

TÍTULO DE PATENTE No. 362301

Titular(es): UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

Domicilio: Lascuráin de Retana # 5, Colonia Centro, 36000, Guanajuato, Guanajuato, MÉXICO

Denominación: PROCESO BIOTECNOLÓGICO PARA LA REDUCCIÓN DE Cr(VI) EMPLEANDO CULTIVOS Y SOBRENADANTES DE CULTIVOS DE LA CEPA Ed8 DE *Aspergillus tubigenis* EN REACTOR COLUMNA DE BURBUJAS

Clasificación: **CIP:** A62D3/02; B09C1/10; C02F1/62; C02F11/02; C02F101/22; C22B5/00
CPC: A62D3/02; B09C1/105; C02F1/62; C02F11/02; C22B5/00; C02F2101/20; Y10S435/821

Inventor(es): J. FÉLIX GUTIÉRREZ CORONA; ALEJANDRO COREÑO ALONSO; ANGELES EDITH ESPINO SALDAÑA; GEORGINA ELENA REYNA LÓPEZ; MANUEL ALEJANDRO LIZARDI JÍMENEZ; ARACELI TOMASINI CAMPOCOSIO; FRANCISCO JOSÉ FERNÁNDEZ PERRINO

SOLICITUD

Número:

Fecha de Presentación:

Hora:

MX/a/2012/012244

22 de Octubre de 2012

09:12

Vigencia: Veinte años

Fecha de Vencimiento: 22 de octubre de 2032

Fecha de Expedición: 16 de noviembre de 2018

La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 69 de la Ley de la Propiedad Industrial.

De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente tiene una vigencia de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 6º fracciones III y 7º bis 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación (D.O.F.) 27/06/1991, reformada el 02/08/1994, 25/10/1996, 26/12/1997, 17/05/1999, 26/01/2004, 16/06/2005, 25/01/2006, 06/05/2009, 06/01/2010, 18/06/2010, 28/06/2010, 27/01/2012, 09/04/2012, 01/06/2016 y 13/03/2018); artículos 1º, 3º fracción V inciso a), 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 14/12/1999, reformado el 01/07/2002, 15/07/2004, 28/07/2004 y 7/09/2007); artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V inciso a), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial (D.O.F. 27/12/1999, reformado el 10/10/2002, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007); 1º, 3º y 5º inciso a) del Acuerdo que delega facultades en los Directores Generales Adjuntos, Coordinador, Directores Divisionales, Titulares de las Oficinas Regionales, Subdirectores Divisionales, Coordinadores Departamentales y otros subalternos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial. (D.O.F. 15/12/1999, reformado el 04/02/2000, 29/07/2004, 04/08/2004 y 13/09/2007).

El presente oficio se signa con firma electrónica avanzada (FIEL), con fundamento en los artículos 7 BIS 2 de la Ley de la Propiedad Industrial; 3o de su Reglamento, y 1 fracción III, 2 fracción V, 26 BIS y 26 TER del Acuerdo por el que se establecen los lineamientos para el uso del Portal de Pagos y Servicios Electrónicos (PASE) del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, en los trámites que se indican.

LA DIRECTORA DIVISIONAL DE PATENTES NAHANNY CANAL REYES



Cadena Original:

NAHANNY MARISOL CANAL REYES|00001000000403252793|Servicio de Administración Tributaria|1695|MX/2019/11294|MX/a/2012/012244|Título de patente normal|1488|IAR|Pág(s) 1|psQPQYTWZxCvh8URiy0+WEnYKEU=

Sello Digital:

vdvNdNifyt6t3MThJUb3UBOZfZdk/dkVPpNo4WsZKJJ7Cv2HhvPv2OgJ/kRWyk4KG46k2rhOf5paV0sMqxTwhIToglVq0Vs7sKioCowGBq+35YiQXxgVae2sussuVG+f0WVN9IEzH13eW8tkQKPzz6s8s67yJle/ZGdmuEnHvwPoAbIESInE R0uIV7Kgnq4ZzskeYjAhwcl0AC1EtMtaapVhQPzFO2Vac9RGJ1r6onBhHs/ZEKDKH/DssbXqVkcRipxBaeQ24Ovv yq17yYwJGoyBk8ki29ZnaWzCMhgD0l/71hmE7wu/SgUhcNsNqJjeqViekzuWIE+TKXy9eNSA==



PROCESO BIOTECNOLÓGICO PARA LA REDUCCIÓN DE Cr(VI) EMPLEANDO CULTIVOS Y SOBRENADANTES DE CULTIVOS DE LA CEPA Ed8 DE *Aspergillus tubigenis* EN REACTOR COLUMNA DE BURBUJAS

5

DESCRIPCIÓN

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La aplicación del proceso biotecnológico de reducción de Cr(VI) *ex situ*, que se reclama en esta solicitud, es en el sector industrial para apoyo a los procesos de biotratamiento de efluentes industriales y biorremediación de sitios o cuerpos de agua contaminados con cromo.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El Cr es un metal de amplio uso industrial, cuyas especies químicas más estables en el ambiente son el Cr(III) y el Cr(VI), siendo este último altamente tóxico y mutagénico para diferentes formas de vida, habiéndose reportado como carcinógeno en humanos y animales. Como resultado de las actividades antropogénicas, se ha roto el equilibrio natural de la concentración de Cr(VI), con el consecuente efecto negativo sobre los ecosistemas. Con anterioridad, se han reportado varios procesos para la eliminación de Cr(VI), entre los cuales destacan:

- a) Procesos físico-químicos, como: la reducción química, la adsorción por carbón activado, el de resinas de intercambio iónico.
- b) Procesos electroquímicos, como: la electro-coagulación, la electrodiálisis, la electroreducción.

Ejemplos de procesos de biorrestauración, empleando diversos organismos, han sido reclamados en patentes, como: US6,383,388B1 (remoción utilizando la levadura de *Saccharomyces cerevisiae*), US6,033,559A, US6,008,028A (emplea cianobacterias y bacterias autotróficas púrpuras), US5,736,048A (emplea algas y bacterias), US5,569,596A (emplea el alga *Shewanella* BrY resistente a Cr(VI) en condiciones anaeróbicas), US5,681,739A (bacterias anaeróbicas), mientras las patentes US4,468,461A y US3,941,691A reclaman procesos que emplean bacterias aerobias.

Considerando la literatura científica, se ha descrito el empleo de hongos filamentosos para la eliminación (reducción) de Cr(VI) de efluentes industriales, de cuerpos de agua y de sitios contaminados. Además, algunos de estos trabajos han descrito el escalamiento de los procesos utilizando biorreactores. Algunos de esos trabajos son: el de Morales-Barrera y cols. (Enzyme and Microbial Technology. 40: 107–113, 2006), que trabajan con la cepa *Trichoderma viride* que utiliza glucosa en el medio de cultivo empleando un reactor Air-lift con un mayor gasto de energía; Faryaly cols. (Pakistan J Botany 39; 5: 1873-1881, 2007), describen que la biomasa de *A. niger* bioabsorbe el 79 al 83% de cromo durante 36 a 48 horas; Acevedo-Aguilar y cols. (Can J Microbiol 52:809-815, 2006) describen cepas de *Aspergillus* y *Penicillium* que reducen en cultivo el Cr(VI) a Cr(III); Shrivastava y cols. (Bioresource Technology 97: 1167-73, 2006) describe un proceso discontinuo de biosorción del cromo; Coreño-Alonso y cols. (Chemosphere 76: 43–47, 2009) describen un proceso que emplea cultivos con la biomasa de Ed8 de *A. tubingensis* utilizando cultivos en batch o en reactores de tanque agitado, en dichas condiciones, los niveles máximos de Cr(VI) reducido eran de 2.68 mM a las 24 hs de incubación.

En los procesos descritos en la literatura, ya sea basados en bioabsorción/bioacumulación o en reducción, la biomasa de los microorganismos se incuba en presencia de Cr(VI) en un medio definido y se sigue la disminución del ión en diferentes tiempos o a un tiempo fijo.

El proceso biotecnológico propuesto puede aplicarse como 2 subprocesos que pueden ser alternativos o secuenciales, ambos basados en el incremento de la eficiencia de reducción de Cr(VI) por la presencia de compuestos orgánicos en el medio.

Subproceso A), basado en el empleo de cultivos con biomasa de la cepa Ed8 de 5 *Aspergillus niger* var. *tubingensis* (*Aspergillus tubingensis* o *A. tubingensis*) incubada en presencia de Cr(VI) con adiciones al medio de compuestos orgánicos que inducen la producción de moléculas responsables de la transformación de Cr(VI) a especies reducidas. El proceso de cultivo de la cepa mencionada se realiza mediante la fermentación aerobia en Columnas de Burbujas, en condiciones de temperatura 10 ambiente, empleando un medio mínimo basado en componentes económicos y una baja alimentación de aire. Este proceso, que se lleva a cabo de forma discontinua y permite la recarga de nutrientes y de Cr(VI), mostró alta eficiencia para la transformación por reducción de hasta 3.57 mM Cr(VI) presente en residuos industriales en 8 hs de incubación. En base al procedimiento de reducción de Cr(VI) contemplado en el proceso, 15 este podría ser aplicado para el tratamiento de residuos industriales líquidos o aguas contaminadas.

Subproceso B), basado en el empleo de sobrenadantes libres de biomasa obtenidos de cultivos de la cepa Ed8 de *Aspergillus tubingensis* incubada en ausencia de Cr(VI) con adiciones al medio de compuestos orgánicos que causan la producción de moléculas 20 responsables de la transformación de Cr(VI) a especies reducidas. En base al procedimiento de reducción de Cr(VI) contemplado en el proceso, este podría ser aplicado para el tratamiento de residuos industriales líquidos o sólidos, así como suelos o cuerpos de agua contaminados.

Las ventajas técnicas del primer subproceso son la alta eficiencia de reducción de 25 Cr(VI) en función del tiempo de residencia de la biomasa y la cantidad de la misma en el reactor. Las ventajas técnicas del segundo subproceso, además de la alta eficiencia de reducción Cr(VI), es la rapidez del mismo, que no se afecta por el Cr(VI) porque el cultivo se realiza en ausencia del metal. Un valor agregado del proceso global (que incluye los dos

subprocesos) de la presente invención es que en el sobrenadante del cultivo de ácidos orgánicos se encuentran presentes moléculas reductoras producidas por la biomasa, cuya identificación puede redundar en mejoras adicionales del proceso.

Las ventajas económicas del proceso global están basadas en que el sistema considerado es de bajo costo por el uso de reactivos grado industrial y una baja concentración (0.25 %) de una fuente de carbono económica (azúcar comercial), así como por el bajo costo de operación del reactor. En los procesos descritos en la literatura se utilizan reactivos de grado analítico y concentraciones altas (1% o mayor) de fuentes de carbono (usualmente glucosa), además de suplementos específicos en los medios de cultivo.

Además, el problema técnico que resuelve la invención considera que dicho proceso tiene una mayor eficiencia de remoción de Cr(VI) [hasta 3.57 mM Cr(VI) presente en residuos industriales en 8 hs de incubación, en el primer subproceso, y de 2.14 a 3.57 mM Cr(VI) en 0.5 hs de reacción, en el segundo subproceso] que la que poseen los procesos descritos en la literatura con el empleo de otros microorganismos [en el trabajo de Morales-Barrera y Cristiani-Urbina (2006) con *Trichoderma viride* se reporta la remoción de 1.3 y 1.6 mM de Cr(VI) en 30 y 80 hs de incubación, respectivamente], principalmente debido a la ventaja técnica de alta eficiencia y rapidez de reducción de Cr(VI) que implica el empleo de biomasa crecida en presencia de ácidos orgánicos con la finalidad de inducir el incremento de las moléculas reductoras producidas por la biomasa; en el caso del segundo subproceso, además, se evita la toxicidad del metal al crecimiento y producción de la biomasa.

En el estado de la técnica se ha descrito que la reducción de Cr(VI) por la cepa *Aspergillus tubingensis* Ed8, se realiza en el espacio extracelular (Gutiérrez Corona, J. C. -5 al 10 de octubre de 2008-. http://www3.inecol.edu.mx/solabiaa/ARCHIVOS/documentos/congresos/algal2008/memorias-cd/archivos%20pdf/biotec-ambiental/B_Orales/BO-07.pdf) (Acevedo-Aguilar, F.J., y cols. Can J Microbiol 52:809-815, 2006) (Gutiérrez Corona, J.F., Rev. Latinoam. Biotecnol.

Amb. Algal, 1(1):47-63, 2010), asimismo se menciona que el empleo de un reactor con columna de burbujas ocasiona un aumento de eficiencia del proceso (Coreño Alonso, A. L. -22-26 de marzo de 2010-. <http://www.cmibq.org.mx/Trabajos/Biotecnologia/BTN279JAN20091220.pdf>) (Laín S., 2004.

5 <http://bdigital.uao.edu.co/bitstream/10614/257/3/T0003440.pdf>). Además, se ha observado que la eficiencia de reducción de Cr(VI) a Cr(III) por la cepa Ed8 de *Aspergillus tubingensis*, se estimula dramáticamente por la presencia en el medio de crecimiento de ácidos orgánicos como citratos, salicilatos o tartratos (Coreño-Alonso, y cols. Chemosphere, 76 (1):43-47, 2009.) (Gutiérrez Corona J. F., Rev. Latinoam. Biotecnol. Amb. 10 Algal 1(1):47-63, 2010). Este análisis indica que la eficiencia obtenida en el proceso que se optimiza ha requerido el análisis y la combinación de más de dos documentos del estado de la técnica.

OBJETO DE LA INVENCION

15 El objeto de la presente invención es el desarrollo de un proceso biotecnológico eficiente para la reducción de Cr(VI) para el tratamiento *ex situ* de efluentes industriales contaminados con cromo, el cual se realiza en un reactor tipo de columna de burbujas con el uso de cultivos con biomasa o sobrenadantes de cultivos libres de biomasa de la cepa Ed8 de *Aspergillus tubingensis*.

20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Vista lateral del reactor tipo columna de burbujas.

Figura 2. Vista lateral de la tapa para el reactor.

Figura 3. Vista Superior de la tapa para el reactor.

25 Figura 4. Vista lateral del distribuidor de aire.

Figura 5. Vista inferior de la parte horizontal del distribuidor de aire.

Figura 6. Gráfica que muestra la reducción de Cr(VI) en una columna de burbujas en presencia de biomasa de *A. tubingensis* Ed8 incubada en medio con 10 mM de salicilato de sodio.

Figura 7. Gráfica que muestra la reducción de Cr(VI) en una columna de burbujas 5 conteniendo sobrenadantes libres de biomasa producidos por incubación de *A. tubingensis* Ed8 en ausencia de Cr(VI) y en presencia de diferentes concentraciones de salicilato (3, 10 y 20 mM) por diferentes tiempos (48, 72 y 96 hs).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10 La cepa Ed8 de *Aspergillus tubingensis* ha sido descrita en varios documentos del estado de la técnica, por ej. se han descrito las fuentes carbono útiles para la reducción del Cr(VI) y se ha realizado una identificación molecular de la cepa, la comparación de las condiciones de crecimiento para tolerar diversas concentraciones de Cr(VI), la 15 determinación de la concentración mínima inhibitoria de higromicina para la producción de los esferoplastos de la cepa Ed8, se ha realizado el análisis proteómico que muestra la producción de proteínas diferenciales en presencia del ión, se ha caracterizado el sistema de reducción de Cr(VI), e incluso se ha aislado y descrito el gen que codifica para una manitol fosfato deshidrogenasa.

El proceso biotecnológico propuesto en esta solicitud de patente, puede aplicarse 20 como dos subprocesos alternativos o secuenciales, uno de ellos basado en el empleo de cultivos con biomasa y el segundo basado en el uso sobrenadantes de cultivos libres de biomasa, ambos contemplando cultivos de la cepa Ed8 de *Aspergillus tubingensis* incubada en presencia de compuestos orgánicos, como: citrato (como parte del medio base), salicilato o tartrato (que se adicionan al medio base que contiene citrato) 25 que inducen la producción de moléculas responsables de la transformación de Cr(VI) a especies reducidas. El proceso de cultivo de la cepa mencionada se realiza mediante la fermentación aerobia en Columnas de Burbujas, en condiciones definidas de temperatura ambiente, empleando un medio mínimo basado en componentes económicos y una baja

alimentación de aire. En el caso del primer subproceso, que se lleva a cabo de forma discontinua por la adición de nutrientes y de Cr(VI), mostró alta eficiencia para la transformación, por reducción de hasta 3.57 mM de Cr(VI) presente en residuos industriales en 8 hs de incubación; el segundo subproceso permite reducir de 2.14 a 3.57 mM Cr(VI) en 0.5 hs de reacción. En base al procedimiento de reducción de Cr(VI) contemplado en el proceso, este también podría ser aplicado para el tratamiento de sitios o cuerpos de agua contaminados.

El subproceso A) se lleva a cabo mediante las siguientes etapas:

➤ Obtención de conidias:

10 Se realizan cultivos en medio sólido para producir conidias, inoculando de 10^3 a 5×10^3 conidias de la cepa Ed8 por caja de Petri que contiene cada una alrededor de 25 mL de medio mínimo solidificado con agar; se pueden inocular con conidias de 20 a 50 cajas conteniendo el referido medio para producir las conidias necesarias para 3–5 experimentos.

15 ➤ Etapa de Crecimiento:

Se inoculan conidias de la cepa Ed8 (5×10^5 a 2×10^6 conidias/mL) en 800 a 1200 ml de medio de cultivo contenidos en el reactor de Columna de Burbujas (diámetro interior de 7 cm, 40 cm de altura) y se incuba con un flujo de aire de 1 a 1.5 litros por minuto, a temperaturas de 23°C a 30°C por 36 a 60 hs.

20 ➤ Etapa de Reducción:

Después de la etapa de Crecimiento, se agrega al medio de cultivo de 100 a 500 mg/l (concentración final) de Cr(VI) proveniente de una solución procedente de industrias que producen residuos contaminados, y se incuba por 12 h en las condiciones descritas para la Etapa de Crecimiento, después de las cuales 50% del volumen inicial del medio de cultivo es removido y reemplazado por el mismo volumen del mismo medio al doble de concentración (2X), y a partir de este momento se recambia 12.5 % del medio de cultivo por medio de cultivo fresco (2X) cada 24 h. Además, se realizan adiciones de Cr(VI) cada 25 12 h (después de los recambios de medio de cultivo), hasta las 60 h terminando los

experimentos a las 72 h de la Etapa de Reducción. Se toma 1mL de medio de cultivo del reactor tres minutos después de añadido el Cr(VI) y se determina la concentración de este ión y la de Cr total, para verificar que la concentración de Cr en el reactor fuese homogénea; también, al final de los respectivos periodos de incubación, se toma 1 mL de medio de cultivo del reactor para la determinación de Cr(VI) y Cr total.

El Subproceso B) se lleva a cabo mediante las siguientes etapas:

➤ Se siguen las Etapas de Obtención de Conidias y de Crecimiento descritas para el Subproceso A; en este último caso la incubación se hace durante 48 h.

➤ Etapa de Reducción de Cr(VI):

Recuperación de la biomasa por filtración y transferencia del sobrenadante (800 a 1200 mL) a otro biorreactor tipo columna de burbujas, operado bajo las condiciones indicadas en el apartado anterior y sin utilizar condiciones de esterilidad. Una vez realizada la operación de transferencia del sobrenadante, se adicionan de 100 a 500 mg/l (concentración final en el reactor) de Cr(VI), proveniente de los residuos industriales (lixiviados o efluentes) y se permite un tiempo de residencia de 15 a 60 minutos.

Tal y como se describen líneas arriba los subprocesos A) y B), son considerados como alternativos. El proceso global con los dos subprocesos utilizados de manera secuencial consiste en aplicar primero el subproceso A, y después del 4o. ciclo de recarga de nutrientes y Cr(VI), a las 72 h de cultivo (Fig. 6) se recupera el sobrenadante, el cual se transfiere a un biorreactor de columna de burbujas y éste se mezcla, en proporción 1:1, con sobrenadante libre de biomasa fresco, obtenido como se indica en el subproceso B.

El medio de cultivo base, empleado para el proceso biotecnológico está constituido por: KH_2PO_4 (0.20% a 0.30%), MgSO_4 (grado comercial) (0.1% a 0.3%), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (grado comercial) (0.4% a 0.6%), fuente de carbono (glucosa, azúcar comercial, piloncillo u otras análogas) (0.2% a 0.3%), NaCl (grado comercial) (0.4% a 0.6%), compuestos orgánicos

como: el ácido cítrico y sus sales (0.5% a 1%) o como el ácido salicílico y sus sales (0.02 a 0.3%); el pH se ajusta a 5.1- 5.5 con NaOH. La preparación de este medio contribuye a la ventaja económica de esta invención y por lo tanto, a su eficiencia.

El tipo de reactor considerado en la presente invención ha sido descrito previamente en publicaciones en el campo de las fermentaciones. Brevemente, dicho reactor consta de un tubo cilíndrico de cristal templado de 40 cm de altura y 7 cm de diámetro (Fig.1), la parte superior del tubo (1) recibe la tapa (Fig. 2) la cual puede ser de hule con las siguientes dimensiones: 7.5 cm en el lado superior, del lado inferior 6.5 cm (2) y de los costados 4 cm; esta tapa posee dos horadaciones como se observa en la Fig. 3, cada horadación (3), con un diámetro de 0.85 cm en una de las cuales se inserta el distribuidor de aire (Fig.4) en forma de L, que posee una parte vertical (4) y otra horizontal (5), que en su parte inferior tiene orificios para hacer posible la alimentación de aire al medio de cultivo. El distribuidor de aire se muestra en la Fig. 4, se construyó de acero inoxidable 304, calibre 20, y con dimensiones: 70 cm en la parte vertical (4) abierta en el extremo superior, 5 cm en la parte horizontal (5) cerrada al final del tubo; 0.8 cm de diámetro externo. La parte horizontal del distribuidor (Fig. 5) está provista de 7 orificios (6) de 1 mm de diámetro cada uno, la separación entre los orificios es de 7 mm y el primero de ellos se encuentra a 5 mm del extremo cerrado de la columna. La segunda horadación de la tapa del tubo sirve para alimentar el reactor [medio y Cr(VI)], así como para tomar muestras. También, en esa misma se instala un tubo de vidrio con salida a una trampa (un matraz con una solución conteniendo un ácido orgánico). Esto es muy importante, ya que evita que el Cr se distribuya en el ambiente donde se encuentra el o los reactores.

25 EJEMPLOS

Con la finalidad de desarrollar los subprocesos descritos, se creció en un medio de cultivo que contenía una concentración de salicilato de sodio (Sal) 10 mM la cepa Ed8 de *A. tubingensis*. El medio también tuvo: KH_2PO_4 (0.25%), MgSO_4 (grado comercial) (0.2%),

(NH₄)₂SO₄ (grado comercial) (0.5%), fuente de carbono (azúcar comercial) (grado comercial) (0.5%), el pH se ajustó entre 5.1 a 5.5 con NaOH.

En la Fig. 6 se muestra el resultado de un experimento de remoción de Cr(VI) con biomasa de la cepa *A. tubingensis* Ed8 cultivada con Cr(VI) [Subproceso A)] en el que se hacen recargas de medio de cultivo y de 100 mg L⁻¹ de Cr(VI) cada 24 hs. En el ejemplo se observó que desde el tiempo 0 hasta las 72 hs de incubación ocurrió disminución en los niveles de Cr(VI) (Fig. 6A), no obstante que los niveles de Cr total en el medio se incrementaron debido a las recargas (Fig. 6B). La diferencia entre los niveles de Cr(VI), que son bajos, y los de Cr total, que son altos, se debe a la transformación del Cr(VI) en Cr(III) en el medio de cultivo; el procedimiento de determinación de Cr utilizado (Espectrometría de absorción atómica) detectó las dos especies de Cr.

Se realizó un experimento del Subproceso B (Fig. 7A, B). En este caso el sobrenadante libre de biomasa se obtuvo cultivando la cepa *A. tubingensis* Ed8 en medio base (como el descrito) suplementado con un compuesto orgánico como Sal a concentraciones 3, 10 ó 20 mM en un reactor de Columna de Burbujas; a las 48, 72 o a las 96 hs de incubación se retiró la biomasa y se determinó la capacidad reductora del sobrenadante del medio de cultivo al adicionarle Cr(VI). La Fig. 7A muestra el resultado obtenido con el sobrenadante producido a las 48 hs de incubación el cual se adicionó con 300 mg Cr(VI)/L; se observa que la disminución de Cr(VI) es completa con los sobrenadantes producidos en presencia de 10 y 20 mM de Sal y parcial (alrededor del 16 %) con el sobrenadante producido en presencia de 3 mM de Sal. En la Fig. 7B se muestra que los sobrenadantes producidos en incubaciones de 72 hs en presencia de 20 mM de Sal adicionados de 550 mg Cr(VI)/L, causan la disminución completa del ión en 30 min; en los sobrenadantes del mismo tiempo de incubación producidos en presencia de 3 o 10 mM de Sal la disminución de Cr(VI) fue cercana al 20 %. En periodos de incubación mayores (96 hs) la eficacia de reducción de Cr(VI) de los sobrenadantes disminuye. Por lo tanto, el procedimiento optimizado comprendería el empleo de sobrenadantes producidos por 48-

72 hs de incubación con 20 mM de Sal, los cuales podrían emplearse para ~~propiedad~~ hasta
550 mg Cr(VI)/L en 30 min.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la reducción de Cromo VI para el tratamiento de efluentes industriales, o suelos y cuerpos de agua contaminados, el cual consiste en:
 - 5 a) obtención de conidias de la cepa Ed8 *Aspergillus tubingensis*, en medio mínimo solidificado de agar,
 - b) etapa de crecimiento, se inoculan las conidias de la cepa Ed8 de *Aspergillus tubingensis* en un reactor y los cultivos se incuban con un flujo de aire de 1 a 1.5 litros por minuto, a temperaturas de 23°C a 30 °C durante 36 a 60 horas,
 - 10 c) etapa de reducción de Cr(VI), se recupera el sobrenadante de los cultivos y se transfiere a otro reactor. Se adicionan de 100 a 500 mg/l (concentración final del reactor) de Cromo VI, proveniente de los residuos industriales (lixiviados o efluentes) y se permite un tiempo de residencia de 15 a 60 minutos con un flujo de aire de 1 a 1.5 litros por minuto, a temperaturas de 23°C a 30 °C. En estas condiciones la eficiencia reductora es de 2.14-3.57 mM de Cromo VI, en 0.5 horas
15 de reducción.
2. El proceso descrito en la reivindicación 1, caracterizado porque el medio mínimo solidificado de agar comprende: KH_2PO_4 , MgSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, fuente de carbono, NaCl y compuestos orgánicos.
3. El proceso descrito en las reivindicaciones 1 y 2, caracterizado porque las
20 proporciones de KH_2PO_4 , MgSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, fuente de carbono, NaCl y compuestos orgánicos son de 0.2-0.3%, 0.1-0.3%, 0.4-0.6%, 0.2-0.3%, 0.4-0.6% y 0.02-1%, respectivamente.
4. El proceso descrito en las reivindicaciones 1, 2 y 3 caracterizado porque la fuente de carbono es: azúcar comercial.
- 25 5. El proceso descrito en las reivindicaciones 1, 2 y 3, caracterizado porque los compuestos orgánicos son: ácido cítrico y sus sales o ácido salicílico y sus sales.
6. El proceso descrito en las reivindicaciones 1, 2 y 3, caracterizado porque el pH del medio de cultivo se ajusta a 5.1-5.5.

RESUMEN

La presente invención reclama un proceso biotecnológico eficiente para la reducción de Cr(VI) con la finalidad de tratar, ex situ, efluentes industriales contaminados con cromo, el cual se basa en el empleo de sobrenadantes libres de biomasa obtenidos de cultivos de la cepa Ed8 de *Aspergillus tubingensis*. En este proceso se utilizan compuestos orgánicos que inducen, en la cepa Ed8, la producción de moléculas responsables de la transformación de Cr(VI).

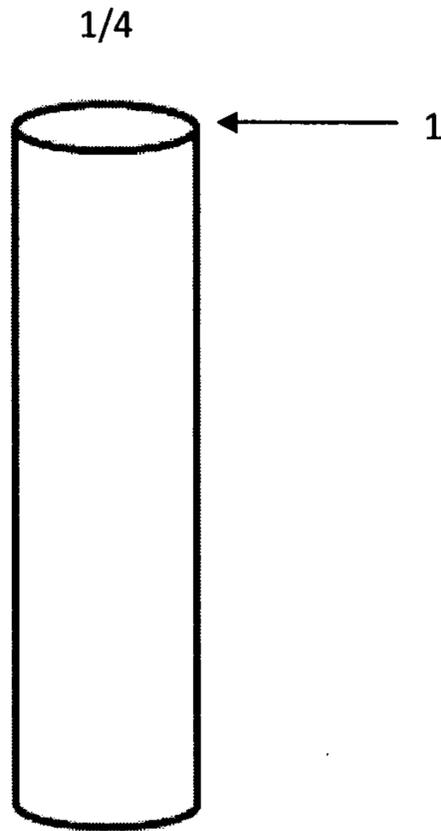


Figura 1

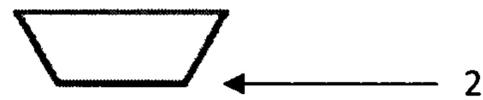


Figura 2

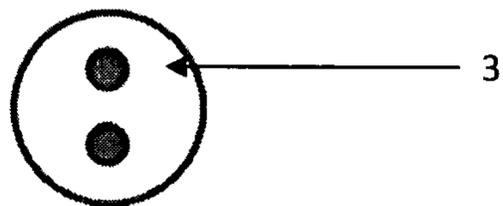


Figura 3

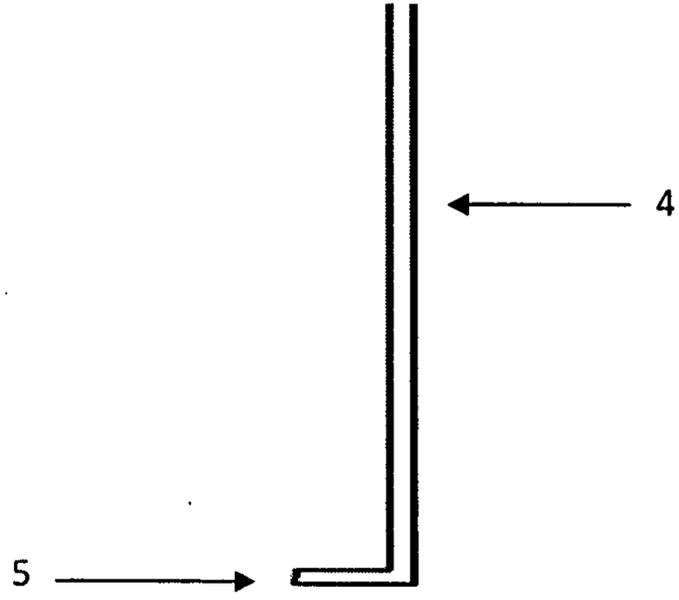


Figura 4



Figura 5

Figura 6

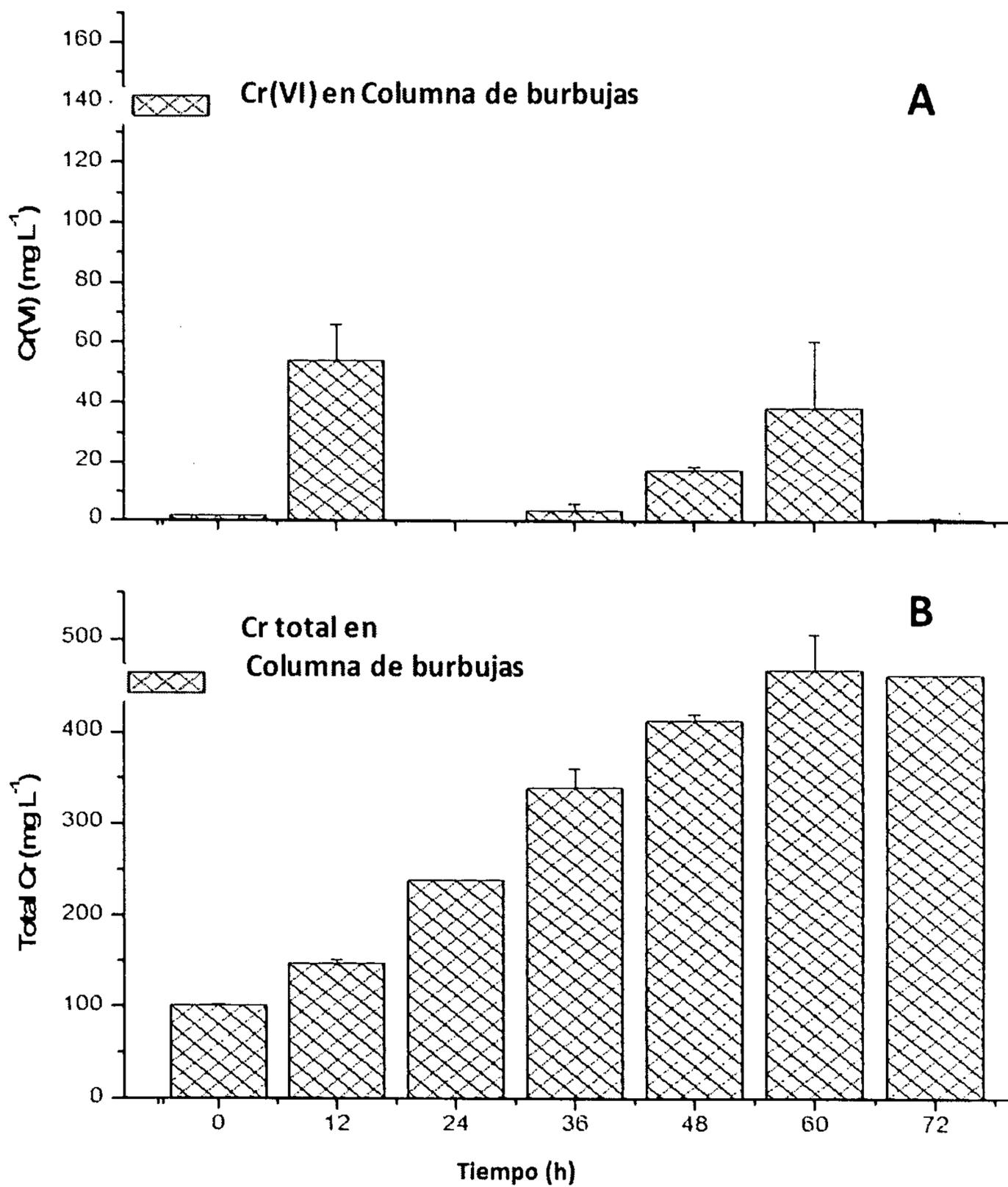


Figura 7

