

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD MICROBIANA EN UN REACTOR ANAEROBIO PARA EL TRATAMIENTO DE LIXIVIADOS RICOS EN CROMO(VI)

García Baca Ivonne (1), Bernal Martínez Arodí (2)

1 [Licenciatura en Ingeniería Ambiental, Universidad de Guanajuato] | [ivy_angel_coudy@hotmail.com]

2 [Departamento de Ingeniería Civil, División de Ingenierías, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [arodiberna@ugto.mx]

Resumen

Actualmente el Cromo es un metal necesario en la fabricación de productos de uso cotidiano, derivando en contaminación ambiental por Cromo(VI) que resulta un peligro para la salud humana por sus efectos toxicológicos. Existen pocos estudios de biorreducción del Cromo(VI) en condiciones anaeróbicas, por lo que no se han identificado muchos de los factores involucrados en este proceso. Esta investigación evaluó la capacidad de biotransformación del Cromo(VI), mediante la determinación de la Dosis Mínima Inhibitoria (DMI), el tiempo, la cinética de crecimiento y reducción del Cromo(VI) de un consorcio microbiano proveniente de un reactor anaerobio dosificado con lixiviados con alto contenido de Cromo(VI), expuesto a diferentes concentraciones de Cromo(VI) y utilizando efluentes residuales alternativos como fuente de carbono. La DMI del consorcio microbiano determinada fue de 100 mg/L de Cromo(VI), con un tiempo de desarrollo de colonias de 2 días y, la reducción de Cromo(VI) se presentó en 4 días con la máxima concentración de 200 mg/L. Con ello, se concluye que el consorcio microbiano demostró ser resistente y capaz de reducir el Cromo (VI), por lo que la reducción biológica de lixiviados ricos en Cromo(VI) por vía anaerobia se considera buena opción de biorremediación de sitios contaminados con este metal.

Abstract

Currently Chromium is a necessary metal in the manufacture of products of daily use, resulting in environmental pollution by Chromium (VI) that is a danger to human health by its toxicological effects. There are few bioreduction studies of chromium (VI) under anaerobic conditions, so many of the factors involved in this process have not been identified. This research evaluated the biotransformation capacity of Chromium (VI) by determining the Minimum Inhibitory Dose (DMI), time, growth kinetics and Chromium (VI) reduction of a microbial consortium from an anaerobic reactor dosed with Leached with high Chromium (VI) content, exposed to different concentrations of Chromium (VI) and using alternative residual effluents as carbon source. The DMI of the microbial consortium determined was 100 mg / L of Chromium (VI), with a development time of colonies of 2 days and, the reduction of Chromium (VI) was presented in 4 days with the maximum concentration of 200 mg / L. Thus, it is concluded that the microbial consortium proved to be resistant and capable of reducing Chromium (VI), so the biological reduction of Chromium (VI) rich leachates by anaerobic route is considered a good option of bioremediation of sites contaminated with this metal.

Palabras Clave

Lixiviados industriales; biotransformación; microorganismos; toxicidad; biotecnología.

INTRODUCCIÓN

La economía de León, Gto., está basada fuertemente en la cadena de producción cuero-calzado. Por lo anterior, en el valle de León se ha encontrado Cromo (VI) en tres cuartas partes de los pozos que se abastecen a la ciudad [1]. La zona más contaminada con Cromo en el Valle de León se encuentra a 13.5 Km al suroeste de la Ciudad de León y a 7 Km de San Francisco del Rincón [2]. Una de las principales fuentes potenciales son las instalaciones de la fábrica de cromatos de Química Central (QC) que fue clausurada en 2014, y que cuenta con un sitio de disposición final de residuos industriales ubicado a 1.5 Km al oeste [3], el cual contiene alrededor de 300,000 toneladas de residuos a la intemperie que aún siguen latentes en el interior de la industria, produciendo un alto contenido de lixiviados [2;4].

El Cromo es un metal que presenta varios estados de oxidación (los derivados de importancia biológica son 3+ y 6+) y tiende a formar iones complejos [5]. La presencia del Cr(III) en el ambiente existe de forma natural en rocas, animales, plantas, suelo y agua, que al contacto con material orgánico puede cambiar de Cr(VI) a Cr(III) [6]. Cabe mencionar que el Cr(III) es un elemento traza esencial para los seres vivos debido a que ayuda a mantener los niveles correctos del metabolismo de la glucosa, de los lípidos y proteínas en seres vivos. En cambio, el Cr(VI) puede alterar el equilibrio causando efectos tóxicos tanto en plantas como en animales, debido a que este es absorbido rápidamente por las membranas biológicas, siendo el tracto respiratorio el blanco principal [7].

Por ello, la biorremediación busca resolver los problemas generados por la contaminación mediante el uso de seres vivos que persisten en ambientes desfavorables y son potencialmente capaces de remover, extraer, degradar y transformar compuestos orgánicos e inorgánicos contaminantes en suelo, sedimento o agua [8;9]. Los mecanismos bioquímicos asociados a la reducción de Cr(VI) involucran: biosorción, transporte, bioacumulación, biomineralización, oxidación-reducción de metales y reducción enzimática (enzimas membranales o de la fracción soluble como las reductasas) [10], y algunos de los factores que influyen en la reducción biológica del Cr(VI) incluyen la concentración inicial de la

biomasa, el tipo y abundancia de la misma, los iones potenciales como MnO^- , Fe^{2+} , SO_4^{2-} (contenidos en los efluentes residuales como el ARD y el ARL), la fuente de energía y la afinidad del microorganismo a la fuente de carbono, el pH, la temperatura, el potencial REDOX y los ácidos orgánicos presentes en la materia orgánica [9;11].

Algunas bacterias Gram + presentan la capacidad para reducir el ion cromato en condiciones aeróbicas, sin embargo no son los únicos microorganismos capaces de reducir el Cr(VI) a Cr(III). La capacidad de reducir Cr anaeróticamente no es un proceso estrictamente específico, y puede ser llevada a cabo tanto por bacterias Gram +, como Gram -. Existen pocos estudios de reducción de Cr(VI) bajo condiciones anaeróbicas, uno de los cuales reporta la reducción del Cr(VI) en concentraciones de hasta 250 mg/L con buenos resultados bajo estas condiciones [12], más, sin embargo, no se ha identificado la dosis mínima de inhibición (DMI) del Cr(VI) en el consorcio de los microorganismos involucrados en la reducción, el tipo y la morfología de estos, ni el tiempo específico en el que proceso de reducción se lleva a cabo.

Debido a lo antes mencionado, el objetivo del presente trabajo es evaluar la toxicidad del Cromo(VI) sobre el crecimiento de un consorcio microbiano adaptado, determinando su tolerancia y analizando la actividad deshidrogenasa del consorcio microbiano.

MATERIALES Y MÉTODOS

El consorcio microbiano utilizado en el presente trabajo proviene de un reactor anaerobio que lleva en operación 365 días (el cual reduce 250 mg/L Cr(VI), alimentado con fuentes de carbono alternativas) inoculado con microorganismos provenientes del lago de Paranguero, ubicado en el municipio de Valle de Santiago, Guanajuato, en la zona conocida como "Las Siete Luminarias", el cual se considera un sitio extremo, debido a la presencia de altas concentraciones salinas.

Como fuente de carbono alternativa (FCA) para el consorcio, se utilizó la combinación de agua residual doméstica (ARD) y agua residual láctica (ARL), en una proporción 50:50 %V/V.

Determinación de la Dosis Mínima Inhibitoria y adaptación de los microorganismos reductores de Cr(VI)

Para determinar la DMI del Cr(VI) sobre el consorcio microbiano, se realizaron cultivos en placa expuestos a diferentes concentraciones (50, 75, 100, 150, 200 y 250 mg/L de Cr(VI)), utilizando agar bacteriológico al 30% p/v sobre la fuente de carbono previamente pasteurizada y la adición de 1 mL de inóculo, en un tiempo de incubación de 7 días a temperatura ambiente. Para asegurar condiciones anaerobias en la placa, esta fue sellada con papel Parafilm. Transcurrido este lapso se procedió con la identificación de aquellas placas en las que se presentó crecimiento microbiano y reducción del Cr(VI); además se llevó a cabo una tinción Gram correspondiente a cada una de ellas, esto con el fin de identificar los tipos de bacterias presentes y resistentes a la presencia del Cr(VI).

Posteriormente se procedió a la adaptación del consorcio a una determinada concentración de Cr(VI) mediante la elaboración de 5 resiembras por estriado en placa de Petri con 50 mg/L de Cr(VI) a un tiempo de exposición de 7 días.

Evaluación del desarrollo de microorganismos expuesto a Cr(VI)

Se realizó la determinación del tiempo de desarrollo de colonias, mediante la siembra en placa con 50 mg/L de Cr(VI) en 7 periodos de tiempo (por duplicado) de los microorganismos adaptados con anterioridad a esta misma concentración, en la cual cada periodo de tiempo corresponde a 1 día de exposición. Al presentarse el primer indicio de crecimiento microbiano, se elaboró tinción Gram para la observación morfológica de los microorganismos presentes en cada periodo de tiempo.

Determinación de la cinética de crecimiento

Para determinar la cinética de crecimiento del consorcio se elaboraron cultivos en medio líquido (ARL+ARD en proporción 50:50 %v/v) con concentraciones de 0, 50, 100, 150 y 200 mg/L de Cr(VI), además de sus respectivos controles sin inocular, además de un blanco, el cual solo contenía el medio líquido. El diseño del experimento se muestra en el Tabla 1. Cada

cultivo, según su concentración, fue evaluada a diferentes periodos de exposición y en cada uno de ellos se determinaron los siguientes parámetros: pH, potencial redox (Predox), densidad óptica, actividad deshidrogenasa (ADH), sólidos suspendidos volátiles (SSV) y determinación de la disminución de Cr(VI).

Tabla 1. Diseño del experimento para la evaluación de parámetros cinéticos.







mg/L de Cr(VI)	Tiempo de exposición							
0	T ₀							
50	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄			
100	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅		
150	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	
200	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅	T ₆	T ₇

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Determinación de la Dosis Mínima Inhibitoria adaptación de los microorganismos reductores de Cr(VI)

De las concentraciones evaluadas se pudo obtener que, los microorganismos presentes en el consorcio pueden crecer en presencia de hasta 100 mg/L de Cr(VI), inhibiendo su crecimiento a partir de 150 mg/L de Cr(VI), como se observa en la Tabla 2.

Tabla 2. Formación de colonias con exposición al Cromo (VI) en placa de Petri.

mg/L Cr(VI)	Aspecto de la placa	Tinciones Gram
Control		
50		
75		

100		
150		Sin crecimiento microbiano
200		Sin crecimiento microbiano
250		Sin crecimiento microbiano

Gracias a la elaboración de la tinción de Gram, se pudo observar que, en el consorcio se encuentra una mayor población de bacterias en forma de bacilos Gram + y, menormente Gram -, con lo que se comprueba que las bacterias Gram + presentan una mayor resistencia y reducción del ion cromato en condiciones anaeróbicas.

Al realizar la adaptación del consorcio se logró aumentar la resistencia de éste a la presencia del Cr(VI) y, además, con ello, se denotó una reducción considerable en el tiempo de crecimiento que se había presentado anteriormente (6 y 7 días aproximadamente).

Evaluación del desarrollo de microorganismos expuesto a Cr(VI)

El tiempo en el que se presentaron los primeros indicios de crecimiento, fue a partir del segundo día, estos resultados se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Determinación del tiempo de proliferación de microorganismos expuestos a Cr(VI).

Tiempo (días)	Observaciones	Tinción Gram
1	Disminución de la coloración amarillo. Sin crecimiento microbiano.	ND
2	Disminución de la coloración amarillo en agar y presencia de crecimiento de bacilos de diversos tamaños, en su mayoría se presentan bacterias Gram +.	
3	Disminución de la coloración amarillo característico del Cr ⁶⁺ . Presencia de bacilos de diversos tamaños, mayormente Gram +.	

4	Presencia de bacilos de diversos tamaños, en su mayoría Gram +. Disminución de coloración amarillo en medio de cultivo.	
5	Presencia de bacilos de diversos tamaños, en su mayoría Gram +. Cambio de coloración de amarillo a gris-azulado en el medio de cultivo.	
6	Presencia de bacilos de diversos tamaños, en su mayoría Gram +. Coloración del agar con tendencia al gris-azulado	
7	Presencia de bacilos de diversos tamaños, en su mayoría Gram +. Coloración de agar con tendencia al gris-azulado.	

ND: No determinado

Determinación de la cinética de crecimiento

En la Tabla 4 se presentan los resultados de las pruebas para la determinación de los parámetros cinéticos, pero solo para los controles (sin microorganismos) y blancos [sin exposición a Cr(VI)]. En la que se observa que la presencia de microorganismos si influyó en la mayoría de los parámetros evaluados. En los controles se puede apreciar que, tanto el pH como el Predox aumentaron al presentar mayor concentración de Cr(VI), en cambio, los SSV disminuyeron a mayor concentración de Cr(VI). En cuanto a la determinación de Cr(VI) presente, se puede apreciar que este, al contacto con la materia orgánica presente en el medio de cultivo, reduce la concentración de Cr(VI).

Tabla 4. Comportamiento de los controles y blancos en las pruebas para la determinación de parámetros cinéticos.

Parámetro	pH	Predox (mV)	D.O. (Abs)	ADH (mg/L)	Cr(VI) (mg/L)	SSV (mg/L)
ARL+ARD	3.56	157	0	0.51	1	640
ARL+ARD+ μ org	3.59	152	0.223	4.72	1	1260
50 mg/L Cr(VI) Sin μ org	3.63	283.5	0.162	-0.38	5	1085
100 mg/L Cr(VI) Sin μ org	3.655	347.5	0.1365	-0.15	16	855

150 mg/L Cr(VI) Sin μ org	3.7	362	0.2195	1.65	30	760
200 mg/L Cr(VI) Sin μ org	3.71	371.5	0.2005	1.8	39.5	475

Los resultados obtenidos para las pruebas con exposición a las diferentes concentraciones y periodos de tiempo se muestran a continuación en la Tabla 5, donde se puede apreciar que, tanto en el Predox y la ADH de cada concentración tendió a disminuir a lo largo del tiempo de exposición, pero los datos de esta última no se consideran relevantes debido a que el método de análisis no fue el adecuado para la determinación de la actividad microbiana, ya que presentó cantidades muy pequeñas, llegando a ser indetectables por este método. En cuanto al pH se observa que hay una mayor tendencia a aumentar, con presto se va dando la reducción del Cromo.

Tabla 5. pH, Predox y ADH en pruebas de reducción de Cr(VI).

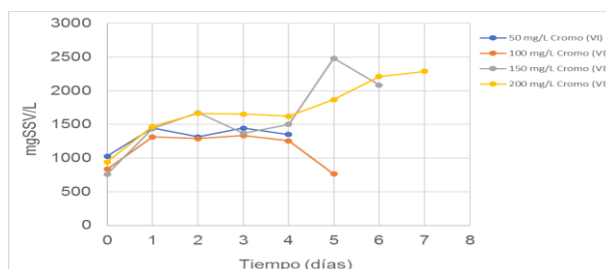
Parámetro	50 mg/L		100 mg/L		150 mg/L		200 mg/L	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
pH	3.675	3.605	3.675	3.745	3.71	3.81	3.705	3.92
POR	316.5	105.5	357.5	56.5	371	58.5	382	78.5
ADH	-0.33	-0.58	1.215	0.095	1.025	-0.33	2.035	0.74

Al determinar la presencia de Cr(VI) (Gráfica 1) a lo largo del tiempo, se puede apreciar que en todos los casos después del día 2, la reducción de la concentración de Cr(VI) es evidente, llegando a disminuir notablemente al término del experimento.



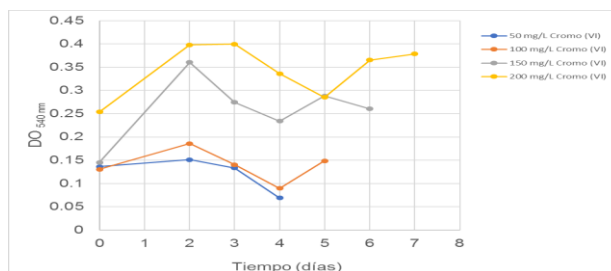
Gráfica 1. Determinación de Cr (VI) durante el periodo de exposición.

En cuanto a la determinación de SSV, como se muestra en la Gráfica 2, se puede apreciar que, el contenido de estos fue aumentando a partir del día 1 en todos los casos. Luego se mantuvo relativamente constante hasta el día 4, para posteriormente para las concentraciones de 50 y 100 mg/L disminuir. En cambio, para las concentraciones de 150 y 200 mg/L, nuevamente se ve incrementados los valores (posiblemente debido a otra fase de crecimiento).



Gráfica 2. Sólidos suspendidos volátiles durante el periodo de exposición.

En la Gráfica 3 se presentan los datos obtenidos para la densidad óptica en la que se puede apreciar que, en todos los casos se obtuvo un mayor crecimiento microbiano en los dos primeros días de exposición, después un periodo de disminución considerable hasta el día 4, y posteriormente, un nuevo aumento en la densidad poblacional. Por lo que se comprueba que la reducción de Cr(VI) a Cr(III) se llevo a cabo hasta el día 2, después un periodo de muerte y adaptación al Cr(III) y finalmente un nuevo episodio de crecimiento microbiano, al igual que con los SSV que presentó un comportamiento similar.



Gráfica 3. Densidad óptica durante el periodo de exposición.

A partir de los datos anteriores, se obtuvo la velocidad específica de crecimiento (μ) y tiempo de duplicación (t_d) del consorcio en cada caso (mediante el uso de las ecuaciones de Monod), los cuales se muestran en la Tabla 6 y donde se puede apreciar que al incrementar las concentraciones de Cr(VI), la velocidad específica de crecimiento disminuye y el tiempo de duplicación aumenta.

Tabla 6. Velocidad específica de crecimiento y tiempo de duplicación.

Parámetro	50 mg/L	100 mg/L	150 mg/L	200 mg/L
μ (día ⁻¹)	0.335	0.187	0.116	0.101
t_d (día)	2.065	3.700	5.959	6.844

CONCLUSIONES

El consorcio microbiano demostró ser resistente y capaz de reducir el Cr(VI). El tiempo de crecimiento microbiano para 50 mg/L Cr(VI) fue de 2 días, gracias a que el consorcio se hizo más resistente con la elaboración de las resiembras, y al aumentar la concentración de Cr(VI) hasta 200 mg/L, el tiempo de reducción aumenta, pero se da en un lapso máximo de 4 días. En cuanto a la cinética de crecimiento, se llegó a la conclusión de que al incrementar las concentraciones de Cr(VI), la velocidad específica de crecimiento disminuye y el tiempo de duplicación aumenta. Por otro lado, la DMI se determinó fue de 100 mg/L de Cr(VI), y la morfología de los microorganismos presentes en el consorcio fue mayormente bacilos Gram +, viéndose también en menor y casi nula proporción, bacilos Gram -. Dicho lo anterior, la reducción biológica de Cr(VI) por vía anaerobia se considera una buena opción de biorremediación de sitios contaminados con este metal, aunque aún falta por estudiar más a fondo como es que el proceso se lleva a cabo y optimizar el proceso.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por el financiamiento del proyecto de investigación BIOMETAL 188775 y a la Dirección de Apoyo a la Investigación y Posgrado por la beca otorgada.

REFERENCIAS

- [1] Blackman, A. (2005). Adoption of Clean Leather-Tanning in Mexico. Discussion Paper. Resources for the future. Washington, DC.
- [2] Armienta, M.A. y Rodríguez, R., Cisneros, N., Juárez, F., Cruz, O. (1996). Distribution, origin and fate of chromium in soils in Guanajuato, México. *Environmental Pollution*. 91:391-397.
- [3] Reyes G., L.R., Romero G., E.T., Olmos S, M. G. y Rodríguez C, R. (2009). Chemical species of chromarite o fan industrial landfill in the Leon Valley, Guanajuato, México. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*. 26:104-116.
- [4] Armienta, M.A., Quere, A., (1995). Hydrogeochemical behavior of chromium in the unsaturated zone and in the acuifer of León Valley, Mexico. *Enviromental Pollution*. 91:391-397.
- [5] Palmer, C. D. y Wittbrodt P. R. (1991). Processes affecting the remediation of chromium contaminated sites. *Enviromental Health Perspectives*. 92:25-40.
- [6] EPA, (2010). Cromo (VI) en agua potable; (EPA 815-F-10-006) U.S. Environmental Protection Agency. Washington D.C. Diciembre.
- [7] Villalobos A., Ellis A., Armienta M.A., Morton. B.O, and Johnson T.M. (2012). Geochemistry an Cr stable isotopes of Cr-contaminated groundwater in Leon valley, Guanajuato, Mexico. *SVSD; Applied Geochemistry* 27:1783-1794.
- [8] Vullo, D.L. (2003). Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Revista Química Viva*. 2(3).
- [9] Adeniji, A. (2004). Bioremediation of Arsenic, Chromium, Lead and Mercury. Recuperado de http://www.cluin.org/download/studentpapers/bio_of_metals_paper.pdf.
- [10] Tekerlekopoulou, A.; Tsiamis, G.; Dermou, E.; Siozios, S.; Bourtzis, K. and Vayenas, D.V. (2010). The effect of carbon source on microbial Community structure and Cr (VI) reduction rate. *Biotechnology and Bioengineering*. 107(1):478-478.
- [11] Michailides. M, Tekerlekopoulou A.G., Akratos C.S., and Vayenas D.V. (2012). A kinetic study of biological Cr (VI) reduction in drawfill reactors. Memoria de congreso Protection and restoration of the enviroment XI. Wastewater treatment and management, Thessaloniki, Greece. Julio 2012.
- [12] Moreno González, A. (2017). Propuesta de un sistema anaerobio como alternativa para el tratamiento de lixiviados ricos en Cromo hexavalente de una industria química. Tesis de Maestría en Ciencias del Agua. Universidad de Guanajuato. División de Ingenierías, Campus Guanajuato. Departamento de Ingeniería Geomática e Hidráulica.