



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**Comportamiento de la especiación de cromo en un sistema de
adsorción/biotransformación de agua potable contaminada**

Tesis que presenta

Wendoline Mar Durón

Para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA**

Director de la Tesis: **Dra. Refugio Rodríguez Vázquez**

Ciudad de México

Octubre, 2018

Agradecimientos

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de esta tesis. La investigación fue realizada en el Laboratorio de Compuestos Xenobióticos del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV-IPN, bajo la dirección de la Doctora Refugio Rodríguez Vázquez, y la asesoría del Dr. Ricardo Aguilar López y del Dr. Jaime Ortega López.

AGRADECIMIENTOS

A mi comité tutorial por su dirección y apoyo para la realización de esta tesis.

A la Dra. Refugio Rodríguez Vázquez por su orientación y por la confianza depositada en mí para la realización de este trabajo.

Dr. Velumani Subramaniam de la Sección de Electrónica del Estado Sólido del CINVESTAV-IPN por haber realizado el análisis de difracción de rayos-X de la arcilla natural en el Laboratorio Avanzado de Nanoscopía Electrónica – LANE.

Al Dr. Luis Cedeño Caero del Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Química de la UNAM por su apoyo para el análisis de fisisorción, difracción de rayos X y microscopía electrónica de barrido.

A la Dra. Yahsé V. A. Rojas Challa por la capacitación para la utilización del equipo de absorción atómica para determinar metales.

A mis compañeros de laboratorio por sus consejos y su amistad.

Dedicatoria

A Dios

por haberme permitido llegar hasta este punto, dado salud para lograr mis objetivos y brindarme de su infinita paz, bondad y amor.

A mis padres

Cesario Mar Ballesteros y Lidia Durón Mendoza, a quienes debo lo que soy

A mis hermanas

Viridiana y Nidia, por sus palabras de aliento y apoyo

A mis amigos

por su invaluable amistad

ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos	I
Índice de figuras	IX
Índice de tablas	XIII
Resumen	XIV
Abstract	XV
1. Introducción	1
1.1. Problemas ambientales generados por Cr ⁶⁺	1
1.2. Características y propiedades del cromo	1
1.3. Regulación de cromo en agua potable	3
1.4. El cromo en México	4
1.5. Tecnologías de tratamiento para agua contaminada con Cr ⁶⁺	5
1.5.1. Reducción de la toxicidad	5
1.5.1.1. Reducción química	5
1.5.1.2. Reducción biológica	5
1.5.2. Contención de cromo	7
1.5.3. Tecnologías de eliminación de cromo	7
1.6. Proyecto SENER	7
1.7. Sorción de metales pesados	7
1.8. Adsorbentes	9
1.9. Caracterización del adsorbente	11
1.9.1. Análisis de fisorción	11
1.9.2. Difracción de rayos X (XRD)	12
1.9.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	13
	IV

1.9.4.	Espectrometría de rayos X de energía dispersiva	14
1.10.	Factores que afectan el proceso de adsorción	14
1.10.1.	Área superficial	15
1.10.2.	Efecto del pH	15
1.10.2.1.	Efecto del pH sobre el adsorbente	15
1.10.2.2.	Efecto del pH sobre el Cromo	16
1.10.3.	Temperatura	16
1.10.4.	Tamaño de partícula	17
1.10.5.	Tiempo de contacto	18
1.11.	Isoterma de adsorción	18
1.11.1.	Modelo isoterma Langmuir	18
1.11.2.	Modelo de isoterma de Freundlich	19
2.	Antecedentes	21
3.	Justificación	22
4.	Hipótesis	23
5.	Objetivos	23
5.1.	Objetivo general	23
5.2.	Objetivos específicos	23
6.	Materiales y Métodos	24
6.1.	Preparación de soportes	24
6.1.1.	Preparación de la arcilla roja	24
6.1.2.	Preparación de los “Pellets” de arcilla	24
6.2.	Caracterización de la arcilla	25
6.2.1.	Análisis de B.E.T.	25
6.2.2.	Análisis de Difracción de rayos-X	25

6.2.3.	Análisis de microscopía electrónica de barrido	26
6.2.4.	Determinación de “punto carga cero”	27
6.3.	Estudio del efecto de: pH, masa de adsorbente, tiempo de agitación y concentración inicial de los iones Cr^{6+} en la adsorción en las arcillas rojas	27
6.3.1.	Operación por lotes	27
6.3.2.	Porcentaje de remoción	28
6.3.3.	Capacidad de adsorción (q_t)	28
6.3.4.	Efecto del pH de la solución	29
6.3.5.	Efecto de la dosis de adsorbente	29
6.3.6.	Efecto del tiempo de agitación	29
6.3.7.	Efecto de la concentración inicial de cromo	30
6.3.8.	Isoterma de adsorción	30
6.4.	Ensayos biológicos	31
6.4.1.	Microorganismo empleado	31
6.4.2.	Manejo y mantenimiento	31
6.4.3.	Curva de calibración	31
6.4.4.	Medio Líquido	32
6.4.5.	Medio Sólido	32
6.4.6.	Medios suplementados	32
6.4.7.	Método de la gota o de Miles y Misra	33
6.4.10.	Evaluación de la reducción biológica	33
6.4.12.	IC_{50}	34
6.5.	Métodos analíticos	34
6.5.1.	Limpieza del material	35
6.5.2.	Determinación de cromo total en agua por espectrofotometría de absorción atómica	35

6.5.3.	Solución patrón de cromo hexavalente	35
6.5.4.	Determinación de Cr ⁶⁺ en medio de cultivo por el método de complejación con 1,5 difenilcarbazida	36
6.5.5.	Solución de 1,5 difenilcarbazida (0.5% p/v)	36
6.5.6.	Curva de calibración	36
6.5.7.	Preparación de las muestras	37
6.5.8.	Determinación de Cr ⁶⁺ de muestras de caldo de cultivo	38
6.5.9.	Determinación de Cr total en medios de cultivo	38
6.5.10.	Determinación de Cr ³⁺	39
6.6.	Digestión de biomasa	39
6.7.	Análisis estadístico	39
7.	Resultados	42
7.1.	Caracterización de arcilla roja	42
7.1.1.	Microscopía electrónica de barrido	42
7.1.1.	Difracción de rayos X	45
7.1.2.	Análisis de B.E.T.	48
7.2.	Estudio del efecto de: pH, masa de adsorbente, tiempo de agitación y concentración inicial de los iones Cr ⁶⁺ en la adsorción de las arcillas rojas	52
7.2.1.	El efecto del pH en la adsorción	52
7.2.2.	Efecto de la concentración de la arcilla en la adsorción	53
7.2.3.	Efecto del tiempo en la adsorción	54
7.2.4.	Efecto de la concentración inicial de Cr ⁶⁺	55
7.2.5.	Isoterma de adsorción	57
7.2.5.1.	Isoterma de Langmuir	57
7.2.5.1.	Isoterma de Freundlich	58
7.3.	Comparación entre granzón y arcilla roja	60

7.4.	Ensayos biológicos	62
7.4.1.	IC ₅₀	62
7.4.2.	Evaluación de la reducción de Cr ⁶⁺ en medios estériles.	62
7.4.3.	Evaluación de la reducción de Cr ⁶⁺ en medios inoculados con <i>A. tumefaciens</i>	66
7.4.4.	Análisis estadístico	77
8.	Discusión	79
9.	Conclusión	80
10.	Recomendaciones	81
11.	Referencias	82
12.	Anexos	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos de transporte de cromato, toxicidad y resistencia en células bacterianas recuperado y modificado de (Ramírez-Díaz, 2008).	6
Figura 2. Términos básicos de adsorción. Recuperado de Worch, 2012.	8
Figura 3. Diagrama de Pourbaix para cromo $[\text{Cr}(\text{aq})]_{\text{tot}} = 10^{-6} \text{ m}$ a 25° C . Modificado de (Beverkog & Puigdomenech, 1999)	17
Figura 4. Difractómetro de Rayos X, modelo D8 ADVANCE DAVINVI, de la facultad de química de la UNAM.	26
Figura 5. Microscopio Jeol JSM-5900 LV, de la Facultad de Química de la UNAM.	26
Figura 6. Curva de calibración con el método de 1,5 difenilcarbazida.	37
Figura 7. Determinación de cromo total en medios de cultivo con equipo de absorción atómica GBC, Avanta.	39
Figura 8. Lavado de células a) botón de las células b) adición de solución salina c) resuspensión de las células.	40
Figura 9. Digestión de muestras a) tubos de teflón b) carrusel con muestras	40
Figura 10. Micrografía de la arcilla roja calcinada con una ampliación de 750X antes de emplearse para adsorción de iones de Cr^{6+} . Imagen a ₁ , es magnificado de imagen a.	42
Figura 11. Mapeo de la arcilla roja calcinada.	43
Figura 12. Espectro EDS para la arcilla roja que muestra picos de elementos.	44
Figura 13. Difracción de rayos X de la arcilla roja con y sin tratamiento térmico a 800° C por 24 horas.	45
Figura 14. Identificación de las fases cristalinas en la arcilla antes del tratamiento térmico.	47
Figura 15. Identificación de las fases cristalinas en la arcilla después del tratamiento térmico.	47
Figura 16. Cantidad adsorbida de N_2 en $\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$ (ordenada) en función de la presión relativa (abscisa) de la arcilla sin calcinar.	49

Figura 17. Cantidad adsorbida de N ₂ en cm ³ g ⁻¹ (ordenada) en función de la presión relativa (abscisa) de la arcilla calcinada.	49
Figura 18. Distribución de tamaño de poro en arcilla sin calcinar.	50
Figura 19. Distribución de tamaño de poro en arcilla calcinada.	50
Figura 20. Potencial zeta de la arcilla en función del pH.	51
Figura 21. Potencial zeta del granzón en función del pH.	52
Figura 22. Efecto del pH en el porcentaje de remoción y en la capacidad de adsorción.	53
Figura 23. Efecto de la concentración de las arcillas en el porcentaje de remoción y en la capacidad de adsorción.	54
Figura 24. Efecto del tiempo en el porcentaje de remoción y en la capacidad de adsorción.	55
Figura 25. Efecto de la concentración inicial en el porcentaje de remoción y en la capacidad de adsorción.	56
Figura 26. Isoterma linealizada de Langmuir para Cr ⁶⁺ en arcilla roja, formato Excel.	57
Figura 27. Isoterma linealizada de Langmuir para Cr ⁶⁺ en arcilla roja, ajuste con Polymath.	57
Figura 28. Isoterma linealizada de Freundlich para Cr ⁶⁺ en arcilla roja, formato Excel.	58
Figura 29. Isoterma linealizada de Freundlich para Cr ⁶⁺ en arcilla roja, formato Polymath.	59
Figura 30. Efecto de la concentración de Cr ⁶⁺ en la adsorción utilizando pellets de arcilla roja.	60
Figura 31. Comparación del porcentaje de remoción y la capacidad de adsorción entre la arcilla tamizada a 91 μm, los “pellets” de arcilla roja y el granzón.	61
Figura 32. Concentración de Cr ⁶⁺ contra tiempo, en medios de cultivo estériles.	63
Figura 33. pH contra tiempo, en medios de cultivo estériles.	64
Figura 34. Oxígeno disuelto contra tiempo, en medios de cultivo estériles.	65
Figura 35. Potencial de óxido-reducción contra tiempo en medios de cultivo estériles.	66

Figura 36. Absorbancia (600 n.m.) contra el tiempo (h), los medios de cultivo se suplementaron con diferentes concentraciones de Cr ⁶⁺ .	67
Figura 37. Crecimiento de <i>A. tumefaciens</i> en log(UFC) contra el tiempo.	68
Figura 38. pH contra tiempo en el medio de cultivo con <i>A. tumefaciens</i> .	69
Figura 39. Concentración de Cr ⁶⁺ (mg L ⁻¹) en el medio de cultivo contra el tiempo.	71
Figura 40. Concentración de Cr ⁶⁺ en mg L ⁻¹ contra el tiempo en el caldo de cultivo, con y sin inóculo.	72
Figura 41. Crecimiento microbiano en UFC ml ⁻¹ y concentración de Cr ⁶⁺ (mg L ⁻¹) con respecto del tiempo en medios de cultivo inoculados con <i>A. tumefaciens</i> con una concentración inicial 2.5 mg L ⁻¹ .	73
Figura 42. Crecimiento microbiano en UFC ml ⁻¹ y concentración de Cr ⁶⁺ (mg L ⁻¹) con respecto del tiempo en medios de cultivo inoculados con <i>A. tumefaciens</i> con una concentración inicial 5 mg L ⁻¹ .	74
Figura 43. Crecimiento microbiano en UFC ml ⁻¹ y concentración de Cr ⁶⁺ (mg L ⁻¹) con respecto del tiempo en medios de cultivo inoculados con <i>A. tumefaciens</i> con una concentración inicial 10 mg L ⁻¹ .	75
Figura 44. Potencial de óxido-reducción en mV contra tiempo en horas.	76
Figura 45. Balance de cromo en los medios de cultivo de <i>A. tumefaciens</i> .	77
Figura 46. Curva de calibración de cromo total, absorbancia contra concentración de Cr en mg L ⁻¹ .	85
Figura 47. Curva de calibración de Cr ⁶⁺ por el método de 1,5 difenilcarbazida.	86
Figura 48. Curva de calibración de absorbancia a 600 n.m. contra unidades formadoras de colonias por mililitro.	87
Figura 49. Medición de tamaño de partícula de la arcilla roja con el programa de tpsDig a partir de la micrografía de arcilla a 250X.	88
Figura 50. Medición de tamaño de partícula de la arcilla roja con el programa de tpsDig a partir de la micrografía de arcilla a 1,500X.	88
Figura 51. Distribución de tamaño de partícula de la arcilla roja calcinada tamizada a 91 µm.	89
Figura 52. PDF 00-029-0085 SiO ₂	89
Figura 53. PDF 00-024-0072 Fe ₂ O ₃	90

Figura 54. PDF 00-003-0865 CaO_2	90
Figura 55. PDF 00-001-0737 Ca	91
Figura 56. PDF 00-083-1762 $\text{Ca}(\text{CO}_3)$	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Regulación de cromo en agua potable.....	3
Tabla 2. Resumen de las capacidades de adsorción reportadas para Cr ⁶⁺ (Bailey, 1999).	10
Tabla 3. Composición del medio líquido manitol.....	32
Tabla 4. Composición del medio sólido manitol	32
Tabla 5. Especificaciones y condiciones de trabajo para medir cromo total.	35
Tabla 6. Compuestos correspondientes a los picos de mayor intensidad.....	46
Tabla 7. Resultados de análisis de Brunauer, Emmett y Teller (B.E.T.): área superficial, diámetro promedio de poro y volumen de poro de la arcilla roja	48
Tabla 8. Constantes de las isothermas de adsorción de Langmuir.....	58
Tabla 9. Ecuación obtenida para Langmuir.....	58
Tabla 10. Constantes de las isothermas de adsorción de Freundlich.	59
Tabla 11. Ecuación obtenida para Freundlich.	59
Tabla 12. Concentración de Cr ⁶⁺ en mg L ⁻¹ que causan el 20, 50 y 80% de reducción de la población bacteriana en log(UFC).....	62
Tabla 13. Velocidad de crecimiento específica y el tiempo de duplicación para cada concentración de Cr ⁶⁺	70

Resumen

En este trabajo se investigó la capacidad de adsorción de iones de Cr en la adsorbente arcilla roja y la reducción de Cr⁶⁺ por *Agrobacterium tumefaciens*.

Se realizó la caracterización de la arcilla roja por medio de cristalografía de rayos-X, microscopía electrónica de barrido, fisisorción y se determinó el punto carga cero. La adsorción, se evaluó con las siguientes condiciones; temperatura constante de 25 ° C concentración de Cr⁶⁺ de 10 mg L⁻¹, a diferentes condiciones de dosificación del adsorbente de 0.5, 1, 3, 6, 9, 12 y 15 g L⁻¹, valores de pH, de 2, 3, 5 y 7 y tiempos de adsorción 30, 60, 120, 180, 240 y 360 min. Los resultados mostraron que las mejores condiciones de adsorción de Cr⁶⁺ en las arcillas rojas fue a pH 3 y el equilibrio se alcanzó a los 180 min con una dosis de las arcillas de 15 g L⁻¹.

La concentración inicial de Cr⁶⁺ se varió de 0.5 a 20 mg L⁻¹, mientras que el pH, la dosificación del adsorbente, el tiempo y la temperatura se mantuvieron constantes. Se observó que el porcentaje de remoción disminuyó con el aumento en la concentración inicial y la capacidad de adsorción de Cr⁶⁺ aumentó.

Los parámetros de las isothermas de Langmuir y Freundlich se determinaron con los datos de equilibrio de adsorción del Cr⁶⁺ en arcillas rojas, los cuales mostraron un valor de los coeficientes de correlación (R²) de 0.9644 y 0.9658, para los modelos de Langmuir y Freundlich, respectivamente.

Se realizaron cinéticas de crecimiento del *A. tumefaciens*, a 2.5, 5 y 10 mg L⁻¹, se midieron en el medio de cultivo; las unidades formadoras de colonias, el pH, el oxígeno disuelto, el potencial de óxido-reducción y la concentración de Cr⁶⁺. Se calculó el IC₅₀ y se realizaron las correlaciones. Se determinó que las variables evaluadas variaron dependiendo de la concentración de Cr⁶⁺ en el medio, entre las más significativas se encontraron el tiempo, el número de unidades formadoras de colonias y el potencial de óxido reducción.

Abstract

In this work, the capacity of adsorption of Cr ions in the red clay adsorbent and reduction of Cr⁶⁺ by *Agrobacterium tumefaciens* was investigated.

Characterization of the red clay was carried out by X-ray crystallography, scanning electron microscopy, physisorption and the point of zero charge was determined. The following constant conditions for Cr⁶⁺ adsorption were tested; temperature 25 ° C, Cr⁶⁺ concentration 10 mg L⁻¹, adsorbent dosage of 0.5, 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 g L⁻¹ pH values of 2, 3, 5 and 7 and adsorption times 30, 60, 120, 180, 240 and 360 min. The results showed that the best adsorption conditions of Cr⁶⁺ in the red clays was at pH 3 and the equilibrium was reached at 180 min with a dose of clays of 15 g L⁻¹.

The initial concentration of Cr⁶⁺ was varied from 0.5 to 20 mg L⁻¹, while the pH, the dosage of adsorbent, the time and the temperature were kept constant, the percentage of chromium removal decreases with the increase in the initial concentration and the adsorption capacity of Cr⁶⁺ increases.

The parameters of the Langmuir and Freundlich isotherms were determined from the data of Cr⁶⁺ adsorption equilibrium in red clays, that showed correlation coefficients (R²) of 0.9644 and 0.9658, for Langmuir and Freundlich, respectively.

Growth kinetics were performed at 2.5, 5 and 10 mg L⁻¹, colony forming units, pH, dissolved oxygen, oxide-reduction potential and Cr⁶⁺ concentration in the medium were measured. Variables varied depending on the concentration of Cr⁶⁺ in the medium, among the most significant were; the time, the number of colony forming units and the oxidation reduction potential.

1. Introducción

1.1. Problemas ambientales generados por Cr⁶⁺

El cromo (Cr) es un elemento de gran importancia en la industria utilizado en diversos productos y procesos. Entre algunas aplicaciones se encuentran la fabricación de acero inoxidable, numerosas aleaciones, pigmentos, catalizadores, colorantes, curtientes, impregnación de madera, ladrillos refractarios, cintas magnéticas, etc.

Aunque el Cr puede ingresar a los sistemas hídricos de manera natural, debido a la erosión de rocas que contienen este elemento o lixiviación de los suelos (Oliveira, 2012). Ha habido un aumento en la concentración de este metal en el medioambiente y en especial en los cuerpos de agua ocasionado a la actividad antropogénica a través de la descarga directa de operaciones industriales, fugas, almacenamiento deficiente o prácticas de eliminación inadecuadas.

Tanto en los sistemas terrestres como acuáticos, el cromo puede sufrir transformaciones de óxido-reducción químicas y fotoquímicas, precipitación/disolubilidad y los procesos de adsorción/desorción (Bielicka, 2005).

1.2. Características y propiedades del cromo

El Cr es el elemento número 24 en la tabla periódica y posee un peso atómico promedio de 52. Puede existir en valencias del 0 al +6, aunque el cromo +3 y +6 son los más estables. Casi todo el cromo natural se encuentra en estado trivalente (Cr³⁺), generalmente en combinación con hierro u otros óxidos metálicos. Los compuestos hexavalentes (Cr⁶⁺) también se encuentran en pequeñas cantidades.

La interconversión de Cr³⁺ y Cr⁶⁺ está controlada por varios factores, que incluyen la presencia y concentraciones de agentes oxidantes o reductores, los potenciales electroquímicos de las reacciones de oxidación y reducción, la temperatura, la luz, los sorbentes, las reacciones ácido-base, agentes complejantes y reacciones de precipitación (Kimbrough, 1999).

El agua tiene un papel crítico en la química redox del cromo. Para que el cromo se oxide, debe aceptar electrones del oxígeno, mientras que la reducción se logra donando electrones.

Los valores altos de potencial redox (Eh) y factor de intensidad redox (pE) en las aguas corresponden a condiciones fuertemente oxidantes. En general, existe una relación inversa entre Eh y pH para el cromo, a medida que el pH aumenta Eh disminuye.

A pH más bajos, existen cromatos como ácido crómico (H_2CrO_4) y cromato de hidrógeno (HCrO_4^-). Cuando la concentración de CrO_4^{2-} es alta, los cromatos se dimerizan para formar especies de dicromato ($\text{H}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ o HCr_2O_7^-). Estas especies son fuertes agentes oxidantes y, por lo tanto, se reducen rápidamente en presencia de agentes reductores a pH bajo o alto Eh. A pH alto, existen cromatos en forma de CrO_4^{2-} , que es un pobre agente oxidante y, por lo tanto, con valores de Eh más bajos, son más estables.

El nivel de concentración de agentes oxidantes y reductores también es un factor importante que afecta la oxidación/reducción del Cr. Por ejemplo, aunque hay muchos agentes oxidantes capaces de oxidar el Cr^{3+} , sólo unos pocos existen en situaciones ambientales en concentraciones lo suficientemente altas como para oxidar el Cr^{3+} a Cr^{6+} . Por el contrario, hay muchos agentes reductores para los cuales la reducción de Cr^{6+} es menos favorable termodinámicamente, pero estos se encuentran típicamente en concentrados suficientemente altos para desempeñar un papel en la reducción de Cr^{6+} a Cr^{3+} .

La reducción de Cr^{6+} por hierro (Fe^{2+}) tiene un potencial redox bajo, 0.56 voltios, pero la concentración de hierro en muchos medios ambientales es lo suficientemente alta como para lograr esta reducción (Buerge, 1997).

El Cr^{3+} tiene la tendencia de precipitar en soluciones acuosas neutras. Por el contrario, los iones cromato (CrO_4^{2-}) e dicromato ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) son solubles en agua a todos los pH.

1.3. Regulación de cromo en agua potable

El cromo es único entre los elementos tóxicos que se regula de manera diferente en función de sus diferentes toxicidades que posee las diferentes especies de cromo, específicamente Cr^{3+} y Cr^{6+} , en contraste con otros elementos tóxicos, como plomo, cadmio y arsénico donde no se distingue el estado de oxidación y se regulan en función de sus concentraciones totales.

Tabla 1. Regulación de cromo en agua potable

Cromo	Límite máximo permisible (mg L⁻¹)	Organismo o Ley
Cr total	0.10	EPA de EE. UU
Cr total	0.05	NOM-127-SSA1-1994
Cr total	0.05	OMS
Cr total	0.05	Código de Regulaciones de California
Cr hexavalente (Cr⁶⁺)	0.01	Código de Regulaciones de California. MCL California

1.4. El cromo en México

En el Municipio de Tultitlán, Estado de México, durante 1958 a 1978, operó la empresa Cromatos de México, S.A. de C.V., dicha empresa fue clausurada en el año de 1978 por haberse detectado contaminación del suelo con cromo hexavalente (DOF, 2010).

Las siguientes actividades y acuerdos se llevaron a cabo durante 30 años para abordar este problema. Entre 1976 y 1984, la Secretaría de Recursos Hidráulicos (Departamento de Agricultura y Recursos Hídricos) monitoreó continuamente la calidad del agua subterránea. En 1983, se construyó un cementerio industrial para el confinamiento de desechos de cromo (Castro-Díaz, 2006), en el predio se confinaron 75,000 toneladas de residuos contaminados con cromo, pero la deficiencia en su compactado provocó que se dispersará en el ambiente a causa de fisuras y hundimientos, lixiviándose a estratos profundos del subsuelo y provocando la contaminación de pozos de agua cercanos a la planta (DOF, 2010).

De 2002 a 2007, la CONAGUA (Junta Nacional del Agua) realizó un seguimiento de la contaminación residual en el acuífero local.

En 2003, se formó un grupo multidisciplinario para realizar estudios de suelos y acuíferos y para remediar el área. CONAGUA firmó un acuerdo de colaboración con la UNAM (Instituto de Ingeniería) en 2009 para analizar las concentraciones de cromo total y hexavalente en el suelo y las aguas subterráneas en el área.

El estudio del Instituto de Geografía y la facultad de química de la UNAM, (1985) reportó en el monitoreo y evaluación del cementerio industrial, que, del total de pozos muestreados, únicamente se encontró cromo, en concentraciones mayores de 0.05 mg L⁻¹ (límite sanitario) en 7 pozos. Los valores promedio obtenidos, fueron: 0.95, 1.97, 0.57, 3 y 0.26 (mg L⁻¹). La hipótesis que se planteó fue que el cromo estaba preferentemente localizado en el cementerio y en los primeros 50 m de material arcilloso del subsuelo.

La mayoría de las muestras de agua de pozo (90%) tenían una concentración de Cr más alta que el valor límite máximo permisible para agua potable de 0.05 mg L⁻¹ con concentraciones desde 0.21 a 1.11 mg L⁻¹ (Rosas et al., 1989).

1.5. Tecnologías de tratamiento para agua contaminada con Cr⁶⁺

1.5.1. Reducción de la toxicidad

Una categoría principal de tecnologías de remediación tiene como objetivo disminuir la toxicidad, al reducir Cr⁶⁺ a Cr³⁺. Los sistemas de tratamientos basados en la reducción de Cr⁶⁺ pueden ser biológicos o abióticos, y a menudo son una combinación de estos dos. Los métodos convencionales para eliminar Cr⁶⁺ incluyen la reducción química seguida de precipitación, intercambio iónico y adsorción sobre carbón activado, alumbre, caolinita y ceniza. Sin embargo, la mayoría de estos métodos requieren alta energía o grandes cantidades de reactivos químicos (Komori, 1990).

La reducción puede ocurrir de forma natural o manipulando las condiciones ambientales para estimular la actividad biológica selectiva o procesos geoquímicos. La reducción también puede ocurrir cuando se agregan productos químicos para reducir directamente el Cr, como las limaduras de ferrato o Fe ((IETEG), 2004).

La reducción microbiana de Cr⁶⁺ tiene una importancia práctica, porque las estrategias biológicas proporcionan una tecnología verde que es rentable (Camargo, 2003).

1.5.1.1. Reducción química

Se refiere a la reducción abiótica *In situ* o *Ex situ* con un donador de electrones (S, Fe²⁺ o Fe). Cuando el Cr se reduce posteriormente se precipita fuera de la solución. Este enfoque logra tanto una reducción en la toxicidad de Cr como su eliminación de la solución acuosa. La reducción química incluye la reducción natural de los óxidos del suelo y la materia orgánica natural ((IETEG), 2004).

1.5.1.2. Reducción biológica

Los microorganismos pueden catalizar reacciones redox a través una combinación de varios mecanismos, las cuales comprenden la reducción enzimática extracelular, la reducción no metabólica por superficies bacterianas y la reducción y precipitación intracelular.

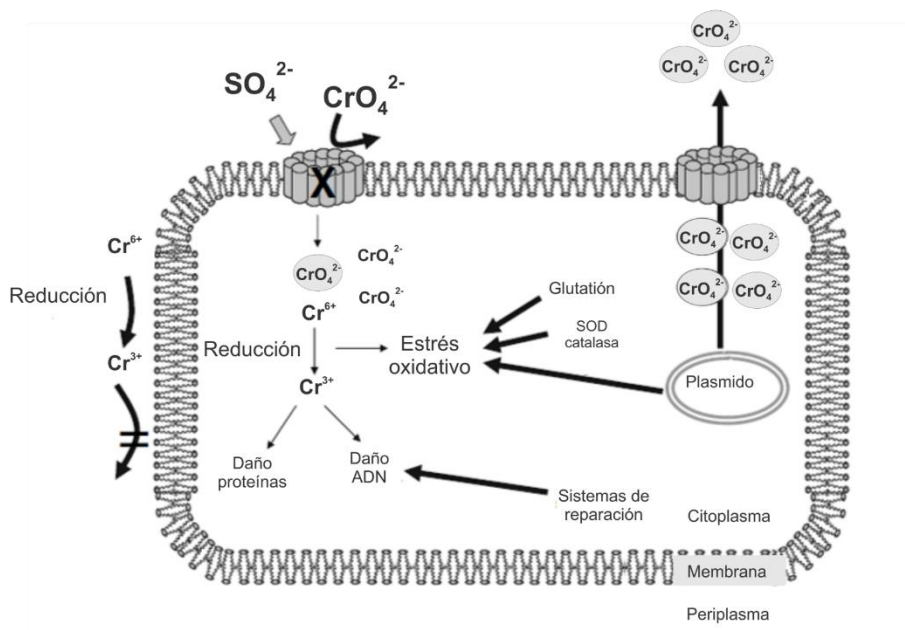


Figura 1. Mecanismos de transporte de cromato, toxicidad y resistencia en células bacterianas recuperado y modificado de (Ramírez-Díaz, 2008).

Los microorganismos capaces de reducir Cr^{6+} a Cr^{3+} incluyen bacterias (*Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Achromobacter* y *Desulfomamaculum*), levaduras de algas y hongos.

Las reacciones de reducción extracelular requieren la presencia de un donador de electrones externo, como Fe, Mn o materia orgánica oxidada. El proceso es igual a la reducción química, pero biológicamente mediado y, por lo tanto, es cinéticamente ventajoso a comparación con las reacciones no biológicas, particularmente en condiciones aerobias.

Fein et al. (2002) demostraron que las superficies bacterianas también pueden catalizar la reducción de Cr^{6+} .

Se han investigado varios factores que afectan la tasa de reducción biológica, incluidas las concentraciones de oxígeno disuelto, la fuente de carbono, pH, potencial de óxido-reducción y la concentración inicial de Cr^{6+} . Aunque la reducción biológica puede ser aerobia o anaerobia, las reacciones de reducción son sensibles a las concentraciones de oxígeno disuelto. En condiciones anaerobias, los mecanismos de reducción

abióticos y bióticos son competitivos. Con el tiempo, el pH puede aumentar debido a la mineralización de la materia orgánica a CO_2 , que aumenta la concentración de HCO_3^- , o debido a una reacción redox que consume ácido. Los resultados son específicos de cada caso, debido que las condiciones ambientales determinan qué mecanismos dominarán en el sistema.

1.5.2. Contención de cromo

Otras tecnologías se centran en prevenir la propagación de la contaminación en áreas más grandes. Estas tecnologías de contención incluyen estabilización o solidificación, bioestabilización, fitoestabilización, precipitación, encapsulación y vitrificación del suelo.

1.5.3. Tecnologías de eliminación de cromo

Para la remoción de Cr del agua subterránea se utilizan varios enfoques, entre las tecnologías utilizadas se encuentran las membranas (ultrafiltración, nanofiltración, ósmosis inversa), intercambio iónico o carbón activado granular.

1.6. Proyecto SENER

La Secretaria de Energía (SENER), obtuvo el proyecto para el diseño de una planta piloto autosustentable, para implementar energía termosolar, fotovoltaica y fotocatalítica, para la remoción de metales pesados.

De acuerdo con este proyecto se propone seleccionar un adsorbente no convencional, que sea un material económico y con alto contenido de compuestos de hierro, aluminio, carbón y silicio, los cuales permitan una adsorción satisfactoria de los elementos; se pretende la remoción de metales pesados con un material que cumpla con los puntos de vista técnico y sobre todo económico.

1.7. Sorción de metales pesados

Existe una variedad de tecnologías para el tratamiento de aguas. Sin embargo, las desventajas de la mayoría de estos métodos son los costos de operación y mantenimiento, la generación de lodos y la complejidad del procedimiento involucrado

en el tratamiento. En este sentido, el proceso de adsorción se considera una alternativa viable en el tratamiento de agua potable y residual, debido a la facilidad de operación y la simplicidad del diseño. La sorción ha sido un método muy efectivo y económico para retirar, recuperar y reciclar metales pesados del agua.

La sorción se subdivide en adsorción y absorción; La adsorción es un proceso de transferencia de masa que implica adhesión de las moléculas de a la superficie de una partícula, por lo que existe una acumulación en la interfaz de dos fases, como la interfaz líquido-líquido, gas-líquido, gas-sólido o líquido-sólido (De Gisi, Lofrano, Grassi, & Notarnicola, 2016). La absorción es la asimilación de un líquido o gas en un sólido o un gas en un líquido. Al cambiar las propiedades de la fase líquida (por ejemplo, concentración, temperatura, pH), las especies adsorbidas pueden liberarse de la superficie y transferirse nuevamente a la fase líquida. Este proceso inverso se conoce como desorción (Worch, 2012). La evidencia experimental muestra que la sorción es a menudo no lineal y cinéticamente controlada (Klaus Knödel, 2007).

Los mecanismos de adsorción generalmente se clasifican como físicos, químicos o electrostáticos. En la Figura 2 se muestran los términos básicos que se utilizan en la teoría de la adsorción. Se denomina adsorbente al material sólido que proporciona la superficie para la adsorción y las especies que serán adsorbidas se llaman adsorbato.

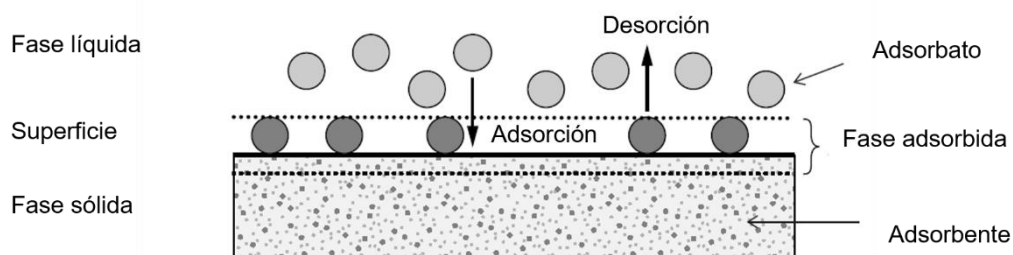


Figura 2. Términos básicos de adsorción. Recuperado de Worch, 2012.

Si la interacción entre la superficie sólida y las moléculas adsorbidas tiene una naturaleza física, el proceso se denomina fisisorción. Las interacciones débiles, como las fuerzas de Van der Waals, son las responsables de este fenómeno, por lo tanto, los resultados del proceso son reversibles. Por otro lado, si las fuerzas de atracción entre las moléculas adsorbidas y la superficie sólida se deben a la unión química, el proceso de adsorción se denomina quimisorción. A diferencia de la fisisorción, la quimisorción ocurre sólo en monocapa.

En condiciones favorables, ambos procesos pueden ocurrir simultánea o alternativamente. La adsorción física se acompaña de una disminución de la energía libre y la entropía del sistema de adsorción y por lo tanto, este proceso es exotérmico (De Gisi et al., 2016).

1.8. Adsorbentes

Se han propuesto sorbentes alternativos para eliminar Cr^{6+} , a fin de ahorrar dinero y/o reciclar material de desecho. Se han probado biosorbentes (biomasa viva o muerta), y otros materiales naturales como arcillas y carbón activado (Guertin et al., 2016).

En la Tabla 2 se proporciona un resumen de las capacidades de adsorción de los materiales absorbentes alternativos, en términos de mg Cr^{6+} absorbido por gramo de sorbente (Bailey, Olin, Bricka, & Adrian, 1999). Los valores en la Tabla 2 no pretenden representar la capacidad de adsorción máxima de los materiales, sino el rango de capacidades de adsorción posibles basado en datos experimentales. Dado que la adsorción es un proceso de equilibrio, la masa de Cr^{6+} absorbida en la superficie depende tanto de la concentración de Cr^{6+} en la fase acuosa como de la afinidad del sorbente por los iones de Cr^{6+} . Esto a su vez depende de los tipos de atracciones químicas entre el sorbente y el Cr (como el enlace iónico, la atracción electrostática y el enlace de hidrógeno), que pueden variar con el pH y la presencia/ausencia de moléculas competidoras.

Tabla 2. Resumen de las capacidades de adsorción reportadas para Cr⁶⁺ (Bailey, 1999).

Clase	Material sorbente	Fuente	Capacidad de adsorción (mg g ⁻¹)
Quitosano	Quitosano	Masri <i>et al.</i> , 1974	27.3
	Wollastonita	–	
Arcilla	cenizas volantes mixtas	Paday <i>et al.</i> , 1984	0.271
Arcilla	Bentonita adaptada	Cadena <i>et al.</i> , 1990	57
		Khan <i>et al.</i> , 1995;	
Arcilla	Bentonita	Cadena <i>et al.</i> , 1990	0.512, 55
Fibra de coco	Médula de fibra de coco	Manju and Anirudham, 1997	50
Biomasa muerta	Molde de hoja	Sharma and Forster, 1994	43
Biomasa muerta	Cáscara de arroz	Roy <i>et al.</i> , 1993	164.31
		Orhan and	
Tanino-rico	Cáscara de nuez	Büyükgüngör, 1993	1.47
		Orhan and	
Tanino-rico	Café turco	Büyükgüngör, 1993	1.63
Zeolita	CETYL- Zeolita modificada	Santiago <i>et al.</i> , 1992	0.65
Aserrín pirolizado	Aserrín pirolizado	Hamadi <i>et al.</i> , 2001	20.09-24.65
Carbón	Comercial F400 GAC	Hamadi <i>et al.</i> , 2001	19.13-26.25

1.9. Caracterización del adsorbente

Las propiedades de adsorbatos y adsorbentes son bastante específicas y dependen de sus componentes. Los constituyentes de los adsorbentes son los principales responsables de la eliminación de cualquier contaminante particular del agua (Grassi, Kaykioglu, Belgiorno, & Lofrano, 2012). Las propiedades de los adsorbentes que los hacen útiles para el tratamiento del agua incluyen alta porosidad y área superficial, así como también la naturaleza física y química de las superficies internas de adsorción. Para identificar si un material tiene una aplicación potencial en la purificación del agua por adsorción, se realizan numerosas pruebas que se utilizan en la caracterización (Management Association, 2017).

1.9.1. Análisis de fisisorción

El área de la superficie se expresa en metros cuadrados por gramo y generalmente se mide por el método de B.E.T. (Brunauer, 1938).

Cuando un gas se adsorbe físicamente en la superficie de un sólido, la cantidad adsorbida varía con la presión. La ecuación se desarrolló para permitir la medición de V_m , el volumen de gas necesario para formar una monocapa de líquido a través de una superficie sólida. La ecuación es

$$\frac{x}{V(1-x)} = \frac{1}{V_m} + \frac{(C-1)x}{V_m}$$

Donde x es la presión relativa, P/P_0 , a la que se adsorbe un gas del volumen V (m^3 en S.T.P.), P es la presión del gas y P_0 es la presión de vapor saturado a la temperatura del recipiente que contiene el adsorbente. V_m es el volumen de gas requerido para formar una monocapa en el adsorbente a la temperatura del sistema, y C es una constante.

Las áreas superficiales totales de adsorbentes sólidos se caracterizan con mayor frecuencia llevando a cabo la isoterma B.E.T. de adsorción de gas. Normalmente se usa gas nitrógeno porque está bien caracterizado, pero se pueden usar otros gases.

Se determina el volumen, V_m , del gas nitrógeno absorbido y luego se puede calcular la superficie total, A , del adsorbente, ya que $A = N_o N_m V_m$, donde N_o es el número de Avogadro y N_m es el número de moles de nitrógeno adsorbido (McKay, 1995).

Después de gas de nitrógeno e adsorbe lentamente en el material y la presión relativa de vapor de nitrógeno se registra contra el volumen de adsorbato usando el programa informático del analizador B.E.T. La conexión entre la presión de vapor relativa y la cantidad de absorción a temperatura constante se denomina isoterma de adsorción. En el análisis B.E.T., la interpretación de la isoterma de adsorción es útil para calcular el área superficial del material y comprender la estructura de los poros del material (Gürsoy & Karaman, 2017).

1.9.2. Difracción de rayos X (XRD)

La técnica de Difracción de rayos X (XRD) mide la distribución de energía e intensidad de la señal de rayos X difractados producidos por átomos en muchas direcciones específicas, posteriormente esta información es interpretada para determinar el tamaño y la forma de las cristalitas. También da una idea sobre la orientación de un solo cristal o grano (Management Association, 2017).

Cada elemento en la muestra puede emitir una o más series de líneas espectrales únicas. Por lo tanto, un análisis cualitativo típico implica obtener un registro de la intensidad de rayos X en función del ángulo del cristal.

El espectrómetro (energía u onda dispersiva) de rayos X proporcionan un espectro de intensidad (número de conteos, o conteos por unidad de tiempo) versus un eje de energía o longitud de onda de los rayos X.

En el caso de los rayos X de longitud de onda más larga, la forma y posición también pueden verse alteradas por cambios en el entorno químico local. Teniendo en cuenta estos factores, sin embargo, es posible convertir las posiciones de los picos en longitudes de onda a través de la ley de Bragg y luego usar la relación de Moseley para identificar los constituyentes elementales (Goldstein, 1992)

La ley de Bragg está dada por:

$$n \lambda = 2 d \sin (\theta)$$

donde n es un número entero (aunque $n = 1$ es con mucho la condición más comúnmente utilizada), d es el espaciado interplanar de las capas atómicas en el cristal paralelo a su superficie, y θ es el ángulo de incidencia de los rayos X. (Russ, 1984).

Como los límites prácticos en el ángulo son aproximadamente de 20 a 75 grados (establecidos por limitaciones de diseño mecánico en el espectrómetro), un cristal particular (cuya separación atómica se describe comúnmente por el valor $2d$ para mayor comodidad) puede cubrir un rango de longitud de onda de aproximadamente 0.5 a 2 veces d . Dado que los cristales están disponibles con valores $2d$ de 1 a 10 angstroms, y en hasta 60 angstroms en casos especiales (pseudo-cristales hechos de capas de ácidos grasos), el rango de cobertura para el análisis de rayos X es de 1 a 100 angstroms (12 a 0.1 keV) (Russ, 1984).

1.9.3. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La técnica de microscopía electrónica de barrido permite la observación y caracterización de materiales y superficies orgánicas e inorgánicas heterogéneas a una escala local (Goldstein, 1992).

El área a analizar se irradia con un haz enfocado de electrones, que se barre a través de la superficie de la muestra realizando un escaneado. La interacción entre los electrones emitidos por el equipo y los electrones de la muestra irradiada resultan en la producción de diversas señales, las cuales se obtienen a partir de volúmenes de emisión específicos dentro de la muestra.

Los tipos de señales que se producen incluyen electrones secundarios, electrones retrodispersados, electrones Auger, rayos x característicos y fotones de varias energías. Las señales posteriormente a ser detectadas son interpretadas en términos de composición, cristalografía, topografía de superficie y tamaño (Management Association, 2017).

Cabe mencionar que en esta técnica las señales de mayor interés son los electrones secundarios y retrodispersados, debido a que varían de acuerdo con las diferencias en la topografía de la superficie a medida que el haz de electrones pasa por la muestra.

Debido a que la emisión de electrones secundarios está confinada a un volumen cerca del área de impacto del haz es posible obtener imágenes con una resolución relativamente alta (Goldstein, 1992).

1.9.4. Espectrometría de rayos X de energía dispersiva

Los rayos X emitidos por la muestra bombardeada con el haz de electrones pueden utilizarse para identificar los elementos presentes. El espectrómetro de rayos X de energía dispersiva es un aditamento del microscopio electrónico de barrido, el cual proporciona información relacionada con la composición elemental de la muestra (Management Association, 2017).

Al realizar un análisis de rayos X cualitativo, se debe utilizar diferentes tipos de información. En primer lugar, la energía específica de los picos de rayos X característicos de cada elemento. Esta información está disponible en forma de tabulaciones, que pueden darse como una "regla de cálculo de energía", un gráfico o, en el caso de un analizador de espectro de rayos X basado en computadora, como un marcador de visualización (Goldstein, 1992).

1.10. Factores que afectan el proceso de adsorción

El proceso de adsorción es un fenómeno de superficie, por lo tanto, el área superficial del adsorbente tiene una gran influencia en la eliminación de contaminantes. Sin embargo, además del área superficial del adsorbente, otras variables del proceso como el pH, la temperatura, la fuerza iónica, la concentración de contaminantes y la dosis de adsorbente juegan un papel importante en el proceso de sorción. La eficiencia de eliminación puede mejorarse varias veces a través de la optimización de estos parámetros (Management Association, 2017).

Para llevar a cabo la optimización de estos parámetros se realizaron experimentos en lote debido a la capacidad de investigar grandes cantidades de muestras en experimentos paralelos, el manejo varias muestras paralelas y la capacidad de estudiar procesos que influyen en la migración sin tener que lidiar con posibles efectos

del transporte de contaminantes complicando la interpretación de datos (como en estudios de columnas) (Klaus Knödel, 2007).

1.10.1. Área superficial

La adsorción es un fenómeno superficial, como tal, el grado de adsorción es proporcional al área superficial específica. Por lo tanto, la cantidad de masa adsorbida por peso del adsorbente debería aumentar gradualmente en función al inverso del diámetro de los poros del adsorbente.

1.10.2. Efecto del pH

De manera general se ha observado que el proceso de adsorción se ve afectado con el cambio en los valores de pH de la solución y en ciertos intervalos de pH específicos tiene lugar la máxima absorción. Esto debido a la protonación y desprotonación del adsorbato y los grupos funcionales activos del adsorbente en solución acuosa a un determinado pH (Management Association, 2017).

1.10.2.1. Efecto del pH sobre el adsorbente

Los sitios activos de los adsorbentes pueden exhibir carga en ciertos rangos de pH, por lo tanto, la comprensión del comportamiento de la carga del contaminante objetivo y del adsorbente es útil para determinar si el ajuste de pH sería beneficioso o necesario en una aplicación de tratamiento particular (Mohan & Pittman, 2007).

Los óxidos metálicos son en su mayoría anfóteros, y su disociación superficial puede representarse esquemáticamente de la siguiente manera (Mahmood *et al.*, 2011):



El punto de carga cero (PCC) es el pH de la suspensión a la cual la carga neta total (externa e interna) en la superficie de las partículas de un óxido/hidróxido insoluble es cero, es decir, donde las concentraciones superficiales negativas ($[MO^{-}]$) y positivas ($[M^{+}]$) son iguales. (Gulicovski *et al.*, 2008; Mahmood *et al.*, 2011). Dado que el PCC corresponde a un punto de equilibrio de cargas sobre el material adsorbente, valores

de pH mayores que PCC generan una superficie cargada negativamente, en tanto que un pH menor que PCC una superficie cargada positivamente (Amaringo Villa, 2013).

1.10.2.2. Efecto del pH sobre el Cromo

En condiciones neutras a básicas, el Cr^{3+} tenderá a precipitarse, mientras que en condiciones ácidas tenderá a solubilizarse. Mientras que los iones de cromato y dicromato son extremadamente solubles en agua a todos los pH, pueden precipitar con varios cationes divalentes (Kimbrough *et al.*, 1999).

A pH más bajos, existen cromatos como ácido crómico (H_2CrO_4) y cromato de hidrógeno (HCrO_4^-). Cuando la concentración de CrO_4^{2-} es alta, los cromatos se dimerizan para formar especies de dicromato ($\text{H}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ o HCr_2O_7^-). Estas especies son fuertes agentes oxidantes y por lo tanto, se reducen rápidamente en presencia de agentes reductores a pH bajo o alto Eh (Kimbrough *et al.*, 1999).

A pH alto, existen cromatos en forma de CrO_4^{2-} , que es un pobre agente oxidante y, por lo tanto, con valores de Eh más bajos, son más estables (Kimbrough *et al.*, 1999).

En la Figura 3 se presenta el diagrama de Pourbaix del cromo, un diagrama de Pourbaix es una representación gráfica del potencial (ordenada) en función del pH (abscisa) para un metal dado bajo condiciones termodinámicas estándar (usualmente agua a 25 °C).

1.10.3. Temperatura

Las reacciones de adsorción son normalmente exotérmicas; por tanto, el grado de adsorción suele aumentar al disminuir la temperatura. Las variaciones de entalpía en la adsorción suelen ser del orden de las correspondientes a reacciones de condensación o cristalización. Así pequeñas variaciones no alteran grandemente el proceso de adsorción.

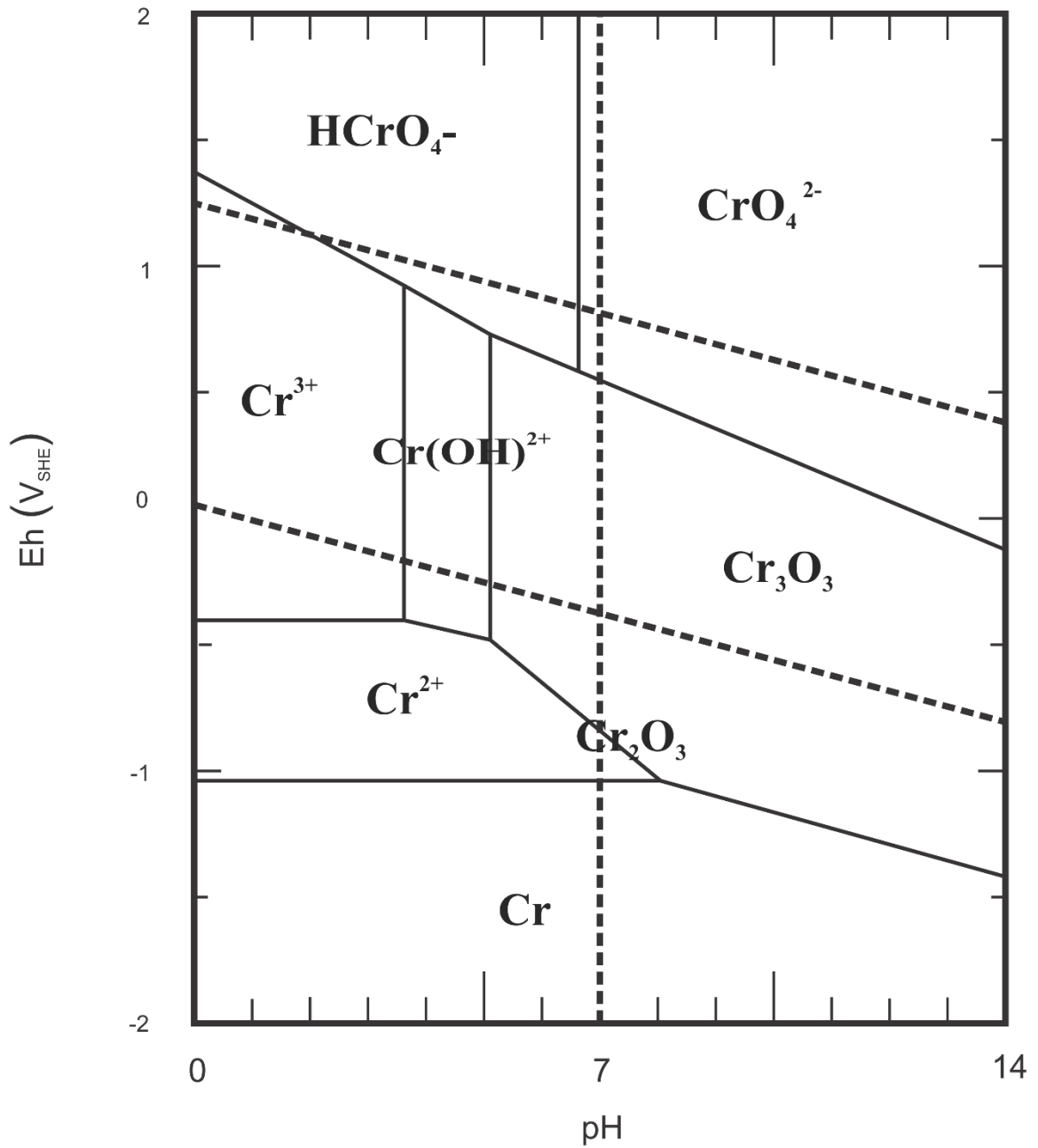


Figura 3. Diagrama de Pourbaix para cromo $[Cr(aq)]_{tot} = 10^{-6} m$ a $25^\circ C$. Modificado de (Beverkog & Puigdomenech, 1999)

1.10.4. Tamaño de partícula

Cuanto menor sea el tamaño del adsorbente mayor será su área de superficie (Management Association, 2017).

Los tamaños de partícula más pequeños reducen la difusión interna y la limitación de la transferencia de masa para penetrar en el adsorbido dentro del adsorbente (es decir, el equilibrio se alcanza más fácilmente y se puede alcanzar una capacidad de adsorción casi total).

1.10.5. Tiempo de contacto

Cuanto mayor sea el tiempo de contacto, más completa será la adsorción. Por lo tanto, el tiempo de contacto requerido para que la sorción se complete es importante para dar una idea de un proceso de sorción. Esto también proporciona una información sobre el tiempo mínimo requerido para que tenga lugar una adsorción considerable, y también el posible mecanismo de control de la difusión entre el adsorbato.

1.11. Isotherma de adsorción

Las isothermas representan la cantidad de soluto adsorbido por unidad de adsorbente, como una función de la concentración de equilibrio en solución a temperatura constante (Khalifa et al.,2015).

1.11.1. Modelo isoterma Langmuir

Este modelo empírico asume la adsorción monocapa (la capa adsorbida es una molécula de espesor), con adsorción solo puede ocurrir en un número finito (fijo) de sitios localizados definidos, que son idénticos y equivalentes, sin interacción lateral y obstáculo estérico entre las moléculas adsorbidas, incluso en sitios adyacentes.

La isoterma de Langmuir viene dada por la ecuación:

$$q_e = \frac{q_m k_l C_e}{1 + k_l C_e} \quad (3)$$

Donde:

C_e = la concentración de equilibrio

k_l = la constante en relación con la afinidad de los sitios de unión

q_m = la cantidad máxima de iones metálicos por unidad de peso de adsorbente para formar una monocapa completa en la superficie

$$\frac{1}{q_e} = \frac{1}{q_m} + \frac{1}{k_l q_e C_e} \quad (4)$$

Tanto q_m como k_l pueden determinarse a partir de la intersección y de la pendiente de la gráfica lineal $1/q_e$ contra $1/C_e$, respectivamente.

Gráficamente, La isoterma de Langmuir se caracteriza por una meseta, un punto de saturación de equilibrio donde una vez que una molécula ocupa un sitio, no puede producirse más adsorción. Además, la teoría de Langmuir ha relacionado la rápida disminución de las fuerzas de atracción intermoleculares con el aumento de la distancia. Por este medio, una constante adimensional, comúnmente conocida como factor de separación (R_L) definido por Webber y Chakkravorti se puede representar como:

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L C_o} \quad (5)$$

donde K_L ($L \text{ mg}^{-1}$) se refiere a la constante de Langmuir y C_o se denota a la concentración inicial de adsorbato (mg L^{-1}). En este contexto, un valor de R_L más bajo refleja que la adsorción es más favorable. En una explicación más profunda, el valor de R_L indica que la naturaleza de adsorción es desfavorable ($R_L > 1$), lineal ($R_L = 1$), favorable ($0 < R_L < 1$) o irreversible ($R_L = 0$).

1.11.2. Modelo de isoterma de Freundlich

La isoterma de Freundlich es la relación conocida más temprana que describe la adsorción no ideal y reversible, no restringida a la formación de monocapa. Este modelo empírico se puede aplicar a la adsorción multicapa, con distribución no uniforme del calor de adsorción y afinidades sobre la superficie heterogénea.

La isoterma de Freundlich viene dada por la ecuación:

$$q_e = K_f C_e^{1/n} \quad (6)$$

donde K_f y n son las constantes de Freundlich relacionadas con la capacidad de adsorción y la intensidad de la adsorción, respectivamente. K_f y n se determinan a partir de la gráfica lineal de $\ln q_e$ versus $\ln C_e$.

En esta isoterma, los sitios de unión se consideran diferentes. K_f está relacionado con la capacidad de adsorción y n se refiere a la intensidad de adsorción. Tomando logaritmo en ambos lados.

La ecuación linealizada del modelo de Freundlich está dada por la ecuación.

$$\log q_e = \log K_f + \frac{1}{n} \log C_e \quad (7)$$

2. Antecedentes

Se ha investigado la aplicación de tratamientos de adsorción combinados con otros procesos químicos y biológicos para eliminar el Cr^{6+} del agua contaminada.

Los sistemas combinados que utilizan como adsorbentes materiales inertes y además de fácil acceso, como arena, grava y arcilla. El uso de dichos materiales ofrece una ventaja con respecto a otros materiales debido a abundancia y costo, por lo que en el presente trabajo se propone utilizar una arcilla roja. Una opción viable para la disposición del adsorbente después de que esté haya cumplido su función, es mediante el proceso de solidificación/estabilización para la elaboración de materiales de construcción utilizando cemento Portland (Leist, Casey, & Caridi, 2003), éste tratamiento se emplea para reducir la movilidad de contaminantes adheridos al soporte y no presenten un peligro para el medio ambiente (Singh & Pant, 2006).

En el equipo de trabajo, Arguelles en el 2016 estudió diferentes tipos de filtros y las características, así como los mecanismos de remoción para posteriormente implementar un tratamiento secuencial, incluyendo dos sistemas de filtración: un filtro percolador empacado con granzón y un bio-filtro con empaque del residuo gastado de *P. ostreatus*, así como un filtro percolador y bio-filtro empacado con cáscara de arroz, en ambos casos se obtuvieron altos porcentajes de remoción de iones de Cr^{6+} .

En el equipo de trabajo del Dr. Subramaniam, (2018) utilizaron “pellets” de arcilla roja con de un diámetro aproximado de 0.5 cm, elaborados manualmente para la adsorción de As^{5+} y realizaron la caracterización parcial del soporte por microscopía electrónica de barrido y difracción de rayos-X. Se ha mejorado la elaboración de los “pellets” de la arcilla roja por Morales, (2018) mediante un sistema para extruir una mezcla de arcilla con quitosano en una forma cilíndrica con 5 mm de diámetro. El “pellet” en dicho trabajo se utilizó en la adsorción de iones de Cd^{2+} .

3. Justificación

El Cr^{3+} y Cr^{6+} poseen diferentes propiedades fisicoquímicas y bioquímicas. Cr^{3+} es menos biodisponible, relativamente estable y al mismo tiempo menos tóxico que Cr^{6+} que se considera la forma más tóxica de Cr debido a su fuerte potencial de oxidación, mayor solubilidad en agua, rápida permeabilidad a través de membranas biológicas y recientemente ha sido clasificado como una de las 17 sustancias químicas más tóxicas por la Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades (ATSDR) y listado como carcinógeno humano grado 'A' por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA). Cr^{6+} es un carcinógeno ocupacional bien establecido asociado con cáncer de pulmón y cáncer nasal y sinusal. ((NIOSH), 2013) considera que todos los compuestos de Cr^{6+} son carcinógenos ocupacionales (Baldiris, 2018).

En virtud de lo anterior, es necesario llevar a cabo estudios encaminados a la remoción de cromo del agua para uso y consumo humano mediante procesos como la reducción biológica de Cr^{6+} a Cr^{3+} que sea cinéticamente ventajoso a comparación con las reacciones no biológicas y la adsorción en adsorbentes no convencionales para llevar la investigación hasta una tecnología eficiente, económica y de fácil acceso.

El objetivo principal de este trabajo es el diseño y la implementación de un sistema secuencial para la remoción de Cr de agua potable. De esta manera se reducirá la exposición a contaminantes peligrosos con lo cual mejorará la calidad de vida de comunidades expuestas. En el presente trabajo, se probó una arcilla roja como adsorbente para remover cromo, con el fin de obtener un agua tratada que cumpla con los requisitos máximos permisibles de 0.05 mg L^{-1} establecidos por la NOM-127-SSA1-1994.

Esta investigación es la primera parte de un proyecto de implementación de plantas piloto que pretende resolver problemas reales de contaminación por metales en agua potable y que pueda ser utilizado como un tratamiento primario dentro del sistema secuencial de tratamientos.

4. Hipótesis

La aplicación del proceso de adsorción/biotransformación con *A. tumefaciens*, favorecerá la disminución de la concentración por adsorción en arcilla roja y el cambio en el estado de oxidación del Cromo (Cr).

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

La aplicación del proceso de adsorción/biotransformación con *Ag tumefaciens*, favorecerá el cambio en el estado de oxidación del cromo y la disminución de la concentración en un agua por adsorción en arcilla roja.

5.2. Objetivos específicos

- Evaluar las características de la arcilla roja, como un modelo de material sorbente no convencional.
- Determinar los modelos de las isotermas de adsorción característica de la arcilla roja.
- Evaluación de la especiación de Cr⁶⁺ del caldo de cultivo de *A. tumefaciens*.

6. Materiales y Métodos

6.1. Preparación de soportes

6.1.1. Preparación de la arcilla roja

La arcilla se calcina a 800 ° C durante 24 h con el fin de aumentar su resistencia mecánica y eliminar algunas impurezas (Vieira et al., 2010).

Posteriormente la arcilla fue tamizada con un tamaño de partícula de 91 μm , dado que con un tamaño de partícula pequeño la adsorción se verá favorecida (Ongley *et al.*, 2001).

6.1.2. Preparación de los “Pellets” de arcilla

En condiciones ligeramente ácidas, la mayoría de los grupos amino de quitosano son protonados y el quitosano resultante contiene múltiples cargas catiónicas. En base a sus propiedades de biodegradabilidad, efectos antimicrobianos y alta carga positiva (Lertsutthiwong, Noomun, Khunthon, & Limpanart, 2012), en el presente estudio se realiza una mezcla de la arcilla roja con quitosano para la adsorción de Cr^{6+} .

La solución de quitosano se prepara disolviendo 2.5 g de quitosano en una solución acuosa de ácido clorhídrico al 5% (v/v), para tener una solución con una concentración final de 0.05 g L⁻¹.

Los pellets se desarrollan a partir de la mezcla de arcilla natural con la solución de quitosano, esta se mezcla uniformemente para formar una pasta. La pasta posteriormente se extruye en una forma cilíndrica con 5 mm de diámetro con una jeringa de plástico. El “pellet” se corta con una longitud de 5 mm (Jelena, 2015), se coloca en crisoles limpios, se seca a 105 ° C durante 24 h, y se calcina adicionalmente a 800 ° C durante 24 h en una mufla para carbonizar y producir poros. Después de enfriar, el producto terminado se mantiene en un recipiente seco y limpio para realizar más experimentos (Te, 2018).

6.2. Caracterización de la arcilla roja

6.2.1. Análisis de B.E.T.

Se prepara las muestras para el análisis del área de superficie y de la estructura de poros con un desgasificador VacPrep modelo 061 de la marca Micromeritics.

Se preparan las muestras por calentamiento a 350 ° C y evacuación con vacío durante 8 horas para eliminar contaminantes de vapor de agua y gases adsorbidos de muestras para evitar la interferencia con las mediciones del área de superficie.

Una vez que la muestra es desgasificada, se pesa, y posteriormente la muestra se sumerge en un baño de refrigerante de nitrógeno líquido. Se obtienen las propiedades texturales mediante isothermas de adsorción-desorción de N₂ de las muestras, con en el equipo analizador de área superficial y porosidad marca Micromeritics modelo TriStar.

Las isothermas de fisisorción de nitrógeno se analizaron mediante el método de Barrett-Joyner-Halenda (BJH) para determinar el área específica (B.E.T), volumen específico de poro (BJH), tamaño de poro promedio (BJH) y distribución de tamaño de poro (BJH y DFT).

6.2.2. Análisis de Difracción de rayos-X

Los patrones de difracción de rayos X ($2\theta = 1-10^\circ$) se recolectaron en un difractómetro de Rayos X, modelo D8 ADVANCE DAVINVI, configuración theta-theta, marca BRUKER AXS, usando pequeñas hendiduras de divergencia y dispersión de 0.05°. Los patrones de XRD se obtuvieron a temperatura ambiente utilizando radiación Cu K α ($\lambda = 1.5406 \text{ \AA}$). Posteriormente se realizó el análisis de las fases cristalinas con el programa de PCPDFWIN.



Figura 4. Difractómetro de Rayos X, modelo D8 ADVANCE DAVINVI, de la facultad de química de la UNAM.

6.2.3. Análisis de microscopía electrónica de barrido

En análisis morfológico se realizó en un microscopio Jeol JSM-5900 LV equipado con un sistema de análisis elemental EDS para realizar un análisis estadístico semicuantitativo de veinte puntos en la superficie de los materiales.



Figura 5. Microscopio Jeol JSM-5900 LV, de la Facultad de Química de la UNAM.

6.2.4. Determinación de “punto carga cero”

Los valores del potencial zeta se obtuvieron de los resultados de la electroforesis obtenidos con un medidor zeta (Zeta-Meter 3.0+) con una solución de 1 mg de arcilla ml^{-1} a valores de pH de 1,2,3,4 y 6 a temperatura ambiente (25 ± 1 °C). Se dispersaron 30 mg de arcilla roja en 30 ml de una solución electrolítica de fondo de NaCl 0.1 M. El pH se ajustó agregando HCl o NH_4OH con un pH-metro. Luego, las muestras se sonicaron durante 10 min para estabilizar el pH y finalmente la suspensión se vertió en la celda de medición.

El instrumento (Zeta-Meter 3.0+) determina la movilidad electroforética de las partículas automáticamente y la convierte en términos de potencial zeta utilizando la ecuación de Smoluchowski. La ecuación de Smoluchowski, la expresión más elemental del potencial zeta, proporciona una relación directa entre el potencial zeta y la movilidad electroforética (Turhan, 2008).

$$\xi = \frac{4 \pi \eta}{\epsilon} U$$

donde U es la movilidad electroforética a la temperatura real, η es la viscosidad del líquido de suspensión, ϵ es la constante dieléctrica, π es una constante, y ξ es el potencial zeta (Turhan, 2008).

6.3. Estudio del efecto de: pH, masa de adsorbente, tiempo de agitación y concentración inicial de los iones Cr^{6+} en la adsorción en las arcillas rojas

6.3.1. Operación por lotes

En una operación por lotes, la cantidad fija de adsorbente se mezcla con un volumen específico de adsorbato. Luego, el sistema se mantiene en agitación durante un período de tiempo determinado. La separación de la solución resultante se lleva a cabo mediante filtración. El pH óptimo, el tiempo de contacto, la dosis del adsorbente y la temperatura óptima se fijan.

La absorción de iones de metales pesados se calculó a partir del balance de masa, que se establece como la cantidad de soluto adsorbido en el sólido. Equivale a la

cantidad de soluto eliminado de la solución. Matemáticamente se puede expresar en las siguientes ecuaciones.

6.3.2. Porcentaje de remoción

El porcentaje del adsorbato eliminado por el adsorbente se determina de acuerdo con la siguiente fórmula (Gorzin et al.,2017):

$$\% \text{ de } R = \frac{C_0 - C_e}{C_0} * 100 \quad (1)$$

Donde:

R= Porcentaje de soluto adsorbido por el adsorbente

C₀ = Concentración inicial del soluto (mg L⁻¹)

C_e = Concentración del soluto en el equilibrio (mg L⁻¹)

6.3.3. Capacidad de adsorción (q_t)

En un sistema sólido-líquido, la adsorción produce la eliminación de solutos de la solución y su acumulación en la superficie sólida. El soluto restante en la solución alcanza un equilibrio dinámico con el adsorbido en la fase sólida. La cantidad de adsorbato que puede absorberse por un adsorbente en función de la temperatura y la concentración de adsorbato, y el proceso, a temperatura constante, puede describirse mediante una isoterma de adsorción de acuerdo con la ecuación general:

La capacidad de adsorción del adsorbente se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$q_t = \frac{C_0 * V_0 - C_t * V_t}{m} \quad (2)$$

Donde:

q_t = Cantidad de adsorbato por unidad de masa de adsorbente en el tiempo t (mg g⁻¹)

C₀ = Concentración inicial (mg L⁻¹)

V₀ = Volumen inicial de la solución (L)

C_t = Concentración de Cr⁶⁺ en el tiempo t (mg L⁻¹)

V_t = Volumen de solución inicial de Cr^{6+}

m= Masa de adsorbente (g)

6.3.4. Efecto del pH de la solución

En el estudio del pH de la solución, el experimento se lleva a cabo a una dosis de adsorbente, concentración inicial de Cr^{6+} y tiempo constante.

Se mezcla 1 g L^{-1} de arcilla con una solución de 10 mg $\text{Cr}^{6+} \text{L}^{-1}$, a diferentes pH, se coloca en un agitador innova 43 a 120 rpm durante 24 h. El pH se ajusta con soluciones 0.1 mol L^{-1} de HNO_3 y NaOH , según sea necesario. Después de alcanzar el equilibrio las muestras se filtrarán usando una membrana de 0.45 μm y se determinará la concentración total de Cr en solución mediante espectrofotometría de absorción atómica con llama de aire/acetileno (AAS-F).

6.3.5. Efecto de la dosis de adsorbente

En el estudio de la dosis del adsorbente, el experimento se lleva a cabo a un pH, concentración inicial de Cr^{6+} y tiempo constante.

Se mezcla una solución 10 mg $\text{Cr}^{6+} \text{L}^{-1}$ al pH de mayor adsorción del experimento anterior con diferentes masas de arcilla roja, se coloca en un agitador innova 43 a 120 rpm durante 24 h. Después de alcanzar el equilibrio las muestras se filtrarán usando una membrana de 0.45 μm y se determinará la concentración total de Cr en solución mediante espectrofotometría de absorción atómica con llama de aire/acetileno (AAS-F).

6.3.6. Efecto del tiempo de agitación

En el estudio del tiempo de agitación, el experimento se lleva a cabo a un pH, dosis de adsorbente y concentración inicial de Cr^{6+} constante.

Se mezcla una solución 10 mg $\text{Cr}^{6+} \text{L}^{-1}$ al pH y la masa de arcilla de mayor adsorción de los experimentos anteriores, se coloca en un agitador innova 43 en agitación a 120 rpm durante 1, 3, 6, 15 y 24 h, respectivamente. Después de alcanzar el equilibrio las muestras se filtran usando una membrana de 0.45 μm y se determinará la

concentración total de Cr en solución mediante espectrofotometría de absorción atómica con llama de aire/acetileno (AAS-F).

6.3.7. Efecto de la concentración inicial de cromo

Se mezclan soluciones de 5,10,15,20,30 mg Cr⁶⁺ L⁻¹ al pH y la masa de arcilla de mayor adsorción de los experimentos anteriores, se coloca en un agitador innova 43 en agitación a 120 rpm durante el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio de acuerdo al experimento anterior. Después de alcanzar el equilibrio las muestras se filtran usando una membrana de 0.45 µm y se determinará la concentración total de Cr en solución mediante espectrofotometría de absorción atómica con llama de aire/acetileno (AAS-F).

6.3.8. Isotherma de adsorción

La isoterma Langmuir representa la adsorción monocapa y el modelo Freundlich representa la adsorción multicapa.

La isoterma de Langmuir viene dada por la ecuación

$$q_e = \frac{q_{max}bC_t}{1+bC_t} \quad (8)$$

Donde:

C_t = la concentración de equilibrio

b = la constante en relación con la afinidad de los sitios de unión

q_{max} = la cantidad máxima de iones metálicos por unidad de peso de adsorbente para formar una monocapa completa en la superficie

La ecuación de Langmuir se puede representar en otra forma como se indica a continuación.

$$\frac{C_t}{q} = \frac{C_t}{q_{max}} + \frac{1}{bq_{max}} \quad (9)$$

La isoterma de Freundlich viene dada por la ecuación

$$q = KC_t^{1/n} \quad (10)$$

En esta isoterma, los sitios de unión se consideran diferentes. K está relacionado con la capacidad de adsorción y n se refiere a la intensidad de adsorción. Tomando logaritmo en ambos lados (Padmavathy et al., 2016).

$$\log q = \log K + \frac{1}{n} \log C_t \quad (11)$$

6.4. Ensayos biológicos

6.4.1. Microorganismo empleado

Agrobacterium tumefaciens fue aislada de nódulos de *Phaseolus vulgaris* y fue solicitada a la Colección Nacional de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares bajo el acrónimo CDBB 500.

6.4.2. Manejo y mantenimiento de la cepa

Como quimioorganótrofos aerobios, la mayoría de las cepas de *Agrobacterium* crecerán en una amplia gama de medios complejos y definidos.

En general, el pH de los medios para el crecimiento de dicha bacteria debe ser entre pH 6.8-7.2. La temperatura de crecimiento ideal para *Agrobacterium* es de 25-30 ° C. Una curva de crecimiento (D.O. 600 vs tiempo) es útil para predecir el tiempo que le toma a una cepa específica alcanzar la fase estacionaria en cualquier medio particular (Wang, 2006).

6.4.3. Curva de calibración

Se realiza un cultivo en medio líquido manitol a 120 rpm con una determinada concentración celular, se mide la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm utilizando espectrofotómetro modelo UV-1800 de la marca SHIMADZU, posteriormente se realiza diluciones decimales seriadas y se siembra 10 µl de cada dilución sobre placas de petri con agar manitol, por el método de Miles y Misra para conteo de unidades formadoras de colonias. Se deja incubar a 28°C en forma invertida. Luego del período de crecimiento, se examina las placas y se contaron colonias para realizar un adecuado análisis estadístico. La Figura muestra la curva de calibración

realizada que relaciona la absorbancia con las unidades formadoras de colonias por ml (UFC ml⁻¹).

6.4.4. Medio Líquido Manitol

Tabla 3. Composición del medio líquido manitol

Compuesto	g L ⁻¹
Extracto de levadura	5.0
Peptona	3.0
Manitol	25.0

6.4.5. Medio Sólido Manitol

Tabla 4. Composición del medio sólido manitol

Compuesto	g L ⁻¹
Extracto de levadura	5.0
Peptona	3.0
Manitol	25.0
Agar	20.0

Cabe mencionar que en los experimentos realizados a la fecha se ha utilizado bacto peptona.

6.4.6. Medios suplementados

Se utiliza cromato de potasio (K₂CrO₄) de la marca Baker, con una pureza ≥ 100%, para la preparación de una solución patrón de 1000 mg L⁻¹ de Cr⁶⁺ disolviendo 0.3735 g de K₂CrO₄ en 100 ml de agua desionizada estéril.

Los medios de cultivo se preparan de la misma forma que los medios de cultivo no suplementados se esterilizan por 15 min a 120 ° C a 20 kg cm⁻², posteriormente se suplementa con un determinado volumen de la solución patrón dependiendo la

concentración final de iones de Cr^{6+} a evaluar, la adición del estándar se realiza en la campana de flujo laminar para evitar cualquier contaminación.

6.4.7. Método de la gota o de Miles y Misra

Se coloca un número determinado de gotas (10 μl) de la muestra diluida sobre placas de agar seco, después de que las gotas son totalmente absorbidas por el agar, se invierten las placas y se incuban. Después de la incubación se seleccionan las placas que tengan colonias aisladas en el área en que se colocaron las gotas, de preferencia, aquellas que contengan menos de 40 colonias por gota (el ideal es de 10 a 20) (Camargo et al., 2003).

6.4.8. Preparación del inóculo

Se cultivan colonias aisladas de *A. tumefaciens* en caldo manitol estéril durante 12 horas para cada serie de muestras. Se diluye el cultivo con la solución tampón estéril hasta que la solución tenga una absorbancia de 0.100 ± 0.01 a 600 nm, medida espectrofotométricamente. Esto tiene una concentración de $1.5 - 3.0 \times 10^8$ UFC ml^{-1} .

6.4.9. Cinéticas de crecimiento *A. tumefaciens*

El caldo de cultivo se suplementa con un determinado volumen de la solución patrón de 1000 mg L^{-1} de Cr^{6+} para evaluar los niveles de resistencia de *A. tumefaciens* al Cr^{6+} y calcular la concentración de inhibición media (IC_{50}).

Se toman muestras cada 3 horas durante 12 horas, y una muestra a las 24 horas. Los experimentos se realizaron por duplicado. El seguimiento del crecimiento bacteriano se realiza por la medición de la absorbancia a 600 n.m. utilizando el espectrofotómetro anteriormente mencionado, y se toman muestras para realizar diluciones decimales y sembrar por el método de Miles y Misra para conteo de unidades formadoras de colonias.

6.4.10. Evaluación de la reducción biológica

Dado que el manitol se ha reportado como agente antioxidante (André, 2017; Roldán, 2000), se prepararon medios de cultivo estériles con una concentración de 2.5, 5 y 10

mg L⁻¹. Cada 3 horas se sacrifican muestras por duplicado, para medir el potencial de óxido-reducción y la concentración de Cr⁶⁺ del caldo de cultivo de los matraces, para determinar la reducción de Cr⁶⁺ por el medio de cultivo y posteriormente comparar las eficiencias de reducción de la cepa de *A. tumefaciens* contra el medio de cultivo sin inocular.

6.4.11. Medición de potencial de óxido-reducción

Dado que las especies de Cr⁶⁺ son agentes oxidantes fuertes, se piensa que parte de la reducción de cromato podría ser el resultado de una reacción química redox entre la materia orgánica de la célula bacteriana y el cromato (Llovera *et al.*, 1993).

Con el fin de correlacionar el poder reductor y la reducción del Cr⁶⁺ (Llovera *et al.*, 1993), el poder reductor se estima midiendo el potencial de óxido-reducción del caldo de cultivo de en cada punto de la cinética de crecimiento utilizando un multiparámetro HANNA HI 9828 con un electrodo Ag/AgCl con electrolito de KCl 3.5 M.

6.4.12. IC₅₀

La concentración de inhibición media (IC₅₀) es la concentración de un compuesto necesaria para reducir *in vitro* el crecimiento poblacional o la actividad metabólica de organismos en un 50 por ciento.

$$\text{Inhibición (\%)} = 100 - \left[100 * \left(\frac{\text{Actividad máxima específica a la concentración evaluada}}{\text{Actividad máxima específica del control biótico}} \right) \right]$$

Las concentraciones de cromo que causan el 20, 50 y 80% de reducción en la actividad metabólica (en comparación al control biótico) se refieren al IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀, respectivamente. Estos valores se calculan por interpolación del porcentaje de inhibición observada en función de la concentración de la sustancia inhibidora (Ochoa *et al.*, 2009).

6.5. Métodos analíticos

En este apartado se describen los medios de cultivo, métodos analíticos y procedimientos empleados para realizar las determinaciones analíticas.

6.5.1. Limpieza del material

Todo el material de vidrio antes y después de su uso es lavado con etanol al 5% y enjuagado con agua destilada, después el material se escurre y se seca antes de sumergirse en una tina con una solución de HNO₃ al 10% durante 12 horas.

Posteriormente el material es enjuagado con agua desionizada y secado en un horno a 105 ° C (con excepción de material volumétrico). Esto con la finalidad de asegurar la quelación de los metales adsorbidos al material y la eliminación de la materia orgánica, para evitar interferencias.

6.5.2. Determinación de cromo total en agua por espectrofotometría de absorción atómica

La concentración de cromo total en solución se mide mediante espectrofotometría de absorción atómica con llama de aire/acetileno (AAS-F), utilizando un equipo de la marca GBC, modelo AVANTA. El equipo de AAS-F se calibra utilizando sus respectivos estándares de trabajo en el rango de linealidad preparado a partir del estándar de Cr de 1000 mg L⁻¹. La siguiente tabla se recuperó del manual del equipo.

Tabla 5. Especificaciones y condiciones de trabajo para medir cromo total.

Longitud de onda nm.	Ancho de hendidura nm.	Rango de trabajo óptimo mg L ⁻¹	Sensibilidad mg L ⁻¹
357.9	0.2	2 – 15	0.05
359.3	0.2	4 – 20	0.09
360.5	0.2	5 – 30	0.10
425.4	0.2	7 – 40	0.17
428.9	0.2	15 – 60	0.35

6.5.3. Solución patrón de cromo hexavalente

Se seca cromato de potasio (K₂CrO₄) de la marca Baker Analyzed, con una pureza ≥ 100%, en una estufa a 105 ° C durante 2 h. Se deja enfriar en desecador. Se prepara

una solución patrón de 1000 mg L⁻¹ de Cr⁶⁺ disolviendo 0.3735 g de K₂CrO₄ en agua desionizada. La solución patrón se almacena a 4 °C para minimizar la degradación. Esta solución se puede almacenar hasta seis meses en frasco ámbar (Onchoke *et al.*, 2016) (NMX-AA-044-SCFI-2014). A partir de la solución 1000 mg L⁻¹ se toma un volumen determinada que posteriormente se diluye para preparar las soluciones patrón de 100 y 10 mg L⁻¹ de Cr⁶⁺.

6.5.4. Determinación de Cr⁶⁺ en medio de cultivo por el método de complejación con 1,5 difenilcarbazida

La reacción del cromo Cr⁶⁺ con la difenilcarbazida es una reacción redox en la cual el Cr⁶⁺ se reduce a Cr³⁺ y el reactivo se oxida a difenilcarbazona, es éste compuesto el que forma el complejo de color rojo-violeta. Si al Cr³⁺ acuoso se le añade el reactivo difenilcarbazona no se origina ninguna coloración, debido a que no ocurre la reacción (Romero *et al.*, 2006).

6.5.5. Solución de 1,5 difenilcarbazida (0.5% p/v)

Esta solución se prepara al momento de su uso, por lo cual se toma en cuenta el volumen necesario. Se pesa 0.05 g 1,5 difenilcarbazida y se disuelve en 10 ml de acetona (Gunasundari, 2013).

Esta solución se almacena en frascos de color ámbar a 4 °C hasta su uso con la finalidad de impedir la formación de productos secundarios con la acción de la luz (NMX-AA-044-SCFI-2014, Doria *et al.*, 2013)

Esta solución posee un color transparente al momento de prepararla, después toma un color amarillo claro.

6.5.6. Curva de calibración

Empleando la solución madre de 1000 mg L⁻¹ de Cr⁶⁺ se prepara las soluciones patrones 5 ml en el intervalo de concentración de 0.5 a 10 mg L⁻¹. Se transfiere 1 ml de las soluciones patrón a matraces aforados. A cada uno se adiciona 135 µl de H₂SO₄ 3 M y 265 µl de una solución de 1,5 difenilcarbazida (DPC) al 0.5% (p / v)). El volumen

de la muestra se afora a 10 ml, posteriormente, se agita y se dejar reposar de 5 a 10 min para desarrollo completo del color rojo-violeta, transcurrido este tiempo, se lee inmediatamente. Antes de leer la absorbancia de los estándares, se ajusta el espectrofotómetro con el blanco a cero de absorbancia. Se mide la absorbancia de los estándares a una longitud de onda de 540 nm en una celda de cuarzo de 1 cm. Se registra las lecturas de las absorbancias, posteriormente se grafica la absorbancia en función de la concentración de las soluciones de Cr^{6+} .

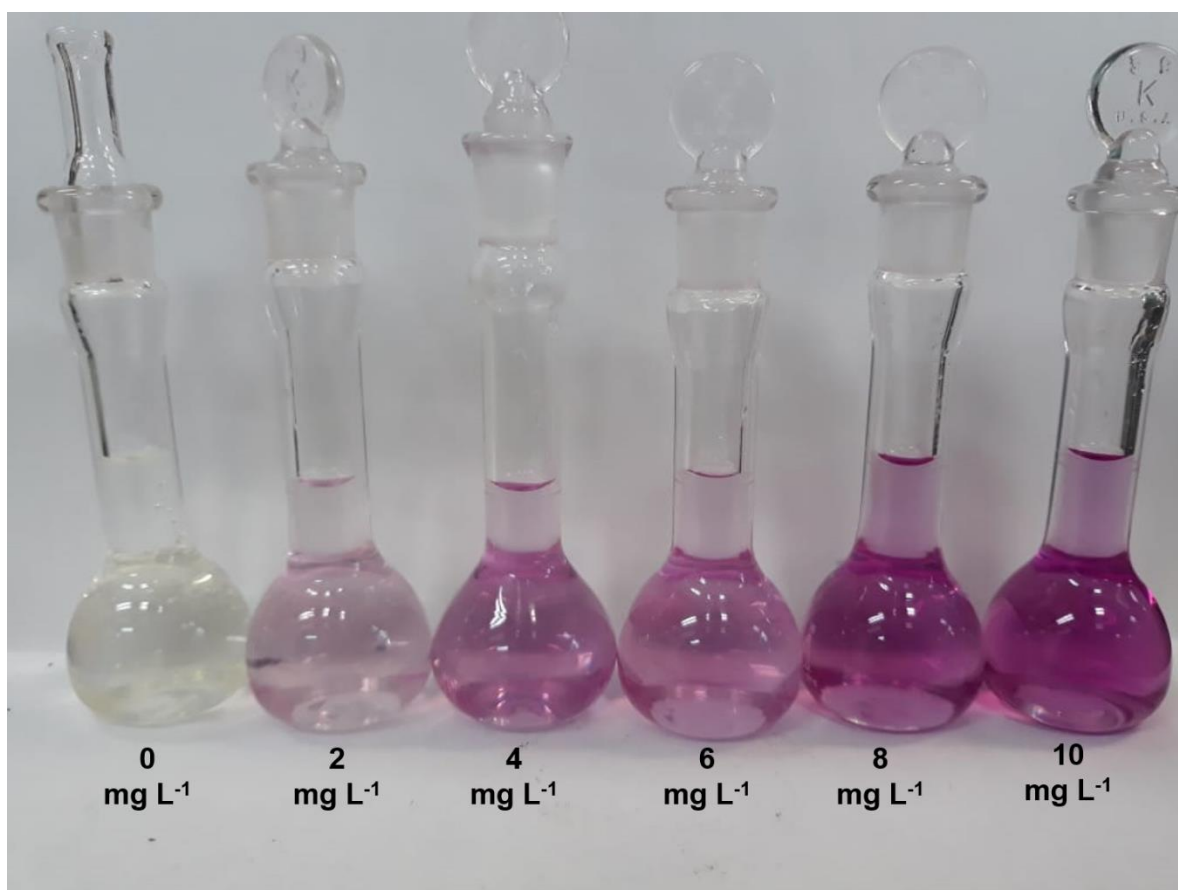


Figura 6. Curva de calibración con el método de 1,5 difenilcarbazida.

6.5.7. Preparación de las muestras

Para determinar la concentración residual de Cr^{6+} , los medios de cultivo después de la cosecha se centrifugan a 10,000 rpm durante 10 min y se reserva los sobrenadantes para analizar mediante espectrofotometría de absorción UV-vis por complejación con 1,5 difenilcarbazida (DPC).

Para el caso de la determinación de la concentración de cromo total en los medios de cultivo, es necesario filtrar las muestras con membranas de 0.45 μm , para evitar obstrucciones en el capilar del equipo y ajustar el pH de la solución filtrada a $\leq 3 \pm 0.1$, debido a las propiedades fisicoquímicas del Cr^{3+} que tiende a precipitarse en condiciones neutras a básicas, lo que podría con llevar a un sesgo en la medición.

6.5.8. Determinación de Cr^{6+} de muestras de caldo de cultivo

Se determina la concentración de Cr^{6+} presente en la muestra directamente de la curva de calibración preparada a partir de la solución patrón $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.

Después de la centrifugación de los medios de cultivo cosechados, se transfiere 1 ml del sobrenadante a matraces aforados. A cada una se adiciona 135 μl de H_2SO_4 3 M y 265 μl de DPC al 0.5% (p / v)). El volumen de la muestra se afora a 10 ml, se agita y se dejar reposar de 5 a 10 min para desarrollo completo del color rojo-violeta, transcurrido este tiempo, se lee inmediatamente. Antes de leer la absorbancia de las muestras, se ajusta el espectrofotómetro con el blanco a cero de absorbancia.

6.5.9. Determinación de Cr total en medios de cultivo

La concentración de cromo total en los medios de cultivo se mide mediante espectrofotometría de absorción atómica con llama de aire/acetileno (AAS-F). Las muestras previamente deben estar filtradas y acidificadas, a un pH $\leq 3 \pm 0.1$.



Figura 7. Determinación de cromo total en medios de cultivo con equipo de absorción atómica GBC, Avanta.

6.5.10. Determinación de Cr³⁺

La concentración de Cr³⁺ en solución se determina por la diferencia entre la concentración total y la concentración de Cr⁶⁺ (Di Natale, Erto, Lancia, & Musmarra, 2015).

A partir de la concentración total de cromo y de Cr⁶⁺ se calcula la concentración de Cr³⁺.

Usando las ecuaciones (Onchoke & Sasu, 2016):

$$[Cr_{(total)}] - [Cr^{6+}] = [Cr^{3+}]$$
$$\frac{[Cr_{(total)}] - [Cr^{6+}]}{[Cr_{(total)}]} \times 100\%$$

6.6. Digestión de biomasa

Las muestras que contienen partículas o material orgánico generalmente requieren pretratamiento antes del análisis espectroscópico. El análisis de “metales totales” incluye todos los metales, inorgánicos y orgánicos, tanto disueltos como particulados. Para reducir la interferencia de materia orgánica y convertir metales asociados con partículas a una forma del metal libre que puede determinarse mediante espectrometría de absorción atómica, se utiliza una de las técnicas de digestión.

Para determinar la concentración de cromo total adsorbido en biomasa, los medios de cultivo después de la cosecha se centrifugan a 10,000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se reserva para la determinación de cromo total y Cr⁶⁺, por otro lado, se realiza dos lavados de las células con solución salina fisiológica y un tercer lavado con agua desionizada.

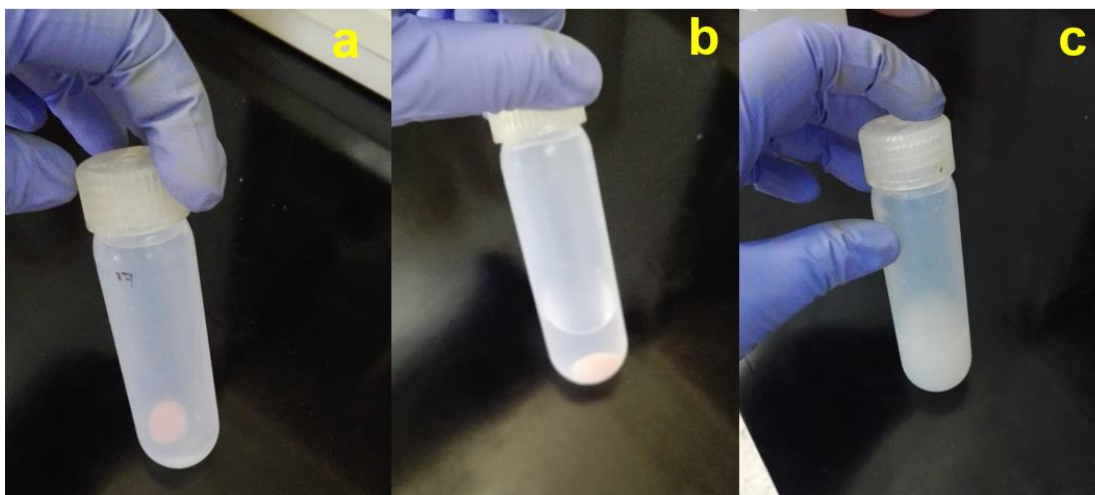


Figura 8. Lavado de células a) botón de las células b) adición de solución salina c) resuspensión de las células.

Las células se dejan secar durante 12 horas a 60°C en tubos a peso constante para determinar el peso seco de las muestras. Se requiere una muestra representativa de hasta 0.5 g que se suspende en 10 ml de HNO_3 concentrado, se agrega agua desionizada hasta alcanzar un volumen de 50 ml, seguido de homogenización de la solución, se dejar reposar durante 15 min.

Las muestras se colocan en recipientes de teflón, los recipientes se sellan y se colocan en el carrusel que se ensambla en la plataforma giratoria.



Figura 9. Digestión de muestras a) tubos de teflón b) carrusel con muestras c) sistema de reacción acelerado por microondas, modelo MARSxpress.

Se programa el sistema de reacción acelerado por microondas, modelo MARSxpress para calentar las muestras a $200 \pm 4^{\circ}\text{C}$ en 10 minutos. Se enciende el sistema de

microondas asegurándose de que la mesa giratoria esté girando y que el ventilador de extracción esté encendido. Al finalizar el programa de microondas, se deja que los recipientes se enfríen durante al menos 5 minutos en la unidad antes de retirarlos. Después de enfriar, se transfiere a frascos limpiadas con ácido. Si el peso neto de la muestra más el ácido disminuyó en más del 10%, la muestra se desecha. En dado caso que la muestra digerida contenga partículas, se filtra, centrifuga o se deposita durante la noche y se decanta, posteriormente a esto la muestra está lista para la determinación de cromo total por espectroscopía de absorción atómica.

6.7. Análisis estadístico

La correlación entre las variables, concentración de Cr^{6+} , potencial de óxido-reducción, pH y oxígeno disuelto, fue procesada mediante el paquete estadístico SAS Versión 9.1. Los datos de crecimiento bacteriano fue reportado en log (UFC ml^{-1}) y la concentración de Cr^{6+} fueron procesados en el programa mediante un análisis Probit para determinar el IC_{50} con un nivel de confianza del 95%. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado.

7. Resultados

7.1. Caracterización de arcilla roja

7.1.1. Microscopía electrónica de barrido

La figura 10 se observa la micrografía de la arcilla roja por microscopía electrónica de barrido. La micrografía fue realizada con una ampliación de 750X, la imagen a₁ es un magnificado de la imagen a, con una ampliación de 1,500X.

Se realizó este análisis solamente a las arcillas a las que se le aplicó el tratamiento térmico y antes de su empleo en la adsorción de iones de Cr⁶⁺.

Mediante las micrografías es posible analizar la morfología superficial del material adsorbente. Al analizar las micrografías con el programa tpsDig para medir el tamaño de las partículas, fue posible confirmar que el material está formado por partículas de tamaño micrométrico. Estas partículas a su vez están se conglomeran en partículas de mayor tamaño. El material tiene un rango de tamaño de partícula de 5-70 μm, lo que indica una alta dispersión en el tamaño de partícula.

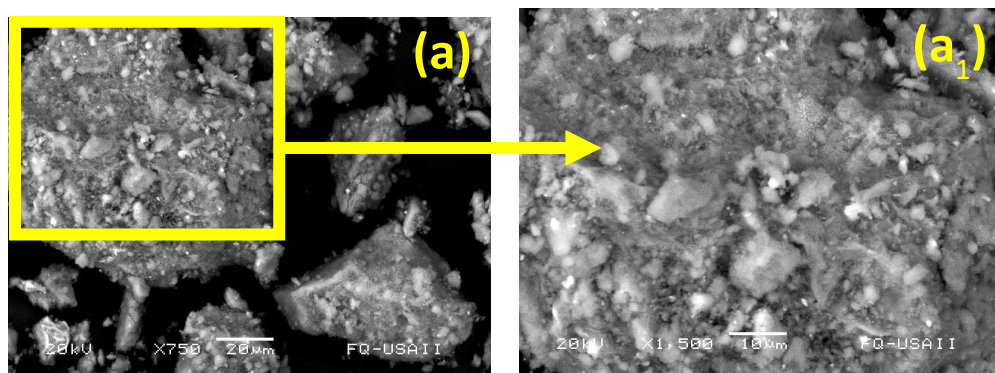


Figura 10. Micrografía de la arcilla roja calcinada con una ampliación de 750X antes de emplearse para adsorción de iones de Cr⁶⁺. Imagen a₁, es magnificado de imagen a.

En la figura 11 se muestra el mapeo de la arcilla roja donde se observa la presencia de Si, Al, Ca, Mg, Fe, K, Ti y Na.

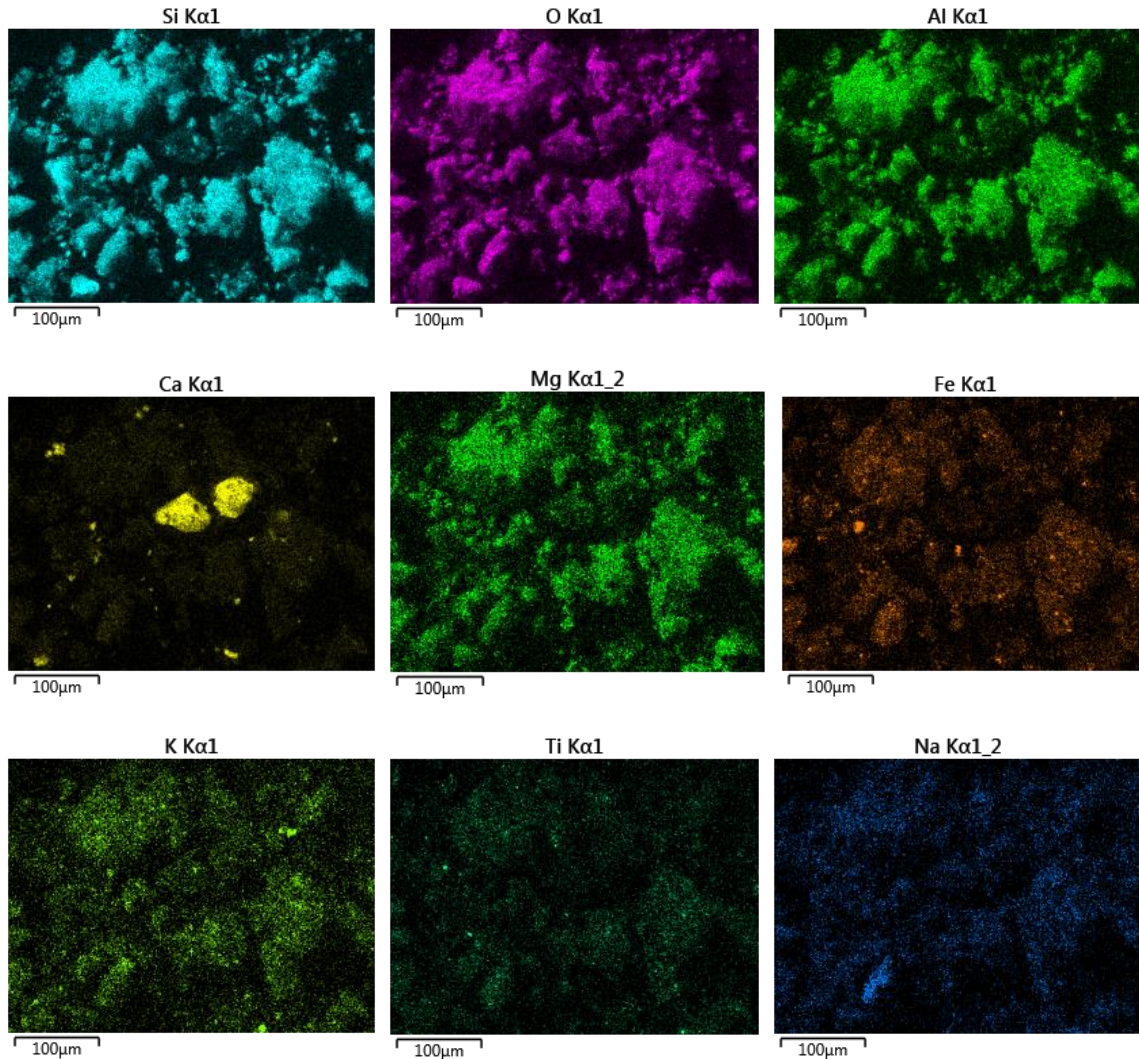


Figura 11. Mapeo de la arcilla roja calcinada.

El carbono presente en la muestra no se tomó en cuenta dado que se coloca como recubrimiento de la muestra para realizar el análisis. La mayoría de las muestras de materiales no conductores están recubiertas con una fina capa de material conductor, comúnmente carbono, oro u otro metal o aleación. El carbono es más deseable para el análisis elemental, mientras que los revestimientos metálicos son más efectivos para aplicaciones de imágenes electrónicas de alta resolución.

Se recubre la muestra con una capa delgada entre 5-50 nm, no lo suficientemente gruesa para enmascarar la morfología de la superficie, pero lo suficiente para

proporcionar un recubrimiento conductor para disipar los artefactos de carga, cualquier acumulación de calor resultante y minimizar el daño del haz.

Debido a que cada elemento tiene una estructura atómica única que permite un conjunto único de picos en su espectro de emisión electromagnética, es posible determinar la composición elemental de una muestra irradiándola con rayos X.

En la figura 12 se muestra los resultados del análisis elemental puntual de EDS, el cual se realizó en diferentes puntos de la superficie con el fin de minimizar cualquier anomalía posible que surja de la naturaleza heterogénea de la superficie analizada. Los valores de EDS dados representan un promedio de cuarenta y tres puntos de datos obtenidos de ubicaciones aleatorias en la superficie del mineral.

Los resultados del análisis químico elemental semicuantitativo producido por la técnica EDS muestran que el contenido elemental promedio de la arcilla fue 56.4% O, 22.85% Si, 8.04% Al, 6.4% Fe, 2.74% Ca, 0.97% Ti junto con cantidades menores de Mg, Na, P, Cl, K, V y Mn.

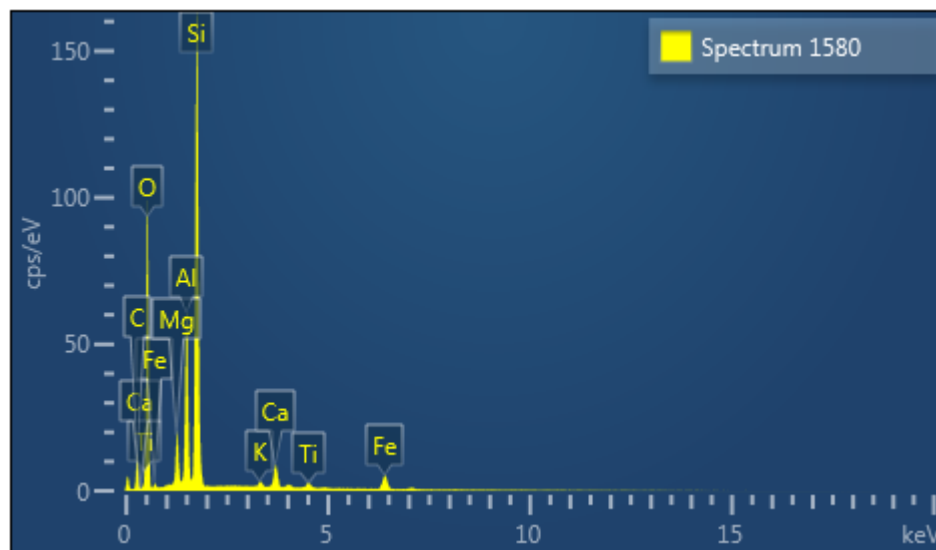


Figura 12. Espectro EDS para la arcilla roja que muestra picos de elementos.

7.1.1. Difracción de rayos X

En la figura 13 se muestra la difracción de rayos X de la arcilla roja antes y después del tratamiento térmico, posteriormente se realizó la identificación de las fases presentes en las arcillas rojas. Una fase cristalina siempre produce un patrón de difracción característico, ya sea que se encuentre en estado puro o como constituyente de una mezcla. Este hecho es la base para el uso de la difracción como método de análisis químico. El análisis cualitativo se realiza mediante la identificación del patrón de las fases presentes en la muestra. Para la identificación cualitativa se usa la Powder Diffraction File (PDF), esta base de datos contiene información cristalográfica y bibliográfica para las fases cristalinas de diversos materiales.

Se utilizó el programa PCPDFWIN para gestionar la base de datos Powder Diffraction File (PDF). En la tabla 6 se resume los compuestos correspondientes a los picos de mayor intensidad y el PDF que corresponde a la fase cristalina identificada, en ANEXOS se encuentran la ficha completa de cada fase donde se encuentra los diagramas de difracción. La mayoría de estos compuestos se han determinado en otros soportes como son la grava (Arguelles, 2016) y de manera aislada se ha reportado su capacidad de adsorción de metales, efectuados por diversos tipos de interacciones. En algunos otros casos su especiación debido a reacciones redox, que favorecen el cambio en estado de oxidación.

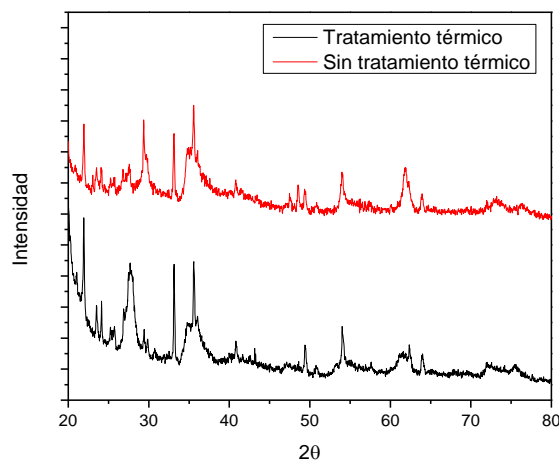


Figura 13. Difracción de rayos X de la arcilla roja con y sin tratamiento térmico a 800 ° C por 24 horas.

Tabla 6. Compuestos correspondientes a los picos de mayor intensidad.

Arcilla sin tratamiento térmico		Arcilla con tratamiento térmico	
Compuesto	PDF	Compuesto	PDF
Fe ₂ O ₃ (Hematita)	PDF 00-024-0072	Fe ₂ O ₃ (Hematita)	PDF 00-024-0072
SiO ₂ (Óxido de silicio)	PDF 00-029-0085	SiO ₂ (Óxido de silicio)	PDF 00-029-0085
Al ₂ O ₃ (Óxido de aluminio)	PDF 01-078-5519	Al ₂ O ₃ (Óxido de aluminio)	PDF 01-078-5519
TiO ₂ (Rutilo)	PDF 01-072-7374	TiO ₂ (Rutilo)	PDF 01-072-7374
Ca(CO ₃) (Calcita)	PDF 00-083-1762	Ca (Calcio)	PDF 00-001-0737
CaO ₂ (Peróxido de Calcio)	PDF 00-003-0865	CaO ₂ (Peróxido de Calcio)	PDF 00-003-0865

En la figura 14 y 15 se realizó la identificación de las fases cristalinas de la arcilla roja antes y después del tratamiento térmico. Las fases son en su mayoría las mismas con excepción de la presencia de calcita (Ca(CO₃)) antes del tratamiento térmico, posterior a este, se encuentra calcio y peróxido de calcio. Probablemente en la calcinación a 800 ° C el carbonato de calcio se calienta hasta que se descompone térmicamente para formar óxidos de calcio y dióxido de carbono.

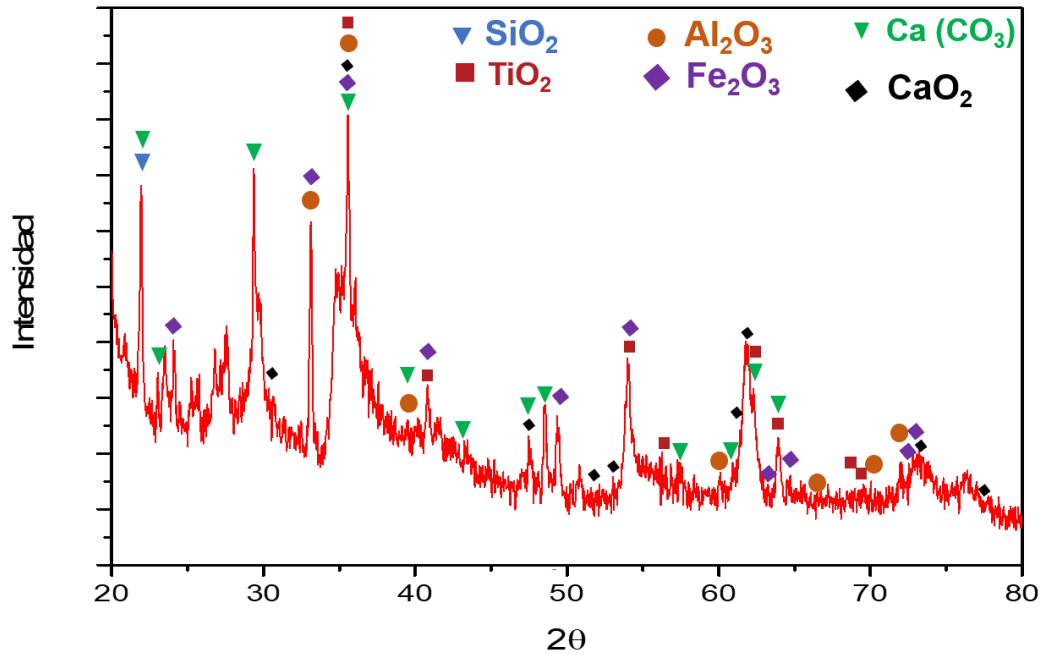


Figura 14. Identificación de las fases cristalinas en la arcilla antes del tratamiento térmico.

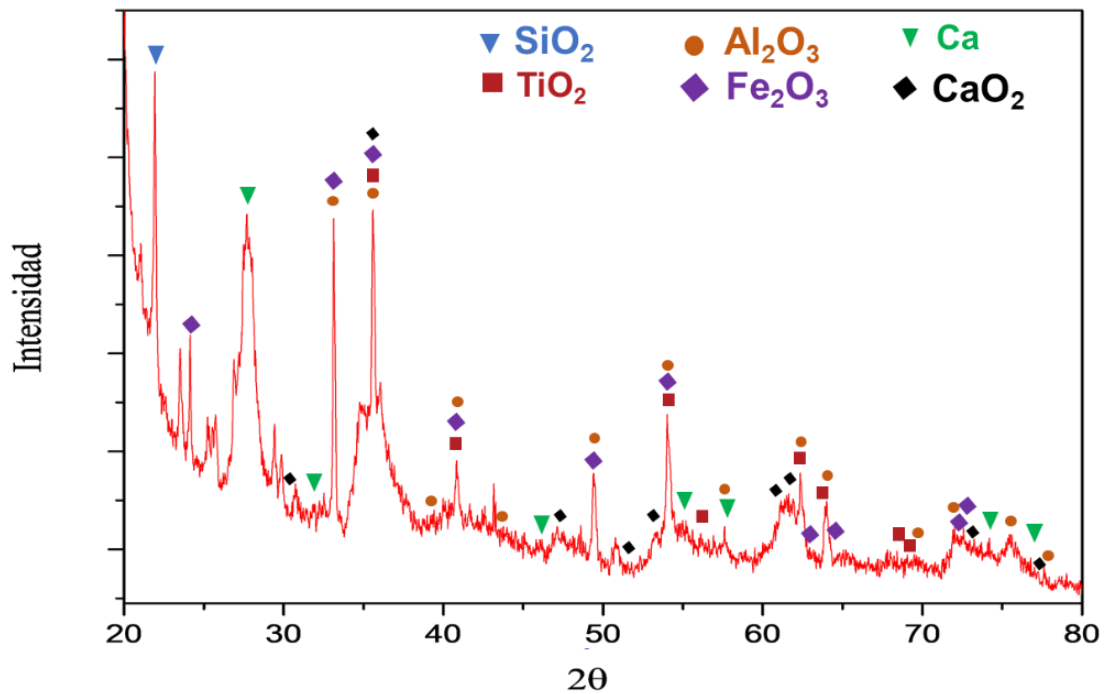


Figura 15. Identificación de las fases cristalinas en la arcilla después del tratamiento térmico.

7.1.2. Análisis de B.E.T.

La figura 16 y 17 representan las isotermas de adsorción-desorción de nitrógeno de las arcillas rojas. Las isotermas de las dos muestras, es decir, la arcilla antes y después del tratamiento térmico, correspondían al modelo de isoterma tipo IV de la clasificación IUPAC, que es típico para materiales mesoporos, donde ocurre un mecanismo de llenado en multicapas. Los bucles de histéresis de estas isotermas parecen ser de tipo H3 (clasificación IUPAC), que no presenta ninguna adsorción limitante a alta presión relativa, se observa con agregados de partículas similares a placas.

Las isotermas de fisisorción de nitrógeno se analizaron mediante el método de Barrett-Joyner-Halenda (BJH) para determinar el área específica (B.E.T), volumen específico de poro (BJH), tamaño de poro promedio (BJH) y distribución de tamaño de poro (BJH y DFT). La presencia de diferentes distribuciones y diámetros de tamaño de mesoporos se verificaron mediante análisis BJH. En las figuras 18 y 19 se presenta la distribución de tamaño de poro de la arcilla antes y después de tratamiento térmico.

Los parámetros estructurales de la estructura de poro, que incluyen áreas superficiales específicas, volumen poroso y diámetro medio de poro, se resumen en la Tabla 7.

Tabla 7. Resultados de análisis de Brunauer, Emmett y Teller (B.E.T.): área superficial, diámetro promedio de poro y volumen de poro de la arcilla roja

Adsorbente	Área superficial específica (m ² g ⁻¹)	Diámetro promedio de poros de adsorción (nm)	Volumen de poros (cm ³ g ⁻¹)
Arcilla roja sin tratamiento térmico	52.5748	4.26 -127	0.137370
Arcilla roja con tratamiento térmico	42.1389	4 - 250.8	0.155089 -0.162165

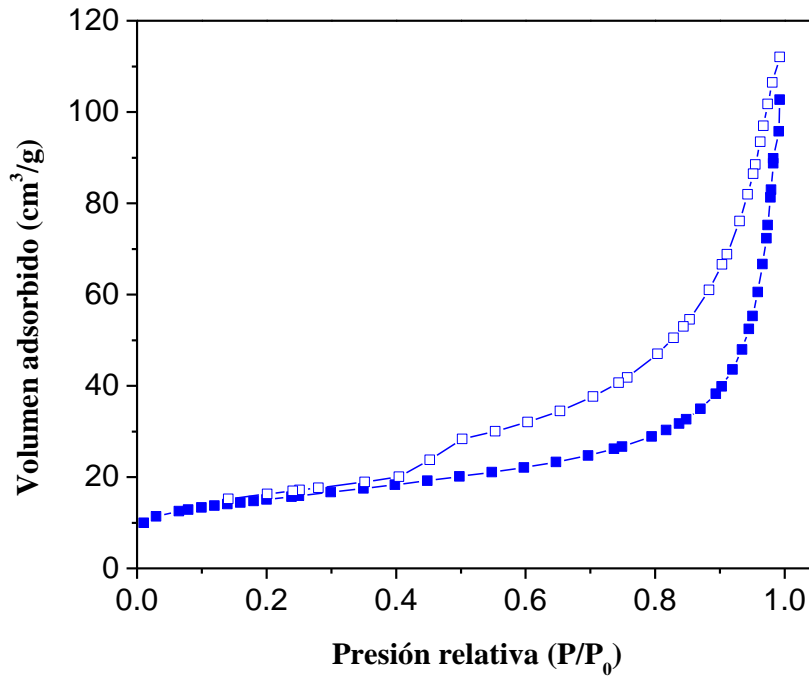


Figura 16. Cantidad adsorbida de N₂ en cm³ g⁻¹ (ordenada) en función de la presión relativa (abscisa) de la arcilla sin calcinar.

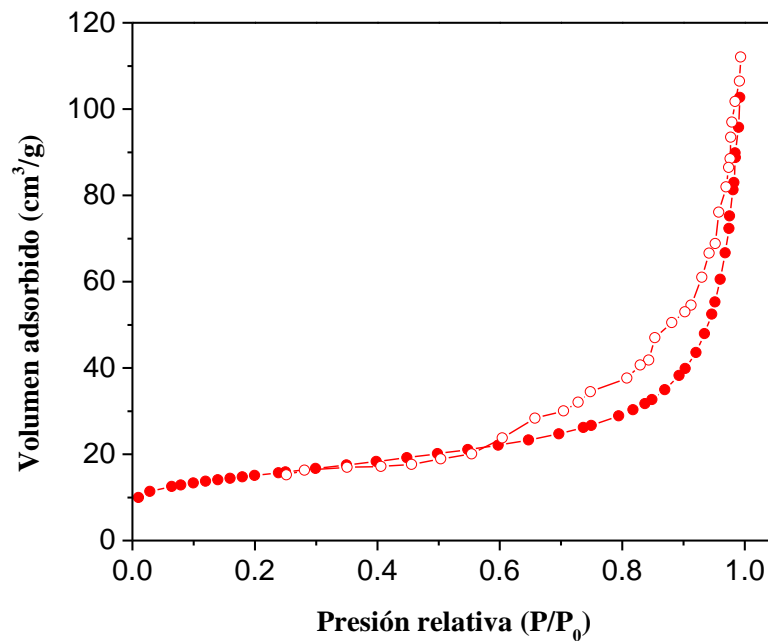


Figura 17. Cantidad adsorbida de N₂ en cm³ g⁻¹ (ordenada) en función de la presión relativa (abscisa) de la arcilla calcinada.

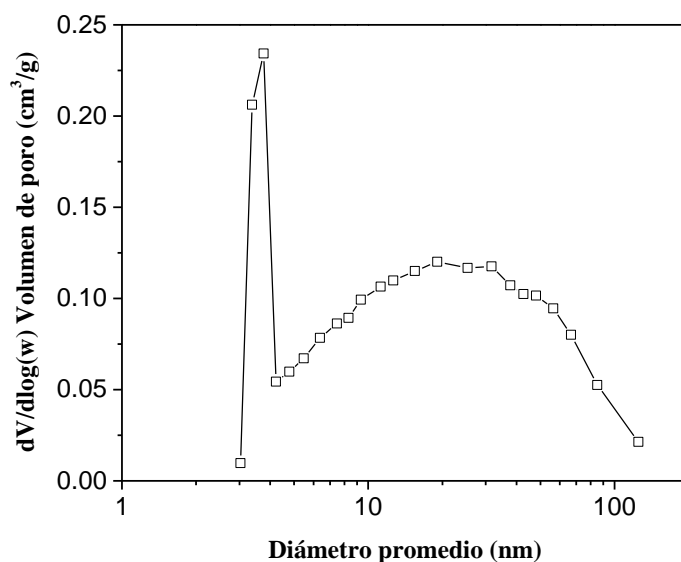


Figura 18. Distribución de tamaño de poro en arcilla sin calcinar.

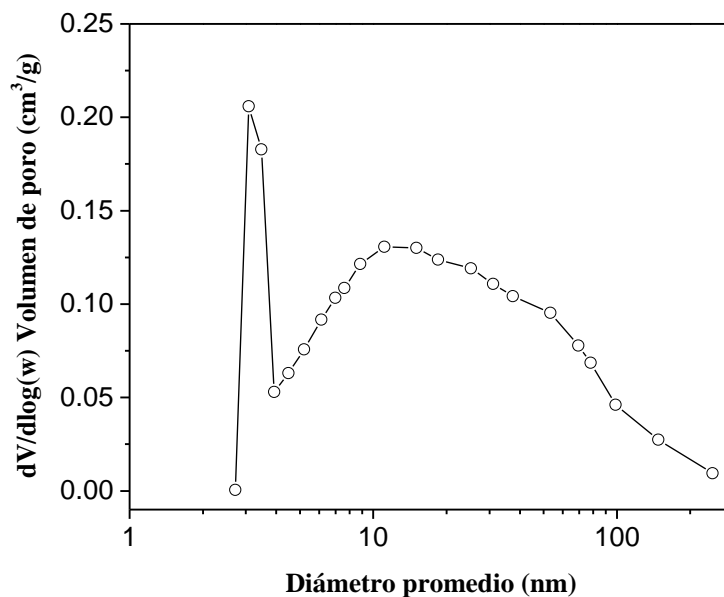


Figura 19. Distribución de tamaño de poro en arcilla calcinada.

El tratamiento térmico que consistió en la calcinación de la arcilla a una temperatura de 800 ° C disminuyó el área de superficie BET específica y aumento la variedad de volumen de poros.

7.1.3. Punto de Carga Cero

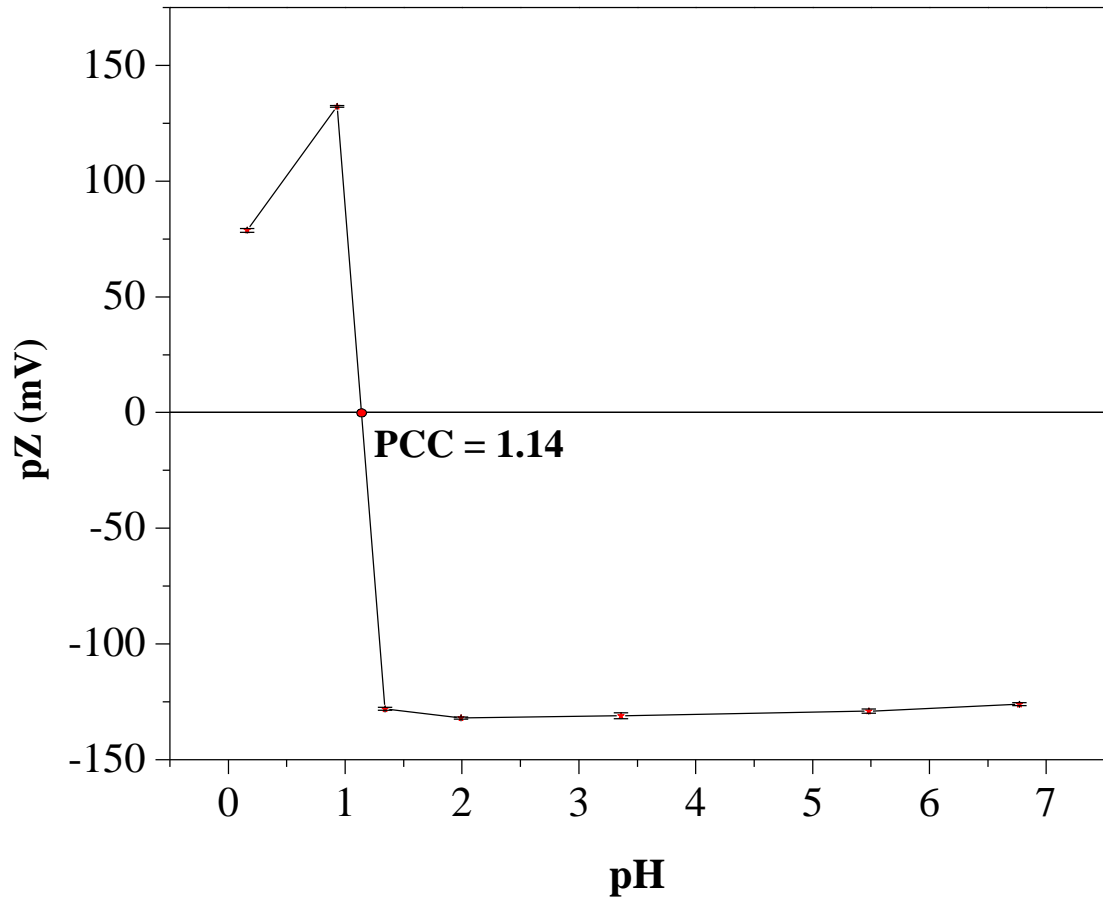


Figura 20. Potencial zeta de la arcilla en función del pH.

El punto carga cero de las arcillas rojas resultó ser 1.14, es decir que a este pH la carga neta del material es 0, por lo que si el material se coloca en una solución acuosa con un $\text{pH} \geq 1.14$ el material se cargará negativamente. Dado que el contaminante objetivo son iones con carga negativa, habrá repulsión por cargas.

Arguelles, 2016 realizó micrografías y difracción de rayos X al soporte utilizado, para comparar la arcilla roja del presente trabajo se complementó la caracterización de la granzón con la determinación del punto carga cero.

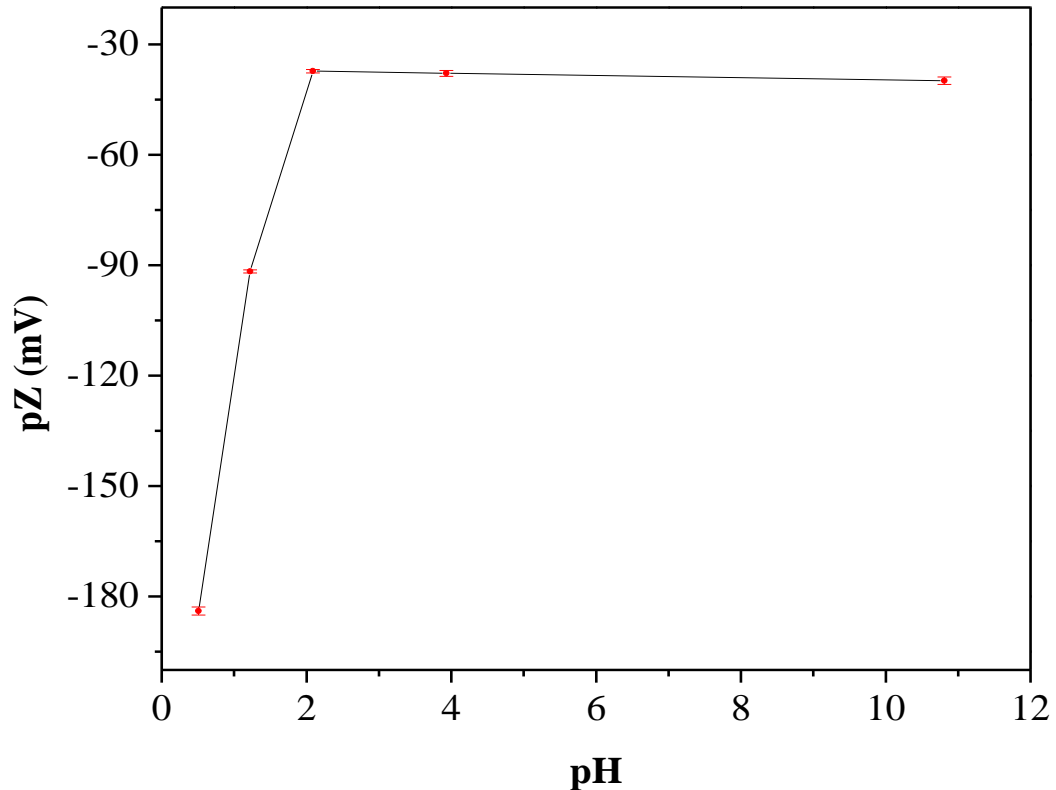


Figura 21. Potencial zeta del granzón en función del pH.

La determinación del PCC del material no fue posible porque se obtuvieron valores negativos de potencial zeta dentro del rango de pH en el que se realizaron las mediciones ($1 \leq \text{pH} \leq 10$). Este tipo de comportamiento se ha reportado antes en otros materiales (Kaya & Yukselen, 2005).

7.2. Estudio del efecto de: pH, masa de adsorbente, tiempo de agitación y concentración inicial de los iones Cr^{6+} en la adsorción de las arcillas rojas

7.2.1. El efecto del pH en la adsorción

El pH de mayor adsorción fue el 3.0 y todos los demás experimentos se realizaron a este pH. A medida que el pH se incrementó de 3 a 7, el porcentaje de remoción disminuye como se muestra en la gráfica. A medida que aumenta el pH, la superficie de la arcilla probablemente se carga negativamente, esto provoca una mayor repulsión entre el Cr^{6+} y el material adsorbente. Por lo tanto, el porcentaje de remoción disminuye con el aumento del pH. También se muestra gráficamente el cambio en la capacidad de absorción del Cr^{6+} con pH.

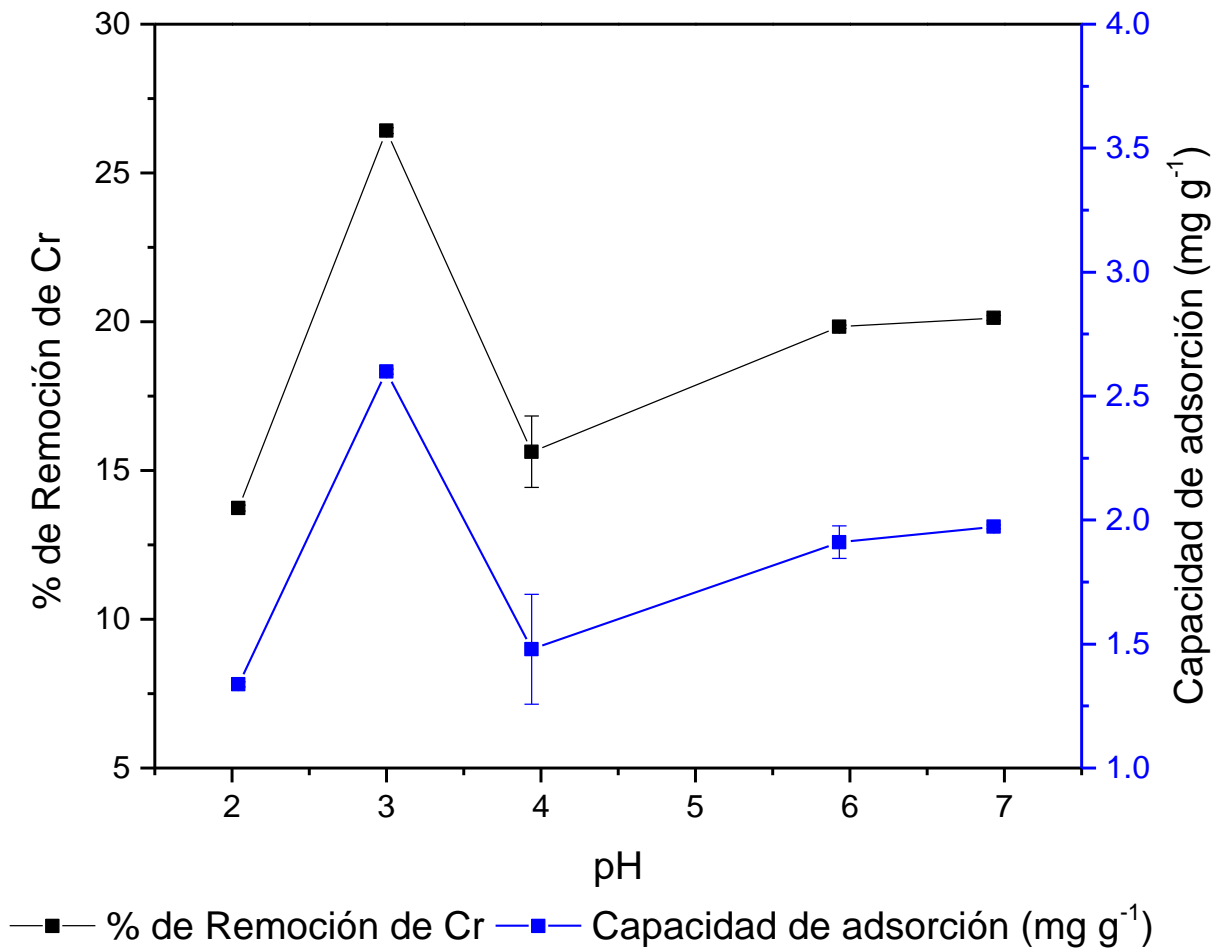


Figura 22. Efecto del pH en el porcentaje de remoción y en la capacidad de adsorción.

7.2.2. Efecto de la concentración de la arcilla en la adsorción

A medida que la dosificación del adsorbente aumenta, el porcentaje de remoción aumenta primero, alcanza el máximo. A medida que la dosificación del adsorbente aumenta la capacidad de absorción de disminuye como se muestra en la figura. A una concentración de adsorbente más baja, el número de sitios activos es mayor. Con el aumento de la dosificación adsorbente, tiene lugar la agregación de partículas, como resultado el porcentaje de remoción y la capacidad de absorción de Cr^{6+} disminuyen.

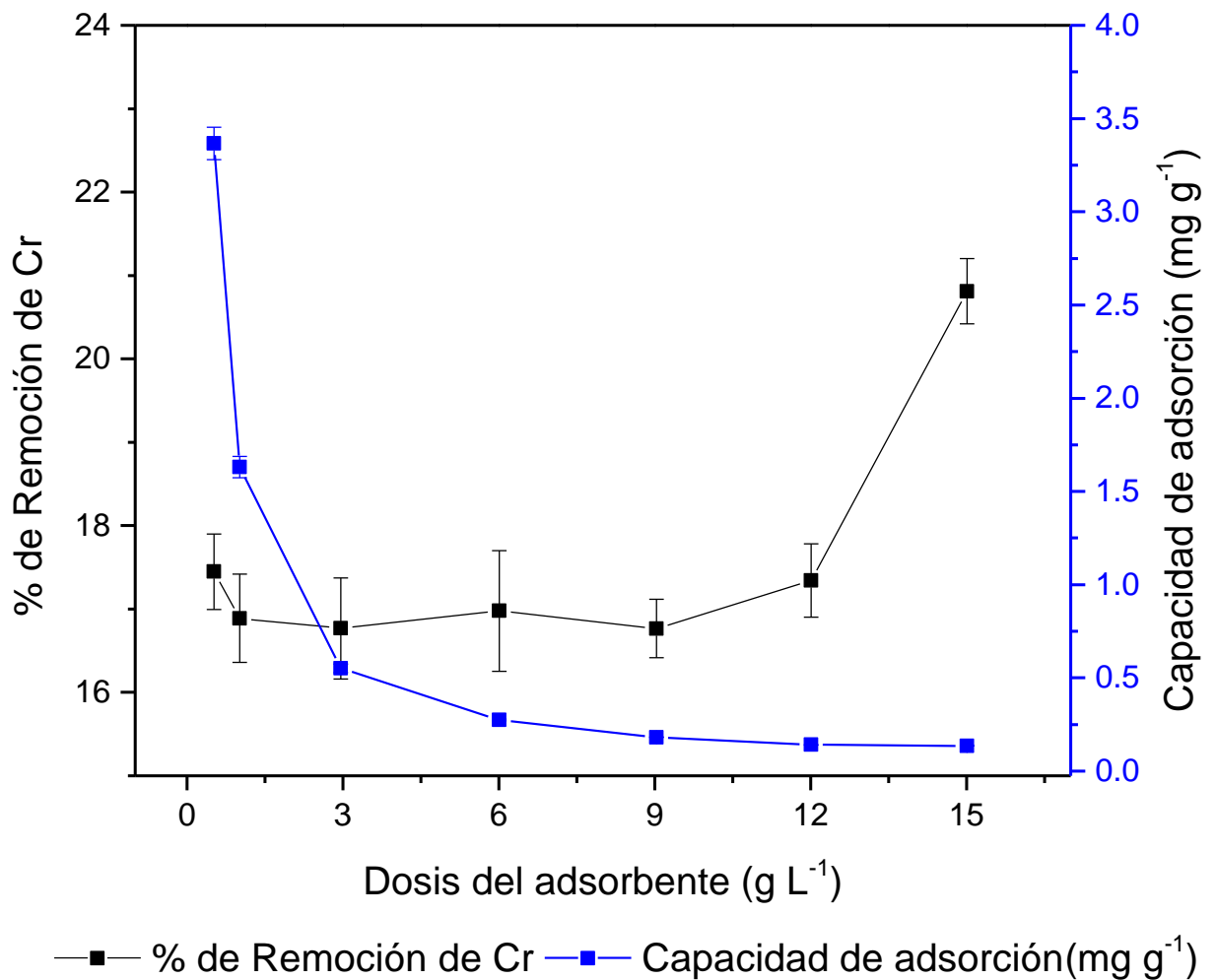


Figura 23. Efecto de la concentración de las arcillas en el porcentaje de remoción y en la capacidad de adsorción.

7.2.3. Efecto del tiempo en la adsorción

A medida que el tiempo de adsorción cambia de 30 a 360 minutos, primero el porcentaje de remoción aumentó al 24.8% a los 180 min, mantuvo un comportamiento constante a partir de los 240 min. A medida que avanza el tiempo, la cobertura superficial del adsorbente es alta y además no tiene lugar adsorción. La figura 24 muestra el efecto del tiempo en la capacidad de adsorción.

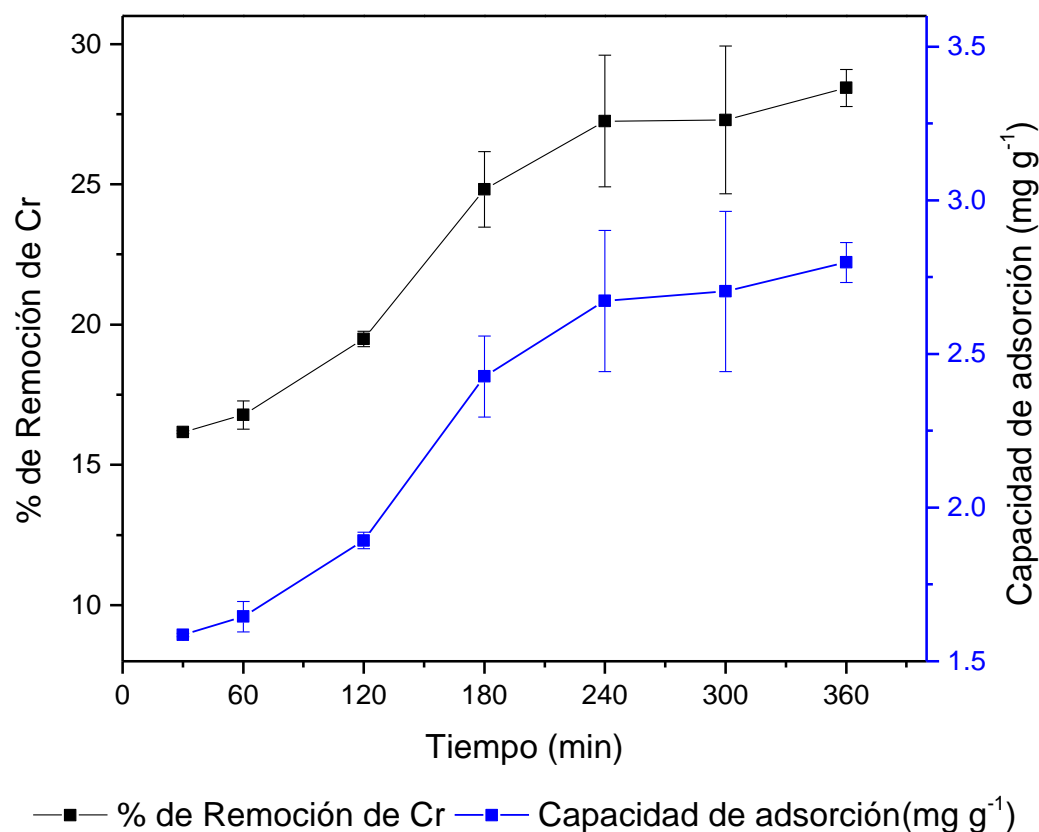


Figura 24. Efecto del tiempo en el porcentaje de remoción y en la capacidad de adsorción.

7.2.4. Efecto de la concentración inicial de Cr⁶⁺

En la figura se muestra los resultados experimentales variando la concentración inicial de Cr⁶⁺ en el rango de 0.5 a 20 mg L⁻¹. El pH, la dosificación del adsorbente, el tiempo y la temperatura se mantuvo constante. Se empleó una dosis de adsorbente de 15 g L⁻¹ durante 180 min a pH 3.0 a 25 ° C.

Se observa que la concentración inicial afecta tanto al porcentaje de remoción como a la capacidad de adsorción del adsorbente. El primero disminuye con el aumento en la concentración inicial y el segundo aumenta.

Con respecto al porcentaje de remoción, el hecho de que la concentración inicial de Cr⁶⁺ y el porcentaje de remoción sean inversamente proporcionales puede explicarse

considerando que la cantidad de iones Cr^{6+} en la solución es menor a concentraciones bajas y los sitios activos disponibles en la superficie del adsorbente los remueven con mayor eficacia.

A medida que aumenta la concentración inicial de iones Cr^{6+} , la disponibilidad de los sitios activos se reduce y aún después de haber alcanzado el equilibrio quedan iones en la disolución. Con respecto al segundo, la masa de Cr^{6+} adsorbido aumenta de la misma manera que lo hace la concentración inicial, mostrando una relación directa.

Esto debido a que se emplea una masa de arcilla constante en todo el experimento, llevando al material hasta la saturación por lo que la capacidad de adsorción aumenta.

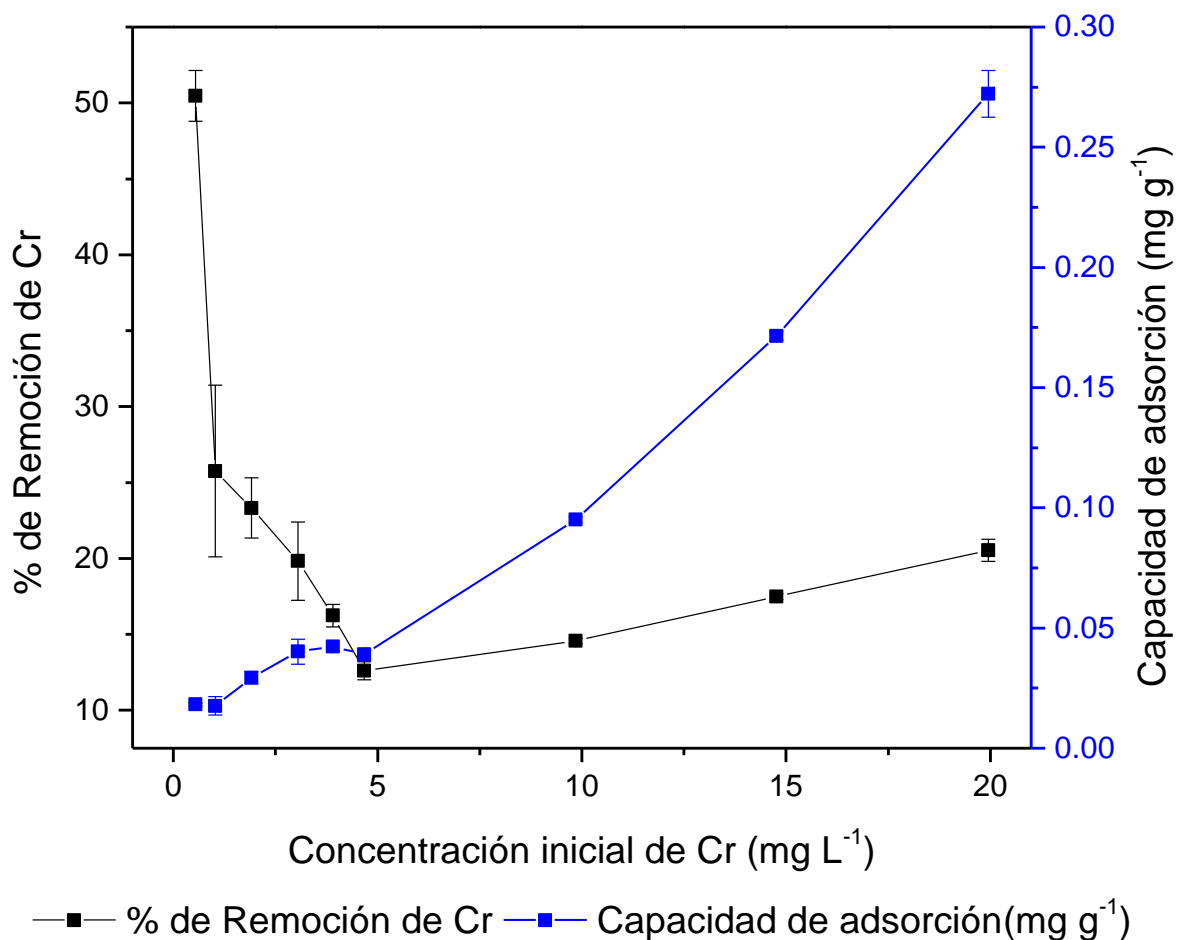


Figura 25. Efecto de la concentración inicial en el porcentaje de remoción y en la capacidad de adsorción.

7.2.5. Isoterma de adsorción

Con los datos obtenidos experimentalmente, se procede a realizar las isotermas de adsorción de Langmuir y de Freundlich para la arcilla roja. Una vez ajustados los datos experimentales obtenidos en equilibrio, a las isotermas de Langmuir y Freundlich, se obtuvieron las constantes de adsorción, en la tabla se aprecia las ecuaciones de las isotermas para cada adsorbente en estudio.

7.2.5.1. Isoterma de Langmuir

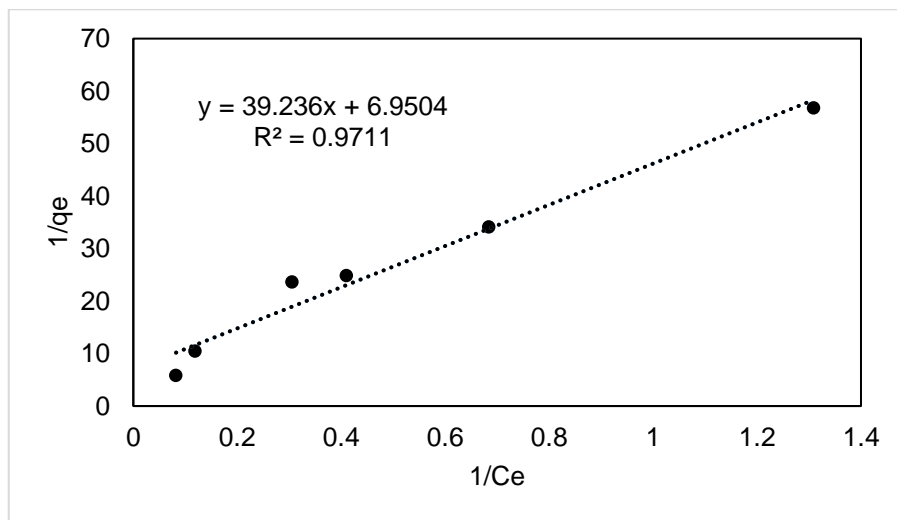


Figura 26. Isoterma linealizada de Langmuir para Cr⁶⁺ en arcilla roja, formato Excel.

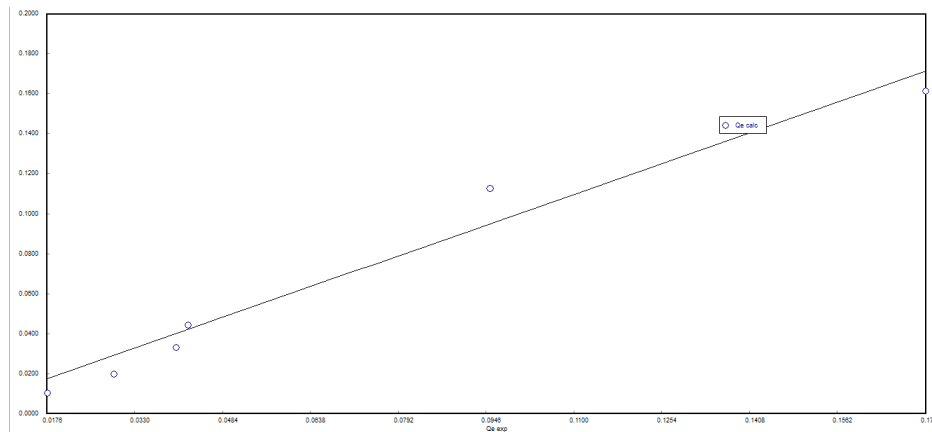


Figura 27. Isoterma linealizada de Langmuir para Cr⁶⁺ en arcilla roja, ajuste con Polymath.

Tabla 8. Constantes de las isothermas de adsorción de Langmuir

Parámetro	Valor
q_m	4.7087
K_l	0.0029

Tabla 9. Ecuación obtenida para Langmuir

Ecuación	$q_e = \frac{0.0114C_e}{1 + 0.0029 C_e}$
Coefficiente de correlación	0.9644

7.2.5.1. Isotherma de Freundlich

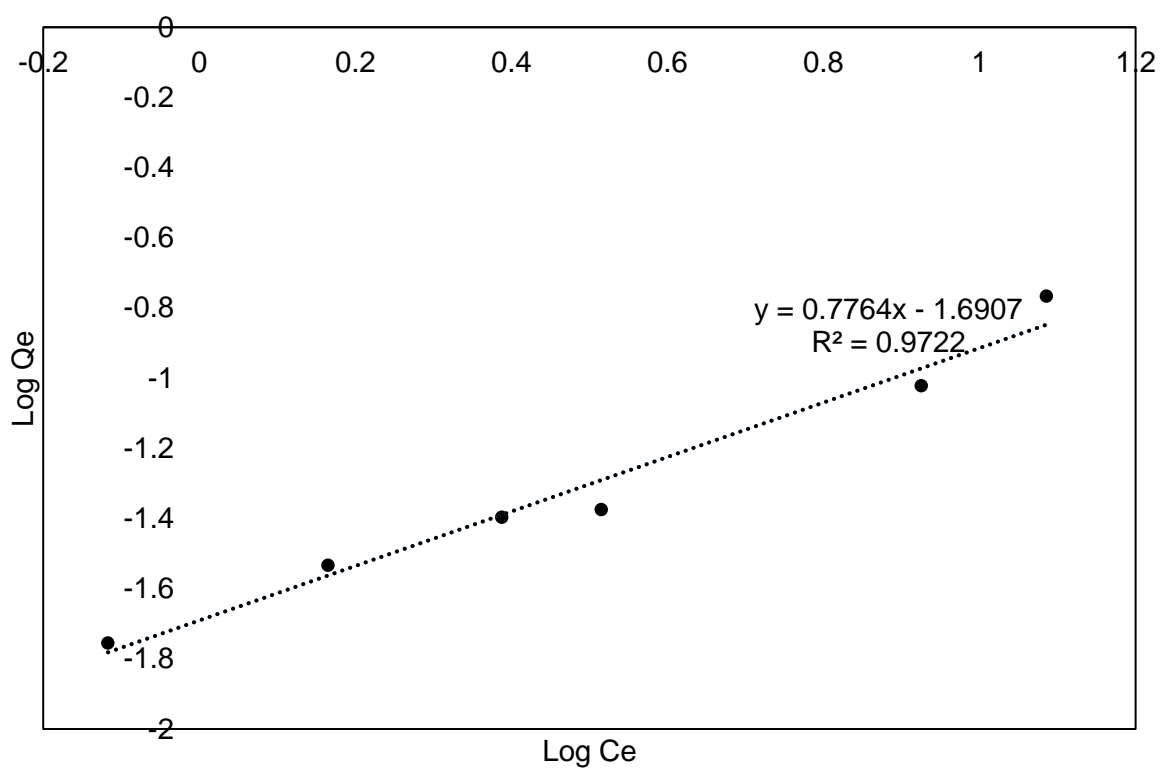


Figura 28. Isotherma linealizada de Freundlich para Cr^{6+} en arcilla roja, formato Excel.

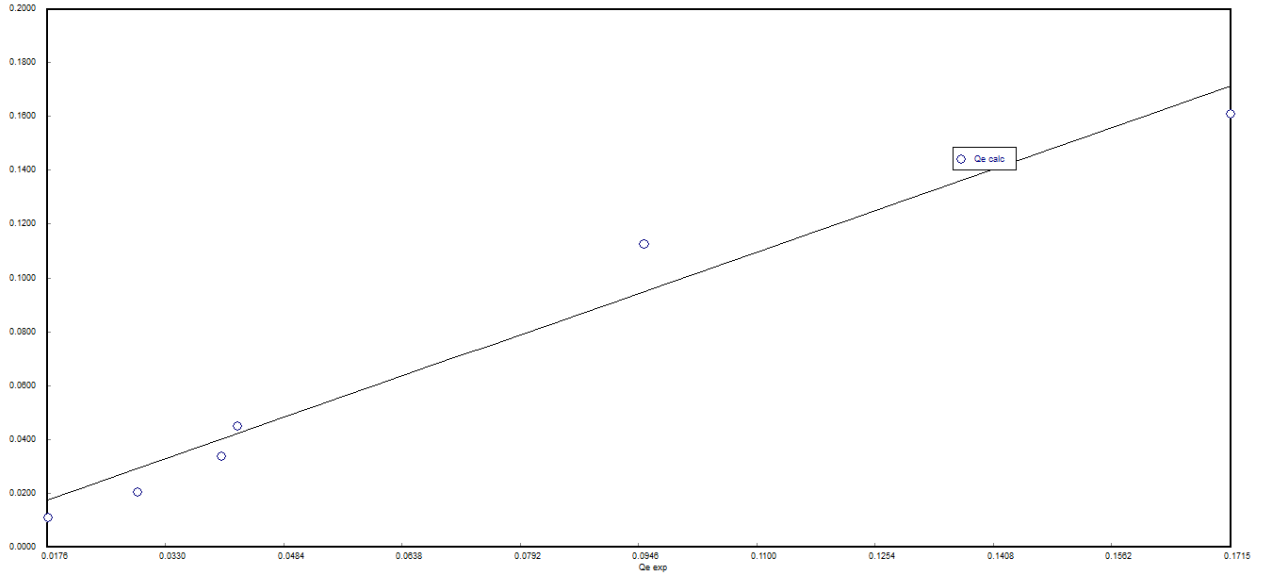


Figura 29. Isoterma linealizada de Freundlich para Cr^{6+} en arcilla roja, formato Polymath.

Tabla 10. Constantes de las isotermas de adsorción de Freundlich.

Parámetro	Valor
K_f	0.0144
N	1.0340

Tabla 11. Ecuación obtenida para Freundlich.

Ecuación	$q_e = 0.0149C_e^{1/1.0340}$
Coefficiente de correlación	0.9658

La adsorción se ve favorecida al utilizar los pellets de arcilla, sin embargo, no se realizó una caracterización de los mismos, que pudiera dilucidar la razón por lo cual existe una mayor adsorción. En teoría el quitosano se volatiliza en la calcinación, pero podría cambiar la porosidad del material.

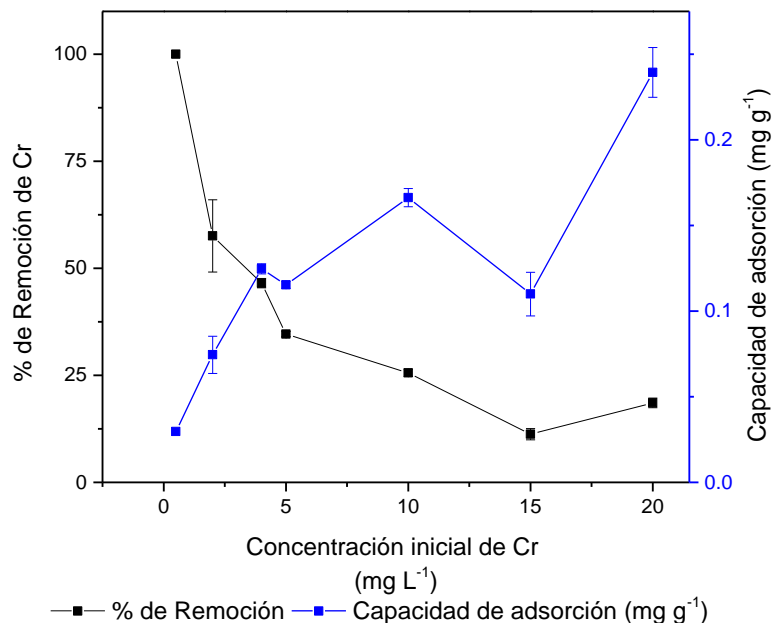


Figura 30. Efecto de la concentración de Cr^{6+} en la adsorción utilizando pellets de arcilla roja.

7.3. Comparación entre granzón y arcilla roja

En el grupo de trabajo anteriormente se trabajó con granzón para adsorción de Cr^{6+} , a modo comparativo se resumen las características del material.

	Granzón	Arcilla roja calcinada (91 μm)
Composición	FeO, Al_2O_3 , SiO_2 , CaO, K_2O y Na_2O	Fe_2O_3 , SiO_2 , Al_2O_3 , TiO_2 , Ca y CaO_2
Porosidad	5 mm (aproximada)	4 - 250.8 nm
PCC	1.14	>12

En la figura 31 se muestra el porcentaje de remoción y la capacidad de adsorción de los diferentes soportes probados, los cuales fueron la arcilla roja calcinada tamizada a 91 μm , los pellets de la arcilla roja y el granzón.

Para estos experimentos se mezcló una solución 10 mg $\text{Cr}^{6+} \text{L}^{-1}$ a pH 3 y se colocó en agitación a 120 rpm durante 3 h. Después de alcanzar el equilibrio las muestras se

filtraron y se determinó la concentración total de Cr en solución mediante espectrofotometría de absorción atómica.

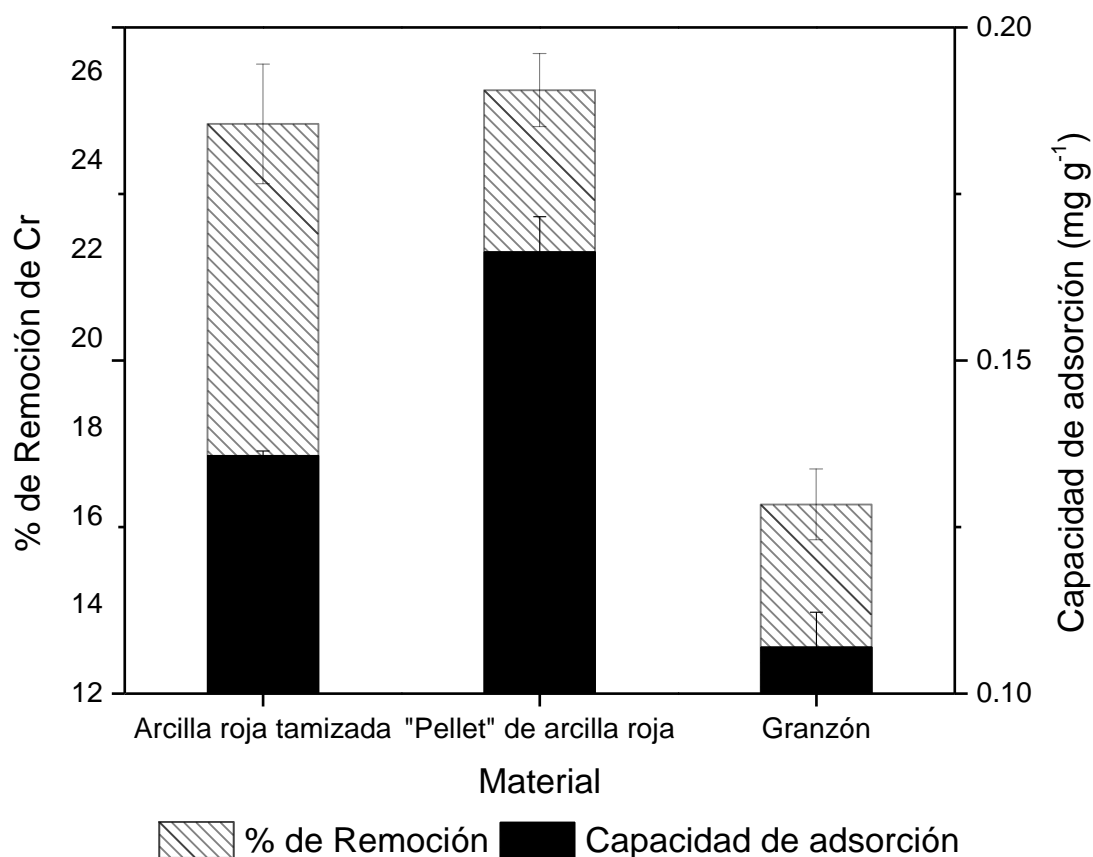


Figura 31. Comparación del porcentaje de remoción y la capacidad de adsorción entre la arcilla tamizada a 91 μm , los “pellets” de arcilla roja y el granzón.

Arguelles, 2016 reportó porcentajes de hasta 90-100% de adsorción de Cr^{6+} a un pH 7 utilizando granzón como soporte en un filtro percolador empleando una dosis de adsorbente de $2,278 \text{ g L}^{-1}$, pero al comparar la adsorción en los diferentes soportes en las condiciones anteriormente mencionadas, los “pellets” de arcilla roja son los que alcanzan el mayor porcentaje de remoción y poseen la mayor capacidad de adsorción. Esto podría explicarse debido al punto carga cero del granzón, el material posee un potencial zeta negativo a $\text{pH} \leq 11$, existe una repulsión por cargas con los iones del Cr^{6+} , además que posee un volumen de poro tiene un tamaño “aparente” de 5 mm, determinado por microscopía electrónica de barrido, mientras que el volumen de poro

de la arcilla está en el orden de 4- 250 nm. La arcilla al poseer poros más pequeños, lo convierte en mejor adsorbente en comparación con la granzón.

7.4. Ensayos biológicos

7.4.1. IC₅₀

Las concentraciones de cromo que causan el 20, 50 y 80% de reducción en la actividad metabólica (en comparación al control biótico) se refieren al IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀, respectivamente.

La actividad metabólica que se tomó como referencia para calcular la concentración de inhibición media fue el log (UFC).

Se utilizó el programa SAS para calcular el IC₂₀, IC₅₀ e IC₈₀ en todos tiempos de muestreo, estos valores cambiaron dependiendo el tiempo de exposición, al aumentar el tiempo de contacto la dosis necesaria para disminuir el 50% fue disminuyendo. En la tabla 12 se resume los resultados.

Tabla 12. Concentración de Cr⁶⁺ en mg L⁻¹ que causan el 20, 50 y 80% de reducción de la población bacteriana en log(UFC).

Tiempo (h)	IC ₂₀	IC ₅₀	IC ₈₀
3	12.93766	55.07184	234.42476
6	10.08282	56.90292	793.48159
9	4.91035	29.18928	173.51376
12	6.46539	18.17486	51.09135

7.4.2. Evaluación de la reducción de Cr⁶⁺ en medios estériles.

En la figura 32 se presenta la concentración de Cr⁶⁺ en medios de cultivo estériles, al no existir crecimiento alguno, se descarta la posibilidad de la disminución de la concentración de cromo total por adsorción a biomasa y se tiene la hipótesis de que algún componente del medio de cultivo o todos en conjunto son capaces de reducir

Cr⁶⁺ a Cr³⁺. Se midió la concentración de Cr⁶⁺ cada 3 horas y al cabo de 12 horas en los medios con una concentración de 10 a 2.5 mg de Cr⁶⁺ L⁻¹, se redujo solo el 0.125 al 0.20%.

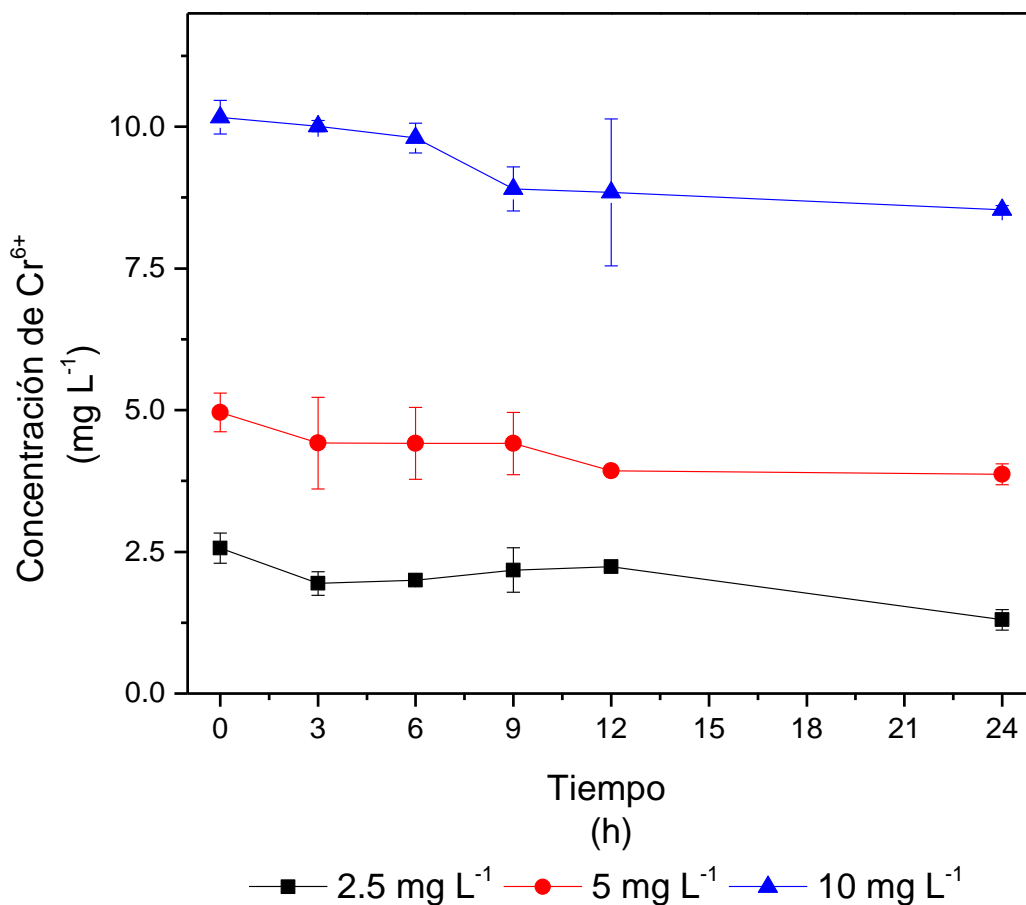


Figura 32. Concentración de Cr⁶⁺ contra tiempo, en medios de cultivo estériles.

Como se menciona en materiales y métodos el medio de cultivo para *A. tumefaciens* se compone por, manitol es la fuente de carbono para *A. tumefaciens*, en una concentración de 25 g L⁻¹, extracto de levadura en una concentración de 5 g L⁻¹ y peptona en una concentración de 3 g L⁻¹.

El manitol es el que se encuentra en mayor concentración y se le podría atribuir en parte a la reducción de Cr⁶⁺, Roldán en el 2000, reportó el posible mecanismo de reducción de Cr⁶⁺ por aldosas (glucitol y manitol). La reacción requiere la presencia de protones y, a baja acidez, la tasa redox es insignificante. El mismo mecanismo se

encuentra para la oxidación de los dos alditoles, y las constantes de velocidad son muy similares, lo que significa que la configuración en C(2) afecta solo ligeramente la velocidad redox.

La reacción implica una ruta de reducción $\text{Cr}^{6+} \rightarrow \text{Cr}^{5+} \rightarrow \text{Cr}^{3+}$, siendo la etapa $\text{Cr}^{6+} \rightarrow \text{Cr}^{5+}$ la que determina la velocidad. Aunque la reducción es posible, A $\text{pH} > 1$, las reacciones redox intramoleculares son muy lentas y los complejos intermediarios (Cr^{5+}) permanecen en solución durante varios días o semanas.

La peptona posee grupos sulfuro capaces de reducir el cromo.

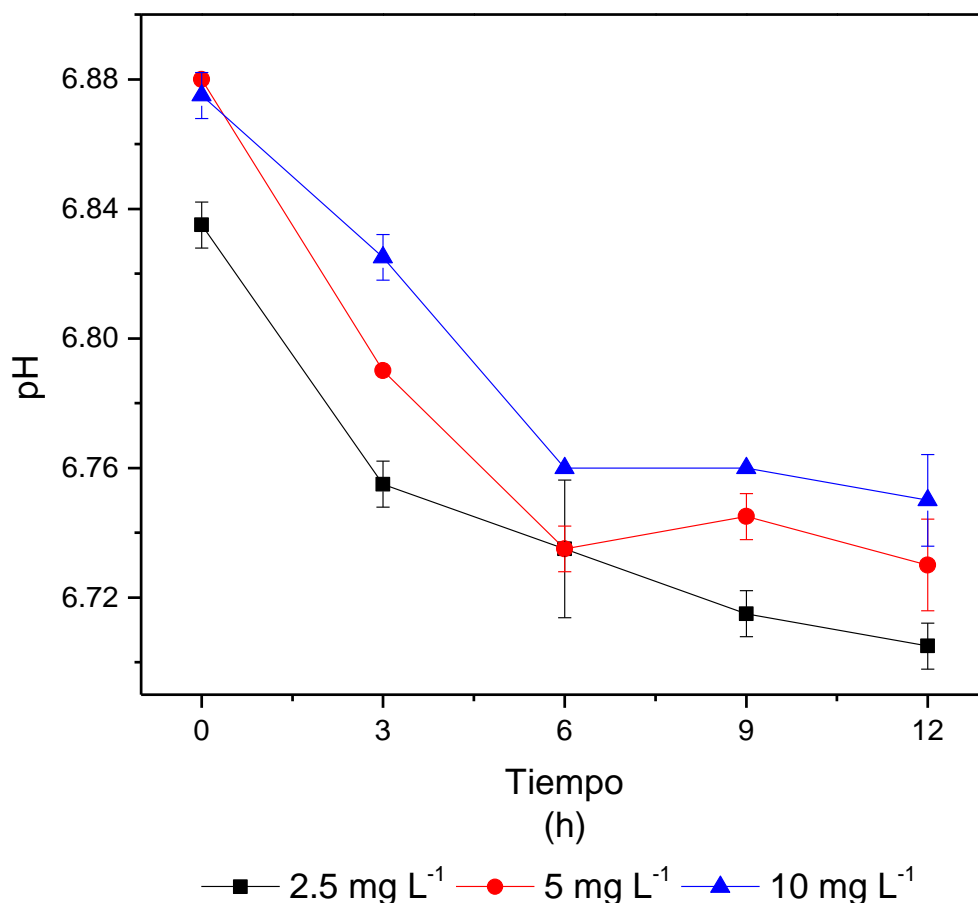


Figura 33. pH contra tiempo, en medios de cultivo estériles.

El pH del medio de cultivo estéril tiende a disminuir, podría deber a la transferencia de electrones, y si y solo si existe la reducción de Cr^{6+} por el manitol esto se podría explicar con el mecanismo propuesto por Roldán en el 2000, que propone que los

alditales son oxidados selectivamente por Cr^{6+} en el grupo OH primario para producir el ácido aldónico como el único producto de oxidación, lo que explica la acidificación del medio.

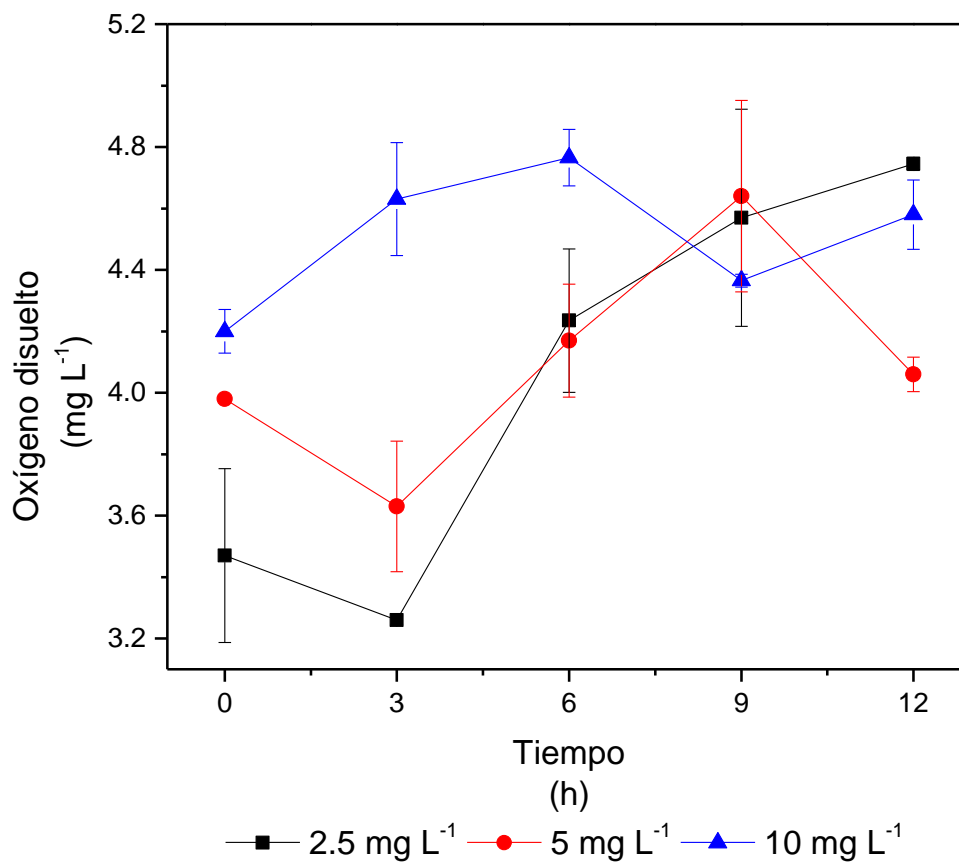


Figura 34. Oxígeno disuelto contra tiempo, en medios de cultivo estériles.

El oxígeno disuelto aumentó, pero los cultivos se mantuvieron en agitación a 120 rpm, por lo tanto, el sistema recibió aireación mecánica.

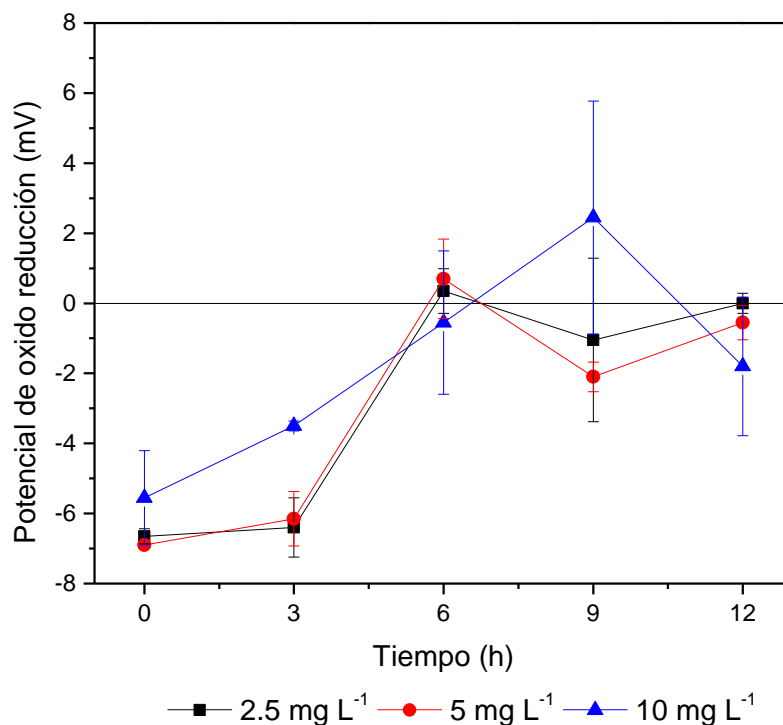


Figura 35. Potencial de óxido-reducción contra tiempo en medios de cultivo estériles.

Las especies de Cr^{6+} son fuertes agentes oxidantes por lo tanto, la adición de estos en el cultivo bacteriano da como resultado un salto brusco en el potencial de óxido-reducción (Chen, 1998).

7.4.3. Evaluación de la reducción de Cr^{6+} en medios inoculados con *A. tumefaciens*

En las figuras 36 y 37 respectivamente se presenta las curvas de crecimiento de *A. tumefaciens*, de modo indirecto por la medición de densidad óptica a 600 nm y de modo directo por conteo de unidades formadoras de colonias, la absorbancia se midió cada hora durante 12 horas. Se realizaron diluciones seriadas y siembra por el método de la microgota de Miles y Misra para el conteo de las unidades formadoras de colonias cada 3 horas durante 12 horas. En la figura 37, se gráfica el logaritmo de las unidades formadoras de colonias con respecto al tiempo para observar la viabilidad del microorganismo.

Los medios de cultivo fueron suplementados con 2.5, 5 y 10 mg L⁻¹ de Cr⁶⁺. No se probaron concentraciones más altas dado que se pretende que sea un sistema secuencial de Cr⁶⁺.

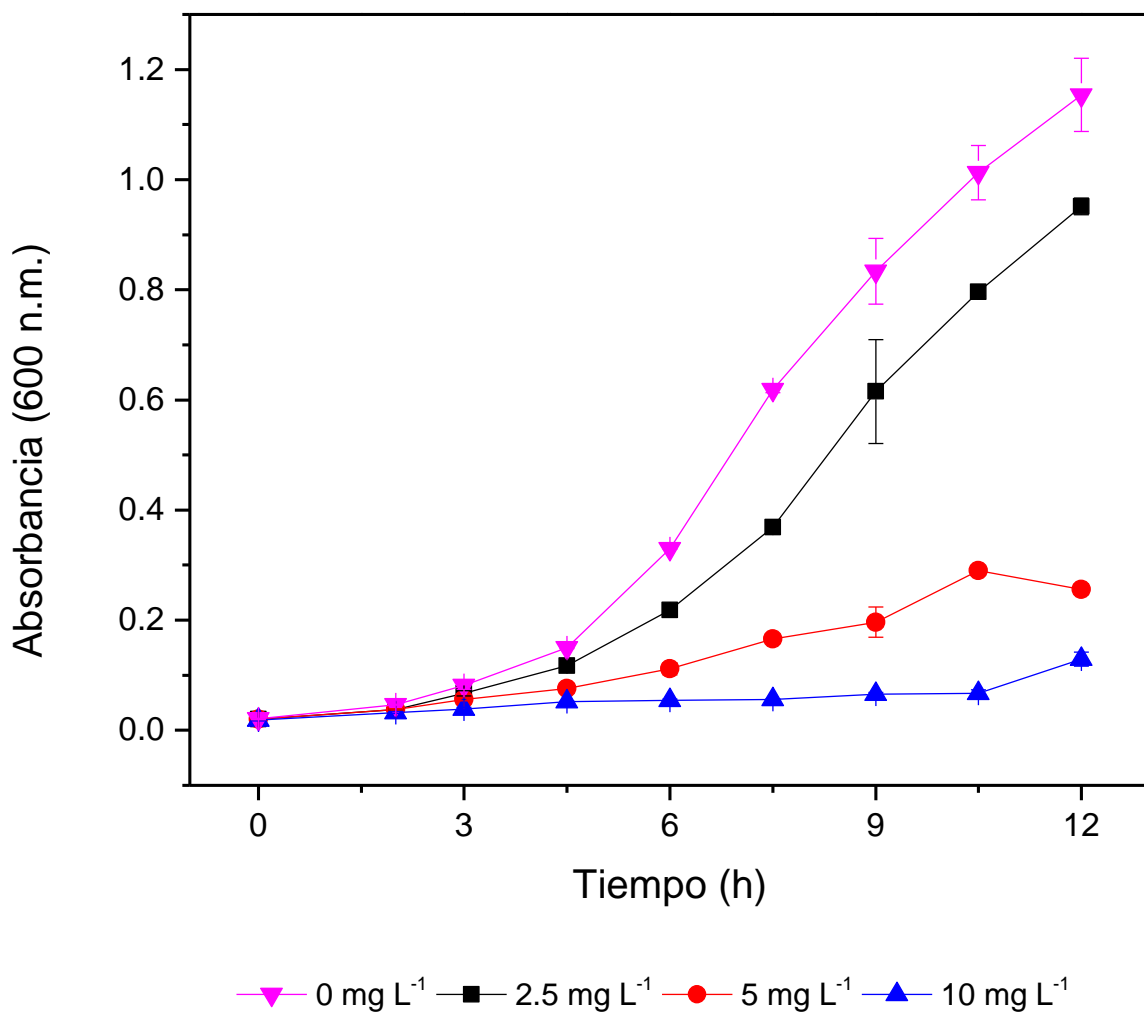


Figura 36. Absorbancia (600 n.m.) contra el tiempo (h), los medios de cultivo se suplementaron con diferentes concentraciones de Cr⁶⁺.

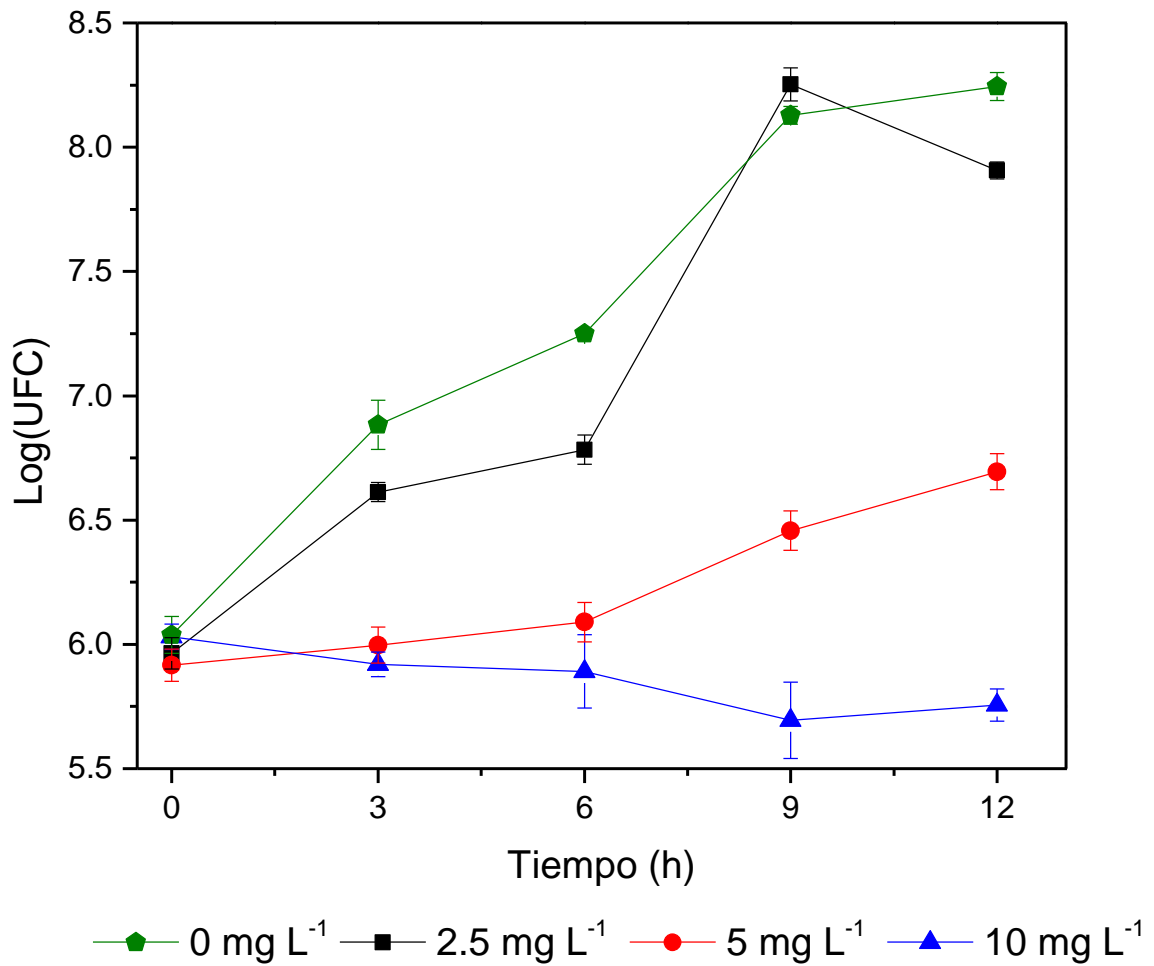


Figura 37. Crecimiento de *A. tumefaciens* en log(UFC) contra el tiempo.

En la figura 38 se presenta el pH del medio de cultivo inoculado con *A. tumefaciens*, el cual fue medido cada 3 horas, en contraste con los medios estériles en el que pH tiende a bajar como se aprecia en la figura 33, en los medios inoculados tiende a subir, la posible explicación sería que el microorganismo este liberando una sustancia en el medio que aumente el pH de este, sin embargo, no se realizó ningún análisis para medir que sustancias se encuentran en el medio.

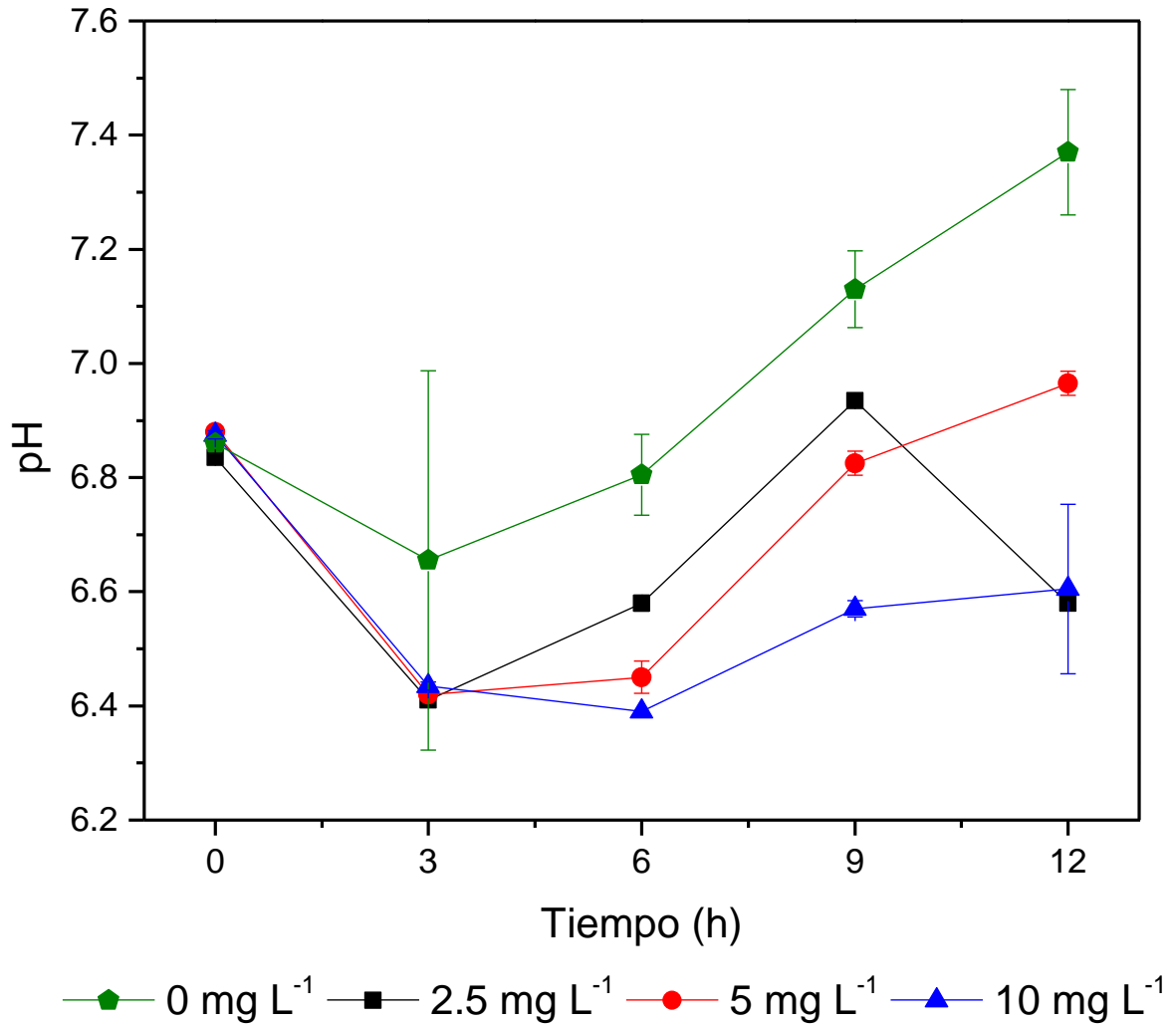


Figura 38. pH contra tiempo en el medio de cultivo con *A. tumefaciens*.

En la tabla 13 se enlista las velocidades de crecimiento específicas de *A. tumefaciens* en los medios suplementados con la determinada concentración de Cr⁶⁺, además se calculó el tiempo de duplicación, en el caso de la concentración de 10 mg L⁻¹ se observa que los valores son negativos, es decir, que el microorganismo a partir de 10 mg L⁻¹ no aumenta en unidades formadoras de colonias conforme transcurre el tiempo, pero no mueren inmediatamente, sino que disminuye su viabilidad.

Tabla 13. Velocidad de crecimiento específica y el tiempo de duplicación para cada concentración de Cr⁶⁺.

[Cr ⁶⁺] mg L ⁻¹	μ	td hrs
0	0.4343	1.60
2.5	0.4505	1.54
5	0.1549	4.47
10	-0.0595	-11.65

En la figura 39 se muestra la gráfica de la concentración de Cr⁶⁺ en el medio de cultivo, el cual fue determinado cada 3 horas durante 12 horas por el método de complejación con difenilcarbazida, cabe resaltar que sólo es la concentración del Cr⁶⁺ y no cromo total. Se realizó además un experimento a las 24 donde se determinó la concentración de cromo total, para discriminar si la disminución de la concentración de la especie Cr⁶⁺ disminuyó, porque efectivamente se redujo a Cr³⁺ o debido a que el Cr⁶⁺ fue adsorbido en la biomasa, dado que en todos los casos la menor concentración correspondió también con el mayor número de unidades formadoras de colonias en los medios.

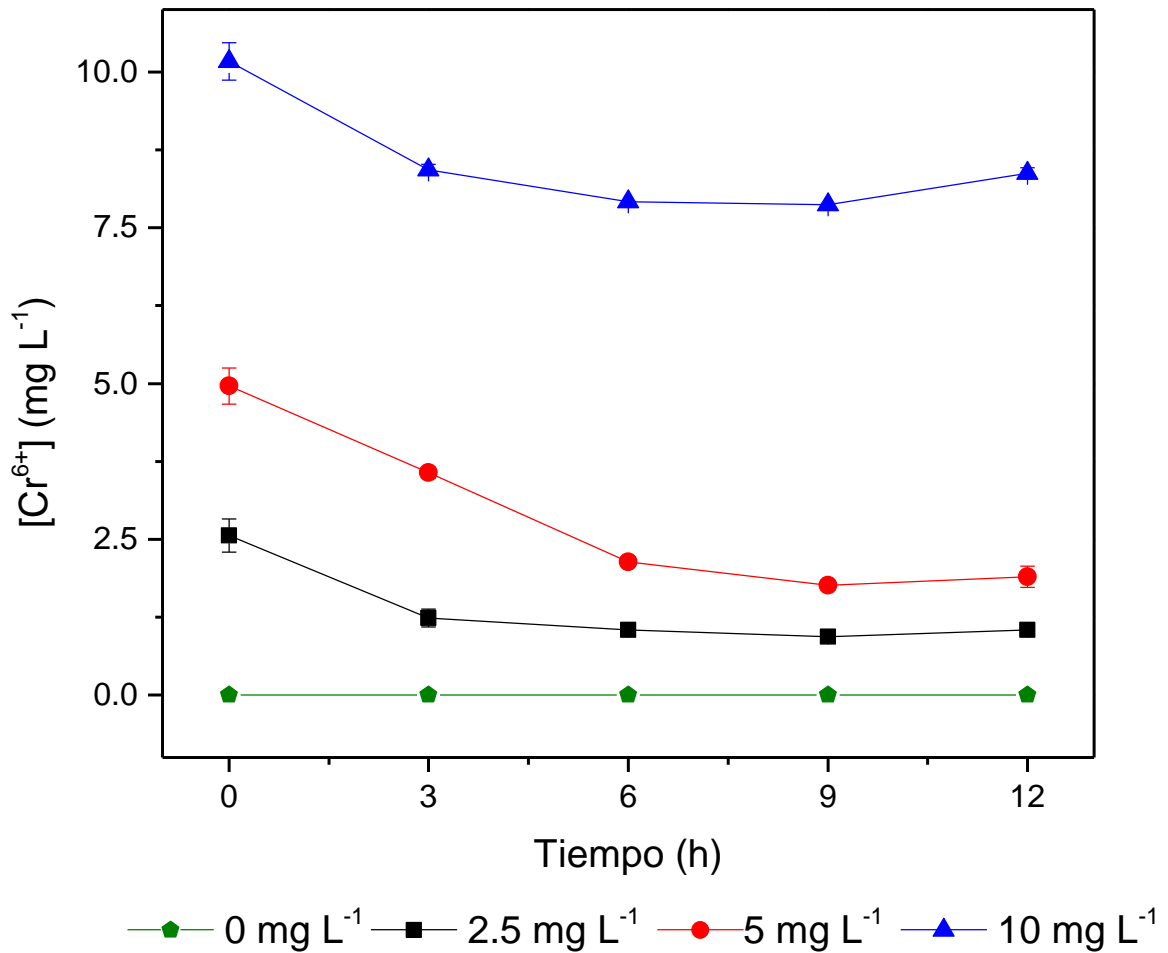


Figura 39. Concentración de Cr⁶⁺ (mg L⁻¹) en el medio de cultivo contra el tiempo.

En la figura 40 se muestra la comparación de la concentración de Cr⁶⁺ en los medios de cultivo estériles que poseían la misma concentración inicial que los medios de cultivo que fueron inoculados con *A. tumefaciens*. En los medios inoculados a las 24 horas se alcanza una disminución hasta el 98% de Cr⁶⁺ en los medios suplementados con una concentración inicial de 5 mg L⁻¹ y de un 68% en los medios suplementados con 10 mg L⁻¹ en el mismo tiempo. En todos los casos hubo una mayor disminución en la concentración de la especie Cr⁶⁺ en los medios que fueron inoculados, aun en la concentración de 10 mg L⁻¹ en donde no hubo un aumento de las unidades logarítmicas, dado que en los medios estériles se alcanzó una reducción del 22% y 16% para los medios de 5 y 10 mg L⁻¹, respectivamente.

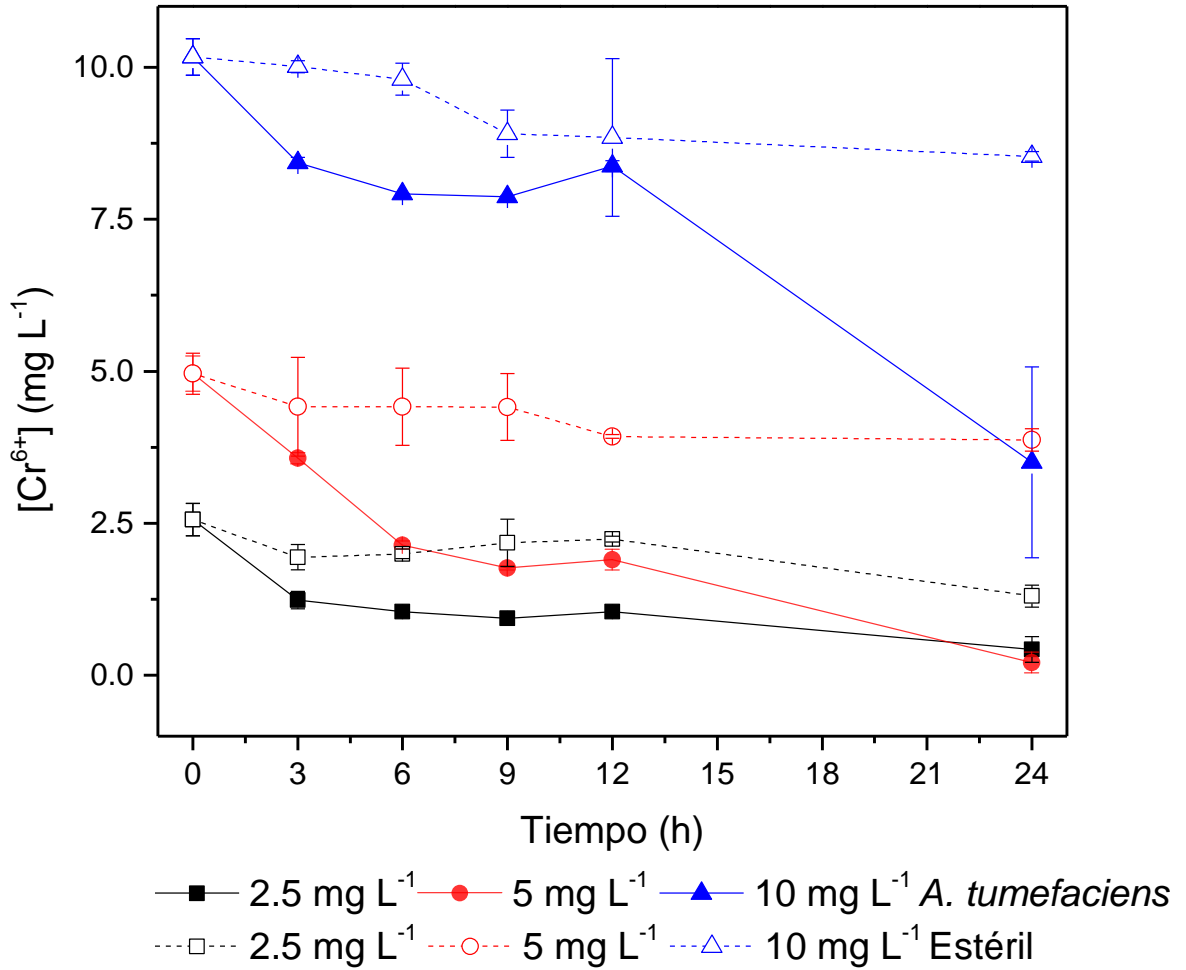


Figura 40. Concentración de Cr⁶⁺ en mg L⁻¹ contra el tiempo en el caldo de cultivo, con y sin inóculo.

En la figura 41 se reporta las unidades formadoras de colonias contra el tiempo y en el eje secundario la concentración de Cr⁶⁺ (mg L⁻¹) en el caldo de cultivo en medios suplementados con 2.5 mg L⁻¹ de Cr⁶⁺. Se observa que a partir de las 6 horas empieza el crecimiento exponencial, pero desde las 3 horas la concentración de Cr⁶⁺ disminuye hasta un 62%.

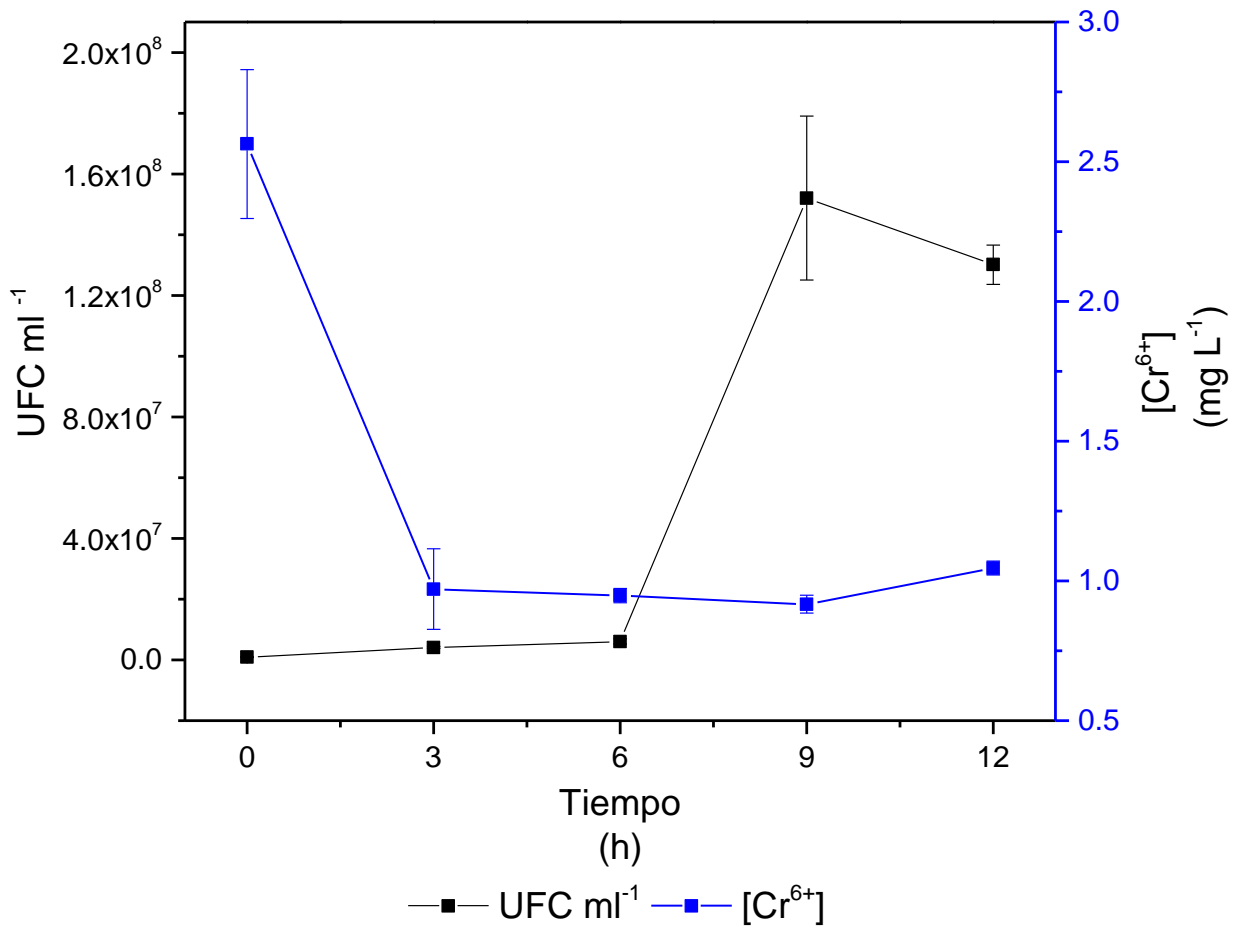


Figura 41. Crecimiento microbiano en UFC ml⁻¹ y concentración de Cr⁶⁺ (mg L⁻¹) con respecto del tiempo en medios de cultivo inoculados con *A. tumefaciens* con una concentración inicial 2.5 mg L⁻¹.

En la figura 42 se reporta las unidades formadoras de colonias contra el tiempo y la concentración de Cr⁶⁺ (mg L⁻¹) en el caldo de cultivo en medios suplementados con 5 mg L⁻¹ de Cr⁶⁺. Se observa que a partir de las 6 horas empieza el crecimiento exponencial, y la concentración de Cr⁶⁺ disminuye en un 58% y a las 9 horas alcanza el 65%.

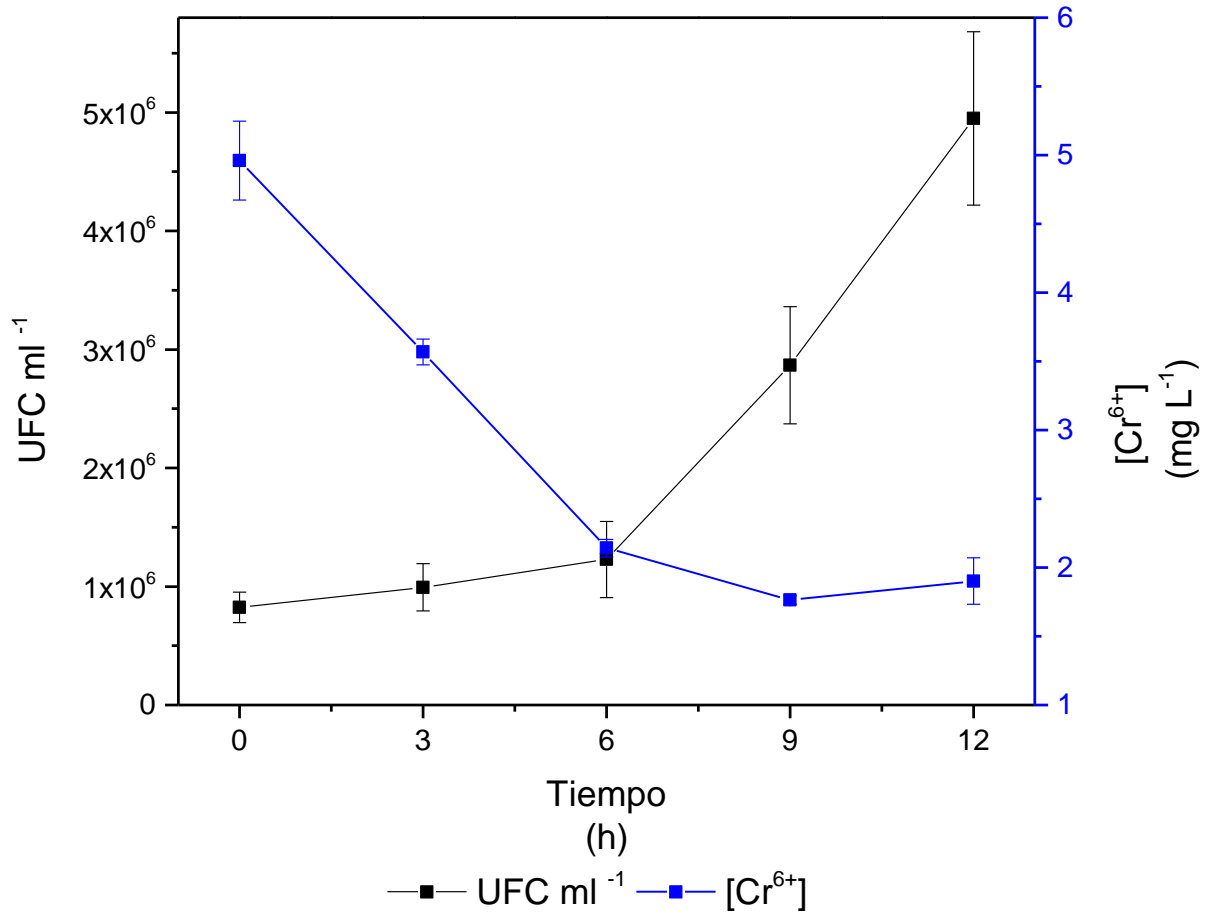


Figura 42. Crecimiento microbiano en UFC ml⁻¹ y concentración de Cr⁶⁺ (mg L⁻¹) con respecto del tiempo en medios de cultivo inoculados con *A. tumefaciens* con una concentración inicial 5 mg L⁻¹.

En la figura 43 se reporta las unidades formadoras de colonias contra el tiempo y la concentración de Cr⁶⁺ (mg L⁻¹) en el caldo de cultivo en medios suplementados con 10 mg L⁻¹ de Cr⁶⁺ en el eje secundario. Se observa que a partir de las 3 horas disminuye las unidades formadoras de colonias, sin embargo, la concentración de Cr⁶⁺ disminuye también en un 17% a las 6 horas y un 22% a las 9 horas.

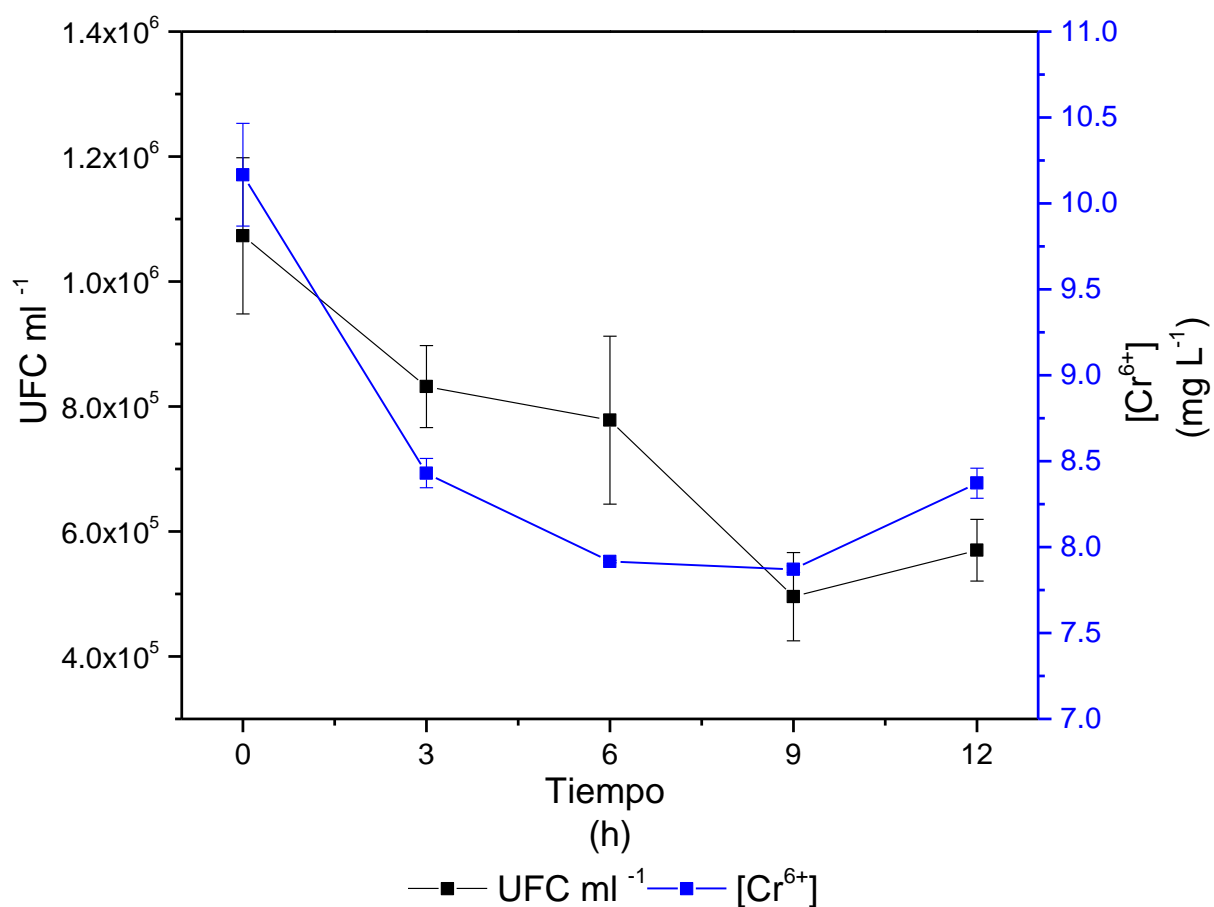


Figura 43. Crecimiento microbiano en UFC ml⁻¹ y concentración de Cr⁶⁺ (mg L⁻¹) con respecto del tiempo en medios de cultivo inoculados con *A. tumefaciens* con una concentración inicial 10 mg L⁻¹.

En la figura 44 se reporta la medición del potencial de óxido-reducción del medio de cultivo, se puede observar que la tendencia es bajar el potencial a condiciones reductoras, cabe mencionar que a medida que aumenta la concentración inicial de Cr⁶⁺ la reducción del potencial de óxido-reducción disminuye, aunque aún a 10 mg L⁻¹ se logró reducir el potencial con respecto a la condición inicial.

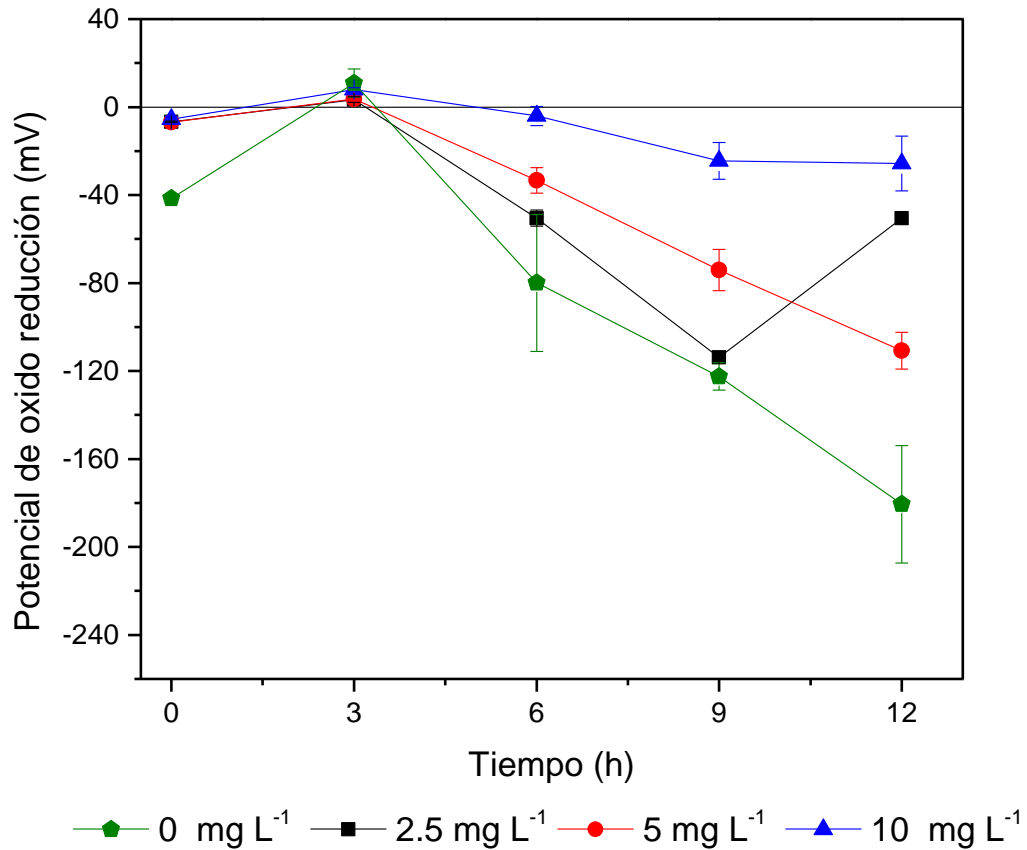


Figura 44. Potencial de óxido-reducción en mV contra tiempo en horas.

Se realizó el balance de cromo en los medios de cultivo, se determinó la concentración de cromo total por espectroscopia de absorción atómica, la concentración de Cr⁶⁺ se determinó por complejación con 1,5 difenilcarbazida, el Cr³⁺ se calculó por la diferencia del cromo total menos el cromo hexavalente.

Se prepararon medios de cultivo a 3 concentraciones diferentes de Cr⁶⁺, y se inocularon con 1.5×10^7 UFC ml⁻¹ y se incubaron a 28 °C durante 24 horas a 120 rpm. A las 24 horas se realizó diluciones en placa, en todas las concentraciones se encontró viabilidad con un promedio de 6×10^{10} UFC ml⁻¹.

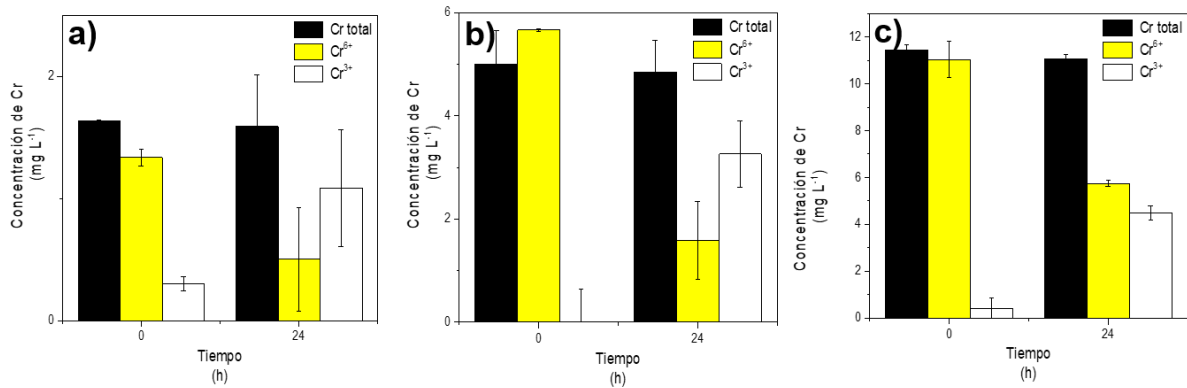


Figura 45. Balance de cromo en los medios de cultivo de *A. tumefaciens*.

Se realizó la digestión de las células bacterianas para la determinación de cromo total por espectroscopía de absorción atómica en la biomasa, pero en todas las concentraciones probadas no se encontró presencia de cromo en las células, pero dado que la concentración de cromo total es muy similar al principio y al final se asume que no hubo adsorción en la biomasa o probablemente la concentración esté por debajo al límite de detección, dado que el equipo tiene una sensibilidad de 0.10 mg L⁻¹.

7.4.4. Análisis estadístico

Se realizaron correlaciones con el paquete estadístico SAS 9.1, para discriminar que factores son realmente significativos para la reducción del Cr⁶⁺.

En la concentración más baja de cromo probada (2.5 mg L⁻¹), los parámetros que tuvieron un coeficiente de correlación más alto y mayor significancia fueron el tiempo y el número de unidades formadoras de colonias, con un valor de R² de -0.7670 y -0.816, respectivamente, con valores de alfa de 0.0036 y 0.0012, respectivamente.

A medida que el transcurre el tiempo, el microorganismo crece y la cantidad de Cr⁶⁺ presente en el medio disminuye.

A una concentración de 5 mg L⁻¹, el tiempo, el oxígeno disuelto (O.D.) en mg L⁻¹ y el potencial de óxido-reducción (POR) tuvieron más significancia en la correlación con la

disminución de la concentración de Cr^{6+} con un valor de R^2 de -0.90007, 0.88294 y 0.86473, respectivamente, y valores de alfa de <.0001, 0.0001 y de 0.0003 respectivamente. De esos factores el tiempo y el POR poseían una correlación significativa con el crecimiento *A. tumefaciens*, En el caso del tiempo estos son directamente proporcionales con R^2 0.96565 y un alfa de <.0001. Caso contrario con él POR, el cual es inversamente proporcional al log (UFC) de la cepa, con un coeficiente de correlación de -0.91052 y un valor de alfa de <.0001.

El crecimiento de la cepa y la concentración residual de cromo en el medio también se correlacionan, y son inversamente proporcionales con un R^2 -0.79988 y un alfa de 0.0018.

Cuando se realizaron experimentos a una concentración de 10 mg L^{-1} , la cual resultó en la inhibición del crecimiento del microorganismo, este factor no tuvo una correlación significativa con la disminución de Cr^{6+} en el medio, solo el oxígeno disuelto (mg L^{-1}) y el pH, con valores de R^2 de 0.87812 y 0.74881 respectivamente, con un valor de alfa 0.0002 para el O.D. y 0.0051 y el pH.

De manera general el POR disminuyó con respecto del tiempo y las unidades formadoras de colonias, menos en 10 ppm. Para las concentraciones de 0, 2.5 y 5 mg L^{-1} , el coeficiente de correlación entre el tiempo y el POR son -0.869, -0.940, -0.972 con valores de alfa de 0.0002, <.0001 y <.0001.

Para las concentraciones de 0, 2.5 y 5 mg L^{-1} , el coeficiente de correlación entre el log (UFC) y el POR son -0.938, -0.937, -0.910, todos con valores de alfa de <.0001.

8. Discusión

En cuanto a la caracterización del material, existe una distribución muy amplia en diámetro de poro variando de 4 hasta 250.8 nm y en tamaño de partícula aun cuando la arcilla es tamizada a un diámetro de partícula específico, como fue el caso en que se tamizó a 91 μm pero cuando se realizó el análisis de distribución de tamaño de grano por análisis de imagen, se obtuvo tamaños de partícula desde 5 hasta 70 μm , esta heterogeneidad repercute en la reproducibilidad de los resultados. Aunque una posible solución es elaborar pellets de la arcilla roja y obtener un tamaño de partícula estandarizado, tomando en cuenta que en cuanto menor sea el tamaño de partícula del material adsorbente mayor será su área de superficial, esto a su vez reducen la difusión interna y la limitación de la transferencia de masa.

De acuerdo con las propiedades de la arcilla roja no es un material ideal para la adsorción de iones de Cr^{6+} . Dado que el punto carga cero del material al ser de 1.14 está tendrá la tendencia de atraer cationes, antes de adsorber aniones como los iones de Cr^{6+} . El pH al que se presenta la mayor adsorción en el material es de 3, es necesario el ajuste del pH previo al proceso de adsorción, en un principio se planteaba que el proceso de adsorción y reducción fuera secuencial pero dado que el efluente de salida será un pH ácido y menor al óptimo de crecimiento para *A. tumefaciens* sería necesario el ajuste del pH y la adición de nutrientes, aunque existen cepas reportadas capaces de reducir Cr^{6+} a bajos pH.

Aunque el pH óptimo de crecimiento de la cepa sea 7 no se probó el crecimiento de la cepa a otros pH, habría que verificar la velocidad de crecimiento de la cepa a diferentes pH, para determinar si fuera posible omitir el ajuste del pH posterior a la adsorción.

9. Conclusión

En la primera fase se evaluó el proceso de adsorción del cromo con la arcilla roja, en el cual se redujo entre el 50% al 100% a bajas concentraciones de Cr^{6+} y con *A. tumefaciens* disminuyó la concentración del metal hasta un 98% en 24 horas en los medios de cultivo con 5 mg L^{-1} , debido al efecto reductor de la bacteria.

La arcilla roja, mostró ser un excelente adsorbente, por ser un material mesoporoso, además de ser versátil para trabajar con diferentes tamaños de partícula lo cual facilita su recuperación y bajo costo siendo un modelo de adsorbente no convencional adecuado para la remoción del Cr^{6+} .

Se estudió la reducción a la especie Cr^{3+} en el medio de cultivo con *A. tumefaciens*, debido a que el Cr^{3+} es menos tóxico que el Cr^{6+} el cual presenta un alto potencial de oxidación y una mayor solubilidad en agua.

Se demostró que si existe una reducción de Cr^{6+} en los medios de cultivo, puesto que en las células digeridas no se encontró presencia de cromo, por lo que se descarta la posibilidad de adsorción a la biomasa. La concentración de cromo total al inicio y al final varía por $\pm 0.20 \text{ mg L}^{-1}$, esta diferencia podría deberse a pérdidas por filtración y dilución de la muestra al ajustar el pH. Por lo tanto, la disminución de Cr^{6+} en el medio se considera que es debido a la reducción, sin embargo, se desconoce aún si esta reducción se presenta vía enzimática favoreciendo las condiciones de óxido-reducción. Por otro lado, la caída del potencial de óxido-reducción indica que en el medio de cultivo se propicia condiciones reductoras que puedan favorecer la conversión de Cr^{6+} a Cr^{3+} .

10. Recomendaciones

El proceso de adsorción de metales puede mejorarse al modificar las características de la arcilla mediante un tratamiento ácido o básico, usualmente no se utiliza la arcilla natural para la adsorción de contaminantes, sino que se realiza un tratamiento para aumentar el tamaño de poro, o una funcionalización con nanopartículas de algún tipo para favorecer la adsorción.

Se recomienda evaluar diferentes tamaños de pellets y emplear más dosis de adsorbente con la finalidad de mejorar la capacidad de adsorción y obtener un mayor porcentaje de remoción.

Debido a la carga negativa que posee la arcilla en solución acuosa a $\text{pH} \geq 1.14$, éste se podría utilizar para la adsorción de otros metales como arsénico, cadmio u otro que posea carga positiva en solución a determinados pH.

En cuanto al proceso de reducción de Cr^{6+} , no se tenía planteado que el medio de cultivo tuviera alguna capacidad para reducir el Cr^{6+} a Cr^{3+} , sería recomendable utilizar un medio mínimo de sales para poder apreciar la reducción principalmente por el sistema biológico.

En caso de que el proceso se escalara, es probable que los nutrientes se añadan en forma de sales, y el microorganismo no estaría en condiciones tan favorables, como en los experimentos a nivel laboratorio realizados, por lo que es de esperar una eficiencia de reducción menor a esta escala.

Existen otros parámetros que se podrían optimizar en la reducción del metal como lo es el tamaño del inóculo, la concentración inicial del metal, el tiempo, el pH, la fuente de carbono, etc.

11. Referencias

- (IETEG), I. E. T. E. G. (2004). *Chromium-VI-handbook*.
- (NIOSH), N. I. f. O. S. a. H. (2013). *Criteria for a Recommended Standard: Occupational Exposure to Hexavalent Chromium; Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Institute for Occupational Safety and Health*. Cincinnati.
- André, P. V., F. (2017). Free radical scavenging properties of mannitol and its role as a constituent of hyaluronic acid fillers: a literature review. *International Journal of Cosmetic Science*, 39(4), 355-360. doi:10.1111/ics.12386
- Bailey. (1999). A review of potentially low-cost sorbents for heavy metals. *Water Research*, 33(11), 2469-2479.
- Bailey, Olin, Bricka, & Adrian. (1999). A review of potentially low-cost sorbents for heavy metals. *Water Research*, 33(11), 2469-2479.
- Baldiris, R. A.-T., Natali ; Montes, Alfredo; Hernández, Jennifer & Vivas-Reyes,Ricardo. (2018). Reduction of Hexavalent Chromium and Detection of Chromate Reductase (ChrR) in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Molecules*, 23(2), 1-20. doi:10.3390/molecules23020406
- Bielicka, A., Bojanowska, I. & Wiśniewski, A. (2005). Two Faces of Chromium - Pollutant and Bioelement. *Polish Journal of Environmental Studies*, 14(1), 5-10.
- Brunauer, S. E., P. H. & Teller, Edward (1938). Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. *Journal of the American chemical society*, 60(2), 309-319.
- Buerge, I. H., S. (1997). Kinetics and pH Dependence of Chromium(VI) Reduction by Iron(II). *Environmental Science & Technology*, 31(5), 1426-1432.
- Camargo, F. B., F.; Okeke, B. & Frankenberger, W. (2003). Chromate Reduction by Chromium-Resistant Bacteria Isolated from Soils Contaminated with Dichromate. *Journal Of Environment Quality*, 32(4), 1228.
- Chen, j. H., O. (1998). Microbial Chromium (VI) Reduction. *Critical Reviews In Environmental Science And Technology*, 28(3), 219-251 doi:10.1080/10643389891254214
- De Gisi, S., Lofrano, G., Grassi, M., & Notarnicola, M. (2016). Characteristics and adsorption capacities of low-cost sorbents for wastewater treatment: A review. *Sustainable Materials and Technologies*, 9, 10-40. doi:10.1016/j.susmat.2016.06.002
- Di Natale, F., Erto, A., Lancia, A., & Musmarra, D. (2015). Equilibrium and dynamic study on hexavalent chromium adsorption onto activated carbon. *Journal of Hazardous Materials*, 281(Supplement C), 47-55. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.07.072>
- Goldstein, J. I. N., Dale E.; Echlin, Patrick; Joy, David C.; Lifshin, Eric; Fiori,Charles; Lyman, Charles E. (1992). *Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis: A Text for Biologists, Materials Scientists, and Geologists* (2 ed.). New York: Plenum Press.
- Grassi, M., Kaykioglu, G., Belgiorno, V., & Lofrano, G. (2012). *Removal of Emerging Contaminants from Water and Wastewater by Adsorption Process*: Springer Science & Business Media.
- Gunasundari, D. M., K. (2013). Simultaneous Cr(VI) reduction and phenol degradation using *Stenotrophomonas* sp. isolated from tannery effluent contaminated soil. *Environmental Science And Pollution Research*, 20(9), 6563-6573. doi:10.1007/s11356-013-1718-6

- Jelena, K. S., Jonjaua, R.G., Ivana, O.B., & Vesna, K.S. (2015). The Influence of Clayey Pellet Size on Adsorption Efficiency of Metal Ions Removal from Waste Printing Developer. *International Journal of Environmental and Ecological Engineering*, 9(3), 387-390.
- Kaya, A., & Yukselen, Y. (2005). Zeta potential of clay minerals and quartz contaminated by heavy metals. *Canadian Geotechnical Journal*, 42(5), 1280-1289. doi:10.1139/t05-048
- Kimbrough, D., Cohen, Y., Winer, A., Creelman, L., & Mabuni, C. (1999). A Critical Assessment of Chromium in the Environment. *Critical Reviews In Environmental Science And Technology*, 29(1), 1-46.
- Klaus Knödel, G. L., Hans-Jürgen Voigt. (2007). *Environmental Geology: Handbook of Field Methods and Case Studies*: Springer Science & Business Media.
- Komori, K. R., A.; Toda, K. & Ohtake, H. (1990). A method for removal of toxic chromium using dialysis-sac cultures of a chromate-reducing strain of *Enterobacter cloacae*. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 33 (1). doi:10.1007/bf00170582
- Leist, M., Casey, R. J., & Caridi, D. (2003). The fixation and leaching of cement stabilized arsenic. *Waste Management*, 23(4), 353-359.
- Lertsutthiwong, P., Noomun, K., Khunthon, S., & Limpanart, S. (2012). Influence of chitosan characteristics on the properties of biopolymeric chitosan–montmorillonite. *Progress in Natural Science: Materials International*, 22(5), 502-508. doi:10.1016/j.pnsc.2012.07.008
- Management Association, I. R. (2017). *Materials Science and Engineering: Concepts, Methodologies, Tools, and Applications: Concepts, Methodologies, Tools, and Applications.*: IGI Global.
- McKay, G. (1995). *Use of Adsorbents for the Removal of Pollutants from Wastewater*: CRC Press.
- Oliveira, H. (2012). Chromium as an Environmental Pollutant: Insights on Induced Plant Toxicity. *Journal of Botany*, 2012, 1-8. doi:10.1155/2012/375843
- Onchoke, K. K., & Sasu, S. A. (2016). Determination of Hexavalent Chromium (Cr(VI)) Concentrations via Ion Chromatography and UV-Vis Spectrophotometry in Samples Collected from Nacogdoches Wastewater Treatment Plant, East Texas (USA). *Advances in Environmental Chemistry*, 2016, 10. doi:10.1155/2016/3468635
- Ramírez-Díaz, M. D.-P., C; Vargas, E.; Riveros-Rosas, H.; Campos-García, J.; Cervantes, C. (2008). Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals*, 21, 321–332. doi:10.1007/s10534-007-9121-8
- Roldán, V. D., V.; Goodman, B.; Santoro, M.; González, J.; Calisto, N.; Signorela, S. & Sala, L. (2000). Kinetics and Mechanism of the Reduction of Chromium(VI) and Chromium(V) by D-Glucitol and D-Mannitol. *Helvetica Chimica Acta*, 83(12), 3211-3228. doi:10.1002/1522-2675(20001220)83:12<3211::aid-hlca3211>3.0.co;2-4
- Russ, J. C. (1984). *Fundamentals of Energy Dispersive X-ray Analysis*: Butterworths & Co (Publishers) Ltd
- Singh, T., & Pant, K. (2006). Solidification/stabilization of arsenic containing solid wastes using portland cement, fly ash and polymeric materials. *Journal Of Hazardous Materials*, 131(1-3), 29-36.
- Te, B. W., Boonchai; Yossapol, Chatpet & Wonglertarak, Watcharapol. (2018). Development of low-cost iron mixed porous pellet adsorbent by mixture design approach and its

- application for arsenate and arsenite adsorption from water. *Adsorption Science & Technology*, 36(1-2), 372–392. doi:10.1177/0263617417693626
- Turhan, Y. T., P.;Doğan,M.; Alkan,M.; Namli, H. & Demirbas, O. (2008). Characterization and Adsorption Properties of Chemically Modified Sepiolite. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 47(6), 1883-1895.
- Wang, K. (2006). *Agrobacterium Protocols*. Totowa, N.J.: Humana Press.
- Worch, E. (2012). *Adsorption Technology in Water Treatment: Fundamentals, Processes, and Modeling*. Berlin: De Gruyter.

12. Anexos

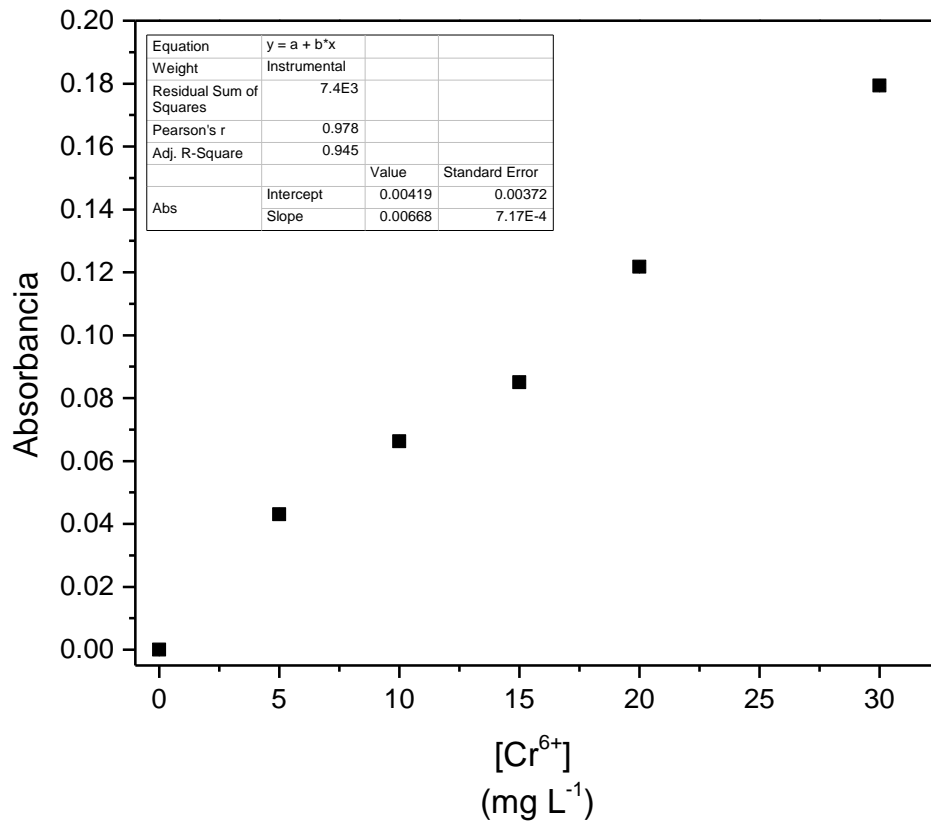


Figura 46. Curva de calibración de cromo total, absorbancia contra concentración de Cr en mg L⁻¹.

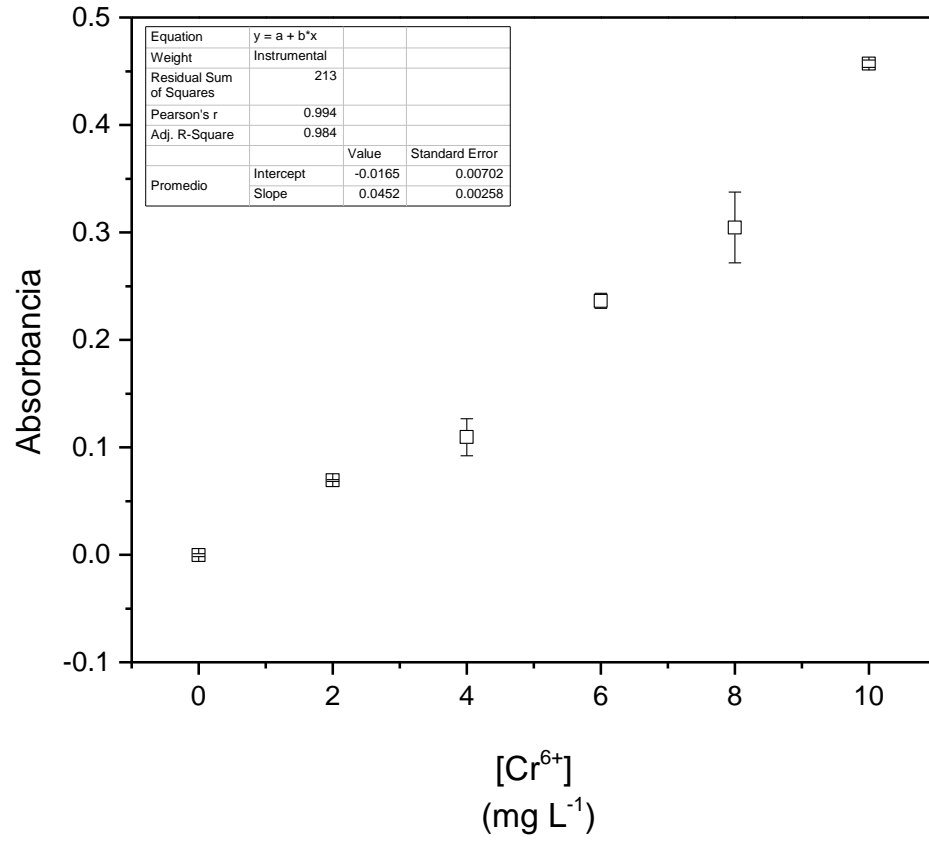


Figura 47. Curva de calibración de Cr⁶⁺ por el método de 1,5 difenilcarbazida.

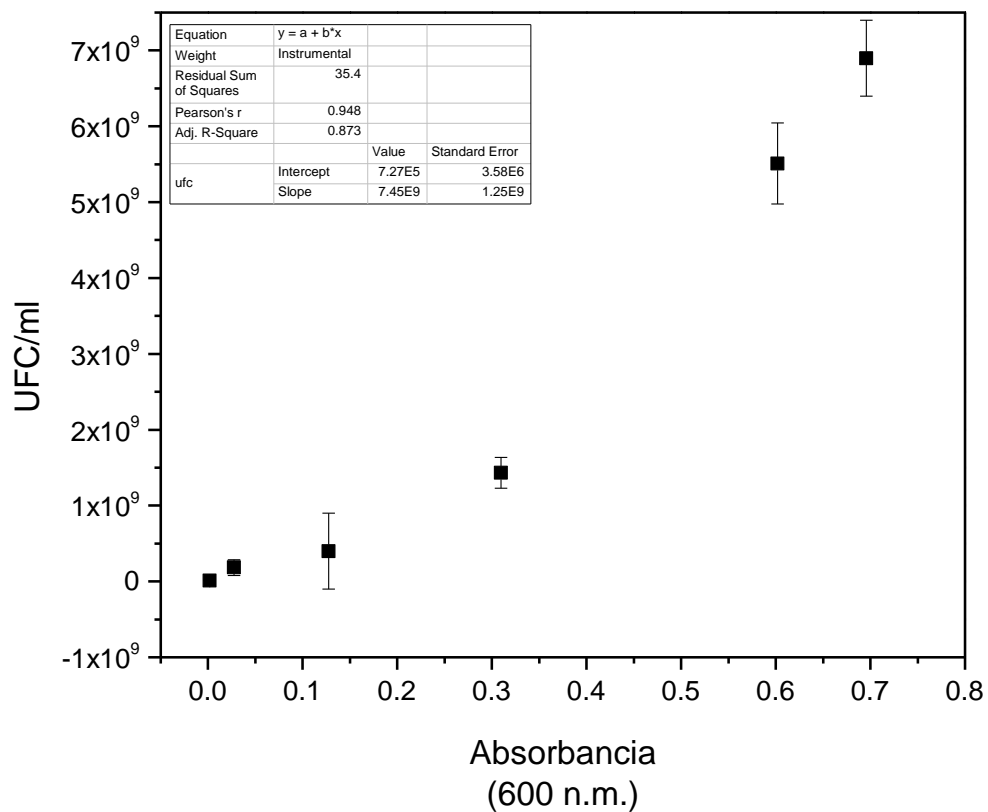


Figura 48. Curva de calibración de absorbancia a 600 n.m. contra unidades formadoras de colonias por mililitro.

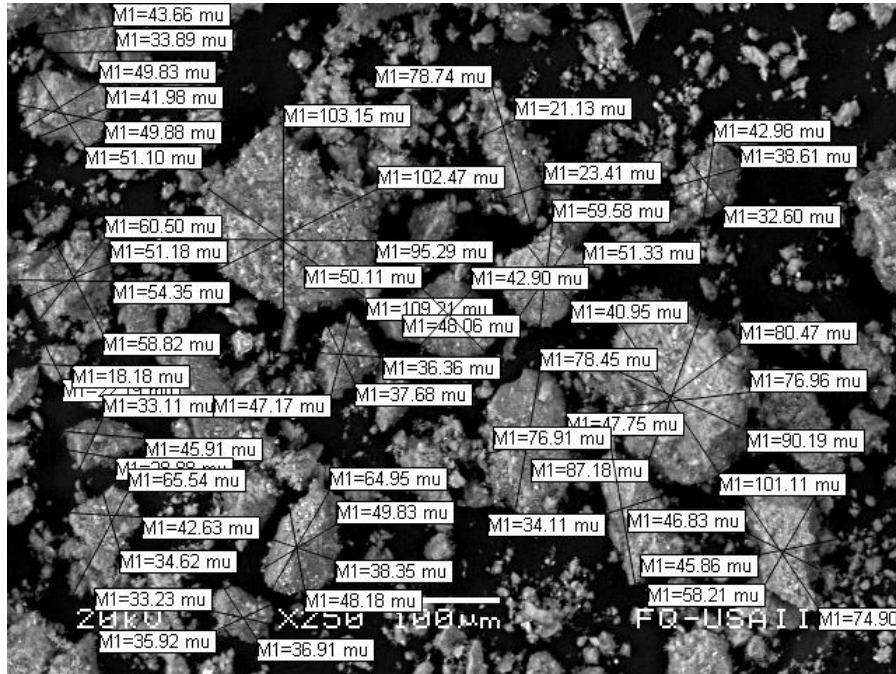


Figura 49. Medición de tamaño de partícula de la arcilla roja con el programa de tpsDig a partir de la micrografía de arcilla a 250X.

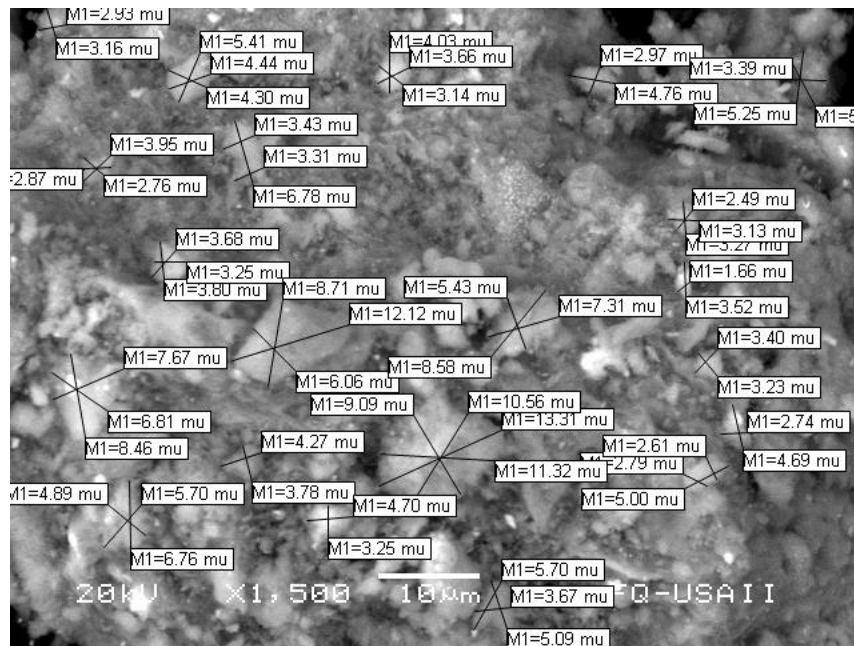


Figura 50. Medición de tamaño de partícula de la arcilla roja con el programa de tpsDig a partir de la micrografía de arcilla a 1,500X.

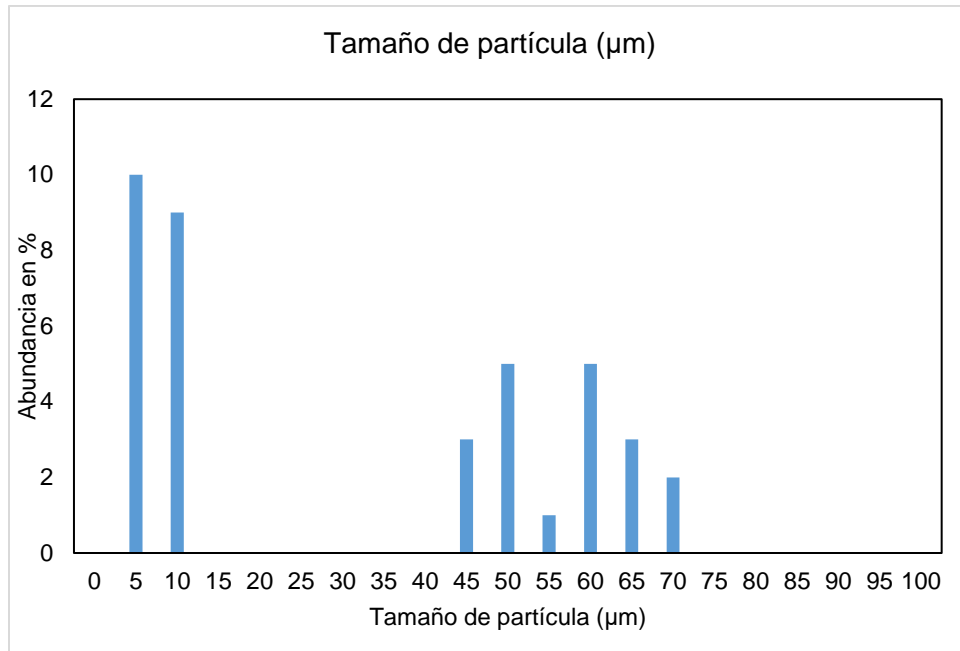


Figura 51. Distribución de tamaño de partícula de la arcilla roja calcinada tamizada a 91 μm.

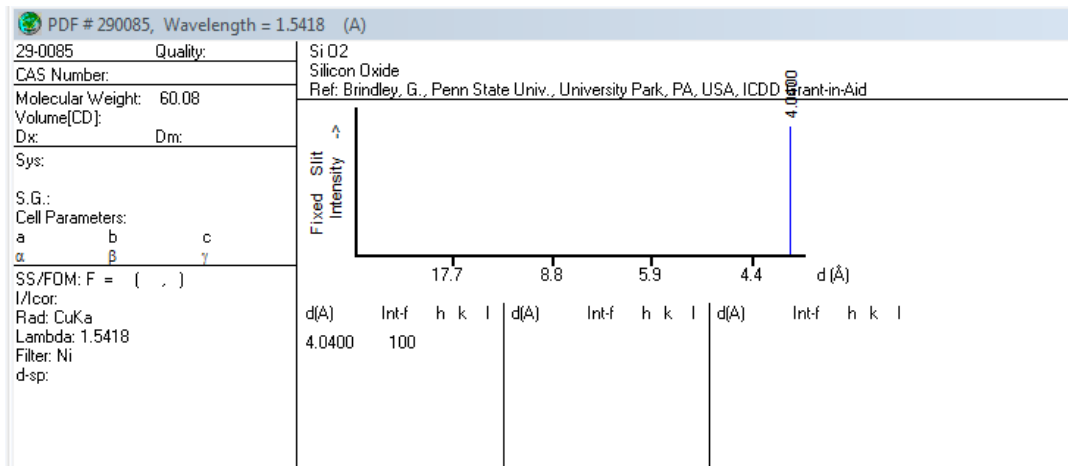


Figura 52. PDF 00-029-0085 SiO₂

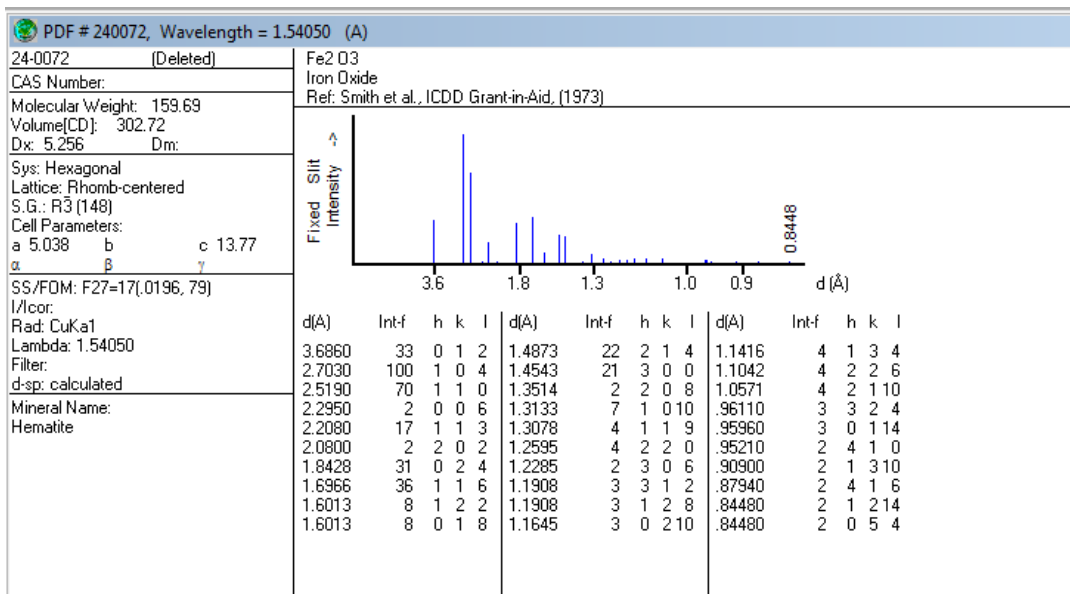


Figure 53. PDF 00-024-0072 Fe₂O₃

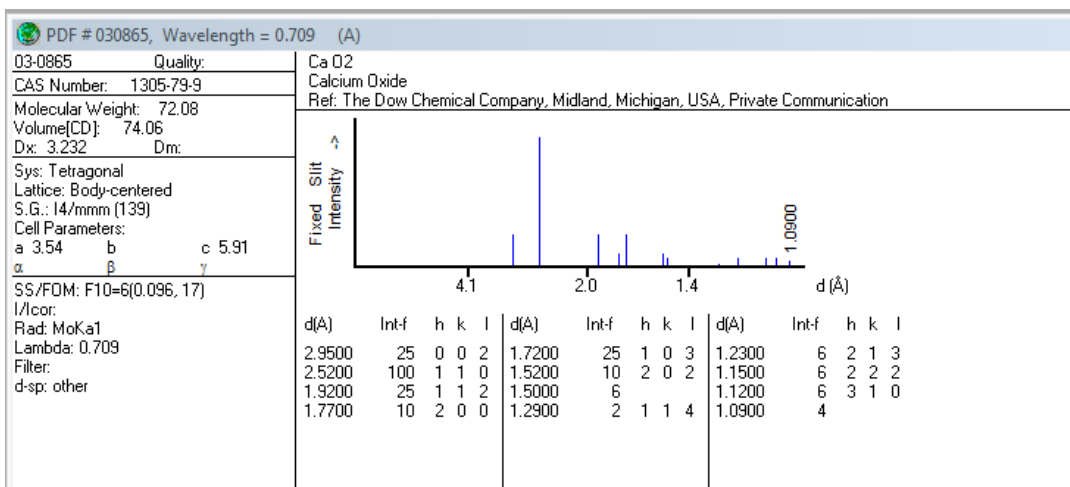


Figure 54. PDF 00-003-0865 CaO₂

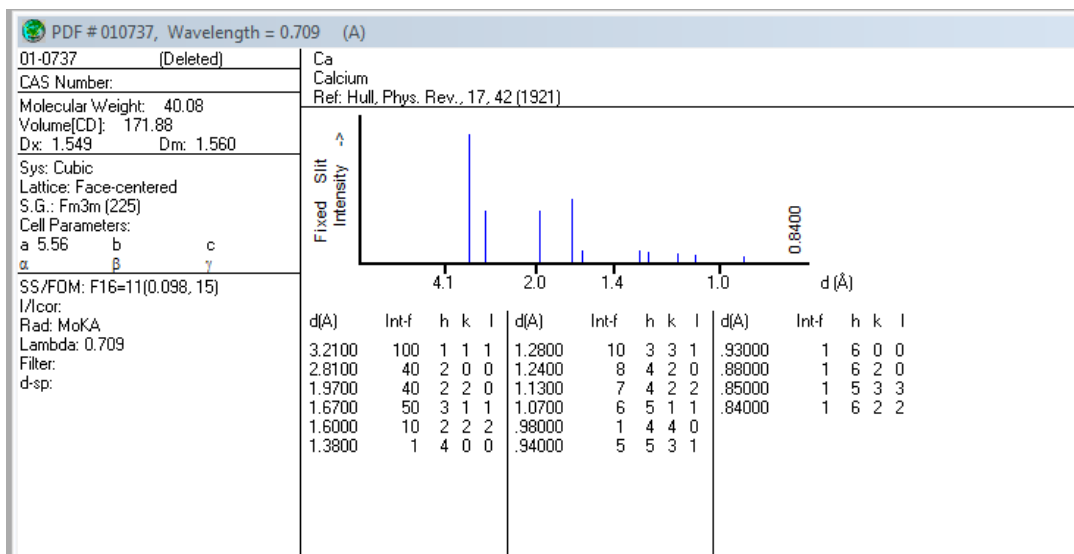


Figura 55. PDF 00-001-0737 Ca

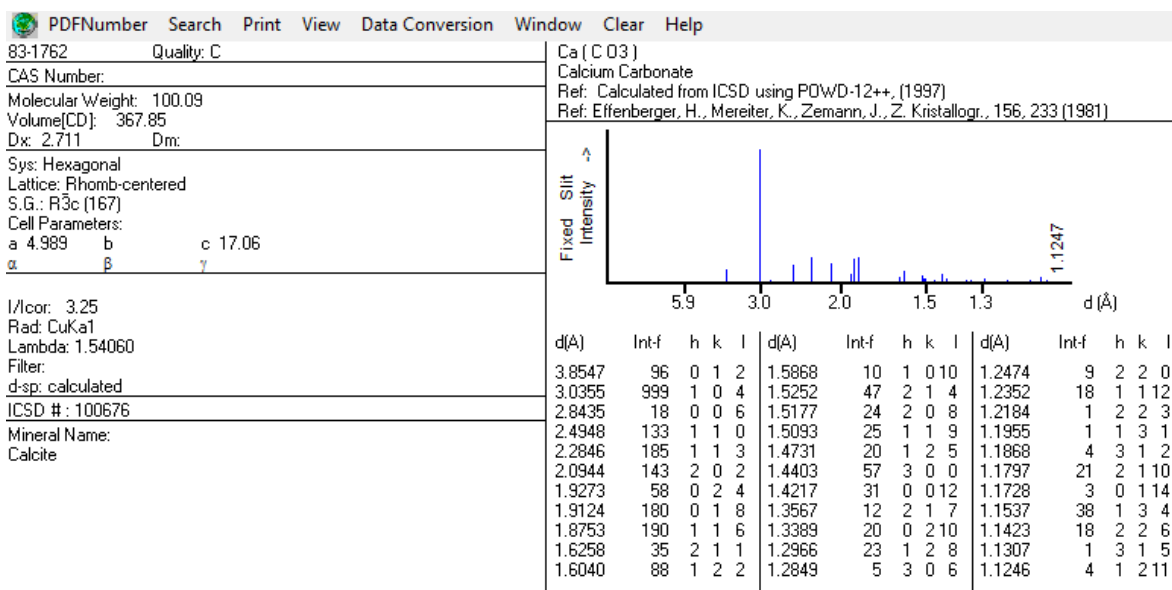


Figura 56. PDF 00-083-1762 Ca(CO₃)