



Facultad de Ciencias Exactas
Universidad Nacional de La Plata

*“Uso de bacterias sulfato-reductoras
inmovilizadas para la precipitación de
metales pesados”*

Trabajo final de Laboratorio de Procesos Biotecnológicos
Mariana Soledad Vicente

-2006-

El presente trabajo se llevó a cabo en el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), bajo la dirección del Dr. Edgardo Donati y la codirección de la Dra. Marisa Viera.

A mis Padres que me han dado todo

Agradecimientos

Al Dr. Edgardo Donati y a la Dra. Marisa Viera, que me han guiado durante este proceso de aprendizaje.

A la Universidad Nacional de La Plata y a la Facultad de Ciencias Exactas, por haberme ofrecido la posibilidad de crecer.

A los integrantes del laboratorio 6 y 7 del CINDEFI, por haberme ayudado siempre que lo necesité.

A mis amigos, que me han acompañado a lo largo de toda la carrera haciendo que todo sea inolvidable y fácil.

A Nadia, por su amistad, confianza y alegría.

A mi familia, por su apoyo incondicional, sin su ayuda me hubiera sido muy difícil concluir esta importante etapa de mi vida.

Índice general

Objetivos	
Objetivo General	9
Objetivos Específicos	9
Justificación del plan	9

Capítulo 1: Introducción

1.1. Fundamento	12
1.1.2. Biorremediación	12
1.1.2. Características de las bacterias sulfato reductoras	15
1.1.3. Las biopelículas y sus características	16
1.2. Referencias	18

Capítulo 2: Descripción de experimentos, materiales y métodos

2.1. Etapa Preliminar	22
2.2. Microorganismo y Medios de cultivo	22
2.3. Cinética de crecimiento en cultivo batch	24
2.3.1 Objetivo	
2.3.2. Materiales y métodos	
2.4. Efecto del pH en el crecimiento bacteriano	28
2.5. Influencia de la fuente de carbono en el crecimiento bacteriano	29
2.6. Bioprecipitación de metales utilizando células en suspensión	30
2.7. Crecimiento de bacterias inmovilizadas. Bioprecipitación de metales utilizando bacterias inmovilizadas	31
2.8. Referencias	33

Capítulo 3: Resultados y discusión

3.1. Cinética de crecimiento en cultivo Batch	35
3.2. Efecto del pH en el crecimiento bacteriano	40
3.3. Influencia de la fuente de carbono en el crecimiento bacteriano	41
3.4. Bioprecipitación de metales utilizando células en suspensión	
3.4.1. Precipitación de cromo	43
3.4.2. Precipitación de cinc	45

3.5. Crecimiento de bacterias inmovilizadas. Bioprecipitación de metales utilizando bacterias inmovilizadas.	47
3.6. Referencias	52

Capítulo 4: Conclusiones

4.1. Conclusiones finales del Trabajo	55
4.2. Posibilidades futuras	56
4.3. Conclusiones a nivel personal	56
Apéndice	58

Objetivo

Objetivo General

Utilizar bacterias sulfato-reductoras para la precipitación de metales pesados

Objetivos Específicos

- Caracterizar el crecimiento de bacterias del género *Desulfovibrio* en distintas condiciones de cultivo.
- Caracterizar la precipitación de iones metálicos por bacterias del género *Desulfovibrio* en cultivos batch.
- Caracterizar el crecimiento de bacterias del género *Desulfovibrio* inmovilizadas sobre diferentes soportes inertes.
- Caracterizar la precipitación de iones metálicos con bacterias del género *Desulfovibrio* inmovilizadas sobre soportes inertes.

Justificación del plan

El uso de procesos biológicos en la remediación de ambientes contaminados presenta algunas ventajas comparativas respecto de las tecnologías tradicionales: suele ser más económico, menos contaminante y de mayor eficacia para grandes volúmenes y pequeñas concentraciones. Los metales pesados, a diferencia de los contaminantes orgánicos, no pueden ser degradados, por ello, los procesos de remediación se reducen a provocar la movilización y/o inmovilización de los mismos. En el caso de efluentes contaminados con iones metálicos, es posible utilizar microorganismos capaces de precipitarlos retirándolos de los cursos de agua. Para su uso adecuado en procesos de remediación, es conveniente utilizar microorganismos inmovilizados. Precisamente, este plan de trabajo está dedicado al estudio de la inmovilización de bacterias sulfato reductoras y su posterior uso para la precipitación de iones metálicos bajo la forma de sulfuros. Los metales pesados analizados en este trabajo han sido cinc y cromo; estos elementos fueron elegidos debido a que son empleados en un gran número de procesos industriales y por lo tanto se los puede hallar en efluentes provenientes de diversas industrias. Entre las múltiples aplicaciones que tienen estos elementos se pueden citar:

Cinc: es uno de los metales de uso común más utilizado; se emplea para galvanizar el acero, para prevenir la corrosión, en aleaciones, como parte de los envases de ciertas baterías, etc. El óxido de cinc se utiliza como pigmento blanco en pinturas, y como activador en la industria del caucho. El cloruro de cinc se utiliza como desodorizante y se puede también utilizar como preservativo de madera.

Cromo: se aplica principalmente en metalurgia para aportar resistencia a la corrosión y un acabado brillante; también se lo usa en aleaciones (por ejemplo, el acero inoxidable contiene más de un 8% en cromo). El mineral cromita ($\text{Cr}_2\text{O}_3 \cdot \text{FeO}$) se emplea en moldes para la fabricación de ladrillos (en general, para fabricar materiales refractarios). En el curtido del cuero es frecuente emplear el denominado "curtido al cromo" en el que se emplea hidroxisulfato de cromo (III) ($\text{Cr}(\text{OH})(\text{SO}_4)$).

Capítulo 1

Introducción

1.1. Fundamentos

1.1.1. Biorremediación

El término biorremediación fue acuñado a principios de la década de los '80. Se trata fundamentalmente de la aplicación de estrategias de remediación biológicas, basadas en la capacidad de los microorganismos de interaccionar en forma directa con contaminantes. Los microorganismos pueden degradar los desechos en productos menos tóxicos, concentrar e inmovilizar sustancias tóxicas tales como metales pesados; minimizar desechos industriales y rehabilitar áreas afectadas con diversos contaminantes. De este modo la biorremediación permite mejorar los ecosistemas dañados, acelerando algunos procesos naturales (Whiteley y Lee, 2006).

El tratamiento biológico de residuos tiene algunas ventajas, cuando es comparado con técnicas tradicionales utilizadas con este fin, entre dichas ventajas se encuentran (Veglio y Beolchini, 1997; Tomotada y Masao, 2001):

- Bajo costo del tratamiento.
- Tratamiento in situ, no hay gastos de transporte.
- Reducción y eliminación de subproductos finales.
- Eliminación de un costoso equipamiento y atención frecuente del operador.
- Eliminación de un seguimiento a perpetuidad.

La aplicación de la biorremediación para solucionar los graves problemas de deterioro ambiental se ha incrementado notablemente en los últimos años; no obstante, el terreno más importante de aplicación ha sido el del tratamiento de contaminantes orgánicos, en particular, de hidrocarburos (Tomotada y Masao, 2001).

A diferencia de lo que puede ocurrir con compuestos orgánicos contaminantes, los metales pesados no pueden ser degradados. Las posibilidades para el tratamiento de contaminaciones producidas por ellos se reducen a inmovilizarlos (si se encuentran en una fase líquida o gaseosa) o movilizarlos (para extraerlos desde matrices sólidas) de forma tal de reducir su biodisponibilidad o su toxicidad (Ledin, 2000; Nagpal y col., 2000; Tsukamoto y col., 2003; Viera y Donati, 2004).

Se considera metal pesado a aquel elemento que tiene una densidad igual o superior a 5 g/cm³ cuando está en forma elemental, o cuyo número atómico es superior a 20 (excluyendo a los metales alcalinos y alcalino-térreos). Su presencia en la corteza terrestre es inferior al 0,1% y casi siempre menor al 0,01%. Junto a estos metales pesados hay otros elementos químicos que, aunque son metales ligeros o no metales, se suelen englobar con ellos por presentar orígenes y

comportamientos asociados; este es el caso del arsénico, boro, bario y selenio (Metales pesados 1-4, páginas web).

Dentro de los metales pesados hay dos grupos:

- *Oligoelementos o micronutrientes*, que son los requeridos en pequeñas cantidades, o cantidades traza, por plantas y animales, y son necesarios para que los organismos completen su ciclo vital. Estos mismos elementos por encima de cierto umbral se vuelven tóxicos. Dentro de este grupo están: arsénico, boro, cobalto, cromo, cobre, molibdeno, manganeso, níquel, selenio y cinc.

- *Metales pesados sin función biológica conocida*, cuya presencia en determinadas cantidades en seres vivos lleva aparejadas disfunciones en el funcionamiento de sus organismos. Resultan altamente tóxicos y presentan la propiedad de acumularse en los organismos vivos. Son principalmente: cadmio, mercurio, plomo, cobre, níquel, antimonio y bismuto.

La actividad humana incrementa el contenido de metales en el suelo en cantidades considerables, siendo esta, sin duda, la causa más frecuente de las concentraciones tóxicas. Esto sucede debido a los vertidos de origen antropogénico, procedentes de vertidos industriales, de actividades mineras, de la aplicación de plaguicidas o también del tráfico rodado (Bosecker, 2001; García, página web; Jong y Parry, 2003; Moosa y col. 2002; Tomotada y Masao, 2001; Tsukamoto y col, 2003, Veglio y Beolchini, 1997).

Como se ha indicado más arriba, dependiendo de la fase en la que se encuentra el metal, de su estado de oxidación y de la especie que esté conformando, la acción de un microorganismo puede responder a una de las siguientes alternativas. La primera correspondería a la movilización del metal, denominada *lixiviación*, la que puede ser definida como un proceso de disolución de un compuesto contenido en una matriz sólida por acción de microorganismos. El término lixiviación bacteriana se reserva para el caso de que los microorganismos sean bacterias. Existen distintos mecanismos de lixiviación (Krebs y col., 1997), entre los cuales se destacan:

- i) Producción de ácidos orgánicos (cítrico, oxálico) o inorgánicos (sulfúrico).
- ii) Óxido-reducción de los metales.
- iii) Metilación de metales para dar compuestos más volátiles.
- iv) Producción de agentes complejantes y sideróforos.

La segunda alternativa aplicable al tratamiento de metales presentes principalmente en efluentes líquidos, corresponde a la *inmovilización* del metal, es decir, al pasaje de un estado soluble inicial, a uno insoluble final (Veglio y Beolchini, 1997).

La inmovilización con bacterias es una alternativa a los métodos fisicoquímicos tradicionales (Moosa y col., 2002). Entre ellos, el más relevante para la eliminación de metales pesados que se encuentran en solución, es la alcalinización del efluente (comúnmente con carbonato o soda cáustica). El aumento de pH provoca la precipitación de los metales pesados como hidróxidos. Estos últimos suelen ser precipitados coloidales, por lo que ocupan grandes volúmenes y, además, coprecipitan con otros elementos. La generación de grandes volúmenes de hidróxidos es claramente un inconveniente en este proceso. Otras limitaciones de este método son el tratamiento de efluentes diluidos, la presencia de elementos anfóteros o complejantes en la solución, la necesidad de trabajar con pH muy altos y la baja selectividad (Jong, y Parry, 2003).

Dentro de la amplia diversidad microbiana, existen microorganismos resistentes y tolerantes a metales. La habilidad de los microorganismos para sobrevivir a un ambiente con metales pesados implica mecanismos que potencialmente podrían ser utilizados para el tratamiento de las contaminaciones con esos metales a través de procesos de inmovilización (Vullo, 2003). Probablemente los dos procesos biológicos más relevantes en la inmovilización de metales son la biosorción y la bioprecipitación (Veglio y Beolchini, 1997). Para que estos procesos biológicos puedan ser utilizados a escala industrial, es conveniente que los microorganismos sean previamente inmovilizados sobre un soporte inerte de modo que no sean eliminados junto con los efluentes o con los precipitados (Nagpal y col., 2000).

El fenómeno de biosorción consiste en un incremento de la concentración de los metales sobre la superficie o en el interior de la célula a través de variados mecanismos de los cuales, sin dudas, el más importante es el mecanismo de intercambio iónico, donde el microorganismo actúa de modo semejante a una resina de intercambio iónico (Davis y col, 2003; Veglio y Beolchini, 1997; Vullo, 2003; Whiteley y Lee, 2006). La biosorción es un fenómeno ampliamente estudiado en la biorremediación de diversos metales pesados como el cadmio, cromo, plomo, níquel, cinc y cobre.

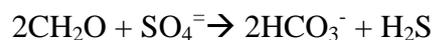
En la bioprecipitación se utilizan microorganismos capaces de generar metabolitos que precipitan con muchos de los metales pesados (Malik, 2004). Un grupo importante de estos microorganismos son las bacterias denominadas sulfato-reductoras (BSR) (White y Gadd, 1996; Moosa y col., 2005; Jong, y Parry, 2003). Estas son bacterias anaeróbicas (crecen en ambientes reductores y en ausencia de oxígeno) que son capaces de formar sulfuros a partir de la reducción de sulfatos. Los sulfuros pueden precipitar con metales presentes en el medio y, de ese modo, pueden ser separados del medio líquido. Debido a que en el presente trabajo se utilizó una cepa de BSR, en la próxima sección se indican con más detalle las características más importantes de estas bacterias.

1.1.2. Características de las bacterias sulfato reductoras

La producción biológica de sulfuro de hidrógeno en ambientes acuáticos se conoce desde el siglo pasado. Las bacterias sulfato reductoras (BSR) forman un grupo especializado de procariones que tienen la capacidad de usar sulfato como aceptor final de electrones en la respiración (Mudryk y col., 2000).

Características relevantes de estas bacterias:

- Fisiológicamente se pueden dividir en tres grupos celulares básicos:
 - ✓ Eubacterias gram negativas
 - ✓ Eubacterias gram positivas
 - ✓ Archeobacterias
- Estas bacterias llevan a cabo el proceso de *reducción desasimilatoria* de sulfato (es decir, cuando el sulfuro producido en la reducción del sulfato no es incorporado a la biomasa); este ion es utilizado como un oxidante para la degradación de la fuente orgánica de carbono (Postgate, 1954). En forma general, este proceso puede representarse mediante la siguiente ecuación química:



- Las características morfológicas de estas células varían considerablemente. Se han descrito distintos tipos celulares, entre los que se encuentran: bacilos, vibrios, cocos, espirilos, etc. (Widdel y Bak, 1992).
- Las capacidades oxidativas y metabólicas de las BSR varían de acuerdo al género. Entre los compuestos orgánicos más utilizados se encuentran: lactato, acetato, piruvato, etanol, propanol y glucosa (Gibson, 1990). Los medios más utilizados para el crecimiento de BSR son los diseñados por J.R. Postgate (denominados medios B y C de Postgate) que poseen lactato como fuente de carbono. Además, el medio B contiene ácido ascórbico y tioglicólico como agentes reductores. Las composiciones detalladas de estos medios de cultivo serán descritas en el siguiente capítulo.
- Las bacterias sulfato-reductoras son estrictamente anaerobias y por lo general, son muy sensibles a los medios óxicos, muriendo de forma más o menos rápida cuando son expuestas a ese tipo de medios (Barton y Tomei, 1995).
- Las BSR requieren ausencia de oxígeno para su crecimiento y también un potencial redox bajo (de aproximadamente 0 a -100 mV) (Gibson, 1990).
- Los metales son importantes como cofactores para varias enzimas de las BSR y así son necesarios para el crecimiento. El níquel y el selenio son requeridos por la enzima hidrogenasa,

el calcio es importante para incrementar la eficiencia del crecimiento en placa, por otra parte el hierro es un elemento esencial para la producción de la hidrogenasa y de los citocromos (Barton y Tomei, 1995).

- Las BSR crecen mejor bajo condiciones levemente alcalinas, en un relativamente estrecho rango de pH (entre 7,0 y 7,8). Sin embargo, se han encontrado BSR con capacidad de tolerar ambientes levemente ácidos (pH 4,0) así como también especies con capacidad de desarrollarse en ambientes alcalinos (pH 9,5) (Barton y Tome, 1995).

- Un factor muy importante en la actividad de las bacterias sulfato reductoras es la temperatura del sistema. La mayoría de las BSR son mesófilas, es decir, con un crecimiento óptimo en el rango de temperatura de 25 a 40 °C (Okabe y Characklis, 1992).

- Se ha comprobado que la actividad metabólica de las BSR es máxima cuando se encuentran formando biopelículas (biofilms) (Beyenal y Lewandowski, 2004).

Debido al último punto enunciado y a que en este trabajo final se intentará inmovilizar células y formar biofilms de BSR, se añade la siguiente sección sobre biofilms y su importancia en los procesos naturales de los microorganismos.

1.1.3. Las biopelículas y sus características

El término biopelícula (*biofilm*) hace referencia a una serie de microorganismos que se encuentran agregados generalmente dentro de una estructura de exopolímeros y que se organizan en forma de colonias adheridas a diferentes superficies, ya sean blandas, animadas e inanimadas. Los exopolímeros, que son producidos por los mismos microorganismos, forman una matriz adherente en donde éstos quedan atrapados y comienzan a organizarse en colonias con diferentes requerimientos metabólicos. Estas conformaciones microbianas presentan características como: adherencia, heterogeneidad, diversidad de microambientes (pH, presión parcial de O₂, concentración de iones y de otros sustratos), resistencia a antimicrobianos y capacidad de comunicación intercelular (Betancourt y col., 2004).

La capacidad de formación de biofilm no parece estar restringida a ningún grupo específico de microorganismos y hoy se considera que bajo condiciones ambientales adecuadas todos los microorganismos son capaces de formar biofilms aunque su composición y estructura depende del microorganismo y de las condiciones en las que se forma.

Algunos estudios realizados utilizando microscopia confocal han mostrado que la arquitectura de la matriz de un biofilm no es sólida y presenta canales que permiten el flujo de agua, nutrientes y oxígeno incluso hasta las zonas más profundas del biofilm. La existencia de estos

canales no evita, sin embargo, que dentro del biofilm podamos encontrarnos con ambientes diferentes en los que la concentración de nutrientes, pH u oxígeno es diferente (Branda y col, 2005).

La etapa inicial del proceso de formación del biofilm es la adherencia sobre la superficie. Una vez que la bacteria se ha adherido a la superficie, comienza a dividirse y las células hijas se extienden alrededor del sitio de unión, formando una microcolonia. En una etapa posterior la bacteria comienza a secretar un exopolisacárido que constituye la matriz del biofilm y forma unas estructuras similares a setas (mushrooms) entre las cuales se observa la presencia de canales. La composición del exopolisacárido es diferente en cada bacteria. Finalmente, algunas bacterias de la matriz del biofilm se liberan del mismo para poder colonizar nuevas superficies, cerrando el proceso de desarrollo de formación del biofilm (Lasa y col., 2005).

Para adaptarse a la vida en el biofilm un microorganismo sufre, en general, cambios radicales. El campo del medio donde se encuentra, activa diferentes genes que codifican nuevas proteínas estructurales y enzimas. Estos genes y proteínas son los que explican la fijación y la resistencia de los microorganismos incluidos en las biopelículas ante los antibióticos o los desinfectantes.

Los biofilms constituyen serios problemas en diferentes ámbitos como los de la salud u otros dentro del campo industrial debido no sólo a los problemas que acarrea la actividad microbiana y la del propio biofilm sino también a que su eliminación suele ser muy difícil (Betancourth y col., 2004). Un ejemplo muy importante dentro del ámbito industrial es el biofouling que consiste en la contaminación producida por actividad microbiana sobre diferentes superficies, generando corrosión de equipos, cascos de barcos, tuberías y de campos petroleros (Torres, página web).

Por otro lado, existen procesos en los cuales la presencia de los biofilms garantiza la actividad microbiana deseada. Dentro de estos procesos se encuentran muchos de los procesos de biorremediación y, en particular, los de bioprecipitación de iones metálicos (Betancourt y col., 2004).

Precisamente, y como se ha adelantado, se ha comprobado que las bacterias sulfato-reductoras desarrollan los máximos niveles de actividad metabólica dentro de los biofilms (Beyenal y Lewandowski, 2004). En los sistemas naturales, la reducción de sulfato desasimilatoria tiene lugar en aquellas zonas de las biopelículas donde, por su profundidad respecto de la parte exterior, están garantizadas las condiciones anaerobias y en cambio no existen limitaciones severas a la difusión de sustratos.

1.2. Referencias

- Atlas R.M., Bartha R. (2002) Ciclos biogeoquímicos: nitrógeno, azufre, fósforo, hierro y otros elementos. En: *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*, Pearson Education S.A., Madrid, 4^{ta} Edición, pp. 442- 433.
- Barton L.L., Tomei F.A. (1995) Characteristics and activities of sulfate- reducing bacteria. In: *Sulfate-Reducing Bacteria* (Ed: Baron I.L.), Plenum Press, New York, pp. 1-32.
- Betancourth M., Botero J. E., Rivera S. P. (2004) Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo. *Colombia Médica* 35: 34-39.
- Beyenal H., Lewandowski Z. (2004) Dynamics of lead immobilization in sulfate reducing biofilms. *Water Research* 38: 2726-2736.
- Bosecker K. (2001) Microbial leaching in environmental clean-up programmers. *Hydrometallurgy* 59: 245-248.
- Brandan S., Vik A., Friedman L., Kolter R. (2005). Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology* 13: 20-26.
- Davis T. A., Volesky B., Mucci A. (2003) A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. *Water Research* 37: 4311-4330.
- García I., Dorronsoro C. Contaminación por metales pesados. Disponible en: <http://edafologia.ugr.es/conta/tema15/introd.htm>.
- Gibson G.R. (1990) Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* 69: 769-797.
- Jong T., Parry D.L. (2003) Removal of sulphate and heavy metal by sulphate reducing bacteria in short-term beach scale upflow anaerobic packed bed reactor runs. *Water Research* 37: 3379-3389.
- Krebs W., Brombacher C., Bosshard P.P., Bachofen R., Brandl H. (1997) Microbial recovery of metals from solids. *FEMS Microbiology Reviews* 20: 605-617.
- Lasa I., del Pozo J.L., Penadés J.R., Leiva J. (2005) Biofilms bacterianos e infección. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* 28: 163-175.
- Ledin M. (2000) Accumulation of metals by microorganisms-processes and importance for soil systems. *Earth-Science Reviews* 51:1-31.
- Mack C., Burgess J.E., Duncan J.R. (2004) Membrane bioreactors for metal recovery from wastewater. *Water SA* 30: 521-532. Disponible en: <http://www.wrc.org.za>.
- Malik A. (2004) Metal bioremediation through growing cells. *Environment International* 30: 261-278.
- Metales pesados 1. Disponible en www.lenntech.com/espanol/metales%20pesados.htm

- Metales pesados 2. Disponible en es.wikipedia.org/wiki/Metal_pesado
- Metales pesados 3. Disponible en www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts60.html
- Metales pesados 4. Disponible en www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts7.html
- Moosa S., Nemati M., Harrison S.T.L. (2002) A kinetic study on anaerobic reduction of sulphate, part I: Effects of sulphate concentration. *Chemical Engineering Science* 57: 2773-2780.
- Moosa S., Nemati M., Harrison S.T. L. (2005) A kinetic study on anaerobic reduction of sulphate, part II: Incorporation of temperature effects in the kinetic model. *Chemical Engineering Science* 60: 3517-3524.
- Mudryk Z. J., Podgórska B., Ameryk A., Bolałek J. (2000) The occurrence and activity of sulphate-reducing bacteria in the bottom sediments of the Gulf of Gdańsk. *Oceanologia* 42: 105–117.
- Nagpal S., Chuichulcherm S., Peeva L., Livingston A. (2000) Microbial Sulphate Reduction in a Liquid-Solid Fluidised Bed Reactor. *Biotechnology and Bioengineering* 70: 370-380.
- Okabe S., Characklis W. G. (1992) Effects of temperature and phosphorous concentration on Microbial Sulfate Reduction by *Desulfovibrio desulfuricans*. *Biotechnology and Bioengineering* 39: 1031-1042.
- Postgate J. R. (1954) Recent Advances in the Study of the Sulfate-Reducing Bacteria. *Bacteriological Reviews* 29: 425-441.
- Tomotada I., Masao N. (2001) Current bioremediation practice and perspective. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92: 1-8.
- Torres R.A. Ácido sulfhídrico, el olor a huevo podrido y algo más Disponible en www.izt.uam.mx/contactos/n35ne/pdf/sulphi.pdf.
- Tsukamoto T. K., Killion H. A., Miller G. C. (2004) Column experiments for microbiological treatment of acid mine drainage: low-temperature, low-pH and matrix investigations. *Water Research* 38: 1405-1418.
- Veglio F., Beolchini F. (1997) Removal of metals by biosorption: a review. *Hydrometallurgy* 44: 301-316.
- Viera M., Donati E.R. (2004) Microbial processes for metal recovery from waste products. *Current Topics in Biotechnology* 1: 117-127.
- Vullo D.L. (2003). Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Química Viva* 2. Disponible en quimicaviva@qb.fcen.uba.ar
- Widdel F., Bak F. (1992) Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In: *The Prokaryote, IV* (Eds: Balows A., Truper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K-H.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 3352-3378.

White C., Gadd G.M. (1996) A comparison of carbon/energy and complex nitrogen sources for bacterial sulphate-reduction: potential applications to bioprecipitation of toxic metals as sulphides. *Journal of Industrial Microbiology* 17:116-123.

Whiteley C.G., Lee D.-J. (2006) Enzyme technology and biological remediation. *Enzyme and Microbial Technology* 38: 291–316.

Capítulo 2

*Descripción de experimentos,
materiales y métodos*

2.1. Etapa Preliminar

Como etapa preliminar se realizó un entrenamiento en el manejo de cultivos anaeróbicos debido a que este tipo de sistema difiere notablemente de los sistemas aeróbicos de uso corriente. Este entrenamiento consistió en la preparación de los medios de cultivos utilizados en el cultivo de BRS, la generación de anaerobiosis y el repique de bacterias anaeróbicas. Además, se aprendieron diversas técnicas analíticas: espectrofotometría de absorción atómica, HPLC, determinación de proteínas, etc.

2.2. Microorganismo y Medios de cultivo

En todas las experiencias realizadas se utilizó una cepa de *Desulfovibrio sp.* adquirida de la American Type Culture Collection y con denominación ATCC 49975. Estas bacterias son mantenidas rutinariamente en frascos tipo penicilina de 10 mililitros (ml) en medio Postgate B (ver tabla 2.1) a 4 °C (Barton y Tomei, 1995).

Tabla 2.1: Composición del medio de cultivo Postgate B

<i>Compuesto</i>	<i>Cantidad</i>
KH ₂ PO ₄	0,5 g
NH ₄ Cl	1 g
CaSO ₄	1 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	2 g
Lactato de Sodio	3,5 g (5 ml al 50%)
Extracto de levadura	1 g
FeSO ₄	0,5 g
Ác. Ascórbico	0,1 g
Ác. Tioglicólico	0,1 g
Agua destilada	1 litro
pH	7 – 7,5

Para preparar el inóculo para las experiencias se tomó un cultivo en medio Postgate B, se filtró en papel, el filtrado se añadió a un frasco de 100 ml que contenía 90 ml de medio Postgate C,

(ver tabla 2.2). El medio se preparaba sin el agregado de FeSO_4 para evitar la precipitación del FeS , que interferiría en las posteriores determinaciones analíticas a realizar, y sin citrato de sodio ya que éste actúa como complejante del hierro(II). A dicho medio se le hizo burbujear N_2 estéril durante 30 minutos para desplazar el O_2 presente. Antes de cerrar el frasco con tapón de goma y virola metálica, se le adicionó solución para anaerobiosis (ver tabla 2.3), previamente esterilizada por filtración (Kelly y Wood, 1998) La incubación se realizó a 30°C y cuando el cultivo alcanzaba la fase de crecimiento exponencial, fue utilizado como inóculo para la realización de las distintas experiencias.

Tabla 2.2: Composición del medio de cultivo Postgate C

<i>Compuesto</i>	<i>Cantidad</i>
KH_2PO_4	0,5 g
NH_4Cl	1 g
Na_2SO_4	4,5 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,06 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,06 g
Lactato de Sodio	6 g (8,5 ml al 50%)
Extracto de levadura	1 g
FeSO_4	0,004 g
Citrato de Sodio $\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,3 g
Agua destilada	1 litro
pH	$7,5 \pm 0,2$

Tabla 2.3: Composición de Solución para anaerobiosis*

<i>Compuesto</i>	<i>Cantidad</i>
Ac. Ascórbico	0,2 g
Ác. Tioglicólico	200 μl
Agua destilada	10 ml
pH	$7,0 \pm 0,2$

*: 50 microlitros de solución en 10 ml de cultivo

2.3. Cinética de crecimiento en cultivo batch

2.3.1 Objetivo

Estudiar la cinética de crecimiento de las bacterias *Desulfovibrio sp* en cultivo batch utilizando medio Postgate C.

2.3.2. Materiales y métodos

Sistema utilizado

El experimento fue realizado usando un biorreactor de 800 ml de capacidad, al cual se le añadió medio Postgate C sin el agregado de FeSO_4 , por las mismas razones antes detalladas. Durante toda la experiencia el O_2 fue desplazado, mediante el burbujeo de N_2 estéril (para lo cual se utilizó un filtro (0,45 μm) en la salida del tubo de N_2). El reactor fue cerrado herméticamente y se le adicionó solución para anaerobiosis antes de la inoculación. La agitación del cultivo se mantuvo por medio de un buzo magnético y un agitador. La temperatura se mantuvo en 30 °C y fue medida por una sonda de temperatura que se encontraba dentro de una camisa que contenía agua; el pH fue mantenido en el valor prefijado de $7,5 \pm 0,2$ mediante un controlador de pH que accionaba, en caso necesario, una bomba que inyectaba solución de HCl 1 Molar.

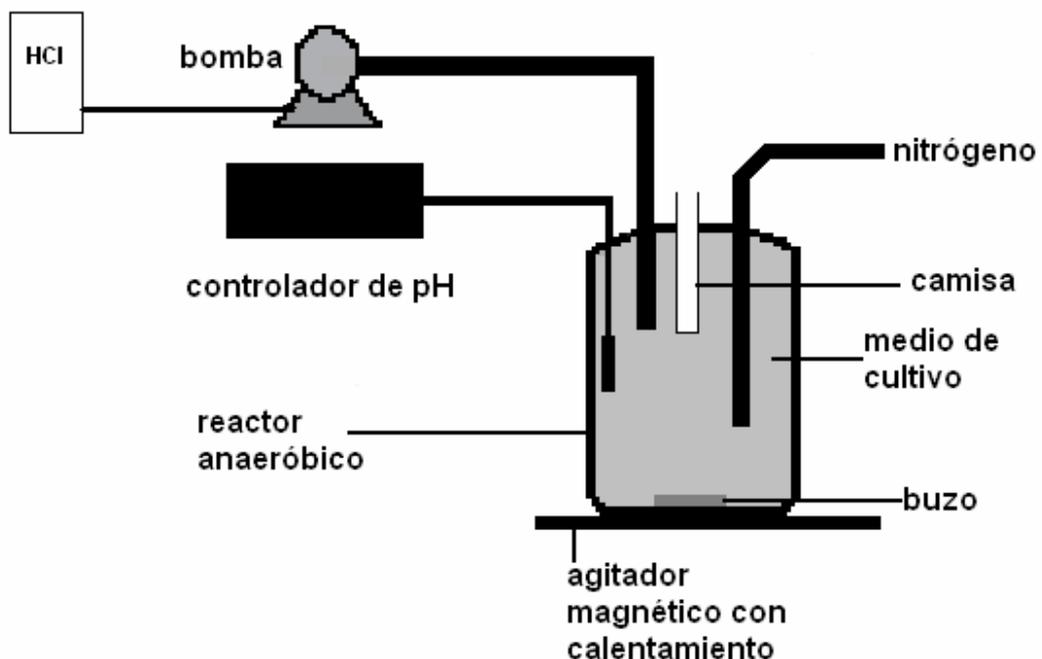


Figura 2.1: Diagrama esquemático del dispositivo utilizado para el cultivo en Batch

La Figura 2.1 muestra un diagrama esquemático del dispositivo experimental usado para los estudios cinéticos. La primera muestra fue tomada inmediatamente después de inocular para registrar la condición inicial del cultivo. Posteriormente, se tomaron muestras de 25 ml cada una en intervalos de 24-72 horas.

Métodos analíticos

Las determinaciones analíticas llevadas a cabo fueron:

Medición del crecimiento

■ *Métodos directos*

- ✓ Peso seco celular.
- ✓ Recuento del número de células

■ *Métodos indirectos*

- ✓ Medida de la turbidez
- ✓ Cuantificación analítica de sulfato

✓ Peso seco celular

Este método permitió cuantificar la cantidad de biomasa formada (Malette, 1969). Se separaron 20 ml de cultivo, los cuales fueron centrifugados a 350 revoluciones por minuto (rpm) durante 20 minutos. El sobrenadante fue descartado y el pellet se resuspendió en agua destilada. El resuspendido fue colocado en un pesafiltro previamente tarado, dicho resuspendido fue secado en estufa a 105°C, hasta lograr peso constante. El peso seco celular se determinó según la siguiente ecuación:

$$\text{Peso de muestra (g/ml)} = \frac{(\text{Peso total} - \text{Peso del pesafiltro})}{\text{Volumen de muestra}}$$

✓ Recuento del número de células

La forma más obvia de determinar el número de células es por recuento directo (Ingraham e Ingraham, 1998). Para esto se utilizó una cámara de Petroff-Hausser. Esta cámara posee una rejilla dividida en 25 campos grabada en el fondo de la cámara; cada uno de los campos está subdividido en una cuadrícula de 16 cuadraditos (Figura 2.2). Una vez que se ha cargado la cámara con la muestra (un cubreobjeto hace de tope superior). Se usó el microscopio de contraste de fase (NIKON Labophot) con un objetivo de 40X para contar las bacterias de sólo 5 de los 25 campos (preferentemente se cuentan los cuadrados de los cuatro extremos y el del centro). Se puede

calcular el número de microorganismos en una muestra, a partir del volumen de la cámara y las diluciones de la muestra que sean necesarias. La ecuación a utilizar para esta determinación es:

$$\frac{\text{Número de bacterias}}{\text{ml}} = \frac{\sum \text{células contadas en los 5 campos}}{4} * \frac{1}{\text{dilución}} * 10^6$$

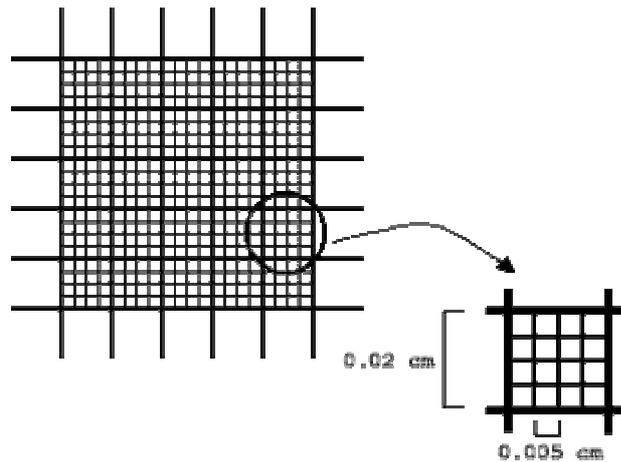


Figura 2.2: Cámara de Recuento de Petroff-Hausser. Vista aumentada de la rejilla.

✓ Medida de la turbidez (densidad óptica)

Esta técnica se basa en la capacidad de las células microbianas de dispersar la luz que incide sobre éstas. Para esta determinación se llenó una cubeta de plástico y se midió la absorbancia a 600 nanómetros (nm) en un espectrofotómetro Bekman DU 640 (Prescott y col., 1999). En general, en los cultivos de sulfato reductoras esta medida no es utilizada ya que además de las bacterias hay precipitados inorgánicos (los sulfuros precipitados) que contribuyen a la turbidez del medio.

✓ Cuantificación analítica de sulfato

Se utilizó un método turbidimétrico que se basa en la reacción del ión sulfato con el bario en medio ácido, para formar sulfato de bario sólido en forma de cristales de tamaño uniforme. La luz absorbida por la suspensión es medida en un espectrofotómetro y la concentración de sulfato es determinada por comparación de la lectura con respecto a una curva estándar.

Antes de la determinación del sulfato remanente en el medio de cultivo, los elementos suspendidos (bacterias y precipitados inorgánicos) fueron separados de la muestra por centrifugación, ya que la presencia de éstos en suspensión interfiere en la medida de la turbidez. Para la determinación de sulfato se midieron 25 ml de la muestra límpida o dilución de la misma, y

se agregó 1 ml de solución reguladora (ver Tabla 2.4), luego se adicionó solución de BaCl₂, se agitó vigorosamente durante 30 segundos y se midió en celda de 1 centímetro de camino óptico contra el blanco (agua destilada). La lectura se realizó a 450 nm en un espectrofotómetro Bekman DU 640 (Greenberg, y col., 1985).

Tabla 2.4: Composición de solución reguladora para determinación de sulfato.

<i>Compuesto</i>	<i>Cantidad</i>
HCl (C)	4.5 ml
Alcohol etílico	15 ml
NaCl	11.25 g
Glicerina	7.5 ml
Agua destilada	45 ml

2.4. Efecto del pH en el crecimiento bacteriano

2.4.1. Objetivo

Este experimento se realizó para determinar la capacidad de *Desulfovibrio sp* de crecer a pH menores al óptimo teniendo presentes que muchos efluentes que transportan metales suelen ser ácidos.

2.4.2. Materiales y métodos

El medio de cultivo Postgate C fue preparado y dividido en tres partes equivalentes, a cada una de las cuales se le ajustó el pH a los siguientes valores: 5,0, 6,0 y 7,5. El proceso experimental fue llevado a cabo en 9 frascos de 100 ml cada uno (3 frascos para cada pH) los cuales fueron inoculados al 15 % v/v (la preparación del inóculo fue descrita en la sección anterior). Antes de realizarse la inoculación se burbujeó N₂ estéril y se adicionó solución para anaerobiosis. Los frascos fueron llenados en toda su capacidad para evitar que quede cámara de aire significativa en la parte superior; se taparon con tapón de goma y se sellaron con virola metálica para mantener la anaerobiosis. Los cultivos fueron mantenidos a 30°C. Se evaluó el crecimiento bacteriano en los distintos cultivos a través de la determinación de sulfato de cada uno, utilizando la técnica ya detallada en la sección anterior. Estas mediciones se llevaron a cabo en diferentes días. Durante la toma de muestra se burbujeó N₂ estéril a cada uno de los frascos.

Cuando se dio por finalizado el cultivo (mediante el seguimiento de la reducción de sulfato) se procedió a tomar 5 ml de muestra de cada uno de los frascos; dicho volumen fue filtrado y fue utilizado para la determinación del pH final del cultivo.

2.5. Influencia de la fuente de carbono en el crecimiento bacteriano

2.5.1. Objetivo

En esta experiencia se pretendió determinar si las células de *Desulfovibrio sp.* son capaces de crecer empleando otras fuentes de carbono distintas de lactato. Este objetivo es importante ya que, al analizar la posibilidad de utilizar un método biológico en el tratamiento de efluentes o residuos industriales, una variable que debe considerarse es la fuente de carbono a emplear. Resulta esencial que la misma otorgue un buen crecimiento, tenga fácil disponibilidad y sea económica.

2.5.2. Materiales y métodos

Para la realización de esta experiencia se preparó medio de cultivo Potsgate C sin el agregado de lactato. Dicho medio fue fraccionado en 4 partes iguales a cada una de las cuales se les adicionó una fuente de carbono distinta en cantidades equimolares. Las fuentes de carbono utilizadas fueron: lactato, etanol, glucosa y acetato de sodio.

Cada uno de los medios de cultivos se utilizó para llenar frascos de 100 ml (se realizaron duplicados para cada fuente de carbono). A cada frasco se le hizo burbujear N_2 y se le añadió solución para anaerobiosis. Una vez realizado esto se procedió a inocular los frascos al 15 % v/v. Los frascos fueron tapados con tapón de goma y virola metálica. Se tomó la primera muestra en forma inmediata. Los cultivos se incubaron a 30°C y se tomaron muestras cada 48 - 72 hs. En cada una de las muestras se realizaron conteos directos al microscopio (ver sección 2.3) y se determinó la concentración de sulfato.

2.6. Bioprecipitación de metales utilizando células en suspensión

2.6.1. Objetivo

En esta experiencia se pretendió evaluar la capacidad de las células plantónicas de *Desulfovibrio sp* de reducir sulfato en presencia de distintas concentraciones de cromo y cinc y, adicionalmente, se analizó la precipitación de los sulfuros correspondientes.

2.6.2. Materiales y métodos

Para esta experiencia se utilizaron frascos de 10 ml, los cuales se llenaron con 9 ml medio Postgate C. En este caso se omitió el sulfato ferroso que lleva el medio para evitar que el sulfuro formado precipite con el hierro(II) y no con el ión de interés. Los frascos con el medio se cerraron herméticamente y fueron esterilizados en autoclave. A cada uno de los frascos se les añadió, con jeringa estéril, solución para anaerobiosis y diferentes volúmenes de las soluciones stock de los metales pesados. El agregado de la solución de los metales y de la solución para anaerobiosis se realizó en estrictas condiciones de esterilidad para lo cual se trabajó en el banco de flujo laminar.

Luego de este proceso los frascos fueron inoculados con 1 ml de un cultivo de *Desulfovibrio sp* filtrado y al cual se le había hecho burbujear N₂ durante 30 minutos aproximadamente. Este procedimiento se realizó para eliminar el H₂S del cultivo evitando una importante precipitación inicial del metal.

Cada uno de los sistemas fue realizado por triplicado. Además se realizó la inoculación de 15 frascos sin metal como controles de crecimiento. Se incubaron también 16 frascos sin inóculo pero con metal (en las distintas concentraciones estudiadas) para constatar posibles precipitaciones de los metales debido a los componentes del medio de cultivo.

Las muestras fueron tomadas cada 48 hs. En ellas se siguió el crecimiento de las bacterias por medio de la determinación sulfato en los cultivos utilizados como control del inóculo. Cuando la concentración de sulfato en los cultivos control alcanzó un valor de 1,3 g/l se finalizó la experiencia y se determinó en cada uno de los frascos la concentración de sulfato remanente y la concentración de metal remanente en solución mediante espectrofotometría de absorción atómica con llama aire-acetileno (ver apéndice). Para esta última determinación las muestras debieron ser diluidas en HNO₃ 0,14 M y filtradas con membrana de acetato de celulosa de 0,22 μm.

2.7. Crecimiento de bacterias inmovilizadas. Bioprecipitación de metales utilizando bacterias inmovilizadas

2.7.1. Objetivo

En este ensayo se pretende inmovilizar a *Desulfovibrio sp* sobre distintos soportes inertes y determinar la capacidad de estas células de precipitar Cr(III) y Zn(II). La capacidad de las BSR de ser inmovilizada y, eventualmente, la de formar biofilms es de especial interés en la biorremediación ya que las células plantónicas serían arrastradas con el efluente que se pretende descontaminar.

2.7.2. Materiales y métodos

Para la realización de esta experiencia se procedió a la inmovilización de las BSR sobre perlas de vidrio y sobre sílica gel. Los soportes fueron previamente tratados de la siguiente manera: se sumergieron en HNO₃ 1 M, se colocaron en el agitador (Shaker Pro Vicking) durante 1 hora a 160 rpm. Luego se lavaron con agua destilada hasta lograr neutralidad y finalmente se los secó en estufa a 40 °C.

25 g de perlas de vidrio o de sílica gel, previamente tratadas, se colocaron en frascos de 100 ml. Los frascos fueron esterilizados en autoclave. A cada frasco se le añadieron 70 ml de medio Postgate C (sin FeSO₄), se le hizo burbujear N₂ y se le agregó solución para anaerobiosis. Posteriormente se inoculó y los frascos fueron cerrados con tapa y sellados con parafilm. Se incubaron todos los sistemas a 30 °C en un shaker. Se mantuvieron los sistemas bajo agitación para que la inmovilización de las células no se produzca sólo sobre la capa más externa del soporte, sino que se realice en forma homogénea en todo el volumen de las perlas. Se tomaron muestras cada 48 hs aproximadamente sobre las cuales se cuantificó la concentración de sulfato. En este caso no se determinó el número de bacterias en suspensión debido a que dicho valor no tendría significado alguno, ya que la mayor parte de las bacterias debería encontrarse inmovilizada sobre el soporte.

Cuando el sulfato era consumido en aproximadamente un 70%, el medio de cultivo agotado era reemplazado por medio fresco. De este modo, el consumo de sulfato posterior al recambio se producía por las bacterias que se encontraban adheridas en los soportes. El recambio del medio de cultivo se realizó entre 3 y 6 veces, dependiendo de la evolución de cada sistema, tomando muestras antes y después de cada recambio.

Cuando se observó continuidad en el consumo de sulfato durante al menos 3 ciclos, se consideró que las BSR se encontraban inmovilizadas y se procedió entonces a cambiar el medio de

cultivo y a agregar las soluciones con los metales pesados elegidos (cromo (III) y cinc (II)) en las cantidades necesarias para obtener una concentración final de 10 ppm de cada uno. A uno de los sistemas de sílica gel se le adicionó ambos metales.

Una vez añadidas las soluciones de los metales a los distintos cultivos, se tomó muestra de cada uno de los frascos. Luego se dejaron incubando a 30 °C con agitación. Se continuó tomando muestras cada 24 – 48 hs; sobre cada muestra se determinó la concentración de sulfato y la concentración del metal pesado (o de ambos en el sistema Cr10Zn10) en solución.

2.8. Referencias

- Barton L.L., Tomei F.A. (1995) Characteristics and activities of sulfate- reducing bacteria. In: *Sulfate-Reducing Bacteria* (Ed: Baron I.L.), Plenum Press, New York, pp. 1-32.
- Mallette M.F. (1969) Evaluation of Growth by physical and chemical means. In: *Methods in microbiology* (Eds: Norris J.R, Ribbons D.W), Academic Press, London, pp. 521-566.
- Greenberg A.E., Trusell R.R., Clesceri L.S. (1985). Método turbidimétrico de determinación de sulfato. In: *Standard Methods for the examination of water and wastewater*, APHA-AWWA-WPCF, Washington, pp. 467.
- Ingraham J., Ingraham C. (1998) Métodos de estudio de los microorganismos. En: *Introducción a la microbiología*, Editorial Reverté S.A., Buenos Aires, pp. 48-73.
- Kelly D.P., Wood A.P. (1998) Microbes of the sulfur cycle. In: *Techniques in Microbial Ecology* (Eds: Burlage R.S., Atlas R., Stahl D., Geesey G., Sayler G.), Oxford University Press, Oxford, pp. 31-56.
- Prescott L. M., Harley, J. P., Klein, D. A. (1999) Crecimiento microbiano. En: *Microbiología*, Editorial Mc Graw Hill Interamericana, México, pp. 118-121.

Capítulo 3

Resultados y discusión

3.1. Cinética de crecimiento en cultivo batch

En este experimento, se siguió el crecimiento de las bacterias *Desulfovibrio sp* en un sistema sin alimentación. Las muestras fueron analizadas como se indica en el capítulo 2, los datos obtenidos luego de esas determinaciones fueron graficados para su posterior análisis.

En la Figura 3.1 se muestra el aumento de la biomasa bacteriana en el transcurso del cultivo batch, a través de la determinación del peso seco bacteriano.

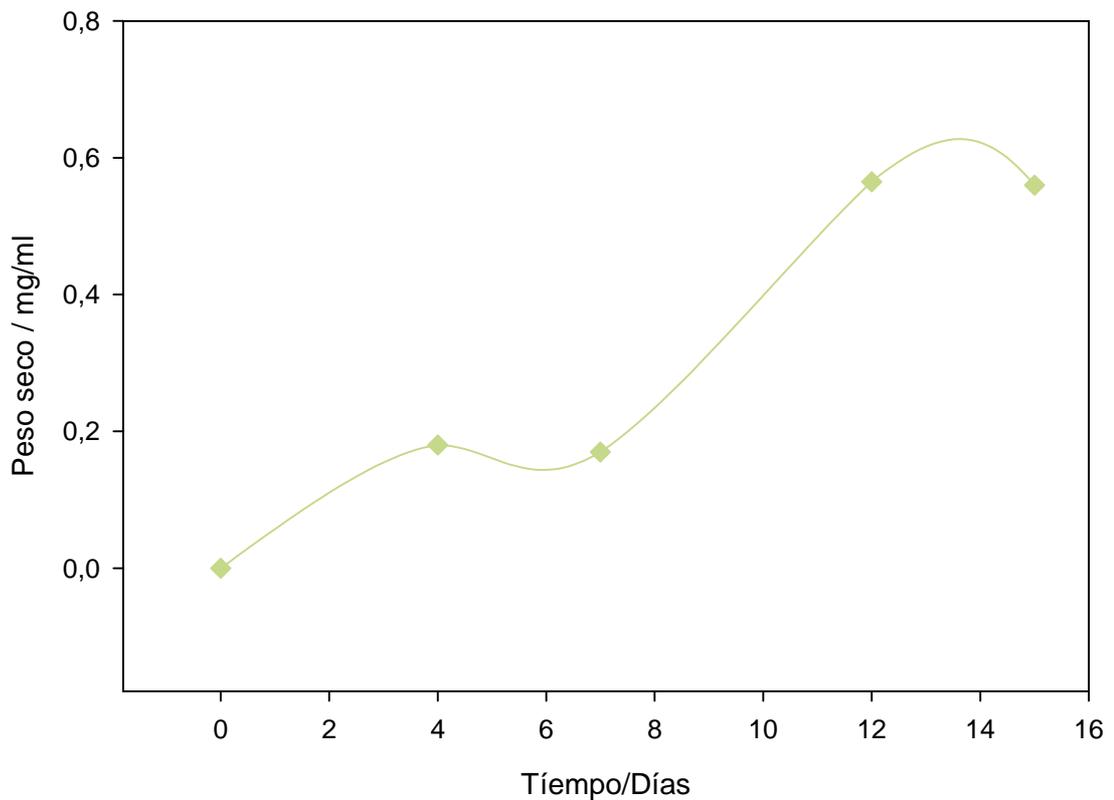


Figura 3.1: Variación de peso seco en función del tiempo para el cultivo batch con *Desulfovibrio sp*

En la Figura 3.2, se puede observar la concentración de bacterias en suspensión en función del tiempo. En ambas figuras se produce un incremento que indica un crecimiento bacteriano, aunque el peso seco presenta un comportamiento más irregular. En el caso de la población bacteriana en suspensión se observa un incremento constante de tipo exponencial hasta los 8 días a partir de los cuales se alcanza una meseta y un posterior decrecimiento que puede atribuirse a la lisis bacteriana.

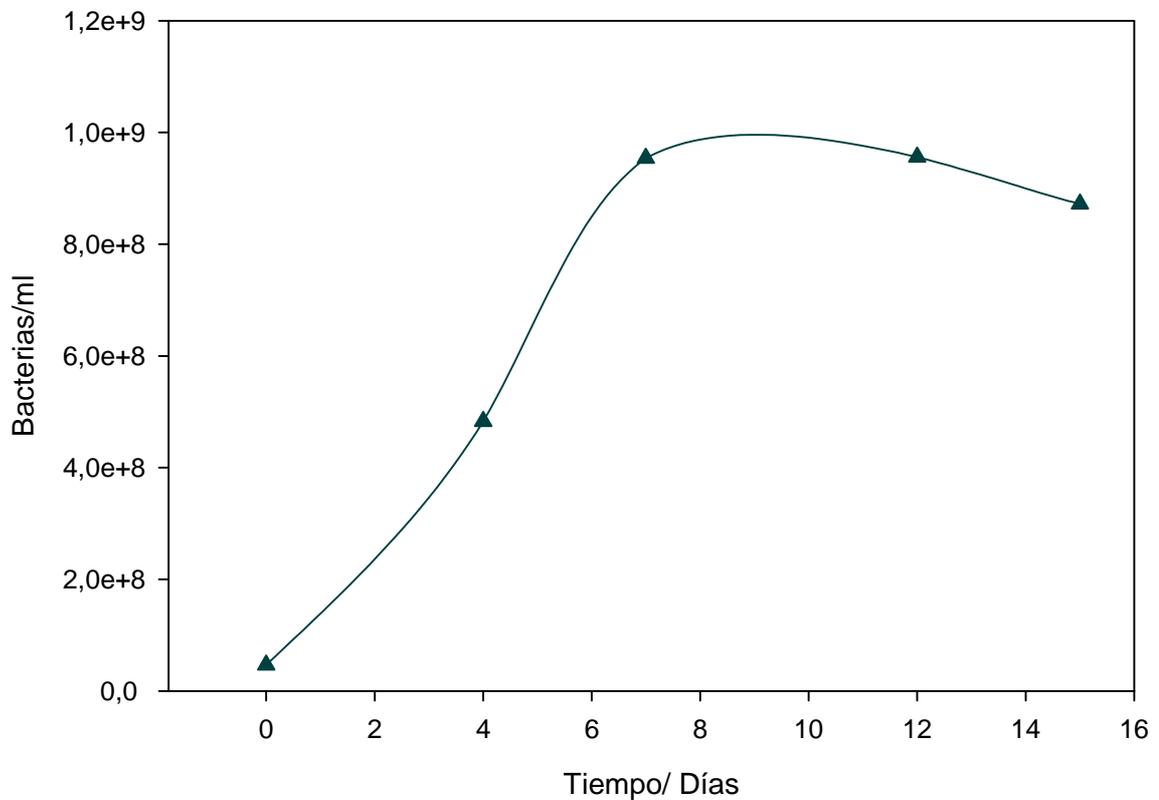


Figura 3.2: Población bacteriana en suspensión en función del tiempo para el cultivo batch con *Desulfovibrio sp*

Como se ha fundamentado anteriormente (capítulo 2), la determinación de la densidad óptica es otra medida que permite evaluar el crecimiento microbiano. En la Figura 3.3 se ha representado la absorbancia a 600 nm en función del tiempo. El comportamiento de esta magnitud, aunque se incrementa en el tiempo del mismo modo que las dos magnitudes analizadas anteriormente, mantiene mayor semejanza con la evolución del peso seco.

En la Figura 3.4 se han volcado los datos obtenidos de las concentraciones de sulfato. Este anión es utilizado durante el crecimiento como aceptor electrónico por lo que es consumido tal cual puede observarse en la figura. Desde un valor inicial de aproximadamente 3,5 g/l, desciende hasta alcanzar un valor de 1,5 g/l. A partir de entonces, la concentración de sulfato comienza a decrecer con una pendiente mucho menor sugiriendo alguna inhibición por producto (Postgate, 1954).

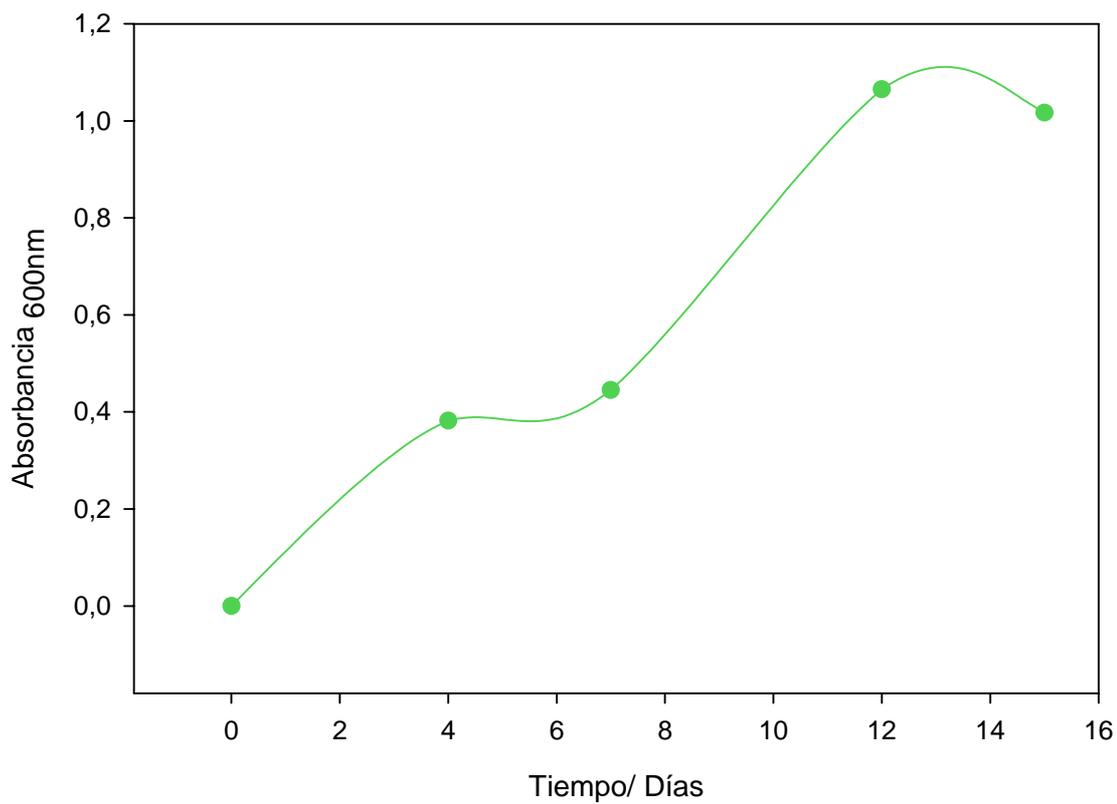


Figura 3.3: Absorbancia (600 nm) en función del tiempo para el cultivo batch con *Desulfovibrio sp*

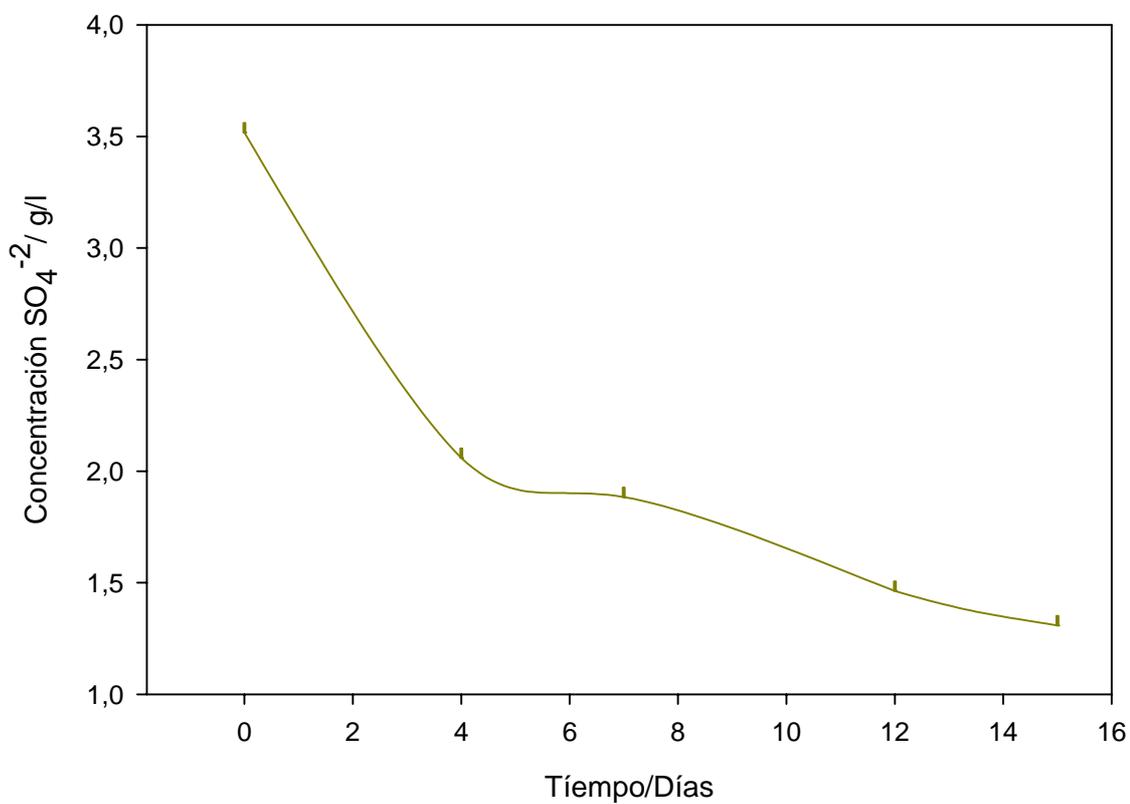


Figura 3.4: Reducción de sulfato en función del tiempo para el cultivo batch con *Desulfovibrio sp*

Para poder comparar más claramente el comportamiento de las distintas magnitudes medidas, se han graficado todas ellas en forma conjunta en la Figura 3.5.

Puede observarse que a medida que el número de bacterias se incrementa, la concentración de sulfato decrece. Cuando el crecimiento se detiene, el cambio en la concentración de sulfato se reduce significativamente; este comportamiento es una comprobación de que la reducción de sulfato está directamente asociada al crecimiento bacteriano.

La densidad óptica y el peso seco tienen comportamientos similares pero difieren del comportamiento de la población bacteriana. Aquellas magnitudes siguen creciendo aún después que la población bacteriana en suspensión se ha estancado e incluso comenzado a descender. Probablemente esto es una indicación de la formación de sólidos (que incrementarían tanto la turbidez como el peso seco) y la eventual adherencia de microorganismos sobre ellos.

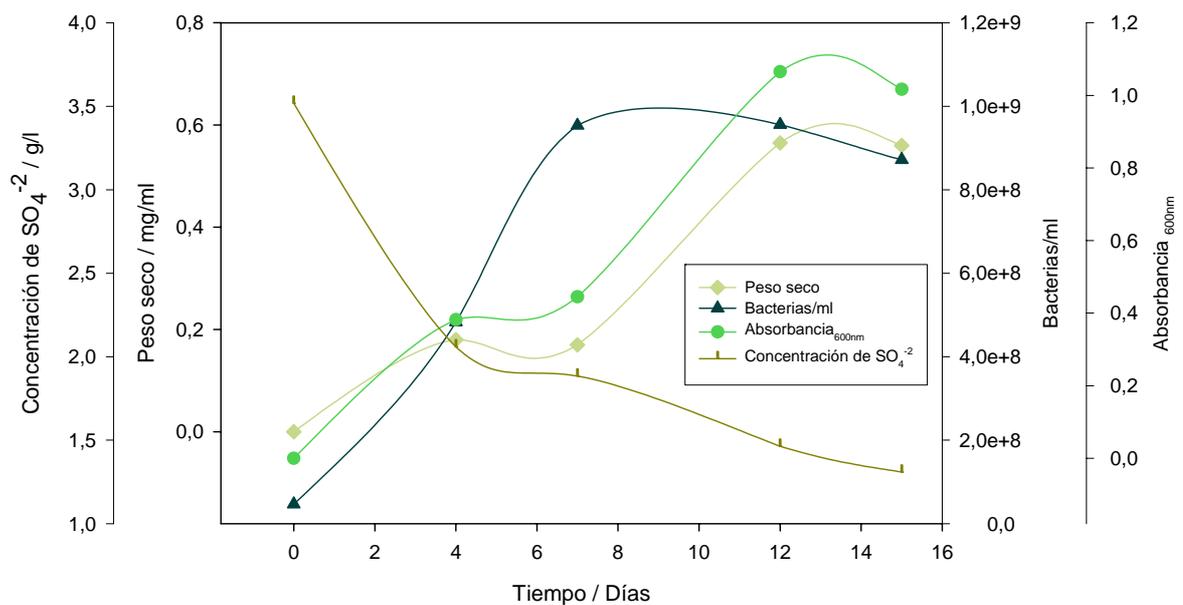


Figura 3.5: Comparación de la evolución de las magnitudes medidas para el cultivo batch con *Desulfovibrio sp*

Los datos obtenidos de biomasa formada (a través del valor del peso seco) y de sulfato consumido, permite calcular el rendimiento en biomasa $Y_{Biomasa/Sulfato}$ cuyo valor es 0,253 g/g. Este valor se encuentra en el rango de los valores reportados en literatura (entre 0,111 y 0,34 g/g) para distintas especies de BSR utilizando lactato como fuente de carbono (Moosa, S. y col, 2002).

Los distintos métodos utilizados para seguir la evolución de este cultivo tienen ventajas y desventajas; la determinación a través de la densidad óptica o del conteo en microscopio permite obtener el dato de manera inmediata. Sin embargo, el conteo por microscopía no puede realizarse en aquellos cultivos en los que se produzca biomasa adherida. Por otra parte, la medida de densidad óptica no debe realizarse en cultivos en los cuales haya presencia de precipitados, ya que estos interfieren en la turbidez del medio. La presencia de precipitados puede afectar también el peso seco; además, para obtener valores de pesadas significativos, se necesitan volúmenes considerables de muestras que, en las experiencias realizadas posteriormente (en frascos de 10 y 100 ml), no resulta posible (Prescott y col., 1999).

Teniendo en cuenta, los resultados obtenidos con los distintos métodos aplicados, y evaluando las ventajas y desventajas antes mencionadas, se puede concluir que el método de determinación de la concentración de sulfato es el más apropiado para seguir el comportamiento del cultivo, debido a la facilidad y rapidez de su implementación.

3.2. Efecto del pH en el crecimiento bacteriano

El pH es un parámetro crítico en el cultivo de microorganismos ya que estos sólo pueden crecer en un rango estrecho de pH (Ingraham e Ingraham,1998). Cada tipo de microorganismo tiene un rango de pH. Fuera de ese intervalo, los microorganismos son inhibidos parcial o totalmente. Los efluentes industriales que llevan alta carga metálica poseen amplios rangos de pH, por lo que resulta importante la evaluación de la capacidad de las células de *Desulfovibrio sp* para crecer a distintos valores de pH. En particular, resulta importante analizar valores más bajos de pH que favorecen la solubilidad de los iones metálicos.

En la Figura 3.6 se pueden ver los resultados de la experiencia. Puede observarse que la mayor reducción de sulfato se produjo en el cultivo que tenía un pH de 7,5 que corresponde aproximadamente al pH óptimo de crecimiento de las BSR (Barton y Tomei, 1995). Se detectó también una significativa reducción de sulfato (algo menor a la detectada a 7,5) cuando el pH del medio fue de 6. En cambio, en el cultivo con pH 5 no se observó disminución de la concentración de sulfato. Este comportamiento puede atribuirse a una inhibición del crecimiento bacteriano causado por la acidez del medio (Fauque G. D., 1995).

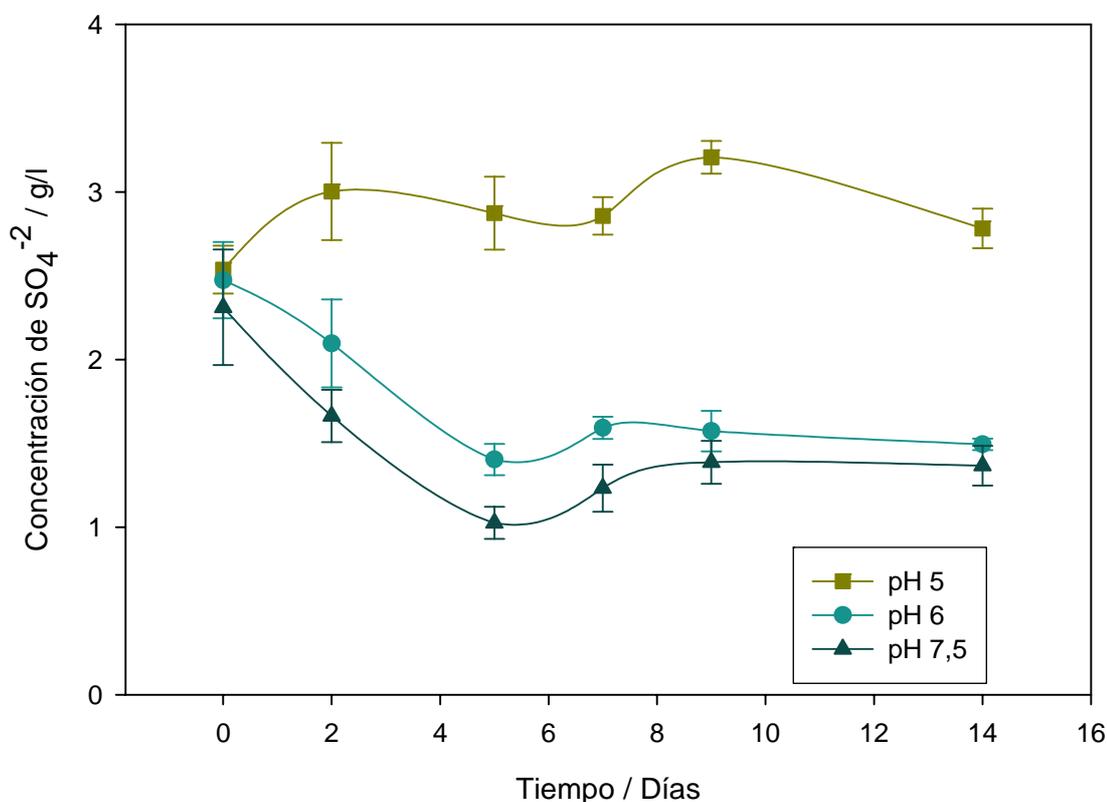


Figura 3.6: Reducción de sulfato por las células de *Desulfovibrio sp*. en distintas condiciones de pH

3.3. Influencia de la fuente de carbono en el crecimiento bacteriano

En la experiencia realizada, no todas las fuentes de carbono utilizadas resultaron ser igual de eficientes para producir el crecimiento de *Desulfovibrio sp.* A partir de la medida de sulfato consumido en los cultivos, se elaboró la Tabla 3.1. En los cultivos con glucosa y acetato de sodio no se produjo reducción de sulfato. En los cultivos con etanol se observó una reducción en la concentración de sulfato, aunque fue significativamente menor que la obtenida con lactato.

Tabla 3.1: Comparación de la reducción de sulfato en los cultivos con distintas fuentes de carbono

<i>Fuente de carbono</i>	<i>Reducción de sulfato</i>	
Lactato	++	+ Capacidad para realizar la reducción de sulfato
Etanol	+	- Incapacidad para realizar la reducción de sulfato
Glucosa	-	
Acetato de sodio	-	

En el medio de cultivo con etanol como fuente de carbono, la concentración de sulfato se redujo un 16 % al cabo de 10 días de cultivo; en el mismo tiempo, en el cultivo con lactato se registró una reducción de la concentración de sulfato del orden de 44 %. A partir de estos datos, se concluye que el lactato es la fuente de carbono que permite mayor reducción de sulfato. Esto coincide con lo indicado en bibliografía; de acuerdo a White y Gadd (1996), a diferencia de otras bacterias sulfato-reductoras, *Desulfovibrio* tiene restringida la capacidad metabólica. El sustrato favorito para el crecimiento es el lactato, el cual es oxidado por la vía del piruvato hasta acetato y CO₂. Otros numerosos compuestos como ácidos del ciclo de Krebs, piruvato y alcoholes son oxidados incompletamente (Gibson, 1990; Postgate, 1954; Widdel y Bak, 1992).

Desde el punto de vista de la biorremediación, y en vista a la eficacia observada, el lactato sería el sustrato más conveniente ya que es el que permite obtener mayor cantidad de sulfuro. Si bien la reducción de sulfato en presencia de etanol no es tan importante, como este sustrato es más económico, se deberían optimizar las condiciones de cultivo que permitan obtener una mayor reducción de sulfato, para poder utilizarlo en un proceso industrial. De todos modos, debería extenderse el presente estudio a otras fuentes de carbono que sean económicas y de fácil disponibilidad y que permitan un crecimiento similar al conseguido con lactato.

3.4. Bioprecipitación de metales utilizando células en suspensión

3.4.1. Precipitación de cromo

Los porcentajes de reducción de sulfato obtenidos para todos los cultivos que se realizaron en presencia de cromo se pueden observar en la Figura 3.8.

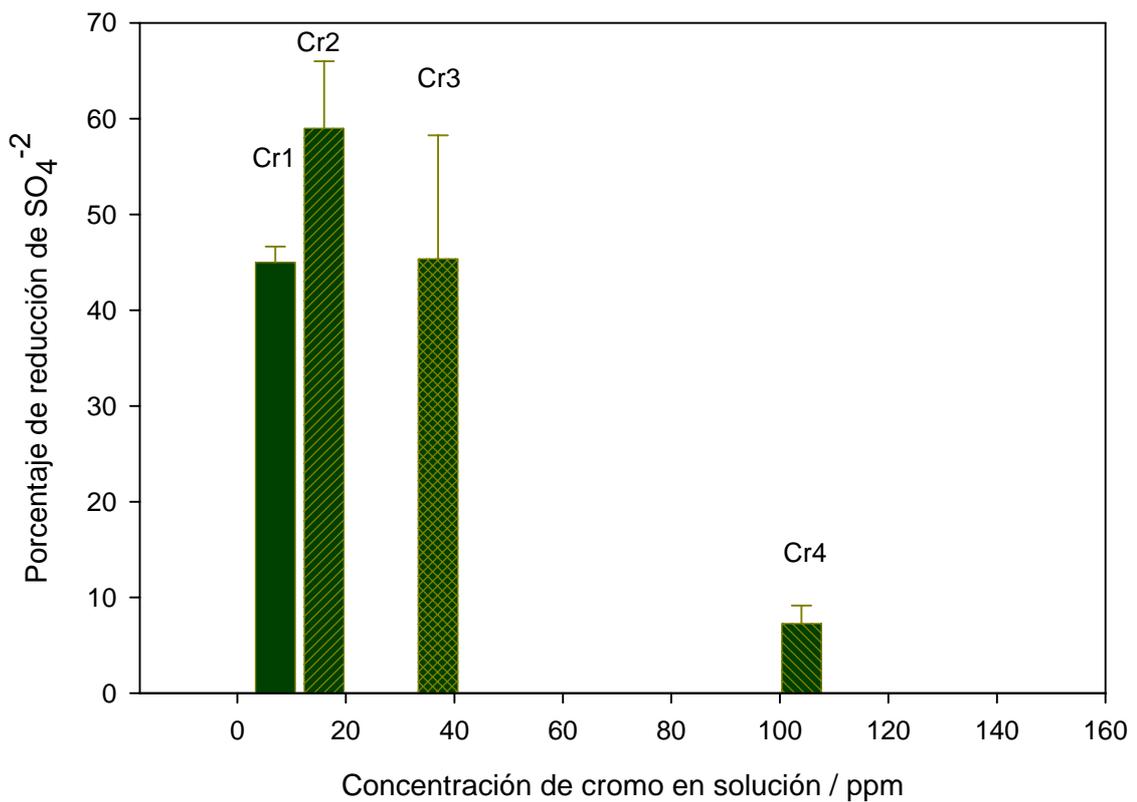


Figura 3.8: Porcentaje de reducción de sulfato en cultivos de *Desulfovibrio sp.* en presencia de distintas concentraciones de cromo

En la figura anterior puede observarse que se ha producido una reducción de sulfato significativa en los cultivos Cr1, Cr2 y Cr3. Si bien las reducciones fueron similares en los tres sistemas, el máximo consumo (aproximadamente 59 %) se obtuvo en el segundo sistema que contenía 17 ppm de cromo, lo que podría sugerir un efecto estimulador del crecimiento bacteriano producido en bajas concentraciones de dicho metal, tal cual se ha visto en Cervantes y col. (2001). En el sistema Cr4 la reducción de sulfato fue sustancialmente más baja (inferior al 10 %) probablemente debida a algún tipo de inhibición producida por el cromo en alta concentración (Cabrera y col., 2006).

Los porcentajes de cromo precipitados luego de 13 días se muestran en la Figura 3.9. Estos porcentajes fueron calculados para cada concentración utilizando como referencia el control abiótico que contenía la misma concentración inicial del metal. En todos los casos se observa una disminución en la concentración del metal en solución en todos los cultivos.

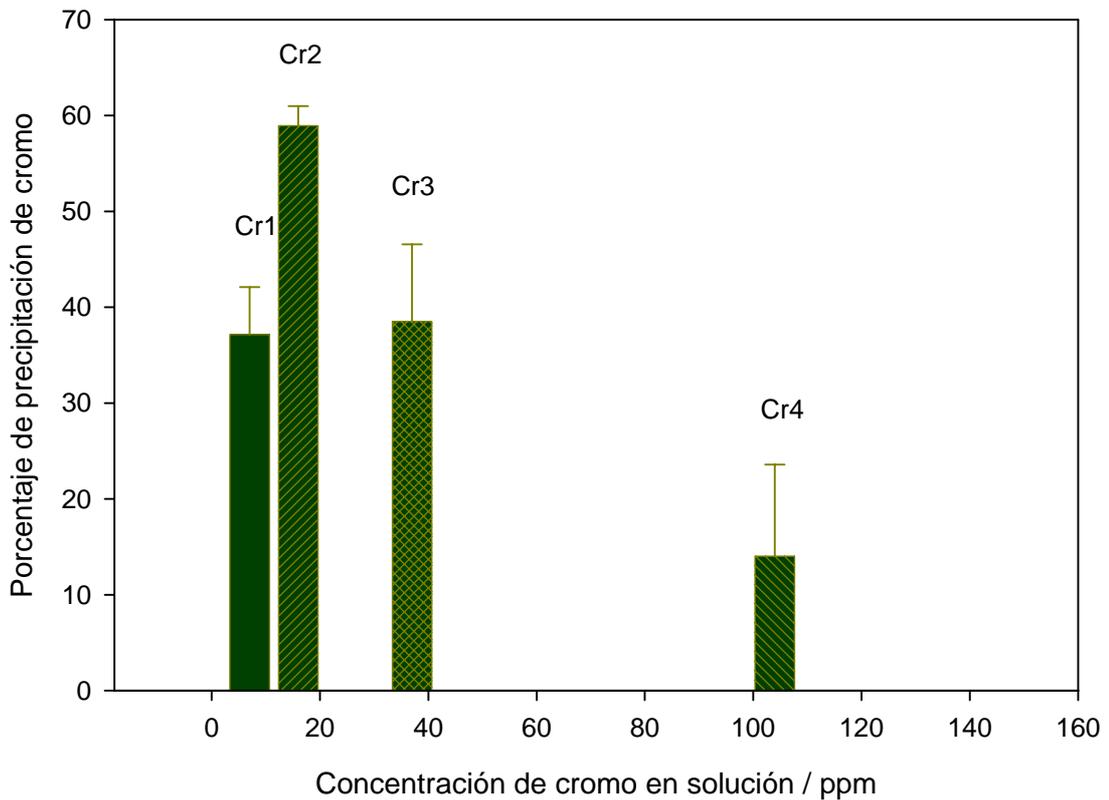


Figura 3.9: Porcentajes de precipitación de cromo obtenidos en cultivos de *Desulfovibrio sp.*

Los cultivos Cr1, Cr2 y Cr3 tuvieron una apreciable precipitación de cromo con un porcentaje máximo de 58 % para una concentración igual a 17 ppm. Este sistema fue precisamente el que mostró una mayor reducción de sulfato y, consecuentemente, una mayor producción de sulfuros. En el sistema Cr4 el porcentaje de precipitación fue de 14 %, coincidiendo con una muy baja reducción de sulfato.

De los resultados analizados se puede concluir que estos microorganismos pueden crecer en un amplio rango de concentraciones de cromo y que en estas condiciones son capaces de lograr la precipitación de buena parte del metal en solución. De acuerdo a lo observado, concentraciones cercanas a 100 ppm resultan tóxicas para *Desulfovibrio sp.*

3.4.2. Precipitación de cinc

En la Figura 3.10 se grafican los porcentajes de reducción de sulfato obtenidos, luego de 13 días, en los cultivos de *Desulfovibrio* en presencia de diferentes concentraciones de cinc. En el gráfico puede observarse que se produjo una reducción significativa de sulfato en los cultivos Zn1, Zn2 y Zn3 que, incluso, fue ligeramente superior a la obtenida en los cultivos realizados para idénticas concentraciones de cromo. Adicionalmente, la máxima reducción (60 %) se obtuvo para el segundo sistema (30 ppm). El sistema Zn4 mostró una fuerte inhibición de la reducción de sulfato (Cabrera y col., 2006).

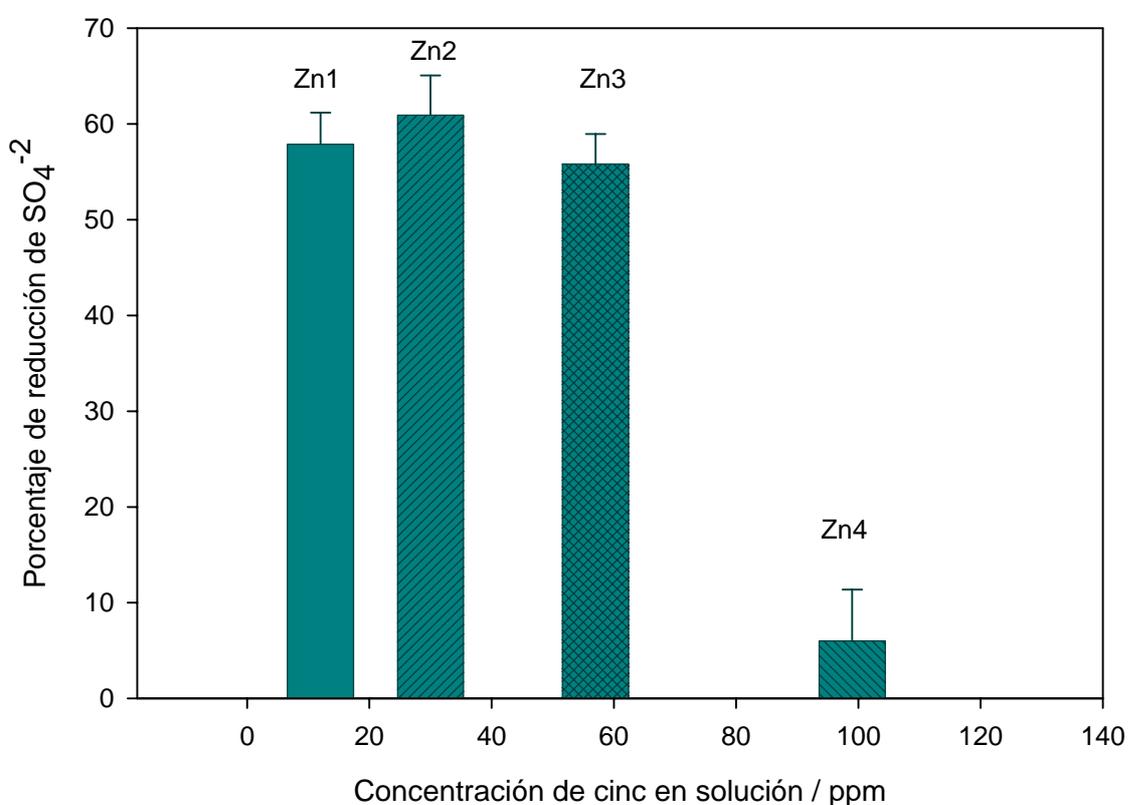


Figura 3.10: Porcentaje de reducción de sulfato en cultivos de *Desulfovibrio sp.* en presencia de distintas concentraciones de cinc

Los datos de precipitación de cinc se exponen en la Figura 3.11. Los porcentajes de precipitación fueron calculados, tal cual se hizo en la sección anterior, utilizando como referencia los valores de concentración de cinc correspondientes al final de la experiencia en los controles abióticos. En la figura puede comprobarse que los porcentajes de precipitación fueron cercanos al 100% en Zn1, Zn2 y Zn3; en cambio, en el cultivo Zn4 no se produjo una precipitación significativa (cercana al 5 %).

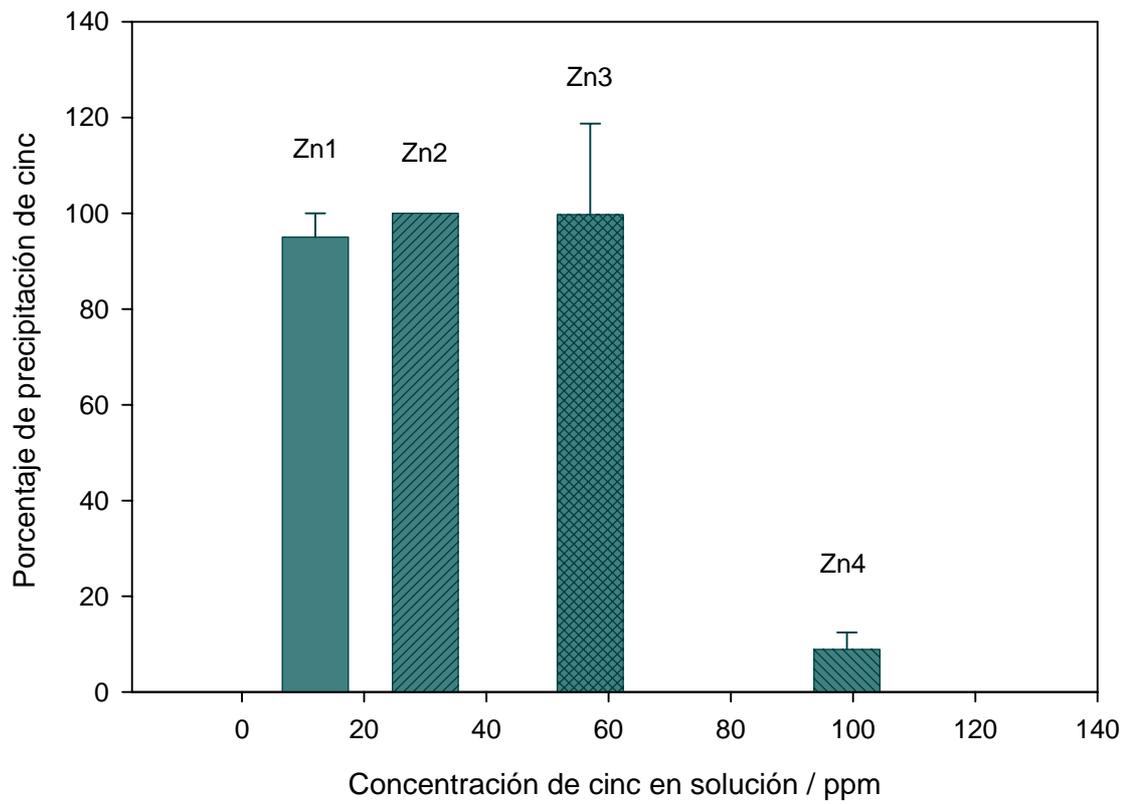


Figura 3.11: Porcentajes de precipitación de cinc obtenidos en cultivos de *Desulfovibrio sp.*

3.5. Crecimiento de bacterias inmovilizadas. Bioprecipitación de metales utilizando bacterias inmovilizadas.

En la Figura 3.12 se presenta la evolución característica de la concentración de sulfato en un cultivo de *Desulfovibrio sp.* conteniendo perlas de vidrio como soporte inerte. Los aumentos bruscos en la concentración de sulfato responden a los cambios del medio de cultivo agotado por medio fresco. Estos cambios fueron realizados cuando la concentración de sulfato alcanzó valores de aproximadamente 1 g/l. Debe aclararse que el recambio del medio de cultivo en los diferentes sistemas se realizó en días distintos dependiendo del progreso del sistema; no obstante, se asumió que para el día 31, los biofilms ya estaban formados en todos los sistemas ya que al menos se habían realizado tres cambios del medio de cultivo en cada uno.

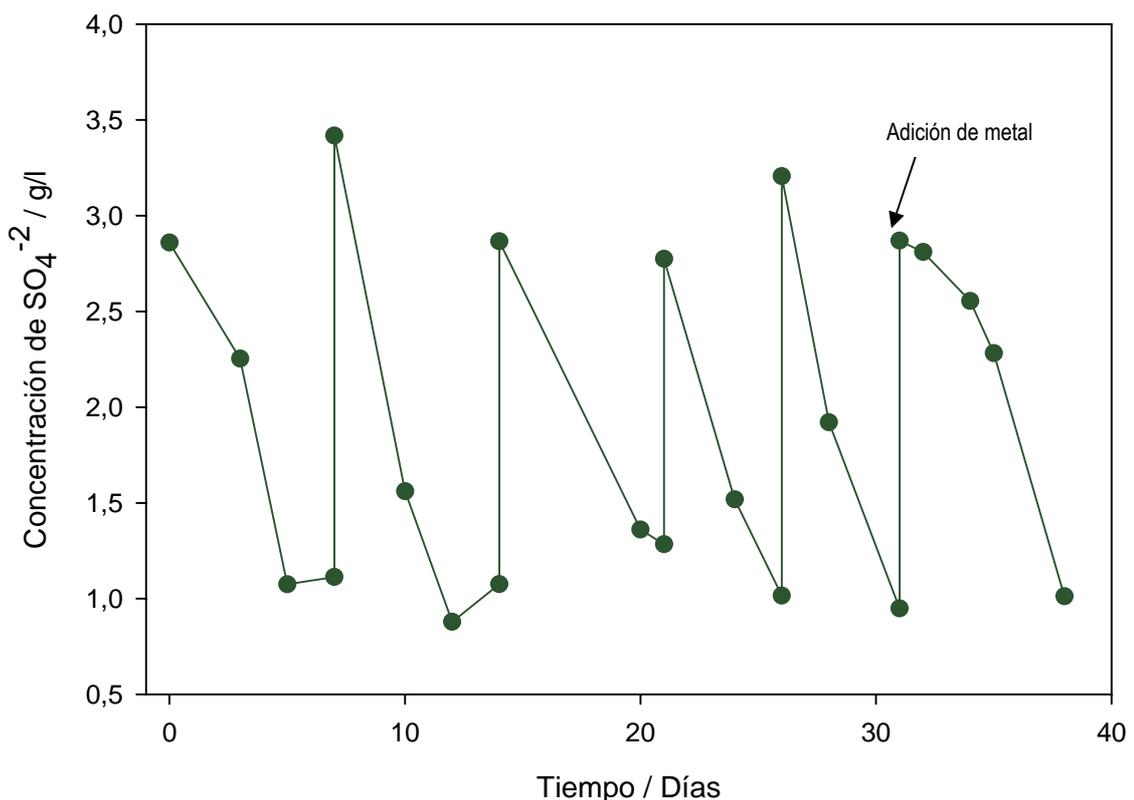


Figura 3.12: Concentración de sulfato a través del tiempo en cultivos de *Desulfovibrio sp.* en presencia de perlas de vidrio. Cada incremento brusco de la concentración se corresponde con un cambio de medio agotado por medio fresco.

A partir de allí, se adicionó un volumen de una solución concentrada de cromo o cinc de modo tal que la concentración final del metal en la solución fuera aproximadamente 10 ppm.

Luego de la adición del metal se incubó cada cultivo en las mismas condiciones en las que se produjo la inmovilización. Se tomaron muestras cada 24 – 48 horas.

En la Figura 3.13 se observa la variación de la concentración de sulfato luego de la adición del metal para todos los sistemas. En esta figura se detecta una disminución en la concentración de sulfato semejante en los dos sistemas analizados independientemente del metal presente.

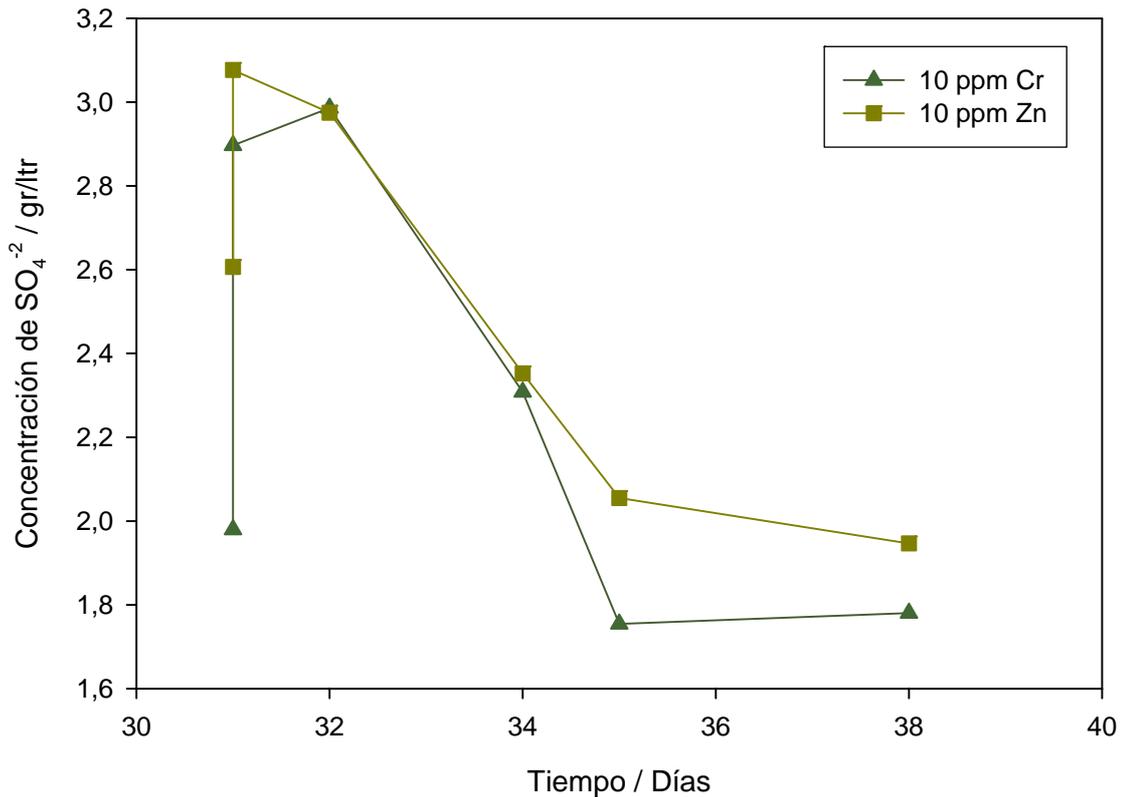


Figura 3.13: Concentración de sulfato a través del tiempo en biofilms de *Desulfovibrio sp.* sobre perlas de vidrio y en presencia de cromo o cinc.

En este caso el soporte inerte utilizado para lograr la inmovilización fue sílica gel. Como en el caso anterior, todos los cultivos tuvieron un comportamiento similar por lo que se presenta un gráfico representativo de todos los cultivos realizados (Figura 3.14).

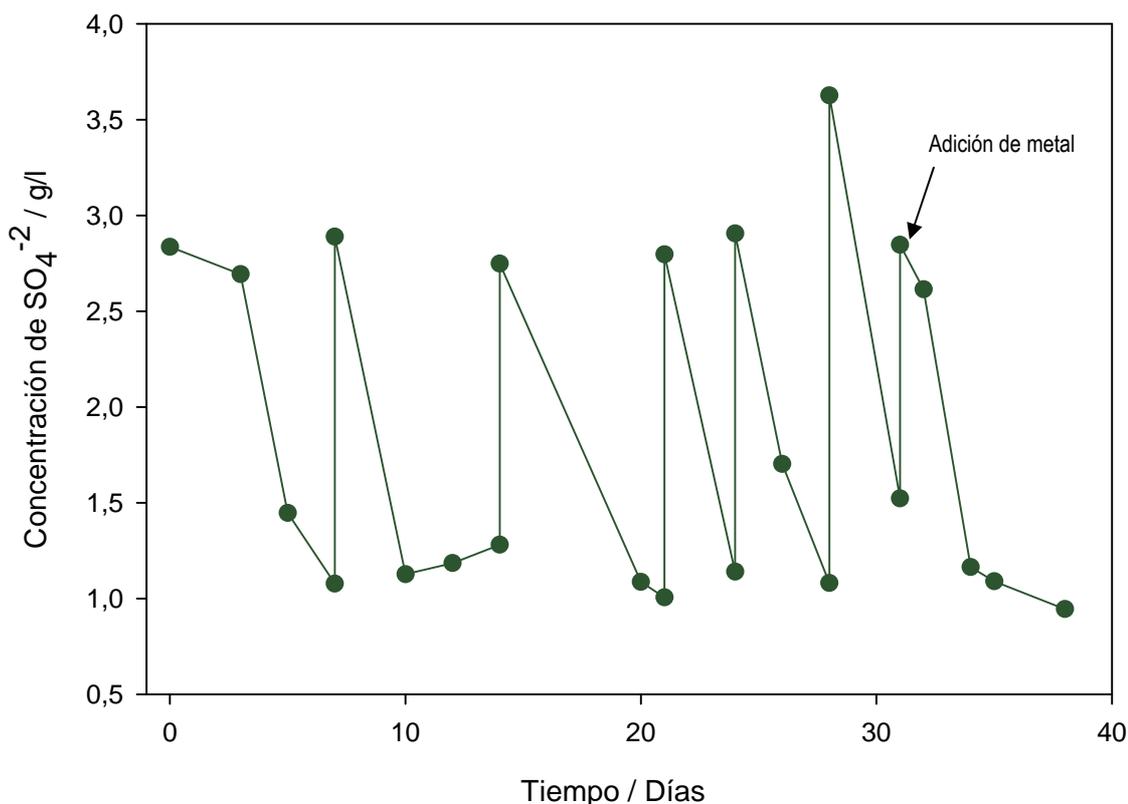


Figura 3.14: Concentración de sulfato a través del tiempo en cultivos de *Desulfovibrio sp.* en presencia de sílica gel. Cada incremento brusco de la concentración se corresponde con un cambio de medio agotado por medio fresco.

Del mismo modo que para perlas de vidrio, se supuso que el biofilm de BSR sobre la sílica gel se encontraba formado para el día 31. A partir de ese momento se adicionó la solución de cromo o cinc. En función de analizar el efecto que sobre la precipitación de un metal pudiera tener la presencia del otro metal, se realizó un sistema mixto en el cual se agregaron soluciones de ambos metales a fin de alcanzar concentraciones del orden de 10 ppm para cada uno en la solución final.

Las BSR son capaces de formar biofilms sobre diferentes soportes, como: carbón vegetal, poliestireno, cerámico, entre otros. La adherencia y efectividad en la reducción de sulfato, varían entre los mismos según lo expuesto por Silva y col (2006). La comparación de los datos obtenidos para la reducción de sulfato por células inmovilizadas sobre perlas de vidrio (figura 3.12) y por células inmovilizadas sobre sílica gel (figura 3.14) nos permiten concluir que la reducción de sulfatos no se ve significativamente afectada por la naturaleza del soporte.

En la Figura 3.15 se muestra la evolución de la concentración de sulfato a lo largo del tiempo luego de la adición de los metales.

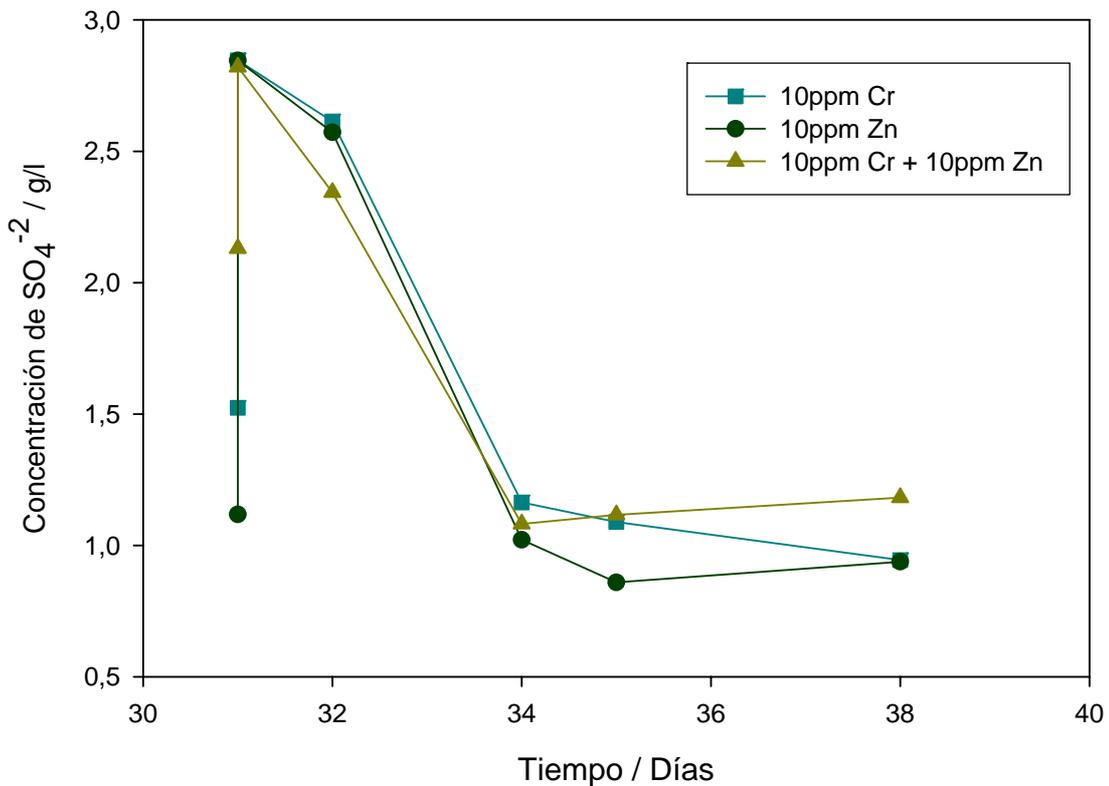


Figura 3.15: Concentración de sulfato a través del tiempo en biofilms de *Desulfovibrio sp.* sobre sílica gel y en presencia de cromo o cinc.

En este gráfico puede verse que todos los sistemas analizados tienen un comportamiento muy similar. En todos los casos se detectó una disminución de la concentración de sulfato hasta el día 34, y a partir de este día dicha magnitud se mantiene aproximadamente constante. El valor obtenido es de 1 g/l sugiriendo alguna inhibición por producto (Cooney y col., 1996).

Los porcentajes de precipitación de cromo, luego de 8 días de agregado el metal, se muestran en la Figura 3.16; se han incluido los datos para los dos biofilms (sobre sílica gel y sobre perlas de vidrio) en función de poder comparar la eficacia de ambos en la precipitación del metal. El biofilm de BSR sobre sílica gel resultó más eficiente para la precipitación de cromo que el biofilm sobre perlas de vidrio. En la figura también se ha incluido el porcentaje de precipitación de cromo obtenido en un biofilm sobre sílica gel al cual se le agregó una solución mixta (conteniendo 10 ppm de cromo y 10 ppm de cinc); se utilizó el biofilm sobre sílica gel debido a su mayor eficiencia en la precipitación de cromo. En la presencia de cinc, el biofilm fue aun más eficiente para precipitar cromo. De todos modos, en los tres casos, la concentración residual de cromo luego de los 8 días, es muy superior (del orden de 30 veces) al máximo nivel permitido por las legislaciones vigentes en la mayoría de los países del mundo, que es de aproximadamente 100 µg/l. En función de lograr

reducir los niveles finales de cromo, probablemente sería necesario recurrir a sistemas continuos (es decir, pasaje continuo de la solución o efluente con cromo sobre el biofilm) lo cual excede el presente trabajo final.

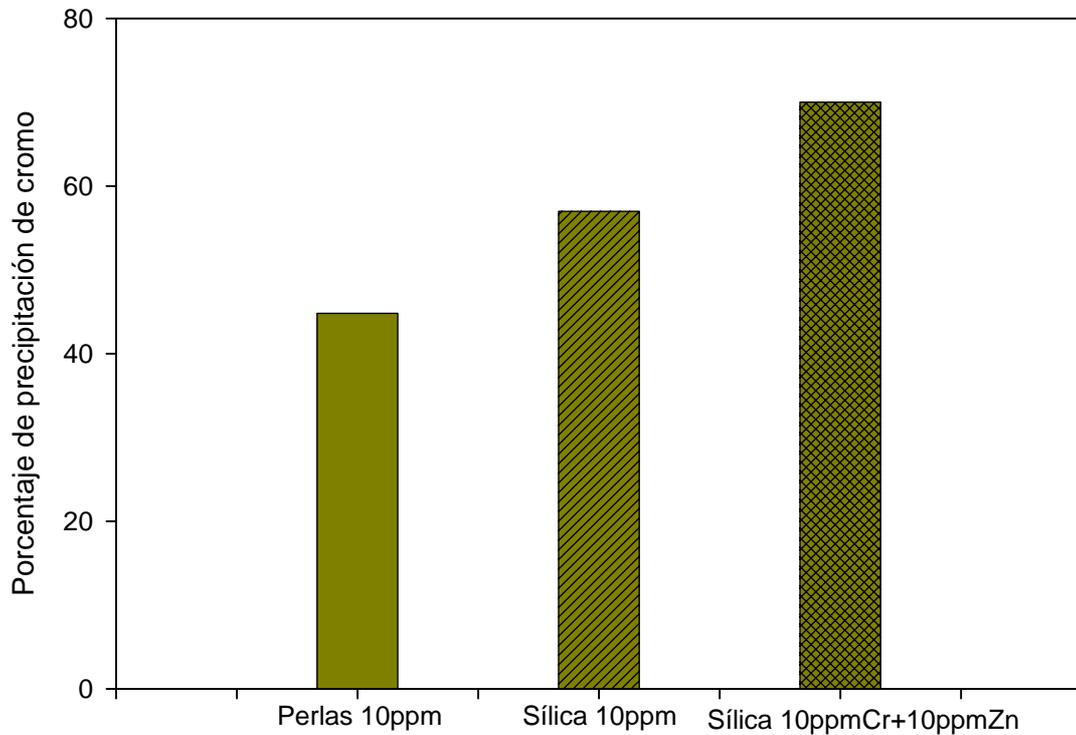


Figura 3.16: Porcentaje de precipitación de cromo luego de 8 días de contacto con biofilms de *Desulfovibrio sp.* sobre sílica gel y sobre perlas de vidrio.

Los porcentajes de precipitación de cinc, luego de 8 días de agregado el metal, se muestran en la Figura 3.17; se han incluido los datos para los dos biofilms (sobre sílica gel y sobre perlas de vidrio) en función de poder comparar la eficacia de ambos en la precipitación del metal. Se ha incluido el porcentaje de precipitación obtenido para un biofilm sobre sílica gel puesto en contacto con una solución de ambos metales. Se puede observar en la figura que, independientemente del soporte utilizado y de la presencia o no de otro metal, el biofilm de BSR mostró máxima eficiencia para precipitar el cinc desde la solución a la concentración a la cual se trabajó.

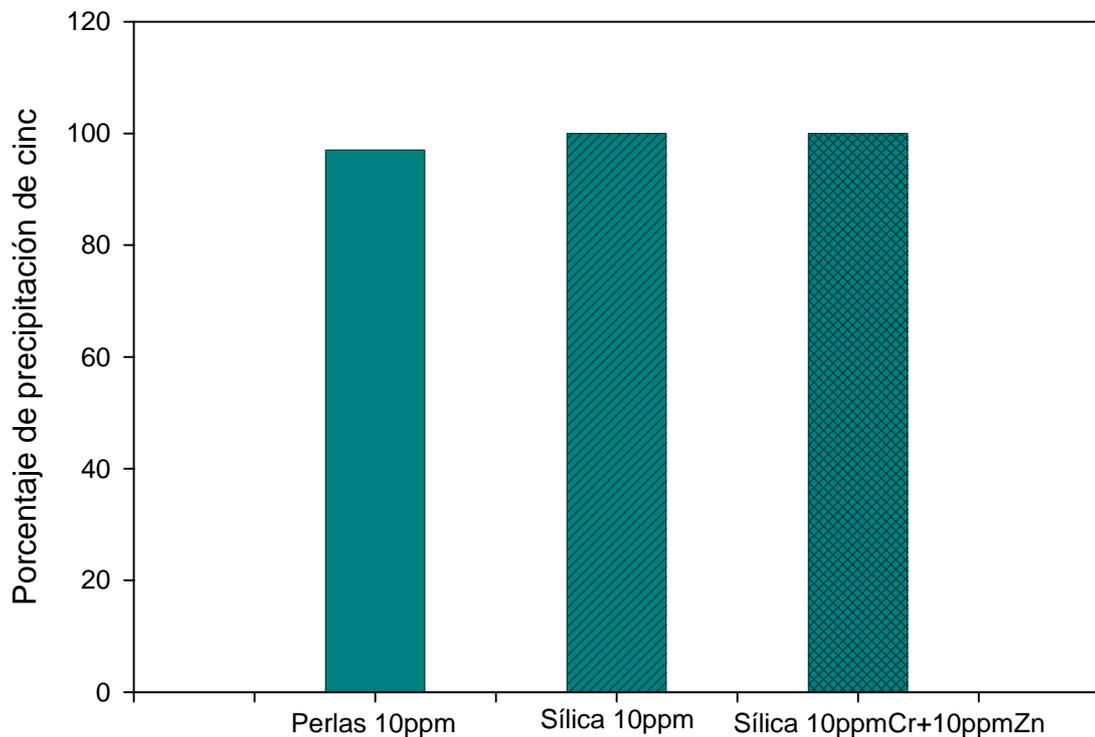


Figura 3.17: Porcentaje de precipitación de cinc luego de 8 días de contacto con biofilms de *Desulfovibrio sp.* sobre sílica gel y sobre perlas de vidrio.

3.6. Referencias

- Barton L.L., Tomei F.A. (1995) Characteristics and activities of sulfate-reducing bacteria. In: *Sulfate-Reducing Bacteria* (Ed: Baron I.L.), Plenum Press, New York, pp. 1-32
- Cabrera G., Pérez R., Gómez J.M, Ábalos A., Cantero D. (2006) Toxic effects of dissolved heavy metals on *Desulfovibrio vulgaris* and *Desulfovibrio sp.* Strains. *Journal of Hazardous Materials* 135: 40–46
- Cervantes C, Campos-García J., Devars S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera H., Torres-Guzmán J.C, Moreno-Sánchez R. (2001) Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews* 25: 335-347.
- Cooney J.M, Roschi E., Marison I.W, Comminellis C., Stockar U. (1996) Physiologic studies with the sulfate-reducing bacterium *Desulfovibrio desulfuricans*: Evaluation for use in a biofuel cell. *Enzyme and Microbial Technology* 18: 358-365.
- Fauque G. D. (1995) Ecology of Sulfate-reducing bacteria. In: *Sulfate-Reducing Bacteria* (Ed: Baron I.L.), Plenum Press, New York, pp. 217-241.

- Gibson G.R. (1990) Physiology and ecology of the sulphate-reducing bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* 69: 769-797.
- Ingraham J., Ingraham C. (1998) Métodos de estudio de los microorganismos. En: *Introducción a la microbiología*, Editorial Reverté S.A., pp. 48-73.
- Moosa S., Nematí M., Harrison S. T. L. (2002) A kinetic study on anaerobic reduction of sulphate, part I: Effects of sulphate concentration. *Chemical Engineering Science* 57: 2773-2780.
- Postgate J. R. (1954) Recent Advances in the Study of the Sulfate-Reducing Bacteria. *Bacteriological Reviews* 29: 425-441.
- Prescott L. M., Harley, J. P., Klein, D. A. (1999) Crecimiento microbiano. En: *Microbiología*, Editorial Mc Graw Hill Interamericana, México, pp. 118-121.
- Silva A.J., Hirasawa J.S., Varesche M.B., Foresti E., Zaiat M. (2006) Evaluation of support materials for the immobilization of sulfate-reducing bacteria and methanogenic archaea. *Anaerobe* 12: 93–98
- Widdel F., Bak F. (1992) Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In: *The Prokaryote, IV* (Eds: Balows A., Truper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K-H.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 3352-3378.
- White C., Gadd G.M. (1996) A comparison of carbon/energy and complex nitrogen sources for bacterial sulphate-reduction: potential applications to bioprecipitation of toxic metals as sulphides. *Journal of Industrial Microbiology* 17:116-123.

Capítulo 4

Conclusiones

4.1. Conclusiones finales del Trabajo

- La determinación de la concentración de sulfato resultó la técnica más conveniente, aunque con una importante desviación experimental, para seguir la evolución del crecimiento de un cultivo de *Desulfovibrio*.
- El rendimiento en biomasa obtenido experimentalmente fue $Y_{\text{biomasa/sulfato}} = 0,253$ g/g utilizando lactato como fuente de carbono en cultivos batch.
- El crecimiento a pH 7,5 fue el más adecuado dentro del rango estudiado. No se observó crecimiento a pH menor a 6,0.
- Etanol fue utilizado como fuente de carbono alternativa al lactato aunque no ocurrió lo mismo con acetato y glucosa.
- Las células plantónicas de *Desulfovibrio* fueron capaces de crecer y de precipitar prácticamente en forma completa al cinc(II) de las soluciones, hasta concentraciones del orden de 60 ppm. En el caso de cromo(III), la precipitación máxima fue del orden de 60% obtenida cuando la concentración inicial fue aproximadamente 17 ppm.
- Concentraciones de cinc o cromo del orden de 100 ppm provocaron inhibición prácticamente completa de la reducción de sulfato
- Se obtuvo una adecuada formación de biofilms de *Desulfovibrio* tanto sobre perlas de vidrio como sobre sílica gel.
- Los biofilms de *Desulfovibrio* fueron capaces de precipitar cinc completamente hasta 10 ppm independientemente del soporte usado y de la presencia o no de una cantidad similar de cromo(III).
- El biofilm de *Desulfovibrio* sobre sílica gel fue más eficiente para la precipitación de cromo que el correspondiente sobre perlas de vidrio. El agregado de cinc tuvo un efecto positivo en la precipitación de cromo.

4.2. Posibilidades futuras

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, se pueden sugerir algunos otros aspectos de interés que sería importante estudiar en función de profundizar las conclusiones alcanzadas:

- Estudios de adaptación de *Desulfovibrio* a menores valores de pH
- Estudios con otras fuentes de carbono más económicas que el lactato (en lo posible subproductos o desechos de otros procesos) variando las condiciones para obtener un crecimiento más adecuado de *Desulfovibrio*
- Estudios de crecimiento de *Desulfovibrio* y de bioprecipitación de cinc y cromo en sistemas continuos
- Estudios de bioprecipitación utilizando efluentes reales que contengan uno o ambos metales estudiados

4.3. Conclusiones a nivel personal

- Aprendizaje de diversas técnicas analíticas
- Entrenamiento en la búsqueda bibliográfica
- Entrenamiento en el diseño y desarrollo de un trabajo de investigación
- Entrenamiento en la presentación de resultados y en la discusión de los mismos

Apéndice

Espectrofotometría de Absorción Atómica

La espectrofotometría de absorción atómica con llama es un método analítico para la determinación cuantitativa de elementos, basado en la absorción luminosa específica por átomos libres en estado fundamental.

Al introducir una solución de un elemento metálico, en forma de niebla (pequeñas gotitas) en el seno de una llama adecuada ocurren los siguientes procesos:

- Volatilización del solvente.
- El soluto desolvatado funde.
- El soluto se volatiliza.
- El soluto se disocia total o parcialmente para formar un vapor atómico.

Estos átomos libres, que se encuentran en el estado fundamental, pueden pasar al primer estado excitado absorbiendo luz de determinada longitud de onda (λ), la cual es característica del elemento y del salto energético.

Si la llama es adecuada, las condiciones de la misma hacen que la mayor parte de los átomos que constituyen el vapor atómico se encuentren en el estado fundamental y sean capaces de absorber la radiación característica.

Existe un proceso simultáneo en el cual algunos átomos emiten radiación desde el estado excitado, aunque éstos representan solo una pequeña porción sometidos a la temperatura que se encuentra la llama para ese proceso. La relación entre las distintas poblaciones obedece la ley de distribución de Boltzman:

$$N_i/N_j = e^{(E_i - E_j)/kT}$$

Donde:

N_i : número de átomos en el nivel excitado i .

N_j : número de átomos en el nivel excitado j .

E_i : energía en el nivel i .

E_j : energía en el nivel j .

k : constante de Boltzman.

T : temperatura absoluta.

A mayor temperatura absoluta aumenta la proporción de átomos en el estado de mayor energía. Por esta razón, la temperatura de la llama es un parámetro fundamental en el proceso.

Aquellos elementos fácilmente excitables, cuyos $E = E_i - E_j$ sean pequeños, requerirán ser analizados en llamas de menor temperatura para alcanzar una población atómica preponderantemente en estado fundamental. Lo contrario ocurre con los elementos más refractarios. Si la llama es excesivamente fría, el proceso de disociación no es completo, la población atómica es menor y disminuye la absorción luminosa. Si, en cambio, la llama es excesivamente caliente, se desplaza el equilibrio hacia el estado excitado y se favorece la emisión de luz en lugar de la absorción.

En espectrofotometría de absorción atómica se utiliza la primera línea de resonancia que es la que conduce al primer estado excitado ya que es la más sensible. Se pueden usar otras menos sensibles cuando el elemento a determinar se encuentra en mayores proporciones.

Cuando un haz de luz monocromático (de longitud de onda correspondiente a la línea de resonancia de un elemento) se hace pasar a través de la llama, la intensidad del haz decrecerá como resultado de la absorción si es que en el paso de la luz se encuentra átomos del elemento. La absorción de la luz es proporcional a la concentración de los átomos en la llama, por lo que puede utilizársela como una medida de la concentración del elemento.

La absorción sigue la ley de Beer:

$$A = \log (I_0/I) = k \times b \times c$$

I_0 : intensidad incidente.

I : intensidad transmitida.

k : constante de proporcionalidad.

b : espesor del medio absorbente (la llama).

c : concentración.

La composición básica de un espectrofotómetro de absorción atómica es la siguiente:

- Una fuente luminosa que emite el espectro de líneas del elemento a determinar (lámpara de cátodo hueco).
- Sistema para producir vapor atómico (cámara-nebulizador).
- Llama de temperatura adecuada como para producir la disociación.
- Un selector de longitud de onda (monocromador) para seleccionar entre las líneas de resonancia.
- Sistema de detección de la intensidad emitida al atravesar el medio absorbente, formado por un detector, un amplificador y un instrumento de lectura.

Tanto la cámara de mezclado como el nebulizador son importantes en la operación ya que deben asegurar una mezcla completa de combustible, oxidante y muestra. Para obtener máxima

precisión y exactitud es necesario optimizar los caudales de los gases y la estequiometría de la llama. La sensibilidad instrumental varía con la velocidad de alimentación.

El dispersador debe estar en la posición adecuada para permitir el drenaje del líquido en exceso.

Para cualquier combinación dada de elemento, matriz, velocidad de nebulización, tipo de llama y quemador, la población atómica varía según la zona de la llama de una manera característica; en consecuencia es importante que siempre la zona de máxima población quede en el centro del camino óptico.

Con respecto a la llama, la adecuada es aquella que permite obtener máxima exactitud y minimizar las interferencias.

Para determinar las condiciones donde las interferencias son mínimas, se toman soluciones del elemento de interés con y sin interferencias y se regula la llama para que las lecturas de las señales sean lo más cercanas posibles.

Existen numerosos tipos de llamas según el campo de aplicación, aire-propano, aire-acetileno, óxido nitroso-acetileno, óxido nitroso-propano, etc. En nuestro caso la llama usada es la de aire-acetileno cuya temperatura máxima es 2300°C.

En general las interferencias se pueden resumir según:

- Efectos de matriz que afectan la cantidad de muestra que llega a la llama: dicha cantidad depende de las propiedades físicas de la solución (viscosidad, densidad, tensión superficial, etc.) por ello es necesario que los patrones y la muestra tengan propiedades similares.
- Especies químicas que afectan el número de átomos que llegan a la llama: de dos modos generales, la disociación incompleta o la ionización.
- Absorción de moléculas no disociadas.

Con respecto a las medidas debe construirse primero la curva de calibración para la cual se preparan patrones que contengan cantidades conocidas del elemento a determinar. Luego se regula la lectura del instrumento en 0.00 de absorbancia mientras se nebuliza agua destilada (el solvente o el blanco). A continuación se nebulizan los patrones en orden creciente de concentración y por último las muestras. La interpolación de la curva de calibración con los valores de absorbancia correspondiente a las muestras, permite obtener sus valores de concentración.

A continuación, se indican las condiciones de operación del equipo para la determinación de cromo y cinc.

Cromo:

Longitud de onda más sensible y utilizada: 357,9 nm

Combustible: Acetileno.

Oxidante: Aire.

Caudal: 2,8 – 3 l/min

Tipo de llama: oxidante.

Corriente de lámpara: 10 – 15 mA

Cinc:

Longitud de onda más sensible y utilizada: 213,9 nm

Combustible: Acetileno.

Oxidante: Aire.

Caudal: 2 l/min

Tipo de llama: oxidante.

Corriente de lámpara: 8 mA