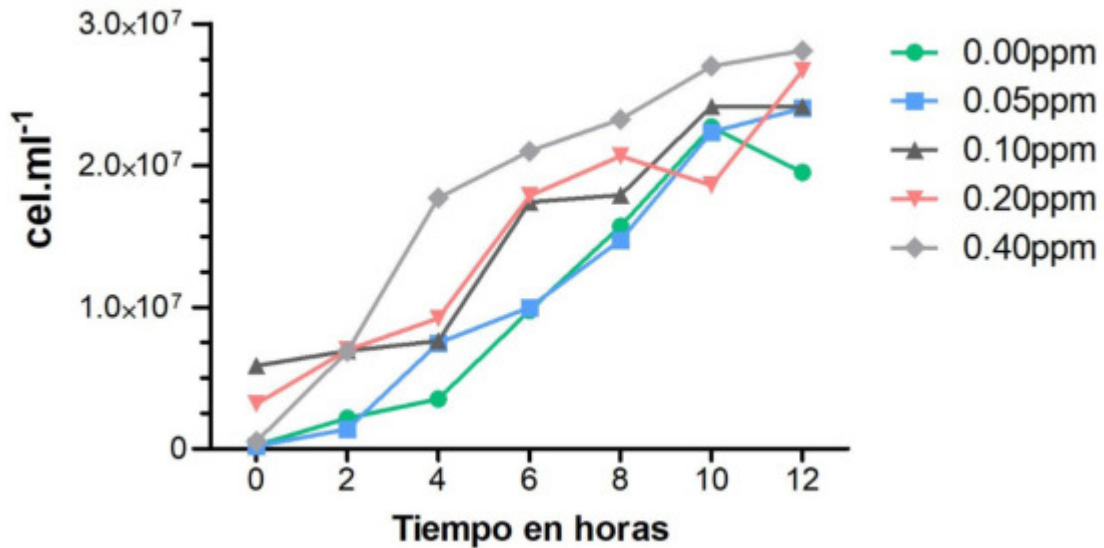


Figura 14. Crecimiento Microbiano de la Cepa O2 en tiempo de duplicación de 12 h. en diferentes concentraciones de Cromo. Elaborado por: Guevara, B. 2018 (El Autor).

La figura 14, indica el crecimiento bacteriano de la Cepa O2 (*Amycolaptosis albispota*) en las diferentes concentraciones de cromo probadas, esta cepa presento excelentes crecimientos significativos, el mejor crecimiento bacteriano fue de aproximadamente $3,0 \times 10^7$ cel.ml⁻¹ a una concentración de 0,40ppm indicando una que esta cepa tiene buena adaptación en presencia de cromo hasta las 12 horas de ensayo, el segundo mejor crecimiento fue de aproximadamente $2,8 \times 10^7$ en una concentración de 0,20 ppm.

6.3.3. Crecimiento microbiano de la Cepa O4 en tiempo de duplicación de 12 horas en presencia de Concentraciones de Cromo.

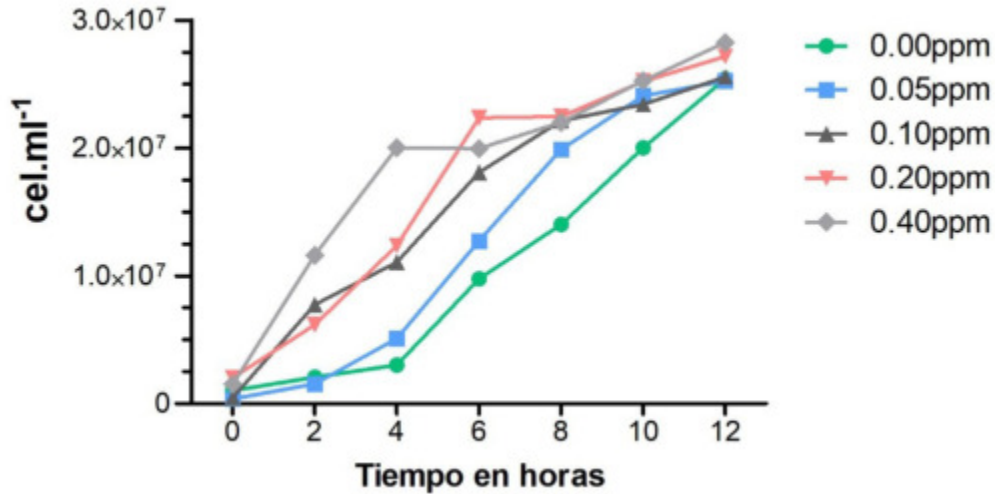


Figura 15 Crecimiento microbiano de la Cepa O4 en tiempo de duplicación de 12 horas en diferentes concentraciones. Elaborado por Guevara, B. 2018 (El Autor)

La figura 15, indica el crecimiento microbiano de la Cepa O4 (*Enterococcus haemoperoxidus*) en las diferentes concentraciones de cromo probadas, esta cepa presento excelentes crecimientos significativos en todas las concentraciones de cromo, el mejor crecimiento bacteriano fue de aproximadamente de $2,9 \times 10^7$ cel.ml⁻¹ a una concentración de 0,40ppm a las 12 horas, indicando que esta cepa tiene buena adaptación a el estrés colocado de cromo , el segundo mejor crecimiento fue de aproximadamente $2,8 \times 10^7$ en una concentración de 0,20 ppm. Indicando esta cepa tiene una buena resistencia a las concentraciones de Cromo colocadas.

6.3.4. Prueba de Crecimiento microbiano de la Cepa O5 en tiempo de duplicación de 12 horas en presencia de Cromo.

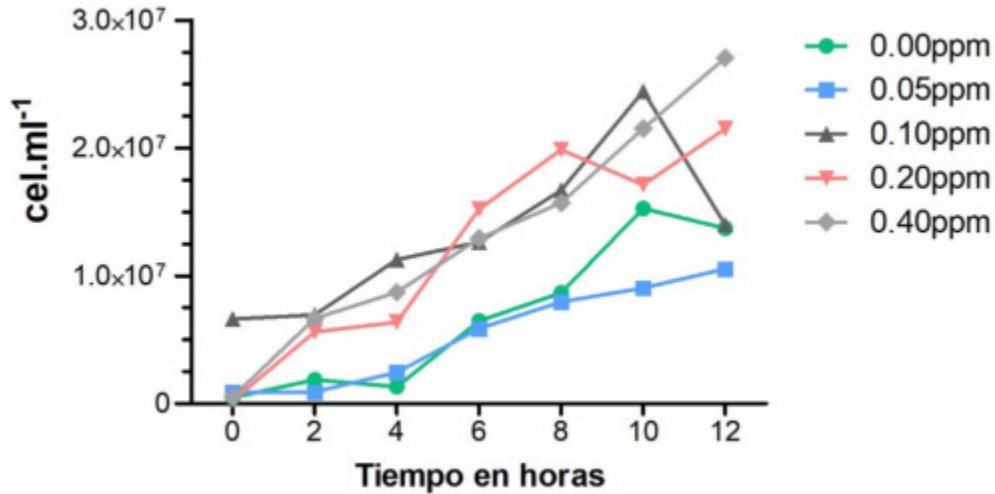


Figura 16 Crecimiento bacteriano de la Cepa O5 en tiempo de duplicación de 12h. a diferentes concentraciones. Elaborado por Guevara, B. 2018 (El Autor)

La figura 16, indica el crecimiento microbiano de la Cepa O5 (*Staphylococcus haemolyticus*) a las diferentes concentraciones de cromo probadas, esta cepa presento 3 excelentes crecimientos, el mejor crecimiento bacteriano fue a la concentración de 0,40 ppm de cromo de aproximadamente $2,9 \times 10^7$ cel.ml⁻¹ a las 12 horas, el segundo mejor crecimiento fue de aproximadamente $2,5 \times 10^7$ en una concentración de 0,20 ppm a las 10 horas y el tercero a una concentración de 0,10 ppm de cromo de aproximadamente $2,5 \times 10^7$ cel.ml⁻¹ a las diez horas de ensayo, indicando la buena resistencia de la cepa en las distintas concentraciones de cromo colocadas .

6.3.5. Prueba de crecimiento microbiano de la Cepa O8 en tiempo de duplicación de 12 horas en concentraciones de Cromo.

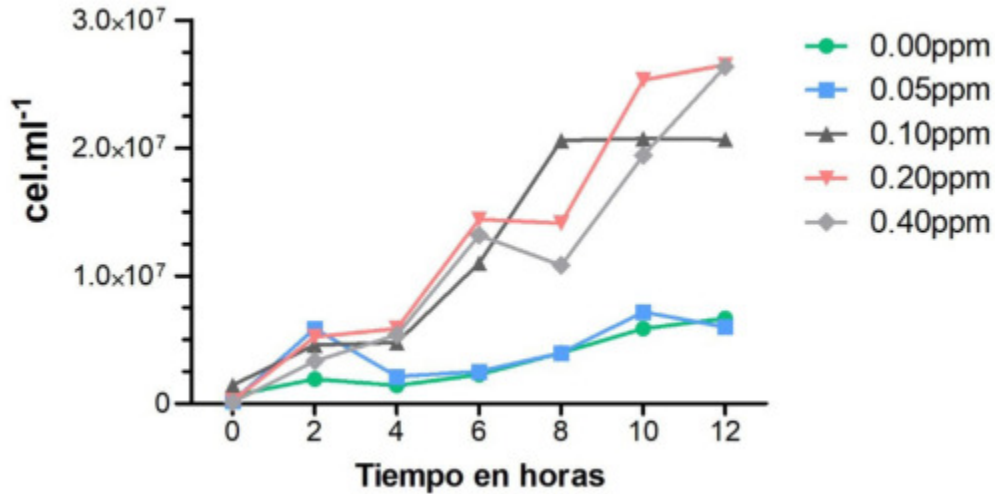


Figura 17. Crecimiento bacteriano de la Cepa O8 en un tiempo de duplicación de 12h. a diferentes concentraciones.

Elaborado por Guevara, B. 2018 (El Autor)

La figura 17, indica el crecimiento microbiano de la Cepa O8 (*Bacillus cerus*) en las diferentes concentraciones de cromo probadas, esta cepa presento 2 excelentes crecimientos, el mejor crecimiento microbiano fue a la concentración de 0,20 ppm de aproximadamente $2,8 \times 10^7$ cel.ml⁻¹ a las 12 horas de ensayo, el segundo mejor crecimiento fue a la concentración de 0,40 ppm de cromo de $2,7 \times 10^7$ cel.ml⁻¹ indicando que esta cepa tiene buena resistenciencia a las distintas concentraciones de cromo colocadas.

6.3.5.1. ADEVA para Reducción de Cromo de la Cepa O8

Tabla 12.

Análisis de Varianza para Reducción de Cromo de la Cepa O8

	FV	GL	SC	CM	F cal	F (0.05)	F(0.01)	(P < 0.05)	
Tratamiento		4	18250	4563	631400	3.478	5.99	0.0001	***
Residual		10	0.07227	0.007227					
Total		14	18250						
C.V					0.01%				

Nota. Datos obtenidos de Graphpad prism por Guevara, B. 2018 (El Autor)

Simbología: **FV:** Factor de las variables, **GL:** Grados de Libertad, **SC:** Sumatoria de Cuadrados, **CM:** Cuadrado Medio, **C.V:** Coeficiente de variación.

La tabla 12, indica el análisis de varianza y el coeficiente de variación realizado a cada uno de los tratamientos, en este caso el CV corresponde a 0.01% lo cual demuestra que el ensayo junto con la variable estuvo bien realizado, además se evidencia que existen diferencias altamente significativas (*) los 5 tratamientos realizados.

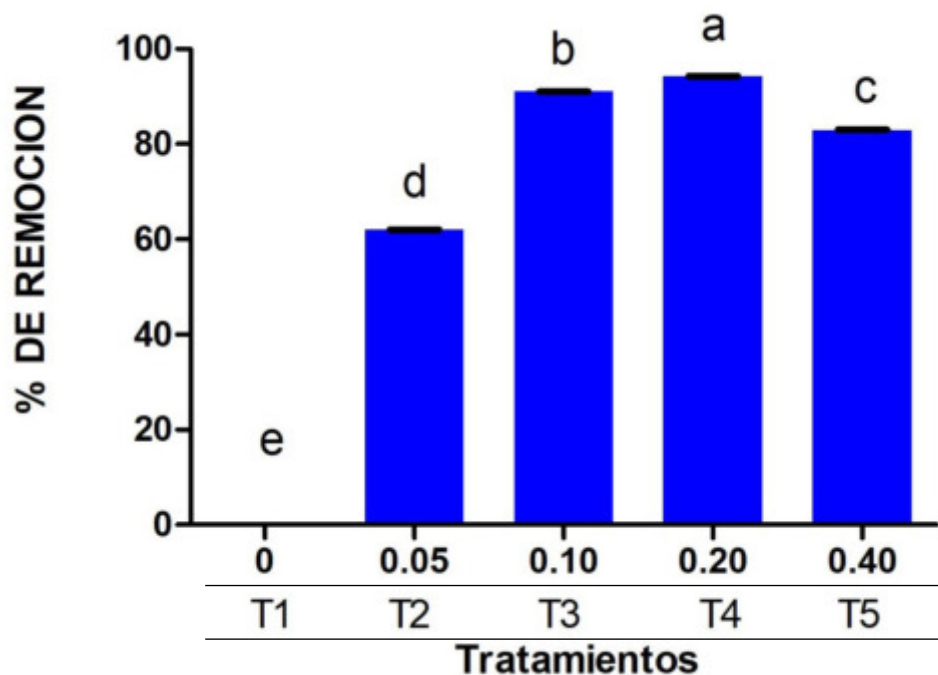


Figura 18. Prueba de Tukey al 5 % de tratamientos de remoción de Cromo de la Cepa O8. Elaborado por Guevara, B. 2018 (El Autor)

La figura 18, indica la prueba de significancia Tukey al 5 % conformando por cinco grupos, el primero de ellos el grupo “a” representado por el T4 (concentración de cromo de 0,20 ppm) con un porcentaje de reducción de 94,25 %, en un intervalo medio se encontraron los grupos “b” representado por T3 (concentración 0,10 ppm) donde se produjo una remoción del 91,00%, los grupos “c y d” (concentraciones 0,05 y 0,40 ppm) respectivamente muestran porcentajes de remoción superiores al 60% lo que indica que la Cepa *Bacillus cereus* es buen removedor de cromo en altas y bajas concentraciones del metal.

6.3.6. Crecimiento microbiano de la Cepa O10 en tiempo de duplicación de 12 horas

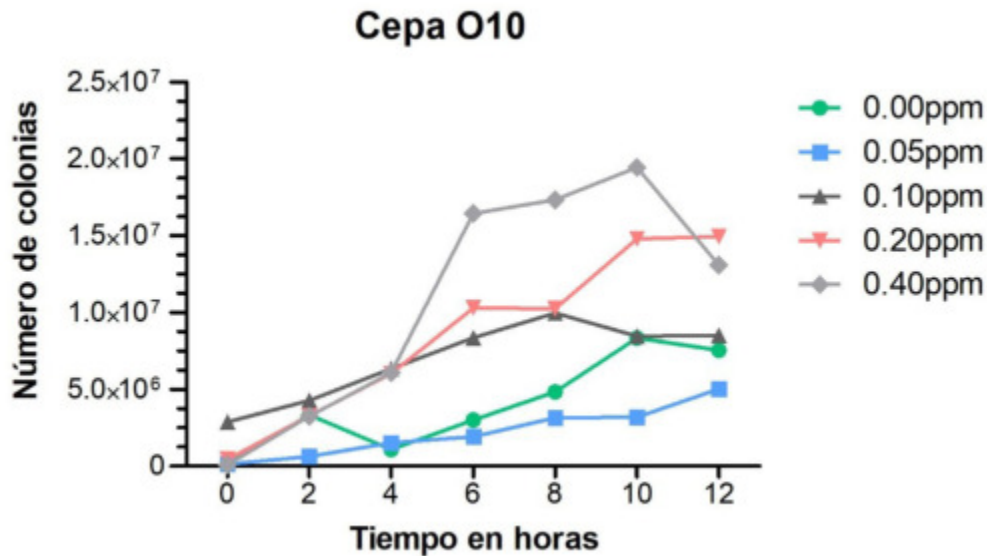


Figura 19 Crecimiento bacteriano de la Cepa O10 en un tiempo de duplicación de 12h. a diferentes concentraciones. Elaborado por Guevara, B. 2018 (El Autor)

La figura 19, indica el crecimiento celular de la Cepa O10 (*Maribacter chugangensis*) en las diferentes concentraciones de cromo probadas, esta cepa presenta como mejor crecimiento un valor de $2,0 \times 10^7$ cel.ml⁻¹ a una concentración de 0,40 ppm a las 10 horas, se evidencia un decaimiento de crecimiento en la misma concentración a las 12 horas lo que puede ser por el ahorro de energía que proporciona las células cuando están por terminar los nutrientes del lugar de crecimiento.

De acuerdo con los resultados obtenidos del análisis estadístico se puede observar que la Cepa con el código O8 (*Bacillus cerus*) presentó la mejor remoción de Cromo dando como resultado un valor de 94,25% en concentración 0,20ppm de Cromo, lo que permite concluir que esta bacteria posee un gran potencial biorremediador pues presenta la capacidad de remover el metal en alta concentración en un corto tiempo de acción.

La Cepa O1 (*Pseudomona* sp.) fue la segunda mejor cepa de las 6 cepas encontradas obteniendo un valor de remoción de Cromo de 93,250% en una concentración de 0,40ppm.

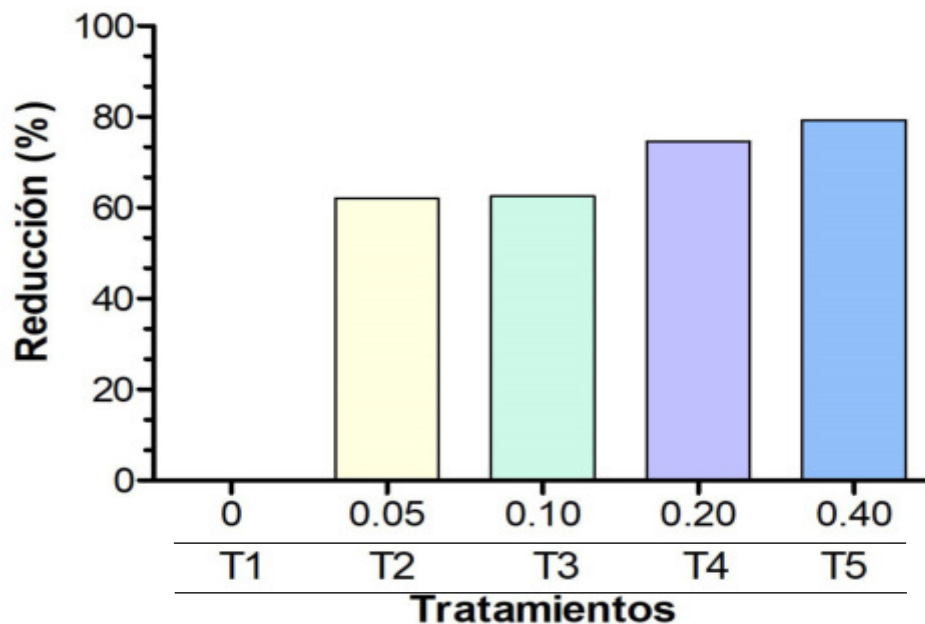


Figura 20. Gráfico de barras de error al 5% (Prueba de Kruskal wallis). Elaborado por Guevara, B. 2018 (El Autor)

Como se aprecia en la figura 20, las seis cepas estudiadas presentaron una buena remoción de cromo en la concentración 4 (0,40 ppm) cromo presentando un promedio mayor de reducción del 79,289%, como segunda mejor remoción la Concentración 3 (0,20 ppm) que presenta una media de remoción de cromo de 74,522% del metal.

Las razones por las que se puede dar una Buena disminución y adaptabilidad al cromo son debido a diversas interacciones contaminante-microorganismo, las cuales producen una cadena de procesos adaptivos que comúnmente se manifiesta como mecanismos de resistencia al metal (Montuelle, 1994). Por ende, la bacteria *Bacillus cerus* y *Pseudomona sp.* pudo efectuar mecanismos para remover el metal por medio de procesos como la biosorción, bioacumulacion o biotransformación, facilitando así su remoción o retención de cromo.

(Campos, 2007) indica que los microorganismos del género *Pseudomonas* y su grupo Proteobacterias poseen un metabolismo que les permite controlar la expresión de genes para adaptarse en ambientes contaminados por metales pesados y a su vez les confiere la capacidad de participar en la capacidad en la remoción de contaminantes, convirtiéndolos en una opción para ser empleados en procesos de biorremediación. (Bentley, 2002) y (Araujo, 2006) confirman dicha

información pues lograron aislar bacterias como: *Bacillus*, *Delfovibrio*, *Pseudomonas* y *Enterobacter* con la capacidad de reducir hasta el 80% de arsénico mientras que la presente investigación describe a *Bacillus cerus* como el mejor removedor con un valor de remoción del metal del 94,250%

Finalmente queda demostrado el potencial remediador de *Bacillus cerus* ya que al finalizar el tratamiento se obtuvo una concentración final de cromo de 0,1885 ppm, y 0,373 ppm de la especie *Pseudomonas sp.*, valores que se encuentran dentro del límite máximo permisible para descarga de agua en alcantarillado como indica el Libro VI del TULSMA.

Existieron contrastes evidentes en el crecimiento bacteriano al utilizar distintas concentraciones del metal. Los resultados indicaron que las concentraciones de 0,20ppm y 0,40ppm de cromo resultaron ser el medio indicado para el en un tiempo de 10 a 12 horas, las cepas bacterianas indicadas en este estudio, presentaron un mayor crecimiento llegando a obtener un promedio máximo de crecimiento de $3,0 \times 10^7$ cel.ml⁻¹, $2,8 \times 10^7$ cel.ml⁻¹, $2,8 \times 10^7$ cel.ml⁻¹, $2,8 \times 10^7$ cel.ml⁻¹, $2,6 \times 10^7$ cel.ml⁻¹ para las cepas O1, O2, O4, O5, O8 respectivamente, mientras que en la cepa O10 se obtuvo un crecimiento menor llegándose a obtener de $2,0 \times 10^7$ cel.ml⁻¹ en un tiempo de duplicación celular de 12 horas, (Campos, 2007) indica en sus anunciados que los valores promedio de crecimiento para lograr una buena degradación de sustancias llegan a una concentración de 10^6 cel.ml⁻¹, por lo que puedo demostrar que las cepas bacterianas obtenidas en este estudio son aptas para remediar el agua contaminada con presencia del metal en el que se encuentra expuesto debido a su gran potencial de crecimiento.

El crecimiento de las cepas estudiadas indicó que en los medios que no había concentración de cromo la densidad poblacional se mantuvo constante es decir que no hubo un incremento o descenso de crecimiento de bacterias, (Silver, 1992) indica que las células se encontraban en una fase de dominancia la cual se genera cuando hay pocos nutrientes y se produce una respuesta general de estrés en la que la velocidad de crecimiento disminuye o se mantiene constante para así reducir la cantidad necesaria de nutrientes. (Amat, 2014) atribuye a que puede sustentar que la cantidad de cromo presente es utilizado por las bacterias en su proceso metabólico y al no encontrarse la cantidad adecuada de cromo en los microorganismos generan un mecanismo en el cual detienen su desarrollo para evitar un gasto energético innecesario.

Por otra parte en los medios que poseía mayor concentración de cromo se pudo evidenciar un mejor patrón de crecimiento lo que se debe a que las bacterias provienen de un medio contaminado y es posible que el estrés ocasionado por la toxicidad del metal ocasione que se hayan adaptado al cromo y lo utilice en su proceso metabólico como lo señalan (Silver, 1992) quienes objetan que la presencia de un contaminante ocasiona una fuerte presión de selección en los microorganismos que allí viven y si la descarga del contaminante se da de manera permanente, como regularmente sucede con los metales pesados, se origina una selección de los genotipos que pueden resistir el estrés a la presencia del metal.

Por lo anteriormente expuesto y los resultados obtenidos se comprueba que la resistencia presentada por las cepas se debe a que son bacterias resistentes que pueden desarrollarse en concentraciones de cromo mayores a las que se encuentra en aguas contaminadas por procesos industriales.

La resistencia bacteriana está codificada por adaptaciones metabólicas y enzimáticas que les permiten sobrevivir en medios con altas concentraciones de metales pesados, dentro de los géneros identificados que poseen estas cualidades son *Pseudomonas*, *Bacilos*, entre otros estudios similares como los realizados por (Cheng, 2003) (Mohankumar, 2016) identificaron especies bacterianas resistentes a metales pesados correspondientes a estos géneros, lo que nos indica que las cepas se encuentran adaptadas al metal debido a que provienen de ambientes contaminados.

Finalmente de las seis cepas estudiadas la que presentó mayor crecimiento fue la cepa O1 con un promedio de $3,0 \times 10^7 \text{ cel. ml}^{-1}$, por lo que se deduce que esta cepa tiene la capacidad de regular su densidad poblacional bajo diferentes concentraciones con cromo, esto probablemente se debe a una acumulación gradual del metaloide y su alta resistencia, lo cual le ha ocasionado que esta cepa haya concebido un proceso de adaptabilidad durante el proceso de evolución, mediante procesos enzimáticos y metabólicos los cuales le permiten a la cepa contrarrestar el efecto a elevadas concentraciones de cromo como indica (Rajendra, 2003) por lo tanto la cepa O1 es la más apta para ser empleada en procesos de biorremediación debido a su amplia diversidad metabólica y funcional.

6.4. Análisis de secuencia

La caracterización molecular de las cepas bacterianas se realizó por medio de la técnica de extracción de ADN. Las muestras fueron extraídas, purificadas, amplificadas y la identificación bacteriana mediante la utilización del software BLAST (software basado en un algoritmo heurístico que compara la secuencia por identificar con millones de secuencias reportadas en bancos genéticos).

La secuencia 16s ADNr de las cepas se corrieron a través del programa BLAST donde se cotejaron las secuencias de las muestras con las bibliotecas genéticas del National Center for Biotechnology Información (NCBI), se consideró valores de significancia y porcentajes de similitud superiores al 95% para la asignación del taxón género y especie.

Las secuencias relativas más cercanas analizadas en el Gen Bank como se indica en la tabla indicaron que los principales *phylum* bacterianos encontrados fueron:

Tabla 13.

Secuencias cercanas analizadas por BLAST

Código	Secuencia relativa más cercana	Grupo bacteriano	Identidad (%)	Gen Bank No Acceso
O1	<i>Pseudomonas sp.</i>	Proteobacteria	96	CP011566.1
O2	<i>Amycolatopsis albispota</i>	Actinobacteria	100	L36679
O4	<i>Enterococcus haemoperoxidus</i>	Proteobacteria	100	NR 028795.1
O5	<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	Firmicutes	100	NC007168.1
O8	<i>Bacillus cereus</i>	Bacilli	100	HD130
O10	<i>Maribacter chugangensis</i>	Firmicutes	95	NR109444.1

Nota. Datos obtenidos de Blast por Guevara, B. 2018 (El Autor)

En esta investigación se realizó la identificación de bacterias que tengan la capacidad de remover el cromo presente en el agua residual de textileras, para lo cual a través de la secuenciación de cepas por el programa Blast se identificó la especie *Pseudomonas sp.* la que (Castillo, 2015) en su investigación evaluó una especie de *Pseudomona fluorescens* con la capacidad de reducción de Cr VI a través de un cultivo aislado del agua residual de una curtiembre con la finalidad de utilizar esta especie en futuros tratamientos de biorremediación de aguas residuales contaminadas por cromo.

En la investigación de (Cervantes, 2007) encontró la especie *Pseudomona Fluorencns* aislada de suelo contaminado de vertiente de agua residual de textileras donde evidencio la resistencia de la bacteria al cromo, lo que quiere decir que el género *Pseudomona* es un buen agente biótico para remover Cromo de lugares contaminados.

En otras experiencias realizadas con varios metales, se pudo comprobar que los filos Proteobacteria y Firmicutes son considerados como potenciales microorganismos para procesos de biorremediación de zonas industriales contaminados, debido a su capacidad para formar biopelículas microbianas (Cano, 2008).

(Amoroso, 2013) En su investigación muestran varias aplicaciones sobre las *Actinobacterias* y manifiestan que son excelentes biorremediadores de ambientes contaminados, lo que fue confirmado por (Quiñones, 2016) quienes informaron que el grupo de *Actinobacteria* tiene la capacidad de degradar diversas moléculas como hidrocarburos de petróleo, detergentes, metales pesados, entre otros.

Entre los datos moleculares y las pruebas bioquímicas en la investigación de (Collazos, 2016) menciona que la especie *Bacillus sp.* Mostrase un magnifico potencial de remediación de cromo hexavalente aislado el cual fue asilado de aguas residuales industriales contaminado con metales pesados.

6.5. Socialización de la Investigación

La socialización de la investigación se llevó a cabo en el transcurso del 2do. Congreso de Microbiología Molecular y Aplicada, impartido en por La Universidad San Francisco de Quito el día 31 de junio hasta el 03 de agosto, con la participación de la American Society For Microbiology y el Instituto de Microbiología (COCIBA) de la Universidad San Francisco de la

ciudad de Quito, docentes y estudiantes de la USFQ, y público en general. En la presentación de la investigación estuvieron presente 19 personas.

Para tener un contexto de la investigación se presentó la importancia del proyecto realizado, la problemática que abarca la contaminación del Cromo en el medio ambiente y la importancia de uso de microorganismos como potenciales biorremediadores de metales pesados gracias a sus mecanismos de remoción que poseen las bacterias encontradas, seguido de los objetivos propuestos, la metodología aplicada, los resultados obtenidos y las conclusiones obtenidas en esta investigación.

Las preguntas de las encuestas presentan resultados altos y muy altos como se indican en las figuras 21, 22, 23, 24 las preguntas efectuadas fueron:

- ¿Considera Usted que el tema investigado posee relevancia para algún actor y / o sector de la sociedad?

Al consultar a los participantes la relevancia para algún actor o sector de la sociedad muestra que el 15,79 % personas indicaron que el tema investigado es alto y el 84,21% de los encuestados respondieron que el proyecto tiene una relevancia muy alta para algún actor y/o sector de la sociedad.

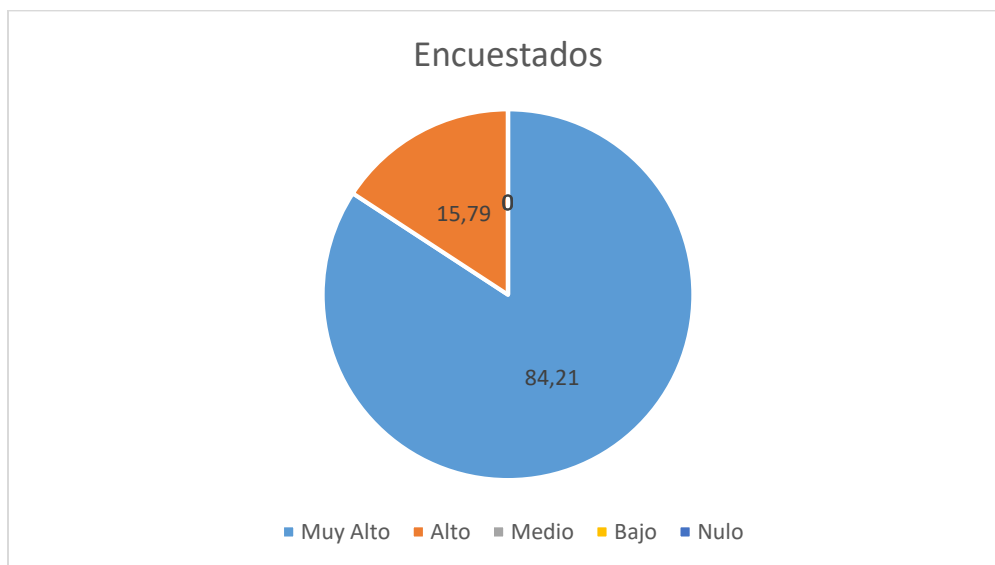


Figura 21 Gráfico de la Relevancia que tiene el tema investigado en la sociedad. Elaborado por Guevara, B. 2018 (el autor)

- ¿Considera Usted que esta investigación posee perspectivas para estudios complementarios posteriores?

En la figura 22, muestra que el 73,68 % de personas encuestadas indicaron que la investigación presentada posee muy altas perspectivas para estudios complementarios en nivel alto.

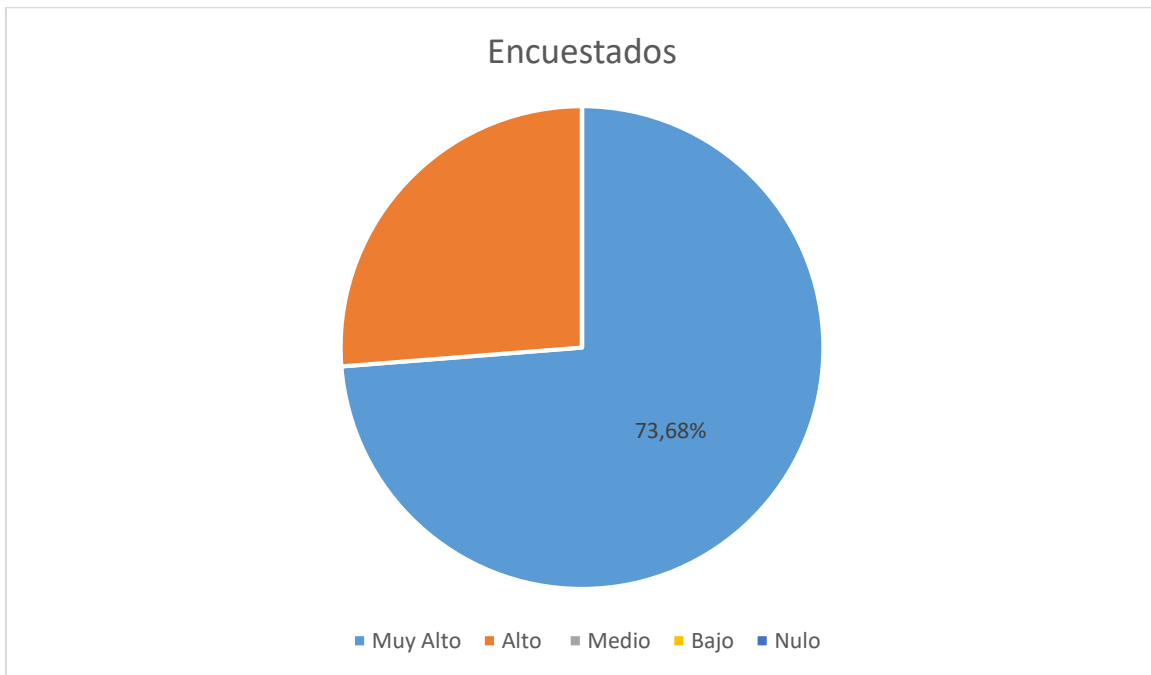


Figura 22 Gráfico de las perspectivas de la investigación para estudios complementarios. Elaborado por Guevara, B. 2018 (El Autor)

- ¿Considera Usted que en el tema investigado genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución?
En la figura 23, indica que el 36,84 % de los encuestados respondieron que el tema investigado presenta perspectivas para estudios complementarios y el 63,16% indican un nivel muy alto.

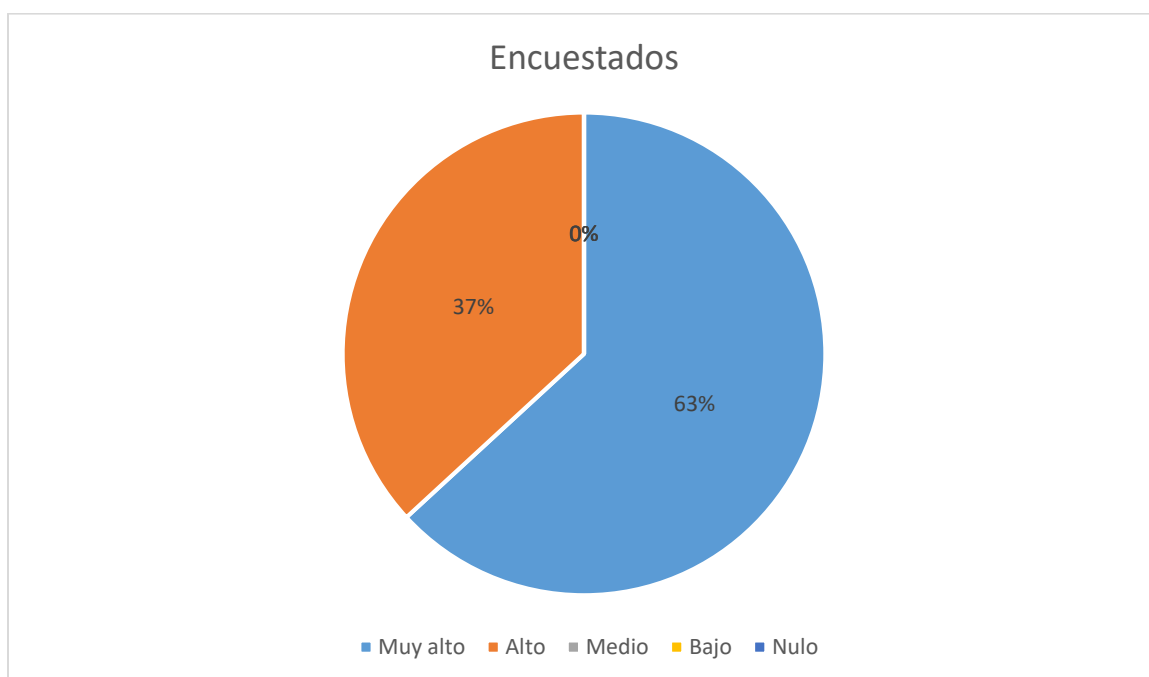


Figura 23 Gráfico de si el tema investigado presenta un beneficio a futuro concreto para alguna organización.
Elaborado por Guevara, B. 2018 (El Autor)

- ¿En función de los objetivos planteados expuestos en la investigación, considera Usted que estos se cumplieron?
La figura 24, indica que el 5,26 % de las personas encuestadas respondieron que el tema investigado presenta un nivel alto, el 94,74% respondieron en un nivel muy alto de cumplimiento de los objetivos expuestos. Los asistentes llenaron encuestas para dejar constancia de la actividad realizada.



Figura 24. Gráfico de cumplimiento de objetivos propuestos en la investigación. Elaborado por Guevara, B. 2018 (El Autor)

7. CONCLUSIONES

- Las características del agua estudiada presentan parámetros fuera de los límites máximos permisible para agua de uso humano y uso domestico como estipula el Tulsma libro VI anexo 1, como el pH (2,73 / LMP 6-8), Color (1110 / LMP 0 UC), DQO (21000 mg. l⁻¹ / LMP 500), Cromo (1,25 / LMP 0,05 mg. l⁻¹)
- La calidad de agua obtenida por actividades de tinturado de prendas textiles presenta características contaminantes las cuales un pH de 2,73, un color de 1100 Uc, una DBO de 21,000 mg. l⁻¹, Cromo 1,25 mg. l⁻¹ los cuales fueron ideales para encontrar Cepas remediadoras de Cromo.
- Se logro aislar 6 Cepas remediadoras del metal a una concentración de 0,05 mg. l⁻¹ de Cromo (Límite máximo permisible para agua de consumo humano y uso doméstico TULSMA) donde se identificó las especies: *Pseudomona sp*, *Amycolaptosis albispora*, *Enterococcus haemoperoxidus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Bacillus cerus*, *Maribacter chugangensis*.
- La especie *Pseudomona sp* fue la cepa que presento un excelente crecimiento con un promedio de $2,8 \times 10^{-7}$ cel.ml⁻¹ en un tiempo de crecimiento celular de doce horas a una concentración de 0,40 ppm de Cromo.
- El Análisis filo genético indicó que los principales *Phylum* encontrados en el ensayo fueron: *Firmicutes*, *Proteobacterias*, *Actinobatcerias*.
- La especie *Bacillus cerus* presento la mejor remoción de Cromo con un porcentaje de 94,25% en una concentración de 0,20 ppm de Cromo y la *Pseudomona sp*. presento un valor de 93,25% a una concentración de 0,40 ppm.
- Las personas que se dieron cita a la socialización del proyecto mostraron gran agrado debido a la presentación del potencial Industrial de microorganismos remediadores de Cromo que se aislarón del agua contaminada.

8. RECOMENDACIONES

- En base a los resultados obtenidos en el presente estudio, se recomienda investigar más a fondo las cepas bacterianas identificadas para evaluar su máxima capacidad de remediación ambiental a más concentraciones de Cromo.
- En el presente trabajo se experimentó el crecimiento bacteriano y la remoción del metal para cada cepa, así que sería importante continuar con el estudio formando un consorcio bacteriano.
- Con la continuidad de esta investigación se puede probar las bacterias identificadas en una planta de tratamiento a pequeña escala con el fin de comprobar su eficacia de remoción del metal en condiciones naturales.
- Se recomienda probar las cepas encontradas como bio indicadores de contaminación ambiental en lugares de actividades contaminantes con metales pesados ya que se comprobó que estos microorganismos resisten elevadas concentraciones de Cromo.

9. BIBLIOGRAFIA

- Abed, R., Safi, N., Köster, J., Beer, D., El Nahhal, Y., Rullkötter, J. y García, F. (2002). Microbial diversity of a heavily polluted microbial mat and its community changes following degradation of petroleum compounds. *Applied and environmental microbiology* 68, 1674-1683.
- Ademoroti, A., Ukponmwan, O., Omode, A. (1992). Studies of textile effluent discharges in Nigeria. *Int. J. Environ. Stud.* 39, 291-296.
- Alam M., Z., Ahmad S. . (2011). Toxic chromate reduction by resistant and sensitive bacteria isolated from tannery effluent contaminated soil. *Ann Microbiol.*, 113-121.
- Amoroso, M. J. (2013). Actinobacteria: application in bioremediation and production of industrial enzymes: *CRC Press* 13, 114-120.
- Amoroso, S. M., & Nies., V. R. (2000). evidence for high affinity nickel transporter genes in heavy metal resistant streptomyces spec. *Journal of basic Microbiology* Basic, 40(5-6). 295-301.
- Anjaneyulu Y., Sreedhara-chary N. y Suman - Raj S.,. (2005). Decolourization of industrial effluents - available methods and emerging technologies. *Environ. Sci. Technol.*, 4,, 245-273.
- Anjaneyulu Y., Suman- Raj S. (2005). Decolourization of industrial effluents – available methods and emerging technologies. *Rev. Environ. Sci. Technol*, 245-273.
- Araujo, I. M. (2006). Lodos estabilizados y cepas bacterianas en la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Interciencia*, 31, 268-275.
- Aristizabal, A., & Bermudez, M. C. (Noviembre de 2007). Estudio de la factibilidad de. *Medellin*. Obtenido de Un sistema de electrocoagulación para tratamiento de aguas: <http://www.scielo.org.co/pdf/cein/v20n1/v20n1a03.pdf>
- Bae S.J., Freeman S.H. Kim D.S. (2006). Influences of new azo dyes to the aquatic ecosystem. *Fiber Polymer.*, 7, 30-35.
- Bentley, R. &. (2002). Microbial methylation of metalloids: arsenic, antimony, and Bismuth. *Microbiol Mol Biol Rev*, 66(2), 250-271.
- Bojórquez. (Septiembre de 2010). Descontaminación de agua por bacterias resistentes a cromo, aisladas del Río Lerma - RI UAE, Mex. Obtenido de http://ri.uaemex.mx/bitstream/handle/20.500.11799/80076/TESIS_Yesica.pdf?sequence=1
- Borst-Pauwels, G. W. (1981). Ion Transport in yeast. *Biochimica et Biophysica. Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 650(2-3), 88-127.

- Bruins MR., Kapil S., Oehme FW. (2000). Microbial resistance to metals in the environment. *Ecotoxicol Environ Saf* 45, 198-207.
- Brune KD., Bayer TS. (2012). Engineering microbial consortia to enhance biomining and bioremediation. *Front Microbiol* 3 (1), 203.
- Buitrón, F. (Marzo de 2014). Plan de Ordenamiento territorial del Cantón Antonio Ante. Atuntaqui: Gobierno Autónomo Descentralizado Municipal de Antonio Ante. Obtenido de https://www.antonioante.gob.ec/AntonioAnte/images/PDF/plan_desarrollo_cantonal_2011.pdf
- Campos, V. V. (2007). Aislamiento de bacterias resistentes a arsénico desde muestras de rocas volcánicas de la quebrada Camarones, Región Parícuta. *Rev. Chile. Guayana (Concepción)*, 71, 150-155.
- Campos, V. V. (2007). Aislamiento de bacterias resistentes a metales pesados de muestras de rocas volcánicas de la quebrada Camarones, región Parícuta: Chile. *Rev. Guayana (Concepción)*, 71, 150-155.
- Cano, E. T. (18 de Agosto de 2008). Identificación y caracterización de microorganismos con resistencia a compuestos mercuriales. Obtenido de <https://docplayer.es/25171458-Identificación-y-caracterización-de-microorganismos-con-resistencia-a-compuestos-mercuriales.html>
- Cañizares. (2000). Biosorción de metales pesados mediante el uso de biomasa microbiana. *Rev. latinoamericana de Microbiología*, 42(3), 131-143.
- Castillo, S. (Septiembre de 2015). Pseudomonas Fluorescens reductora de Cromo VI a partir de agua residual de una curtiembre. Obtenido de <http://www.medigraphic.com/pdfs/lamicro/mi-2000/mi003f.pdf>
- Cervantes C., Espino-Saldana AE., Acevedo-Aguilar F., León R. (2006). Interacciones microbianas con metales pesados. *Lat Microbiol* 48(2), 203-210.
- Cervantes, C. & G. (2007). Reduction and efflux of chromate by bacteria. In: Nies, DH, Silver S (eds). *Rev. molecular Microbiology of Heavy Metals*, 407 - 420
- Cheng. (2003). Effects of Heavy Metals on Plants and Resistance Mechanisms. *Rev. Environmental Science and Pollution research*, 10(4), 256-264
- Cheung K. H., Gu J. D. (11 de Junio de 2011). Bacterias reductoras de Cromo y su potencial biotecnológico. Obtenido de Scielo: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v27n3/v27n3a8.pdf>
- Chung K.T y Stevens S.E.J. (1993). Decolourisation of azo dyes by environmental microorganisms and helminths. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12, 2121-2132.

- Collazos, A. M. (Agosto de 2016). Bacillus sp. G3 un microorganismo promisorio en la biorremediación de aguas industriales contaminadas con cromo hexavalente Nova Scientia vol 8 no. 17 Leon. Obtenido http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-07052016000200361.
- Cortázar, M., González, C., Olivares, C., Escalante, J., Castro J. . (Octubre de 2012). Biotecnología aplicada a la degradación de colorantes de la industria textil. Obtenido de Scielo: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-2979201200020009
- Cruz, A. Buitron, G. . (2001). Biodegradation of disperse blue 79 using sequence dan aerobic/anaerobic biofilters. *WaterScience and Technology* 44(4), 159-166
- De la Peña, M. Ducci, J., Zamora, V. (06 de Marzo de 2013). *Tratameinto de agaus residuales en mexico*. Obtenido de Banco interamericano de Desarrollo: http://www.sagua.org/sites/default/files/documentos/documentos/tratamiento_de_aguas_residuales
- De Moraes S.G., Freire R.S. y Duran N. (2000). Degradation an toxicity reduction of textile effluent by combined photocatalytic and ozonation processes. *Chemosphere*, 40, 369-373.
- Dönbak L., Rencuzogullari E., Topaktas M. y Sahin G. (2006). A biomonitoring study on the workers from textile dyeing plants. *Genetika.*, 42., 613-618.
- Dos Santos A., Crevantes F y Van-Lier J. (2006). Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: Perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresour. Technol.*, 98, 613-618.
- Gavril M. y Hodson P.V. (2007). Investigation of the Toxicity of the Products of Decoloration of Amaranth by Trametes versicolor. *J. Environ. Qual.*, 36, 1591-1598.
- Girden, E. R. (Junio de 1992). Repeated Mesures. Obtenido de Technometrics, <http://doi.org/102307/1270301>
- Galli, C. (2002). Degradación por medios bacterianos de compuestos químicos tóxicos. *Comisión Técnica Asesora en: Ambiente y desarrollo sostenible, Buenos Aires, Argentina*, 55-59.
- Golvleva, L., Aharonson, R. (1990). The rol and limitations of microorganism in the conversión of xenobiotics. *Puer and apl.. Chem* 62, 351-364.
- Halden, R., Tepp, S. (1999). Degradation of 3 phenoxybenzoic acid in soil by Pesudomonas pseudoalcaligenes POB310 (pPOB) and two Modified Pseudomonas Strains. *Applied and enviromental microbiology* 65, 3354-3359.
- Harris, D. C. (2005). Analisis Químico Cuantitativo 2da. edición . Reverte. Capitulo 16

- Huang L., Chai X., Chen G., Logan BE. (2011). Effect of set potential on hexavalent chromium reduction and electricity generation from biocathode microbial fuel cells. *Environ Sci. Technol* 11, 5025-5031.
- Julio, B. (Noviembre de 1999). "Chromium-resistant bacterial populations from a site heavily contaminated with hexavalent chromium", en *Water Air Soil pol.* 109:263-779. Obtenido de https://www.researchgate.net/publication/275951488_Aislamiento_de_bacterias_resistentes_y_transformadoras_de_crv_i_y_metil_pariation
- kocberber, d. y. (Noviembre de 2004). revista internacional de contaminacion ambiental. Obtenido de Scielo: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992011000300008
- Kuhad R.C., Sood N., Tripathi K.K., Singh A. y Ward O.P. (2004). Developments in microbial methods for the treatment of dye effluents. *Adv. Appl. Microbiol.*, 56, 185-213.
- Kuhad R.C., Sood N., Tripayhi K.K., Singh A. y Ward O.P. (2005). Developments in microbial methods for the treatment of dye effluents. *Appl. Microbiol.*, 56, 185-213.
- Lai, K Scrimhaw, M. (2002). Biotransformation and bioconcentration of steroid estrogens by *Chlorella vulgaris*. *Applied and enviromental Microbiology* 68, 859-864.
- Manu B. y Chaundhari S. (2002). Anaerobic decolorization of simulated textile wastewater containing azo dyes. *Biores. Technol.*, 82, 225-231.
- Marrero, D. &. (2010). Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. *CENIC Ciencias Biologicas*, 4(1), 67-78
- Marrero, J. D. (2010). Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediacion. *CENIC Ciencias Biologicas*, 41(1), 67-68
- Mathur N., Krisshnatrey. (2003). Toxic effects of textile printing industry effluents on liver. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 71, 453-457.
- Matur N., Krishanatrey R., Sharma S. y Sharma K.P. (2002). Anaerobic decolorization of simulated textile wastewater containing azo dyes. *Biores. Technol.*, 82, 225-231.
- Mendez, G. (2003). Tratamiento de aguas residuales de la industria textil. *Quimica viva*, 77. 106-111.
- Mergeay. (1991). Towards an understanding of the genetics of bacterial metal resistance. *Trends in Biotechnology*, 9(1), 17-24
- Modrego, L. &. (1994). Contaminación por metales pesados in Editorial CSIC - CSIC Press (Ed.). *Molecular and Cellular Biochemistry*, 222(vi), 41-47.

- Mohan, D., Pittman., C. U., & Steele, P. H. (2006). Pyrolysis of Wood/Biomass for Bio-oil: A Critical Review. . *Energy & Fuels*, 20(3), 848-889.
- Mohankumar, R. &. (2016). Antibiotic susceptibility and plasmid profile of heavy metal resistant *Pseudomonas* species, *Nova* 9(2), 211-215.
- Montuelle, B. L.-M. (1994). Toxicity of heavy metals to bacteria in sediments. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 53(5), 753-758.
- Morel, M. A.-B.-S. (2009). Cellular and biochemical response to Cr(VI) in *Stenotrophomonas* sp.: Research Letter. *FEMS Microbiology Letters*, 291(2), 162-168. :
- Nelder, M. &. (Octubre de 1989). Generalized linear models. Monographs on Statistics and Applied Probability. Obtenido de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/13535/1/UPS-QT11268.pdf>
- Nies, D. H. (1995). Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *Journal of Industrial Microbiology*, 14(2), 186-199
- Nies DH., Silver S. (1995). Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J Ind Microbiol Biotechnol* 14, 186-199.
- Nies DH., Silver S. (1999). Microbial heavy-metal resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 51, 730-750.
- Monge O., Guerrero P. (Octubre de 2009). Capacidad de adsorción del cromo de un consorcio bacteriano aislado del río San Pedro, Sonora. XXVIII Convención Internacional, Veracruz: Obtenido de: <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2611/1/T-ESPE-030039.pdf>
- Otiniano. (Septiembre de 2007). Biorremediación de Cromo En agua sintéticas por dos inoculos bacterianos nativos compuestos, a escala laboratorio . Obtenido de <https://repositorio.espe.edu.ec/bitstream/21000/2611/1/T-ESPE-030039.pdf>
- Pant, D., Adholeya, A. (2007). Biological approaches for treatment of distillery wastewater using whole bacterial cells,. *Bioresource technology*, 29, 179-196.
- Pearce, C., Lloyd, J. (2001). The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells, . *Dyes and Pigments*, 58, 179-196.
- Quiñones, E. E. (Noviembre de 2016). Los actinomicetos y su aplicación biotecnológica: Obtenido de <https://elementos.buap.mx/num101/pdf/59.pdf>.
- Ranganathan K., Jeyapaul S. y Sharma D. (2007). Assessment of water pollution in different bleaching based paper manufacturing and textile dyeing industries in India. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 363-372.
- Rehman A., Bhatti H. y Rehman H. (2008). Textile effluents affected seed germination and early growth of some winter vegetable crops: a case study. *Water Air Soil Pollut.*, 198, 155-163.

- Rivas., G. (2000). Caracterización de la biosorción del cromo con hueso de aceituna,. *Iberoamericana de micología* 20, 164-168.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., Nigman, P. (20001). Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource technology*, 77., 247-255.
- Schrenk, W. (17 de Septiembre de 1986). *Merck Química Chilena Soc. Ltda.* Obtenido de Fao.org: <http://www.fao.org/docrep/field/003/AB482S/AB482S04.htm>
- Silver, S. (1992). Gene regulation of plasmid - and chromosome - determined inorganic ion transport in bacteria. *Microbiological Reviews*, 56 (1), 195-228.
- Silver, S. (1998). Genes for all metals. A bacterial view of periodic table. *J Ind Microbiol Biotechnol.* , 1-12.
- Soto, C. G. (2010). Biotransformación de metales pesados presentes en lodos ribereños de los ríos Bogotá y Tunjuelo. *Nova*, 195-205:
- Soto, G. R. (2010). Bitransformación de metales pesados presentes en lodos ribereños de los ríos Bogotá y Tujuendo. *Nova*, 195-205:
- Sueiro, F. (Noviembre de 2012). Caracterización de la resistencia a metales pesados y búsqueda de integrones en cepas de *Delfia* sp. Obtenido de <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/13535/1/UPS-QT11268.pdf>
- Vasques, M. y Reyes, W. (2002). Degradación de Aroclor 1242 por *Pseudomas* sp. *Biblioteca Nacional del Perú*, 112-118.
- Victor, L., Martín, C. (Septiembre de 2015). *Gestión de los efluentes de la industria Textil.* Obtenido de Cuaderno tecnológico N°18: <https://www.inti.gob.ar/ue/pdf/publicaciones/cuadernillo18.pdf>
- Vullo, D. (diciembre de 2003). Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. Obtenido de Química Viva: <http://www.redalyc.org/html/863/86320303/>
- Xicota, E. (15 de Noviembre de 2015). Comunicación de sustentabilidad y RSE. Obtenido de Expok: <https://www.expoknews.com/impactos-del-proceso-de-tenido-textil/>
- Zamágorra, G. (Julio de 2010). proyecto de titulación (Muñoz & Infante). Obtenido de <https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/18564/Proyecto%20de%20Titulaci%C3%B3n%20de%20Mu%C3%B1oz%20y%20Infante%20Reducci%C3%B3n%20de%20Cr%20VI%20mediante%20un%20consorcio%20mixto.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

ANEXOS

Anexo 1. DEL LIBRO vi DEL TEXTO UNIFICADO DE LEGISLACION SECUNDARIA DEL MINISTERIO DEL AMBIENTE NORMA DE CALIDAD AMBIENTAL Y DE DESCARGA DE EFLUENTES AL RECURSO AGUA.

5.2.3.6 Las descargas al sistema de alcantarillado provenientes de actividades sujetas a regularización, deberán cumplir, al menos, con los valores establecidos en la **TABLA 9**, en la cual las concentraciones corresponden a valores medios diarios.

TABLA 9. Límites de descarga al sistema de alcantarillado público

Parámetros	Expresado como	Unidad	Límite máximo permisible
Aceites y grasas	Solubles en hexano	mg/l	70,0
Explosivos o inflamables.	Sustancias	mg/l	Cero
Alkil mercurio		mg/l	No detectable
Aluminio	Al	mg/l	5,0
Arsénico total	As	mg/l	0,1
Cadmio	Cd	mg/l	0,02
Cianuro total	CN	mg/l	1,0
Cinc	Zn	mg/l	10,0
Cloro Activo	Cl	mg/l	0,5
Cloroformo	Extracto carbón cloroformo	mg/l	0,1
Cobalto total	Co	mg/l	0,5
Cobre	Cu	mg/l	1,0
Compuestos fenólicos	Expresado como fenol	mg/l	0,2
Compuestos organoclorados	Organoclorados totales	mg/l	0,05
Cromo Hexavalente	Cr ⁶⁺	mg/l	0,5
Demanda Bioquímica de Oxígeno (5 días)	DBO ₅	mg/l	250,0
Demanda Química de Oxígeno	DQO	mg/l	500,0
Dicloroetileno	Dicloroetileno	mg/l	1,0
Fósforo Total	P	mg/l	15,0
Hidrocarburos Totales de Petróleo	TPH	mg/l	20,0
Hierro total	Fe	mg/l	25,0
Manganeso total	Mn	mg/l	10,0
Mercurio (total)	Hg	mg/l	0,01
Níquel	Ni	mg/l	2,0

Fuente: Ministerio del Ambiente 2018

ANEXO N° 2 Medios de cultivo

- **Caldo Luria Bertani**

Composición en g/L:

Peptona tríptica de caseína....	10,00
Extracto de levadura.....	5,00
NaCl.....	10,00

Preparación: Disolver 25 g del polvo en un litro de agua destilada. Esterilizar en autoclave durante 20 minutos a 121 °C.

- **Agar Luria Bertani**

Composición en g/L:

Triptona.....	10,00
Extracto de levadura.....	5,00
NaCl.....	10,00
Agar.....	15,00

Preparación: Disolver 40 g del polvo en un litro de agua destilada. Esterilizar en autoclave durante 20 minutos a 121 °C.

ANEXO N° 4 Soluciones utilizadas

- Lysozyme Digestion Buffer (25 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2.5 mM EDTA, 1% Triton)

Tris-HCl 25 mM.....	0,393 g
EDTA 2.5 mM.....	0,093 g
Tritón 1%.....	1 ml
Agua destilada.....	Aforar a 50 ml

- TE Buffer (10 mM Tris-HCL, pH 8.0, 0,01 mM EDTA)

Tris-HCl 10 mM..... 0,0393 g
 EDTA 0.01 mM..... 0,9 mg
 Agua destilada..... Aforar a 25 ml

- Solución stock del gel de Agarosa al 2%

Agarosa..... 2 g
 TAE 1X..... Aforar a 100 ml
 Diamond™ Nucleic..... 5 µL
 Acid Dye



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR
 SEDE IBARRA**

**ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS Y AMBIENTALES
 VINCULACIÓN CON LA COMUNIDAD**

PROCESO DE SOCIALIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN

ANEXO N° 3 Encuesta de socialización de la investigación.

El siguiente cuestionario nos permitirá implementar mejoras constantes en los procesos de socialización de trabajos de investigación, por favor háganos llegar sus comentarios y sugerencias:

FECHA			
EXPOSITOR			
LUGAR	DENTRO PUCESI		FUERA PUCESI

NOTA IMPORTANTE: Por favor conteste las preguntas según la siguiente escala:

5. MUY ALTO / 4. ALTO / 3. MEDIO / 2. BAJO / 1. NULO

DETALLE DE VALORACIÓN		1	2	3	4	5
ORGANIZACIÓN DEL EVENTO DE SOCIALIZACIÓN:						
1.	¿Considera Usted que la sala donde se desarrolló este evento brindó las comodidades necesarias?					
2.	¿Considera Usted que el material audiovisual utilizado en la presentación fue adecuado?					
EJECUCIÓN DEL EVENTO POR PARTE DEL EXPOSITOR						
3.	¿Considera Usted que el expositor mostró dominio del tema?					
4.	¿Estima Usted que el manejo del auditorio por parte del expositor fue adecuado?					

5. ¿Considera Usted que el Expositor demostró facilidad de expresión?					
MEDICIÓN DE IMPACTO DE LA INVESTIGACIÓN:					
6. ¿Considera Usted que el tema investigado posee relevancia para algún actor y/o sector de la sociedad?					
7. ¿Considera Usted que esta investigación posee perspectivas para estudios complementarios posteriores?					
8. ¿Considera Usted que el tema investigado genera actualmente o a futuro un beneficio concreto para alguna organización, empresa pública o privada, comunidad o institución?					
9. ¿En función de los objetivos planteados expuestos en la investigación, considera Usted que éstos se cumplieron?					
REALICE UN COMENTARIO O SUGERENCIA PARA LOS ORGANIZADORES DE ESTE EVENTO					
MENCIONE USTED OTRAS PROBLEMÁTICAS QUE A SU PARECER PODRÍAN SER INVESTIGADAS Y QUE POSEAN IMPORTANCIA PARA ALGÚN ACTOR Y/O SECTOR DE NUESTRA COLECTIVIDAD					

INSTITUCIÓN U ORGANIZACIÓN A LA QUE PERTENECE EL ENCUESTADO	
--	--

ANEXO N° 4 Lista de participantes que asistieron a la socialización

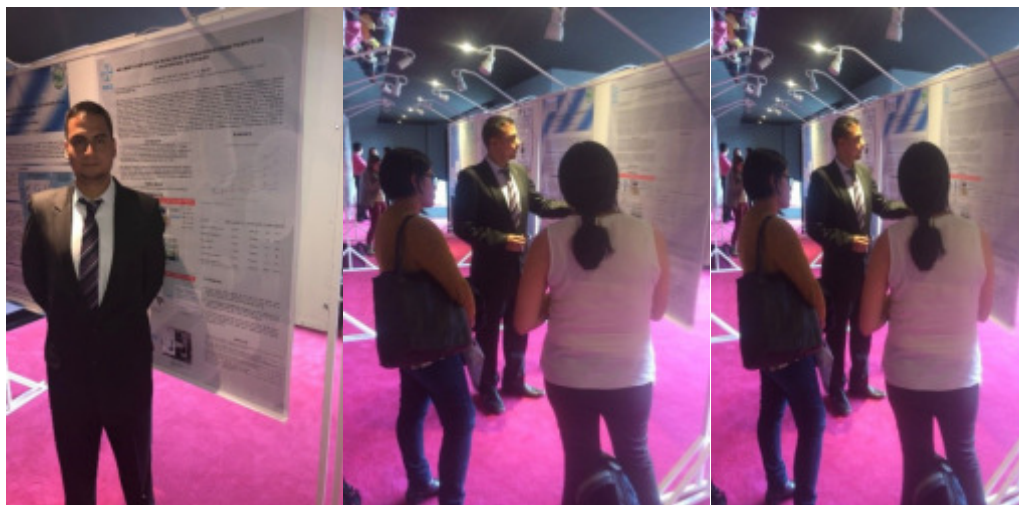


LISTA DE ASISTENCIA A SOCIALIZACIÓN DE INVESTIGACIÓN

NOMBRE DEL EXPOSITOR: *Dayan Orlando Guano Guzmán*
 CARRERA: *Ciencias Agrícolas y Ambientales*
 FECHA: *2 de Agosto del 2018*

NOMBRE ASISTENTE	NÚMERO DE CÉDULA	INSTITUCIÓN A LA QUE REPRESENTA	FIRMA
<i>GABRIELA ACHACACA</i>	<i>100829587-2</i>	<i>PUCE-SJ</i>	<i>[Firma]</i>
<i>JUAN SEBASTIÁN MUIÑA</i>	<i>100474344-2</i>	<i>UTE</i>	<i>[Firma]</i>
<i>Emerson Ruiz</i>	<i>100369544-8</i>	<i>UTN</i>	<i>[Firma]</i>
<i>Piñedo, Yronie</i>	<i>040059544-4</i>	<i>OTN</i>	<i>[Firma]</i>
<i>Aniel Guano</i>	<i>100295679-0</i>	<i>UTE</i>	<i>[Firma]</i>
<i>Gustavo Guano</i>	<i>100294934-8</i>	<i>UADE</i>	<i>[Firma]</i>
<i>Ximena Fabara</i>	<i>100180785-6</i>	<i>PARTICULAR</i>	<i>[Firma]</i>
<i>Milton Guano</i>	<i>17200764-8</i>	<i>Guano Fides</i>	<i>[Firma]</i>
<i>Yanier Montalvo</i>	<i>1003412630</i>	<i>UTN</i>	<i>[Firma]</i>
<i>MAURICIO GUANO</i>	<i>1002999058</i>	<i>PUCE-SJ</i>	<i>[Firma]</i>
<i>Bryan Siverona</i>	<i>1001451325</i>	<i>PARTICULAR</i>	<i>[Firma]</i>
<i>Aniel Guano Ica</i>	<i>1002853628</i>	<i>PARTICULAR</i>	<i>[Firma]</i>
<i>Fernando Guano</i>	<i>100153891-5</i>	<i>PARTICULAR</i>	<i>[Firma]</i>
<i>Vanessa Guano</i>	<i>100231596-5</i>	<i>PARTICULAR</i>	<i>[Firma]</i>
<i>Vanessa Tapia</i>	<i>1004084321</i>	<i>Creacion "Vanessa"</i>	<i>[Firma]</i>
<i>Lorena Silva</i>	<i>100316711-9</i>	<i>Sonisas Sonas</i>	<i>[Firma]</i>

Anexo 5. Socialización de la Investigación en el Congreso de Microbiología Molecular USFQ



Anexo 6. Certificado de Concurso de Posters



UNIVERSIDAD
SAN FRANCISCO



AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY



instituto de
Microbiología
Universidad San Francisco

El Instituto de Microbiología (COCIBA) de la
Universidad San Francisco de Quito - USFQ otorga el presente

CERTIFICADO

a: Bayron Orlando Guevara Garzón

**EXPOSITOR DE PÓSTER EN 2DO
CONGRESO DE MICROBIOLOGÍA
MOLECULAR Y APLICADA**

Realizado desde el 31 de julio al 3 de agosto del 2018 con una duración total
de 32 horas académicas.



Dr. Antonio Machado
Profesor- Investigador -Instituto de Microbiología
Coordinador Pregrado Microbiología- USFQ

Código: 20601- 702000010

Quito, 21 de agosto del 2018

