

REDUCCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CROMO (VI) POR *BACILLUS CEREUS* B₁ EN AGUAS RESIDUALES DE GALVANOPLASTIA

Jennifer Andrea Moreno Benavides

Universidad del Valle, Apartado Aereo 25360, Cali, Colombia.

correo electrónico: jennifer.610@hotmail.com

Enrique Javier Peña Salamanca

Universidad del Valle, Apartado Aereo 25360, Cali, Colombia.

correo electrónico: enrique.pena@correounivalle.edu.co

Neyla Benítez Campo

Universidad del Valle, Calle 13 No 100-00, Cali, Colombia.

correo electrónico: neyla.benitez@correounivalle.edu.co

RESUMEN

Las industrias galvánicas son reconocidas mundialmente por estar entre las más contaminantes, debido a que generan descargas de agua con metales pesados que resultan ser tóxicos para el ambiente. En esta investigación, se evaluó la capacidad reductora de Cr (VI) por parte de *B. cereus* B₁, en aguas residuales generadas en una industria galvánica. Para ello, se realizaron ensayos de biorreducción de Cr (VI), empleando agua residual real (ARR) de una galvanoplastia y agua residual artificial (ARA), con y sin glucosa. El ARA se preparó a partir de sales de Ni, Zn, Cu, Pb y Cr, simulando la concentración del ARR. Se monitoreó la concentración de Cr (VI) y el crecimiento celular, tres veces al día por cinco días. Además, se evaluaron los efectos tóxicos del agua residual, sobre la morfología de *B. cereus* B₁, por medio de microscopia electrónica de barrido. En el ARA se alcanzaron porcentajes de reducción de Cr (VI) de 100 % y 71 %, mientras que en el ARR, la reducción fue de 75,6 % y 31,7 %, en los experimentos con y sin glucosa respectivamente. A pesar del bajo porcentaje de reducción en el ARR sin glucosa, se alcanzaron concentraciones de $\pm 0,14$ mg Cr (VI)/L, valor dentro de los límites permisibles (0,5 mg Cr (VI)/L). La microscopia mostró alteraciones en la pared celular y disminución del tamaño, principalmente en las bacterias expuestas al ARR. Lo que permite proponer a *B. cereus* B₁, como un microorganismo promisorio para la biorremediación de efluentes industriales contaminados con Cr (VI).

Palabras clave: biorremediación, efluentes industriales, glucosa, metales pesados.

ABSTRACT

Electroplating industries are globally recognized as being among the most polluting because they generate large amounts of water contaminated with heavy metals that become toxic to the environment. In this research, the reducing capacity of *B. cereus* B₁ in wastewater generated in electroplating industry was evaluated. For this purpose, test bioreduction of Cr (VI) was performed, using electroplating wastewater (EWW) and artificial wastewater (AWW), with and without glucose. The AWW was prepared from Ni, Zn, Cu, Pb and Cr reagents, simulating the concentration of EWW. The Cr (VI) concentration and cell growth was measured three times daily for five days. Furthermore, the toxic effects of wastewater, on the morphology of *B. cereus* B₁, were evaluated using scanning electron microscopy. In EWW the Cr (VI) was reduced 100 % and 71 %, while in AWW the removal was 75,6 % and 31,7 %, in experiments with and without glucose respectively. Despite the low percentage of reduction in EWW without glucose, concentration of $\pm 0,14$ mg Cr (VI)/L were achieved, value within the permissible limits (0,5 mg Cr (VI)/L). The scanning electron microscopy showed alterations in the cell wall and decrease in size, mainly in bacteria exposed to EWW. *B. cereus* B₁ is proposed as a promising microorganism for bioremediation of industrial effluents contaminated with Cr (VI).

Key words: bioremediation, glucose, heavy metals, industrial effluents.

INTRODUCCIÓN

Con el incremento de la actividad industrial en el mundo, los cuerpos de agua reciben continuamente

descargas de contaminantes tóxicos de tipo metálico que exceden la capacidad de autodepuración, trayendo como consecuencia graves problemas de

contaminación ambiental (Gómez *et al.* 2008). Estos contaminantes proceden de actividades industriales muy variadas como la galvanoplastia, curtido de pieles, metalúrgica, industria del cemento, fotográfica, de baterías, mecánica, pinturas corrosivas etc. Los efectos toxicológicos sobre el ecosistema son de importancia ecológica y de salud pública, ya que puede provocar dermatitis irritativa, dermatitis alérgica, asma bronquial (OPS 1987) y daños en el ADN, aumentando el riesgo carcinogénico en humanos (Sedman *et al.* 2006).

Las galvanoplastias o industrias de depósito por vía electrolítica, son aquellas líneas de producción que tienen como objetivo aplicar pequeñas capas de metales sobre sustratos metálicos o plásticos por medio de electricidad (Passos 1994), con el fin de modificar sus propiedades superficiales, aumentar su resistencia a la corrosión y al ataque de sustancias químicas, e incrementar su resistencia a la fricción y al rayado o mejorar su apariencia visual (Ministerio del Medio Ambiente del Ecuador 2011).

El proceso en estas industrias, involucra un tratamiento de limpieza inicial de la pieza para remover aceites, grasas e impurezas, seguido de un proceso de fijación de la capa protectora deseada, mediante electrolisis, y de un lavado final (Romero 2004). Los insumos que se utilizan en el proceso son usualmente: sulfatos de cobre y níquel, cianuros de sodio, cromo y zinc, hidróxido de zinc, cloruro de níquel y de cadmio, ácido bórico, ácido clorhídrico, solventes orgánicos, desengrasantes alcalinos, ácido sulfúrico, entre otros (Romero 2004). Siendo el cromo, el principal contaminante presente en aguas residuales de este tipo de industrias.

En lo que respecta al cromo, este es un elemento químico de número atómico 24, que pertenece al grupo VI B de la tabla periódica, dentro de los llamados metales de transición (Téllez *et al.* 2004). En la naturaleza se encuentra principalmente en dos estados de oxidación: la forma trivalente Cr (III) y la forma hexavalente Cr (VI). La proporción de Cr (VI) es más baja que la de Cr (III), sin embargo, esta es la forma más tóxica para plantas y animales, ya que se considera un agente fuertemente oxidante, bioacumulable y biomagnificable (Park *et al.* 2005). Por el contrario, el Cr (III), generalmente es tóxico solamente para plantas a elevadas concentraciones y es menos tóxico para animales (Anderson 1998).

Estos efectos hicieron que en Colombia se determinara que las concentraciones máximas permisibles de cromo total para vertimientos en cuerpos de agua o red de alcantarillado público, no deben exceder 0,5 mg/L (Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible 2012). Es por esta razón que algunas industrias,

han implementado métodos convencionales para la remoción de metales pesados como precipitación química, óxido reducción química, filtración, intercambio iónico y tratamiento electroquímico (Zouboulis *et al.* 1999), pero se han encontrado ciertas desventajas asociadas a costos, producción de residuos secundarios, poca efectividad a bajas concentraciones y rápida saturación, lo que los convierte en métodos inviables para pequeñas industrias (Gómez *et al.* 2008). Por esta razón en la actualidad, se promueve el desarrollo de tecnologías eficientes y de bajo costo como es la biorremediación (Vidali 2001), que ofrece la posibilidad de degradar, remover o reducir contaminantes a formas no tóxicas o menos tóxicas, para la salud humana y el ambiente (Garg *et al.* 2012).

En la interacción con los iones cromato, se han descrito diversos géneros bacterianos, entre los que se incluye a *Pseudomonas* sp. (Ishibashi *et al.* 1990), *Aeromonas* (Kvasnikov *et al.* 1985), *Enterobacter* (Wang *et al.* 1989), *Escherichia* (Shen & Wang 1993), *Bacillus* (Garbisu *et al.* 1998) y *Shewanella* (Myer *et al.* 2000), los cuales pueden interactuar con el metal a diferentes niveles: pared celular, periplasma, membrana plasmática, citoplasma y organelas celulares (Guevara 2010).

En *B. cereus*, se ha reportado la capacidad biorreductora de Cr (VI), en muestras con altas concentraciones del contaminante. Por ejemplo, Murugavelh & Mohanty (2013), reportaron una reducción casi completa de Cr (VI), a concentraciones iniciales de 10 y 50 mg/L, y entre el 96,7 % y 72,1 %, a concentraciones iniciales de 60 y 70 mg/L, respectivamente. Por su parte, Naik *et al.* (2012), reportaron la capacidad de *B. cereus* para reducir más del 75 % Cr (VI) a una concentración inicial de 968 mg/L. Además, tuvo la versatilidad para absorber otros metales diferentes al cromo y resistir la toxicidad del efluente (Naik *et al.* 2012). A escala de laboratorio, se ha reportado la capacidad de *B. cereus* *B*₁ para tolerar hasta 8000 ppm, y remover el 100 % del contaminante al cabo de 9, 34, 50 y 96 horas, a concentraciones iniciales de 10, 30, 50 y 100 ppm, respectivamente (Ramírez & Benítez-Campo 2013). Basado en lo anterior, este proyecto pretende evaluar la capacidad de *B. cereus* *B*₁ para reducir Cr (VI), presente en aguas residuales de una industria galvanizada.

MÉTODOS

Se tomaron muestras de aguas residuales en el sitio de vertimiento de los efluentes de una galvanoplastia, localizada en la ciudad de Cali, departamento de Valle del Cauca, Colombia. En el lugar de muestreo, se determinó la temperatura y el pH. Las muestras se almacenaron en frascos de vidrio previamente lava-

dos con HNO_3 al 10 % y esterilizados en autoclave, y se transportaron en neveras a 4°C , al laboratorio de Investigaciones Microbiológicas (LIM) del Departamento de Biología de la Universidad del Valle, en la Ciudad de Cali, Colombia. Según recomendaciones de la APHA, AWWA, WEF (1989), las muestras se procesaron en las siguientes seis horas. Inicialmente, se ajustó el pH a $7,5 \pm 0,2$ empleando Buffer Tris, que en investigaciones previas, ha mostrado ser el óptimo para el crecimiento de la cepa nativa B_1 (Lemos 2012).

El microorganismo empleado, fue seleccionado porque presentó una mayor tolerancia al Cr (VI) en estudios previos realizados a escala de laboratorio (Ramírez & Benítez-Campo 2013, Lemos 2012) y actualmente se encuentra crio conservado en el laboratorio de Investigaciones Microbiológicas de la Universidad del Valle.

Los bioensayos de reducción de cromo se realizaron por triplicado, empleando agua residual real de una galvanoplastia (ARR) y agua residual artificial (ARA), con y sin glucosa, filtradas a través de una membrana con $0,2 \mu\text{m}$ de tamaño de poro. Según Lemos (2012), la concentración óptima de glucosa para los bioensayos fue de $0,2 \text{ g/L}$.

Con el fin de determinar si en el ARR existen otros factores que pudieran influir en el proceso de reducción de Cr (VI), se preparó un agua residual artificial (ARA), en la que se disolvieron $14,11 \text{ mg/L}$ de $[\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]$, $0,07 \text{ mg/L}$ de $[\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]$, $0,15 \text{ mg/L}$ de $[\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}]$, $0,21 \text{ mg/L}$ de $[\text{Pb}(\text{NO}_3)_2]$ y $5,25 \text{ mg/L}$ de $[\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7]$. Estas concentraciones se definieron a partir del análisis fisicoquímico realizado al ARR de la galvanoplastia.

Cada bioensayo constaba de un erlenmeyer de 250 mL que contenía 50 mL de ARR y ARA e inóculo bacteriano. El inóculo se preparó a partir de colonias de una caja maestra, sembradas en 1000 mL de medio LB (Louria-Bertani) e incubadas a 30°C por 17 horas en un shaker a 125 rpm . El cultivo crecido, se trasvasó a 12 tubos falcon con 50 mL cada uno, los cuales se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos. Luego, se descartó el sobrenadante y el pellet se utilizó como inóculo en los diferentes tratamientos. Por cada tratamiento, se incluyó un control químico que contenía 50 mL de ARR y de ARA, con y sin glucosa; obteniendo un total de 16 erlenmeyer que se incubaron a 30°C y 125 rpm .

Se realizaron tres bioensayos, a partir de tres muestreos independientes, con cinco días de duración cada uno. Se determinó la concentración de Cr (VI) y crecimiento microbiano tres veces al día y el pH al principio y al final de cada ensayo. La concentración de Cr (VI)

se midió mediante el método espectrofotométrico de la 1,5-difenilcarbazida a 540 nm , utilizando el equipo HACH DR 890 (APHA, AWWA, WEF 1989) y el crecimiento microbiano por medio de la densidad óptica a 600 nm , empleando un espectrofotómetro (Thermo Spectronic Genesys 20, digital UV VIS).

Los resultados obtenidos para reducción de Cr (VI) (%) y crecimiento microbiano (D.O.), a través del tiempo, se analizaron gráficamente. La existencia de diferencias significativas, se evaluó mediante un análisis de varianza, para un diseño factorial 2^2 con bloque, donde cada bloque representó un bioensayo. La unidad experimental fue el erlenmeyer de 250 mL , los factores: tipo de agua y presencia/ausencia de glucosa, la variable de respuesta el porcentaje de reducción de Cr (VI) y la variable de control el crecimiento microbiano. El modelo asociado al diseño experimental, se expresó en la siguiente ecuación:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \tau_k + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad \text{Para } i = 1,2; j = 1,2,3...$$

Dónde:

y_{ijk} = Disminución porcentual en el nivel de Cr (VI) en agua residual dado el efecto del i-ésimo tipo de agua, con el j-ésimo nivel de glucosa, en el pi-ésimo ensayo.

μ = Disminución porcentual promedio en el nivel de cromo sin tener en cuenta el tipo de agua, ni el nivel de glucosa.

α_i = Efecto debido al i-ésimo tipo de agua en la disminución porcentual en el nivel de Cr (VI) en el agua residual.

β_j = Efecto debido al j-ésimo nivel de glucosa en la disminución porcentual en el nivel de Cr (VI) en el agua residual.

τ_k = Efecto debido al pi-ésimo ensayo en la disminución porcentual en el nivel de Cr (VI) en agua residual.

$(\alpha\beta)_{ij}$ = El efecto en la disminución porcentual en el nivel de Cr (VI) en agua residual debido a la interacción entre el i-ésimo tipo de agua y el j-ésimo nivel de glucosa.

ε_{ijk} = Efecto en la disminución porcentual en el nivel de Cr (VI) en agua residual debido al error experimental.

Las hipótesis a contrastar fueron las siguientes:

H_o = El porcentaje de Cr (VI) reducido en el agua residual es igual para los tres ensayos.

H_a = El porcentaje de Cr (VI) reducido en el agua residual es diferente para los tres ensayos.

H_o = El porcentaje de Cr (VI) reducido en el ARR es igual al porcentaje de Cr (VI) reducido en el ARA.

H_a = El porcentaje de Cr (VI) reducido en el ARR es diferente al porcentaje de cromo reducido en el ARA.

H_o = El porcentaje de Cr (VI) reducido en el agua residual con glucosa es igual al porcentaje de cromo reducido en el agua residual sin glucosa.

H_a = El porcentaje de cromo reducido en el agua residual con glucosa es diferente al porcentaje de cromo reducido en el agua residual sin glucosa.

H_o = El porcentaje de cromo reducido en el agua residual dado el tratamiento $(\alpha\beta)_{ij}$ es igual al porcentaje de cromo reducido en el agua residual en ausencia del tratamiento.

H_a = El porcentaje de cromo reducido en el agua residual dado el tratamiento $(\alpha\beta)_{ij}$ es diferente al porcentaje de cromo reducido en el agua residual en ausencia del tratamiento.

Los supuestos de normalidad se evaluaron mediante la prueba formal de Shapiro Wilk y los de homogeneidad de varianzas mediante la prueba formal de Levene. Cuando no se cumplió el supuesto de homogeneidad de varianzas, la transformación de los datos se hizo aplicando la función $Y = \arcsen(\sqrt{y})$. De igual manera, cuando se encontraron diferencias estadística-

mente significativas, se utilizó la prueba a posteriori de Tukey. Las pruebas estadísticas se realizaron con el software R y los gráficos con Origin (8,0).

Con el fin de evaluar el efecto tóxico del ARR y del ARA sobre la morfología de *B. cereus* B_1 , se expuso la bacteria a los distintos tratamientos y se visualizó mediante microscopía electrónica de barrido. Para ello, se tomaron 2 mL de cada erlenmeyer inoculado con la bacteria y 2 mL de un cultivo puro de *B. cereus* B_1 crecido en medio líquido (LB) durante 24 horas (control), los cuales se centrifugaron a 4000 rpm durante 10 minutos, descartando el sobrenadante. Posteriormente, se fijaron los microorganismos a una solución de glutaraldehído al 2,5 % y amortiguador fosfato 0,1M pH 7,2 durante 12 horas a 4°C. Las muestras fijadas fueron lavadas dos veces en amortiguador fosfato y deshidratadas sumergiendo e incubando la muestra a 4°C durante 10 minutos en concentraciones crecientes de etanol entre 30 % y 99,8 %. Inmediatamente, las muestras se secaron agregando hexametildisiloxano (HMDS) durante 30 segundos y se recubrieron con una película de oro, para su inmediata observación (Mora 2013).

RESULTADOS

Los resultados del análisis fisicoquímico del ARR se muestran en la Tabla 1. Estos parámetros indican contaminación por cromo y níquel, cuyos valores están por encima del valor máximo permitido por la norma para vertimientos (Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible 2012).

Tabla 1. Análisis fisicoquímico del agua residual de una galvanoplastia.

Parámetro	Resultado	VLMP*
Temperatura (°C)	24	40
pH (Unidades)	6,0	6-9
DBO5 (mg/L)	6,3	200
DQO (mg/L)	16,1	400
SSS (mg/L)	<0,1	10
SST (mg/L)	4,40	300
Sulfatos (mg/L)	15,7	-
Plomo (mg/L)	<0,210	0,20
Cobre (mg/L)	0,149	0,5
Zinc (mg/L)	0,067	2
Níquel (mg/L)	14,11	0,5
Cromo (VI) (mg/L)	5,24	0,5

*Valor Límite Máximo Permisible para vertimientos de aguas residuales de generadores que desarrollan actividades de recubrimiento electrolítico, según Ministerio de ambiente y desarrollo sostenible (2012).

La Figura 1 muestra los promedios entre las réplicas del crecimiento microbiano y el porcentaje de reducción de Cr (VI), durante las 132 horas de incubación, para el bioensayo 1. La Figura 1a muestra que en el ARR, se redujo el 24 % de Cr (VI) en las primeras 30 horas, tiempo en el que además, se produjo la mayor caída de la población bacteriana. Posteriormente, el proceso de reducción se estabilizó y la población comenzó a recuperarse, para finalmente decrecer y alcanzar un 29,3 % de reducción. La Figura 1b muestra que en el ARA, se redujo el 72 % de Cr (VI) y se mantuvo constante las últimas 36 horas. Desde el inicio del experimento, la población bacteriana decreció, sin embargo, la población final fue mayor que en el ARR.

La Figura 1c muestra que en el ARR con glucosa, se redujo el 83,3 % de Cr (VI) y se mantuvo constante las últimas 30 horas. El comportamiento de la población bacteriana fue similar al del ARR, pues sufrió un rápido decrecimiento en las primeras 30 horas, luego se estabilizó y decreció. Sin embargo, la población fue mayor a la del ARR. La Figura 1d muestra que en el ARA con glucosa, se alcanzó 100 % de reducción en las primeras 48 horas. La población bacteriana se mantuvo estable durante todo el ensayo y fue mayor que en los demás tratamientos. El control no presentó reducción química en ninguno de los tratamientos.

En los bioensayos 2 y 3 (datos no mostrados), se observó un comportamiento similar al bioensayo 1, obteniéndose los menores valores de reducción de Cr (VI) en el ARR, cuyos porcentajes fueron de 29,0 y 37,2 %, seguido del ARA con 77,6 y 64,2 %. Igualmente al bioensayo 1, la presencia de glucosa aceleró el proceso de reducción de Cr (VI), obteniéndose un 74,4 y 69,2 % en el ARR con glucosa en los ensayos 2 y 3 respectivamente, mientras que en el ARA con glucosa se alcanzó el 100 % de reducción para los dos bioensa-

yos restantes. Con respecto a la población bacteriana en los bioensayos 2 y 3, su comportamiento fue similar al bioensayo 1 (datos no mostrados).

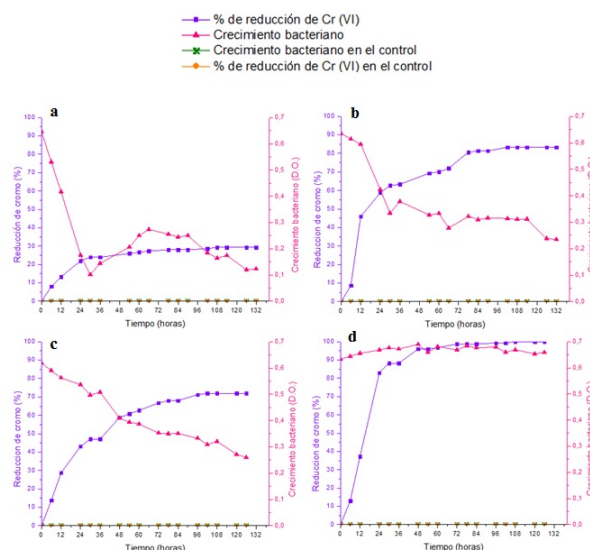


Figura 1. Porcentaje de reducción de Cr (VI) vs crecimiento microbiano (D.O) en el ensayo 1 en: (a) agua residual real; (b) Agua residual artificial; (c) Agua residual real con glucosa; (d) agua residual artificial con glucosa.

El análisis estadístico mostró que no hubo diferencias significativas entre los bioensayos para reducción de cromo ($p = 0,3326$). Pero si se encontraron diferencias significativas entre los factores tipo de agua ($p = 2e-16$), presencia de glucosa ($p = 2e-16$) y la interacción entre los factores tipo de agua-glucosa ($p = 0,0398$). Ver tabla 2.

Tabla 2. ANOVA para el diseño factorial 2^2 con bloque luego de aplicar la transformación.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
Bioensayo	2	0,0114	0,0057	1,142	0,3326
Agua	1	1,9195	1,9195	384,969	2e-16
Glucosa	1	2,3497	2,3497	471,256	2e-16
Tipo de agua*glucosa	1	0,023	0,023	4,617	0,0398
Residuales	30	0,1496	0,005		

Los resultados obtenidos en el ANOVA, se muestran en la Figura 2, observándose similitud en el porcentaje medio de reducción de cromo entre los bioensayos (Fig. 2a). El ARA, presentó un porcentaje de reducción muy superior (85,6 %) al ARR (53,7 %) (Fig. 2b), y la presencia de glucosa (Fig. 2c), aceleró el proceso de

reducción en un 87,8 % comparado con un 51,5 % en ausencia de dicho nutriente. Por su parte la interacción entre tipo de agua y glucosa (Fig. 2d), mostró un mayor efecto en el tratamiento con glucosa, favoreciendo la reducción en el ARA.

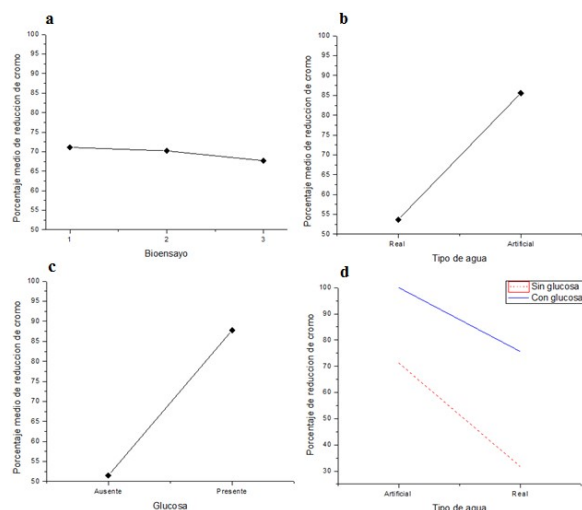


Figura 2. Porcentaje medio de reducción de cromo entre: (a) los bioensayos; (b) tipo de agua; (c) presencia o no de glucosa; (d) interacción entre el tipo de agua y la glucosa.

El análisis POST-ANOVA de Tukey, mostró para el factor tipo de agua (real/artificial) y glucosa (presente/ausente), una diferencia de -0,4618171 y 0,5109586 respectivamente, indicando que los factores, agua artificial y presencia de glucosa, presentaron mayor reducción de Cr (VI) comparado con los factores, agua real y ausencia de glucosa. Además, al comparar los distintos tratamientos, el análisis POST-ANOVA, mostró que no existieron diferencias significativas entre el ARR con glucosa y el ARA ($p = 0,463835$).

La microscopía electrónica de barrido, mostró cambios morfológicos en la célula bacteriana tras exponerse a los distintos tratamientos. En el control sin Cr (VI) (Fig. 3a), la bacteria presentó forma elongada y superficie

lisa; mientras que en el ARR (Fig. 3b-3c), la bacteria se tornó más pequeña, redondeada y con algunas rugosidades en su pared. En el tratamiento con el ARA (Fig. 3d-3e), aunque la célula conservó la forma elongada, se observó una disminución de tamaño y bordes desiguales sobre su pared.

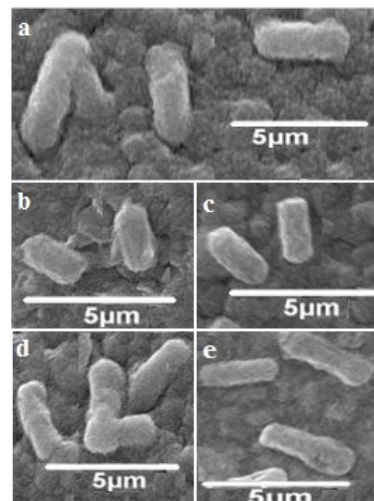


Figura 3. Microscopía electrónica de barrido que muestra los cambios en la morfología y el tamaño de *B. cereus* B₁: (a) control sin cromo; (b) agua residual real; (c) agua residual real enriquecida con glucosa; (d) agua residual artificial; (e) agua residual artificial enriquecida con glucosa.

En la Tabla 3 se muestran los resultados de pH inicial y final en el ensayo uno. En los ensayos con glucosa, hubo disminución del pH, mientras que en el ARR, hubo aumento del pH, y en el ARA, hubo una tendencia a permanecer constante. Este comportamiento fue a similar en los ensayos dos y tres (datos no mostrados).

Tabla 3. pH inicial y final de cada uno de los tratamientos.

Tratamiento	ARR	Control	ARR+G	Control	ARA	Control	ARA+G	Control
pH inicial	7,6	7,6	7,6	7,6	7,6	7,6	7,6	7,6
pH final	8,2	6,9	5,1	7,1	7,5	6,7	5,6	6,9

DISCUSIÓN

Las concentraciones de Pb^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} y Ni^{2+} , determinadas en la muestra del ARR (tabla 1), pueden considerarse limitantes en términos de la afinidad de dichos metales, por los grupos funcionales presentes en la superficie celular (Fosso-Kankeu *et al.* 2011), que probablemente conllevó a una competición con el Cr (VI) y en consecuencia una baja reducción de la concentración del mismo, principalmente en el ARR. Lo anterior también fue reportado por Naik *et al.* 2012,

donde la presencia de Ni^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{3+} y Zn^{2+} , afectó la absorción de Cr (VI) por parte de *B. cereus*. Por esta razón, la competencia entre los metales y su afinidad por ciertos sitios de la superficie celular bacteriana, juega un papel importante en la remoción de metales (Dhal *et al.* 2010).

En *Bacillus cereus*, por ejemplo, se ha encontrado que los grupos carboxil, amida y fosfato son los que tienen afinidad por el Cr (VI) y los grupos amida y carboxil por el Ni^{2+} (Naik *et al.* 2012). Dado que las

concentraciones de Cr (VI) y Ni^{2+} fueron las más altas en este estudio y además comparten afinidad por los mismos grupos, la competencia entre estos dos iones probablemente afectó la reducción de Cr (VI).

Los resultados obtenidos permitieron determinar que *B. cereus* B_1 , redujo aeróbicamente la concentración de Cr (VI). Dicha disminución puede deberse a la capacidad de reducción que se ha comprobado en la cepa B_1 de *B. cereus* (Ramírez & Benítez-Campo 2013). Este mecanismo pudo haber ocurrido al considerar el cambio de color, en todos los tratamientos, de amarillo a blanco conforme transcurría el ensayo, que según Garbisu *et al.* (1998), es un indicativo de la formación de hidróxido de cromo $[Cr(OH)_3]$.

En presencia de oxígeno, la reducción bacteriana de Cr (VI), consiste en un proceso de dos o tres pasos, donde el Cr (VI) inicialmente es reducido a intermediarios de vida corta como son el Cr (V) y Cr (IV), para finalmente producir el Cr (III) (Cheung & Gu 2007). El NADH, NADPH y los electrones de reserva endógena, son los responsables de donar electrones en el proceso de reducción de Cr (VI) a Cr (III) y la enzima cromato reductasa (ChrR), es la encargada de reducir el Cr (VI) para formar el Cr (V), donde además se genera una especie reactiva de oxígeno (ROS), que fácilmente se combina con complejos DNA-proteína (Cheung & Gu 2007).

Al ser el ARR sola, una matriz que no contó con un donador de electrones, la cepa expuesta a este tratamiento, únicamente logró utilizar su reserva endógena de electrones, lo que llevó a una escasa eficiencia de reducción en este tipo de agua. Sumado a esto, se resalta el hecho de que los efluentes industriales, contienen varios componentes iónicos (incluyendo cationes y aniones), adicionales a los iones de interés, que según se ha reportado, tienen un impacto perjudicial sobre la acumulación de metales (Suh & Kim 2000, citado por Wang & Chen 2006). Además, se ha sugerido que en aquellos procesos, en donde se llega a un punto en que la reducción decrece y eventualmente cesa, como ocurrió en algunos de los tratamientos, es producto de los efectos mutagénicos del Cr (VI) hacia las células bacterianas (Wang 2000), las cuales pueden llegar a formar una barrera que impide el paso de Cr (VI) al interior de la célula, como lo reportaron Horitsu *et al.* (1987) en estudios realizados con *Pseudomonas ambigua*. Por su parte, Komori *et al.* (1989), reportaron mutaciones en *Enterobacter cloacae* como resultado de un daño al ADN debido a la interacción con el Cr (VI) y Wang (2000), reportó que el daño al ADN causa interrupción en la replicación normal de las células, dando como resultado replicados mutantes de las células afectadas.

Por lo anterior, se han estudiado distintos compuestos, que eventualmente podrían utilizarse como donadores de electrones, en procesos de bioreducción a escala industrial, considerando su eficiencia tanto en rendimiento como en costos. Se incluye el uso de glucosa, glicerol (Fulladosa *et al.* 2006), acetato, sucrosa, succinato, oxalato, citrato, malato, lactato (Zakaria *et al.* 2007), dextrosa (Srivastava & Thakur 2007), fructosa y extracto de bagazo (Kathiravan *et al.* 2011, citado por Barrera-Díaz *et al.* 2012).

En esta investigación se encontró que independientemente del tipo de agua, aquellos tratamientos suplementados con glucosa mostraron una mayor reducción de Cr (VI). Estos resultados se asemejan a los reportados por Liu *et al.* (2006), quienes encontraron que la concentración de Cr (VI) disminuyó de 40 a 4,24 mg/L, (aproximadamente el 89 %) en un medio con glucosa, mientras que sin glucosa, la concentración de Cr (VI) cayó solo a 16,24 mg/L (aproximadamente el 59 %), después de 72 horas de incubación. Investigaciones sugieren que el efecto reductor cuando se suministra glucosa, se debe al hecho de que esta molécula entra en la vía de las pentosas, convirtiendo el NADP a su forma reducida, que a su vez proporciona metabolitos reducidos (Fulladosa *et al.* 2006).

Además de ser la glucosa una fuente donadora de electrones, también es una importante fuente de energía, que junto a otros elementos traza, aumenta el crecimiento de células vivas y facilita la biosorción de metales (Wang & Chen 2006). En estudios realizados por estos mismos investigadores, se determinó que en medio LB, alrededor de las 16-24 horas (periodo donde la reducción de Cr (VI) fue mayor), la glucosa fue completamente utilizada y los niveles de reducción de Cr (VI) prácticamente cesaron transcurrido este periodo.

De acuerdo a lo observado, puede inferirse que este mismo fenómeno ocurrió en el ARR con glucosa, pues aunque la reducción fue más rápida en las primeras 78 horas de incubación (Fig. 1c), transcurrido este tiempo, los porcentajes de reducción se estabilizaron, la glucosa se consumió y en consecuencia no hubo una completa reducción del Cr (VI) presente en el efluente. Además, el crecimiento de las células se favoreció en aquellos tratamientos con glucosa (Fig. 1c y 1d), lo que reafirma su papel determinante tanto en el crecimiento celular como en la reducción de Cr (VI).

La razón por la que en el ARA con glucosa, se redujo la totalidad del Cr (VI) presente en el efluente, se debió a varios factores. Uno de ellos la presencia de glucosa, pues en las primeras 24 horas de incubación, ya se había reducido más del 80 % del Cr (VI) y dado que

la población bacteriana siempre se mantuvo constante, no representó dificultad reducir el Cr (VI) restante (menos del 20 %). El segundo factor corresponde a la escasa variedad de componentes iónicos con los que se preparó este tipo de agua, pues solamente presentaba SO_4^{2-} y NO_3^- , de los cuales se ha encontrado que a concentraciones iniciales de 40 y 80 mg/L, la reducción de Cr (VI) no se afecta, pues bajo condiciones aeróbicas, ninguno de los dos compete con el Cr (VI) por aceptar electrones (Liu *et al.* 2006). Este último aspecto, también fue el responsable de no encontrar diferencias significativas entre el ARR con glucosa y el ARA, en la que la población bacteriana, a pesar de haber decrecido, se mantuvo por encima de la población expuesta al ARR con glucosa, lo que reafirma la toxicidad del agua industrial. Además, el agua tenía básicamente compuestos inorgánicos, donde la cepa de *B. cereus*, difícilmente podría realizar sus procesos metabólicos al ser una bacteria heterotrófica.

La tendencia del crecimiento microbiano y la reducción de Cr (VI), observada en el ARR con y sin glucosa, fue similar a la reportada por Wang & Xiao (1995), donde *Bacillus* sp., incrementó la tasa de reducción de Cr (VI) a través del tiempo, de manera inversa a la concentración de células. La razón está en que la reducción puede ser inhibida por la toxicidad del Cr (VI). Sin embargo, algunos estudios han mostrado que a pesar de haber una baja tasa de crecimiento, las células que crecen, son capaces de remover metales continuamente, a través de mecanismos de detoxificación interna (Malik 2004, citado por Wang & Chen 2006).

A pesar de que en todos los tratamientos *B. cereus* B_1 presentó cambios morfológicos, los más drásticos se observaron en el tratamiento con ARR, pues al parecer estos cambios, son el resultado de un mecanismo adoptado para resistir la toxicidad del medio (Naik *et al.* 2012). Como parte de este mecanismo, se presentan alteraciones en la estructura de la membrana celular y tamaño de la célula microbiana (Fosso-Kankeu *et al.* 2011), que son vitales para mantener la actividad metabólica y sobrevivir a la absorción de cromo y otros metales del efluente (Naik *et al.* 2012).

Frente a este punto, se ha sugerido la relación que existe entre la superficie celular y la susceptibilidad para reducir Cr (VI) en presencia de uno o varios metales. La razón, la existencia de una gran variedad de grupos funcionales: amida (Dhal *et al.* 2013), amina, carboxil, fosforil e hidroxil, a los que se unen metales pesados (Garg *et al.* 2012) y permiten que se lleven a cabo procesos de biosorción. Metales como Cu^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} (Garbisu *et al.* 1998), Hg^{2+} , Ag^{2+} (Ishibashi *et al.* 1990), Mo^{6+} y Fe^{3+} (Lovera

et al. 1993), han mostrado variados patrones de inhibición, que dependen de la cepa bacteriana probada (Garg *et al.* 2012). Por ejemplo, estudios realizados con *Bacillus* sp. JDM-2-1 y *Staphylococcus capitis*, mostraron una alta resistencia a Ni^{2+} (4000 $\mu\text{g/mL}$) y Cr (VI) (4500 y 2800 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente). Y el orden de resistencia respecto a las concentraciones de otros metales fue de: $Ni^{2+} > Pb^{2+} > Cu^{2+} > Zn^{2+} > Cd^{2+} > Hg^{2+}$ para *Bacillus* sp. JDM-2-1 y $Ni^{2+} > Pb^{2+} > Zn^{2+} > Cu^{2+} > Cd^{2+} > Hg^{2+}$ para *S. capitis* (Zahoor & Rehman 2009).

Por otro lado, se ha determinado que el pH puede afectar remarcablemente las propiedades de los grupos funcionales (carboxil, fosfato, amino, entre otros) sobre la superficie celular y los iones metálicos en solución (Liu *et al.* 2008). Al igual que los resultados obtenidos por Liu *et al.* (2006), se observó un incremento de pH en aquellos tratamientos sin glucosa, principalmente en el ARR (tabla 4). La razón está en que la reducción de Cr (VI) a Cr (III), como ya se mencionó anteriormente, requiere de un donador de electrones (endógeno en este caso), que gradualmente conlleva a una disminución del potencial de oxidación/reducción y en consecuencia un incremento de pH (Liu *et al.* 2008).

Liu *et al.* (2006) también reportaron un decrecimiento del pH en presencia de *Bacillus* sp. (de 7,2 a 5 y 6), después de 72 horas de incubar los tratamientos con glucosa. Lo anterior, como producto de los metabolitos (ácidos orgánicos) secretados por las células (Kumar 2011). También se ha propuesto que este decrecimiento, es producto de la formación y precipitación de complejos de cromo (Camargo *et al.* 2003). Por lo anterior, es necesario considerar el papel que desempeña la glucosa en el metabolismo de la bacteria, la resistencia al Cr (VI) y los mecanismos implicados en la reducción del mismo (Liu *et al.* 2006).

En la presente investigación, se reporta la capacidad que tiene *B. cereus* B_1 , para reducir Cr (VI) presente en aguas residuales de una galvanoplastia, a pesar de la toxicidad que representó este tipo de efluentes para la bacteria.

Pese a que el ARA se preparó con los mismos metales y a concentraciones similares a las reportadas en el ARR, esta última mostró una eficiencia de reducción de Cr (VI) menor a la del ARA, lo que demuestra la existencia de otros componentes que interfieren en el proceso reducción de Cr (VI) por parte de *B. cereus* B_1 , en el ARR.

A pesar de que los tratamientos con glucosa mostraron una eficiencia de reducción de Cr (VI), mayor que aque-

llos sin glucosa, en el ARR se alcanzaron concentraciones de Cr (VI) de $\pm 0,14$ mg/L, nivel que está dentro de los límites permisibles (0,5 mg/L), según norma colombiana. Lo que permite proponer a *B. cereus* B₁, como un microorganismo promisorio para la biorremediación de efluentes industriales contaminados con Cr (VI).

AGRADECIMIENTOS

A la profesora Neyla Benítez, por el acompañamiento y la asesoría brindada.
A los Biólogos Alexander Mora y Alexander Ramírez, por su ayuda en la realización de los experimentos.
Al Ing. Walter Agudelo por haberme permitido realizar los muestreos en la empresa Induzinc LTDA.
A mis compañeros del Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas de la Universidad del Valle, Gustavo Rodríguez y Natalia Aristizábal, por su acompañamiento.

LITERATURA CITADA

- American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA), and Water Environment Federation (WEF) (1989), *Standard methods for the examination of water and wastewater*, Joint Editorial Board, Washington D.C., EE.UU.
- Anderson, R. A. (1998), "Effects of Chromium on Body Composition and Weight Loss", *Nutrition Reviews*, Vol. 56 No. 9, pp. 266-270.
- Barrera-Díaz, C. E., Lugo-Lugo, V and Bilyeu, B. (2012), "A review of chemical, electrochemical and biological methods for aqueous Cr (VI) reduction", *Journal of Hazardous Materials*, Vol. 223-224, pp. 1-12.
- Camargo, F. A. O. Okeke, B. C., Bento, F. M. and Frankenberger, W.T. (2003), "In vitro reduction of hexavalent chromium by a cell-free extract of *Bacillus* sp. ES 29 stimulated by Cu^{2+} ", *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 62, pp. 569-573.
- Cheung, K. H. and Gu, J-D. (2007), "Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review", *International Biodeterioration and Biodegradation*, Vol. 59 No. 1, pp 8-15.
- Dhal, B., Abhilash and Pandey, B. D. (2013), "Process optimization for bio-beneficiation of a chromite concentrate by a Cr (VI) reducing native microbe (*Bacillus* sp.)", *International Journal of Mineral Processing*, Vol. 123, pp. 129-136.
- Dhal, B., Thatoi, H., Das, N. and Pandey, B. D. (2010), "Reduction of hexavalent chromium by *Bacillus* sp. isolated from chromite mine soils and characterization of reduced product", *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, Vol. 85, pp. 1471-1479.
- Fosso-Kankeu, E., Mulaba-Bafubandi, A. F., Mamba, B. B. and Barnard, T. G. (2011), "Prediction of metal-adsorption behaviour in the remediation of water contamination using indigenous microorganisms", *Journal of Environmental Management*, Vol. 92 No.10, pp. 2786-2793.
- Fulladosa, E., Desjardin, V., Murat, J-C., Gourdon R. and Villaescusa, I. (2006), "Cr (VI) reduction into Cr(III) as a mechanism to explain the low sensitivity of *Vibrio fischeri* bioassay to detect chromium pollution", *Chemosphere*, Vol. 65 No. 4, pp. 644-650.
- Garbisu, C., Alkorta, I., Lama, M. J. and Serra, J. L. (1998), "Aerobic Chromate Reduction by *Bacillus Subtilis*", *Biodegradation*, Vol. 9 No. 2, pp. 133-141.
- Garg, S. K., Tripathi, M. and Srinath, T. (2012), "Strategies for chromium bioremediation of tannery effluent", *Review of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 217, pp. 75-140.
- Gómez, S., Amaya, D., Maldonado, C., Martínez, M., Quevedo, B., Soto, A. and Pedroza, A. (2008), "Evaluación de tres hongos lignolíticos y de *Aspergillus niger* como alternativa para el tratamiento de aguas residuales del curtido de pieles", *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, Vol. 24 No.3, pp. 93-106.
- Guevara, D. S. (2010), *Biorremoción de cromo (cromo total y cromo VI) en agua sintética por dos inóculos bacterianos nativos compuestos a escala de laboratorio*. Trabajo de grado, Escuela Politécnica del Ejército.
- Horitsu, H., Futo, S., Miyazawa, Y., Ogai, S. and Kawai, K. (1987), "Enzymatic Reduction of Hexavalent Chromium by Hexavalent Chromium Tolerant *Pseudomonas ambigua* G-1", *Agricultural and Biological Chemistry*, Vol. 51 No. 9, pp. 2417-2420.

- Ishibashi, Y., Cervantes, C. and Silver, S. (1990), "Chromium reduction in *Pseudomonas putida*", *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 56, pp. 2268–2270.
- Komori, K., Rivas, A., Toda, K. and Ohtake, H. (1989), "Biological removal of toxic chromium using an *Enterobacter cloacae* strain that reduces chromate under anaerobic conditions", *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 35 No. 9, pp. 951-954.
- Kumar, M. (2011), "Studies on chromate removal by chromium-resistant *Bacillus* sp. isolated from tannery effluent", *Journal of Environmental Protection*, Vol. 2, pp. 76-82.
- Kvasnikov, E. I., Styepanyuk, V. V., Klyushnikova, T. M., Serpokrylov, N.S., Simonova, G.A., Kasatkina, T.P. and Panchenco, L.P. (1985), "A new chromium-reducing, Gram variable bacterium with mixed type of flagellation", *Mikrobiologiya*, Vol. 54, pp. 83–88.
- Lemos, C. (2012), *Evaluación de parámetros físico-químicos en la biorremediación de Cromo (VI) por bacterias aisladas de aguas residuales de curtiembres*. Trabajo de grado, Universidad del Valle.
- Liu, Y-G., Xu, W-H., Zeng, G-M., Li, X and Gao, H. (2006), "Cr (VI) reduction by *Bacillus* sp. isolated from chromium landfill", *Process Biochemistry*, Vol. 41 No. 9, pp. 1981-1986.
- Liu, Y-G., Feng, B-Y., Fan, T., Zhou H-Z and Li, X. (2008), "Tolerance and removal of chromium(VI) by *Bacillus* sp. strain YB-1 isolated from electroplating sludge", *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, Vol. 18 No. 2, pp. 480-487.
- Lovera, S., Bonet, R., Simon-Pujal, M. D. and Congregado, F. (1993), "Chromate reduction by resting cells of *Agrobacterium radiobacter* EPS-916", *Applied Environmental Microbiology*, Vol. 59, pp. 3516–3518.
- Ministerio del Ambiente del Ecuador (2011), *Estudio de potenciales impactos ambientales y vulnerabilidad relacionada con las sustancias químicas y tratamiento de desechos peligrosos en el sector productivo del Ecuador*, Quito – Ecuador.
- Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible (2012), "Por el cual se establecen los parámetros y los valores límites máximos permisibles en vertimientos puntuales a cuerpos de aguas superficiales y a sistemas de alcantarillado público, y se dictan otras disposiciones". Bogotá D.C. Colombia.
- Mora, A. (2013), *Estimación de la diversidad bacteriana en celdas de combustible microbianas*. Trabajo de grado, Universidad del Valle.
- Murugavelh, S. & Mohanty, K. (2013), "Isolation, identification and characterization of Cr (VI) reducing *Bacillus cereus* for chromium contaminated soil", *Chemical Engineering Journal*, Vol. 230, pp. 1-9.
- Myer, C. R., Carstens, B. P., Antholine, W. E. and Myers, J. M. (2000), "Chromium (VI) Reductase Activity Associated with the Cytoplasmic Membrane of Anaerobically Grown *Shewanella Putrefaciens* MR-1", *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 88 No. 1, pp. 98-106.
- Naik, U., Srivastava, S. and Thakur, I. (2012), "Isolation and characterization of *Bacillus cereus* IST105 from electroplating effluent for detoxification of hexavalent chromium", *Environmental Science and Pollution Research*, Vol. 19 No. 7, pp. 3005-3014.
- Organización Panamericana de la Salud (1987), *Cromo*. Serie Vigilancia 5. Metepec, México D.F.
- Park, D., Yun, Y-S and Park, J. M. (2005), "Use of dead fungal biomass for the detoxification of hexavalent chromium: screening and kinetics", *Process Biochemistry*, Vol. 40 No. 7, pp. 2559-2565.
- Passos, R. (1994), "Tecnologías de tratamiento de efluentes de galvanoplastias", *Información Tecnológica*, Vol. 5 No. 5, pp. 51-54.
- Ramírez, A and Benítez-Campo, N. (2013), "Tolerancia y reducción de cromo (VI) por *Bacillus cereus* B₁, aislado de aguas residuales de una curtiembre", *Revista de Ciencias, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad del Valle*, Vol. 17 No. 2, pp. 51-63
- Romero, J. A. (2004), "Aguas residuales de industrias de galvanoplastia", *Revista de la Escuela Colombiana de Ingeniería*, No. 53, pp. 22-30.
- Sedman, R. F., Beaumont, J., McDonald, T. A., Reynolds, S., Krowech, G. and Howd, R. (2006), "Review of the evidence regarding the carcinogenicity of hexavalent chromium in drinking water", *Journal of Environmental Science and Health Part C*, Vol. 24 No.1, pp. 155-182.
- Shen, H and Wang, Y. T. (1993), "Characterization of enzymatic reduction of hexavalent chromium by *Escherichia coli* ATCC 33456", *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 59, pp. 3771–3777.

- Srivastava, S. and Thakur I. (2007), "Evaluation of biosorption potency of *Acinetobacter* sp. for removal of hexavalent chromium from tannery effluent", *Biodegradation*, Vol. 18 No. 5, pp. 637-646.
- Téllez, J., Carvajal, R. and Gaitán, A. (2004), "Aspectos toxicológicos relacionados con la utilización de cromo en el proceso productivo de curtiembres", *Revista Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia*, Vol. 52 No.1, pp. 50-61.
- Vidali, M. (2001), "Bioremediation. An overview", *Pure and Applied Chemistry*, Vol. 73 No. 7, pp. 1163–1172.
- Wang, P. C., Mori, T., Komori, K., Sasatsu, M., Toda, K. and Ohtake, H. (1989), "Isolation and characterization of an *Enterobacter cloacae* strain that reduces hexavalent chromium under anaerobic conditions", *Applied Environmental Microbiology*, Vol. 55, pp. 1665–1669.
- Wang, Y-T. and Xiao, C. (1995), "Factors affecting hexavalent chromium reduction in pure cultures of bacteria", *Water Research*, Vol. 29 No. 11, pp. 2467-2474.
- Wang, Y-T. (2000), "Microbial reduction of chromate", in Lovely, D.R. (Ed.), *Environmental Microbe–Metal Interactions*, American Society for Microbiology Press, Washington, DC, pp. 225–235.
- Wang, J. and Chen, C. (2006), "Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review", *Biotechnology Advances*, Vol. 24 No. 5, pp. 427-451.
- Zahoor, A. and Rehman, A. (2009), "Isolation of Cr (VI) reducing bacteria from industrial effluents and their potential use in bioremediation of chromium containing wastewater", *Journal of Environmental Sciences*, Vol. 21 No. 6, pp. 814-820.
- Zakaria, Z. A., Zakaria, Z., Surif, S. and. Ahmad, W. A (2007), "Hexavalent chromium reduction by *Acinetobacter haemolyticus* isolated from heavy-metal contaminated wastewater", *Journal of Hazardous Materials*, Vol. 146 No. 1–2, pp. 30-38.
- Zouboulis, A. I., Rousou, E. G., Matis, K. A and Hancock, I. C. (1999), "Removal of toxic metals from aqueous mixtures. Part 1: Biosorption", *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Vol. 74 No. 5, pp. 429-436.