



**BIORREMEDIACIÓN DE RESIDUOS PELIGROSOS GENERADOS EN LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA DE LA UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE
CUNDINAMARCA.**

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA ACADÉMICO BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

TRABAJO DE GRADO

BOGOTÁ D.C. 2019



**BIORREMEDIACIÓN DE RESIDUOS PELIGROSOS GENERADOS EN LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA DE LA UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE
CUNDINAMARCA**

**TRABAJO DE GRADO PRESENTADO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE
BACTERIÓLOGOS Y LABORATORISTAS CLÍNICOS**

ESTUDIANTES

JUAN CAMILO ARIZA BARON

JHON SMITH CASTELLANOS SANCHEZ

CRISTIAN FELIPE RAMIREZ MORALES

DOCENTE ASESOR

JUDITH ELENA CAMACHO KURMEN

MS.c Medio Ambiente y Desarrollo, Dr. en Biociencias

UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

PROGRAMA ACADÉMICO BACTERIOLOGÍA Y LABORATORIO CLÍNICO

BOGOTÁ D.C. 2019

DEDICATORIA

A nuestros padres, hermanos, amigos, profesionales y profesores por guiarnos e inspirarnos a realizar nuestras metas y sueños como método de superación personal, agradecemos su paciencia y amor en estos años, gracias a ustedes hemos logrado llegar hasta aquí, y es un privilegio y orgullo ser sus hijos, amigos y futuros colegas.

A todas las personas que estuvieron con nosotros en este camino aportando conocimiento y su tiempo en este proyecto de grado ayudando a que este se realice siempre con éxito.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos principalmente a Dios por permitirnos salir adelante con nuestros proyectos y metas, porque a pesar de que el camino es un proceso de constancia y disciplina siempre tuvimos presente el conocimiento, fe y sabiduría para crecer como profesionales y futuros investigadores.

Agradecemos a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca por permitirnos adquirir tantos conocimientos.

Agradecemos a la profesora Judith Elena Camacho por su amor, su práctica en docencia, sus conocimientos y su paciencia en colaboración para este proyecto de grado, por permitirnos adquirir nuevas habilidades, por siempre corregirnos y encaminarnos para obtener este gran logro que es un reto personal de cada uno de los participantes de este proyecto.

Agradecemos al grupo de investigación Bioprocesos y Control por su apoyo logístico y material de este modo agradecemos al Laboratorio central y personal por su colaboración y apoyo.

Agradecemos a nuestros padres por su amor y su apoyo en este proyecto de grado, por siempre permitir hacer de cada uno de nosotros una persona de bien y de excelencia profesional, por su constancia y motivación diaria.

TABLA DE CONTENIDO.

INTRODUCCIÓN	14
OBJETIVOS.....	17
1. ANTECEDENTES.....	18
2. MARCO REFERENCIAL.....	27
2.1 Residuos peligrosos.	27
2.1.1 Características de peligrosidad.....	27
2.1.2 Residuos generados en laboratorios de docencia.	29
2.2 Colorantes.....	31
2.2.1 clasificación de los colorantes.	31
2.3 Tinciones.....	32
2.3.1 Tinción de Gram.	32
2.3.2 Tinción de Wright.....	34
2.3.3 Tinción de Ziehl – Neelsen.	35
2.3.4 Tinción negativa.....	36
2.3.5 Tinción azul de lactofenol.	37
2.4 Reactivos químicos.	37
2.4.1 Reactivos ácidos.....	37
2.4.2 Reactivos básicos.	37
2.4.3 Reactivos de hipoclorito de sodio.	37
2.5 Técnicas de tratamiento para residuos.....	38
2.5.1. Digestión anaerobia.....	38

2.5.2 Compostaje.....	38
2.5.3 Biorremediación.....	39
2.5.4 Degradación enzimática.....	39
2.5.5 Remediación microbiana.....	40
2.5.6 Fitorremediación.....	40
2.6 Factores que afectan a la biorremediación.....	40
2.6.1 Temperatura.....	40
2.6.2 pH.....	41
2.6.3 Disponibilidad de oxígeno.....	41
2.6.4 Disponibilidad de nutrientes.....	41
2.6.5 Humedad.....	41
2.6.6 Otros factores.....	42
2.7 Biorremediación de colorantes.....	42
2.7.1 Biorremediación de cristal violeta.....	42
2.7.2 Biorremediación de verde de malaquita.....	43
2.8 Microencapsulación.....	47
2.8.1 Procesos de microencapsulación.....	47
2.8.2 Materiales usados en la microencapsulación.....	48
2.8.3 Microencapsulación con alginato de sodio.....	50
2.9 Inmovilización de células.....	50
2.9.1 Inmovilización sin soporte.....	50
2.9.2 Unión covalente.....	51
2.9.3 Adsorción.....	51
2.9.4 Captura.....	52

2.9.5 Membranas semipermeables.....	53
2.10 Degradación enzimática.....	53
2.11 Métodos para determinación de biomasa en procesos biológicos.....	54
2.11.1 Métodos directos.....	54
2.11.2 Métodos indirectos.....	56
2.11.3 Otros métodos.....	56
2.12 Métodos para determinar la concentración del colorante.....	56
2.12.1 DBO ⁵	56
2.12.2 DQO.....	56
2.12.3 pH.....	57
2.12.4 Método espectrofotométrico.....	57
2.12.5 Carbono orgánico total (TOC).....	57
2.12.6 Cromatografía de gases.....	57
2.12.7 Espectrofotometría de gases.....	58
2.12.8 Acoplamiento cromatografía de gases – espectrometría de masas.....	58
2.13 Marco legal.....	58
2.13.1 Resolución 01174 de 2002.....	58
2.13.2 Decreto 4741 de 2005.....	58
2.13.3 Resolución 0062 de 2007.....	59
2.13.4 Resolución 2115 de 2007.....	59
2.13.5 Resolución 043 de 2007.....	59
2.13.6 Resolución 1362 de 2007.....	59
2.13.7 Resolución 631 de 2015.....	59
3. DISEÑO METODOLOGICO.....	60

3.1 Tipo de estudio.....	60
3.1.1 Universo.....	60
3.1.2 Población.....	60
3.1.3 Muestra.....	60
3.2 Hipótesis.....	60
3.2.1 Variables e indicadores.....	60
3.3. Técnicas y procedimientos.....	61
3.3.1 Fase 1. Diagnóstico de los residuos peligrosos generados en los laboratorios de docencia de la universidad colegio mayor de Cundinamarca.....	61
3.3.2 Fase 2. Aislamiento e identificación de microorganismos presentes en los residuos peligrosos generados en los laboratorios de docencia de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.....	62
3.3.3 Fase 3. Biorremediación de los residuos generados utilizando diferentes métodos.....	64
4. RESULTADOS.....	69
4.1 Fase 1. Diagnóstico sobre la generación de residuos en los laboratorios de docencia de la universidad colegio mayor de Cundinamarca.....	69
4.2 Fase 2. Aislamiento e identificación de microorganismos nativos en los residuos peligrosos generados.....	77
4.2.1 Potencial de decoloración.....	83
4.3 Fase 3. Ensayos de Biorremediación.....	86
4.3.1 Biorremediación con inmovilización de hongo <i>Aspergillus niger</i>	86
4.3.2 Biorremediación de residuos peligrosos generados utilizando un consorcio bacteriano y microencapsulación del consorcio bacteriano en alginato de sodio.....	90
5. DISCUSIÓN.....	97

6. CONCLUSIONES.....	108
7. RECOMENDACIONES.....	110
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	111
9. ANEXOS.....	124

INDICE DE TABLAS.

Tabla 1 Clasificación de residuos peligrosos ^{26, 64}	30
Tabla 2 Biorremediación de cristal violeta por <i>Agrobacterium radiobacter</i> ⁴⁸	43
Tabla 3 Microorganismos usados en biorremediación de colorantes ⁴⁵	47
Tabla 4 Materiales empleados para la microencapsulación de compuestos activos ⁶²	49
Tabla 5 Método de inmovilización de enzimas ⁵⁴	51
Tabla 6 Células microbianas unidas covalentemente a varios soportes ⁵⁴	51
Tabla 7 Materiales usados para adsorber células ⁵⁴	52
Tabla 8 Inmovilización por captura ⁵⁴	53
Tabla 9 Variables dependiente e independiente.....	61
Tabla 10 Diseño metodológico ⁶⁶	63
Tabla 11 Laboratorios de docencia, componentes temáticos y residuos generados.	70
Tabla 12 Características de peligrosidad de los principales residuos generados en la universidad colegio mayor de Cundinamarca.....	72
Tabla 13 Cantidad en litros de residuos peligrosos generados en los laboratorios de docencia.....	75
Tabla 14 Características físicas y químicas de los residuos peligrosos.....	76
Tabla 15 Características microscópicas, macroscópicas y pruebas bioquímicas de los microorganismos nativos aislados.....	80
Tabla 16 Microorganismos identificados.....	81
Tabla 17 Microorganismos aislados e identificados de los residuos peligrosos. ...	83
Tabla 18 Unidades de color y porcentaje de biorremediación de residuos	

peligrosos usando inmovilización fúngica.....	89
Tabla 19 Porcentajes de biorremediación usando células libres de <i>Staphylococcus sciuri</i> (M1), <i>Burkholderia cepacea</i> (M2), <i>Aeromona hydrophila</i> (M4).....	91
Tabla 20 Porcentajes de biorremediación de los residuos peligrosos utilizando consorcio bacteriano.....	92
Tabla 21 Porcentajes de biorremediación usando microencapsulados de consorcio bacteriano.....	94
Tabla 22 Porcentajes de biorremediación obtenida durante los diferentes tratamientos a las 192 horas.....	95

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1 Tinción de Gram resumida en pasos ²⁹	33
Figura 2 Estructura química del colorante cristal violeta ²⁹	34
Figura 3 Estructura química del colorante safranina y/o fucsina de Gram ²⁹	34
Figura 4 Estructura química de la Hematoxilina – eosina ²⁹	35
Figura 5 Estructura química del Carbol-Fucsina ²⁹	36
Figura 6 Estructura química del azul de metileno ²⁹	36
Figura 7 Estructura química del verde de malaquita ²⁹	36
Figura 8 Estructura química de la tinta china o nigrosina ²⁹	37
Figura 9 Biorremediación de verde de malaquita ⁴⁹	45
Figura 10 Procesos de microencapsulación ⁵⁸	48
Figura 11 Guardianes y contenedores de 40 y 20 L.....	71
Figura 12 Residuos peligrosos.....	77
Figura 13 Hongos aislado en agar PDA.....	82
Figura 14 Medios de agar nutritivo y PDA suplementados con 50 mg/L de cristal violeta.....	83
Figura 15 Halos de decoloración (mm). Método botón estéril.....	84
Figura 16 Halos de decoloración para hongos(mm) método botón estéril.....	84
Figura 17 Halos de decoloración (mm) para bacterias. Método Kirby Bauer.....	85

Figura 18 Halos de decoloración (mm) para hongos. Método Kirby Bauer.....	85
Figura 19 Fotografía de halos de decoloración.....	86
Figura 20 Hongo inmovilizado en espuma de poliuretano.	87
Figura 21 Hongo inmovilizado en espuma de poliuretano inoculado en los biorreactores en los residuos peligrosos.....	87
Figura 22 Cambio de pH en el proceso de biorremediación de residuos peligrosos con inmovilización de hongo <i>A. niger</i>	88
Figura 23 Unidades de color y porcentaje de biorremediación de residuos peligrosos usando <i>Aspergillus niger</i> inmovilizado.....	89
Figura 24 Prueba de antagonismo.....	90
Figura 25 Microcapsulas de alginato de sodio inoculadas en los residuos peligrosos.	90
Figura 26 Ensayos de biorremediación en células libres y consorcio bacteriano. .	93
Figura 27 Porcentajes de biorremediación de residuos peligrosos con el consorcio bacteriano microencapsulado.	94

INDICE DE ANEXOS.

Anexo 1 Composición del medio mineral.....	124
Anexo 2 Formulario RH1, fuentes de generación y clases de residuos.....	124
Anexo 3 BBL Crystal.....	125
Anexo 4 Método de siembra por botón estéril.	126
Anexo 5 Método de siembra por Kirby Bauer.	130
Anexo 6 Absorbancia y pH de los biorreactores que contenían residuos peligrosos con el hongo inoculado en espuma de poliuretano.....	133
Anexo 7 Absorbancia de los residuos peligrosos usando células libres.	135
Anexo 8 Absorbancia de los residuos peligrosos usando consorcio bacteriano. .	137
Anexo 9 Absorbancias de los residuos peligrosos en microencapsulación del consorcio bacteriano en alginato de sodio.....	138
Anexo 10 Características de peligrosidad de los residuos peligrosos ^{97, 98}	140
Anexo 11 ANOVA (95% DE CONFIANZA).....	145

BIORREMEDIACIÓN DE RESIDUOS PELIGROSOS GENERADOS EN LOS LABORATORIOS DE DOCENCIA DE LA UNIVERSIDAD COLEGIO MAYOR DE CUNDINAMARCA

RESUMEN

El presente proyecto de investigación tiene como objetivo biorremediar residuos peligrosos generados en los laboratorios de docencia de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, utilizando microorganismos nativos.

La metodología realizada incluyó un diagnóstico de los residuos generados para el primer periodo de 2018, seguido por el aislamiento e identificación de los microorganismos presentes en estos residuos y el uso los métodos de biorremediación usando consorcio, inmovilización y microencapsulación.

Generándose de residuos de hipoclorito de sodio 302 L, de colorantes 112L, de ácidos 32L y de básicos 16L. Los cuales son considerados peligrosos por tener características corrosivas, reactivas, explosivas, tóxicas, inflamables e infecciosas, CRETII. Los microorganismos aislados fueron *Staphylococcus sciuri*, *Burkholderia cepacia*, *Aeromonas Hydrophila*, usados en consorcio microbiano y en microencapsulación, *Corynebacterium aquaticum*, el *Aspergillus niger*, usado en inmovilización fúngica y *Penicillium spp.*

El método de inmovilización fúngica biorremedió en un 35.06% los residuos básicos en 192 h. El consorcio bacteriano en células libres biorremedió cristal violeta en un 72.78%, residuos de colorantes en un 32.78% y los residuos de hipoclorito en 100% en 192 horas, destacando al microorganismo *Aeromonas hydrophila*, el cual biorremedió el cristal violeta en 58.42% en 192 horas. El método de microencapsulación del consorcio bacteriano biorremedió en 45.52% los residuos básicos y en 100% los residuos de hipoclorito de sodio en 192 horas. El análisis ANOVA (95%) estableció que no hay diferencias significativas entre los métodos de biorremediación realizados ($F= 1, 941$; $P= 0,199$; $gl = 2$), concluyendo

que sirven para el tratamiento de los residuos peligrosos generados.

Palabras clave.

Bioderremediación, microencapsulación, residuos peligrosos, consorcio, microorganismos nativos.

Estudiantes

JUAN CAMILO ARIZA BARON

JHON SMITH CASTELLANOS SANCHEZ

CRISTIAN FELIPE RAMIREZ MORALES

Asesora

JUDITH ELENA CAMACHO KURMEN, Q.F. Esp. MSc. Doctora en Biociencias

INTRODUCCIÓN

El crecimiento de técnicas donde se utilizan colorantes y reactivos en los laboratorios de docencia universitarios, de diagnóstico e industrias, ha incrementado la generación de residuos de colorantes, reactivos de carácter básico, ácido, de solventes, de desinfectantes como hipoclorito de sodio, lo cuales sino se disponen y tratan adecuadamente pueden llevar a una bioacumulación en los ecosistemas hasta niveles preocupantes, causando una problemática ambiental. Siendo necesario buscar metodologías de tratamiento como las tecnologías limpias amigables con el medio ambiente que sean eficientes en la degradación de estos residuos considerados como peligrosos, para prevenir los impactos negativos que causan en la salud humana y la salud de los ecosistemas, considerándose los procesos de biorremediación usando microorganismos⁴⁰.

Los residuos peligrosos (RESPEL) son definidos en el decreto 4741 de 2005 expedido por el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, como aquellos residuos que presentan características de ser corrosivos, reactivos, explosivos, tóxicos, inflamables e infecciosos. Los cuales impactan negativamente en forma directa o indirecta a la salud humana y al ambiente. También se clasifican y rotulan según su peligrosidad por la norma NFPA 704 que explica el “diamante de materiales peligrosos” establecido por la Asociación Nacional de Protección contra el fuego^{26, 64}.

Los Residuos peligrosos se han incluido para su adecuado manejo en el plan de gestión integral de residuos peligrosos donde se tiene como prioridad la prevención, reducción de la generación, clasificación según peligrosidad, aprovechamiento, tratamiento incluyendo las técnicas de biorremediación y su disposición final adecuada para contribuir al desarrollo sostenible⁹⁵.

La presencia de estos residuos en las aguas de ríos, lagos por sus vertimientos indiscriminados han generado una problemática ambiental por su ecotoxicidad acuática y bioacumulación en lodos, suelos y aguas, causando daños desde el nivel celular, en organismos individuales y en las comunidades afectando los

ecosistemas. La toxicidad incluye efectos en los cambios de crecimiento, desarrollo, reproducción y comportamiento a la cual se exponen los organismos vivos. También causan malos olores y daño estético de los ecosistemas.

Los vertimientos se caracterizan generalmente por su elevada Demanda Química de Oxígeno (DQO), debido a los compuestos orgánicos refractarios; Demanda Biológica de Oxígeno (DBO), debida a la materia orgánica biodegradable, elevada Cambio de temperatura, alto contenido en color, pH inestable, sólidos y capas grasas en suspensión y malos olores. El impacto en la salud humana puede ser por lesiones en la piel, mucosas y tejidos, inhalación de malos olores, de tóxicos y contacto con ellos^{40, 42}.

Los tratamientos convencionales para tratamiento de residuos peligrosos se basan en la aplicación de procesos de tipo mecánico, físico y químico, todos estos procesos físicos, químicos y térmicos tienen una ventaja y es que pueden realizarse a periodos cortos, pero como desventaja presenta que son tratamientos costosos y requieren de una gran utilización de energía y reactivos y algunas veces no son eficientes en la remoción de residuos peligrosos.

Por esta razón, se propone en este trabajo de investigación utilizar métodos de biorremediación que son menos costosos utilizando microorganismos nativos aislados de este tipo de residuos, aprovechando sus capacidades metabólicas para degradarlos y así proponer esta tecnología limpia para tratarlos y poder utilizarlos en el tratamiento de los residuos peligrosos generados en los laboratorios de docencia y en laboratorios donde se generen este tipo de residuos para aportar en su buena disposición, utilizando un método amigable con el medio ambiente¹².

OBJETIVOS

Objetivo general

Realizar la biorremediación de los residuos peligrosos generados en los laboratorios de docencia de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

Objetivos específicos

- Realizar el diagnóstico del manejo y la cantidad generada de los residuos peligrosos generados en las prácticas de laboratorio de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
- Aislar e identificar microorganismos presentes en los residuos peligrosos generados en los laboratorios de docencia de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca
- Biorremediar los residuos peligrosos generados usando la inmovilización de biomasa fúngica en espuma de poliuretano, un consorcio bacteriano en células libres y la microencapsulación del consorcio en alginato de sodio.

1. ANTECEDENTES.

Se ha reportado una producción anual mundial de residuos peligrosos como los colorantes de más de 700.000 toneladas, produciendo cerca de 100 mil tipos distintos, los cuales son uno de los responsables de la contaminación generada en los ecosistemas acuáticos por su vertimiento indiscriminado a efluentes de aguas residuales. Estos colorantes poseen grupos llamados cromóforos los cuales en concentraciones mínimas (1 mg/L) poseen la capacidad de darle color visible³.

El uso de metodologías de biorremediación de residuos peligrosos utilizando microorganismos se ha evidenciado en diferentes estudios los cuales se mencionan en las siguientes publicaciones:

En el año 2003, Jones *et al.* demostraron que *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. marinum* y *M. chelonae* son especies de micobacterias tolerantes al verde de malaquita y al cristal violeta en concentraciones mayores o iguales a 5 µg/ml, de esta manera se determinó la concentración media que impide la formación de colonias para todas las cepas micobacterianas, siendo de 60 µg / ml para verde malaquita y 15 µg/ml para cristal violeta. Concluyendo que la decoloración de verde de malaquita y de cristal violeta, requiere de la transferencia de iones de hidrógeno a través de las membranas junto con un citocromo P-450 que está involucrado en el proceso de decoloración¹.

También, Liberto *et al.*, en el 2015, describieron como los cromóforos sintéticos afectan el crecimiento de algunos hongos. Los hongos utilizados en la investigación son del filo Deuteromycota aislados de materia orgánica como: *Dictyosporium triramosum*, *Minimidochium parvum* y *Tetraploa aristata*. En el estudio, los cromóforos sintéticos que tienen la mayor capacidad para ser agentes inhibidores del crecimiento, son los cromóforos de trifenilmetano, principalmente por sus propiedades tóxicas o biostáticas sobre los hongos².

Daneshvar *et al.* en el año 2007 estudiaron la problemática ambiental de la contaminación a nivel mundial tanto en el agua, como en el aire y el uso de un

tratamiento compuesto por diversos microorganismos como bacterias, hongos, algas, etc. Entre estos contaminantes en agua residual principalmente tenemos ácidos, bases, sólidos tóxicos orgánicos e inorgánicos y colorantes, como resultados principalmente de diferentes procesos en plantas industriales. En los últimos años, una serie de estudios se han centrado en algunos microorganismos que son capaces de degradar y adsorber los tintes en aguas residuales como *Escherichia coli* NO 3 , *Pseudomonas luteola*, *Aeromonas hydrophila*, especies de *Kurthia*; hongos: *Aspergillus niger*, *Phanerochaete chrysosporium* , *Aspergillus terricola*, *P. chrysosporium* ; levaduras: *Saccharomyces cerevisiae* , *Candida tropicalis*; algas: especies de *Spirogyra*, *Chlorella vulgaris*, *C. sorokiniana* , *Lemna minuscula* , *Scenedesmus obliquus*, *C. pyrenoidosa* y *Closterium lunula*³.

Quintero L y Cardona S, en el 2009, evaluaron el tratamiento de tintes índigo e índigo carmín con distintos métodos. El método fisicoquímico usando flocculantes y coagulantes como cal, alumbre y sulfato ferroso seguido de un proceso de lodos activados decoloró el tinte en un 71%. La oxidación química lo decoloró en un 88% usando oxidantes como ozono, peróxido de hidrógeno y permanganato. También se usó la biorremediación usando *Pseudomonas sp.* con un resultado de 69% y *Trametes versicolor* y *Aspergillus alliaceus* obteniendo un porcentaje de biorremediación entre el 80 y 100%. Se concluyó que los procesos biológicos fueron los más económicos y eficientes⁴.

También Shimizu *et al.* en el año 2009 realizaron un cultivo primario en agar malta de la cepa F de *Ganoderma applanatum* con la cepa 2126 de *Pycnoporus sanguineus* y luego procedieron a realizar pruebas de decoloración en agar-malta glucosado. En la investigación se usaron 50 µM de rojo fenol, 50 µM de verde de malaquita y 50 µM de azul de bromofenol y para la biorremediación de licor negro se utilizó medios que contenían 1 % glucosa y licor negro a una dilución de 1:15 v/v con un pH de 4.7 ajustado con ácido sulfúrico. En esta investigación se demostró que los hongos poseen la capacidad de crecimiento y biorremediación sobre los colorantes azul de bromofenol y verde de malaquita, así como sobre el

efluente de la industria papelera licor negro⁵.

En el año 2009, Cardona M *et al.* evaluaron 7 cepas de hongos lignolíticos para biorremediar naranja II, rojo cibacrón, rojo erionilo, azul terasilo en medios semisólidos y líquidos. Se estableció que el *Phanerochaete chrysosporium* y *Phanerochaete sordida* biorremediarán naranja II en un 98% y entre 82 y 86 % los otros colorantes en medio líquido. En medio sólido todos los colorantes biorremediarán en un 100% en un período de 8 días⁶.

En el 2010, González M *et al.* investigaron la biodegradación del colorante rojo punzo que es un colorante sintético muy utilizado. Se ha propuesto su tratamiento a través de un proceso de digestión anaerobia para lo cual se cuantificaron los microorganismos presentes en este lodo, tanto aerobios como anaerobios, posterior se les adiciono una muestra de rojo punzo en concentraciones de 0,500 y 1000 mg/L. Se determinó un porcentaje de biorremediación mayor al 90% para este colorante, evidenciando que el uso de bacterias anaerobias es útil para la degradación de colorantes azoicos⁷.

También en el 2010, Osorio *et al.* trataron aguas residuales de una industria textil las cuales presentaban como contaminantes colorantes azoicos como el rojo cibacrón y el rojo erionilo. Se biorremediaron con el hongo *Bjerkandera spp.* Se realizaron los bioensayos cultivándolo de 2 maneras, uno suplementado con sales de cloruro de calcio, tiamina, glucosa y peptona, biorremediándolos en un 75 %. En el tratamiento donde no se usan sales, biorremedió estos colorantes en un 65%⁸.

Cheriaa *et al.* en el año 2012 utilizaron un consorcio de cuatro aislados bacterianos, *Agrobacterium radiobacter*, *Bacillus spp*, *Sphingomonas paucimobilis* y *Aeromonas hydrophila*, aisladas de lodo activado, extraído de una estación de tratamiento de aguas residuales, producidas de una industria textil. Se realizaron pruebas de biorremediación de cristal violeta y verde de malaquita. El consorcio biorremedió en un 91% y 99%, los dos colorantes respectivamente en 2 h de tratamiento. Se midió complementariamente la demanda química de oxígeno

(DQO) después de 24 h, con valores de 61.5% y 84.2% para la cristal violeta y verde malaquita, respectivamente⁹.

También en el año 2012 Cheng *et al.* realizaron una biorremediación de cristal violeta utilizando el microorganismo *Burkholderia vietnamiensis* C09V obteniendo un valor de 94% con células libres, y con células microencapsuladas con perlas de gel de PVA-alginato-caolín un 98,6%. Este método de microencapsulación protege a los microorganismos de las condiciones adversas del entorno como la toxicidad. En este estudio se analizó también el efecto de la temperatura en el proceso observándose una mejor eficiencia de la biorremediación usando las células libres del microorganismo a una temperatura entre 25°C y 35°C. Por el contrario, este ajuste de temperatura no es necesario para realizar la biorremediación con las células microencapsuladas con perlas de gel de PVA- alginato- caolín por el factor protector ejercido frente a las condiciones del medio ambiente¹⁰.

Se ha evidenciado el uso de microorganismos nativos en la biorremediación de contaminantes presentes en aguas como el Chanagá *et al.* en el año 2012 donde se trataron efluentes provenientes de una industria textil localizada en el Valle de Aburrá usando hongos nativos lignolíticos los cuales fueron *Ascomycete Leptosphaerulina*, *Trichoderma viride* y *Aspergillus niger*, para su identificación se basaron en la morfología macroscópica y microscópica e identificación molecular, comenzando con la purificación de los hongos y posteriormente se les realizó una extracción de ADN y un PCR¹¹.

Se han realizado trabajos de grado usando proceso de biorremediación como el de Rosete en el año 2012, quien estudia el uso de diferentes tratamientos para tratar vertimientos, estableciéndose que los tratamientos físicos y químicos, no siempre son efectivos y presentan un costo alto, como el tratamiento realizado mediante electro incineración para remoción en un 100% de colorante azul índigo, además otros tratamientos pueden producir impactos ambientales negativos¹².

Otro microorganismo nativo utilizado es el usado por Pucci *et al.* en el 2013,

Rhodococcus erythropolis ohp-al-gp, aislado de suelo contaminado con aceite de turbinas, estableciendo su posible empleo en biorremediación de residuos provenientes de lavados de motores, estaciones de servicio, estaciones de extracción de petróleo y sus maquinarias. Obteniendo con esta cepa un 41% de biorremediación de gasoil en ausencia de nitrógeno, y con su presencia la biorremediación fue del 61%¹³.

En el año 2014 se investigó también el uso de hongos ambientales y su potencial en procesos de biorremediación, por lo Jaramillo *et al.* quienes estudiaron la biorremediación usando hongos de podredumbre blanca como *Pleurotus ostreatus* y *Trametes versicolor* en un medio líquido de extracto de malta y el medio PDA con colorante rojo 40. En 20 días el mejor resultado de biorremediación fue para *T. versicolor* con un 93,19%, seguido de *P. ostreatus* con 63,15%, en medio salvado de trigo suplementado con extracto de malta¹⁴.

También, Huachi *et al.* en el año 2014 investigaron el *Aspergillus niger* y *Trametes versicolor*, los cuales poseen enzimas ligninolíticas capaces de realizar una acción catalítica, sobre anillos aromáticos presentes en la estructura química de colorantes, tinturas y el fenol. Los compuestos fenólicos poseen una alta toxicidad en el medio ambiente y la salud humana. Los hongos se usaron para biorremediar colorantes como índigo carmín, naranja II y rojo fenol. Se usaron vainas de *Caesalpinia spinosa* las cuales presentan taninos actuando como inductores cuando se usa *Trametes versicolor* estimulando la producción de lacasas, la cual aumenta al estar en contacto con el ácido tánico de los taninos, y de esta manera se obtuvo un aumento en la biorremediación de los colorantes¹⁵.

En el mismo año 2014, Kabbout R. y Taha S. utilizaron biomasa fúngica muerta para el tratamiento de efluentes contaminadas con colorantes industriales, a través del uso de *Aspergillus fumigatus* cuyo hongo tiene la capacidad de decolorar el colorante azul de metileno, logrando un 65% de adsorción del colorante a un pH de 4 a 6 en 120 minutos y de un 90% a un pH de 7 a 13 en 120 minutos a temperatura ambiente, demostrando así resultados de hasta un 93.43 % de

bioadsorción del colorante a una concentración de 12 mg/L, en un pH tamponado alcalino por 120 minutos a una temperatura de 30°C. Los autores refieren que es más sencillo obtener biomasa fúngica debido a que muchas veces los microorganismos bacterianos como *Aeromonas hydrophyla* requieren algunos requerimientos específicos para el desarrollo de estas mismas, en comparación con la biomasa fúngica las cuales son más resistentes a la presencia de residuos tóxicos¹⁶.

Además, cabe destacar la investigación en el año 2015 por Rojas *et al.* lodo, encontrándose que los hongos de la podredumbre blanca, como *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus pulmonarius* y *Trametes versicolor* poseen enzimas como la lacasa, la lignina peroxidasa, el manganeso peroxidasa, que son enzimas ligninolíticas que permiten la mineralización de algunos colorantes siendo la lacasa la más representativa para la biorremediación de colorantes trifenilmetanos como cristal violeta, azul de bromofenol y verde de malaquita¹⁷.

Otra investigación para determinar el potencial de los hongos en la biorremediación de colorantes que son vertidos por la industria, la realizó Gomez H. y González J. en 2016, determinando el potencial de biorremediación de estos hongos en agares con rojo congo y agares con azul de alanina. En esta investigación se demuestra cómo es posible aislar hongos degradadores de colorantes de aguas residuales que han sido contaminadas con estos mismos, como el “hongo verde” aislado, el cual formó un halo de decoloración de 8.5 cm en el agar con colorante azul de alanina en 72 horas¹⁸.

También, Acevedo A, *et al.* en el 2017 estudiaron el crecimiento del hongo H2DP en un medio que contenía lignina, para la obtención de enzimas de tipo peroxidasas y oxidasas entre las que se destacan las lacasas, enzimas que son capaces de la biorremediación de hemicelulosas y lignina convirtiéndose en una opción de biorremediación de colorantes tanto fenólicos como no fenólicos, ya que estos muestran estructuras similares a la lignina, por lo que se han hecho con ellas pruebas de biorremediación. Para determinar actividad de biorremediación

de los colorantes por las lacasas se utilizó orceína y cristal violeta siendo biorremediadas a las 72h¹⁹.

Otro hongo utilizado para investigaciones de biorremediación de colorantes por Holguin J *et al.* en 2017, fue el *Bjerkandera adusta*, este hongo de la pudrición blanca de la madera posee sistemas complejos oxidativos que permiten un amplio espectro en la remoción de colorantes y/o compuestos recalcitrantes como la lignina a través de enzimas tipo lignolíticas extracelulares, lacasas, manganeso-peroxidasas entre otras, este hongo en específico puede remover hasta el 75% del colorantes en agua obteniéndose el 91% de biorremediación del colorante Bezaktiv amarillo V-5 GL a 18 días de tratamiento²⁰.

En el año 2017, Loredó *et al.* demostraron la biodegradación de poliuretanos, contaminantes del medio ambiente utilizando microorganismos quimio heterótrofos capaces de aprovechar estos materiales como fuente de carbono y nitrógeno, como *Geomyces pannorum* y *Nectria sp.*, principalmente, además de *Cylindrocladiella parva*, *Penicillium inflatum*, *Plectosphaerella cucumerin* y *P. inflatum*, *Alternaria*, *Penicillium venetum*, *Neonectria ramulariae* y *Penicillium viridicatu*, obteniéndose un 40% de biorremediación con estos microorganismos, mayor porcentaje que el obtenido cuando solo se trata con temperaturas altas²¹.

En ese mismo año, en el año 2017, se usan microalgas para biorremediación, en donde Angulo M. *et al.* estudiaron para la biorremediación de aguas residuales de la industria de pinturas la microalga *Chlorella sp.* Los resultados de porcentaje de biorremediación con ausencia de nutrientes fueron: 81.7, 69.7 y 58.3% y para los que tenían presencia de nutrientes 72.6, 69.0 y 86.8%, para concentraciones de 0.10, 0.20 y 0.30 en unidades de absorbancia. También se obtuvieron resultados beneficiosos en DBO⁵ y DQO²².

También, Vacca JV. *et al.* En el 2017 en Atlántico, Colombia realizaron la remoción de color de un efluente de una empresa textil, usando también la microalga *Chlorella spp.* la cual fue previamente cultivada en un biorreactor de 2.5 L, el cual estaba sometido a procesos de aireación y fotoperiodos de luz/oscuridad

cada 12 horas, además de tener fertilizante comercial, posteriormente se realizaron pruebas con los efluentes contaminados, en concentración de 0.10, 0.20, 0.30 en absorbancias se evaluó su porcentaje de biorremediación y porcentajes de DQO Y DBO⁵. El mejor porcentaje de biorremediación fue con la concentración de 0,30 en absorbancia en un 97,2% y disminuyó en un 94,6% la DQO y 95,4% la DBO⁵²³.

En la biorremediación de los colorantes, Jaramillo M, *et al.* en el 2018 realizaron un estudio con tinturas azoicas, las cuales fueron sometidas a procesos de biorremediación utilizando la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, ya que posee enzimas que rompen el grupo azo (-N=N-) presente en estos colorantes; Se utilizó en aguas residuales donde se vierten este tipo de colorantes, dando como resultado la producción de aminas tóxicas que vuelven el medio ácido. Para asegurar que el microorganismo pueda seguir su desarrollo se utilizó un método de inmovilización a través de un encapsulado en gelatina la cual permite que la levadura pueda ser no solo reutilizada sino también mejorar su resistencia al pH²⁴.

También, Salazar H *et al.* en el año 2018 determinaron que la biodegradación de algunos colorantes crea sustancias más tóxicas para la vida que el mismo colorante, como sucede con los colorantes de tipo azo, donde las aminas producidas vuelven el ambiente tóxico y los microorganismos no pueden continuar su degradación, por lo cual se realizó un estudio donde tomaron un grupo aromático de estas aminas, llamado ácido sulfanílico que se forma en la biodegradación de algunos colorantes. Se utilizó un microorganismo, o un consorcio usando esta amina como fuente de energía y carbono y debido a su toxicidad se decidió inmovilizar los microorganismos con piedra de río. donde se inocularon 3 cepas de una comunidad bacteriana, individualmente y un consorcio, las cuales biorremediaron esta amina debido al crecimiento en el medio mineral usado con el ácido sulfanílico, demostrando que no solo los colorantes sino también los metabolitos producidos pueden ser removidos²⁵.

Los estudios relacionados demuestran los aportes científicos e investigativos en el

uso de microorganismos nativos y métodos de biorremediación para tratar residuos peligrosos apoyando la realización de esta investigación.

2. MARCO REFERENCIAL.

2.1 Residuos peligrosos.

Se entiende como residuo peligroso o RESPEL a los residuos que debido a su peligrosidad intrínseca (tóxico, corrosivo, reactivo, inflamable, explosivo, infeccioso, eco tóxico) puede causar daños a la salud o al ambiente. Es decir, la definición de residuo o desecho peligroso está basada en las características intrínsecas de peligrosidad del residuo para la salud o el ambiente y en la no posibilidad de uso por parte del generador que lo produjo. Se consideran residuos peligrosos los envases, recipientes y embalajes que hayan estado en contacto con ellos^{26, 64}.

2.1.1 Características de peligrosidad

Conociendo las características de peligrosidad del residuo, se puede determinar el tipo de riesgo que puede ser generado a partir de este.

2.1.1.1 Característica que hace a un residuo corrosivo.

Característica que hace que un residuo o desecho por acción química, pueda causar daño en tejidos o que en caso de fuga genere daño a otros materiales. Se presentan las siguientes características.

- Ser acuoso y presentar un pH menor o igual a 2 o mayor e igual a 12.5.
- Ser líquido y corroer el acero a una tasa mayor de 6.35 mm por año a una temperatura de ensayo de 55 grados Celsius^{26, 64}.

2.1.1.2 Característica que hace a un residuo reactivo.

Característica que hace que un residuo o desecho cuando al mezclarse o ponerse en contacto con otros elementos, compuestos o sustancias generan las siguientes propiedades.

- Generación de gases, vapores y humos tóxicos en cantidades suficientes para provocar daño a la salud humana o al ambiente cuando se mezclan con el agua.

- Poseer sustancias como cianuros, sulfuros, peróxidos orgánicos que por alguna reacción generen gases o vapores que afecten la salud humana y el medio ambiente.
- Ser capaz de generar explosión al generar un estímulo de calor.
- Aquel que produce una reacción endotérmica o exotérmica al estar en contacto con el aire, agua o cualquier sustancia.
- Favorecer la combustión^{26, 64}.

2.1.1.3 Característica que hace a un residuo explosivo.

Se considera explosivo cuando en estado sólido o líquido por reacción química genera gases a una temperatura, presión y velocidad generando daño a la salud humana y el medio ambiente, además que cuente con alguna de las siguientes características.

- Formar mezclas explosivas con el agua.
- Producir fácilmente una reacción o descomposición detonante a temperaturas de 25 grados Celsius y presión de 1.0 atm.
- Ser una sustancia creada con cuyo fin sea producir una explosión o efecto pirotécnico^{26, 64}.

2.1.1.4 Característica que hace a un residuo inflamable.

Se considera inflamable cuando en presencia de una fuente de ignición (inicio de la combustión) puede arder bajo condiciones de presión y temperatura o presentar alguna de las siguientes propiedades.

- Ser un gas que a una temperatura de 20 grados Celsius y 1.0 atm de presión arde en una mezcla menor o igual al 13 % del volumen aire.
- Ser un líquido cuyo punto de inflamación es inferior a 60 grados Celsius de temperatura con excepción de las soluciones acuosas con menos de 24% de alcohol en volumen.

- Ser un sólido con la capacidad bajo condiciones de temperatura de 25°C y presión de 1.0 atmósfera, de producir fuego por fricción, absorción de humedad o alteraciones químicas espontáneas y quema vigorosa y persistentemente dificultando la extinción del fuego;
- Ser un oxidante que puede liberar oxígeno y, como resultado, estimular la combustión y aumentar la intensidad del fuego en otro material^{26, 64}.

2.1.1.5 Característica que hace a un residuo toxico.

Es aquel capaz de provocar efectos biológicos indeseables o adversos, causando daño a la salud humana y el medio ambiente Para este efecto se consideran tóxicos los residuos o desechos que se clasifican de acuerdo con los criterios de toxicidad (efectos agudos, retardados o crónicos y eco tóxicos) definidos en el Decreto 4741 de 2005^{26, 64}.

2.1.1.6 Característica que hace a un residuo biológico y/o infeccioso.

Un residuo o desecho con características infecciosas se considera peligroso cuando contiene agentes patógenos, tales como bacterias, parásitos, virus, rickettsias y hongos con suficiente virulencia y concentración para causar enfermedades en los seres humanos^{26, 64}.

2.1.2 Residuos generados en laboratorios de docencia.

En los laboratorios de docencia universitarios, se realizar diferentes tipos de tinciones para apoyar el diagnóstico, allí cada muestra procesada emplea distintas coloraciones, reactivos y soluciones como coloración de Gram, coloración de Ziehl – Nielsen, coloración de Wright, coloración verde de malaquita²⁷.

Los residuos peligrosos generados se clasifican en el anexo I y II del presente decreto 4741 de 2005, de la siguiente manera:

Anexo I: Lista de residuos o desechos peligrosos por procesos o actividades

Anexo II: Residuos o desechos peligrosos por corrientes de residuos.

Anexo III: Características de peligrosidad de los residuos o desechos peligrosos^{26,}

Anexo	Nomenclatura
Anexo I	Y1-Y45
Anexo II	A1 (Desechos metálicos o que contengan metales) A2 (Desechos que contengan principalmente constituyentes inorgánicos, que puedan contener metales o materia orgánica) A3 (Desechos que contengan principalmente constituyentes orgánicos, que puedan contener metales y materia inorgánica)
Anexo III	Corrosivo Reactivo Explosivo Inflamable Infeccioso Radioactivo y Toxico

Elaborado por los autores, 2018.

Tabla 1 Clasificación de residuos peligrosos^{26, 64}.

Según la clasificación dada por los anexos I y II del decreto 4741 de 2005, los residuos trabajados en la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca y a los cuales se les realizó un diagnóstico y tratamiento en el presente proyecto son clasificados como:

Y12: Desechos resultantes de la producción, preparación y utilización de tintas, colorantes, pigmentos, pinturas, lacas o barnices

Y34: Soluciones ácidas o ácidos en forma sólida

Y35: Soluciones básicas o bases en forma sólida

Y41: Solventes orgánicos halogenados^{26,64}.

2.2 Colorantes.

Se define como una sustancia que tiene la capacidad de dar color a células, tejidos, fibras, etc. Los colorantes se pueden clasificar en colorantes naturales, que son extraídos de las plantas, y colorantes artificiales, que son aquellos de minerales procesados en el laboratorio. Estos colorantes están constituidos por un componente cromóforo que tienen la capacidad de absorber energía o luz visible, para emitir colores de acuerdo a la longitud de onda emitida, y un componente auxocromo que son grupos funcionales que constituyen una molécula y que tienen como función intensificar la formación de color, algunos ejemplos de grupos funcionales son grupo metilo, halógenos, hidroxilo, alcohol y amino²⁸.

2.2.1 clasificación de los colorantes.

Los colorantes se pueden clasificar según su naturaleza y su comportamiento químico.

2.2.1.1 Según su naturaleza.

- Naturales: Hace referencia a los colorantes o tintes derivados de plantas (raíces, hojas, madera, etc.), hongos, líquenes, invertebrados o minerales como, por ejemplo: Hemateina (Extraída del tronco de una planta que por oxidación permite la extracción de hemateina), azul de índigo (Extracto de leguminosa) o Camín (Extraído de la cochinilla)^{29,30}.

- Artificiales: Son preparados artificiales solubles en agua, debido a la presencia de grupos de ácido sulfónico y consecuentemente son fáciles de utilizar, generalmente en forma de sales sódicas, en líquidos y materiales pastosos. Son obtenidos en su mayor parte de alquitrán de hulla, son colorantes de anilina y se distinguen colorantes ácidos y básicos, que precipitan sales, y así mismos colorantes neutros^{29,30}.

2.2.1.2 Según su comportamiento químico.

Se caracterizan dependiendo de su estructura fisicoquímica, porque dependiendo de ello se unirá de una forma más estable a la estructura que se tiñe. Estos

colorantes están constituidos por un anillo bencénico al cual se unen distintos radicales y uno de ellos es el radical cromóforo que generalmente es de tipo nitroso o de tipo amido, azo, alquenos, ciano, tiociano. Dependiendo de la cantidad de radicales cromóforos se unan será el poder del colorante. Asimismo, se unirán radicales no coloreados o auxocromos que pueden ser de tipo hidroxilo, amino, y metileno que no poseen capacidad tintorial, pero generan estabilidad al colorante. De esta manera se clasifican en:

- Colorantes ácidos o aniónicos: Son colorantes donde la carga radical es negativa y corresponden a colorantes citoplasmáticos, ya que el citoplasma de la célula se considera básico y por tal motivo captan colorantes ácidos. Ejemplo: Eosina y auraminas²⁸.

- Colorantes básicos o catiónicos: Son aquellos donde la carga del radical cromóforo es positiva y generalmente tiñen estructuras nucleares que son ácidas o ligeramente ácidas, que poseen carga negativa. Ejemplo: Fucsina, cristal violeta o violeta de genciana o azul de metileno²⁸.

- Colorantes neutros: Es una sal compuesta de un colorante básico y ácido. Ejemplo: Eosinato azul de metileno²⁸.

- Colorantes indiferentes: Colorantes insolubles en agua y solubles en alcohol donde no hay una predominancia de cargas, pero tampoco tiene un comportamiento neutro. Ejemplos: Sudan III y Negro sudan²⁸.

2.3 Tinciones.

Las tinciones se pueden clasificar como tinciones simples, cuando usan un solo colorante, diferenciales cuando son usados más de un colorante, y específicas cuando se utilizan anticuerpos marcados con una molécula fluorescente. Son usadas en laboratorios y diferentes industrias, a continuación, se exponen las referentes tinciones usadas en microbiología, hematología y parasitología.

2.3.1 Tinción de Gram.

Es una tinción usada en laboratorios donde se manejan muestras microbiológicas.

Es definida como una coloración diferencial ya que se usan dos colorantes que permiten clasificar a las bacterias en Gram positivas y Gram negativas (ver figura 1). Los colorantes usados son:

- Violeta de Gram: Colorante que tiene afinidad con el peptidoglicano de la pared bacteriana^{29, 31}.

- Lugol de Gram: Sirve como mordiente, e impide la salida del colorante de la pared bacteriana, debido a la formación de un complejo cristal violeta-yodo^{29, 31}.

- Alcohol- acetona: Deshidrata la pared bacteriana y cierra los poros de la misma, también destruye la membrana externa de las bacterias Gram negativas, debido a que es soluble^{29, 31}.

- Safranina o Fucsina de Gram: Sirve como contra tinción para las bacterias que no retienen el colorante violeta de Gram^{29, 31}.

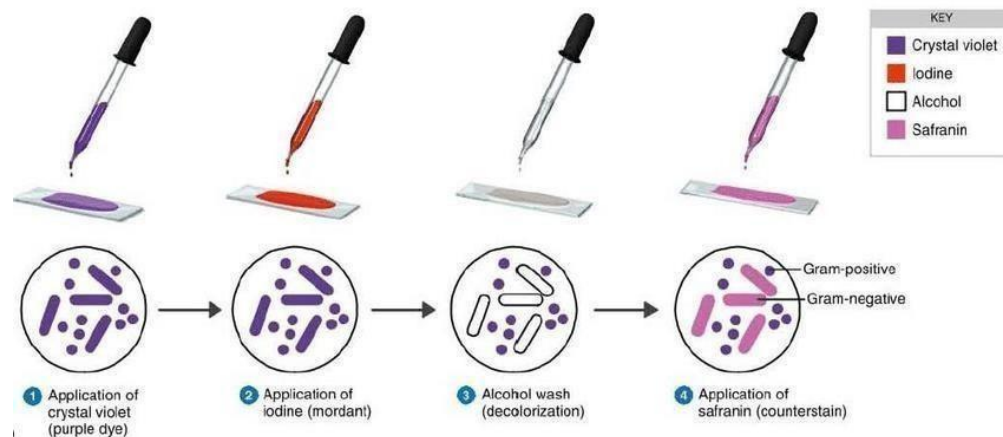


Figura 1 Tinción de Gram resumida en pasos²⁹.

2.3.1.1 Colorantes y soluciones usados en la tinción de Gram.

- Violeta de Gram: (dimetilamonio, cloruro hexametilparrosanilina, cloruro hexametil-p-rosanilina, cloruro violeta básico). Es un colorante básico, que en contacto con bacterias de carga negativa reacciona coloreándolas (Ver figura 2). Presenta un pH de 2,5- 3,5 (1%), punto de fusión 194°C y su solubilidad es de 4g/L en agua a 25°C^{29, 31}.

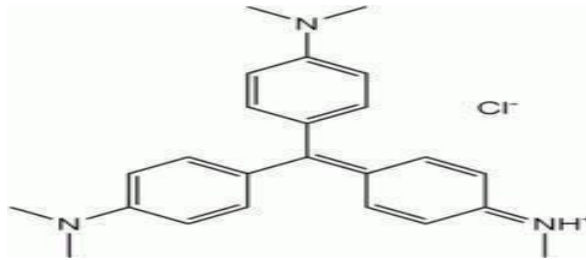


Figura 2 Estructura química del colorante cristal violeta²⁹.

- Fucsina de Gram: Su presentación es dada por cristales oxidados oscuros o polvo verde oscuro soluble en agua. Es un colorante cargado positivamente que tiene la capacidad de combinarse con elementos combinados negativamente (Ver figura 3). Es determinado como un colorante de contraste^{29, 31}.

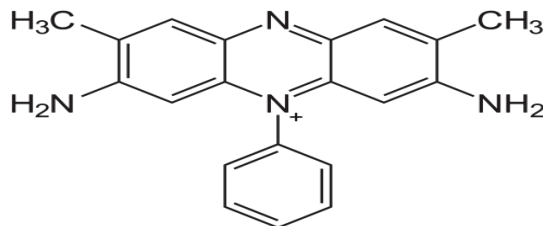


Figura 3 Estructura química del colorante safranina y/o fucsina de Gram²⁹.

- Lugol de Gram: Es un compuesto formado por I₂ (yodo) en equilibrio con KI (yoduro de potasio) y Si (Siulterio), los cuales están presente para solubilizar el yodo^{29, 31}.

- Alcohol Acetona: Decolorante orgánico de estructura CH₃(CO)CH₃^{29, 31}.

2.3.2 Tinción de Wright.

Es una técnica empleada para diferenciar elementos celulares de la sangre y es clasificada como una tinción policromática ya que puede teñir varios compuestos ácidos o básicos presentes en una célula^{29, 32}.

2.3.2.1 Colorantes y soluciones usadas en la tinción de Wright.

El reactivo de Wright está constituido por hematoxilina- eosina y azul de

metileno³².

- Hematoxilina-eosina: Es un colorante ácido natural extraído de una planta leguminosa *Haematoxylum campechianum*, conocida también con el nombre de palo de Campeche. Por su carácter ácido tiñe sustancias básicas (Ver figura 4). Tiene un pH de 5-7 un punto de fusión de 140-145°C^{29, 32}.

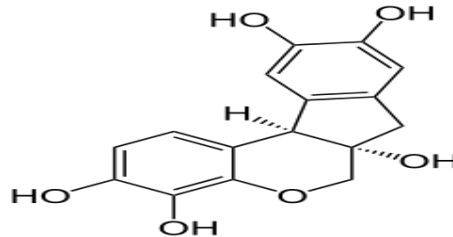


Figura 4 Estructura química de la Hematoxilina – eosina²⁹.

- Buffer de Giordano: Solución amortiguadora de pH para la coloración de Wright. Líquido incoloro sin presencia de partículas suspendidas ni precipitadas. Está compuesto por agua, fosfato de sodio y calcio, presenta un pH de aproximadamente 6,7 a 20°C^{29, 32}.

2.3.3 Tinción de Ziehl – Neelsen.

Tinción utilizada principalmente para el diagnóstico de bacilos ácido alcoholos resistentes (BAAR). Esta tinción permite diferenciar las bacterias en dos grupos aquellos que son capaces de resistir la decoloración con alcohol-ácido y aquellos que no lo son^{29, 34}.

2.3.3.1 Colorantes usados en la tinción de Ziehl – Neelsen.

- Carbol-fucsina: Es una mezcla de fenol y fucsina básica. Es un producto de color rojo sin capacidad de generar auto inflamación^{29, 33}.

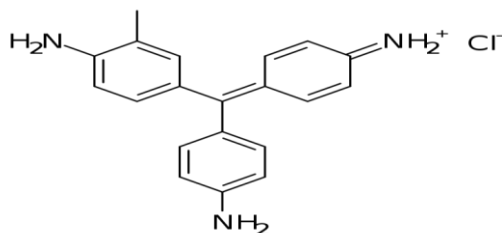


Figura 5 Estructura química del Carbol-Fucsina²⁹.

- Azul de metileno: Es un colorante de característica catiónica cuyo nombre científico es cloruro de metiltionina (Ver figura 6). Presenta un pH de 3 y un punto de fusión de 180°C y una solubilidad de 40g/L en agua a 20°C^{29, 33}.

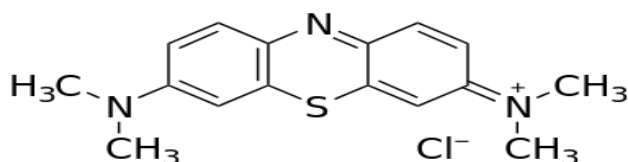


Figura 6 Estructura química del azul de metileno²⁹.

- Colorante verde de malaquita: Es un colorante débilmente básico (presenta una carga positiva débil) (ver figura 7). Presenta un pH de 3.8, una temperatura de fusión de 190°C y una solubilidad en agua de 1.5g/L a 20°C^{29, 34}.

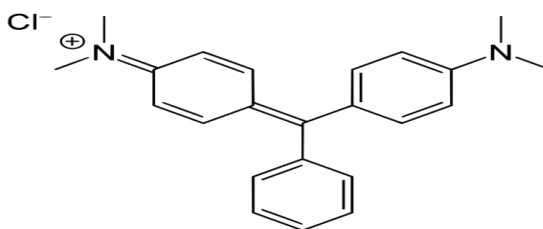


Figura 7 Estructura química del verde de malaquita²⁹.

2.3.4 Tinción negativa.

Tinción para microscopía de luz con el fin de rodear y delinear las bacterias no tenidas u otros materiales biológicos. En microbiología se utiliza para apoyo diagnóstico de *Cryptococcus neoformans*, microorganismos que causan meningitis en pacientes con inmunosupresión, siendo la técnica más usada para poner de manifiesto su cápsula^{29, 35}.

2.3.4.1 Colorantes usados en la tinción negativa.

- Tinta china o nigrosina: En la tinción negativa se utilizan tintes ácidos los cuales poseen un cromógeno negativo que no penetrara en la bacteria debido a su carga negativa en la pared celular (Ver figura 8). Presenta un pH de 3.2-8 y una

solubilidad de 10g/L a 20°C^{29,35}.

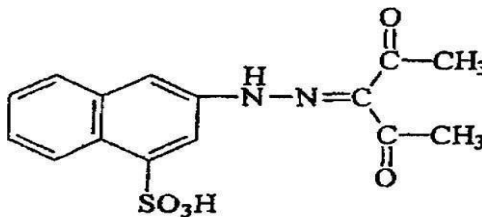


Figura 8 Estructura química de la tinta china o nigrosina²⁹.

2.3.5 Tinción azul de lactofenol.

Tinción utilizada en el área de micología para observar hongos de interés clínico y este colorante es capaz de mantener las estructuras fúngicas. El fenol inactiva enzimas líticas de la célula y evitará que esta se degrade, igualmente destruye flora acompañante e inactiva a la célula^{29, 33, 35}.

2.3.5.1 Colorante azul de lactofenol.

- Azul de lactofenol: Es un colorante de composición ácida, presenta un pH de aproximadamente 2.3 a 20°C y una solubilidad a 20°C^{29, 33, 35}.

2.4 Reactivos químicos.

2.4.1 Reactivos ácidos.

Es un compuesto químico, que cuando se disuelve produce una solución con actividad de catión hidronio, es decir, un pH menor a 7. Con características de neutralizar la acción de sustancias básicas, expresada al enrojecer el indicador papel o tintura tornasol³⁶.

2.4.2 Reactivos básicos.

Es una sustancia que aporta iones OH⁻ en una disolución acuosa, es decir, tiene un pH mayor a 7 neutraliza la acción de los ácidos Expresada al generar color azul en el papel o tintura tornasol³⁶.

2.4.3 Reactivos de hipoclorito de sodio.

El hipoclorito de sodio (NaClO) es compuesto químico, utilizado ampliamente por

sus propiedades desinfectantes, manejado principalmente en industrias para el tratamiento y potabilización de agua, blanqueador de textiles, en procedimientos diarios en hospitales universidades e investigación en salud que se necesite condiciones asépticas, limpieza doméstica. Es un compuesto altamente tóxico por lo cual su venta se realiza en concentraciones bajas (0,5 a 5,25%)³⁷.

2.5 Técnicas de tratamiento para residuos.

Denominadas como convencionales (métodos físicos y químicos) y no convencionales (métodos biológicos), estos últimos pueden ser desarrollados a menor precio y ser en ocasiones más efectivos en el tratamiento de los residuos peligrosos, entre ellos tenemos:

2.5.1. Digestión anaerobia.

El proceso de digestión anaerobia es un proceso biológico donde la materia orgánica es degradada por la acción de microorganismos, en ausencia de oxígeno, generando dióxido de carbono y metano o bien conocida como “biogás” y una mezcla acuosa junto con nitrógeno, fósforo y otros elementos presentes en la biomasa³⁸. Este proceso comprende una serie de etapas por las cuales pasa la materia orgánica, entre ellas encontramos la hidrólisis, acidogénesis, acetogénesis y metanogénesis. El pH óptimo para realizar digestión anaerobia es de 7 aunque se puede operar en un pH de 6.5 a 7.5³⁸.

2.5.2 Compostaje.

Es un producto obtenido de la mezcla de materia orgánica la cual es sometida a un proceso biológico para fomentar su degradación y descomposición. Para la realización de un compostaje se deben tener en cuenta condiciones específicas de humedad, temperatura, pH y cantidad de oxígeno, las cuales pueden variar dependiendo del tipo de compostaje que se quiera elaborar. Es importante destacar que tipos de compostaje existen ya que varían en cuanto a materiales orgánicos y el método que utilizan para su elaboración. Los tipos de compostaje que existen son el compostaje básico, compostaje de lombrices, avicompostaje,

compostaje de café y composta caliente³⁹.

2.5.3 Biorremediación.

La biorremediación es un proceso que utiliza las habilidades catalíticas de los organismos vivos para degradar y transformar contaminantes tanto en ecosistemas terrestres como acuáticos, presentando así un importante potencial en la mitigación de la contaminación ambiental para que de esta manera puedan integrarse a ciclos biogeoquímicos naturales^{40, 41, 42}. También se ha conseguido identificar las enzimas involucradas en la degradación de colorantes y desarrollar tecnologías utilizando dichas enzimas. De esta manera es importante destacar los 3 tipos de biorremediación que existen: Degradación enzimática, remediación microbiana y la fitorremediación siendo el proceso siempre dependiente de pH, la temperatura, los nutrientes, así como de la especificidad de la enzima por el sustrato^{40, 42}.

2.5.3.1 Biorremediación *in situ*.

Técnicas biológicas las cuales son aplicadas en el lugar que se encuentra la contaminación⁴³.

2.5.3.2 Biorremediación *ex situ*.

Técnicas biológicas en las cuales se traslada la zona contaminada, para realizar su tratamiento. Se escoge la técnica según el tipo de contaminante y factibilidad económica⁴³.

2.5.4 Degradación enzimática.

Consiste en el empleo de enzimas en los sitios contaminados con el fin de degradar sustancias nocivas. Dichas enzimas son producidas en bacterias que son transformadas genéticamente para la producción de las mismas, hoy en día empresas dedicadas a la biotecnología comercializan las enzimas o microorganismos transformados genéticamente^{40, 42}.

2.5.5 Remediación microbiana.

Se refiere al uso de microorganismos directamente del foco de contaminación que por razones de adaptabilidad pueden existir en ese sitio y es necesaria la administración de fósforo o nitrógeno con el fin de acelerar el proceso o directamente la inoculación de distintos microorganismos provenientes de otros ecosistemas^{40, 42}.

Existen en la literatura varias especies de bacterias, levaduras, hongos y algas reportadas en la aplicación de procesos de biorremediación con la relativa facilidad, por ejemplo: Degradación del petróleo y sus derivados y biorremediación de los enlaces azo de colorantes textiles. Es importante mencionar en la remediación microbiana la utilización de consorcios microbianos capaces de degradar colorantes, debido a la adaptación de los organismos al estrés ambiental y a la presión evolutiva debido a las condiciones del efluente^{40, 42}.

2.5.6 Fitorremediación.

Se refiere al uso de plantas para limpiar ambientes contaminados. Aunque se encuentra en desarrollo, constituye una estrategia muy interesante, debido a la capacidad que tienen algunas especies vegetales de absorber, acumular y/o tolerar altas concentraciones de contaminantes como metales pesados, compuestos orgánicos y radioactivos, etc.^{40, 42}.

2.6 Factores que afectan a la biorremediación.

2.6.1 Temperatura.

es uno de los factores ambientales más importantes que afecta la actividad metabólica de los microorganismos y la tasa de degradación. Las bacterias presentan intervalos de temperatura bastante reducidos entre 20 y 30°C decreciendo la biodegradación por desnaturalización de las enzimas a temperaturas superiores a 40°C e inhibiéndose a inferiores a 0°C^{44, 45}.

2.6.2 pH.

Afecta significativamente la actividad microbiana, cuanto mayor sea la diversidad de microorganismos existentes, potencialmente mayor será el rango de tolerancia. El crecimiento de la mayor parte de los microorganismos es máximo dentro de un intervalo de pH situado entre 6 y 8 (bacterias), mientras que es más ácido para los hongos (pH 4 - 5). El pH óptimo establecido para procesos de biodegradación es neutro (pH 7,4 - 7,8)⁴⁵.

2.6.3 Disponibilidad de oxígeno.

Es el aceptor final de electrones generalmente empleado en procesos biológicos y también es necesario en determinados tipos de reacciones de oxidación – reducción catalizada por enzimas. Los microorganismos, oxidan compuestos orgánicos o inorgánicos, obteniendo así la energía necesaria para su crecimiento. El aceptor final de electrones es el receptor de los mismos y, en el caso de un metabolismo aerobio, O₂ es el aceptor y H₂O es el producto^{44, 46}.

2.6.4 Disponibilidad de nutrientes.

El metabolismo microbiano está orientado a la reproducción de los organismos y éstos requieren que los constituyentes químicos se encuentren disponibles para su asimilación y síntesis. Los nutrientes principalmente requeridos son el fósforo y el nitrógeno. La adición de fuentes de Nitrógeno (N₂) y Fosforo inorgánico generalmente tiene un efecto positivo incrementando las poblaciones microbianas. Aunque en general la adición de fuentes inorgánicas de NITR y P es beneficiosa para los procesos de biodegradación, de igual manera, el uso excesivo de nutrientes inorgánicos también puede inhibir los procesos de biodegradación⁴⁴.

2.6.5 Humedad.

El agua forma parte del protoplasma bacteriano y sirve como medio de transporte a través del cual los compuestos orgánicos y nutrientes son movilizados hasta el interior de las células. Un exceso de humedad inhibirá el crecimiento bacteriano al reducir la concentración de oxígeno, esta se define como la cantidad de agua

admitida hasta su saturación^{42, 47}.

2.6.6 Otros factores.

Se deben tener en cuenta son el tipo de sustrato del residuo a tratar, entre los cuales tendremos:

- Volatilidad: Es el proceso en el cual un contaminante se difunde desde la fase sólida o líquida a la fase gaseosa⁴⁴.
- Viscosidad: Este parámetro es una medida de la resistencia interna de una sustancia a fluir⁴⁴.

2.7 Biorremediación de colorantes.

2.7.1 Biorremediación de cristal violeta.

En la literatura reportada se han realizado ensayos de decoloración de colorantes bajo ciertas concentraciones en función del tiempo, evidenciando un comportamiento directamente proporcional, es decir, que a mayor concentración en mg/L se necesita de un mayor tiempo en horas para que sea efectiva la decoloración. Adicionalmente a ello, se han realizado ensayos de fitotoxicidad en plantas para determinar si los compuestos generados después de una biorremediación con microorganismos generan problemas ambientales⁴⁸. De esta manera, a través de distintas investigaciones se llega a la conclusión que enzimas como la lacasa y la aminopirina N-desmetilasa son presumiblemente involucrados en la decoloración de cristal violeta. De igual manera, es importante el análisis de los metabolitos los cuales pueden ser medidos por distintos métodos químicos como cromatografía de gases y espectrofotometría de masas⁴⁸. Los metabolitos generados luego de una degradación de cristal violeta observados en la tabla 2 son:

No	Metabolito	Estructura química
-----------	-------------------	---------------------------

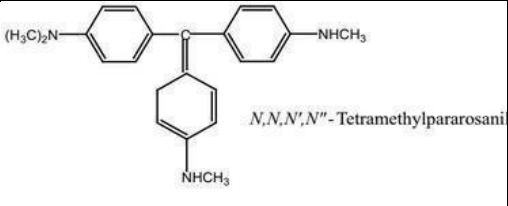
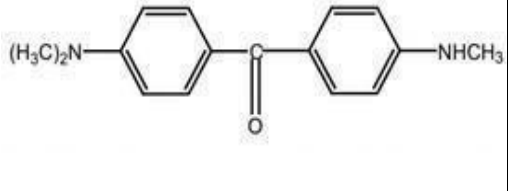
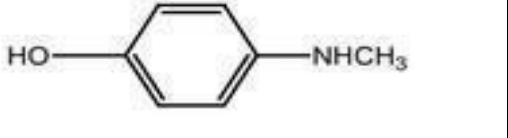
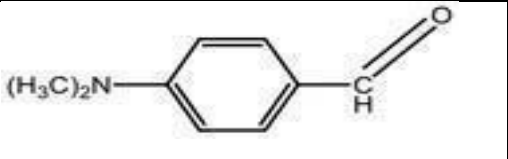
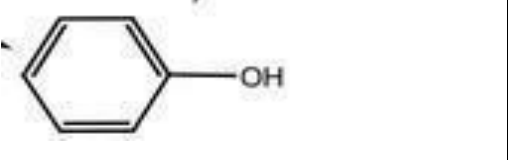
1	N,N,N,N-Tetramethylpararosaniline	 <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylpararosaniline
2	[N,N-dimethylaminophenyl] [N-methylaminophenyl] benzophenone	
3	4-methyl amino phenol	
4	N,N-dimethyl aminobenzaldehyde	
5	Fenol	

Tabla 2 Biorremediación de cristal violeta por *Agrobacterium radiobacter*⁴⁸.

2.7.2 Biorremediación de verde de malaquita.

El verde de malaquita es un colorante usado en la industria textil, alimentaria, médica y acuicultura. Debido a su toxicidad es prohibida en muchos países, pero aun así el bajo costo y eficacia hace que sea usada. El trifenilmetano reductasa y el citocromo P450 median la reducción de verde de malaquita a leucomalaquita, sin embargo, tal degradación es viable para la generación de más tóxicos⁴⁹.

El leucomalaquita es un metabolito tóxico ya que puede acumularse en los tejidos de los peces y adicionalmente a esto su efecto tóxico incluyen daños a los órganos, crecimiento, reproducción, anomalías del desarrollo y es potencialmente mutagénico y carcinogénico⁴⁹.

Las lacasas son enzimas pertenecientes al grupo de las oxidasas de cobre azul,

las cuales tienen importancia en procesos de decoloración, desintoxicación de colorantes, tratamiento de aguas residuales y biorremediación, ya que son amigables con el medio ambiente y oxidan compuestos fenólicos como lo es el verde de malaquita y no fenólicos. Estas lacasas son producidas por hongos de la pudrición blanca y son eficaces al secretar estas enzimas. Son enzimas con cuatro átomos de cobre por molécula y catalizan la oxidación de un electrón de sustrato con reducción de cuatro moléculas de oxígeno molecular en agua. Las lacasas dependerán para la degradación de un potencial redox entre 400 a 800 mV y pueden llegar a ser potenciados por mediadores, el ejemplo más claro es cuando se usan compuestos no fenólicos ya que se necesita incrementar el potencial redox para la degradación⁴⁹.

Para la degradación se identifican 2 vías paralelas y competitivas:

- Vía I de degradación: N-desmetilación (es decir, la conversión completa de MG a desmetil MG, didesmetil MG y tridesmetil MG) donde no se produce decoloración de MG⁴⁹.

- Vía II de degradación: Decoloración de verde de malaquita a su forma de carbinol en donde hay una ruptura en el enlace entre el átomo de carbono central y el anillo de N, N – dimetilamino fenilo en (dimetilamino-fenil) -fenil- metanona y N, N-dimetilanilina. (dimetil amino-fenil) -fenil-metanona fue luego N- desmetilada a (amino fenil) -fenil metanona (Ver figura 9)⁴⁹.

Cada mecanismo de degradación será distinto si usamos mediadores.

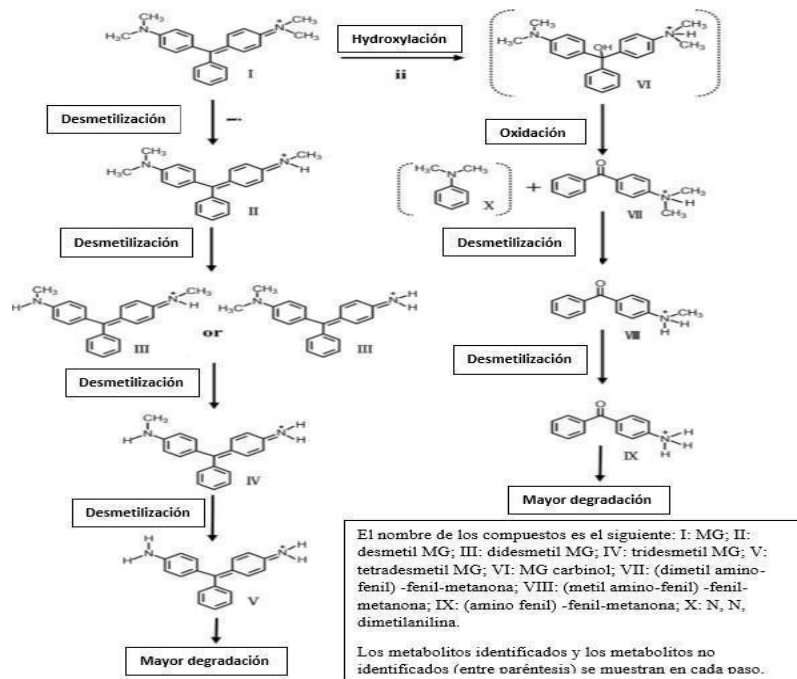


Figura 9 Biorremediación de verde de malaquita⁴⁹.

En la tabla 3 se encuentran ejemplos de microorganismos usados en biorremediación de residuos peligrosos como los colorantes incluyendo bacterias y hongos.

Microorganismo	Colorante degradado
<i>Aeromonas hydrophyla</i>	<i>Cristal violeta</i>
<i>Corynebacterium spp.</i>	<i>Negro reactivo 5</i> <i>y amarillo reactivo</i> <i>15</i>
<i>Sphingomonas sp. BN6</i>	<i>Colorantes tipo azo</i>
<i>Bacillus sp.</i>	<i>Colorantes tipo azo</i>
<i>Consortio bacteriano</i>	<i>Colorantes tipo trifenilmetano</i>

<i>Aeromonas hydrophila</i>	Colorantes tipo antraquinona y trifenilmetano azo
<i>Bacteria KMK48</i> <i>no</i> <i>identificada</i>	Colorantes sulfonatados tipo azo
<i>Sphingomonas xenophaga</i>	aminoantraquinona- ácido sulfónico (ASA-2)
<i>Paenibacillus larvae</i>	Colorante indigo
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Colorantes tipo azo
<i>Citrobacter sp.</i>	Colorantes tipo azo y trifenilmetano
<i>Bacillus cereus</i>	Colorantes tipo indigoide azo
Consorcio bacteriano	Colorantes textiles tipo reactivo y disperso
Consorcio bacteriano	Rojo de metilo
Bacterias sulfato reductoras	Colorantes básicos
Consorcio bacteriano	Azul disperso
<i>Aspergillus niger</i>	Verde básico 4
<i>Funalia troji</i>	Rojo Astrozon
<i>Pseudomonas sp.</i>	Verde básico 4
<i>Shingomonas xenophaga</i>	Antraquinoide

Tabla 3 Microorganismos usados en biorremediación de colorantes⁴⁵.

2.8 Microencapsulación.

La microencapsulación es una metodología que se basa en el recubrimiento de un microorganismo o consorcio de microorganismos, para mejorar su estabilidad y viabilidad mediante una barrera, que funciona como una protección contra los efectos adversos que puedan ser generados por un ambiente en el cual son sometidos gran variedad de microorganismos, obteniéndose como fin, capsulas de tamaño micrométrico, los cuales son elaboradas a partir de agentes de recubrimiento (alginato, quitosano, gelatina, almidón entre otros) que encapsulan un material activo^{55, 56, 57}.

Entre las ventajas de realizar este proceso esta aumentar la resistencia frente a condiciones ambientales, liberación controlada y gradual del material activo, conservación de las características físicas del material activo, como olor y sabor, puede ser empleado para separar componente y estabiliza el material activo⁵⁵.

2.8.1 Procesos de microencapsulación.

Para poder determinar el tipo de microencapsulación que se deben conocer los diferentes y distintos métodos utilizados para este fin, esto también dependerá del tiempo en que se buscan obtener las capsulas, el estado físico en el cual se obtiene el material activo, y en el cual se espera utilizar⁵⁸. En la figura 10, se observa una ilustración esquemática de los diferentes procesos de microencapsulación.

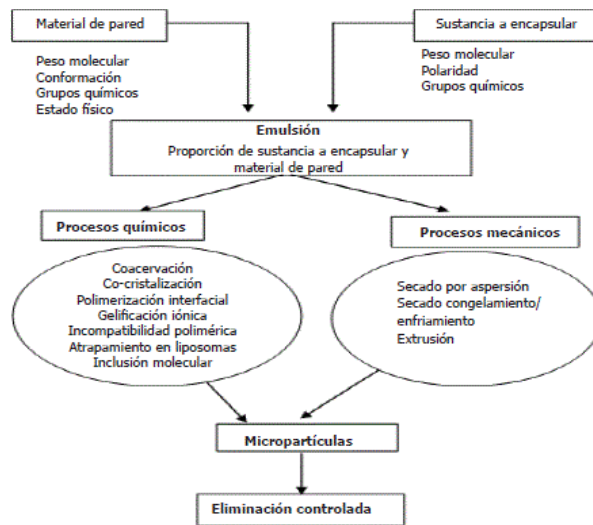


Figura 10 Procesos de microencapsulación⁵⁸.

2.8.2 Materiales usados en la microencapsulación.

Una de las características principales que deben tener los materiales encapsulantes, es que deben permitir y mantener la viabilidad del material activo, por lo cual debe propiciar en gran medida la correcta conservación sin separarlo completamente del medio externo, es decir debe permitir mantener una relación con su entorno. Algunos compuestos activos que se han descrito en la literatura han sido enzimas, antioxidantes polifenoles, microorganismos, lípidos buffers, entre otros, con los cuales se busca aumentar su resistencia a condiciones no tolerables, como concentraciones de pH, temperatura o sales, muy altas o muy bajas⁵⁹.

Uno de los materiales más usados en la literatura para encapsular, es el alginato de sodio, el cual, gracias a su capacidad de secuestrar cationes divalentes como calcio, permite la creación de geles que también al ser sometidos a otros secuestradores de cationes divalentes como lactatos o citratos, permiten la desgelificación del mismo, permitiendo de esta manera la liberación del material activo. Además, por ser un material desarrollado a partir de algas, es biodegradable y por lo tanto amigable con el medio ambiente⁵⁹.

Una de las desventajas más grandes del alginato de sodio, es que tiene una

sensibilidad a los ambientes ácidos y debido al tamaño de sus poros, pudiendo afectar su barrera en condiciones ambientales desfavorables^{59, 60, 61}.

Dentro de la literatura se utilizan diversos materiales para encapsular teniendo en cuenta el tipo de material o sustancia que sea usada como material activo como se ve en la tabla 4:

CATEGORIA	MATERIAL ENCAPSULANTE	TÉCNICA EMPLEADA
Carbohidratos	Almidón, maltodextrina, quitosano, solidos del jarabe de maíz, dextrina, almidon modificado, ciclodextrinas.	Secado por atomizacion, extrusión, coacervacion, inclusión.
Celulosa	Carboxilmetilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa, etilcelulosa, metilcelulosa, etil celulosa.	Coaservacion, secado por atomización.
Gomas	Goma acacia, agar, alginato de sodio, carragenina.	Secado por atomización, emulsificacion (formación de esferas).
Lípidos	Cera, parafina, cera de abejas, aceites, grasas.	Emulsificacion, formación de películas, liposomas.

Tabla 4 Materiales empleados para la microencapsulación de compuestos activos⁶².

2.8.3 Microencapsulación con alginato de sodio.

La microencapsulación en alginato de sodio. consiste en que el alginato es un gel de origen natural, extraído de algunas algas marinas, los cuales forman un polisacárido compuesto de ácidos b-D-manurónicos y aL- gulurónicos, el cual es inestable en pH ácidos, por lo cual se ha decidido utilizar algunos materiales como gomas entre otros⁶¹.

El alginato de sodio se utiliza como material encapsulante debido a que puede absorber cationes, en este caso como el del calcio, este cambia la estructura líquida del alginato de sodio y lo vuelve sólido, permitiendo absorber el material entre mezclado con el alginato de sodio; esto de igual manera se fundamenta en la gelificación interna, donde a través de un ion calcio el ácido aL-guluronico se une a otro acido aL-gulunorico, de esta forma se consigue la gelificacion y se producen micro cápsulas de 50mm aproximadamente⁵⁹.

2.9 Inmovilización de células.

“Se puede definir como cualquier técnica que restringe el movimiento libre de las células”⁵⁴. Un método de inmovilización debe reunir ciertos criterios entre los cuales están no debe atentar a la vida, viabilidad celular, debe ser resistente y tener una larga duración, debe permitir mantener la actividad celular, debe ser de simple ejecución y debe ser barato⁵⁴.

2.9.1 Inmovilización sin soporte.

Se da mediante los agregados o flóculos que puedan tener algunos microorganismos unos a otros ya sea inducida a través de algún reactivo como el glutaraldehído o por características propias del medio, aunque algunos microorganismos como las levaduras pueden desarrollar agregaciones y/o flóculos por sí mismos (tabla 5), estas técnicas son usadas también para inmovilización de enzimas⁵⁴.

Unión	Tipo de unión
-------	---------------

Sin soporte	Agregación o formación de floculo para la formación del entrecruzamiento
Con soporte	Unión covalente, adsorción para la formación de intercambiadores iónicos o biopelículas inorgánicas. Formación de biopelículas
Captura	Polímero orgánico, polímero inorgánico, membrana semipermeable

Tabla 5 Método de inmovilización de enzimas⁵⁴.

2.9.2 Unión covalente.

Se define como el uso de acopladores como el glutaraldehído para unir células, aunque estos pueden ser bastante tóxicos y a menudo dañan las células, un ejemplo dado de esta inmovilización, es el uso de *Aspergillus niger* con un soporte de glicidil metacrilato obteniendo como producto ácido glucónico⁵⁴.

Especies	Soporte	Producto
<i>Actobacter</i>	Hidróxidos metálicos	Ácido acético
<i>Aspergillus niger</i>	Glicidil metacrilato	Ácido glucónico
<i>Micrococcus luteus</i>	CM – celulosa	Ácido urocanico
<i>Saccharomyces cerevisae</i>	Aminopropil silica	Etanol
<i>Saccharomyces cerevisae</i>	Hidroxiálquil metacrilato	Toxina asesina
<i>Saccharomyces cerevisae</i>	Celulosa	Etanol
<i>Zygosaccharomyces lactis</i>	Hidroxiálquil metacrilato	B-galactosidasa

Tabla 6 Células microbianas unidas covalentemente a varios soportes⁵⁴.

2.9.3 Adsorción.

Se obtiene gracias a la capacidad de los microorganismos a adherirse a superficies solidas donde posteriormente forman biopelículas, algunos

microorganismos son dependientes de anclaje y requieren para crecer camas o portadores hechos de materiales como celulosa, poliestireno, agarosa entre otros como se puede observar en la tabla 7⁵⁴.

Soporte	Microorganismo	Producto
Celex-E	<i>Azotobacter Vinelandii</i>	--
Intercambiador de iones basico, anionico	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Etanol
Astillas de madera	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Etanol
Ceramica	<i>Acetobacter</i>	Ácido acético
Vidrio poroso	<i>Saccharomyces carlbergensis</i>	Cerveza
Vidrio con poro controlado	Cultivo mixto	Metano
Vidrio poroso	<i>E. coli</i>	Biomasa
Colchones de fibra de vidrio	<i>Zynomonas mobilis</i>	Etanol
Antracita	<i>Pseudomonas spp.</i>	Degradación de fenol

Tabla 7 Materiales usados para adsorber células⁵⁴.

2.9.4 Captura.

La captura de células en una red tridimensional se utiliza con polímeros como poliacrilamida, poliuretano, colágeno, gelatina entre otros con el fin de atrapar células completas⁵⁴, como se puede observar en la tabla 8.

Método	Organismo	Producto
---------------	------------------	-----------------

Poliacrilamida	<i>E. coli.</i> <i>Kluyveromyces lactis</i> <i>Saccharomyces cerevesiae</i> <i>Arthrobacter Simplex</i>	B-lactamasa 6-APA Hidrolisis de lactosa Etanol Predrisolona
Poliuretano	Células vegetales <i>Capsicum frutescens</i>	Capsaicina
Colageno	<i>Aspergillus niger</i> <i>Corynebacterium libium</i> <i>Streptomyces griseus</i>	Ácido cítrico Ácido glutámico Candicinina
Agar. Agarosa	<i>E. coli</i> <i>Saccharomyces pastorianus.</i> <i>Methylomonas</i>	Hidrolisis de lactosa Sucrosa Oxidacion de metano
Alginato	<i>Arthrobacter simplex</i> <i>Curvularia Gluconobacter oxidans</i> <i>Lactobacillus delbricii</i>	Pedrisolona Cortisona Dihidroxiacetona Ácido láctico
K-carragenano	<i>Acetobacter suboxydans</i> <i>Bacillus anyloliquifaciens</i> <i>Penicillium.</i> <i>Serratia marcescens</i>	L-sorbosa, a-amilasa patulina L-isoleucina

Tabla 8 Inmovilización por captura⁵⁴.

2.9.5 Membranas semipermeables.

“Se utiliza para confinar células dentro del medio”⁵⁴.

2.10 Degradación enzimática.

Algunos microorganismos tienen la capacidad de absorber por si mismos los

colorantes debido a las características morfológicas que esta pueda poseer como su membrana o proteínas propias de esta que permitan la degradación de desechos sin que sea necesario una adaptación del microorganismo¹.

Otra forma en la que un microorganismo degrada algún residuo es por la actividad metabólica, en la cual, al desarrollarse en el medio, el microorganismo puede producir enzimas como, lacasas, peroxidasas, monooxigenasas y diooxigenasas entre otras las cuales pueden degradar componentes como la lignina y los grupos cromoforos como el azoico, la antraquinona, índigo, etc., estos últimos perecientes a colorantes y/u otros desechos^{51, 52}.

2.11 Métodos para determinación de biomasa en procesos biológicos.

La determinación de biomasa es importante ya que ella misma indica la efectividad de un bioproceso. Para su determinación hay métodos directos que se basan en el conteo de células o en el peso celular y los indirectos que tendrán en cuenta algún componente celular o alguna actividad metabólica específica⁵¹.

2.11.1 Métodos directos.

2.11.1.1 Métodos gravimétricos.

La determinación de biomasa se realizará en peso seco por unidad de volumen, ya sea como sólidos solubles totales (SST) o sólidos solubles volátiles (SSV). Toda separación celular en un componente líquido se realizará por medio de centrifugación o filtración⁵¹. Los métodos gravimétricos poseen una desventaja y es que son poco reproducibles y consumen bastante tiempo ya que su determinación no solo incluye microorganismos activos, si no inertes, material inerte, polímeros⁵¹.

2.11.1.2 Métodos espectrofotométricos.

Se basan en la existencia de la relación que hay entre el número de microorganismos totales presentes en una muestra y su nivel de turbidez. Se conoce como densidad óptica y se lee entre 600 y 700 nm⁵¹.

2.11.1.3 Métodos microscópicos de recuento celular.

El recuento de microorganismos se realiza en la cuadrícula central de la cámara y se multiplica por la profundidad, obteniéndose el número de microorganismos por volumen. No es un método bastante exacto ya que presenta interferencias con formas orgánicas y además no permite la diferenciación de células activas y células inertes⁵¹.

2.11.1.4 Métodos microscópicos mediante epifluorescencia.

Es considerado uno de los mejores métodos para la estimación de biomasa. Es una técnica que usa un agente fluorocromo, junto con la adición de un anticuerpo marcado con fluorescencia o una auto fluorescencia natural debido a que hay presencia de un componente celular auto fluorescente⁵¹.

2.11.1.5 Métodos de siembra.

El método se fundamenta en la capacidad de una célula viable, para desarrollar colonias viables en un medio de cultivo apropiado para su crecimiento. Se realiza por siembra en superficie y por vertido⁵¹.

- Siembra en superficie: Se extiende un volumen de aproximadamente 0.1ml de la suspensión realizada sobre la superficie de un medio de cultivo⁵¹.

- Por vertido: Un volumen de 0,1- 1 ml de la suspensión microbiológica se mezcla con el medio de cultivo, dejando enfriar en una caja de Petri⁵¹.

Los resultados se expresan como UFC (Unidades formadoras de colonia). Es importante tener en cuenta cómo se determina un cultivo viable, para ello es necesario tener el conteo de 30 a 300 colonias. En el caso de muestras muy diluidas se utiliza la filtración en membrana, que, tras realizar una filtración de la muestra, se coloca el filtro sobre el agar, permitiendo de esta manera la colonización. Otro tipo de siembra es el NMP y es usado cuando la densidad de población bacteriana es elevada, tanto que no permite una evaluación cuantitativa de células individuales⁵¹.

2.11.2 Métodos indirectos.

Son métodos basados fundamentalmente en la determinación de un componente celular, cuantificación de actividades enzimáticas o en la medida de consumo de sustrato. Los principales componentes a tener en cuenta para la utilización de estos métodos indirectos son proteínas, ADN, polisacáridos, lípidos y ATP⁵¹.

2.11.3 Otros métodos.

2.11.3.1 Métodos bioquímicos.

La mayoría de actividades enzimáticas se realiza mediante la conversión de sustratos específicos a productos coloreados que son cuantificados fotométricamente. La principal desventaja es que cuando algunos microorganismos mueren, sus enzimas siguen activas. Se destaca la actividad esterasa y deshidrogenasa⁵¹.

2.11.3.2 Métodos cinéticos.

La base de estos métodos es la medida del consumo de sustrato o de la formación de productos. El ejemplo más típico es la determinación de DBO junto con microorganismos aerobios⁵¹.

2.12 Métodos para determinar la concentración del colorante.

2.12.1 DBO⁵.

Demanda biológica de oxígeno, es una medida del consumo de oxígeno utilizado por los microorganismos para la oxidación de compuestos orgánicos, siendo una medida asociada a materia orgánica en suspensión y disuelta. La técnica de DBO₅ expresa el oxígeno consumido de una muestra de agua residual previamente diluida con agua saturada de oxígeno y sellada en una botella de DBO por 5 días, sin espacio de aire a 20°C. Se realiza la medición de la disminución de oxígeno por medio de electrodos de oxígeno⁵².

2.12.2 DQO.

Técnica que mide la demanda de oxígeno por medio de oxidantes químicos

fuertes. en la cual se somete la muestra a reflujo por 2 horas con dicromato potásico en ácido sulfúrico concentrado con sulfato de plata como catalizador, el dicromato de potasio que queda se medirá por titulación de sulfuro ferroso amónico, esto dará una medición del oxígeno requerido para la oxidación de la muestra⁵².

2.12.3 pH.

El cambio en el medio de este parámetro indica que posiblemente está ocurriendo un cambio en la estructura química de los compuestos presentes y casos de biorremediación se están generando metabolitos⁵².

2.12.4 Método espectrofotométrico.

Técnica que utiliza el principio de la espectrofotometría donde se mida la cantidad de luz que es absorbida (absorbancia) por una sustancia química, estas sustancias se leen en el rango de luz visible debido a que algunos colorantes y contaminantes pueden generar color, es decir se leen en un rango de entre 400 a 800 nm y se utiliza con el fin de determinar la cantidad de luz absorbida o absorbancia es generada por un contaminante, es decir que a menor cantidad de absorbancia se puede determinar una menor concentración de este y por ende una menor cantidad de contaminante¹².

2.12.5 Carbono orgánico total (TOC).

Medición realizada por combustión eléctrica, la cual mide la cantidad de carbono orgánico presente⁵².

2.12.6 Cromatografía de gases.

Técnica cromatografía en la cual la muestra se volatiliza y se inyecta en la cabeza de un mechero de una columna cromatografía, en su fase móvil la cual es un gas inerte normalmente Helio, en la cual pasa a través de la fase estacionaria que se encuentra fijada en una columna que se encuentra de un horno con programación de temperatura, cada soluto en la muestra tiene una diferente afinidad hacia la fase estacionaria lo que permite su separación en bandas para su análisis

cuantitativo y cualitativo mediante detectores⁵³.

2.12.7 Espectrofotometría de gases.

Se procede a ionización de la muestra mediante, impacto electrónico que bombardea las moléculas con electrones con energía específica, una vez ionizada la muestra las moléculas se aceleran y conducen a sistema colector mediante campos eléctricos o magnéticos, en la cual cada molécula tendrá una velocidad dependiente de su masa, produciendo el espectro de masas de la muestra que es diferente para cada compuesto químico y ser a identificado por medio de la memoria del ordenador (librería de espectros de masas) y proceder a su identificación⁵³.

2.12.8 Acoplamiento cromatografía de gases – espectrometría de masas.

La cromatografía de gases es una técnica de separación de mezclas muy complejas y una vez separadas la espectrometría de masas realiza la identificación casi inequívoca de cualquier sustancia pura ya que normalmente no puede identificar componentes individuales de una mezcla sin separar previamente sus componentes⁵³.

2.13 Marco legal.

2.13.1 Resolución 01174 de 2002.

Regulado por el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, donde se adopta el manual de procedimientos para la gestión integral de los residuos hospitalarios y similares serán de obligatorio cumplimiento por los generadores de residuos hospitalarios y similares y prestadores de los servicios de desactivación y especial de aseo, de conformidad con lo dispuesto en el Decreto 2676 de 2000⁶³.

2.13.2 Decreto 4741 de 2005.

Decreto emitido por la resolución del Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial 1402 de 2006 por el cual se reglamenta parcialmente la prevención y el manejo de los residuos o desechos generados en el marco de la gestión integral,

tiene como objeto prevenir la generación de residuos o desechos peligrosos, así como regular el manejo de los residuos o desechos generados, con el fin de proteger la salud humana y el medio ambiente⁶⁴.

2.13.3 Resolución 0062 de 2007.

Emitido por el IDEAM, en la cual se adoptan los protocolos de muestreo y análisis de laboratorio para la caracterización fisicoquímica de los residuos o desechos peligrosos en el país⁶⁵.

2.13.4 Resolución 2115 de 2007.

Expedida por el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo territorial por el cual se señalan las características, instrumentos básicos y sistemas de control y vigilancia para la calidad del agua de consumo humano⁶⁶.

2.13.5 Resolución 043 de 2007.

Expedido por el IDEAM, “Por la cual se establecen los estándares generales para el acopio de datos, procesamiento, transmisión y difusión de información para el Registro de Generadores de Residuos o Desechos Peligrosos”⁹⁰.

2.13.6 Resolución 1362 de 2007.

Expedido por el Ministerio de Ambiente. Vivienda y Desarrollo Territorial. “Por la cual se establece los requisitos y el procedimiento para el Registro de Generadores de Residuos o Desechos Peligrosos, a que hacen referencia los artículos 27° y 28° del Decreto 4741 del 30 de diciembre de 2005”⁹¹.

2.13.7 Resolución 631 de 2015.

Expedida por el Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo territorial, reglamenta los parámetros máximos permisibles que pueden tener las aguas residuales para quienes realizan vertimientos a estas mismas, teniendo como parámetros para el vertimiento a aguas superficiales, aspectos microbiológicos, de plaguicidas, físicos químicos entre otros⁶⁷.

3. DISEÑO METODOLOGICO.

3.1 Tipo de estudio.

Cuantitativo.

3.1.1 Universo.

Residuos producidos en las prácticas de laboratorio de universidades.

3.1.2 Población.

Residuos producidos en las prácticas de laboratorio de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

3.1.3 Muestra.

Residuos peligrosos generados en las prácticas de laboratorio de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

3.2 Hipótesis.

Los microorganismos nativos aislados de los residuos peligrosos generados en los laboratorios de docencia de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca realizan su biorremediación.

3.2.1 Variables e indicadores.

Pueden ser observados en la tabla 9.

VARIABLE	DEFINICIÓN	INDICADORES
Dependiente	% de biorremediación de microorganismos nativos aislados	-Microorganismos aislados: cantidad UFC/ml -Técnicas de biorremediación (Consortio, inmovilización y microencapsulación) -Características macroscópicas y microscópicas.

-% de decoloración

-Halo de decoloración en mm o cm

Independiente	Residuos generados en las prácticas de laboratorio de la UCMC.	-Tipo de residuo generado -Cantidad en ml y Litros -pH -Características de los residuos: CRETII (corrosivo, reactivos, explosivo, tóxicos, inflamables e infecciosos), según IDEAM ⁶⁴
---------------	--	---

Tabla 9 Variables dependiente e independiente.

Elaborado por los autores.

3.3. Técnicas y procedimientos.

3.3.1 Fase 1. Diagnóstico de los residuos peligrosos generados en los laboratorios de docencia de la universidad colegio mayor de Cundinamarca.

Se realizó una observación directa de los diferentes tipos de residuos generados en los laboratorios y se procede a diligenciar una matriz para determinar los residuos generados y su cantidad durante el primer período del 2018 (Ver Anexo 2). A los residuos generados se les toma muestras según el IDEAM⁶⁴ de cada uno de los contenedores. La toma de muestra se efectúa en los laboratorios 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, donde se toman los componentes temáticos micología, hematología clínica, bioquímica, química, industrial, aguas, toxicología y microbiología. La toma de muestra se realizó el 12 de febrero del año 2018 procediendo con su análisis.

Se realizó la clasificación de los residuos teniendo en cuenta el pH y las características de peligrosidad según las fichas técnicas de los posibles residuos peligrosos depositados en cada contenedor. Las características de peligrosidad son ser corrosivas, reactivas, explosivas, tóxicas, inflamables y biológicas CRETII.

3.3.2 Fase 2. Aislamiento e identificación de microorganismos presentes en los residuos peligrosos generados en los laboratorios de docencia de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

3.3.2.1 Preparación del inóculo.

- Se tomó una muestra de 1 mL de los residuos peligrosos colectados, los cuales fueron: Residuos de carácter ácido, residuos de carácter básico, residuos de hipoclorito de sodio, residuos de colorantes de los contenedores de 20 L y 40 L provenientes de los laboratorios de docencia de la universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.
- Se suspendió en 5 mL de medio mineral en vasos de precipitado de 50 mL previamente esterilizados.
- Se agitó, y se dejó reposar para sedimentar. El sobrenadante es considerado como el inóculo.
- Del sobrenadante de la suspensión se agregó 0,2 mL en biorreactores (frasco tapa rosca azul, vidrio blanco, autoclavable hasta 140°C con capacidad de 250 mL), los cuales contenían 20mL de medio mineral líquido (MSM), (Anexo 1). Previamente a estos biorreactores se les agregó del residuo peligroso 2mL (residuos colectados). Asimismo, se realizó un montaje de cada residuo peligroso adicionando 2 mL de glucosa como fuente de carbono. (ver tabla 10)
- Se realizó control sin inóculo, el cual contenía 20 mL de medio mineral líquido y 2 mL del contaminante
- Se incubó en agitación constante a 100 rpm durante un periodo de tiempo de 24-48 horas y a una temperatura de 25°C.
- Se realizó lectura de densidad óptica a 600 nm, utilizando el espectrofotómetro marca Jenway y se midió pH, utilizando el potenciómetro marca Hanna instruments.
- Se seleccionaron los biorreactores donde se presentó mayor densidad óptica y

cambio en el pH, para el siguiente proceso⁶⁶.

El diseño metodológico se presenta en la Tabla 10.

Células (inoculo)	MSM + Contaminante (residuos básicos, residuos de colorantes, Cristal violeta (50mg/l), Residuos ácidos, residuos hipoclorito de sodio) + Glucosa.
	MSM + Contaminante (residuos básicos, residuos de colorantes, Cristal violeta (50mg/l), Residuos ácidos, residuos hipoclorito de sodio) + Glucosa.
Controles	
Sin células (sin inoculo)	MSM + Contaminante (residuos básicos, residuos de colorantes, Cristal violeta (50mg/l), Residuos ácidos, residuos hipoclorito de sodio) + Glucosa.
	MSM + Contaminante (residuos básicos, residuos de colorantes, Cristal violeta (50mg/l), Residuos ácidos, residuos hipoclorito de sodio) + Glucosa.

Tabla 10 Diseño metodológico⁶⁶.

3.3.2.2 Aislamiento de microorganismos.

- De los biorreactores seleccionados se realizaron diluciones 1:100 y 1:1000 los cuales se sembraron en medio solido enriquecido agar tripticasa de soya, asimismo se realizó una siembra directa del biorreactor.
- Se dejó en incubación a una temperatura de 30°C de 24 a 48 horas para bacterias y para hongos por 8 días a la misma temperatura.
- Se realizó caracterización macroscópica y microscópica de los microorganismos nativos aislados. Para la identificación microscópica de bacterias se utilizó tinción de Gram y para la identificación de hongos se realizó un directo de azul de lactofenol.

- Se realizó repiques de las bacterias aisladas en agar sangre, el cual es un medio de cultivo sólido enriquecido y en un medio selectivo de agar Mac Conkey. En el caso de los hongos se realizaron repiques en agar PDA.
- Se dejó en incubación a temperatura de 30°C de 24 a 48 horas para las bacterias y los hongos por 8 días a la misma temperatura.
- Se realizó identificación de los microorganismos por medio de caracterización macroscópica y microscópica para hongos y bacterias y adicionalmente, se realizaron pruebas bioquímicas (catalasa y oxidasa) y BBL Crystal para bacterias.
- Se realizó siembra de las bacterias y hongos seleccionados e identificados en un medio que contenía el colorante cristal violeta a una concentración de 50mg/L, en el caso de las bacterias se adicionó cristal violeta en medio agar nutritivo y para hongos al agar PDA⁶⁷.
- Se realizaron pruebas de antagonismo de los microorganismos seleccionados.
- Se inocularon los microorganismos utilizando el método de Kirby Bauer y botón estéril por triplicado de cada uno de los microorganismos seleccionados y se incubaron a las mismas condiciones previamente mencionadas para bacterias y hongos. Se utilizó como control para las bacterias la *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, suministrada por el Cepario de la Universidad.
- Se procedió a medir los halos de decoloración para seleccionar los microorganismos que tienen un valor mayor o igual valor en mm del halo de decoloración que da el microorganismo utilizado como control⁶⁷.
- Los microorganismos seleccionados se utilizaron para los siguientes procesos.

3.3.3 Fase 3. Biorremediación de los residuos generados utilizando diferentes métodos.

3.3.3.1 Inmovilización de biomasa fúngica en espuma de poliuretano.

Fase 1:

- Se verificó la pureza del cultivo por medio de un directo de azul de lactofenol

para evidenciar la presencia de hongos.

- De la cepa obtenida se retiró un disco de agar con el hongo.
- Se realizó inóculo del hongo en agar extracto de salvado de trigo el cual es un medio de enriquecimiento. Se incubó por 8 días a 30°C⁶⁷.

Fase 2:

- Se realizó prueba de pureza, caracterización macroscópica y microscópica.
- Se retiraron 10 discos del agar con el hongo crecido de la zona periférica.
- Se inóculo en un Erlenmeyer con 50 ml de extracto de salvado de trigo en medio líquido.
- Se agregó 8 cubos de espuma de poliuretano de 1cm³ estéril para inmovilización del hongo en esta. Se incubó por 8 días a 30 °C a 150 rpm en oscuridad⁶⁹.

Fase 3:

- Se realizó prueba de pureza.
- Se retiró las espumas del medio y se determinó crecimiento de biomasa atrapada en cada uno de los cubos por medio de peso seco, teniendo en cuenta el peso inicial del soporte
- Antes de inocular se ejecutó una lectura inicial en cuanto a absorbancia a los biorreactores a los cuales se les iba a realizar el ensayo.
- Se tomaron 5 cubos de espuma colonizados y se agregaron a un biorreactor de 250 mL el cual contenía 50 mL de colorante cristal violeta en una concentración de 50mg/L y biorreactores que contenían 50 mL de los residuos peligrosos, realizando el ensayo por triplicado. Se incubó por 8 días a 30°C en agitación continua a 150 rpm⁶⁷.

Lectura:

- Pasados 8 días se retiraron los cubos de espuma de poliuretano y se tomó una muestra de 5 mL la cual se centrifugó a 2500 rpm por 10 min separando el

sobrenadante.

- Se realizó la última lectura de absorbancia de 450 nm y se procedió a realizar la fórmula de unidades de color (absorbancia x 500/ 0.132).
- Se realizó de igual manera la lectura del blanco (colorante sin tratamiento).
- Se realizó comparación de las mediciones del colorante sin tratamiento y después de este⁶⁷.

3.3.3.2 Microencapsulación por medio de perlas de alginato de sodio.

Fase 1:

- A los microorganismos seleccionados: *Staphylococcus sciuri*, *Burkholderia cepacia*, y *Aeromonas hydrophila* (potencial de decoloración) se les realizó una comparación con el estándar de la escala de Macfarland 3 con el fin de tener una suspensión bacteriológica como referencia.
- Se homogeneizaron las 3 suspensiones de microorganismos¹⁰.

Fase 2:

- Se adiciono 25 mL de las suspensiones con 0.5g de alginato de sodio a un vaso de precipitado de 250 mL y se homogenizo por cinco minutos.
- Se utilizó una jeringa de 20 mL y se succiono sin aguja una alícuota de la mezcla de microorganismos y se descartó por goteo en un vaso de precipitado con cloruro de calcio al 0.05M, previamente refrigerado a 4°C. Esta mezcla se mantuvo en agitación lenta favoreciendo la formación de perlas de alginato.
- Se separó las perlas mediante un proceso de filtración usando gasa estéril para retener las perlas⁶⁹.
- Se realizó un medio el cual contenía 100 mL de medio mineral con cristal violeta a una concentración de 50mg/L con perlas de alginato sin suspensión bacteriana para control. Este ensayo se realizó por triplicado.
- Se utilizaron biorreactores con 100 mL de medio mineral con cristal violeta a

50mg/L ya preparado para inocular por triplicado.

- Se utilizaron biorreactores con 100 mL para cada uno de los residuos peligrosos por triplicado.
- Se tomaron 25 g de las perlas producidas y se inocularon en cada biorreactor.
- Se incubó a 25°C y se mantuvo en agitación constante a 100 rpm por un tiempo de 192 horas¹⁰.

Fase 3:

- Completado el tiempo de incubación, se tomó lectura de las absorbancias a 590 nm para Cristal violeta y residuo de colorantes y 550 nm para los otros residuos en un tiempo de 2, 4, 24 y 192 horas.
- Se determinó el porcentaje de biorremediación a través de la siguiente fórmula:

$$\text{Biorremediación (\%)} = \left[\frac{\text{Absorbancia en } t_0 - \text{Absorbancia en } t_1}{\text{Absorbancia en } t_0} \right] \times 100^{10, 67}.$$

3.3.3.3 Biorremediación usando un consorcio bacteriano.

Fase 1:

- Se tomaron los microorganismos *Staphylococcus sciuri*, *Burkholderia cepacia*, y *Aeromonas hydrophila*, se llevaron a una escala de McFarland 3 en medio MSM.
- Se realizó el consorcio bacteriano, tomando partes iguales de cada microorganismo para posterior homogenización en un Erlenmeyer.

Fase 2:

- Se utilizaron 15 biorreactores con 100 ml medio mineral (MSM) y cristal violeta a una concentración de 50mg/L⁸.
- Se utilizaron 9 biorreactores con 100 ml de los 3 tipos de residuos peligrosos por triplicado.
- Se tomó 4 mL de cada microorganismo preparado en la fase 1 para ensayos en

células libres y 4 mL del consorcio preparado también en esta fase. Se adicionaron a los biorreactores preparados previamente logrando una concentración de 4% (v/v).

- Se tomó una absorbancia a 590 nm del control cristal violeta sin inóculo, como control por triplicado.

- Los biorreactores se llevaron a agitación a 100 rpm a temperatura ambiente 25°C por un tiempo de 192 horas⁸.

- Se tomó lectura de las absorbancias a una longitud de onda de 590 nm para cristal violeta y residuos de colorantes, y 550 nm para los otros residuos. Las lecturas se realizaron a las 2, 4, 6, 24 y 192 horas.

- Se realizó la determinación del porcentaje de biorremediación con la siguiente fórmula:

$$\text{Biorremediación (\%)} = \left[\frac{\text{Absorbancia en } t_0 - \text{Absorbancia en } t_1}{\text{Absorbancia en } t_0} \right] \times 100^{10, 69}.$$

3.3.3.4 Tratamiento estadístico.

Las diferencias entre tratamientos fueron evidenciadas mediante un análisis de varianza ANOVA (95% de confianza), utilizando el programa Excel 2013.

4. RESULTADOS.

4.1 Fase 1. Diagnóstico sobre la generación de residuos en los laboratorios de docencia de la universidad colegio mayor de Cundinamarca.

El diagnóstico se realiza mediante una observación directa de los 12 laboratorios de docencia de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, donde se encuentra los residuos dispuestos según código de colores en canecas roja, verde y gris. Además, dependiendo del laboratorio se encuentran contenedores plásticos identificados con capacidades de 20 y 40 litros para la disposición de residuos básicos, ácidos, solventes, colorantes, hipoclorito de sodio y residuos de materiales donde se deposita vidrio, baja lenguas e hisopos, cumpliendo el decreto 4741 de 2005⁶⁴. De este mismo modo se encuentran guardianes identificados para el depósito de material corto punzante (Ver figura 11). La matriz diligenciada se encuentra en Anexo 2.

Cada recipiente se encuentra correctamente identificado con el tipo de residuo que contiene, con su respectivo pictograma y símbolo de riesgo, indicando qué residuos deben ser depositados allí para evitar accidentes y darles un correcto manejo. Se realizó una tabla donde se encuentra la relación entre los laboratorios, sus componentes temáticos y residuos generados (Ver tabla 11).

En los laboratorios 1,2 y 10 donde se realiza investigación no se tomó muestra ya que allí no había contenedores para la disposición de residuos básicos, ácidos, solventes, colorantes e hipoclorito de sodio.

LABORATORIO	COMPONENTES TEMÁTICOS	RESIDUOS PELIGROSOS
# 3	Microbiología industrial, microbiología ambiental y aguas.	Residuos de hipoclorito de sodio y residuos de colorantes.

# 4	Bioquímica, diagnóstico clínico y microbiología industrial II.	Residuos de hipoclorito de sodio y residuos de colorantes.
# 5	Química I, química II, toxicología y bioquímica.	Residuos de hipoclorito de sodio, ácidos, básicos y solventes.
# 6	Microbiología, bacteriología I, bacteriología II y biotecnología.	Residuos de colorantes e hipoclorito de sodio.
# 7	Microbiología II, veterinaria, bacteriología I, bacteriología II y microbiología industrial.	Residuos de colorantes e hipoclorito de sodio.
# 8	Genética, banco de sangre, virología y biología molecular.	Residuos de hipoclorito de sodio.
# 9	Inmunología I, inmunología II y banco de sangre.	Residuos de colorantes, solventes hipoclorito de sodio.
# 11	Hematología I, hematología II y morfofisiología	Residuos de colorantes e hipoclorito de sodio.
# 12	Parasitología, micología, bacteriología I, veterinaria y microbiología ambiental	Residuos de colorantes e hipoclorito de sodio.

Tabla 11 Laboratorios de docencia, componentes temáticos y residuos generados.

Elaborado por los autores.

Cada laboratorio de docencia contiene colectores específicos para la recolección de diferentes residuos peligrosos usados, allí se evidencia que cada colector contiene su respectiva etiqueta donde se incluye la identificación de los residuos generados etiqueta de la NFPA, ONU⁹⁷ y su número como lo sugiere el decreto 4741 de 2005⁶⁴. En los laboratorios hay colectores con diferentes capacidades, de 20 y 40 litros (Ver figura 11), ninguno sin exceder la capacidad para prevenir que el personal que realiza el transporte y disposición se vea afectado.



Figura 11 Guardianes y contenedores de 40 y 20 L.

Elaborado por los autores.

Los residuos generados se monitorean en el primer periodo del 2018 para establecer la cantidad generada de los residuos, que según la legislación se pueden considerar residuos peligrosos CRETII⁶⁴. Los residuos seleccionados son de residuos de hipoclorito de sodio, residuos de colorantes, residuos de ácidos, básicos y residuos de solventes. Este tipo de residuos puede contener diferentes sustancias (Ver tabla 12 y Anexo 10).

Residuos peligrosos	Características de peligrosidad NFPA ⁹⁷
Ácido clorhídrico	Corrosivo
Ácido sulfúrico	Corrosivo
Hidróxido de sodio	Corrosivo

Hidróxido de potasio	Corrosivo, reactivo
Lugol, solución de yodo	Corrosivo
Azul de metileno	Inflamable, Corrosivo
Cristal violeta	Tóxico, corrosive
Verde malaquita	Reactivo, Corrosivo
Alcohol acetona	Reactivo Inflamable Corrosivo
Colorante de Giemsa	Inflamable
Fucsina básica coloración de Gram	Corrosivo
Azul de cresil brillante	Corrosivo
Hipoclorito de sodio	Corrosivo

Tabla 12 Características de peligrosidad de los principales residuos generados en la universidad colegio mayor de Cundinamarca.

Elaborado por los autores.

Los tres monitoreos se realizaron los días 12 de febrero de 2018, 22 de marzo de 2018, 12 abril de 2018 y 10 de mayo de 2018, resultados que pueden ser observados en la Tabla 13 donde se observó los residuos por laboratorios de docencia y se determinó aproximadamente la cantidad generada de cada residuo peligroso. Todos los muestreos se realizaron, tomando un total de 5 muestras de los laboratorios 3, 4, 5, 6, 7 y 12.

LABORATORIO	RESIDUOS GENERADOS	CAPACIDAD DEL CONTENEDOR	CANTIDAD (LITROS)			
			12 Feb	22 Mar	12 Abr	10 May

			2018	2018	2018	2018
# 3	Residuos de hipoclorito de sodio	20 Litros	5	10	15	18
	Residuos de colorantes	20 Litros	4	10	10	14
	Residuos ácidos	40 Litros	4	4	6	4
# 4	Residuos de hipoclorito de sodio	20 Litros	2	6	10	10
	Residuos de colorantes	20 Litros	4	10	10	14
	Residuos ácidos	40 Litros	4	4	6	8
# 5	Residuos hipoclorito de sodio	40 Litros	2	4	4	8
	Residuos de solventes	40 Litros	2	4	4	6
	Residuos de ácidos	20 Litros	2	8	16	20
	Residuos de básicos	20 Litros	2	5	8	16

# 6	Residuos hipoclorito de sodio	60 Litros (2 contenedores)	28	38	56	60
	Residuos colorantes	20 Litros	3	6	8	18
# 7	Residuos hipoclorito de sodio	60 Litros (2 Contenedores)	22	36	50	60
	Residuos colorantes	40 Litros (2 contenedores)	12	28	36	40
# 8	Residuos hipoclorito de sodio	40 Litros	10	20	28	3
# 9	Residuos hipoclorito de sodio	60 Litros (2 contenedores)	7	20	40	52
	Residuos solvents	20 Litros	0.5	1	2	4
	Residuos colorantes	20 Litros	0.5	1	3	4
#11	Residuos hipoclorito de sodio	40 Litros	4	20	28	30
	Residuos colorantes	20 Litros	1	2	3	3

# 12	Residuos de hipoclorito de sodio	40 Litros	8	18	28	32
	Residuos de colorantes	20 Litros	5	10	17	19

Tabla 13 Cantidad en litros de residuos peligrosos generados en los laboratorios de docencia.

Elaborado por los autores.

Las cantidades generadas de residuos se estimaron por litros, mediante el diligenciamiento del formulario RH1, fuentes de generación y clases de residuos expedida por el Ministerio del Medio Ambiente (ver anexo 2), en su respectivo orden de mayor a menor tipo de residuos generados se obtuvieron: residuos de hipoclorito de sodio 302 litros, residuos de colorantes 112 litros, residuos de ácidos 32 litros, residuos de solventes 10 litros y residuos básicos 16 litros.

Los contenedores se encontraban rotulados de la manera correcta sin exceder la capacidad de los mismos, sin embargo, en los laboratorios 6, 7 y 9 se encontraban más de dos contenedores, rotulados de la siguiente manera: En el laboratorio 6 se encontraban 2 contenedores, uno de 20 litros y otro de 40 litros para la disposición de residuos de hipoclorito de sodio con una producción total de 60 litros, en el laboratorio 7 se encontraban 2 contenedores para residuos de hipoclorito de sodio uno de 20 litros y otro de 40 litros con una producción total de 60 litros y 2 contenedores para colorantes de 20 litros con una producción total de 40 litros, en el laboratorio 9 se encontraban 2 contenedores uno de 20 litros y otro de 40 litros para la disposición de residuos de hipoclorito de sodio con una producción total de 52 litros. Esta producción se ve aumentada debido a los componentes temáticos que se dictaban allí como bacteriología, microbiología, biotecnología, veterinaria, biología, virología y banco de sangre.

Los residuos escogidos presentes en los laboratorios de docencia de la

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca para la investigación fueron los generados en los laboratorios 3, 4, 5, 7 y 12, presentando las siguientes características físicas y químicas (Ver tabla 14); no obstante los residuos peligrosos no pueden ser definidos bajo un pH único debido a que pueden tener (debido a los diferentes espacios académicos dictados) variabilidad en los residuos generados en las diferentes prácticas de laboratorio de estos; También se indica que los residuos peligrosos generados por la universidad colegio mayor de Cundinamarca no deben ser desechados al desagüe según legislación 3956 de 2009 debido a que presentan pH de 0.9 a 9.5 (aunque se evidenciaron pH más altos en residuos básicos)⁹⁶.

Laboratorio	Muestra	Características organolépticas		Presencia de partículas en suspensión.	pH
		Color	Olor		
Laboratorio 3	Residuos Básicos	Ámbar	Fuerte	No	9.5
Laboratorio 4	Residuos Hipoclorito	Blancuzco	Fuerte	Si	6.9
Laboratorio 5	Residuos Ácidos	Café	Fuerte	Si	0.9
Laboratorio 7	Residuos de colorantes	Violeta	Alcohólico	No	6.0
Laboratorio 12	Residuos de colorantes	Violeta	Alcohólico	Si	6.1

Tabla 14 Características físicas y químicas de los residuos peligrosos.

Elaborado por los autores.

La cantidad de residuos generados convierten a la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca en un mediano generador pues produce más de 100 kg/mes y

menos de 1000 kg/mes⁹¹. Además según las características CRETII propuestas para la normatividad de RESPEL los residuos generados son peligrosos por lo cual presentan efectos adversos al medio ambiente y a la salud humana que pueda presentar un contacto directo y/o indirecto con éstos, de esta manera y para evitar estos efectos adversos, cada generador debe hacerse responsable de sus residuos peligrosos^{63, 64, 95}. Por ende, se escogen los residuos peligrosos generados que permitan la adaptación de microorganismos con el fin de inducir una transformación y minimización de la peligrosidad para su disposición final, estos se observan en la figura 12.



Figura 12 Residuos peligrosos.

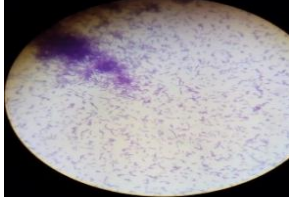
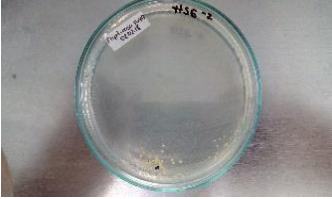
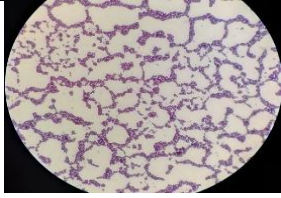
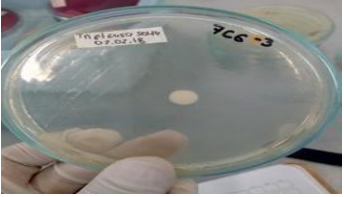
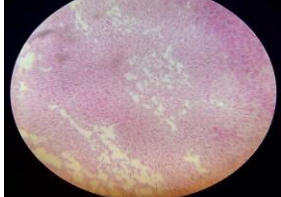
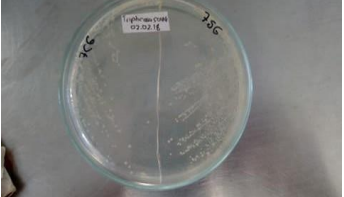
Elaborado por los autores.

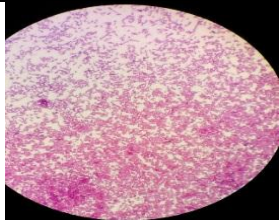
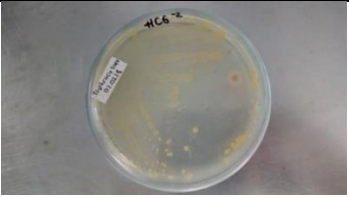
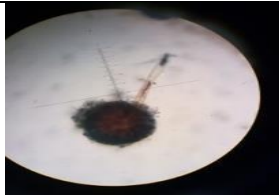



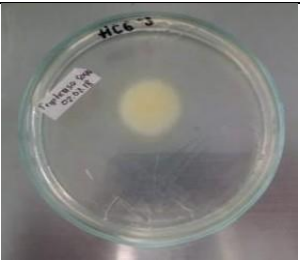
4.2 Fase 2. Aislamiento e identificación de microorganismos nativos en los residuos peligrosos generados.

Se realizó el aislamiento de los residuos encontrándose en total 6 microorganismos, 4 bacterias y 2 hongos (Ver tabla 15). En el aislamiento realizado en los residuos de sustancias acidas no se encontró ningún microorganismo posiblemente por el pH tan bajo que se encuentra para este tipo de residuos (85).

Los microorganismos aislados de los residuos de hipoclorito de sodio, colorantes y residuos básicos en agar tripticasa de soya se les realizo tinciones para observar sus características microscópicas junto con las características macroscópicas, pruebas bioquímicas y BBL Crystal para su identificación son observadas en el

anexo 3.

Bacterias.			
Residuo peligroso	Características microscópicas	Características macroscópicas	Pruebas bioquímicas
Residuo de hipoclorito de sodio sin glucosa (HSG-2)	 <p>Bacilos Gram positivos</p>	 <p>Colonias amarillas, puntiformes y cremosas.</p>	Oxidasa negativa. Catalasa positiva.
Residuos de colorantes del laboratorio 7 con glucosa (7CG-3 y 7CG-2)	 <p>Cocos Gram positivos</p>	 <p>Colonias naranjas, puntiformes y cremosas</p>	Oxidasa positiva. Catalasa positiva.
Residuos de colorantes del laboratorio 7 con glucosa y sin glucosa (7CG y 7SG)	 <p>Bacilos Gram negativos</p>	 <p>Colonias blancas, puntiformes cremosas</p>	Oxidasa positiva. Catalasa positiva.

<p>Hipoclorito con glucosa (HCG-2)</p>	 <p>Bacilos Gram negativos</p>	 <p>Colonias grandes amarillas, cremosas.</p>	<p>Oxidasa positiva. Catalasa positiva.</p>
<p>Hongos.</p>			
<p>Residuos básicos sin glucosa y básicos con glucosa (BCG-3 y BSG-2)</p>	 <p>Cabezas conidiales uniseriadas y predominantemente columnares; estipes hialinos y lisos; vesícula piriforme. Conidios globosos a ovoides, lisos o ligeramente rugosos.</p>	  <p>Colonia aterciopelada de color verde, polvorosa, vellosa, con margen blanquecino o beige.</p>	<p>NO APLICA</p>
<p>Residuos de hipoclorito con glucosa (HCG-3)</p>	 <p>Conidióforo corto, y liso, vesícula con</p>		<p>NO APLICA</p>

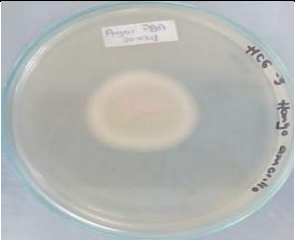

	fiálides, uniseriada, ocupando 2/3 de la vesícula.	 <p>Colonias aterciopeladas, blancas afelpada, vellosa, con margen blanquecino o beige</p>	
--	--	--	--

Tabla 15 Características microscópicas, macroscópicas y pruebas bioquímicas de los microorganismos nativos aislados.

Elaborado por los autores.

Las bacterias fueron repicadas en medios diferenciales y selectivos para posteriormente ser identificados por medio del BBL Crystal (Ver tabla 16 y Anexo 3). Para hongos se utilizó agar PDA, (Ver figura 13).

Residuo Peligroso	Características microscópicas	BBL Crystal
Residuos de hipoclorito sin glucosa (HSG-2)	 <p>Colonias oscuras, cremosas.</p>	<i>Corynebacterium aquaticum</i> 95%




<p>Residuos de colorantes laboratorio 7 con y sin glucosa (7CG-3 y 7CG-2)</p>	 <p>Colonias puntiformes, blancas, cremosas de bordes definidos</p>	<p><i>Staphylococcus sciuri</i> 100%</p>
<p>Residuos de colorantes laboratorio 7 con y sin glucosa (7CG, 7SG)</p>	 <p>Colonias pequeñas, puntiformes color crema.</p>	<p><i>Burkholderia cepacea</i> 93%</p>
<p>Residuos de hipoclorito con glucosa (HCG -2)</p>	 <p>Colonias pequeñas, puntiformes, rosadas</p>	<p><i>Aeromonas hydrophila</i> 81%</p>

Tabla 16 Microorganismos identificados.

Elaborado por los autores.

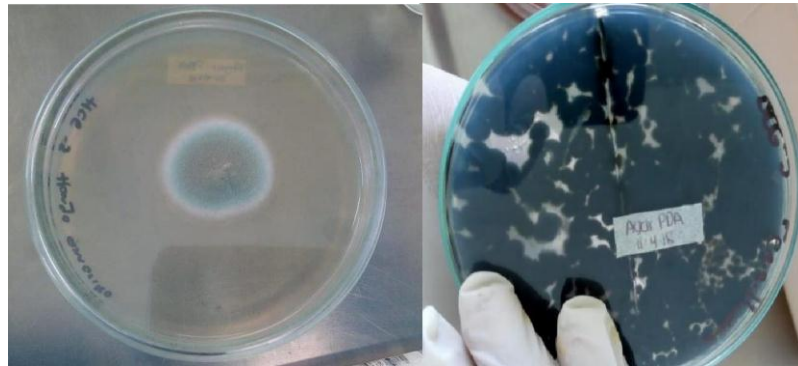


Figura 13 Hongos aislado en agar PDA.

Elaborado por los autores.

Los hongos aislados e identificados fueron: *Aspergillus niger* y *Penicillium spp.* Posteriormente a la identificación de los microorganismos se procede a realizar la investigación con los microorganismos encontrados, los cuales fueron nombrados dentro del proyecto como se observa en la tabla 17.

Fuente	Microorganismo	Código
7CG-3 y 7CG-2 (Residuos colorantes)	<i>Staphylococcus sciuri</i>	M1
7CG (Residuos de colorantes)	<i>Burkholderia cepacia</i>	M2
HSG-2 (Hipoclorito De Sodio)	<i>Corynebacterium aquaticum</i>	M3
HCG-2 (Residuos de hipoclorito)	<i>Aeromona hydrophila</i>	M4
HCG (Residuos de hipoclorito)	<i>Penicillium spp.</i>	H1
BSG-2 y BCG-3	<i>Aspergillus niger</i>	H2

Residuos básicos		
------------------	--	--

Tabla 17 Microorganismos aislados e identificados de los residuos peligrosos.

Elaborado por los autores

4.2.1 Potencial de decoloración.

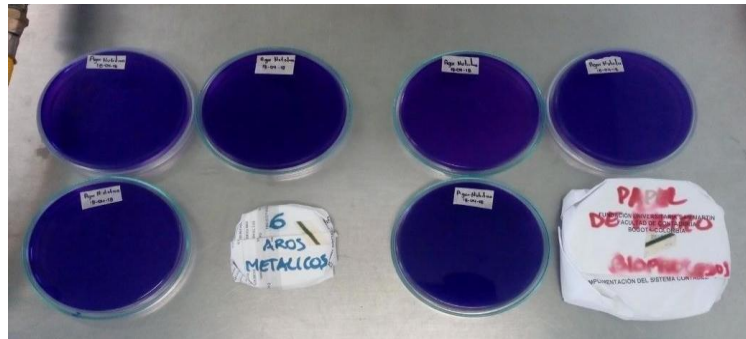


Figura 14 Medios de agar nutritivo y PDA suplementados con 50 mg/L de cristal violeta.

Elaborado por los autores.

A continuación, se muestran los potenciales de biodegradación, desarrollados por cada microorganismo individualmente, los cuales fueron obtenidos por los métodos de siembra en botón estéril y Kirby Bauer, realizados en diferentes cajas de agar PDA y nutritivo suplementados con cristal violeta 50 mg/L y observados en la figura 14, este colorante fue utilizado por ser el colorante más tóxico. Los halos de decoloración pueden observarse en el anexo 4 y 5.

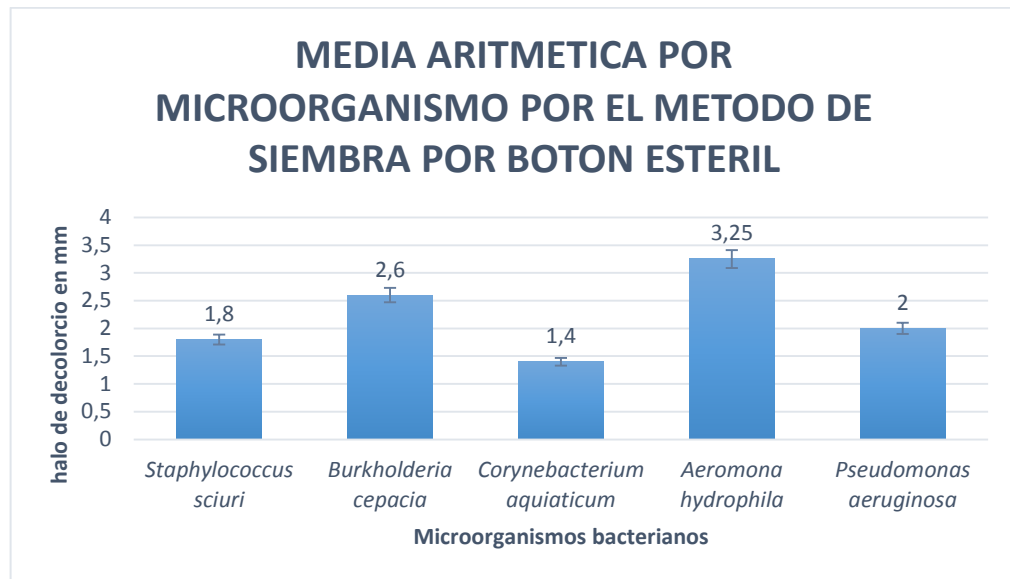


Figura 15 Halos de decoloración (mm). Método botón estéril.

Elaborado por los autores.

Los microorganismos presentaron halos de decoloración entre 3.25 mm y 1.4 mm, el microorganismo que presentó mayor halo de decoloración fue *Aeromonas hydrophila* seguido por *Burkholderia cepacia*, *Staphylococcus sciuri* y por último *Corynebacterium aquaticum*, el control *Pseudomonas aeruginosa* presentó un halo de decoloración de 2 mm observado en la figura 15.

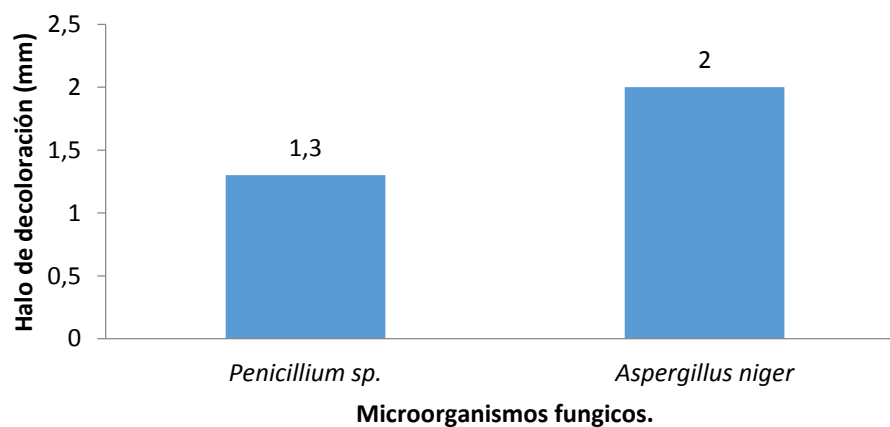


Figura 16 Halos de decoloración para hongos (mm) método botón estéril.

Elaborado por los autores

Los hongos presentaron halos de decoloración entre 2 mm y 1.3 mm, el microorganismo que presento mayor halo de decoloración fue *Aspergillus niger* y por último *Penicillium sp.* Como se puede observar en la figura 16.

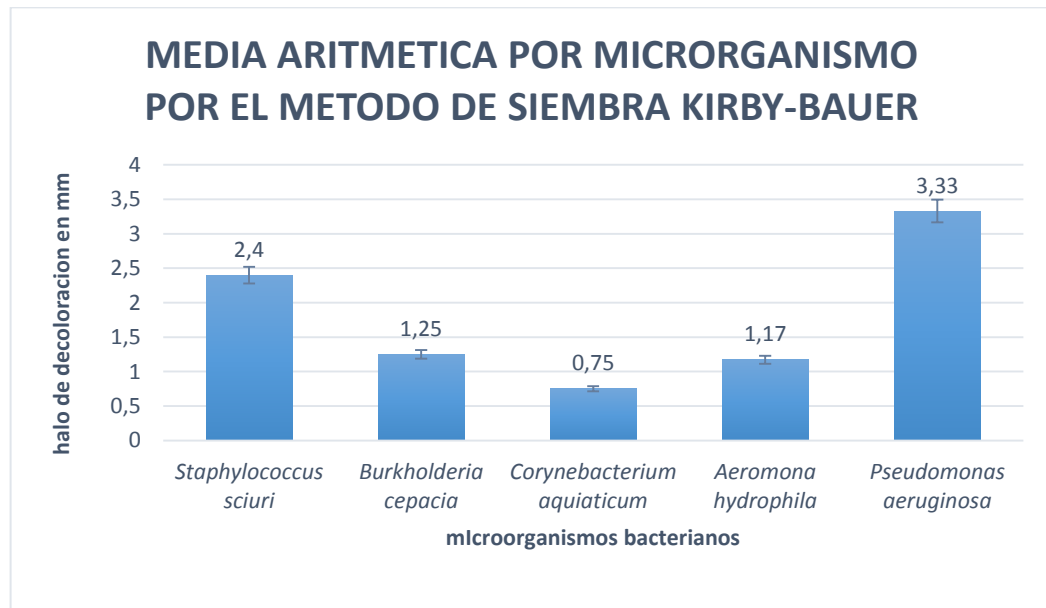


Figura 17 Halos de decoloración (mm) para bacterias. Método Kirby Bauer.

Elaborado por los autores.

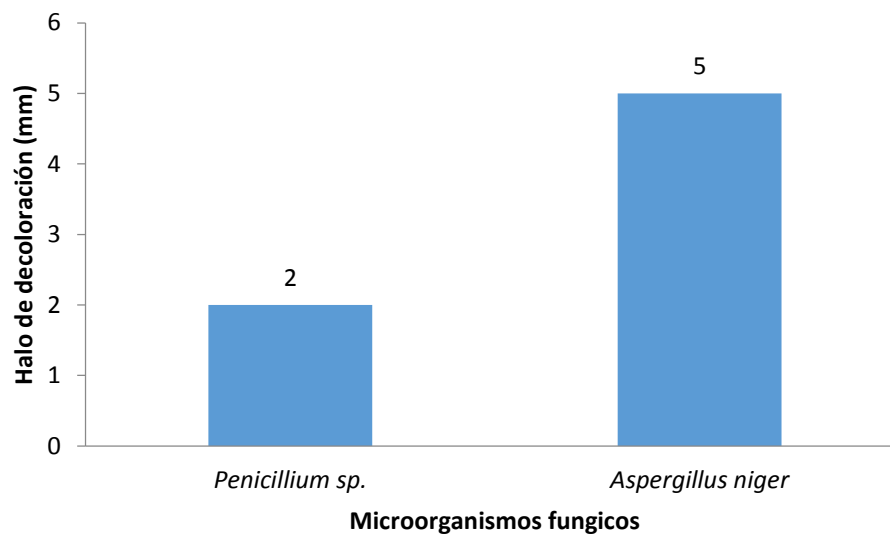


Figura 18 Halos de decoloración (mm) para hongos. Método Kirby Bauer.

Elaborado por los autores.

Debido a su mayor potencial de biodegradación (figura 17 y figura 15) frente al control *P. aeruginosa* se escogieron los microorganismos *S. sciuri*, *B. cepacea*, *A. hydrophila* para preparación del consorcio bacteriano y la microencapsulación con alginato y el hongo *A. niger* por su mayor halo de decoloración frente al hongo *Penicillium sp.* para inmovilización de masa fúngica por presentar el mayor halo de decoloración.

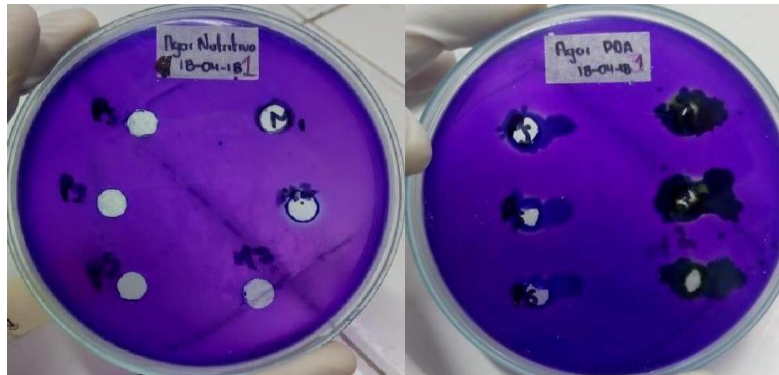


Figura 19 Fotografía de halos de decoloración.

Elaborado por los autores.

4.3 Fase 3. Ensayos de Biorremediación.

4.3.1 Biorremediación con inmovilización de hongo *Aspergillus niger*.

En el proceso de inmovilización se observó como el hongo invadió todo el material del poliuretano, obteniendo un excelente crecimiento, lo cual indica que este inóculo está listo para ser utilizado en el ensayo de biodegradación (ver figura 22).

Poliuretano con inóculo del	Poliuretano sin inóculo del hongo
-----------------------------	-----------------------------------

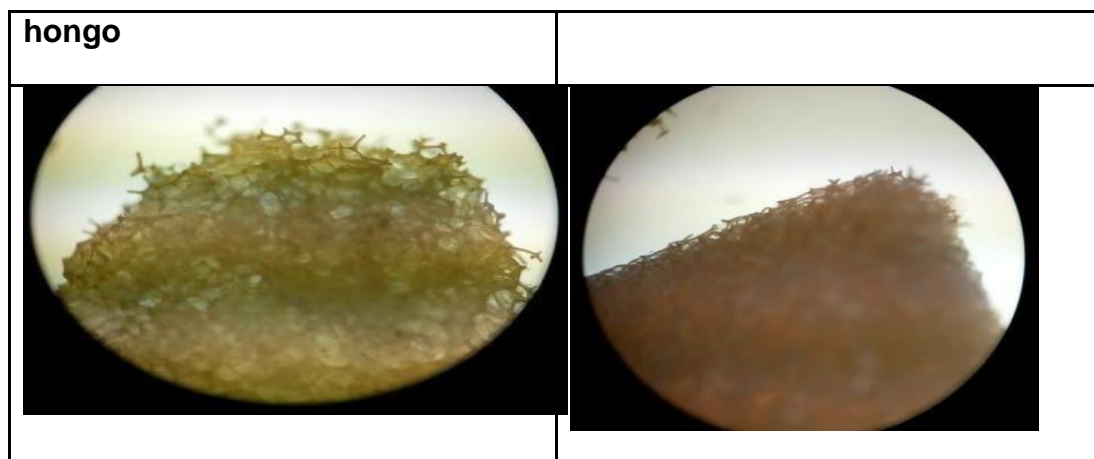


Figura 20 Hongo inmovilizado en espuma de poliuretano.

Elaborado por los autores.

Los inóculos se pueden observar en la figura 21 donde se pueden observar también los controles sin inóculo.



Figura 21 Hongo inmovilizado en espuma de poliuretano inoculado en los biorreactores en los residuos peligrosos.

Elaborado por los autores.

Pasados los 8 días de incubación se procedió a tomar las absorbancias de los biorreactores a los que se les aplico el ensayo por triplicado, hallando de esta manera el promedio y desviación estándar del pH y de las absorbancias unidades de color. (Ver figura 22 y anexo 6).

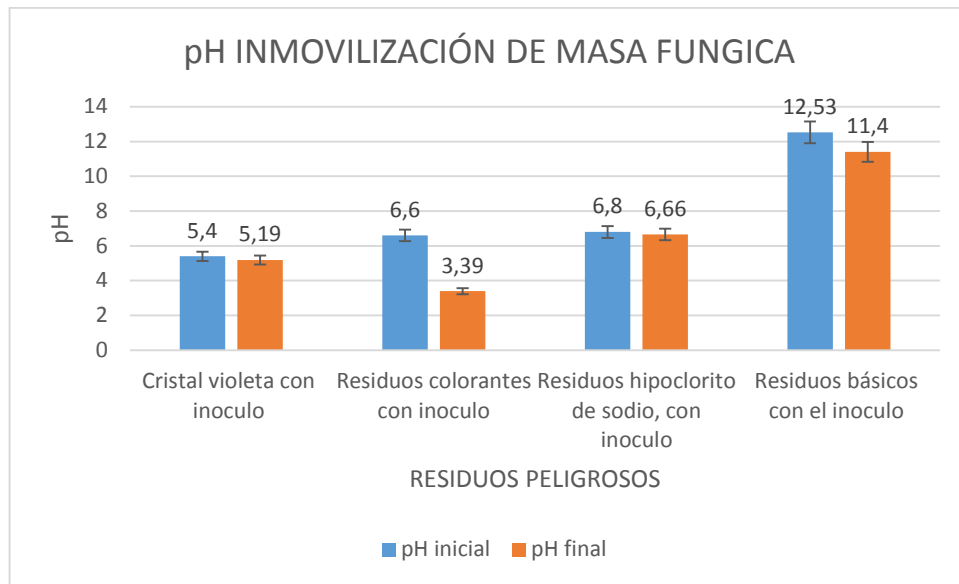


Figura 22 Cambio de pH en el proceso de biorremediación de residuos peligrosos con inmovilización de hongo *A. niger*.

Elaborado por los autores.

Se procede a determinar las unidades de color y porcentaje de biorremediación de *Aspergillus niger* inmovilizado en cada uno de los residuos peligrosos estos resultados pueden observarse en la tabla 18 y la figura 23.

Residuos	Abs inicial	Abs final	UFC inicial	UFC final	% de biorremediación
Cristal violeta con inoculo	2,456	2,224	8420.4	8314.3	9.44%
Residuos de colorante	2,158	1,935	7875.1	7310.6	10.33%
Residuos de hipoclorito de sodio	0,089	0,066	287.87	238.63	32.58%
Residuos básicos	0,462	0,333	1518.9	1117.4	35.06%

Cristal violeta sin inocular	2.449	2,309	9,276	8.746.2	5.71%
-------------------------------------	--------------	--------------	--------------	----------------	--------------

Tabla 18 Unidades de color y porcentaje de biorremediación de residuos peligrosos usando inmovilización fúngica.

Elaborado por los autores.

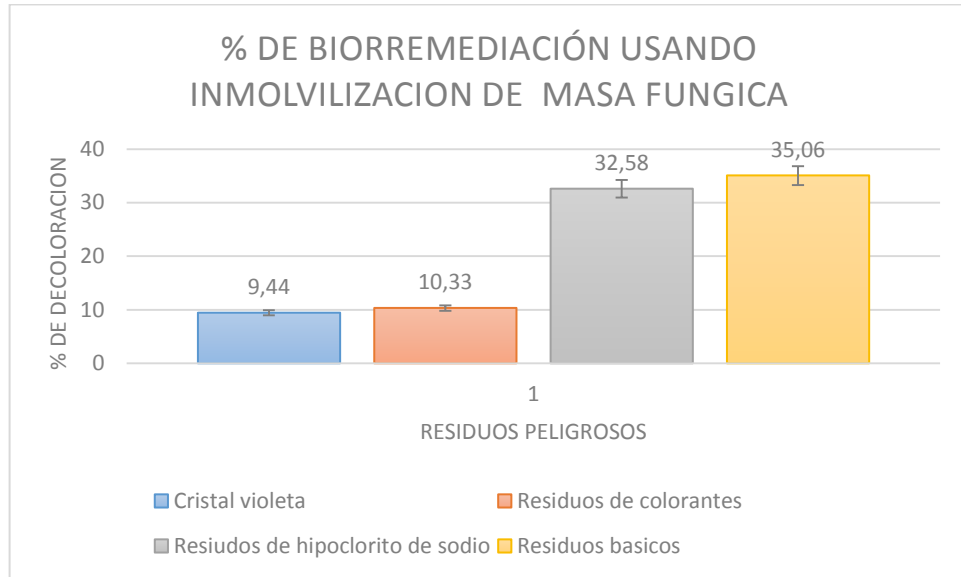


Figura 23 Unidades de color y porcentaje de biorremediación de residuos peligrosos usando *Aspergillus niger* inmovilizado.

Elaborado por los autores.

En la figura 23 se puede observar que el porcentaje de biorremediación fluctuó entre

9.44 y 35.06% obteniéndose resultados mayores de este porcentaje para los residuos básicos de 35.06% y residuos de hipoclorito de sodio de 32.58%

4.3.2 Biorremediación de residuos peligrosos generados utilizando un consorcio bacteriano y microencapsulación del consorcio bacteriano en alginato de sodio.

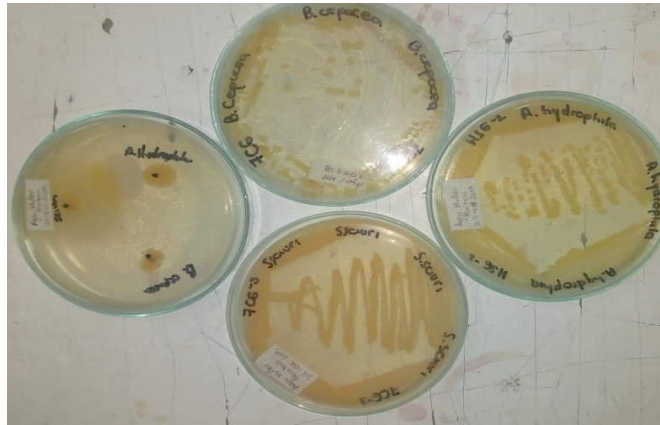


Figura 24 Prueba de antagonismo.

Elaborado por los autores.

Los microorganismos a utilizar en este proceso son *Aeromonas hydrophila*, *Burkholderia cepacea*, *Staphylococcus sciuri*, porque presentaron los mayos halos de decoloración al usar cristal violeta en 50 mg/L. A estos microorganismos se les realizó una prueba de antagonismo (figura 24), donde los microorganismos no se afectaron el crecimiento entre ellos, por lo cual se procede a realizar el consorcio como se planteó en la metodología y el ensayo con los microorganismos microencapsulado.



Figura 25 Microcapsulas de alginato de sodio inoculadas en los residuos

peligrosos.

Elaborado por los autores.

En la figura 25 se observan las microcápsulas obtenidas del consorcio de los microorganismos *Staphylococcus sciuri*, *Burkholderia cepacea* y *Aeromonas hydrophila*, estas son utilizadas para biodegradar los contaminantes, se aprecia la producción de burbujas evidenciando el desarrollo microbiano óptimo en ellas.

A continuación, en células libres, a las 192 horas las absorbancias obtenidas (Tabla 19, Anexo 7) nos permite evidenciar que se obtuvieron los siguientes porcentajes de biorremediación.

% DE BIORREMEDIACIÓN USANDO CÉLULAS LIBRES DE <i>Staphylococcus sciuri</i>, <i>Burkholderia cepacea</i> , <i>Aeromonas hydrophila</i>					
Residuo	2h	4h	6h	24h	192h
Cristal violeta sin inóculo	5,42%	5,56%	5,69%	7,50%	28,55%
Cristal violeta con M1	2,51%	6,45%	12,10%	13,03%	34,60%
Cristal violeta con M2	3,21%	18,04%	27,21%	27,63%	34,54%
Cristal violeta con M4	2,87%	4,61%	5,61%	8,48%	58,42%

Tabla 19 Porcentajes de biorremediación usando células libres de *Staphylococcus sciuri* (M1), *Burkholderia cepacea* (M2), *Aeromona hydrophila* (M4).

Elaborado por los autores.

Se procede a realizar el inóculo de las células libres del consorcio con los 3

microorganismos ensayados anteriormente para degradar los residuos peligrosos, calculándose el porcentaje de biorremediación, a las 2h, 4h, 6h, 24h y 192h horas. (Ver tabla 20 y anexo 8)

Ensayos % de biorremediación del consorcio bacteriano					
RESIDUOS	2h	4h	6h	24h	192h
Cristal violeta con consorcio	4,14%	5,85%	10,59%	12,72%	72,78%
Residuos colorantes consorcio	3,17%	8,28%	8,88%	9,53%	32,78%
Residuos básicos consorcio	10,93%	27,79%	29,47%	30,75%	32,68%
Residuos hipoclorito consorcio	15,06%	43,83%	100%	100%	100%

Tabla 20 Porcentajes de biorremediación de los residuos peligrosos utilizando consorcio bacteriano.

Elaborado por los autores.

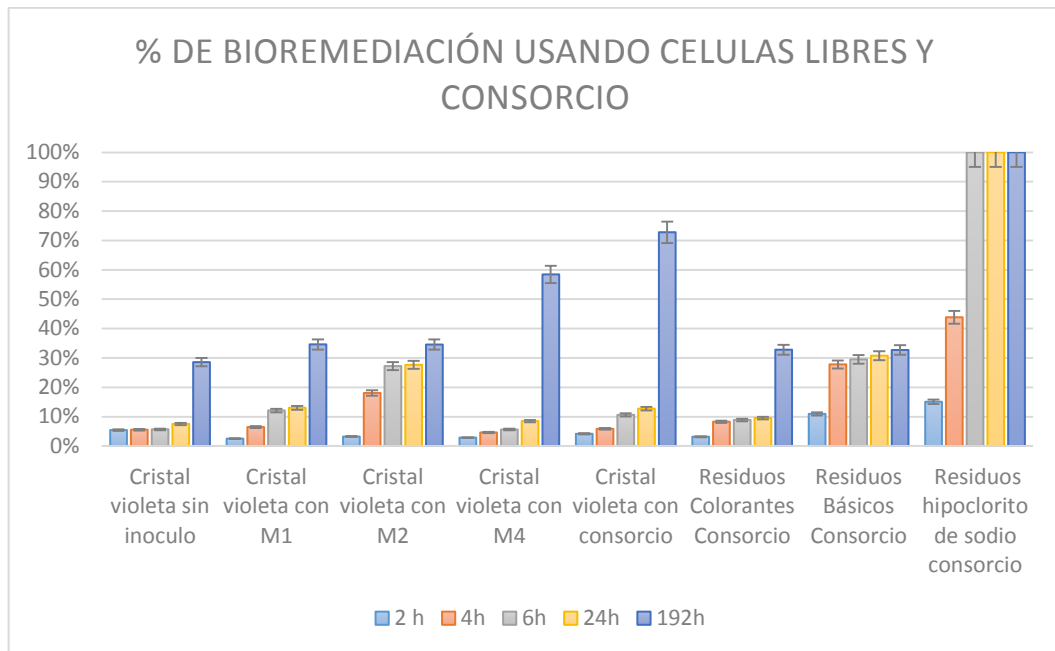


Figura 26 Ensayos de biorremediación en células libres y consorcio bacteriano.

Elaborado por los autores.

En la figura 26 se observa la comparación entre el porcentaje de biorremediación de residuos peligrosos utilizando células libres y consorcio bacteriano, se observa que el residuo de hipoclorito con consorcio, presentaron el mejor porcentaje de biorremediación desde las 6h seguido por el residuo de cristal violeta utilizando el consorcio bacteriano a las 192h, seguido por cristal violeta con M4 a las 192h.

En la siguiente tabla se realiza el inoculo de las microcápsulas de alginato de sodio con el consorcio bacteriano y se establece su potencial de biorremediación a las 192 horas (Tabla 21, Anexo 9).

% De biorremediación usando microencapsulados de consorcio bacteriano				
RESIDUOS	2h	4h	24h	192h
Cristal violeta 200 perlas	9,19%	19,12%	22,79%%	32,09%
Residuos colorantes	1,69%	10,43%	13,95%	26,09%

Residuos básicos	5,14%	18,15%	41,19%	45,52%
Residuos hipoclorito de sodio	4,54%	15,15%	65,15%	100%
Cristal violeta perlas sin inculo	1.47%	3.36%	7.51%	12.7%

Tabla 21 Porcentajes de biorremediación usando microencapsulados de consorcio bacteriano.

Elaborado por los autores.

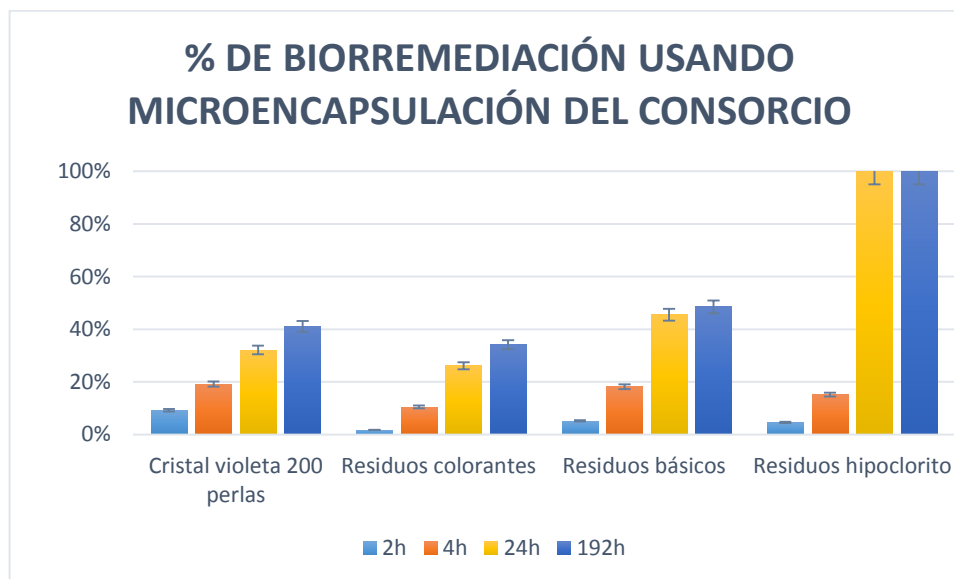


Figura 27 Porcentajes de biorremediación de residuos peligrosos con el consorcio bacteriano microencapsulado.

Elaborado por los autores.

Con la técnica de consorcio bacteriano microencapsulado el mejor resultado se evidenció en residuo de hipoclorito de sodio a las 24h con un valor de 100%, seguido por residuos básicos a las 192h con un valor de % de biorremediación de 45.52%, se utiliza como control cristal violeta con perlas de alginato de calcio sininoculo.

En la tabla 22 se presenta un resumen de los ensayos de biorremediación realizados para los residuos peligrosos:

Muestra	Inmovilización fúngica (% de biorremediación)	Consortio bacteriano en células libres (% de biorremediación)	Microencapsulado de consorcio bacteriano (% de biorremediación)
Cristal violeta	9,44%	72,78%	32.09%
Residuos de colorantes	10,33%	32,78%	26.09%
Residuos básicos	35,06%	32,68%	45.52%
Residuos de Hipoclorito de sodio	32,58%	100%	100%

Tabla 22 Porcentajes de biorremediación obtenida durante los diferentes tratamientos a las 192 horas.

Elaborado por los autores.

Al realizar el ANOVA (95%) no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de biorremediación realizados ($F= 1,941$; $P= 0,199$; $gl=2$) (Anexo 11).

Como ya se mencionó los datos nos demuestran que no hay diferencias significativas en los tres tipos de tratamiento utilizados de biorremediación para los residuos peligrosos generados en los laboratorios de docencia por lo cual podemos rechazar la hipótesis alterna y quedarnos con la hipótesis nula, esto es debido a dos resultados importantes.

Si F es mayor que Valor crítico para F , se rechaza la hipótesis nula, en este caso,

F es menor que el Valor crítico para F, por lo cual podemos decir que la hipótesis nula puede ser utilizada⁷¹.

Si P es menor que 0,05 significa que existe una diferencia significativa en algún tratamiento utilizado es decir las variables están asociadas; pero como P dio mayor que 0,05 podemos decir que la hipótesis alterna es rechazada y utilizar la hipótesis nula es decir las variables no están asociadas⁷².

5. DISCUSIÓN.

En el diagnóstico realizado sobre la generación de residuos en los laboratorios de docencia de la Universidad en el primer período del 2018, se establece que se utiliza el código de colores: rojo, gris y verde, así como se dispone de contenedores rígidos con capacidad de 20L a 40L debidamente etiquetados, con el nombre del residuo a depositar y los pictogramas de riesgo correspondiente tal y como lo exige la legislación^{66, 67, 97, 98}. Los residuos tenidos en cuenta para este estudio fueron, con su respectiva cantidad en litros en promedio los residuos ácidos con 32L, residuos básicos con 16L, residuos de colorantes con 112L y residuos de hipoclorito de sodio con 302L, los cuales, de acuerdo al decreto 4741 del 30 de diciembre de 2005 son considerados peligrosos ya que presentan propiedades corrosivas, reactivas, tóxicas, inflamables e infecciosas, CRETII⁶⁴.

En los residuos ácidos se encuentran como alguno de los posibles residuos presentes ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido clorhídrico (HCl) y ácido fosfórico (H_3PO_4) a diferentes concentraciones, que según su ficha técnica son considerados por su pH tan bajo como corrosivos, reactivos y tóxicos^{64, 97, 98}. Estos residuos ácidos son generados en componentes temáticos prácticos de bacteriología, microbiología, micología y toxicología, donde se disponen en contenedores rígidos debidamente rotulados, según el plan de gestión integral de manejo de residuos^{73, 97, 98}.

En los residuos básicos se encuentran como algunos de los posibles residuos, hidróxido de sodio (NaOH) e hidróxido de potasio (KOH) a diferentes concentraciones, que según su ficha técnica son considerados por su pH tan alto como residuos corrosivos⁶⁴. Los residuos básicos son generados en los componentes temáticos de bacteriología, toxicología, microbiología, micología, química y bioquímica donde se disponen en contenedores rígidos debidamente rotulados cumpliendo el plan de gestión integral de manejo de residuos⁷³.

En los residuos de colorantes se encuentran como algunos de los posibles residuos cristal violeta, safranina, lugol, verde de malaquita, azul de lactofenol, azul de cresil brillante y eosina, a diferentes concentraciones, que según su ficha

técnica son considerados residuos corrosivos, reactivos, tóxicos e inflamable⁶⁴. Los residuos de colorantes son generados en componentes temáticos prácticos de bacteriología, microbiología, hematología, micología, toxicología, bioquímica, donde se disponen en contenedores rígidos debidamente rotulados según, el plan de gestión integral de manejo de residuos⁷³.

Los residuos de hipoclorito de sodio presentan como posible residuo, el hipoclorito de sodio a 5000 ppm (0,5mg/L), que según su ficha técnica es considerado como residuos reactivo⁶⁴. El hipoclorito de sodio es generado en los componentes temáticos donde se utiliza para desinfección, donde se disponen en contenedores rígidos debidamente rotulados cumpliendo el plan de gestión integral de manejo de residuos⁷³.

Al comparar las cantidades generadas se encontró que los residuos peligrosos más generados en los laboratorios de docencia de la Universidad son los residuos de hipoclorito de sodio con una cantidad de 302 L, en promedio, durante el periodo de estudio, debido a su uso en los componentes temáticos prácticos donde se manejan muestras y fluidos biológicos infecciosos.

Los microorganismos aislados de los residuos peligrosos fueron de los residuos básicos el *Aspergillus niger*, de los residuos de colorantes *Burkholderia cepacea* y *Staphylococcus sciuri*; de los residuos de hipoclorito de sodio las bacterias *Aeromonas hydrophila*, *Corynebacterium aquaticum* y el hongo *Penicillium spp*; de los residuos ácidos no se pudo aislar ningún microorganismo, debido a que presentaron un valor de pH de 0,9, el cual no es adecuado para el crecimiento de microorganismos, ya que el pH ideal es el cercano a la neutralidad, 7, de esta manera se argumenta que pHs distintos al rango donde están adaptados los microorganismos pueden dañar su membrana plasmática siendo nocivos para estos⁷⁴.

La *P. aeruginosa*, ha demostrado ser uno de los microorganismos más resistentes y que pueden degradar colorantes en ambientes sumamente tóxicos, un ejemplo de ello es la investigación realizada por Maqbool *et al.*, en el año 2016, donde se

describe la actividad de algunas enzimas importantes en la degradación, como son la azoreductasa, lacasas, tirosinasa y NADH-DCIP reductasa, la cuales son producidas por la bacteria en distintas concentraciones dependientes de la concentración de colorantes y metales pesados, alcanzando un porcentaje de biorremediación de 51,9 y 91.1% y una eliminación del cromo entre un 76.6 y 98.7%, en 180 horas de incubación sobre colorante rojo reactivo 120⁷⁵, o también la investigación planteada por Jing *et al.* en el año 2018, donde obtuvieron porcentajes de biorremediación superiores del 90% de los colorantes negro reactivo 5, rojo congo y azul directo 6, en concentraciones menores de 40 mg/L, donde también se observan las mejores condiciones de biorremediación, que fueron un pH 7.0, temperatura de 35°C y 120 rpm, en un tiempo de 12 horas⁷⁶.

Se resalta que la cepa *P. aeruginosa* ATCC 9027 utilizada en este proyecto, fue suministrada por el cepario de la Universidad, donde se le hizo la caracterización genética y se está realizando la documentación para la acreditación ante la ANLA, Agencia Nacional de Licencias Ambientales.

Se establecieron como mejores bacterias para el proceso de biorremediación el *Staphylococcus sciuri* (M1) con halos de decoloración de 1,8 mm en botón estéril y 2,4mm en Kirby Bauer; *Burkholderia cepacea* (M2) con halos de decoloración de 2,6 mm en botón estéril y 1,25mm en Kirby Bauer; *Aeromonas hydrophila* (M4) con halos de decoloración de 3,25 mm en botón estéril y 1,17mm en Kirby Bauer. El *Corynebacterium aquaticum* (M3) presentó halos de decoloración de 1,4mm en botón estéril y 0,75mm en Kirby Bauer, pero debido a que no superó el valor de halos de decoloración de la cepa utilizada como control de *P. aeruginosa* con halos de decoloración de 2 mm en botón estéril y 3,33mm en Kirby Bauer, además de que en algunas pruebas no logró formar un halo de decoloración no se utilizó en los procesos de biorremediación.

En el año 2011 Aftab *et al.*, aisló bacterias del género *Corynebacterium* spp. estableciendo las condiciones propicias para la degradación del colorante a concentraciones de 100 ug/ml de negro reactivo 5 y amarillo reactivo 15,

obteniendo porcentajes de biorremediación de 68% y 80%, respectivamente en 4 días de tratamiento, a una temperatura de 37°C y pH 7.0⁷⁷. Lo cual indica que el microorganismo aislado en esta investigación si sirve para biorremediar residuos peligrosos como los colorantes, pero por su baja actividad no se selecciona para usarlo en el consorcio bacteriano, también se decide no inocular este microorganismo debido al riesgo de que pueda competir por los pocos nutrientes, no realizar la degradación del colorante y/o tener consecuencias en la degradación de las demás bacterias.

Se estableció como mejor hongo para procesos de biorremediación el *Aspergillus niger* (H2) con una media en sus halos de decoloración de 2 mm en botón estéril y 5mm en Kirby Bauer.

El hongo *Penicillium spp.* (H1) con una media en sus halos de decoloración de 2mm en botón estéril y 3,33mm en Kirby Bauer frente a los valores obtenidos para *A. niger* es menor su valor, pero sirve para biorremediar este tipo de residuos porque en estudios reportados el *Penicillium spp.*, tiene la capacidad de degradar colorantes, como negro reactivo 5 a concentraciones de 50 y 100 ppm, a una temperatura de 25°C y/o temperatura ambiente, logrando porcentajes de biorremediación mayores al 75%, en un tiempo de 7 a 10 días⁷⁵. Se decide escoger el hongo *Aspergillus niger* debido a que su valor de halo de decoloración fue mayor al obtenido por el obtenido en los ensayos con el *Penicillium spp.*

Las técnicas utilizadas para ensayos de biorremediación fueron células libres, consorcio, inmovilización de masa fúngica y microencapsulación de consorcio.

Se evaluaron cada uno de los microorganismos en células libres usando como sustrato cristal violeta, contra un control de cristal violeta sin inculo obteniendo como resultado un porcentaje de biorremediación de 28.55% a las 192h.

Staphylococcus sciuri, biorremedio en un 34.60% a las 192h cristal violeta. Este microorganismo se caracteriza por colonias blanquecinas a cremas, translúcidas, circulares, convexas con margen completo, anaerobio facultativo, no formadora de

esporas, esférico, Gram positivo, inmóvil, facultativo, dispuesto individual o en racimos, el cual ha sido usado en biorremediación gracias a sus propiedades de bioadsorción de metales pesados tóxicos como el cobre, ya que puede adsorber los iones de este metal por medio de grupos funcionales (hidroxilo, carboxilo, amino entre otros) presentes en su membrana celular, en un proceso llamada bioadsorción⁷⁶.

El *Staphylococcus sciuri* es una bacteria resistente a metales pesados debido a que ha sido aislada del embalse de la reserva del río Marinduque en Filipinas el cual fue contaminado con residuos de la minería. La remoción del cobre fue mejor a un pH de 2 a 4 debido a la desprotonación del fosfato donde los grupos funcionales de su membrana tienden a perder hidrogeniones y a captar cationes de cobre con los cuales competían⁷⁶. En este proyecto fue aislado de residuos de colorantes, donde se encontró en un pH entre 3 a 3.5, demostrando ser un microorganismo tolerante a ambientes tóxicos.

Burkholderia cepacea biorremedió en un 34.54% a las 192h cristal violeta. Es un bacilo aeróbico Gram negativo no fermentador que produce unidades formadoras de colonias translúcidas, brillantes, de consistencia blanda, con bordes definidos y lisos, algunas con producción de pigmento amarillo⁷⁷.

Este microorganismo también puede bioadsorber y biorremediar colorantes y/o metales pesados como en el estudio donde se inmovilizó en Eucalipto vivo, usando hojas molidas, las cuales se inocularon con *Burkholderia cepacea* al 5% (v/v) mediante centrifugación, las cuales se consideraron inmovilizadas al estar dentro o en la superficie del eucalipto vivo, estos fueron inoculados en verde de malaquita en concentraciones de 60 mg/l y cromo en concentraciones de 20 mg/l, demostrando que podía biorremediar el 94.8% de verde de malaquita y el 71,9% de Cr en 36 horas⁷⁸.

Estos porcentajes de biorremediación fueron más altos que cuando se usó en forma individual obteniendo para el verde de malaquita una biorremediación del 90,7% y para el cromo de 55,7%. Usando células libres de este microorganismo

se obtuvo una biorremediación del 26.2% para verde de malaquita y 24.2% para Cr. En este estudio se observa la ventaja de inmovilizar microorganismos usando un material encapsulante. No se encontraron compuestos intermedios de la biodegradación como 4-dimethylamino benzofenona entre otros productos de procesos de dimetilización y hidroxilación⁷⁸.

Aeromonas hydrophila biorremedió en un 58.42% a las 192h el cristal violeta. Este microorganismo se caracteriza por ser un bacilo Gram negativo, motil, en forma de barra, oxidasa positiva, fermentador de glucosa e indol negativo, el cual puede causar infecciones en el ser humano debido a que puede residir dentro del pescado⁷⁹, Puede ser encontrado también en plantas de tratamiento de aguas residuales de la industria textil donde se ha demostrado que existen cepas de este microorganismo que pueden degradar colorantes en concentraciones de 50 mg/l hasta en un 90% de biorremediación en 10 horas, para esto se aisló e identifico una cepa (SJ4) que fue inoculada al 1% (v/v) en 100 ml de MSM con 100 mg/l de colorante cristal violeta donde se tomaron muestras de absorbancia a 620 nm para medir el crecimiento de la bacteria y después de centrifugada a 590 nm para después ser expresada en porcentaje de biorremediación⁸⁰.

Se obtuvieron lecturas a las 2,4,6 y 8 horas obteniendo un porcentaje de biorremediación del 99% a un pH de 7, y un porcentaje de biorremediación del 9% a un pH de 5⁸⁰. La temperatura donde se alcanzó el porcentaje de biorremediación del 97% fue a 35 °C, y la biorremediación del 83% se obtuvo a una temperatura de 30°C, donde esta última es la más cercana a la usada en este trabajo de investigación siendo 20 a 25°C, Además se expone que a altas concentraciones (mayor a 200 mg/l) debido a la toxicidad del cristal violeta las bacterias pierden la capacidad de degradar los colorantes debido a la toxicidad de las moléculas del colorante o el bloqueo de los sitios activos de las enzimas, al final se demuestra que *Aeromonas hydrophila* también es capaz de reducir la toxicidad del cristal violeta.⁸⁰, también se puede destacar a Cherriaa et. al. en el año 2012 aislando el microorganismo de lodo activado y posteriormente realizando pruebas de

biorremediación de cristal violeta y verde de malaquita obteniendo entre el 91-99% de biorremediación en 2h. de tratamiento⁹.

Además de establecer cuales microorganismos tienen mayor porcentaje de biorremediación, para la realización de un consorcio bacteriano, se realizaron pruebas de antagonismo, donde no se observó inhibición, deterioro o muerte de algunas de las bacterias por acción de otra indicando que si se pueden usar en un consorcio.

El consorcio diseñado en este trabajo conformado por *S. sciuri*, *B. cepacea* y *A. hydrophila*, al ser usado para biorremediar los residuos peligrosos presento como porcentajes de biorremediación de cristal violeta un 72,78% en 192h, de residuos de colorantes un 32,78% en 192h, de residuos básicos un 32,68% en 192h y de residuos de hipoclorito de sodio el 100% en 192 h. Estableciéndose que el uso del consorcio bacteriano tiene la capacidad de biorremediar los residuos peligrosos, con valores entre 70% hasta 100% de biorremediación.

El hipoclorito de sodio es un compuesto químico fuertemente oxidante que contiene un compuesto activo en forma de ácido hipocloroso el cual actúa como agente desinfectante, como se puede ver en el trabajo desarrollado por Cote C. en el año 2006, donde describe la existencia de microorganismos cloro resistentes como *A. hydrophila*, la cual resistía concentraciones de hasta 2mg/L de hipoclorito de sodio en un tiempo de 10 minutos, demostrándonos de esta manera que esta bacteria se adapta a las condiciones de estos residuos donde en su gran mayoría existe la sustancia de hipoclorito de sodio en concentraciones de 5000 ppm es decir 0.5mg/L, por lo cual puede ser aislada de estos residuos, tal y como lo demostró este proyecto⁸¹, además al ser combinada con *S. sciuri* y *B. cepacea* mejora su acción, ya que se combinan metabolismos y se estimula la acción de enzimas para degradar este contaminante.

Con el consorcio bacteriano microencapsulado en alginato de calcio se encontró que hay un porcentaje de biorremediación de hipoclorito de sodio del 100% en 192h, igual al porcentaje de biorremediación obtenido cuando se usó el consorcio

bacteriano en células libres, proceso que ocurre por la combinación de metabolismos y enzimas y la protección dada por la microencapsulación en alginato de calcio, protegiéndolos de las condiciones ambientales adversas dados por el hipoclorito de sodio. La microencapsulación y el consorcio permite a los microorganismos aumentar su promedio de viabilidad y mantenerse en condiciones donde normalmente existiría una muerte celular^{9, 82}.

La microencapsulación en alginato de calcio presento un porcentaje de biorremediación para el cristal violeta del 32.09% en 192h, para los residuos de colorantes del 26.09% en 192h y para los residuos básicos del 45.52% en 192h, aunque es usado el mismo consorcio bacteriano en las mismas condiciones y tiempo, se pudo observar que el consorcio bacteriano en células libres obtuvo mejores porcentajes de biorremediación.

Esto es debido principalmente a que el alginato de calcio es un material encapsulante muy poroso, de baja durabilidad química y que en pH bajos puede tener muy poca estabilidad física, debido a que estos pHs ácidos reducen el peso molecular del alginato causando su degradación y produciendo fugas^{83, 84}, además de que en concentraciones inferiores a 3% puede llegar a tener formas irregulares y que por su porosidad pueden obtenerse concentraciones inferiores de células libres del consorcio, por lo cual las células libres pueden estar siendo liberadas en cantidades ineficientes al medio contaminante⁸⁴.

Una de las desventajas más grandes de la microencapsulación en alginato de calcio, es su limitación en cuanto a la cantidad de degradación permitida, esto es debido a que los microorganismos no están en contacto directo con el medio exterior, por lo cual el tamaño del poro tiende a limitarlos en la cantidad de residuos que pueden entrar y la cantidad de enzimas producidas que pueden salir, dividiendo de esta manera la biodegradación en dos partes, una interna y otra externa⁸⁵, este tamaño puede ser influenciado por factores como, la concentración del alginato, la concentración del cloruro de calcio, el tamaño de poro de la jeringa utilizada, el pH y la temperatura⁸⁵.

Por estas razones se ha decidido recubrir al alginato de calcio en materiales como quitosano o poliuretano entre otros desarrollando mezclas binarias, con el fin de controlar un poco más el contacto de los microorganismos encapsulados con el medio exterior^{82, 84}, un ejemplo importante de una mejor resistencia en ambientes de pH bajo por parte de la microencapsulación con alginato de sodio es adicionando, gel de acilo, donde se pudo mantener a *Lactobacillus delbrueckii* en un 57% de viabilidad en ambientes simulados de jugos gástricos de pH 1.2 y 1.5 a un tiempo de exposición de 180 minutos, de esta manera eliminando las desventajas del uso del alginato de calcio por si solo⁸². Se necesitan estudios moleculares para la identificación de cepas que tengan mejores porcentajes de biorremediación frente a sus homologas del mismo género y/o especie.

En este estudio realizado se estableció que la microencapsulación del consorcio bacteriano sirvió para biorremediar los residuos peligrosos generados en los laboratorios de docencia de la universidad con valores entre 26.09% y un 100%, siendo mejor el resultado para los residuos básicos y los residuos de hipoclorito de sodio.

El método de inmovilización de biomasa fúngica, utilizando *A. niger* presento un porcentaje de biorremediación para cristal violeta de 9,44% en 192h, para los residuos de colorantes de un 26,09% en 192h y para los residuos básicos 35,06% en 192h, obteniéndose el mayor valor de porcentaje de biorremediación en el tratamiento de residuos básicos, esto debido a que el *A. niger* fue aislado de estos mismos residuos y se podría establecer que estaba adaptado para este ambiente y sus condiciones.

El *A. niger*, fue escogido por su potencial en biorremediación y se trabajó solo en la inmovilización fúngica. Al principio tiende a tener una coloración blancuzca, pero con el tiempo puede ponerse de color carmelita oscuro o negro, de textura granulenta plana y granular; microscópicamente con cabezas conidiales radiadas, con conidióforos lisos, hialinos y vesículas globosas o casi globosas que producían fialides alrededor además de conidios globosos oscuros de color

marrón o negros⁸⁷, características observadas en el hongo aislado en esta investigación.

El *A. niger* se ha utilizado para fines biotecnológicos debido a su gran producción de enzimas, las cuales son usadas para biorremediación de colorantes tipo azo⁴⁸. Con este tratamiento el porcentaje de biorremediación para cristal violeta y residuos de colorantes fue de menos del 10%, debido al pH de 3 a 3.5, resultados que se relacionan con la investigación realizada por Peña C y Tobon YV (2006), donde *Aspergillus spp.* fue capaz de adaptarse hasta un pH de 3.83⁸⁸, de tal manera podemos inferir que esta inmovilización del hongo en el soporte inerte de poliuretano permitió al hongo adaptar su micelio al material encapsulante, pero por ser poroso no lo protegió de una manera efectiva frente a los ambientes tóxicos con estos pH bajos, pero aun así permitió que existiera una biorremediación del colorante⁸⁸.

También se destaca el uso de este género como *A. fumigatus* en el 2017 por Kalyane P. *et al*, quienes demostraron su capacidad para biorremediar colorantes como el verde de malaquita en un 60% y rojo Congo en un 90% después de 5 días de incubación a una temperatura de 35°C, observándose un incremento en el porcentaje de biorremediación en un pH de 7 a 9⁸⁹.

Al comparar los resultados obtenidos en el uso de los métodos de biorremediación utilizados en este trabajo podemos concluir que el mejor tratamiento para biorremediar residuos de pH bajo como cristal violeta y residuos de colorantes, es el consorcio bacteriano, debido a su contacto directo y a la capacidad de una combinación de metabolismos que desarrollan una producción multienzimática y de esta manera logran biorremediar mejor estos residuos, destacándose que dos de las tres bacterias que conforman el consorcio bacteriano se aislaron de los residuos tratados, es decir que estaban adaptadas a las condiciones y ambientes tóxicos, como las de los residuos de hipoclorito de sodio los cuales fueron biorremediados en un 100% por los métodos realizados por el consorcio bacteriano en células libres y microencapsulado. También se observó que en pHs

altos también biorremedió los residuos básicos en un 45%, usando la microencapsulación de consorcio.

Por lo cual se propone el consorcio bacteriano para tratar residuos ácidos y residuos básicos y el consorcio microencapsulado para tratar residuos básicos, como la mejor alternativa para biorremediar. Adicionalmente se requiere seguir estudiando los microorganismos aislados e identificados en esta investigación implementando otros materiales de microencapsulación e inmovilización para aumentar los porcentajes de biorremediación de los microorganismos sobre los residuos, con el fin de desarrollar un producto que pueda ser utilizado en la realización de un pretratamiento de los residuos peligrosos generados en los laboratorios de docencia de la Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.

6. CONCLUSIONES.

1- El diagnóstico realizado en los laboratorios de docencia donde se generan residuos peligrosos para el primer período de 2018, evidenció, que los contenedores con una mayor cantidad de residuos producidos son los contenedores con los residuos ácidos con valor de 32 Litros, residuos de colorantes 112 Litros, residuos de hipoclorito de sodio 302 Litros y residuos básicos 10 Litros. Los residuos se consideran peligrosos porque cumplen con las características de corrosivo, reactivo, explosivo, tóxico, inflamable e infeccioso (CRETII) y ejemplifican la gran cantidad de residuos generados y la necesidad de la realización de un pre-tratamiento efectivo y menos costoso como el planteado

2- Se aislaron e identificaron 5 microorganismos de los residuos peligrosos de los cuales se obtuvieron cuatro bacterias, *Staphylococcus sciuri*, *Corynebacterium aquaticum*, *Aeromonas hydrophila* y *Burkholderia cepacia*, y se obtuvieron dos hongos *Aspergillus niger* y *Penicillium spp*, estos microorganismos se adaptan a las condiciones tóxicas y presentan un potencial de biorremediación frente a los residuos peligrosos.

3- Las células libres de *Aeromonas hydrophila* presentaron un 58,42% de biorremediación de cristal violeta, el consorcio bacteriano en células libres presentó un 72,78% de biorremediación de este colorante a las 192 horas, estas presentan un mejor desempeño biorremediando los residuos peligrosos de características ácidas. El ensayo de biorremediación con microcápsulas del consorcio bacteriano conformado por *Staphylococcus sciuri*, *Aeromonas hydrophila* y *Burkholderia cepacia*, obtuvo un 45,52% de biorremediación de residuos básicos, a las 192 horas por lo cual se establece que el alginato si confiere una protección adicional al consorcio obteniendo un mayor porcentaje de biorremedación de residuos básicos además de demostrar el uso óptimo del alginato y su estabilidad en residuos peligrosos de características neutras y básicas.

4- El *Aspergillus niger* inmovilizado presentó un 35.06% de biorremediación de los

residuos básicos a las 192h y del hipoclorito de sodio el 100% por medio de la microencapsulación en alginato de calcio del consorcio y el consorcio bacteriano a las 192 horas, por lo cual se deduce que los microorganismos nativos logran una mejor adaptación a las condiciones tóxicas de los residuos peligrosos y los biorremedian.

5- Se realizó el proceso de biorremediación con los microorganismos aislados e identificados de los residuos peligrosos generados en los laboratorios de docencia observándose según el ANOVA (95%) realizado que no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos de biorremediación ensayados ($F= 1,941$; $P= 0,199$; $gl=2$), por lo cual se pueden utilizar células libres de estos microorganismos, el consorcio bacteriano, el inmovilizado del hongo y las microcápsulas del consorcio bacteriano para lograr la biorremediación de residuos peligrosos generados en los laboratorios de docencia de la universidad.

7. RECOMENDACIONES

- 1- Implementar el consorcio bacteriano en células libres, el microencapsulado bacteriano y el hongo inmovilizado para biorremediar los residuos generados en los laboratorios de docencia y laboratorios similares donde se generen este tipo de residuos.
- 2- Realizar la caracterización genética de los microorganismos aislados para confirmar su género y especie.
- 3- Hacer análisis cromatográfico de los metabolitos generados en el proceso de biorremediación.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Jones JJ, Falkinham, JO. Decolorization of malachite green and crystal violet by waterborne pathogenic mycobacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*.2003; 47(7): 2323-2326.
2. Liberto R, Saparrat MC. Crecimiento y habilidad decolorante potencial de *Hyphomycetes* (*Deuteromycetes*) de Río Santiago sobre medio agarizado suplementado con cromóforos sintéticos. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. 2005;40 (3-4): 145-150.
3. Daneshvar N et al. Biological decolorization of dye solution containing Malachite Green by microalgae *Cosmarium* sp. *Bioresource technology*. 2007; 98(6) :1176-1182.
4. Quintero RLA, Cardona S A. "Tecnologías para la decoloración de tintes índigo e índigo carmín." *Dyna*.2010; 77(162):371-386. 371-386 2346-2183 0012-7353.
5. Shimizu E, et al. "Relación entre degradación de colorantes y oxidación de lignina residual causados por *Ganoderma applanatum* y *Pycnoporus sanguineus* en el licor negro kraft." *Revista de Ciencia y Tecnología*. 2009; 12: 46-51.
6. Cardona M, Osorio J, Quintero J. "Degradación de colorantes industriales con hongos ligninolíticos." *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia*. 2009; 48: 27-37.
7. Osorio EJ, Vidal BA, Quintero DJ. "Decoloración de aguas residuales textiles utilizando el hongo ligninolítico anamorfo R1 de *Bjerkandera* sp." .2011.
8. Cheriaa J, et al. "Removal of triphenylmethane dyes by bacterial consortium." *The Scientific World Journal*. 2012.
9. Cheng Y, et al. "Biodegradation of crystal violet using *Burkholderia vietnamiensis* C09V immobilized on PVA–sodium alginate–kaolin gel beads." *Ecotoxicology and environmental safety*.2012; 83: 108-114.
10. Chanagá VX et al. "Native fungi with industrial dye degrading potential in the

Aburrá valley, Colombia." Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín.2012; 65(2): 6811-6821.

11. Juárez R M E. Tratamiento de efluentes generados por la industria textil, aplicando sistemas biotecnológicos, químicos y electroquímicos. Diss. 2012.

12. Pucci OH, Adrián A, Pucci GN. "Biodegradation Waste of the Stations Service by *Rhodococcus erythropolis* ohp-al-gp." Acta Biológica Colombiana.2013; 18.(2): 251-258.

13. Jaramillo A, et al. "Obtención de un inóculo fúngico para la degradación de un colorante azo por fermentación en estado sólido." Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica. 2014; 17(2) .

14. Huachi L, Macas Á, Méndez G. "Biodegradación de los fenoles presentes en el extracto de guarango (*caesalpinia spinosa*) y en los colorantes índigo carmín, naranja ii y rojo fenol a través de *trametes versicolor* y *aspergillus niger*." La Granja 2014;20(2): 29-35.

15. Kabbout R, Taha S. "Biodecolorization of textile dye effluent by biosorption on fungal biomass materials." Physics Procedia.2014;55: 437-444.

16. Rojas J, Hormaza A. "Evaluación de la biodegradación del colorante azul brillante utilizando hongos de la podredumbre blanca y sus consorcios." Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica. 2016;2(1): 179-187.

17. Sandoval VH, González CJ. "aislamiento de microorganismos con potencial para la degradación de colorantes textiles." jóvenes en la ciencia.2017;3(2): 137-142.

18. Ortega LC, Nieto RM, Hernández CE. Aplicación de lacasas producidas por hongos para degradación de colorantes microbiológicos (*orceína* y *crystal violeta*). jóvenes en la ciencia.2015; 1(2) 633-637.

19. Múnera JF , Oquendo AE , Rodríguez RD, Marín GM. Remoción de colorantes reactivos empleando el hongo *Bjerkandera adusta*. Informador técnico. 2017;

81(2): 142-150.

20. Loredó A, Argüello A, Rodríguez-Herrera R, Gutiérrez-Sánchez G, Escamilla A, & Aguilar C. Fungal biodegradation of rigid polyurethane. *Química Nova*. 2017 40(8):885-889.

21. Angulo E, Castellar G, Cely M M, Ibáñez L & Prasca L. Decoloración de aguas residuales de una industria de pinturas por la microalga *Chlorella* sp. *Revista MVZ Córdoba*. 2017; 22(1): 5706-5717.

22. Vacca-Jimeno VA, Angulo-Mercado ER, Puentes-Ballesteros DM, Torres-Yépez JG, & Plaza-Vega ME. Uso de la microalga *Chlorella* sp. viva en suspensión en la decoloración del agua residual de una empresa textil. *Prospectiva*. 2017; 15(1): 93-99.

23. Flórez MC, Betancur MQ, Ciro MJ & Betancur SM. Biorremediación del Colorante Negro Azoico por Levadura Inmovilizada en Gelatina. *Ingenierías USBMed*. 2018; 9(1): 30-38.

24. Salazar-Huerta MA, Velázquez-García A, Juárez-Ramírez C, Santoyo-Tepole, F., Ruíz-Ordaz N, & Galíndez-Mayer J. EVALUACIÓN comparativa de la biodegradación del ácido sulfanílico por cultivos puros. *Gestión integral de residuos o desechos peligrosos*. Ministerio de ambiente Vivienda y Desarrollo Territorial

25. Cortés RJ. Plan piloto de manejo de residuos peligrosos (RESPEL) para las estaciones de servicio (EDS) de los departamentos del Valle del Cauca y el Cauca-Colombia (Bachelor's thesis, Universidad Autónoma de Occidente). 2011.

26. Granados R, & Villaverde C. Bacteriología, características y clasificación bacteriana, virología, características y técnicas bioquímicas. *Microbiología*, 1 2003.

27. Barrios Ziolo LF, Gaviria RL, Agudelo EA. Tecnologías para la remoción de colorantes y pigmentos presentes en aguas residuales. Una revisión. *Dyna*, 2015; 82(191): 118-126.

28. Quintero L, Cardona S. Technologies for the decolorization of dyes: indigo and indigo carmine. *Dyna*. 2010; 77(162): 371-386.
29. Calderón JD. Fundamentos microbiológicos. Enfermedades infecciosas en ginecología y obstetricia. 2018;3.
30. Cuenca VJ. Utilidad de los índices eritrocitarios, frotis de sangre periférica y ferritina como pruebas diagnósticas laboratoriales de anemia ferropénica en adultos mayores del Barrio Obrapia (Bachelor's thesis). 2015
31. López JL, Hernández DM, Colín Castro C, Ortega PS, Cerón GG, Franco CR. Las tinciones básicas en el laboratorio de microbiología. 2015.
32. Vázquez C, Martín A, de Silóniz MI, Serrano S. Técnicas básicas de Microbiología. Observación de bacterias. *Reduca (Biología)*. 2011;3(5).
33. Torres JS, Cerón LF, Sánchez LP, Mendoza ÁJ , Bernal SI Microfotografía: generalidades en la matriz extracelular, colágeno y piel. *Morfología*. 2018; 10(3): 26-46.
34. Quiminet.com [Internet]. México D.F. [25 de Octubre de 2012; 10 de Octubre de 2018], QuimiNet, Disponible en: <https://www.quiminet.com/articulos/acidos-y-bases-sustancias-basicas-en-la-quimica-2875121.htm>
35. Jones JJ, Falkinham JO. Decolorization of malachite green and crystal violet by waterborne pathogenic mycobacteria. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2003;47(7). 2323-2326.
36. Palau EC. "Digestión anaerobia de residuos de biomasa para la producción de biogás. Fundamentos." 2016.
37. Secretaria distrital de hábitat. Guía técnica para el aprovechamiento de residuos orgánicos a través de metodologías de compostaje y lombricultura.2014 [Internet]. [Consultado 20 septiembre 2018]. Disponible en: http://www.uaesp.gov.co/images/Guia-UAESP_SR.pdf
38. Garbisu C, Amézaga I, Alkorta I. Biorremediación y ecología. *Revista*

Ecosistemas.2002; 11(3).

39. Osorio J, Quintero JC. Decoloración del colorante industrial Turquesa Erionyl con el hongo de la pudrición blanca de la madera *Bjerkandera* sp. R1. Revista Técnica de la Facultad de Ingeniería Universidad del Zulia.2018; 41(1): 32-40.

40. Cortazar MA, González RA. Coronel OC, Escalante LJ, Castro RJ, Villagómez JR. Biotecnología aplicada a la degradación de colorantes de la industria textil. Universidad y ciencia.2012;28(2): 187-199.

41. Delgado KT, Montoya TZ. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. Facultad de Mina. Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Trabajo de grado para optar el título de Ingeniería Química.2009.

42. Castellanos J, Hernández Y, Trujillo J. Biorremediación. [Internet]. [Consultado 4 abril 2012]. Disponible en: <http://microbiologia3bn.blogspot.com.co/2012/05/>

43. Leahy JG, Colwell RR. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiology and Molecular Biology Reviews.1990;54(3): 305-315.

44. Romero SE, Bustos D C, Marín A M, Rodríguez C Z, Casallas M L, Vargas P C. Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por *Pseudomonas* en suelos contaminados por hidrocarburos. Nova.2008; 6(9): 76-84.

45. Haigler BE, Pettigrew CA, Spain JC. Biodegradation of mixtures of substituted benzenes by *Pseudomonas* sp. strain JS150. Appl. Environ. Microbiol.1992 58(7): 2237-2244.

46. Parshetti GK, Parshetti SG, Telke AA, Kalyani DC, Doong RA, Govindwar SP. Biodegradation of crystal violet by *Agrobacterium radiobacter*. Journal of Environmental Sciences.2011;23(8):1384-1393.

47. Yang J, Yang X, Lin YNg TB, Lin J Ye X. Laccase-catalyzed decolorization of malachite green: performance optimization and degradation mechanism. PloS

one.2015; 10(5):e0127714.

48. Arnáiz FC, Isac OL, Lebrato MJ. Determinación de la biomasa en procesos biológicos. I Métodos directos e indirectos. Tecnología del agua.2000; 20 (205): 45-52.

49. Cardona M, Osorio J, Quintero J. Degradación de colorantes industriales con hongos ligninolíticos. Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia.2009 (48): 27-37.

50. Gutiérrez B M, Droguet M. La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor. Gutiérrez, MC; Droguet, M." La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: identificación de compuestos causantes de mal olor". Boletín Intexter.2002; 122: 35-41.

51. Scragg A, Biotecnología para ingenieros sistemas biológicos en procesos tecnológicos, Balderas 95. México D.F, limusa s.a de cv grupo noriega editores, 1997.

52. Cayra E, Dávila JH, Villalta JM, Rosales Y. Evaluación de la Estabilidad y Viabilidad de Dos Cepas Probióticas Microencapsuladas por Lecho Fluidizado. Información tecnológica. 2017;28(6): 35-44.

53. Çabuk B, Harsa Ş T. Improved viability of *Lactobacillus acidophilus* NRRL-B 4495 during freeze-drying in whey protein-pullulan microcapsules. Journal of microencapsulation.2015; 32(3): 300-307.

54. Desai KG, Liu C, Park HJ. Characteristics of vitamin C encapsulated tripolyphosphate-chitosan microspheres as affected by chitosan molecular weight. Journal of microencapsulation.2006; 23(1): 79-90.

55. Parra H R. Food microencapsulation: a review. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín.2010; 63(2): 5669-5684.

56. Natalia D A, Ramírez L A, Villadiego O S, Campuzano O I. Técnicas para la

microencapsulación de probióticos y el impacto en su funcionalidad: una revisión. *Alimentos Hoy*.2015; 23(36): 112-126.

57. Ding WK, Shah NP. Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. *Journal of Food Science*.2009;74(2): M100-M107.

58. Burgain J, Gaiani C, Linder M, Scher J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of food engineering*.2011; 104(4):467-483.

59. Flores–Belmont IA, Jiménez–Munguía MT. Microencapsulación de compuestos activos con quitosano. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*.2013; 7(1): 48-56.

60. Maya Z, María A. Residuos peligrosos en Colombia 2016: Caracterización y análisis normativo para su adecuada gestión.2018

61. Colombia. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Decreto 4741 del 2005, por el cual se reglamenta parcialmente la prevención y manejo de los residuos y desechos peligrosos en el marco de la gestión integral. *Diario Oficial*, 46137 (Dic. 30 2005). Disponible en:

<http://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=18718>

62. Colombia. Instituto de Hidrología, meteorología y estudios ambientales (IDEAM). Resolución 0062 del 2007, marzo 30, por la cual se adoptan los protocolos de muestreo y análisis de laboratorio para la caracterización fisicoquímica de los residuos o desechos peligrosos en el país. Bogotá: 2007. (*Diario oficial*, número 46.703 de Julio 28 de 2007) Disponible en: <https://app.vlex.com/#vid/43247311>

63. IDEAM, Informe Nacional de Residuos o Desechos Peligrosos en Colombia. 2016 Bogotá DC. 128 paginas

64. Colombia. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Decreto 2115 del 2007, por el cual se reglamenta parcialmente la prevención y manejo de los residuos y desechos peligrosos en el marco de la gestión integral. *Diario*

Oficial, 46137 (Dic. 30 2005). Disponible en:

<http://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=18718>

65. Resolución 631 de 2015. Por la cual se establecen los parámetros y los valores límites máximos permisibles en los vertimientos puntuales a cuerpos de aguas superficiales y a los sistemas de alcantarillado público y se dictan otras disposiciones. (Diario oficial número 49.486 de 18 de abril de 2015) Disponible en:https://www.icbf.gov.co/cargues/avance/docs/resolucion_minambienteds_0631_2015.htm

66. Ortiz H. María Laura. Principios y aplicaciones de la Biotecnología. Universidad Autónoma del estado de Morelos. México.2006.

67. Pedroza, A., Quevedo-Hidalgo, B. y Matiz, A. 2007. Manual de laboratorio de procesos biotecnológicos. Primera edición. Colección de apuntes, Editorial Pontificia Universidad Javeriana. ISBN: 978-958-716-029-1.

68. Botero M, Salazar OA, Mendez JA. Método anova utilizado para realizar el estudio de repetibilidad y reproducibilidad dentro del control de calidad de un sistema de medición, Scientia et Technica Año XIII, [Internet].2007. [Citado el 05 de diciembre de 2018]. Vol. 1, Núm. 37 pag 533 – 537. Disponible en: <http://revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/view/4181/2141>

69. Avila J. [PDF] Pruebas de Hipótesis-ANOVA – Zenodo. [Internet]. 18 de agosto de 2016. [Citado el 05 de diciembre de 2018]. Disponible en: <https://zenodo.org/record/60501/files/anova.pdf>

70. Rubio M, Berlanga V. Cómo aplicar las pruebas paramétricas bivariadas t de Student y ANOVA en SPSS. Caso práctico. REIRE. [Internet]. 2012. [citado el 05 de diciembre de 2018]. Vol. 5, núm. 2, pag 83 – 100. Disponible en: <http://revistes.ub.edu/index.php/REIRE/article/view/reire2012.5.2527/4082>

71. López Casas J, Olivera Martínez E, Rey Benito J, Manual de Gestión Integral de Residuos CODIGO: MNL-A05.002.0000-001 VERSIÓN 00. República de Colombia Instituto Nacional de Salud. [Internet], [Citado 15 de febrero de 2019].

Disponible en:
<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/manual-gestion-integral-residuos.pdf>

71. Apella MC, Araujo PZ. Microbiología de agua. Conceptos básicos. Solar Safe Water [Internet], [Citado 23 de septiembre de 2018]. Chapter 2. Pag 33- 50. Disponible en: <http://www.ine.es/normativa/leyes/incinor.htm>

72. Maqbool Z et al. Use of RSM modeling for optimizing decolorization of simulated textile wastewater by *Pseudomonas aeruginosa* strain ZM130 capable of simultaneous removal of reactive dyes and hexavalent chromium. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016. Vol 23 No 11, pag 11224–11239.

73. Jing W et al. Decolorization and Degradation of Direct Blue 6 from textile wastewaters by *Pseudomonas aeruginosa* HS-DY012. *Advances in Engineering Research*. 2018. vol 120. pag 1355 – 1359.

74. Aftab U et al. Decolourization and Degradation of Textile Azo Dyes by *Corynebacterium* sp. Isolated From Industrial Effluent. *Pakistan J. Zool*. 2011. vol. 43, No. 1, pag 1-8.

75. Salas MC, Morales I, Terrazas E. Capacidad decolorativa de *Corioloopsis polyzona*, *Pycnoporus* sp. Y *Penicillium* sp. Sobre Reactive Black 5 a diferentes condiciones de cultivo. *BIOFARBO*, 2012. Vol. 20. No. 1. Pág. 41-48.

76. Robidillo CJ, Villarante NR, Trinidad LC. Biosorption of copper (II) by live biomasses of two indigenous bacteria isolated from copper-contaminated water, *Philippine Science Letters* [Internet], 2014, Vol. 7 No. 2. pag 356- 372.

77. Araque et al. Identificación bioquímica y PCR especie-específica de cepas de *Burkholderia cepacea* de origen hospitalario y ambiental en Venezuela, *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* v.28 n.2 Caracas dic. 2008.

78. Gan L, Zhou F, Owens G, Chen Z. *Burkholderia cepacea* immobilized on eucalyptus leaves used to simultaneously remove malachite green (MG) and Cr (VI). *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 172 (2018). pag 526–

531. 79. Rahayu Kusdarwati et al. IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci. (2017). 55. 012038.
80. Bharagavaa RN, Mania S, Mullab SI, Saratalec GD. Degradation and decolourization potential of an ligninolytic enzyme producing *Aeromonas hydrophila* for crystal violet dye and its phytotoxicity evaluation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 156. (2018). pag 166–175.
81. Cote CR. Aislamiento, identificación bioquímica y pruebas de cloro resistencia in vitro a cepas nativas de coliformes totales y *E. coli* obtenidas en la red de distribución del acueducto de Bogota. [Trabajo final de grado en Internet]. [Bogota]: Pontifica Universidad Javeriana, 2006 [citado 31 de marzo de 2019]. Disponible en:
<https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8264/tesis248.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
82. Gonzalez RE, et al. Efecto de la Microencapsulación sobre la Viabilidad de *Lactobacillus delbrueckii* sometido a Jugos Gástricos Simulados. *Inf. tecnol*. 2015. vol.26 No. 5. Pag. 11-16.
83. Reyes MA, et al. Inmovilización de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo crudo en matrices orgánicas naturales y sintéticas. *Rev. Int. Contam. Ambie*. Vol. 34. No. 4. 2018 Pag. 597- 609.
84. Lopretti MI, Olazabal L. Microencapsulación de microorganismos *kluveromyces marxianus* en diferentes sistemas y materiales. Evaluación de su actividad biológica en la producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. Volumen 15 No. 1. 2014. Pag. 55-65
85. Castillo SL, et al. Diseño de microcápsulas de alginato con matriz prebiótica de aloe vera para la encapsulación de *Lactobacillus plantarum*. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 2017. Vol. 2. Pag 531-536.
86. Chitiva L, Dussan J. Evaluación de matrices para la inmovilización de

Pseudomonas spp. en biorremediación de fenol Matrix evaluation for *Pseudomonas* spp. immobilisation in phenol bioremediation. Rev. colomb. biotecnol., Volumen 5, Número 2, 2003, paginas. 5-10.

87. Lezcano JC, Martínez B y Alonso O. Caracterización cultural y morfológica e identificación de especies de *Aspergillus* asociadas a semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Perú. Pastos y Forrajes [Internet]. 2015. Vol 38 No 2 Matanzas abr.- jun. Pag 176 – 181. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/pdf/pyf/v38n2/pyf04215.pdf>

88. Peña C, Tobon YV. Remoción del color de lodos provenientes de la industria textil por *Aspergillus* spp. Revista universidad EAFIT. 2006. Vol 42 No 152. Pag 88 – 94.

89. Kalyane P. et al. Degradation of textile dyes by their culture optimization., International Journal of Current Research, 2017, Vol. 9, Issue 12, pag, 62229-62232.

90. Resolución 043 de 2007. “Por la cual se establecen los estándares generales para el acopio de datos, procesamiento, transmisión y difusión de información para el Registro de Generadores de Residuos o Desechos Peligrosos”. Disponible en: <http://www.ideam.gov.co/documents/51310/526371/Resolucion+043+2007+ESTANDARES+PA RA+ACOPIO.pdf/f531d10e-5437-4cae-9423-fd61e2280d0f>

91. Colombia. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Resolución 1362 de 2007, agosto 2, por la cual se establece los requisitos y el procedimiento para el registro de generadores de residuos o desechos peligrosos, a que hacen referencia los artículos 27º y 28º del decreto 4741 del 30 de diciembre de 2005 Bogotá: El Ministerio;2007.

Disponible en: <https://www.alcaldiabogota.gov.co/sisjur/normas/Norma1.jsp?i=26053>

92. Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial. Dirección de

desarrollo sectorial sostenible. Política Ambiental Para la Gestión Integral de Residuos o Desechos Peligrosos. 2005. Bogota D.C. Disponible en: <https://oab.ambientebogota.gov.co/es/con-la-comunidad/ES/politica-ambiental-para-la-gestion-integral-de-residuos-o-desechos-peligrosos>

93. Gonzalez LM, Martinez H, Sanabria J. Biodegradacion de residuos de colorantes cristal violeta y fucsina por medio de un consorcio microbiano. [Trabajo final de grado] [Bogota]: Universidad colegio mayor de Cundinamarca. 2015 [citado 25 de Junio de 2019].

94. NFPA 400 Código de materiales peligrosos edición 2010. Massachusetts: NFPA; 2010. Programa de almacenamiento seguro de sustancias químicas.

Almacenamiento seguro de sustancias químicas. [Documento en internet].

[Citado 20 abri 2018]. Disponible en: http://biology.uprm.edu/files/almacenamiento_sustancias_quimicas.pdf

95. Naciones Unidas. Sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos [Documento en internet]. Cuarta edición.

Copy right ; 2011 .New York y Ginebra. [Citado 6 de mayo de 2018].

Disponible en: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/Spanish/ST-SG-AC10-30-Rev4sp.pdf

96. Colombia. Ministerio del Medio Ambiente. Decreto 2676 de 2000, por el cual se reglamenta la gestión integral de los residuos hospitalarios y similares. Diario Oficial, 44275 (Dic. 29 2000).

97. NFPA 400 Código de materiales peligrosos edición 2010. Massachusetts: NFPA; 2010. Programa de almacenamiento seguro de sustancias químicas.

Almacenamiento seguro de sustancias químicas. [Documento en internet]. [Citado

20 abri 2018]. Disponible en: http://biology.uprm.edu/files/almacenamiento_sustancias_quimicas.pdf

98. Naciones Unidas. Sistema globalmente armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos [Documento en internet]. Cuarta edición.

Copy right ; 2011 .New York y Ginebra. [Citado 6 de mayo de 2018].

Disponible en:
http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/Spanish/ST-SG-AC10-30-Rev4sp.pdf

99. Colombia. Ministerio del Medio Ambiente. Decreto 2676 de 2000, por el cual se reglamenta la gestión integral de los residuos hospitalarios y similares. Diario Oficial, 44275 (Dic. 29 2000).

100. Colombia. Ministerio del Medio Ambiente. Decreto 2663 de 2001, por medio del cual se modifica el Decreto 2676 de 2000 sobre manejo integral de residuos hospitalarios y similares. Bogotá; El Ministerio; 2001

101. Colombia. Ministerio del Medio Ambiente y el Ministerio de Salud. Resolución 1164 de 2002, por la cual se adopta el Manual de Procedimientos para la Gestión Integral de los residuos hospitalarios y similares. Diario Oficial, 45009 (Nov. 25 2002).

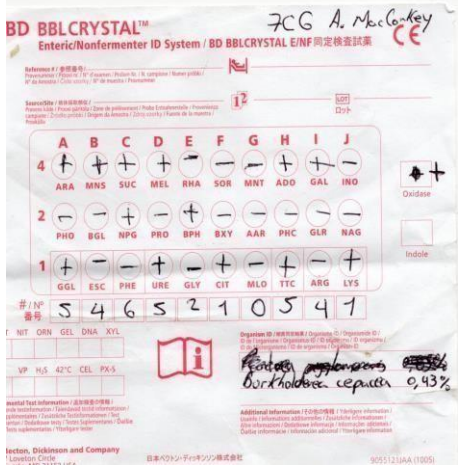
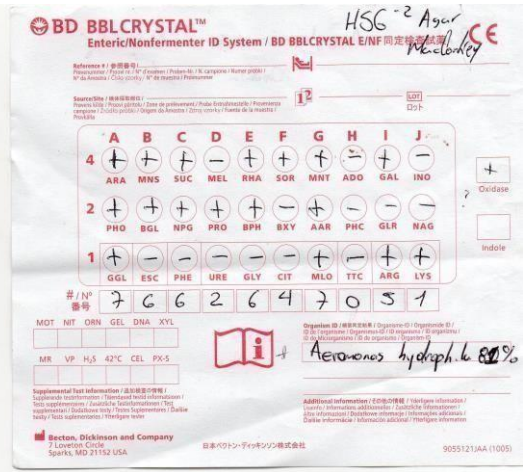
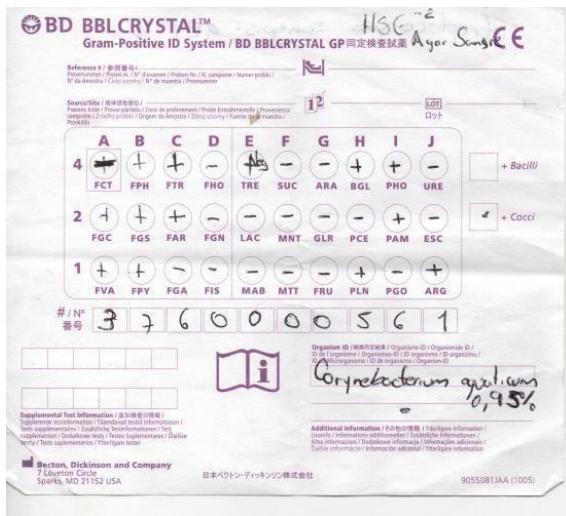
9. ANEXOS.

Anexo 1 Composición del medio mineral.

El medio líquido fue preparado manteniendo un pH de 7.5, esterilizado a 120 °C en autoclave y siguiendo los componentes de la siguiente tabla.

Componentes	Gramos por litro de agua destilada
MgSO ₄	0.1 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.6 g/L
NaCl	0.5 g/L
K ₂ HPO ₄	1.36 g/L
CaCl ₂	0.02 g/L
MnSO ₄	1.1 mg/L
ZnSO ₄	0.2 mg/L
CuSO ₄	0.2 mg/L
FeSO ₄	0.14 mg/L

Anexo 2 Formulario RH1, fuentes de generación y clases de residuos.



Anexo 4 Método de siembra por botón estéril.

Cajas agar nutritivo método de siembra por botón estéril.

Caja	agar	Resultado de decoloración	Promedio en mm	Desviación estándar
Caja 1 nutritive	agar	Resultado de decoloración	2	0
Caja 1 Nutritivo M1	agar	Resultado de decoloración	2	0

Caja 1 agar Nutritivo M2	2	2	0
Caja 1 agar Nutritivo M3	2	2	0
Control <i>P. Aeruginosa</i>	2	2,00	0,00
Control <i>P. Aeruginosa</i>	2		
Control <i>P. Aeruginosa</i>	2		
Caja 2 agar nutritivo	Resultado de decoloración en Mm	Media aritmética	Desviación estandar
Caja 2 agar Nutritivo M1	2	1,66	0,47
Caja 2 agar Nutritivo M1	1		
Caja 2 agar Nutritivo M1	2		
Caja 2 agar Nutritivo M2	2	2,3	0,47
Caja 2 agar Nutritivo M2	3		

Caja 2	agar	2			
Caja 3	agar	Resultado de decoloración en Mm	Media aritmética	Desviación estandar	
Caja 3	agar	1	1,33	0,47	
Caja 3	agar	1			
Caja 3	agar	2			
Caja 3	agar	4	3,66	0,47	
Caja 3	agar	3			
Caja 3	agar	4			
Caja 4	agar	Resultado de decoloración en Mm	Media aritmética	Desviación estandar	
Caja 4	agar	2	2	0	
Caja 4	agar	4	4	0	
Caja 4	agar	1	1	0	

Nutritivo M3			
Caja 4 agar Nutritivo M4	2	2	0

Cajas agar PDA método de siembra por botón estéril.

Caja 1 Agar pda	Resultado de decoloracion En mm	Media aritmética	Desviacion estandar
Caja 1 Agar pda H1	1	1,3	0,47
Caja 1 Agar pda H1	2		
Caja 1 Agar pda H1	1		
Caja 2 Agar pda	Resultado de decoloracion En mm	Media aritmética	Desviacion estandar
Caja 1 Agar pda H2	2	2	0
caja 2 agar PDA H2	2		
caja 2	2		

agar PDA H2			
----------------	--	--	--

Anexo 5 Método de siembra por Kirby Bauer.

Cajas agar nutritivo método de siembra por Kirby Bauer.

Halo de decoloración de bacterias. Método de siembra kirby-bauer			
M1	HALO DE DECOLORACIÓN (mm)	PROMEDIO	DESVIACIÓN ESTANDAR
Caja 1 Agar nutritivo	3	2,40	0,49
Caja 1 Agar nutritivo	2		
Caja 1 Agar nutritivo	3		
Caja 3 Agar Nutritivo	2		
Caja 4 Agar Nutritivo	2		
Nutritive			
Caja 4 Agar nutritivo	2		
Caja 4 Agar Nutritivo	2		
M2	Halo de decoloración	Media	Desviacion

	(mm)	aritmetica	estandar
Caja 1 Agar nutritivo	2	1,25	0,43
Caja 1 Agar nutritivo	1		
Caja 1 Agar nutritivo	1		
Caja 3 Agar nutritivo	1		
M3	Halo de decoloración (mm)	Media Aritmetica	Desviacion Estandar
Caja 2 Agar nutritivo	1	0,75	0,43
Caja 2 Agar Nutritivo	1		
Caja 2 Agar nutritivo	1		
Caja 3 Agar Nutritivo	0		
M4	Halo de decoloración (mm)	Media aritmetica	Desviacion estandar
Caja 2 Agar nutritivo	1		

Caja 2 Agar nutritivo	2	1,17	0,37
Caja 2 Agar nutritivo	1		
Caja 3 Agar nutritivo	1		
Caja 3 Agar Nutritivo	1		
Caja 3 Agar nutritivo	1		
CONTROL <i>P. aeruginosa</i>	Halo de decoloración (mm)	Media aritmetica	Desviacion estandar
Caja 4 Agar Nutritivo	6	3.33	1.88
Caja 4 Agar nutritivo	2		
Caja 4 Agar Nutritivo	2		

Cajas de agar PDA por método de siembra de Kirby Bauer.

Halos de decoloración para hongos. Método kirby- bauer			
Caja 1 Agar pda	Halo de decoloración (mm)	Promedio	Desviacion estandar

Caja 1 agar pda H1	2		
Caja 1 agar pda H1	2		
Caja 1 agar pda H1	2		
Caja 2 AGAR PDA	Halo de decoloración (mm)	Media aritmetica	Desviacion estandar
Caja 2 agar pda H2	5		
Caja 2 agar pda H2	6		
Caja 2 agar pda H2	4		
		2.00	0.00
		5,00	0,82

Anexo 6 Absorbancia y pH de los biorreactores que contenían residuos peligrosos con el hongo inoculado en espuma de poliuretano.

MUESTRA	ABSORBANCIA INICIAL	ABSORBANCIA FINAL	X Abs f	DS Abs f
Cristal violeta con inoculo	2.456	2,247	2,224	0,020
		2,198		
		2,226		
Residuos colorantes		1,900		
		1,970		

con inculo	2.158	1,936	1,935	0,029
Residuos hipoclorito de sodio, con Inculo	0.089	0,068	0,06	0,016
		0,08		
		0,041		
Residuos Básicos con el inculo	0.462	0,297	0,30	0,020
		0,318		
		0,27		
Cristal violeta sin inculo	2.449	2,278	2,309	0,031
		2,340		
		2,320		

- pH inicial y final de los residuos peligrosos en 192 horas.

Residuos	pH inicial	pH final	Promedio	Ds
Cristal violeta con inculo	4.2	4.82	4.86	0,05
		4.85		
		4.92		
Residuos colorantes con inculo	6.6	3.45	3.39	0.06
		3.31		
		3.42		

Residuos hipoclorito de sodio, con inoculo	6.8	6.55 6.77 6.67	6.66	0.09
Residuos básicos con el inoculo	11.4	12.66 12.4 12.54	12.53	0.11
Cristal violeta sin inoculo	4.1	4.25 4.28 4.32	4,28	0,03

Anexo 7 Absorbancia de los residuos peligrosos usando células libres.

MUESTRA	Tiempo Cero	2h	4h	6h	24h	192h
Cristal violeta sin inoculo	1,497	1,402	1,418	1,407	1,386	1,049
	1,486	1,415	1,400	1,402	1,372	0,838
	1,492	1,417	1,409	1,411	1,383	1,311
Promedio	1,492	1,411	1,409	1,407	1,380	1,066
Desviacion Estandar	0,004	0,007	0,007	0,004	0,006	0,193
MUESTRA	Tiempo cero	2h	4h	6h	24h	192h

Cristal violeta con M1	1,592	1,584	1,512	1,428	1,424	1,263
	1,685	1,592	1,506	1,408	1,402	0,976
	1,605	1,583	1,547	1,455	1,418	0,952
Promedio	1,627	1,586	1,522	1,430	1,415	1,064
Desviacion Estandar	0,041	0,004	0,018	0,02	0,009	0,141

MUESTRA	Tiempo					
	cero	2h	4h	6h	24h	192h
Cristal violeta con M2	1,666	1,422	1,373	1,248	1,238	1,224
	1,598	1,560	1,393	1,211	1,203	0,936
	1,772	1,893	1,362	1,207	1,204	1,137
Promedio	1,679	1,625	1,376	1,222	1,215	1,099
Desviacion Estandar	0,072	0,198	0,013	0,018	0,016	0,121

MUESTRA	Tiempo					
	cero	2h	4h	6h	24h	192h
Cristal violeta con M4	1,454	1,539	1,316	1,417	1,358	1,045
	1,478	1,369	1,338	1,415	1,353	0,446
	1,556	1,452	1,396	1,405	1,397	0,375
Promedio	1,496	1,453	1,350	1,412	1,369	0,622

Desviacion Estandar	0,044	0,069	0,034	0,005	0,020	0,301
---------------------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Anexo 8 Absorbancia de los residuos peligrosos usando consorcio bacteriano.

MUESTRA	Tiempo cero	2h	4h	6h	24h	192h
Cristal violeta con consorcio	1,693	1.538	1.537	1.424	1.367	0,219
	1,688	1.640	1.610	1.580	1.530	0,898
	1,689	1.683	1.627	1.530	1.528	0,262
Promedio	1,690	1.620	1.591	1511	1475	0,46
Desviacion estandar	0,002	61	39	65,04	76	0,31
MUESTRA	Tiempo Cero	2h	4h	6h	24h	192h
Residuos de colorantes con consorcio	2,230	2,108	1,985	1,998	1,970	1,505
	2,193	2,150	2,001	1,970	1,960	1,436
	2,092	2,050	1,990	1,968	1,964	1,440
Promedio	2,172	2,103	1,992	1,979	1,965	1,460
Desviacion Estandar	0,06	0,04	0,01	0,01	0,00	0,03
	Tiempo					

MUESTRA	Cero	2h	4h	6h	24h	192h
Residuos básicos con consorcio	0,815	0,718	0,603	0,601	0,597	0,578
	0,774	0,678	0,505	0,503	0,500	0,490
	0,743	0,680	0,576	0,540	0,517	0,500
Promedio	0,777	0,692	0,561	0,548	0,538	0,523
Desviacion Estandar	0,029	0,018	0,041	0,040	0,042	0,039
MUESTRA	Tiempo Cero	2h	4h	6h	24h	192h
Residuos de hipoclorito con consorcio	0,071	0,062	0,024	0	0	0
	0,069	0,045	0,037	0	0	0
	0,080	0,078	0,061	0	0	0
Promedio	0,073	0,062	0,041	0,000	0,000	0,000
Desviacion Estandar	0,005	0,013	0,015	0,000	0,000	0,000

Anexo 9 Absorbancias de los residuos peligrosos en microencapsulación del consorcio bacteriano en alginato de sodio.

MUESTRA	Tiempo cero	2h	4h	6h	24h	192h

Cristal violeta con consorcio microencapsulado	1,882	1,709	1,522	1,453	1,278	1,109
PROMEDIO	1,882	1,709	1,522	1,453	1,278	1,109
DESVIACION ESTANDAR	0	0	0	0	0	0
MUESTRA	Tiempo cero	2h	4h	6h	24h	192h
Residuos colorantes con consorcio microencapsulado	0,810	0,81	0,707	0,638	0,645	0,572
	0,838	0,812	0,717	0,713	0,653	0,502
	0,824	0,807	0,789	0,776	0,528	0,556
Promedio	0,824	0,810	0,738	0,709	0,609	0,543
Desviacion estandar	0,01	0,002	0,037	0,056	0,057	0,03
MUESTRA	Tiempo cero	2h	4h	6h	24h	192h
Residuos básicos con consorcio microencapsulado	0,782	0,897	0,555	0,465	0,470	0,367
	0,723	0,592	0,647	0,417	0,320	0,370
	0,710	0,611	0,609	0,421	0,415	0,402
Promedio	0,738	0,700	0,604	0,434	0,402	0,380
Desviacion estandar	0,031	0,140	0,038	0,022	0,062	0,016

MUESTRA	Tiempo cero	2h	4h	6h	24h	192h
Residuos de hipoclorito con consorcio microencapsulado.	0,124	0,117	0,103	0,031	0	0
	0,132	0,124	0,112	0,029	0	0
	0,139	0,136	0,12	0,078	0	0
Promedio	0,132	0,126	0,112	0,046	0,000	0,000
Desviacion estandar	0,006	0,008	0,007	0,023	0,000	0,000
MUESTRA	Tiempo cero	2h	4h	6h	24h	192h
Cristal violeta perlas sin inoculo	1.895	1,865	1,845	1,750	1,655	1,475
	1.899	1,870	1,852	1,763	1,645	1,460
	1.915	1,890	1,820	1,769	1,680	1,490
Promedio	1.903	1,875	1,839	1,760	1,66	1,477
Desviacion estandar	0,010	0,014	0,016	0,009	0,018	0,016

Anexo 10 Características de peligrosidad de los residuos peligrosos^{97, 98}.

Posibles residuos	Pictograma Grados de NFPA	Efectos peligrosos

Ácido clorhídrico	Corrosivo	Efectos peligrosos para la salud: En contacto con la piel: irritaciones leves Por contacto ocular: irritaciones leves
Ácido sulfúrico	Corrosivo	Riesgo por reactividad Materias que deben evitarse: Metales Efectos peligrosos para la salud : Tras contactos prolongados con el producto: dermatitis. Irritaciones en piel y mucosas.
Hidróxido de sodio	Corrosivo	Riesgo por reactividad Materias que deben evitarse: Metales ligeros, formación de hidrógeno (riesgo de explosión), Metales alcalinotérreos en polvo, Compuestos amoniacales, Cianuros, Magnesio Efectos peligrosos para la salud: Por contacto directo: quemaduras en mucosas, piel, y ojos. Por ingestión: Irritaciones en mucosas de la boca, garganta, esófago y tracto intestinal.

Hidróxido de potasio	Corrosivo Reactivo	<p>Efectos peligrosos para la salud: quemaduras Por contacto, Por ingestión: Irritaciones en mucosas de la boca, garganta, esófago y tracto intestinal. Riesgo de perforación intestinal y de esófago.</p> <p>Riesgo por reactividad</p> <p>Materias que deben evitarse: Metales ligeros Formación de hidrógeno (riesgo de explosión), Metales alcalinotérreos en polvo. Compuestos amoniacaes, Compuestos orgánicos de nitrógeno. Compuestos orgánicos. Halógenos. Halogenuros de halógeno.</p> <p>Hidrocarburos halogenados. Oxihalogenuros no metálicos. Halogenóxidos. Fósforo, Anhídridos</p>
Lugol solución yodo/ yoduro de Gram	Corrosivo	Efectos peligrosos para la salud: En contacto con la piel: Absorción. Por contacto ocular: irritaciones leves, trastornos musculares vómitos, ansiedad, reacción, alérgica
Azul de metileno	Inflamable Corrosivo	<p>Efectos peligrosos para la salud: Por ingestión de grandes cantidades: Irritaciones en vías urinarias.</p> <p>En caso de incendio posible formación de gases de combustión o vapores</p>

		peligrosos
Cristal violeta	Tóxico. Corrosivo	Efectos peligrosos para la salud: Irritaciones en mucosas por inhalación, tos. Por ingestión: vómitos, dolores de cabeza, vértigo, trastornos gastrointestinales. Cancerígeno en ensayos sobre animales. No hay conclusiones definitivas sobre el efecto cancerígeno de esta sustancia en las personas.
Verde malaquita	Reactivo Corrosivo	Efectos peligrosos para la salud: Por inhalación del polvo: Irritaciones en vías respiratorias, irritación ocular y en la piel por contacto. Por ingestión: Irritaciones en mucosas de la boca, garganta, esófago y tracto gastro intestinal

Alcohol acetona	Reactivo Inflamable. Corrosivo	Riesgo por reactividad Materias que deben evitarse: Metales alcalinos. Óxidos alcalinos. Agentes oxidantes fuertes Efectos peligrosos para la salud: Por inhalación de vapores: Irritaciones en mucosas Riesgo de absorción cutánea, Por ingestión: Puede provocar náuseas, vómitos Efectos sistémicos: embriaguez vértigo, parálisis respiratoria Evitar Temperaturas elevadas.
Colorante de Giemsa	Inflamable.	Efectos peligrosos para la salud: No se conocen datos concretos de esta sustancia sobre efectos por sobredosis en el hombre. Irritación por contacto en tiempo prolongado
Fucsina básica coloración de Gram	Corrosivo	Se deben observar las precauciones usuales de manipulación de cualquier producto químico
Azul de cresil brillante	Corrosivo	Se deben observar las precauciones usuales de manipulación de cualquier producto químico

Acrile - Nankin (Tinta China)	Corrosivo	Se deben observar las precauciones usuales de manipulación de cualquier producto químico
Hipoclorito 5000 pm	Corrosivo	Efectos peligrosos para la salud: Irritaciones en contacto ocular, con la piel, mucosas Por ingestión: Irritaciones en mucosas de la boca, garganta, esófago y tracto intestinal.

Anexo 11 ANOVA (95% DE CONFIANZA).

¿Existe alguna diferencia significativa en el porcentaje de decoloración de alguna de los 3 tratamientos?

Variable dependiente: Promedio de degradación a las 192 horas de residuos peligrosos Hipótesis nula: No existe diferencia significativa en los diferentes tratamientos con un porcentaje de confiabilidad de 95%

Hipótesis alterna: En al menos uno de los tratamientos existe diferencia significativa con un porcentaje de confiabilidad de 95%

Se rechaza la hipótesis alterna, y se elige la hipótesis nula, no existe diferencia significativa en los diferentes tratamientos con un porcentaje de confiabilidad de 95%. (P=0.199, F= 1.94 y gl =2)

Análisis de varianza de un factor						
RESUMEN						
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Columna 1	4	87,41	21,8525	192,118492		
Columna 2	4	238,24	59,56	1083,28827		
Columna 3	4	203,7	50,925	1136,36803		
ANÁLISIS DE VARIANZA						
					<i>n</i> de las varianzas de cuadrados de libertad	<i>df</i> de los cuadrados
Entre grupos	3122,17205	2	1561,08603	1,94183059	0,19902813	4,25649473
Dentro de los grupos	7235,32438	9	803,924931			
Total	10357,4964	11				

