



Universidad Nacional de Río Cuarto  
Facultad de Ciencias Exactas, Físico Químicas y Naturales

# **SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS TOLERANTES A CROMO (VI) AISLADOS DE ÁREAS CONTAMINADAS DE LA PROVINCIA DE CÓRDOBA PARA SU USO EN BIORREMEDIACIÓN**

Trabajo Final de Grado  
Laura F. Ambrosio

Río Cuarto, Córdoba 2013

El presente Trabajo Final fue realizado en el Departamento de Biología Molecular perteneciente a la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto. El mismo se presenta como requerimiento para optar por el título de Microbiólogo.

Laura Fernanda Ambrosio  
Alumna

Dra. Paola González  
Directora

Licenciada Cintia Paisio  
Codirectora

Jurado:

Dra. Paola González

Dr. Fernando Ibañez

Dra. Daniela Medeot

## Agradecimientos

Fundamentalmente quiero agradecer a mi familia por su apoyo incondicional, no sólo en estos 5 años de estudios sino que durante toda mi vida. A mis viejos por apoyarme en cada uno de mis proyectos, y por el enorme esfuerzo que hacen para que no nos falte nada. A mi mamá que siempre tenía preparado algo rico para que me llevara en la semana, que me hacía el apoyo psicológico y me cebaba mates cuando me quedaba hasta la madrugada estudiando para rendir, a mi papá que se acordó de cada fecha en la que rendía y por la confianza que me tiene. A mi hermana que me entregaba la pieza o el comedor cuando tenía que estudiar, a mi tía y primos que se comieron mis charlas de parásitos y hongos, y a Dan por escucharme, por tener siempre una palabra de aliento, por sus consejos y “críticas constructivas” que siempre me enojan pero termino poniendo en práctica y por ser quien me acompañó desde el principio en esta nueva experiencia que es comenzar a estudiar una carrera y estar lejos de la familia.

A mis amigas Microbiológicas María, Mariana y Rocío por las tardes de estudio y mates que inevitablemente se convertían en rondas de chistes, imitaciones de María (De nuevoooooo!) y juegos de cartas. Las quiero mucho chicas, fue increíble encontrar tres personas tan parecidas a mí y a la vez tan distintas, por ustedes estos 5 años resultaron todo y más de lo que esperaba, que los mails y las juntadas no se terminen nunca! A mis amigos “del pueblo” Ema y Euge por noches de delire y películas, por caminatas hasta las 3 de la mañana y por los intentos de salir a correr con Ema, por todo el tiempo compartido.

A las chicas del Lab.!, a Pao, Orne, Ro, Cintia, Sabri, Ana, Meli, Anita y Eli, por hacerme sentir una más, por contestar mis interminables preguntas. Ustedes me mostraron que el compañerismo entre mujeres no es ningún mito, y son la única razón por la que me entristece no haberme quedado en la Universidad, espero que mis próximos compañeros de laboratorio sean tan buenas como ustedes.

# Índice

<b>Resumen</b>	<b>IV</b>
<b>Abreviaturas</b>	<b>VI</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1 Contaminación ambiental	1
1.1.1 Contaminación por metales pesados	2
1.2 Propiedades físico-químicas y toxicidad del cromo	3
1.2.1 El cromo en la industria de curtido de cueros	5
1.3 Remedación de contaminantes	6
1.3.1 Métodos de remediación biológicos	8
1.3.1.1 Biorremediación microbiana	9
1.3.1.2 Mecanismos microbianos involucrados en la remoción de Cr (VI)	11
1.3.1.3 Mecanismos de tolerancia a Cr (VI)	17
<b>2. Hipótesis y Objetivos</b>	<b>18</b>
2.1 Hipótesis	18
2.2 Objetivo general	18
2.3 Objetivos específicos	18
<b>3. Materiales y Métodos</b>	<b>20</b>
3.1 Material biológico	20
3.1.1 Condiciones de cultivo y mantenimiento de los microorganismos	20
3.2 Selección de una cepa bacteriana con capacidad para tolerar y remover Cr (VI)	20
3.2.1 Ensayo de tolerancia a Cr (VI)	20
3.2.2 Ensayo de remoción de Cr (VI)	21
3.3 Caracterización fenotípica e identificación del aislamiento C8	21
3.3.1 Caracterización morfo-fisiológica	21
3.3.2 Caracterización bioquímica	21
3.3.3 Identificación por secuenciamiento de ADN <sub>r</sub> 16S	22
3.3.4 Construcción del árbol filogenético basado en el gen ADN <sub>r</sub> 16S	22
3.4 Análisis del crecimiento y remoción de Cr (VI) por el aislamiento C8 en medio TY con distintas concentraciones del contaminante	23
3.5 Optimización de las condiciones de remoción	23

3.5.1 Efecto de diferentes medios de cultivo sobre la remoción de Cr (VI)	24
3.5.2 Efecto de distintas fuentes de carbono sobre el crecimiento y la remoción de Cr (VI)	24
3.5.3 Efecto de distintas concentraciones de glucosa sobre el crecimiento y la remoción de Cr (VI)	25
3.5.4 Efecto del pH sobre el crecimiento y la remoción de Cr (VI)	25
3.5.5 Efecto de la concentración inicial de inóculo sobre el crecimiento y la remoción de Cr (VI)	25
3.5.6 Efecto de distintas fuentes de nitrógeno sobre la remoción de Cr (VI)	25
3.5.7 Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la remoción de Cr (VI)	26
3.6 Evaluación de la tolerancia y capacidad de remoción de Cr (VI) del aislamiento C8 en presencia de fenol y en efluentes industriales	26
3.6.1 Tolerancia en placa a distintas concentraciones de Cr (VI), fenol y a ambos contaminantes	26
3.6.2 Remoción de Cr (VI) por el aislamiento C8 en presencia de fenol	27
3.6.3 Tolerancia en placa a diferentes efluentes industriales	27
3.7 Determinación de los mecanismos de remoción de Cr (VI) presentes en el aislamiento C8	28
3.7.1 Ensayos de bioadsorción de Cr (VI)	28
3.7.2 Ensayos de detección de cromato reductasas	28
3.8 Determinación del destino final del Cr (VI) incorporado al medio cultivo	31
3.9 Determinación del crecimiento bacteriano por método óptico y peso seco	31
3.9.1 Método óptico	31
3.9.2 Determinación de biomasa por peso seco	31
3.10 Determinación de Cr (VI) residual	32
3.11 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS)	33
3.11.1 Extracción de proteínas y preparación de las muestras	33
3.11.2 Determinación de la concentración de proteínas	33
3.12 Análisis estadístico	33
<b>4. Resultados y Discusión</b>	<b>34</b>
4.1 Selección de un aislamiento bacteriano con capacidad para tolerar y remover Cr (VI)	34
4.1.1 Ensayo de tolerancia a Cr (VI)	34
4.1.2 Ensayo de remoción de Cr (VI)	35
4.2 Caracterización fenotípica e identificación del aislamiento C8	36
4.2.1 Caracterización bioquímica e identificación	36
4.2.2 Identificación por secuenciamiento del ADNr 16S	38
4.2.3 Construcción de un árbol filogenético basado en el gen ADNr 16S	39

4.3 Análisis del crecimiento y remoción alcanzados por <i>Serratia</i> sp. C8 en medio rico (TY) utilizando distintas concentraciones de Cr (VI)	41
4.3.1 Crecimiento de <i>Serratia</i> sp. C8 en presencia de distintas concentraciones de Cr (VI)	41
4.3.2 Evaluación de la remoción de distintas concentraciones de Cr (VI) en medio rico (TY), por <i>Serratia</i> sp. C8	42
4.4 Optimización de las condiciones de remoción	43
4.4.1 Efecto de diferentes medios de cultivo sobre la remoción de Cr (VI)	43
4.4.2 Efecto de distintas fuentes de carbono sobre el crecimiento y la remoción de Cr (VI)	45
4.4.3 Efecto de distintas concentraciones de glucosa sobre el crecimiento y la remoción de Cr (VI)	50
4.4.4 Efecto del pH sobre el crecimiento y la remoción de Cr (VI)	51
4.4.5 Efecto de la concentración inicial de inóculo sobre el crecimiento y la remoción de Cr (VI)	53
4.4.6 Efecto de distintas fuentes de nitrógeno sobre la remoción de Cr (VI)	54
4.4.7 Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la remoción de Cr (VI)	55
4.5 Evaluación de la tolerancia y capacidad de remoción de Cr (VI) de <i>Serratia</i> sp. C8 en presencia de fenol y en efluentes industriales	57
4.5.1 Tolerancia en placa a distintas concentraciones de Cr (VI), fenol y a ambos contaminantes	58
4.5.2 Remoción de Cr (VI) por <i>Serratia</i> sp. C8 en presencia de fenol	58
4.5.3 Tolerancia en placa a diferentes efluentes industriales	60
4.6 Determinación de los mecanismos de remoción de Cr (VI) presentes en <i>Serratia</i> sp. C8	61
4.6.1 Ensayos de bioadsorción de Cr (VI)	61
4.6.1.1 Bioadsorción a pH 2	61
4.6.1.2 Bioadsorción por células autoclavadas	63
4.6.2 Ensayo de detección de cromato reductasas	63
4.6.2.1 Detección de cromato reductasas extracelulares	64
4.6.2.2 Detección de cromato reductasas intracelulares	65
4.7 Determinación del destino final del Cr (VI) incorporado al medio de cultivo	66
4.8 Análisis del perfil de proteínas de <i>Serratia</i> sp. C8 crecida en presencia y ausencia de Cr (VI)	67
<b>5. Conclusiones</b>	<b>69</b>
<b>6. Bibliografía</b>	<b>71</b>
<b>Anexo</b>	<b>85</b>

## Resumen

El importante desarrollo industrial generado para satisfacer las necesidades de la población mundial, es el responsable de gran parte de los problemas de contaminación ambiental actual. Esto se ve agravado cuando no se realizan los controles adecuados sobre el tratamiento y disposición de los efluentes generados por las industrias. Estos desechos, que pueden ser tanto orgánicos como inorgánicos, terminan siendo liberados al ambiente. Entre las industrias más contaminantes se encuentran las curtiembres, las cuales liberan en sus efluentes grandes cantidades de Cromo (VI), compuesto que es considerado un contaminante prioritario por la USEPA (Agencia de Protección Medioambiental de los Estados Unidos) debido a sus propiedades cancerígenas, mutagénicas y teratogénicas. En la actualidad se dispone de distintas estrategias de remediación para eliminar o disminuir la toxicidad de estos compuestos, entre éstas la remediación biológica ha ganado gran importancia, ya que se la considera una tecnología amigable con el ambiente, de bajo costo y alta eficiencia.

En este trabajo a partir de 8 aislamientos microbianos, provenientes de un efluente y suelo contaminado de una curtiembre, se seleccionó un microorganismo capaz de tolerar y remover elevadas concentraciones de Cr (VI), que fue posteriormente caracterizado e identificado mediante métodos bioquímicos y secuenciamiento de ADNr 16S como *Serratia* sp.

Al analizar el efecto de distintas concentraciones de Cr (VI) sobre la eficiencia de remoción, se observó que ésta disminuyó al aumentar las concentraciones de Cr (VI) de 5 mg/l a 100 mg/l, siendo la eficiencia de remoción del 75 y 58% en medio rico (TY) y medio mínimo (MM9) para 5 mg/l de Cr (VI), respectivamente. La optimización de los parámetros de remoción tales como medio de cultivo, fuente de carbono adicional y concentración de la misma, pH, concentración de inóculo y temperatura, lograron aumentar la eficiencia de remoción del microorganismo, el cual pasó de remover un 48% de 20 mg/l Cr (VI) en medio TY a remover un 75% de la misma concentración. Sin embargo, la adición de una fuente de nitrógeno adicional no modificó la remoción del contaminante.

Los ensayos de tolerancia a fenol, a Cr (VI), a ambos contaminantes y a efluentes industriales, mostraron que *Serratia* sp. C8 fue capaz de crecer en todas estas condiciones,

pudiendo además remover Cr (VI) en presencia de fenol, demostrando un alto potencial para su aplicación al tratamiento de efluentes o ambientes con contaminación mixta.

Se demostró que *Serratia* sp. C8 removió Cr (VI) a través de mecanismos de adsorción a la membrana externa, bioacumulación, como así también mecanismos de reducción, proceso que se llevó a cabo por cromato reductasas intracelulares. Por otra parte, se observó que la exposición de células a Cr (VI) produjo un patrón de proteínas totales diferente respecto de las células crecidas en ausencia del contaminante, indicando un posible efecto del Cr (VI) a nivel molecular y bioquímico.

Los resultados obtenidos indicarían que *Serratia* sp. C8 podría ser potencialmente aplicable en procesos de biorremediación de Cr (VI) a partir de efluentes o ambientes contaminados con este nocivo metal.

## Abreviaturas

<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>C:N</b>	Relación carbono-nitrógeno
<b>CMT</b>	Concentración máxima tolerada
<b>Cr (III)</b>	Cromo trivalente
<b>Cr (VI)</b>	Cromo hexavalente
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>EAA</b>	Espectrofotometría de absorción atómica
<b>ELC</b>	Extracto libre de células
<b>g/l</b>	Gramos por litro
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>M</b>	Molar
<b>mA</b>	Miliamperio
<b>mg/l</b>	Miligramos por litro
<b>mg/ml</b>	Miligramos por mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>ONU</b>	Organización de las Naciones Unidas
<b>pH</b>	Potencial de Hidrógeno
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>EROS</b>	<i>Especies reactivas del oxígeno</i>
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>t</b>	Tonelada
<b>USEPA</b>	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos

## **Introducción**

## 1. Introducción

### 1.1 Contaminación Ambiental

El término contaminación ambiental o polución se refiere a la alteración en la concentración de una sustancia o en la magnitud de un parámetro del ambiente, que ocurre como consecuencia de la introducción de un contaminante, provocando daños en los organismos vivos allí presentes. Este deterioro generado en el ambiente dependerá de la concentración y del tipo de contaminante (Bagad, 2009). El crecimiento poblacional y el consecuente crecimiento industrial generado para satisfacer distintos aspectos de la vida contemporánea, son actualmente la principal causa de contaminación ambiental (Mishra y Doble, 2008).

Existen diferentes tipos de contaminación, entre ellas la del agua, el aire y el suelo y las fuentes causantes de este proceso son varias y diversas, siendo la de origen industrial la más relevante (Bagad, 2009). Todas las actividades industriales generan contaminantes como subproductos, pero el problema se produce cuando éstos no son correctamente tratados. Los distintos tipos de contaminación mencionados se encuentran relacionados entre sí, ya que los recursos hídricos se ven afectados por el vertido de efluentes que no están adecuadamente tratados y el contacto de esta agua con el suelo mediante el riego u otras actividades produce su contaminación, a su vez las emisiones gaseosas generan fenómenos como las lluvias ácidas que contaminan el agua y el suelo, incluso las emisiones de CO<sub>2</sub> pueden alterar el pH de los océanos, afectando de esta manera a la flora y fauna marina ([www.unesco.org](http://www.unesco.org)).

Debido a esto, el cuidado del ambiente, el desarrollo sustentable y el favorecimiento de las tecnologías limpias son temas cada vez más abordados por organizaciones, agrupaciones y gobiernos. Entre los esfuerzos globales por reducir la contaminación pueden citarse a la Conferencia de Bali (2007), la Cumbre del Clima de la ONU (2009), Cumbre de Barcelona (2009), y la Conferencia Rio+20 (2012) (Amestoy, 2010). De llevarse adelante las políticas propuestas en estas reuniones se espera que la contaminación generada disminuya, por lo tanto, el desarrollo de tecnologías para la descontaminación del ambiente es un tema de suma importancia.

### 1.1.1 Contaminación por metales pesados

Suele considerarse como metal pesado a aquellos metales cuya densidad es mayor a 5 g/ml, aunque no existe una definición aceptada mundialmente. No todos los metales pesados tienen la capacidad de solubilizarse, por lo que sólo algunos de ellos pueden ser incorporados por los organismos vivos, lo cual les confiere mayor peligrosidad. Entre los que poseen esta propiedad encontramos a aquellos que son necesarios como micronutrientes o elementos traza (Fe, Co, Mo, Mn, Zn, V, Ni, Cr, Cu y W) y a los metales “no esenciales” (Cd, Hg, Pb, Ag, U) que son tóxicos incluso en bajas concentraciones (Agarwal, 2009; Furini, 2012). Otra forma de clasificación los agrupa en: metales tóxicos (Hg, Cr, Pb, Zn, Cu, Ni, Cd, As, Co, Sn), preciosos (Pd, Pt, Ag, Au, Ru) y radionucleídos (U, Th, Ra, Am) (Wang y Chen, 2009).

Los metales pesados se encuentran de forma natural en el ambiente como resultado de diversos procesos geológicos, como erupciones volcánicas, incendios y el desgaste de las rocas debido a la acción prolongada del agua y el viento. Sin embargo la mayor parte llega al suelo y a los cursos de agua por medio de la actividad humana (Kavamura y Espósito, 2010; Vargas-García y col., 2012). La industria metalúrgica, de curtido, químicas, de galvanizado, baterías y la minería son algunas de las mayores fuentes de contaminación del ambiente por metales pesados (Mishra y Doble, 2008).

Como consecuencia de la contaminación generada por este tipo de actividad, sitios que una vez fueron fértiles vieron disminuída considerablemente su capacidad productiva. La acumulación de estos componentes en el suelo no solo trae aparejado problemas en la salud humana y animal sino que también afecta la diversidad microbiana, alterando así los ciclos geoquímicos de nutrientes y el crecimiento de las plantas (Karuppiah y Rajaram, 2011; Sagar y col., 2012).

Algunos metales pesados cumplen valiosas funciones, entre ellos el Zn se encuentra presente en proteínas de unión al ADN formando parte de estructuras denominadas dedos de Zn y en más de doscientas enzimas, entre ellas la anhidrasa carbónica y la carboxipeptidasa, ambas importantes en la regulación del CO<sub>2</sub> y la degradación de proteínas, respectivamente (Osredkar y Sustar, 2011). Por otro lado, el ingreso de metales pesados a la cadena alimentaria constituye un grave problema, ya que éstos se acumulan en el alimento llegando a encontrarse en concentraciones peligrosas para la salud. Una exposición prolongada a metales pesados puede

producir náuseas, anorexia, anormalidades gastrointestinales y dermatitis. La toxicidad de estos metales también puede llegar a dañar o disminuir las funciones nerviosas, los pulmones y el hígado; a largo plazo podría causar deterioro físico, muscular y neurológico, cáncer de pulmón y daño al sistema respiratorio (Oves y col., 2012). El Cr es un metal pesado sumamente tóxico para los seres vivos. Esta toxicidad depende de la especie iónica en que se encuentre, ya que el Cr (III) es un importante micronutriente, el cual es requerido como co-factor de ciertas enzimas, mientras que en su estado hexavalente Cr (VI) tiene efectos cancerígenos y teratogénicos, es por esto que ha sido clasificado por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA) como un contaminante prioritario o de “Categoría A” (Benazir y col., 2010; Pajor y col., 2012). En Argentina, son muchas las localidades que se enfrentan a la problemática generada por la contaminación con Cr. Así, por ejemplo, en Las Toscas (Provincia de Santa Fe) y otras localidades vecinas, resulta alarmante la cantidad de casos de cáncer registrados, según los datos presentados por la Liga Argentina de Lucha contra el Cáncer (LALCEC) ([www.pagina12.com.ar](http://www.pagina12.com.ar)). Otro sitio afectado por la contaminación por Cr es la cuenca Matanza Riachuelo, que posee 50 veces las cantidades permitidas no sólo de Cr sino también de Zn, Hg y Pb, afectando a los 14 municipios que la conforman ([www.greenpeace.org](http://www.greenpeace.org)). Además, estudios realizados por profesionales de la Facultad de Agronomía de la UBA mostraron que en el Riachuelo (período 2005-2006) el metal predominante tanto en los sedimentos en suspensión como en el fondo del cauce era Cr, el cual alcanzaba concentraciones de 4000 mg/l ([www.agro.faua.info](http://www.agro.faua.info)). Entre las localidades que han obtenido un fallo favorable en contra de las empresas contaminantes, podemos mencionar al municipio de Vicente López (Buenos Aires), que tras 15 años de denuncias contra la empresa de cromado Diacrom S.A obtuvo un recurso de amparo en contra de ésta y del Gobierno de la Provincia de Buenos Aires. Cabe destacar que esta acción no fue tomada por el municipio sino por una Fundación denominada Ecosur debido a la poca eficiencia de las medidas tomadas contra esta industria ([www.fundacionecosur.org.ar](http://www.fundacionecosur.org.ar)).

### 1.2 Propiedades físico-químicas y toxicidad del cromo

El Cr puede hallarse de forma natural en el ambiente asociado a distintos minerales, ya sea en forma de cromita ( $\text{FeCr}_2\text{O}_4$ ), crocoíta ( $\text{PbCr}_4$ ), bentonita ( $\text{Ca}_6(\text{Cr,Al})_2(\text{SO}_4)_3$ ) ó tarapacaíta ( $\text{K}_2\text{CrO}_4$ ) (Peralta-Videa y col., 2009). Aunque al igual que lo que ocurre con otros metales

pesados, la mayor parte llega al ambiente debido a la actividad del hombre, en este caso para obtener Cr se minan 12 millones de toneladas de cromita por año a nivel mundial. Debido a la propiedad del Cr (III) de formar complejos de coordinación con diversos ligandos y por su gran estabilidad, se lo utiliza en una gran variedad de industrias, siendo el sulfato básico de cromo ( $\text{CrOHSO}_4$ ) el de mayor manufactura (500 mil t/año) (WHO, 2009).

Las valencias del Cr van desde -2 a +6, pero las formas más estables y las de mayor concentración en el ambiente son el Cr (III) y el Cr (VI). En solución de pH ácido el Cr (III) puede hallarse en su forma soluble ( $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6^{+3}$ ), mientras que a pH mayores a 6 suele encontrarse como hidróxido ( $\text{Cr}(\text{OH})_3$ ) u óxido ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) los cuales tienden a precipitar. Esta propiedad lo convierte en un blanco fácil para las tecnologías de remediación, en comparación con su forma hexavalente la cual es altamente soluble. El Cr (VI) es un oxidante fuerte, puede encontrarse en las formas de dicromato ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{-2}$ ), ácido crómico ( $\text{H}_2\text{CrO}_4$ ) y las formas iónicas de éste ( $\text{HCrO}_4^-$  y  $\text{CrO}_4^{-2}$ ), siendo todas altamente solubles en cualquier rango de pH. La presencia de una forma u otra dependerá del pH: a valores menores a 1 predomina  $\text{H}_2\text{CrO}_4$ , entre valores de pH 1 y 6 el  $\text{HCrO}_4^-$  se encuentra en mayor cantidad mientras que a pH mayores a 6 se halla  $\text{CrO}_4^{-2}$ . Por otra parte,  $\text{Cr}_2\text{O}_7^{-2}$  es un dímero de  $\text{HCrO}_4^-$  por lo que se forma a pH ácido, cuando la concentración de Cr (VI) es mayor a 1 g/l (Mohan y Pittman, 2006; Ko y col., 2012; Martorell y col., 2012; Shi y col., 2012; Oliveira, 2012; Wang y Choi, 2013).

El Cr (III) es considerado un micronutriente esencial relacionado al metabolismo de la glucosa y los lípidos, mientras que el Cr (VI) es 100 veces más tóxico y 1000 veces más mutagénico que el Cr (III), esto se relaciona con su mayor solubilidad, disponibilidad y movilidad tanto en el suelo como a través de las membranas biológicas (Song y col., 2009; Oliveira, 2012). Esta característica le confiere al Cr (VI) la capacidad de penetrar en las células, una vez dentro de ellas es reducido por glutatión, grupos tioles y otros metabolitos, reacción que lleva a la formación de intermediarios reactivos como Cr (V), Cr (IV), Cr (III) y a especies reactivas del oxígeno (EROS). Todas estas moléculas son capaces de unirse a componentes celulares, entre ellos las proteínas y el ADN. Como consecuencia del daño generado a éste último, es que se producen los efectos carcinogénicos, mutagénicos y teratogénicos en diversos organismos, entre ellos animales, plantas y microorganismos (Morais y col., 2011). Debido a esto el Cr (VI) es considerado un carcinógeno del grupo I por la Agencia Internacional de Investigación de Cáncer (IARC) (Cubero y col., 2009; He y col., 2010).

El Cr (VI) puede ingresar al organismo por vía oral, cutánea o digestiva, distribuyéndose a nivel de médula ósea, ganglios linfáticos, bazo, riñón e hígado. Su distribución se debe a que es tomado por los glóbulos rojos y luego llevado a las células en las que penetra por medio de transportadores de sulfatos (Cubero y col., 2009). Con la finalidad de evitar las alteraciones en la salud, derivadas de la exposición a Cr (VI), es que existen distintas reglamentaciones que establecen los niveles máximos permitidos de este contaminante. Este nivel en Argentina es de 0,05 mg/l de Cr (VI) y 0,5 mg/l de Cr total para agua de bebida, según lo establecido por el Código Alimentario Argentino, mientras que otros países como India y Uruguay permiten 0,05 mg/l de Cr total (Benazir y col., 2010; [www.ose.com.uy](http://www.ose.com.uy)). En relación a la exposición laboral, datos publicados por el Departamento de Salud y Servicios para Mayores de Nueva Jersey, muestra que la Administración de Salud y Seguridad del Trabajo (OSHA) establece como límite de exposición permisible 1 mg/m<sup>3</sup>, mientras que el Instituto Nacional para la Salud (NIOSH) y Seguridad en el trabajo y la Conferencia Estadounidense de Higienistas Industriales Gubernamentales (ACGHI) establecen un máximo de 0,5 mg/m<sup>3</sup>, estos niveles se refieren al Cr presente en el aire en una jornada laboral de 8 horas ([www.nj.gov](http://www.nj.gov)). Por otro lado, en Argentina se permite una concentración máxima de 0,2 mg/l de Cr (VI) y 2 mg/l de Cr (III) en el vertido a colectora cloacal, conducto pluvial y a curso de agua (Romero y col., 2006).

### 1.2.1 El cromo en la industria del curtido de cueros

Entre la gran variedad de industrias que utilizan Cr se encuentran las dedicadas a la galvanoplastia, producción de pigmentos, cerámicos, preservación de madera, generación de aleaciones, colorantes textiles y mordientes, ladrillos refractantes, procesamiento textil y al curtido de cueros, siendo los efluentes de esta última considerados como uno de los más contaminantes en relación a la contaminación por Cr (Belay, 2010; Liu y col., 2010).

La industria del curtido de cueros es una de las mayores generadoras de metales pesados, liberando al ambiente metales como Zn, Ni, Cu, Pb y Cd además del Cr. Este metal es utilizado en el proceso de curtido para estabilizar el cuero y volverlo resistente a la degradación por microorganismos, mejorando también el aspecto y la textura del mismo. La utilización de este componente podría evitarse dado que existen compuestos para curtido de origen vegetal, pero a

pesar de las alternativas disponibles, el 90% del curtido en el mundo se realiza con sales de Cr (III) (Covington, 2009).

Se estima que una curtiembre libera en promedio 40000 t de químicos básicos y 15000 t de sulfato de cromo (Cr (III)) por año como desecho. La gran cantidad de Cr (III) eliminado se debe a que sólo el 54-57% de este compuesto reacciona con el cuero, sumando a esta problemática la gran cantidad de agua que se utiliza, por lo que se considera a esta industria como una de las más contaminantes a nivel mundial (Tariq y col., 2005; Kiliç y col., 2011). Se calcula también que la concentración de Cr (VI) presente en el agua de desecho ronda entre 40 -25000 mg/l, ya que el Cr (III) puede oxidarse a Cr (VI) cuando existen altas concentraciones de O<sub>2</sub> o por la presencia de óxidos de manganeso (Benazir y col., 2010; Oliveira, 2012). Estas prácticas no sólo contaminan el curso de agua al que se vierten los efluentes, sino también el terreno en contacto con el canal por el que circula el mismo, ya que el suelo es capaz de absorber y acumular grandes cantidades de Cr (VI) y como consecuencia los contaminantes pueden percolar y alcanzar así las aguas subterráneas, pudiendo ser incorporados a las plantas y animales (Gangwar, 2010). A pesar de que algunas aguas de desecho que se liberan al ambiente sufren tratamientos previos, éstas suelen contener concentraciones no admitidas de metales y materia orgánica o incluso presentar alteraciones en sus parámetros físico-químicos cuando el tratamiento no es el adecuado, constituyendo así un riesgo para la salud y el ambiente (Tripathi y col., 2011).

### 1.3 Remediación de contaminantes

La remediación es una tecnología de saneamiento ambiental importante para lograr recuperar sitios contaminados, que de otra manera no serían útiles a ciertos propósitos, tales como urbanización, cría de animales y agricultura; puesto que la permanencia en un sitio contaminado involucra riesgos para los organismos vivos. Debido a que la contaminación genera la inutilización de grandes áreas, comenzaron a desarrollarse estrategias para brindar una solución. Las técnicas convencionales de remediación consistían en excavar el suelo contaminado, o bombear un efluente industrial hacia vertederos dispuestos para este fin. Sin embargo, estas prácticas así como también el aislamiento o contención de un terreno contaminado, representan una solución parcial al problema de la contaminación. La primera de estas involucra nuevos riesgos asociados al transporte y disposición del material, con el agravante

de que al mover el suelo y dejar los contaminantes en la superficie aumenta la exposición al mismo por parte de los trabajadores y al público en general. Además estas técnicas conllevan un alto costo económico, debido al monitoreo constante necesario en las áreas de contención, a la pérdida de tiempo que produce la excavación, como así también lograr encontrar un sitio para disponer el material contaminado (Vidali, 2001; Leung, 2004).

Al trascurrir el tiempo y desarrollarse nuevas tecnologías, las metodologías de remediación disponibles aumentaron, pudiendo clasificarse de acuerdo a su naturaleza en físico-químicas y biológicas. Los métodos físico-químicos fueron los primeros en ser desarrollados y son los más utilizados actualmente. Algunas de las técnicas de remediación utilizadas para tratar suelo y aguas contaminados con Cr (VI) incluyen, precipitación seguida de sedimentación, cementación, separación con solventes y extracción mediante membranas, ósmosis inversa, intercambio iónico, reducción-precipitación, absorción en carbón, carbón activado, aluminio, caolita (Krishna y Phillip, 2005; Farag y Zaki, 2010; Chaturvedi, 2011; Chen y col., 2012). Por otra parte, los métodos de remediación biológicos, han surgido como respuesta a la necesidad de desarrollar tecnologías amigables con el ambiente, basadas en la utilización de distintos organismos para el saneamiento de sitios o materiales contaminados. Este tipo de tecnología se discute con mayor profundidad en el apartado 1.3.1.

Tanto los métodos físico-químicos como los biológicos han sido utilizados en la remediación de sitios o materiales contaminados, debiendo considerarse al optar por uno de ellos las ventajas y desventajas de cada uno (Li y Ramakrishna, 2011; Chen y col., 2012; Shi y col., 2012), que se presentan en la Tabla 1.

**Tabla 1:** Ventajas y desventajas de los métodos de remediación físico-químicos y biológicos.

Métodos	Ventajas	Desventajas
Físico-químicos	Reducen altas concentraciones de contaminante (>100 mg/l).	Costosos.
	Se realizan en breves períodos de tiempo.	Generan residuos secundarios.
		Requieren alto consumo de químicos y energía.
		Tienen complejidad operativa.
Biológicos	Tienen alta relación costo beneficio.	Poseen propensión a la re-contaminación.
	Es una tecnología limpia.	Son altamente específicos.
	Puede realizarse <i>in situ</i> evitando contaminación por transporte de material.	Requiere de largos períodos de tiempo (meses, años).
		No todos los compuestos pueden ser degradados rápida y completamente.

### 1.3.1 Métodos de remediación biológicos

Los métodos de remediación biológicos también conocidos como métodos de biorremediación, pueden ser definidos como los procesos o tecnologías por medio de las cuales una o varias sustancias contaminantes presentes en un sistema, son removidas, degradadas o transformadas (total o parcialmente), mediante el empleo de organismos vivos. Entre ellos, el empleo de plantas para sanear ambientes contaminados se denomina fitorremediación, mientras que el uso de microorganismos se denomina más estrictamente biorremediación. Entre los microorganismos podemos citar a bacterias, hongos, levaduras y algas, los cuales utilizarán el contaminante como fuente de carbono, de electrones o de aceptor final en la respiración

anaerobia, disminuyendo de ese modo la concentración del mismo (Volke Sepúlveda y Velasco Trejo, 2002; Castillo Rodríguez y col., 2005; Pinilla Ponz, 2010).

Existen también gran variedad de estrategias de remoción, por esto y con el fin de facilitar la comprensión de sus mecanismos de acción, se clasifican de acuerdo a las modificaciones sufridas por el contaminante en (Leung, 2004):

- ✦ **Biotransformación:** el contaminante es transformado en una especie no tóxica o de menor toxicidad.
- ✦ **Biodegradación:** se lleva a cabo en compuestos orgánicos, los cuales son clivados en moléculas orgánicas más pequeñas.
- ✦ **Mineralización:** este proceso se lleva a cabo en sustancias orgánicas, las cuales son degradadas hasta obtener CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O.

De los procesos descritos sólo la biotransformación es capaz de modificar compuestos inorgánicos tales como los metales pesados.

### 1.3.1.1 Biorremediación Microbiana

El objetivo de la biorremediación es devolver a un ambiente contaminado su estado original, mediante la utilización de microorganismos o sus enzimas y puede aplicarse tanto *ex situ* como *in situ*.

➤ **Biorremediación *ex situ*:** en este tipo de metodología se remueve el material contaminado para su posterior tratamiento. Requiere menor tiempo que la biorremediación *in situ* pero se debe extraer el material a descontaminar y movilizarlo hacia donde se lo desea tratar, lo cual aumenta sus costos de aplicación. En las técnicas denominadas de “fase-sólida”, el terreno es excavado y dispuesto en pilas en las que luego se estimulará el crecimiento microbiano por insuflación de oxígeno, compuestos orgánicos y agua. Dentro de esta categoría se encuentran metodologías de biorremediación como el tratamiento de terreno o **landfarming**, **biopilas** y el **compostaje**, estos pueden ser utilizados para la remoción de metales pesados y de compuestos orgánicos, generalmente hidrocarburos (Diez Lázaro, 2008; Saxena y Misra, 2010; Magan y col., 2012). La remediación *ex situ* puede realizarse en **biorreactores** para tratar distintos tipos de sólidos, tales como tierra, lodos y sedimentos o líquidos como efluentes industriales (Saxena y

Misra, 2010; Magan y col., 2012). Los biorreactores pueden utilizarse para remover tanto compuestos orgánicos como inorgánicos presentes en efluentes industriales. Entre los contaminantes inorgánicos cuya remediación ha sido probada con éxito en biorreactores se encuentra el Cr (VI) (Ganguli y Tripathi, 2002; Srivastava y Thakur, 2006; Mistry y col., 2010; Ajao y col., 2011).

➤ **Biorremediación *in situ*:** esta denominación se utiliza cuando la tecnología de remediación se lleva a cabo en el sitio contaminado, sin alterar las características del mismo. Algunas de las metodologías de remediación *in situ* son:

⊕ **Bioventeo:** esta técnica consiste en la insuflación forzada de bajos volúmenes de O<sub>2</sub> (aire) al suelo, mediante pozos de inyección mientras se genera vacío mediante bombas e insufladores. De esta manera se estimula la degradación aeróbica de los contaminantes, ya que se favorece tanto la remoción del contaminante por los microorganismos nativos del suelo, como también la migración de la fase volátil de los contaminantes retenidos en él. También puede realizarse de forma pasiva mediante la apertura de hoyos en el suelo. Suele combinarse con la tecnología de extracción por vapor para aumentar la velocidad de remediación en áreas altamente contaminadas. Se utiliza para la remediación de suelos contaminados con combustibles, compuestos orgánicos volátiles y semi-volátiles no halogenados, pesticidas y herbicidas, entre otros. Este tipo de tecnología no es aplicable en sitios con altas concentraciones de sales, metales pesados o compuestos orgánicos debido a que dificultan el crecimiento de los microorganismos (Agarwal, 2005; Mohee y Mudhoo, 2012).

⊕ **Biomagnificación o bioaumentación:** consiste en la introducción de microorganismos, frecuentemente de origen bacteriano, cuya capacidad de remover el contaminante deseado haya sido previamente confirmada. Este procedimiento se aplica cuando la microbiota autóctona con capacidad detoxificadora es muy reducida, pudiendo añadirse cepas autóctonas o cepas modificadas genéticamente. A pesar de que esta última opción es la más eficiente, también es la más costosa, por lo que representa una estrategia casi exclusiva de los países desarrollados (Saxena y Misra, 2010; Barrios San Martín, 2011). La biomagnificación ha sido utilizada con

éxito para biorremediar hidrocarburos como combustibles diesel, fenantreno, e hidrocarburos aromáticos policíclicos (Alisi y col., 2009; Li y col., 2009).

⊕ **Bioestimulación:** se basa en la adición de nutrientes al sitio contaminado que se desea sanear con el fin de potenciar la capacidad degradadora de la flora indígena. Además se deben ajustar otros parámetros, tales como pH, humedad y temperatura, para así garantizar una mejor remoción del contaminante por los microorganismos. La bioestimulación puede ser utilizada para remediar compuestos orgánicos no halogenados volátiles y semi-volátiles, pesticidas y herbicidas (Agarwal, 2005; Abdulsalam y col., 2011; Barrios San Martin, 2011).

Antes de la aplicación de alguna de estas tecnologías es necesario el ensayo a escala de laboratorio para determinar las mejores condiciones de remoción y los mecanismos involucrados en el proceso y de esta manera dilucidar si es factible o no la utilización del microorganismo en biorremediación.

### 1.3.1.2 Mecanismos microbianos involucrados en la remoción de Cr (VI)

Al comenzar a desarrollar un sistema para biorremediación de Cr (VI) se prefiere que los microorganismos seleccionados para tal fin provengan de sitios afectados por el contaminante, ya que éstos serán capaces de tolerarlo y probablemente podrían desarrollar algún tipo de mecanismo que les permita removerlo, algunos incluso podrían poseer la capacidad de remover varios contaminantes a la vez (Tripathi y col., 2011). Otro punto a tener en cuenta al utilizar microorganismos en biorremediación, es que las condiciones del medio en el que van a desarrollar pueden afectar la remoción del contaminante. Estudios previos han demostrado que es necesario optimizar parámetros como pH, temperatura, fuente de carbono y electrones, medio de cultivo y concentración celular (Chaturvedi, 2011; Dey y Paul, 2012; Mishra y col., 2012).

La diversidad de microorganismos capaces de remover Cr es amplia, abarcando gran cantidad de especies. Entre las bacterias encontramos a *Bacillus circulans* MN1 (Chaturvedi, 2011), *Brevibacterium casei* (Ng y col., 2010), *E. coli* (Liu y col., 2010), *Pannonibacter phragmitetus* (Shi y col., 2012), levaduras como *Hansenula polymorpha*, *Pichia jadinii* y *Pichia*

*anomala* (Smutok y col., 2011; Martorell y col., 2012) y algunas especies de hongos filamentosos (Cárdenas-González y Acosta-Rodríguez, 2011).

Actualmente han sido descritos distintos procesos mediante los cuales estos microorganismos interactúan con metales tóxicos, facilitando su remoción. Entre ellos, los más estudiados son la **bioadsorción** (unión del metal a la superficie celular por mecanismos físico-químicos), **bioacumulación** (ingreso activo del metal al microorganismo) y **reducción enzimática** (biotransformación de Cr (VI) a Cr (III) mediante reductasas). Además, existen mecanismos como la **biomineralización** mediante la cual los metales pesados son inmovilizados por medio de la formación de complejos insolubles y otros como la **biolixiviación**, que de modo contrario, permite la movilización de los metales pesados mediante su interacción con ácidos orgánicos liberados por la célula o debido a la ocurrencia de reacciones tales como la metilación (Vargas-García y col., 2012).

#### ➤ **Bioadsorción de Cr**

La bioadsorción es un proceso pasivo de unión de un compuesto (adsorbato) presente en una fase líquida a una fase sólida (biodsorbente), el adsorbato es atraído por el adsorbente debido a su afinidad por éste, uniéndose a él hasta alcanzar el equilibrio (Ingole y Dharpal, 2012).

Algunas de las ventajas que presenta esta metodología de remoción incluye: la reducción efectiva de metales pesados a un bajo costo, posibilidad de recuperar el metal, fácil regeneración del bioadsorbente, reutilización de la biomasa. Además, el rendimiento de esta técnica es comparable al obtenido al utilizar resinas de intercambio iónico, siendo la relación costo-beneficio mayor, lo que la convierte en una opción más rentable y ecológica (Sen y Ghosh-Dastidar, 2010; Mythilli y Karthikeyan, 2011; Ingole y Dharpal, 2012). A su vez, el empleo de biomasa bacteriana como bioadsorbente posee ciertos beneficios respecto a otros materiales, entre ellos pueden citarse su ubicuidad, resistencia a gran variedad de condiciones ambientales, capacidad de desarrollar en condiciones controladas y además, debido a su pequeño tamaño existe una alta relación superficie-volumen y por ende una amplia superficie de contacto con el medio (Quintelas y col., 2009; Chaturvedi, 2011). Este mecanismo no requiere necesariamente de células viables, puesto que el proceso es pasivo, pudiendo utilizarse biomasa muerta. De esta manera existen ciertas ventajas, tales como que no es necesario adicionar nutrientes al medio,

como así también no hay limitaciones en las células debido a la toxicidad del contaminante (Sen y Gosh-Dastidar, 2010; Chaturvedi, 2011).

La bioadsorción del metal a la biomasa dependerá de la composición de la superficie bacteriana. La pared celular se compone mayormente por peptidoglicano, el cual representa el 90% de la pared celular en bacterias Gram (+) (G (+)) y del 10-20% en Gram (-) (G (-)), este compuesto aporta grupos amino y carboxilo como sitios de interacción con metales. El ácido teicoico y lipoteicoico presente en ciertas bacterias G (+) y los fosfolípidos y lipopolisacáridos de la membrana externa de bacterias G (-), confieren a la superficie bacteriana una carga total negativa, mediante la cual interactúa con los cationes metálicos. La interacción del metal con estos grupos químicos puede llevarse a cabo mediante uno de los siguientes procesos o la combinación de varios de ellos. Ellos son: intercambio iónico, complejación, coordinación, adsorción, interacciones electrostáticas, quelación y microprecipitación (Vijayaraghavan y Yun, 2008; Wang y Chen, 2009).

En la Figura 1 pueden observarse algunos de los mecanismos involucrados en la bioadsorción de Cr (VI) a la superficie celular. En el Mecanismo I el Cr (VI) es reducido por un grupo dador de electrones a Cr (III). En el Mecanismo II una molécula de ácido crómico es atraída a un grupo cargado positivamente que luego es reducido a Cr (III), mediante la interacción con un grupo dador de electrones y al volverse su carga positiva se libera por repulsión electrostática. A su vez el Cr (III) obtenido, puede unirse a grupos específicos en la superficie, a compuestos orgánicos del medio y de acuerdo al pH precipitar o mantenerse en solución.

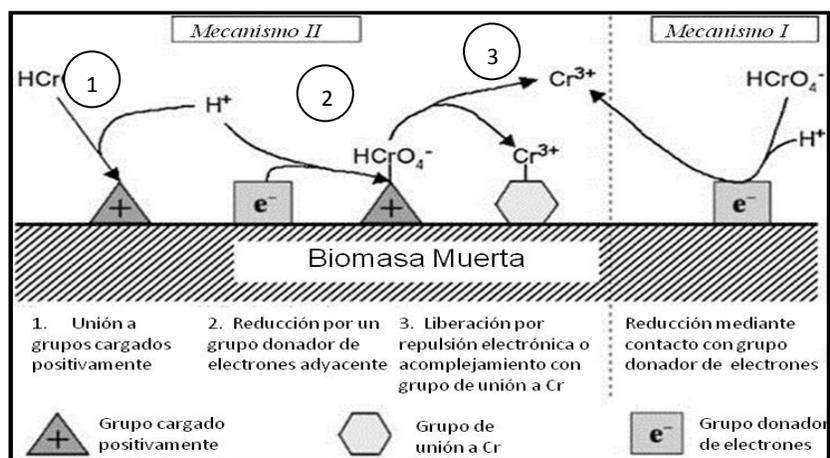


Figura 1: Posibles mecanismos de bioadsorción a Cr (VI), adaptado de Saha y Orvig, (2010).

En el estudio realizado por Silva y col. (2009), puede observarse la relación existente entre el pH del medio y la interacción del Cr con la superficie celular. En su estudio se evaluó la remoción mediante bioadsorción de Cr (VI) en el microorganismo *Artrhobacter viscosus* a distintos pH (1-4). En el mismo se observó que a pHs 1, 2 y 3 no había Cr (VI) en el medio y la cantidad de Cr (III) disminuía a medida que aumentaba el pH pero sin aumentar la cantidad de Cr (VI). Esto se debe a que al aumentar el pH los sitios de unión a metales pierden protones apareciendo mayor cantidad de cargas negativas a las cuales se une el Cr (III), generado de la reducción del Cr (VI). A pesar de que a pH 1 se removió todo el Cr (VI), la menor cantidad de Cr total se reportó a pH 4, ya que a pHs más ácidos, el Cr (III) producido por la reducción del Cr (VI) es repelido por la biomasa bacteriana debido a las fuertes cargas positivas de ésta. Por esta razón el autor plantea que la bioadsorción no ocurre por un mecanismo de adsorción aniónica sino por adsorción acoplada a reducción.

### ➤ Bioacumulación de Cr

El Cr (VI) ingresa a la célula mediante transporte activo. Debido a su parecido iónico y estructural con los sulfatos, éste es capaz de ingresar mediante sus transportadores (específicos y putativos), una vez dentro podría ser reducido a Cr (III) (Smutok y col., 2011). Entre los microorganismos capaces de bioacumular Cr se encuentran distintas especies de microalgas verdes y verdeazuladas (Dwivedi y col., 2010). Estos autores observaron que las algas verdeazuladas eran más tolerantes a altas concentraciones de Cr que las verdes y que además el mayor valor de Cr acumulado se halló en *Phormedium bohneri* la cual pertenece al grupo de las microalgas verdeazuladas. La acumulación de Cr (III) en el citoplasma celular puede ser observada mediante microscopía de transmisión electrónica. Mediante esta técnica tanto Srivastava y Thakur (2007) como Polti y col. (2011) pudieron observar zonas de mayor densidad electrónica presentes en el citoplasma celular de *Acinetobacter* sp. y *Streptomyces* sp. MC1 que no se hallaron en los microorganismos incubados en ausencia de Cr (VI).

### ➤ Reducción de Cr

La biotransformación de Cr (VI) a Cr (III) puede ocurrir en el interior celular, en la superficie bacteriana o en el medio que rodea la célula. La reducción en el interior de la célula puede ocurrir mediante la acción de reductasas las cuales pueden encontrarse en el citoplasma de la célula o asociadas a la membrana citoplasmática. En la superficie microbiana la reducción ocurriría debido a que existen componentes de la pared celular que poseen poder reductor (ácido teicoico, los componentes que contienen diol y distintos azúcares) y, por último, la reducción en el medio circundante podría llevarse a cabo por reductasas extracelulares secretadas por el microorganismo (Quintelas y col., 2009, Mary Mangaiyarkarasi y col., 2011; Chen y col., 2012). La reducción de Cr (VI) puede acoplarse a la remoción de un contaminante orgánico, en este sentido el agregado de compuestos orgánicos de carácter tóxico como el fenol para la remoción de Cr (VI), constituye una importante estrategia de biorremediación, ya que estos componentes suelen encontrarse juntos en sitios contaminados. El mecanismo consiste en la utilización del fenol como fuente de carbono y electrones para reducir Cr (VI), consiguiéndose la degradación de fenol probablemente hasta su mineralización (Song y col., 2009).

La remediación mediante cromato reductasas puede ocurrir tanto en aerobiosis como en anaerobiosis.

### ⊕ Reducción de Cr (VI) en aerobiosis

Uno de los mecanismos propuestos para explicar la reducción de Cr (VI) a Cr (III) es el siguiente:

1.  $\text{Cr}^{+6} + \text{e}^- \rightarrow \text{Cr}^{+5}$
2.  $\text{Cr}^{+5} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Cr}^{+3}$

Si bien el Cr (IV) no aparece en el modelo anterior, podría generarse al reducirse Cr (VI). Tanto Cr (IV) como Cr (V) son intermediarios de vida corta, ya que se reducen rápidamente a Cr (III) puesto que esta es una forma mucho más estable. Se desconoce si la reducción que ocurre de

Cr (V) a Cr (IV) y de éste a Cr (III) es espontánea o mediada por enzimas (Barrera-Díaz y col., 2012).

Las enzimas aisladas y caracterizadas que poseen actividad reductasa no son muchas, y la mayoría de ellas pertenece a la familia de reductasas de las flavoproteínas dependientes de NAD(P)H (Ramírez-Díaz y col., 2008). Cada una posee distintos mecanismos de remoción, ya que su función primaria no es la de remover Cr (VI). La reductasa mejor caracterizada pertenece a *Pseudomonas putida* (ChrR). Esta flavoproteína posee también actividad quinona reductasa en su estado reducido, lo que podría contribuir a la detoxificación de las EROS formadas en el paso de reducción del Cr (VI), ya que las quinonas cumplen funciones detoxificantes. La flavoproteína YieF de *E. coli* presenta homología con la ChrR de *P. putida*, su mecanismo de reducción consiste en la transferencia de 4 electrones de manera simultánea, 3 de ellos reducen el Cr (VI) a Cr (III) y el restante reduce la especie reactiva del oxígeno formada (Ramírez-Díaz y col., 2008 y citas contenidas allí). Estas fueron algunas de las primeras reductasas aisladas. Actualmente se han aislado y purificado distintas enzimas pertenecientes a la familia de reductasas de las flavoproteínas dependientes de NAD(P)H en microorganismos como *Shewanella oneidensis* (Mugersfeld y col., 2009), *Gluconacetobacter hansenii* (Jin y col., 2012), *E. coli* (Eswaramoorthy y col., 2012). La capacidad reductora en aerobiosis se ha observado en una gran cantidad de bacterias, pero las moléculas que median estas reacciones aún no han sido totalmente caracterizadas en muchos de estos microorganismos (He y col., 2011).

Se ha demostrado que la reducción enzimática en aerobiosis no sólo es realizada por reductasas ubicadas en citosol, sino que puede llevarse a cabo por enzimas asociadas a membrana, lo cual ocurre en *Bacillus subtilis* (Mary Mangaiyarkarasi y col., 2011).

#### ✦ Reducción de Cr (VI) en anaerobiosis

La reducción de Cr (VI) en anaerobiosis suele ocurrir debido a su utilización como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria, por lo que la familia de citocromos suele estar involucrada en el proceso. Las enzimas capaces de reducir Cr (VI) en ausencia de oxígeno pueden encontrarse en el citoplasma o bien asociadas a membrana (Barrera-Díaz y col., 2012).

Uno de los primeros microorganismos identificados, capaz de reducir Cr (VI) en anaerobiosis fue la enterobacteria *Enterobacter cloacae* HO1. Este microorganismo facultativo creció tanto en aerobiosis, como en anaerobiosis, pero sólo removía Cr (VI) en esta última condición (Wang y col., 1989). Además, las bacterias reductoras de sulfato también son capaces de remover Cr (VI) en anaerobiosis, ya que lo utilizan como aceptor final de  $e^-$  en lugar del sulfato, como ocurre normalmente (Martins y col., 2008). La bibliografía existente con respecto a microorganismos anaerobios capaces de reducir Cr (VI) es escasa en relación a la de microorganismos aerobios.

### 1.3.1.3 Mecanismos de tolerancia a Cr (VI)

#### ➤ Bomba de eflujo ChrA

Los mecanismos anteriores de remoción de Cr (VI) podrían ser considerados también mecanismos de tolerancia, ya que permiten disminuir la concentración de contaminante en contacto con la célula, lo cual los hace capaces de tolerar distintas concentraciones de Cr, ya sea por reducción o adsorción. Por otro lado, existen mecanismos de tolerancia que no se relacionan con la remoción de Cr, entre ellos se encuentra el transportador de membrana ChrA que permite tolerar altas concentraciones del metal, bombeándolo fuera de la célula, mediante un proceso con consumo de energía. Los genes que codifican estas proteínas forman parte del operón Chr y se han hallado en transposones presentes tanto en el cromosoma como en plásmidos, por lo que podrían transferirse de forma horizontal por conjugación. Entre los microorganismos en los que el operón se encuentra insertado en el cromosoma, encontramos a *Ochrobactrum tritici* 5bv11, cuyo operón Chr se encuentra en un transposón (*TnOtChr*) y no es inducible por Cr (VI) Entre los pocos microorganismos reportados cuya expresión del transportador sí es inducible, se encuentra *Bacillus cereus* SJ1 (He y col., 2010; Morais y col., 2011). A diferencia de estos microorganismos, en *P. aeruginosa* el operón Chr se encontró en el plásmido pUM505 (Ramírez-Díaz y col., 2011).

En base a todos estos antecedentes se plantea la siguiente hipótesis y objetivos de trabajo

## **Hipótesis y Objetivo**

## 2. Hipótesis y Objetivos

### 2.1 Hipótesis

Microorganismos aislados de zonas contaminadas con Cromo (VI) con capacidad de biotransformar/bioadsorber este contaminante, pueden ser utilizados para estudios de biorremediación *in vitro* y consecuentemente para el tratamiento de efluentes industriales o en aplicaciones ambientales, tales como el bioaumentación.

### 2.2 Objetivo General

Estudiar la capacidad de biorremediación de Cr (VI) de microorganismos nativos de una curtiembre de la localidad de Elena (Córdoba), para reducir los niveles disponibles del mismo y así estimar si podrían utilizarse para minimizar el impacto ambiental que este contaminante produce en suelos y acuíferos.

### 2.3 Objetivos específicos

- ⊕ Seleccionar una bacteria con alta tolerancia y capacidad de remover de Cr (VI), a partir de microorganismos previamente aislados de efluentes y suelos contaminados de una curtiembre de la localidad de Elena.
  
- ⊕ Identificar mediante pruebas metabólicas y secuenciación de ADN ribosomal el microorganismo anteriormente seleccionado.

- ⊕ Optimizar diferentes parámetros que influyen sobre el crecimiento microbiano, tales como medio de cultivo, concentración de la fuente de carbono y nitrógeno, pH, temperatura, concentración de inóculo, los cuales podrían ser claves para permitir una mayor eficiencia en el proceso de remediación.
- ⊕ Analizar la capacidad del microorganismo seleccionado de tolerar y remover Cr (VI) en presencia de fenol.
- ⊕ Determinar los principales mecanismos de remoción presentes en el microorganismo seleccionado y el destino final del Cr (VI) incorporado al medio de cultivo.
- ⊕ Analizar si existen cambios a nivel proteico ante la exposición de la bacteria seleccionada al contaminante.

## **Materiales y Métodos**

### 3. Materiales y Métodos

#### 3.1 Material Biológico

En este trabajo se utilizaron 8 aislamientos provenientes de un efluente y sedimento contaminado de una curtiembre situada en la localidad de Elena (Córdoba, Argentina). Posteriormente se seleccionó uno de los mismos, el cual se denominó C8.

##### 3.1.1 Condiciones de cultivo y mantenimiento de los microorganismos

Los aislamientos fueron mantenidos en placas con medio TY sólido (Anexo) suplementado con 10 mg/l de Cr (VI), y sembrados utilizando la técnica de estrías por agotamiento. Los microorganismos fueron repicados semanalmente a partir de colonias aisladas y cultivados a 28°C. En todos los casos el Cr (VI) fue adicionado como  $K_2Cr_2O_7$  (Sigma).

#### 3.2 Selección de un aislamiento bacteriano con capacidad para tolerar y remover Cr (VI)

##### 3.2.1 Ensayo de tolerancia a Cr (VI)

Los ensayos de tolerancia en placa se realizaron en primera instancia con la finalidad de seleccionar una cepa bacteriana tolerante a Cr (VI). Para ello, los 8 aislamientos fueron sembrados en placas conteniendo medio rico TY con concentraciones crecientes de Cr (VI) (35, 70, 175, 350, 530 y 700 mg/l). Las mismas fueron posteriormente incubadas en estufa a 28°C, durante 10 días. Luego de este tiempo el crecimiento fue evaluado determinándose la concentración máxima tolerada (CMT), la cual corresponde a la mayor concentración de contaminante donde aún se observa crecimiento bacteriano.

### 3.2.2 Ensayo de remoción de Cr (VI)

Una vez analizada la tolerancia a Cr (VI) en placa, se procedió a evaluar la capacidad de remoción de este contaminante por los 8 aislamientos en medio líquido. Para ello se utilizaron inóculos de cada aislamiento crecido en medio TY durante 24 hs, los cuales fueron usados para inocular tubos de 10 ml conteniendo 3 ml de medio TY, con 50 y 100 mg/l de Cr (VI). Los mismos fueron incubados a 28°C y agitados a 150 rpm durante 72 hs, momento en el cual se determinó la capacidad de crecimiento de cada uno así como también el Cr (VI) residual, siguiendo la metodología descrita en las secciones 3.9 y 3.10. Como control del contaminante se utilizaron tubos sin inocular, los cuales fueron utilizados como controles 100%. En función de los resultados obtenidos en los ensayos de tolerancia y remoción de Cr (VI) se seleccionó el aislamiento C8 para posteriores estudios.

## 3.3 **Caracterización fenotípica e identificación del aislamiento C8**

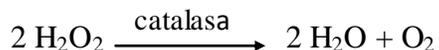
### 3.3.1 Caracterización morfo-fisiológica

Para la caracterización morfológica se tomó una colonia aislada de una placa con medio TY con Cr (VI) (10 mg/l), y se realizó tinción de Gram utilizando el kit Gram Britania (Britania). Los preparados se observaron en microscopio óptico Axiopot (Carl Zeiss). Las imágenes fueron obtenidas con cámara digital Power Shot G6 de 7,1 megapíxeles (Cannon INC, Japón) asociada al microscopio (aumento 1000X). Se registró la coloración y morfología de las células.

### 3.3.2 Caracterización bioquímica

Se realizaron diferentes pruebas bioquímicas como catalasa y oxidasa utilizando protocolos estandarizados. Además, se evaluó la asimilación de distintas fuentes de carbono y producción de enzimas, mediante el kit comercial API 20 E.

⊕ Determinación de Catalasa: se tomó una colonia aislada de un cultivo de menos de 24 hs y se la colocó en portaobjeto sobre una gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%, la producción de la enzima catalasa se evidenció por medio de la producción de burbujas.



⊕ Determinación de Citocromo C Oxidasa: se determinó utilizando discos de oxidasa (Britania). Se tomó una colonia aislada del microorganismo y se la colocó en un portaobjeto, con una gota de solución fisiológica estéril, una vez homogeneizada la suspensión se colocó sobre ella un disco de oxidasa. Se consideró reacción positiva si el disco se tornó de color rosado intensificándose a fucsia. Como control positivo se utilizó una cepa de *Pseudomonas* sp.

⊕ Se utilizó la galería de pruebas API 20E (BioMerieux) para la identificación presuntiva del microorganismo.

⊕ También se evaluó la capacidad del microorganismo de crecer en medio Eosina Azul de Metileno (EMB), el cual es un medio selectivo para bacilos G (-) entéricos y otros bacilos G (-) no exigentes y diferencial, ya que pone en evidencia la capacidad del microorganismo de fermentar la lactosa. Para esto se tomó una colonia aislada de una placa que contenía medio TY y Cr (VI) (10 mg/l) y se la sembró mediante estrías por agotamiento en el medio selectivo. Se incubó a 28°C durante 24 hs y posteriormente se evaluó el crecimiento.

### 3.3.3 Identificación por secuenciamiento de ADNr 16S

Para la identificación del microorganismo en estudio se realizó la amplificación y secuenciamiento del gen codificante para el ARNr 16S, lo cual fue realizado por servicio de la empresa Macrogen Korea S.A. La secuencia obtenida fue posteriormente comparada con otras secuencias de nucleótidos disponibles en la base de datos GenBank utilizando el programa BLAST N. Posteriormente, la secuencia fue depositada en la base de datos del NCBI con el código: JX258135.

### 3.3.4 Construcción de un árbol filogenético basado en el gen ADNr 16S

Se seleccionaron de la base de datos GenBank del NCBI, secuencias nucleotídicas homólogas, cuya longitud fuera similar a la de la cepa C8. Estas secuencias fueron alineadas y editadas con el programa BioEdit v7.0.5, luego se construyó un árbol filogenético utilizando el programa de bioinformática MEGA 4.1. Este árbol permitió inferir las relaciones filogenéticas entre las cepas analizadas.

### **3.4 Análisis del crecimiento y remoción de Cr (VI) por el aislamiento C8 en medio TY con distintas concentraciones del contaminante**

Se utilizaron Erlenmeyers de 50 ml con 20 ml de medio de cultivo TY, a los cuales se les adicionó una solución madre Cr (VI) 5000 mg/l hasta alcanzar concentraciones de 5, 20, 35, 50 y 100 mg/l de Cr (VI).

Estos medios fueron inoculados al 7,5% v/v con un inóculo de 24 hs de cultivo bacteriano, e incubados a 28°C y 150 rpm. Cada 24 hs se tomaron muestras para evaluar el crecimiento y la concentración residual de Cr (VI) como se describirá posteriormente (sección 3.9 y 3.10). Los ensayos fueron realizados por triplicado. El control de contaminante (sin inocular) contuvo medio TY con 10 mg/l de Cr (VI).

### **3.5 Optimización de las condiciones de remoción**

En las siguientes secciones se describe la optimización de diferentes condiciones de cultivo para maximizar la remoción de Cr (VI). En estos ensayos se evaluó el crecimiento de la cepa C8 y el Cr (VI) residual como se describe en las secciones 3.9 y 3.10.

### 3.5.1 Efecto de diferentes medios de cultivo sobre la remoción de Cr (VI)

Se ensayaron distintas condiciones de cultivo para así determinar las que permitían obtener una mayor eficiencia de remoción. Se usaron Erlenmeyers de 50 ml con 20 ml de medio rico TY o medio mínimo MM9, a los cuales se les adicionó una concentración inicial de 5, 20, 35, 50 y 100 mg/l de Cr (VI). El medio mínimo fue adicionado con glucosa (1 g/l) como fuente de carbono. Posteriormente, se analizó la remoción alcanzada en otro medio rico, (Medio I) (Anexo), suplementado con 20 mg/l de Cr (VI). Se determinó Cr (VI) residual al día 5 del ensayo. Como control de contaminante se usó una solución de 10 mg/l de Cr (VI) en medio TY, MM9 o Medio I, según el medio de cultivo empleado en cada ensayo. Todos los ensayos fueron realizados como mínimo por triplicado.

### 3.5.2 Efecto de distintas fuentes de carbono sobre el crecimiento y la remoción de Cr (VI)

Para este ensayo se utilizaron Erlenmeyers de 50 ml con 20 ml de medio TY o Medio I y 20 mg/l Cr (VI), suplementados con 1 g/l de las siguientes fuentes de carbono: acetato de sodio, citrato, glucosa o sacarosa. En el caso del Medio I, el cuál contiene en su composición 1 g/l de glucosa, no se adicionó 1 g/l extra de las fuentes de carbono, sino que se reemplazó a la glucosa por una de ellas. Los mismos fueron inoculados al 7,5% v/v con un inóculo crecido durante 24 hs sin el contaminante. Se determinó el crecimiento microbiano y Cr (VI) residual cada 24 hs durante 5 días.

Se determinó la velocidad de remoción de Cr (VI) en los medios TY adicionado con 1 g/l de glucosa y Medio I, éste parámetro fue calculado en tres intervalos de tiempo (0-6 hs, 6-24 hs y 24-96 hs). Utilizando el programa Excel 2007 se trazó la mejor recta en cada uno de estos intervalos y se obtuvo la pendiente de cada una de ellas, que representa la velocidad de remoción en cada intervalo.

### 3.5.3 Efecto de distintas concentraciones de glucosa sobre el crecimiento y la remoción de Cr (VI)

Se utilizaron Erlenmeyers de 50 ml, con 20 ml de medio TY suplementado con 20 mg/l de Cr (VI) y con diferentes concentraciones de glucosa (0,5; 1,0 y 1,5 g/l). Los mismos fueron inoculados al 7,5% v/v con un inóculo crecido durante 24 hs sin el contaminante, e incubados a 150 rpm y 28°C durante 5 días, luego de los cuales se determinó crecimiento y Cr (VI) residual.

### 3.5.4 Efecto del pH sobre el crecimiento y la remoción de Cr (VI)

Los ensayos de remoción frente a diferentes pHs se realizaron en medio TY con 20 mg/l de Cr (VI) y 1 g/l de glucosa, el pH del medio TY fue ajustado mediante la adición de HCl o NaOH. Los cultivos fueron inoculados al 7,5% v/v con un inóculo de la cepa C8 de 24 hs. Se ensayaron los pHs 4, 5, 6, 7, 8 y 9. El crecimiento y Cr (VI) residual a cada pH fue determinado luego de 5 días de incubación a 150 rpm y 28°C.

### 3.5.5 Efecto de la concentración inicial de inóculo sobre el crecimiento y la remoción de Cr (VI)

Se utilizaron Erlenmeyers de 50 ml, conteniendo 20 ml de medio TY con 20 mg/l Cr (VI) y 1 g/l de glucosa, los cuales fueron inoculados con distintas concentraciones de un cultivo de 24 hs de crecimiento (1; 5; 7,5 y 10%). Los cultivos fueron mantenidos en agitación continua a 150 rpm y 28°C durante 5 días. Posteriormente se determinó crecimiento y Cr (VI) residual.

### 3.5.6 Efecto de distintas fuentes de nitrógeno sobre la remoción de Cr (VI)

Se analizó el agregado de dos fuentes inorgánicas de nitrógeno al medio TY, el cual contenía 20 mg/l Cr (VI) y 1 g/l de glucosa. Para ello se utilizaron  $\text{CINH}_4$  y  $\text{NO}_3\text{NH}_4$  en dos concentraciones (0,5 y 1 g/l). La remoción se determinó al día 5 (tiempo final).

### 3.5.7 Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la remoción de Cr (VI)

En este ensayo los Erlenmeyers con 20 ml de medio TY suplementados con 20 mg/l Cr (VI) y 1 g/l de glucosa, fueron incubados durante 5 días a 150 rpm a diferentes temperaturas (20, 25, 28, 30, 35 y 37°C). Luego de este período se determinó crecimiento y Cr (VI) residual.

## **3.6 Evaluación de la tolerancia y capacidad de remoción de Cr (VI) del aislamiento C8 en presencia de fenol y en efluentes industriales**

Se evaluó la tolerancia de la cepa C8 a Cr (VI), a un contaminante orgánico (fenol), y a ambos contaminantes en medio mínimo (MM9) (Anexo), en medio rico (TY), así como también su capacidad de remover Cr (VI) en presencia de fenol. Además, se evaluó la tolerancia del aislamiento C8 a diferentes efluentes industriales, tal como se describe a continuación.

### 3.6.1 Tolerancia en placa a distintas concentraciones de cromo (VI), fenol y a ambos contaminantes

Para la evaluación de la tolerancia de la cepa C8 a Cr (VI) y fenol, se utilizaron placas con medio rico (TY) y medio mínimo (MM9), a las cuales se les adicionó los contaminantes como se describe a continuación:

#### ⊕ Medio rico (TY):

- ⊕ Fenol: 100, 200, 350, 500, 1000 y 1500 mg/l.
- ⊕ Cr (VI): 35, 70, 175, 350, 530 y 700 mg/l.
- ⊕ Cr (VI) y fenol: 350 mg/l de fenol adicionado con 70 y 175 mg/l Cr (VI), 500 mg/l de fenol con 17,5, 35, 70 y 175 mg/l Cr (VI).

#### ⊕ Medio mínimo (MM9):

- ⊕ Fenol: 100, 200, 300, 400, 500, 600 y 750 mg/l.

- ⊕ Cromo: 20, 35, 50, 75, 100 y 150 mg/l, se añadió glucosa (1 g/l) como fuente de carbono.
- ⊕ Cromo y fenol: se utilizaron 100, 200, 350 y 500 mg/l de fenol, a cada una de las primeras tres concentraciones se les añadió 5, 10 y 20 mg/l de Cr (VI), y a la última 17,5, 35, 70 y 175 mg/l.

Las placas fueron incubadas en estufa a 28°C, durante 10-14 días.

### 3.6.2 Remoción de Cr (VI) por el aislamiento C8 en presencia de fenol

Se analizó la capacidad del aislamiento C8 de remover Cr (VI) en presencia de 100 mg/l de fenol, tanto en medio TY como en MM9. Para esto, Erlenmeyers de 50 ml conteniendo 20 ml de uno de estos medio fueron adicionados con 100 mg/l de fenol, al medio TY se le agregó 20 mg/l de Cr (VI) y al medio MM9 5 mg/l. Se incubaron durante 5 días a 28°C en agitación (150 rpm), luego de este tiempo se determinó Cr (VI) residual como se describirá posteriormente en la sección 3.10.

### 3.6.3 Tolerancia en placa a diferentes efluentes industriales

La cepa C8 fue sembrada en placas conteniendo diferentes efluentes provenientes de una industria petroquímica, dos industrias químicas y de una curtiembre, los cuales fueron agarizados y esterilizados. Dichas placas se incubaron en estufa a 28°C durante 10-14 días, estableciendo luego el crecimiento de cada una.

### 3.7 Determinación de los mecanismos de remoción de Cr (VI) presentes en el aislamiento C8

#### 3.7.1 Ensayos de bioadsorción de Cr (VI)

##### ⊕ **Bioadsorción a pH 2:**

Se siguió la técnica descrita por Volesky (1999), para ello se hizo crecer al microorganismo durante 24 hs en medio TY sin Cr (VI) y se lo centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos para obtener la biomasa. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con solución fisiológica. Aproximadamente 30 mg de biomasa fueron puestos en contacto con 10 ml de medio TY conteniendo 10 y 20 mg/l Cr (VI) a pH 2. Los Erlenmeyers fueron incubados a 150 rpm, 28°C y el Cr (VI) residual fue determinado a los días 1 y 5 como se describirá posteriormente en la sección 3.10. El ensayo fue realizado por cuadruplicado.

Se utilizó como control medio TY a pH 2 suplementado con 10 mg/l de Cr (VI), sin biomasa bacteriana.

##### ⊕ **Bioadsorción por células autoclavadas:**

Cultivos de 24 hs crecidos en medio TY fueron autoclavados y utilizados para inocular Erlenmeyers de 50 ml con 20 ml de medio TY adicionado con 10 mg/l de Cr (VI). Los mismos fueron incubados en agitación (150 rpm, 28°C) y se determinó Cr (VI) al día 1 y 5 del ensayo. Como control de contaminante se utilizó medio TY estéril con 10 mg/l de Cr (VI).

#### 3.7.2 Ensayos de detección de cromato reductasas

Para la determinación de cromato reductasas se utilizó la técnica descrita por Bopp y Ehrlich (1988), con algunas modificaciones.

#### ⊕ **Detección de cromato reductasas extracelulares:**

Este ensayo se realizó con la finalidad de determinar si en la remoción de Cr (VI) se hallaban involucradas reductasas extracelulares, cuya liberación fuera inducida por la presencia de Cr (VI). Para esto, se prepararon 2 Erlenmeyers de 100 ml con 50 ml de medio TY, que se inocularon al 7,5% v/v con un inóculo de 24 hs de crecimiento. Para determinar si la producción de reductasas extracelulares era inducible o constitutiva uno de los Erlenmeyers fue suplementado con 20 mg/l de Cr (VI). Los 2 cultivos se incubaron 24 hs en agitador orbital a 150 rpm y 28°C. Luego de este tiempo los cultivos se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se separó el sobrenadante, el cual fue centrifugado nuevamente en las mismas condiciones. Los sobrenadantes fueron filtrados utilizando filtros milipore de 0,22 µm para eliminar cualquier célula bacteriana remanente. A los medios con Cr (VI) se les determinó cromo residual por el método de difenilcarbazida. Posteriormente, se colocaron 10 ml de cada sobrenadante en Erlenmeyers estériles para seguir con la incubación (por triplicado) y otros 10 ml fueron colocados en un baño a 100°C durante 30 minutos para inactivar las posibles reductasas extracelulares. Los sobrenadantes de los cultivos crecidos en ausencia de cromo fueron suplementados con Cr (VI) 10 mg/l. Los sobrenadantes fueron incubados en agitador orbital 24 hs a 150 rpm y 28°C.

Para determinar si se produjo remoción del contaminante en alguna de las condiciones ensayadas se determinó Cr (VI) residual, como se describirá posteriormente en la sección 3.10. En la Figura 2 se muestra un esquema del diseño experimental utilizado.

#### ⊕ **Detección de cromato reductasas intracelulares:**

El *pellet* obtenido del ensayo descrito anteriormente para reductasas extracelulares fue resuspendido en buffer fosfato salino (PBS) (Anexo) (1 ml/100 mg de peso fresco). La biomasa fue sonicada en hielo, realizándose 3 ciclos de sonicado de 2 minutos cada uno con pulsos de 6 segundos y amplitud del 60%. La suspensión sonicada fue centrifugada a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C, separándose el sobrenadante del *pellet* celular. El sobrenadante fue filtrado con filtros milipore 0,22 µm y se denominó extracto libre de células (ELC).

Las distintas fracciones se colocaron en tubos de ensayo, por triplicado, conteniendo medio TY suplementado con 10 mg/l de Cr (VI), se incubó 24 hs en agitación a 28°C y luego se determinó Cr (VI) residual por el método de la difenilcarbazida (Figura 2).

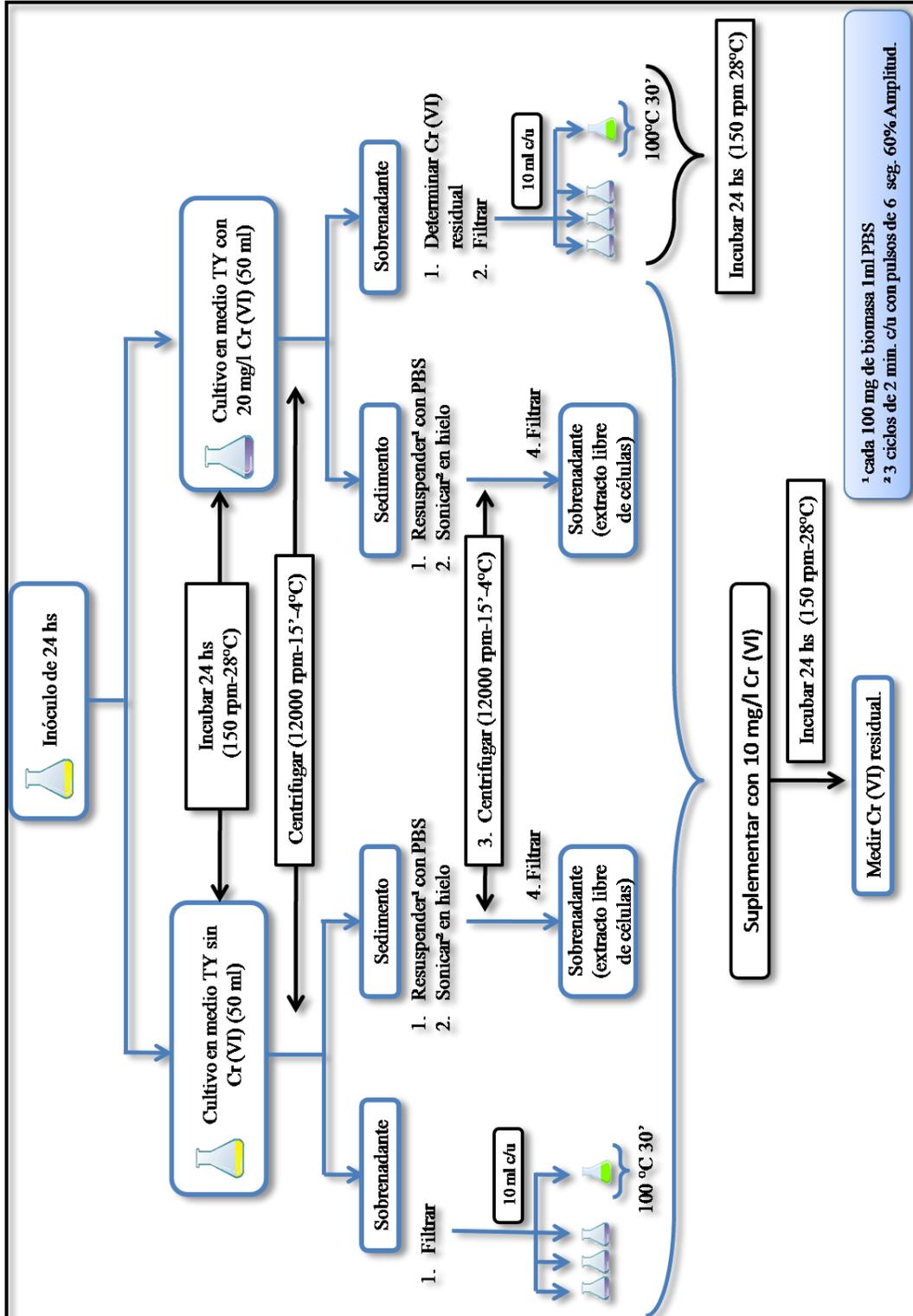


Figura 2: Procedimiento para la determinación de cromato reductasas extra e intracelulares.

### 3.8 Determinación del destino final del Cr (VI) incorporado al medio de cultivo

A fines de determinar el destino final del Cr (VI) adicionado al medio de cultivo, se evaluó la concentración de Cr total (Cr (VI) + Cr (III)) y Cr (VI) en el sobrenadante, como así también en la biomasa bacteriana. Para ello se hizo crecer al microorganismo en medio TY suplementado con 20 mg/l de Cr (VI) y glucosa 1 g/l. Al término de 5 días se centrifugó para obtener el sobrenadante y la biomasa. La determinación de Cr (VI) en sobrenadante fue realizada por el método de la difenilcarbazida, mientras que las determinaciones de Cr total en sobrenadante y en biomasa fueron realizadas por Espectrofotometría de Absorción Atómica (EAA), por servicio de un laboratorio especializado (FARESTAIE, Mar del Plata).

### 3.9 Determinación del crecimiento bacteriano por método óptico y peso seco

#### 3.9.1 Método óptico

Para determinar el crecimiento celular se utilizó el método óptico, determinando la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm, utilizando espectrofotómetro Beckman 640.

En los ensayo de crecimiento con distintas concentraciones de Cr (VI) y fuente de carbono adicional las mediciones se realizaron cada 24 hs, y en los experimentos de optimización de medios de cultivo, concentración de glucosa, pH, concentración de inóculo y temperatura, las determinaciones se hicieron a tiempo final del experimento (día 5).

#### 3.9.2 Determinación de biomasa por peso seco

Para determinar la relación entre la biomasa de la suspensión celular de la cepa C8 y su densidad óptica, se inoculó un Erlenmeyer que contenía 750 ml de medio TY con un pre-inóculo bacteriano (10%), crecido durante 24 hs. Este cultivo se incubó 15 hs en agitación continua (150 rpm, 28°C). Transcurrido este tiempo se midió la Absorbancia (DO) del cultivo a 600 nm y de acuerdo a ésta se realizaron diluciones con medio TY estéril hasta alcanzar densidades ópticas de 0,3; 0,6; 0,9 y 1,2 (por duplicado). Se llevó a volumen final en matraz aforado y se tomó una alícuota de cada matraz para determinar la DO real de los cultivos.

Luego se centrifugaron volúmenes entre 28 y 60 ml a 12000 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 1 ml de solución fisiológica. Cada suspensión se transfirió a un tubo eppendorf, previamente secado y pesado, que fue centrifugado (12000 rpm, 10 minutos). Se descartó el sobrenadante y los tubos se llevaron a estufa de secado (70°C) hasta peso constante. Posteriormente se determinó el peso seco de la biomasa en cada eppendorf y se expresó en g de peso seco/l de medio de cultivo. Se graficó Absorbancia 600 nm vs peso seco (g/l), luego se determinó la mejor recta y la ecuación de la recta utilizando Excel 2007. Esta ecuación se utilizó para estimar el peso seco de cada cultivo basándose en su medición de absorbancia.

### 3.10 Determinación de Cr (VI) residual

De cada medio de cultivo a analizar se tomó un volumen de 1 ml y se lo colocó en tubos eppendorf, éstos se centrifugaron a 10000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los sobrenadantes se utilizaron para cuantificar el Cr (VI) por medio del método de la 1,5-difenilcarbazida en solución ácida (Clesceri y col., 1998). Esta técnica se realizó en un volumen final de 5 ml agregando en un tubo de ensayo las siguientes soluciones:

- ⊕ Muestra (sobrenadante): para concentraciones hasta 10 mg/l Cr (VI) se empleó 500 µl de muestra, a concentraciones mayores de contaminante la muestra fue diluida hasta alcanzar concentraciones de 10 mg/l o inferiores.
- ⊕ Agua destilada: 4,5 ml.
- ⊕ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2 M: 500 µl.
- ⊕ Solución de difenilcarbazida (5 mg/ml acetona): 200 µl.

Las mezclas fueron homogeneizadas utilizando vortex y luego incubadas 10 minutos a temperatura ambiente. Por último se midió la Absorbancia a 540 nm con espectrofotómetro Beckman 640. Estos valores se extrapolaron en una curva de calibración previamente graficada utilizando concentraciones conocidas de Cr (VI).

### 3.11 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS)

#### 3.11.1 Extracción de proteínas y preparación de las muestras

Para la extracción de proteínas se prepararon tres cultivos de 50 ml de medio TY, dos de los cuales fueron adicionados con Cr (VI) (10 y 20 mg/l), los cultivos se inocularon al 7,5% v/v con un inóculo de 24 hs de crecimiento. El ELC fue obtenido tal como se describió en el ensayo de cromato reductasas intracelulares (sección 3.7.2).

Las muestras para la corrida se sembraron a igualdad de proteínas, en gel de poliacrilamida al 12% con SDS al 10%, según Laemmli (1970). La corrida electroforética se llevó a cabo a 2 mA por calle, y el buffer de corrida usado fue Tris/glicina 0,01M pH 8,3 conteniendo SDS al 1%. Para la visualización proteínas se utilizó el colorante azul de Coomasie.

#### 3.11.2 Determinación de la concentración de proteínas

Para determinar la concentración de proteínas presente en los extractos obtenidos anteriormente se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976) usando albúmina sérica bovina como estándar (1 mg/ml).

### 3.12 Análisis Estadístico

El cálculo de la media y de los desvíos estándar de los datos registrados en los distintos experimentos, así como también la representación gráfica de los mismos fueron realizados utilizando el programa Microsoft Excel 2007.

La existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los datos analizados se determinó utilizando el Análisis de Varianza (ANOVA) de una sola vía y si los datos mostraban diferencia estadísticamente significativas se realizó el test de contraste de rango múltiple de Tukey para determinar entre qué grupos de datos existían estas diferencias. El nivel de significancia en ambos casos fue de 0,05. Para esto se utilizó el programa estadístico Statgraphics Plus versión 5.1.

## **Resultados y Discusión**

## 4. Resultados y Discusión

### 4.1 Selección de un aislamiento bacteriano con capacidad para tolerar y remover Cr (VI)

En este trabajo, se realizó la selección de un aislamiento con capacidad para tolerar y remover Cr (VI). Estas variables fueron analizadas en 8 aislamientos previamente obtenidos en nuestro laboratorio, a partir de muestras de sedimentos y efluente recolectados de una curtiembre ubicada en la localidad de Elena (Córdoba). Se seleccionó esta área para el aislamiento de bacterias debido a la presencia del contaminante en la misma. En ésta zona, El Cr total en sedimento presentó valores comprendidos entre 2500-6770 mg/kg a pesar de que, según lo establecido por la Ley 24051 sobre Residuos Peligrosos, la concentración máxima permitida en suelo de uso industrial es de 800 mg/kg. Por otro lado, el Cr total y Cr (VI) presente en el efluente varió entre 0,01-0,45 mg/l y 0,01-0,15 mg/l respectivamente. Aunque la concentración de Cr en el efluente se encontraba dentro del rango establecido (Romero y col., 2006), estudios previos de biotoxicidad realizados en nuestro laboratorio mediante el test AMPHITOX, utilizando embriones de *Rhinella arenarum*, determinaron que el efluente era altamente tóxico. Esta toxicidad podría deberse a algún otro compuesto tóxico, presente en el mismo.

#### 4.1.1 Ensayo de tolerancia a Cr (VI)

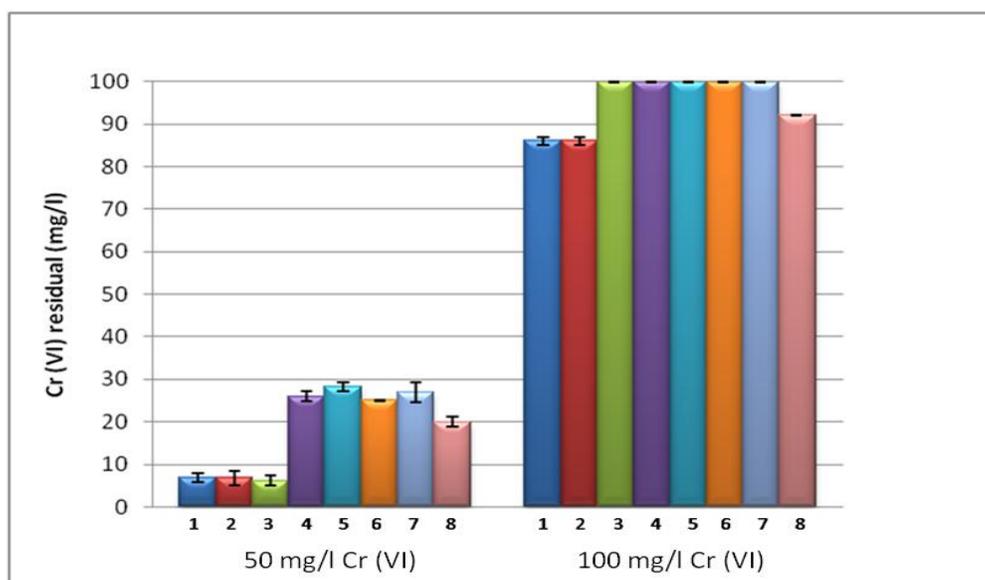
Con el fin de determinar la capacidad de los 8 aislamientos para tolerar Cr (VI), se procedió a sembrarlos en placas de petri conteniendo medio rico (TY) suplementado con distintas concentraciones del contaminante (35-700 mg/l). En la Tabla 2 puede observarse que la mayor parte de los aislamientos pudieron crecer en presencia de 350 mg/l de Cr (VI), excepto los aislamientos 6 y 8 cuya CMT fue de 175 mg/l. Por otra parte, ninguno de los microorganismos fue capaz de crecer cuando la concentración de Cr (VI) fue superior o igual a 530 mg/l.

**Tabla 2:** Concentraciones máximas toleradas (CMT) de Cromo (VI) en medio TY por los 8 aislamientos.

Aislamiento	CMT (mg/l)
C1	350
C2	350
C3	350
C4	350
C5	350
C6	175
C7	350
C8	175

#### 4.1.2 Ensayo de remoción de Cr (VI)

Considerando que un microorganismo puede ser capaz de tolerar un contaminante pero no de removerlo, se procedió a realizar un ensayo de los 8 aislamientos en el cual se evaluó la remoción, en primera instancia, de dos concentraciones de Cr (VI) (50 y 100 mg/l) (Figura 3). Se puede observar que cuando la concentración inicial de Cr (VI) fue 50 mg/l, todos los aislamientos fueron capaces de remover el contaminante, siendo los aislamientos C1, C2, C3 y C8 con los que se logró mayor remoción (entre 90 y 60%). A su vez, sólo los aislamientos C1, C2 y C8 pudieron remover Cr (VI) cuando la concentración inicial del mismo fue de 100 mg/l.



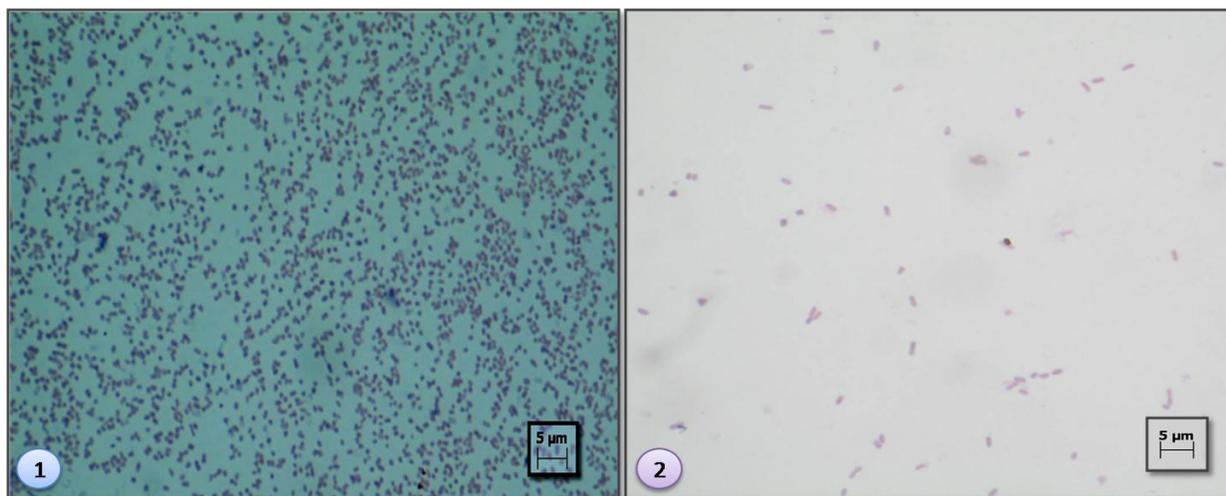
**Figura 3:** Remoción de Cr (VI) por los 8 aislamientos a las 72 hs de crecimiento en medio TY.

De acuerdo a los resultados obtenidos sólo los aislamientos C1, C2 y C8 lograron remover Cr (VI) en las dos condiciones ensayadas. Estos aislamientos con mayor capacidad de remoción fueron caracterizados morfológicamente por tinción de gram y azul de metileno, determinándose que los aislamientos C1 y C2 fueron levaduras y el aislamiento 8 una bacteria G (-). Considerando estos resultados se seleccionó al aislamiento C8 para continuar con los estudios de remoción de Cr (VI) ya que fue el único de origen bacteriano.

## 4.2 Caracterización fenotípica e identificación del aislamiento C8

### 4.2.1 Caracterización bioquímica e identificación

En primera instancia se realizó tinción de gram a una colonia aislada del aislamiento C8, crecido en placas con medio TY. El preparado se observó en microscopio óptico con objetivo de inmersión (100X) visualizándose bacilos cortos G (-) de 0,55-0,71  $\mu\text{m}$  de largo, mientras que cuando el microorganismo fue crecido en placas con medio TY con 20 mg/l de Cr (VI), los mismos mostraron un aumento de tamaño, variando el mismo entre 1,5 y 1,8  $\mu\text{m}$  (Figura 4).



**Figura 4:** Microfotografía obtenida por tinción de Gram, la barra indica la escala de 5 µm. Aumento: 1000X 1. Medio TY 2. Medio TY con 20 mg/l Cr (VI).

Los cambios morfológicos producto de la exposición de microorganismos a un contaminante han sido descritos por diversos investigadores. Nuestros resultados demostraron que el aislamiento C8 aumentó de tamaño y su forma se volvió más redondeada, pero algunos autores destacaron una disminución del tamaño frente a la exposición de Cr (VI), tal como reportaron Polti y col. (2011) para el microorganismo *Streptomyces* sp. MC1. Éste se acortó y redondeó luego de crecer durante 7 días en un medio mínimo suplementado con 50 mg/l Cr (VI).

Con respecto a la caracterización bioquímica, el aislamiento C8 fue posteriormente identificado como catalasa (+) y oxidasa (-), lo que junto con las características morfológicas y fisiológicas podría indicar que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Posteriormente, el microorganismo fue sembrado en medio eosina y azul de metileno (EMB), el cual es selectivo y diferencial para el aislamiento de bacilos entéricos G (-) y otros bacilos G (-) no exigentes, observándose desarrollo del mismo a las 24 hs de incubación.

Continuando con la identificación del aislamiento C8 se utilizó la galería API 20E, método rápido que permite la identificación presuntiva. Los resultados obtenidos luego de 48 hs de incubación se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3:** Resultados de la galería API 20E inoculada con el aislamiento C8 después de 48 hs de incubación.

API 20 E			
Prueba	Resultado	Prueba	Resultado
<b>Reducción de nitrato</b>	+	Producción de Indol	-
<b>Reducción de nitrito</b>	-	Producción de H <sub>2</sub> S	-
<b>Fermentación butanodiólica</b>	-	<b>Utilización de azúcares</b>	
<b>Utilización de Citrato</b>	+	Amigdalina	+
Presencia de enzimas		Arabinosa	+
<b>β- galactosidasa</b>	+	Glucosa	+
<b>Arginina dehidrolasa</b>	-	Inositol	+
<b>Gelatinasa</b>	+	Manitol	+
<b>Lisina descarboxilasa</b>	+	Melobiosa	+
<b>Triptófano desaminasa</b>	-	Ramnosa	-
<b>Ureasa</b>	+	Sacarosa	+
<b>Ornitina descarboxilasa</b>	+	Sorbitol	+

Una vez reveladas las pruebas que así lo requerían se procedió a introducir los datos obtenidos en el sistema API web. El aislamiento C8 fue identificado presuntivamente como *Serratia marcescens* con un 80,7% de confianza.

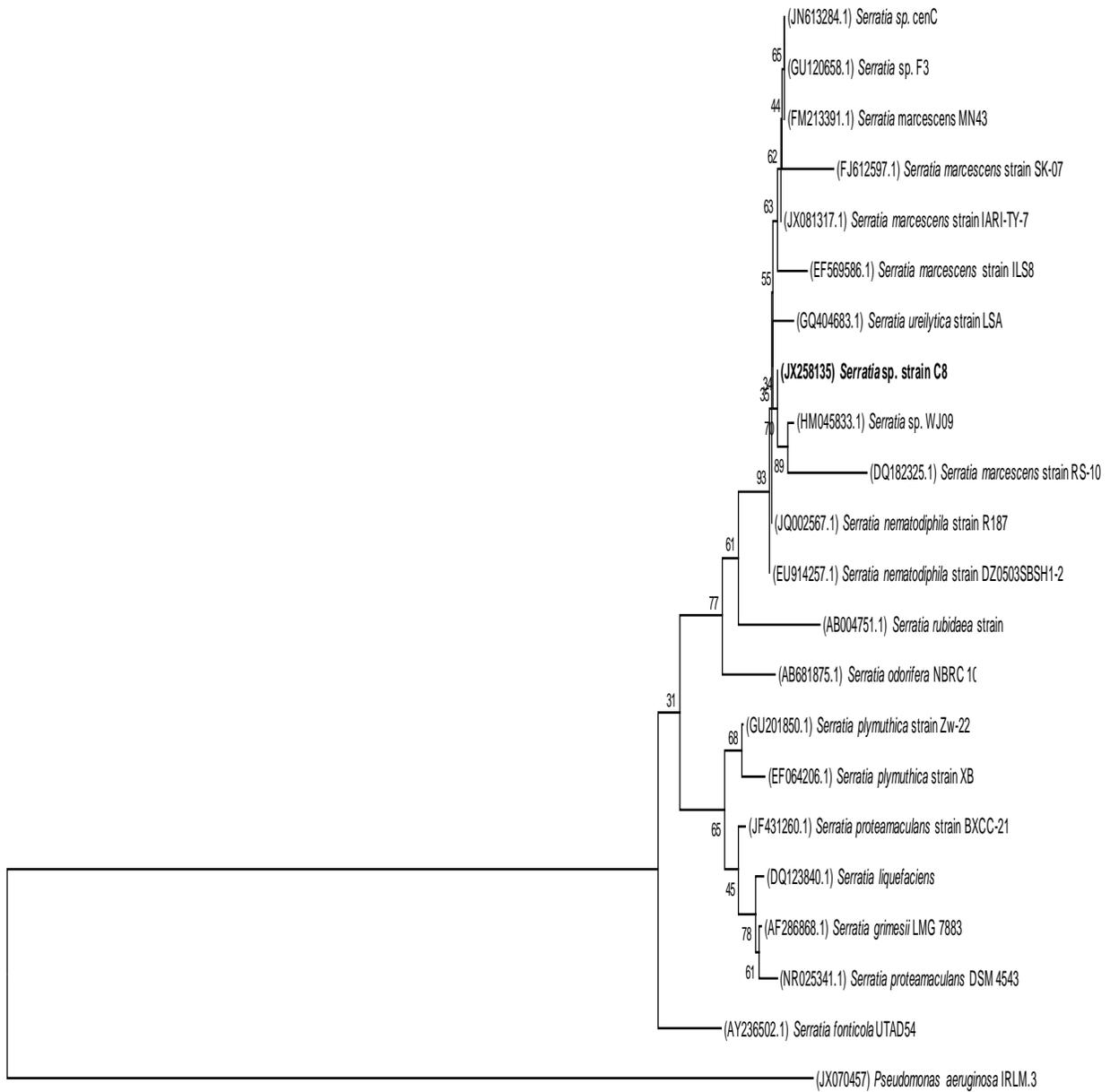
#### 4.2.2 Identificación por secuenciamiento de ADNr 16S

A partir de un cultivo puro del aislamiento bacteriano C8 se procedió a secuenciar el gen que codifica para el ARNr 16S. La secuencia obtenida por amplificación por PCR y su secuenciamiento reveló un fragmento de 1492 pb. Utilizando el programa blastN se comparó esta secuencia nucleotídica con las disponibles en la base de datos GenBank, indicando que la misma presentaba homología con secuencias correspondientes al género *Serratia*, siendo el porcentaje de identidad del 99%. La secuencia obtenida fue incorporada a la base de datos del NCBI, con el código de acceso JX258135.

Los resultados obtenidos mediante el kit comercial API 20E y el secuenciamiento del gen ADNr 16S fueron coincidentes y permitieron así identificar al aislamiento C8 como una cepa del género *Serratia*. En función de esto la bacteria será llamada *Serratia* sp. C8. Pruebas identificatorias más específicas son necesarias para la confirmación de la especie.

### 4.2.3 Construcción de un árbol filogenético basado en el gen ADNr 16s

Por medio de la utilización del programa de bioinformática MEGA 4.1 se construyó un árbol filogenético, comparando las secuencias de ADNr 16S de la cepa en estudio con las de distintas especies del género *Serratia* y utilizando una cepa de *Pseudomonas aeruginosa* como grupo externo (Figura 5). En el mismo es posible observar que la cepa *Serratia* sp. C8 formó parte de un *cluster* junto con la cepa WJ09 de *Serratia* sp. y con una cepa de *S. marcescens* (RS-10).



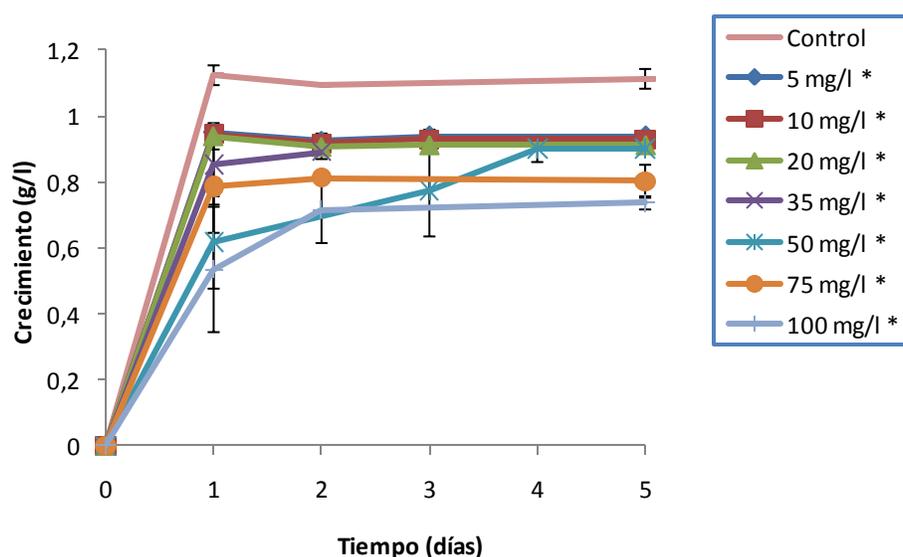
**Figura 5:** Árbol filogenético basado en la comparación de secuencias de ADN codificante para la región 16S del ARNr de distintas especies de *Serratia* y *Pseudomonas aeruginosa*. En negrita se encuentra la bacteria seleccionada para este estudio.

### 4.3 Análisis del crecimiento y remoción alcanzados por *Serratia* sp. C8 en medio rico (TY) utilizando distintas concentraciones de Cr (VI)

#### 4.3.1 Crecimiento de *Serratia* sp. C8 en presencia de distintas concentraciones de Cr (VI)

En primera instancia se analizó el efecto de distintas concentraciones de Cr (VI) sobre el crecimiento de *Serratia* sp. C8 (Figura 6).

Se puede observar que el crecimiento disminuyó a medida que aumentaron las concentraciones del contaminante en el medio de cultivo. Además, con 100 mg/l Cr (VI) el crecimiento fue significativamente menor que a las demás concentraciones probadas.



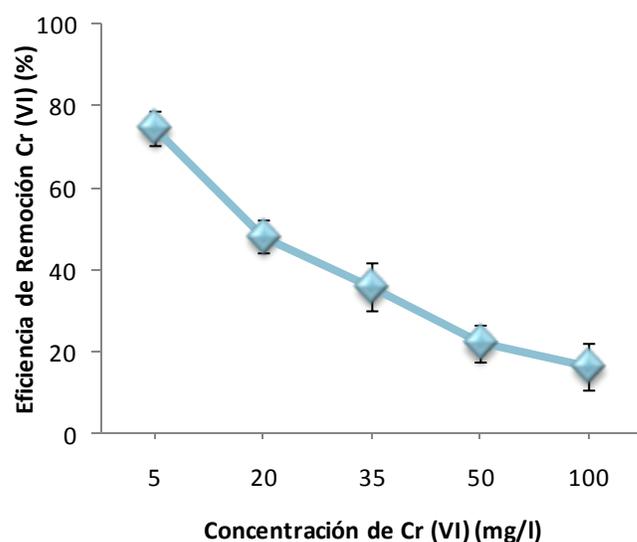
**Figura 6:** Crecimiento en medio TY con distintas concentraciones de Cr (VI). Los (\*) indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al control, el análisis estadístico se realizó en los días 1 y 5.

Los resultados obtenidos son coincidentes con lo informado por Srinath y col. (2002) para dos cepas bacterianas correspondientes a las especies *Bacillus megaterium* y *Bacillus circulans*, para las cuales se determinó que a concentraciones de Cr (VI) de 100 y 150 mg/l, el crecimiento disminuyó alrededor de un 50% y 90% respectivamente, en relación al control. Contrariamente, otros autores informaron que el crecimiento de *Bacillus* sp. no se vio afectado por 100 mg/l de Cr (VI), siendo similar al del control sin Cr (VI) (Zahoor y Rehman, 2009). Además, se han

reportado microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa* cuyo crecimiento en medio líquido no se vio afectado a concentraciones de hasta 5 mM de Cr (VI) (260 mg/l), notándose sólo un aumento en la duración de la fase de latencia (Oh y Choi, 1997). Estos trabajos demuestran que el Cr (VI) afecta de manera diferente a distintas especies bacterianas.

#### 4.3.2 Evaluación de la remoción de distintas concentraciones de Cr (VI) en medio rico (TY), por *Serratia* sp. C8

Para la evaluación de la remoción de Cr (VI), se utilizaron distintas concentraciones del mismo, las cuales variaron entre 5 y 100 mg/l. En la Figura 7 se puede observar que el microorganismo fue capaz de remover de manera diferencial las distintas concentraciones de Cr (VI) presentes en el medio de cultivo. Las eficiencias de remoción variaron entre 75 y 16% cuando las concentraciones fueron 5 y 100 mg/l, respectivamente.



**Figura 7:** Eficiencia de remoción (%) alcanzada al día 5 de crecimiento en medio rico (TY) suplementado con distintas concentraciones de Cr (VI).

De modo general, se observó que la capacidad de remoción se vio disminuída a medida que la concentración inicial de Cr (VI) aumentó. Esta tendencia ha sido también observada por Liu y col. (2008), en un consorcio bacteriano formado por *Bacillus* sp. y *Pseudomonas putida*, y por Farag y Zaki (2010) en dos aislamientos bacterianos identificados como *Acinetobacter* sp. y

*Pseudomonas* sp., por lo que este comportamiento no sería propio de una única especie. Esta disminución en la eficiencia de remoción podría atribuirse a la toxicidad generada por elevadas concentraciones de Cr (VI), a las cuales el crecimiento de los microorganismos se ve afectado, ya sea volviéndose más lento o inhibiéndose completamente. Esto generaría una disminución en la remoción del contaminante, puesto que los mecanismos de remoción que dependen del metabolismo activo, tales como la reducción enzimática y la bioacumulación, no podrían llevarse a cabo. A su vez un menor crecimiento daría como resultado menos superficie de adsorción disponible para la unión del contaminante. La cantidad de Cr (VI) capaz de producir este efecto tóxico depende de cada microorganismo, tal como se discutió anteriormente para el ensayo de crecimiento a distintas concentraciones de Cr (VI).

#### 4.4 Optimización de las condiciones de remoción

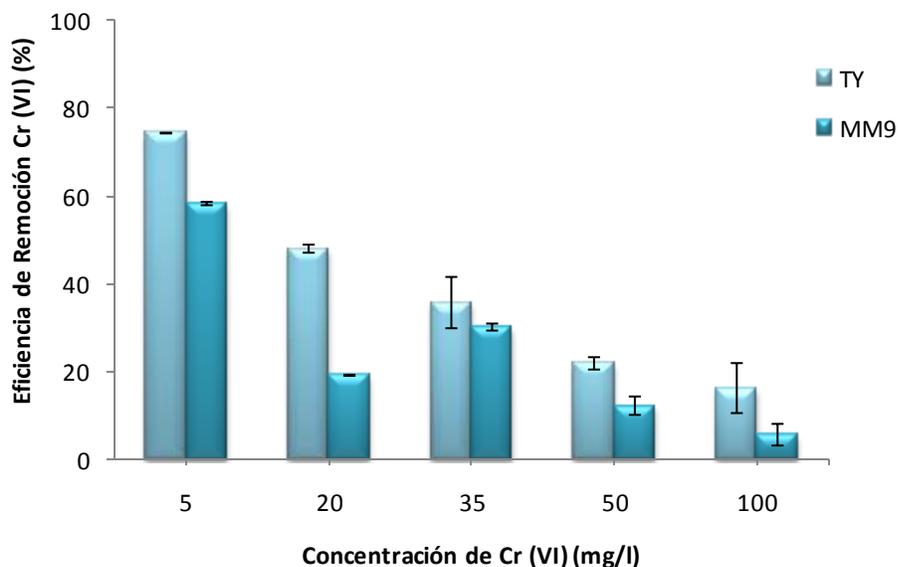
Existen diferentes mecanismos a través de los cuales los microorganismos son capaces de remover compuestos orgánicos e inorgánicos del medio en el que se encuentran. Éstos procesos, ya sean de índole físico-químico o biológico se ven afectados por distintas condiciones ambientales o de cultivo si se trata de experimentos de remoción *ex-situ*, tales como composición del medio, pH, temperatura, fuentes de carbono y nitrógeno disponibles, concentración de sustancias tóxicas (metales pesados, herbicidas, pesticidas, etc.), entre otros. Con el fin de encontrar las condiciones que permitan optimizar la eficiencia de remoción de Cr (VI), por parte del microorganismo *Serratia* sp. C8, se probaron distintas estrategias.

##### 4.4.1 Efecto de diferentes medios de cultivo sobre la remoción de Cr (VI)

Debido a que los estudios de remoción anteriores fueron realizados en un medio rico de crecimiento (TY) se decidió analizar la remoción de Cr (VI) en un medio mínimo (MM9), para realizar un estudio comparativo.

*Serratia* sp. C8 fue capaz de remover el contaminante presente en ambos medios de cultivo, en todas las concentraciones ensayadas (Figura 8). Si bien la remoción se evidenció en ambos medios, en el medio TY se obtuvieron los mayores porcentajes de remoción, encontrándose éstos entre 75 y 16% mientras que en medio mínimo (MM9) los porcentajes de

remoción alcanzados fueron del 58 y 5,7% para concentraciones iniciales de 5 y 100 mg/l de Cr (VI), respectivamente.



**Figura 8:** Eficiencia de remoción (%) alcanzada al día 5 de crecimiento en un medio rico (TY) y un medio mínimo (MM9) adicionado con 1 g/l de glucosa, suplementados con distintas concentraciones de Cr (VI).

Con los resultados obtenidos se demostró que un medio rico de crecimiento permite alcanzar una mayor remoción de Cr (VI), por esta razón se analizó la eficiencia de remoción utilizando otro medio rico (Medio I).

Debido a que los mayores porcentajes de remoción en medio TY se registraron con 5 y 20 mg/l Cr (VI) y que con 20 mg/l se logra remover un 50% del contaminante se seleccionó para este ensayo la concentración de 20 mg/l Cr (VI). Además, valores cercanos a esta concentración suelen encontrarse frecuentemente en aguas contaminadas con este metal. La Tabla 4 muestra la remoción de Cr (VI) y el crecimiento registrados para *Serratia* sp. C8 en diferentes medios ricos (TY y Medio I) comparado con los valores observados en el medio mínimo (MM9).

**Tabla 4:** Crecimiento y remoción de Cr (VI) alcanzados en los distintos medios de cultivo adicionados con 20 mg/l de Cr (VI) a tiempo final (día 5).

Medio de Cultivo	Cr (VI) removido (mg/l)	Eficiencia de remoción (%)	Absorbancia máxima
TY	9,62	48,12	1,67
Medio I	14,12	70,6	1,69
MM9	3,8	19	0,63

Como puede observarse en la Tabla 4, en los medios ricos se logró una mayor eficiencia de remoción al compararla con el medio mínimo, al finalizar el experimento. Esto puede deberse a que en los medios ricos existe mayor disponibilidad de compuestos capaces de funcionar como dadores de electrones, necesarios para la reducción de Cr (VI) a Cr (III). Esta preferencia por medios ricos ha sido informada por Guah y col. (2001) en el microorganismo *Shewanella alga*. Por otro lado, ha sido reportado que los microorganismos *Bacillus* sp. JDM-2-1 y *Staphylococcus capitis* fueron capaces de alcanzar porcentajes de remoción de Cr (VI) del 85 y 89%, respectivamente, en agua destilada con 100 mg/l Cr (VI) (Zahoor y Rehman, 2009).

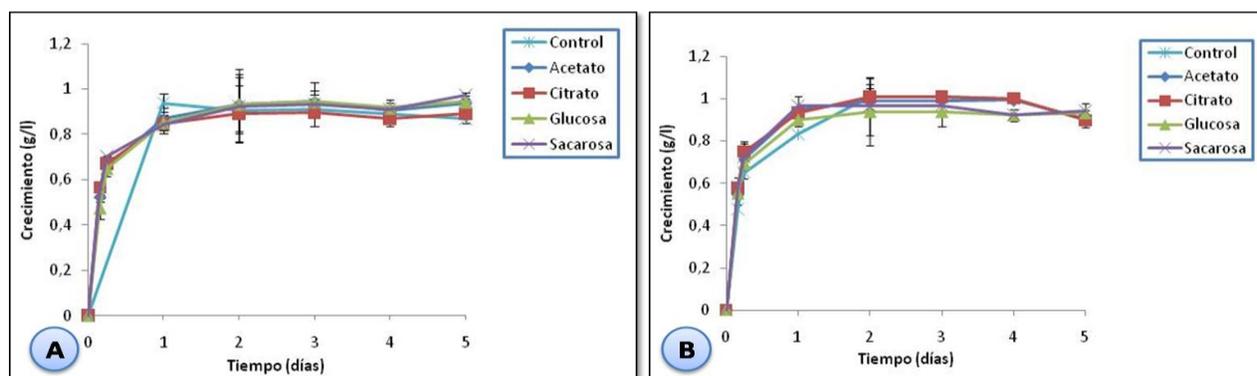
En los medios ricos también se observó mayor crecimiento que en el medio mínimo, lo cual estaría relacionado con las mayores eficiencias de remoción registradas para estos medios de cultivo. En este sentido en el Medio I se obtuvo una mayor remoción que en medio TY, lo cual podría deberse a la fuente de carbono extra que posee este medio en comparación con el medio TY, ya que la composición de estos dos medios es muy similar.

#### 4.4.2 Efecto de distintas fuentes de carbono sobre el crecimiento y la remoción de Cr (VI)

La adición de compuestos orgánicos al medio de cultivo sería un parámetro a tener en cuenta, ya que éstos pueden ser utilizados por los microorganismos como fuente de electrones, lográndose así una mayor eficiencia de remoción (Dey y Paul, 2012). Para comprobar esta hipótesis se seleccionaron los dos medios ricos probados anteriormente (TY y Medio I) a los

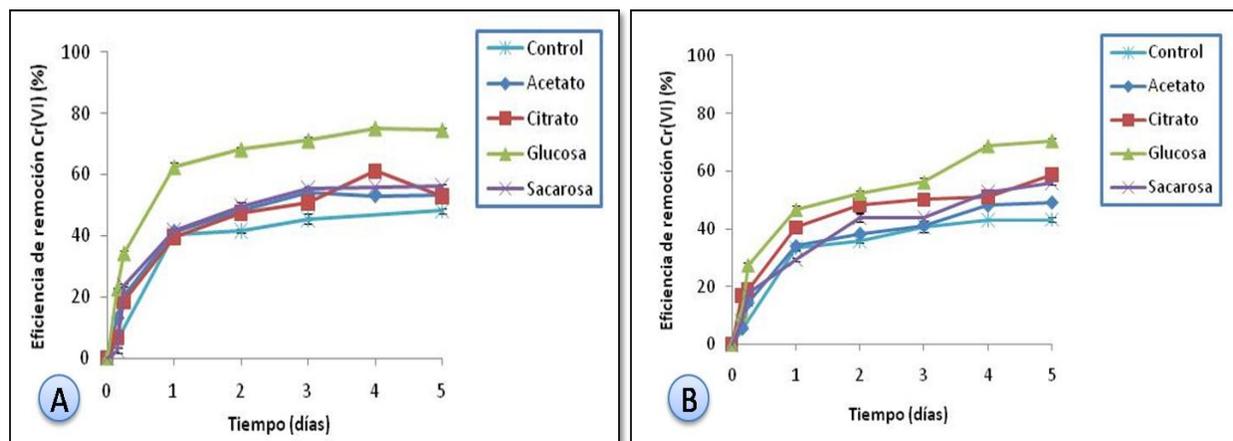
cuales se les adicionaron cuatro fuentes de carbono: glucosa, citrato, acetato de sodio y sacarosa, en una concentración de 1 g/l, con la presencia de 20 mg/l Cr (VI).

Se pudo observar que el crecimiento de *Serratia* sp. C8 no se vio afectado por el agregado de las diferentes fuentes de carbono adicionadas tanto al medio TY (Figura 9.A), como al Medio I (Figura 9.B), siendo su crecimiento similar al observado en condiciones control (medios sin fuente de carbono extra), alcanzando valores de crecimiento de alrededor de 0,9 - 0,95 g/l al finalizar el experimento (día 5).



**Figura 9:** Crecimiento de *Serratia* sp. C8 en medio TY (A) y Medio I (B) adicionados con distintas fuentes de carbono y 20 mg/l Cr (VI).

Cuando se analizó la remoción de Cr (VI) en las condiciones mencionadas anteriormente, se observó que a diferencia de lo ocurrido con el crecimiento, la capacidad de remoción sí se vio afectada por la fuente de carbono, tal como puede verse en la Figura 10.



**Figura 10:** Remoción de Cr (VI) 20 mg/l en medio TY (A) y Medio I (B) suplementados con diferentes fuentes de carbono.

La remoción alcanzada en medio TY con acetato y citrato al día 5, no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p>0,05$ ) respecto al control, el cual alcanzó una eficiencia de remoción del 48% al finalizar el ensayo. En contraposición, tanto los medios con glucosa como los que contenían sacarosa mostraron diferencias significativas respecto al control ( $p<0,05$ ). Sin embargo la remoción alcanzada a tiempo final con glucosa fue mayor que con sacarosa, lográndose un 75% y un 56% respectivamente.

Al igual que en medio TY, en Medio I la mayor eficiencia de remoción se alcanzó cuando la fuente de carbono adicionada al medio fue glucosa, obteniéndose con ésta un 70% de remoción, valor que supera alrededor del 20% a los obtenidos con las restantes fuentes de carbono, las cuales no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellas ( $p>0,05$ ).

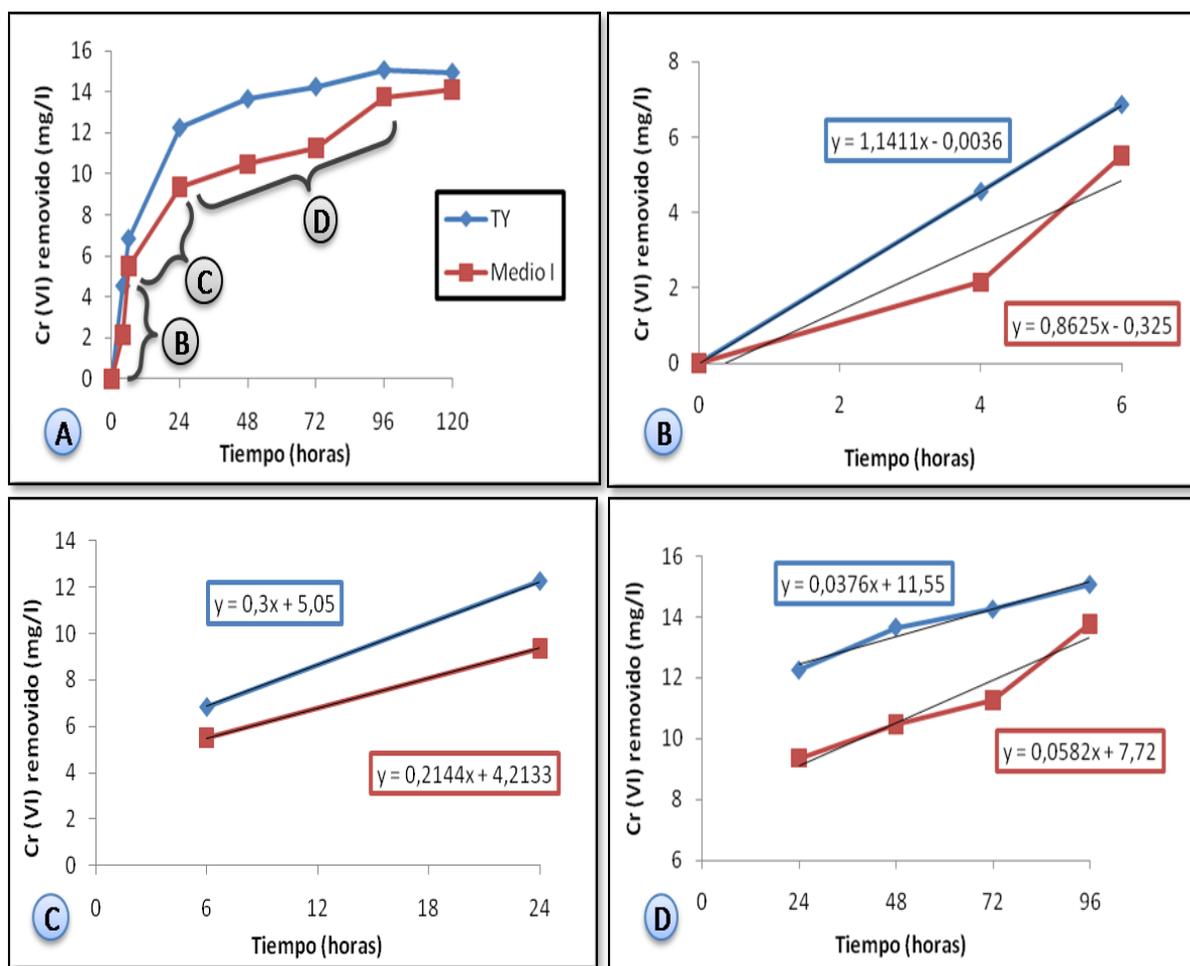
Estas diferencias en la eficiencia de remoción, de acuerdo a la fuente de carbono adicionada, podrían deberse a que la remoción del Cr (VI) se estaría llevando a cabo por reducción del mismo a Cr (III), proceso que involucra la transferencia de electrones desde un compuesto con un potencial de óxido reducción más bajo (compuesto reductor) a uno con un potencial mayor (compuesto oxidante) (Burriel Martí y col., 2008). *Serratia*, al ser un microorganismo quimioorganoheterótrofo, utiliza compuestos orgánicos como fuente de carbono y como dadores de electrones, pudiendo utilizarse el mismo sustrato para ambos fines (Tórtora y col., 2007).

Se ha demostrado que la reducción de Cr (VI) depende de la fuente de carbono y del microorganismo involucrado (Zhang y Li, 2011; Dey y Paul, 2012). En nuestro trabajo la mayor remoción alcanzada con glucosa por *Serratia* sp. C8 podría estar relacionada con el hecho de que ésta es una fuente de carbono fácilmente utilizable, por lo que habría una mayor disponibilidad de los electrones necesarios para realizar la reducción de Cr (VI), ya que las enzimas relacionadas al catabolismo de la glucosa (glucólisis) son constitutivas (Tórtora y col., 2007).

Algunos autores reportaron mayor remoción de Cr (VI) en presencia de otras fuentes de carbono. En este sentido, el microorganismo *E. cloacae* HO1 mostró mayor crecimiento y remoción de Cr (VI) en presencia de acetato que con glucosa (Wang y col., 1989). De manera similar *Arthrobacter* sp. SUK 1201 removió el 100% de una concentración inicial 2 mM de Cr (VI) (104 mg/l), cuando la fuente de carbono fue glicerol, mientras que con glucosa sólo removió un 76% (Dey y Paul, 2012). Así también Liu y col. (2004) hallaron que con *Pseudomonas aeruginosa* se obtenía un mayor porcentaje de remoción de Cr (VI) con malato y succinato que

con glucosa. Por otro lado, se ha establecido que el efecto positivo de una fuente de carbono en la remoción de Cr (VI) varía incluso entre microorganismos de un mismo género. Zhang y Li (2011), demostraron que se obtenía una mayor remoción por el microorganismo *Serratia* sp. Cr-10 cuando se adicionaba fructosa al medio, siguiendo en eficiencia lactosa, sacarosa y ácido succínico, situándose la glucosa en quinto lugar, contrario a lo observado en este trabajo para *Serratia* sp. C8.

Considerando lo expuesto anteriormente, se seleccionó a la glucosa como fuente de carbono extra. Además, se eligió al medio de cultivo TY para continuar con los ensayos de optimización, ya que si bien la eficiencia de remoción alcanzada en medio TY y Medio I con 1 g/l de glucosa no mostró diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ), sí se observó una mayor velocidad de remoción en medio TY (Figura 11.A). A las 6 horas de incubación en medio TY la velocidad de remoción fue 1,14 mg/l.h, mientras que en Medio I fue 0,86 mg/l.h (Figura 11.B). Luego de transcurrido este tiempo la velocidad de remoción disminuyó a más de la mitad en ambos medios, alcanzando valores de 0,3 y 0,2 mg/l.h en medio TY y Medio I, respectivamente (Figura 11.C). Pasadas las 24 hs la velocidad de remoción continuó disminuyendo hasta alcanzar valores cercanos a cero (Figura 11.D), lo que se corresponde con la fase estacionaria del cultivo en estudio.



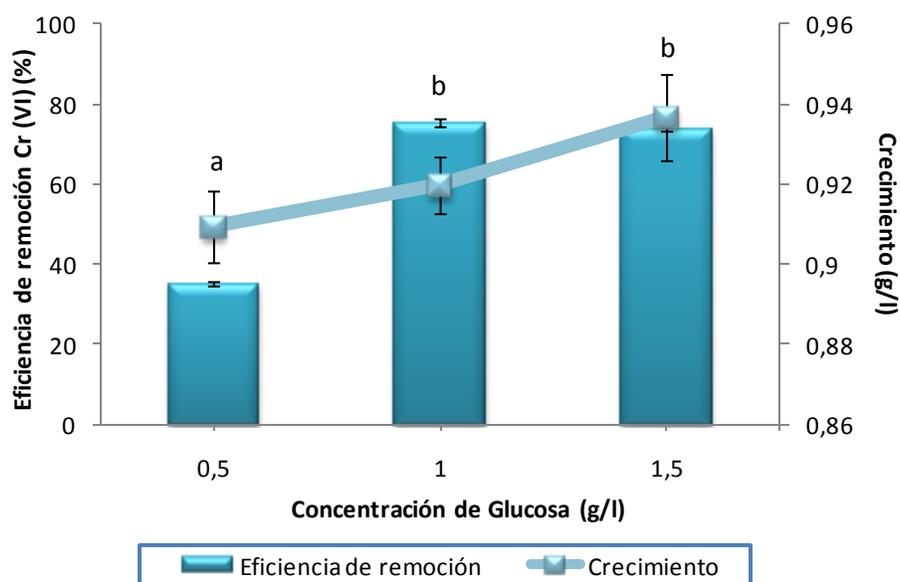
**Figura 11:** Cr (VI) removido en medio TY y en Medio I con 20 mg/l Cr (VI) y 1 g/l glucosa. Segmentos de la curva seleccionados para la determinación de velocidad (A). Cr (VI) removido a la hora 6 del ensayo (B), de 6-24hs (C), de 24-96 hs (D). La pendiente de la recta mostrada en cada ecuación representa la velocidad de remoción (mg/l.h) para cada sección de la curva.

Debido a la mayor velocidad de remoción alcanzada en medio TY a las 48 hs del ensayo, fue que en este medio la eficiencia de remoción llegó al 68%, mientras que en Medio I a las 48 hs fue del 52%.

Podemos decir que el medio TY con 1 g/l de glucosa fue más eficiente que el Medio I, ya que el tiempo necesario para remover una determinada cantidad de contaminante fue menor.

#### 4.4.3 Efecto de distintas concentraciones de glucosa sobre el crecimiento y la remoción de Cr (VI)

Este ensayo se realizó con el objetivo de analizar si distintas concentración de glucosa permitirían lograr una mayor eficiencia de remoción. Se utilizó como medio de cultivo al medio TY, seleccionado en el ensayo anterior, adicionado con 20 mg/l Cr (VI) y las diferentes concentraciones de glucosa a analizar (Figura 12).



**Figura 12:** Crecimiento y eficiencia de remoción de 20 mg/l Cr (VI) en presencia de distintas concentraciones de glucosa a tiempo final (día 5). Los datos de remoción con letras iguales no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellos ( $p > 0,05$ ).

Las variaciones de la concentración de glucosa en medio TY no afectaron el crecimiento del microorganismo y no se observaron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre los valores de biomasa alcanzados al finalizar el estudio.

Cuando la concentración de glucosa fue de 1 y 1,5 g/l se alcanzaron eficiencias de remoción del 75 y 74% respectivamente, valores que duplican el porcentaje de remoción alcanzado con 0,5 g/l de glucosa. Esto podría indicar que la glucosa estaría directamente relacionada con el proceso de remoción de Cr (VI), y debido a que la biomasa permaneció

relativamente constante a lo largo del tiempo, el mecanismo al cual estaría afectando la variación en las concentraciones no sería el de adsorción.

Resultados similares fueron presentados por Liu y col. (2004) quienes observaron un aumento en el crecimiento y la remoción de Cr (VI), por el microorganismo *Pseudomonas aeruginosa*, a medida que aumentaba la concentración de malato añadida al medio.

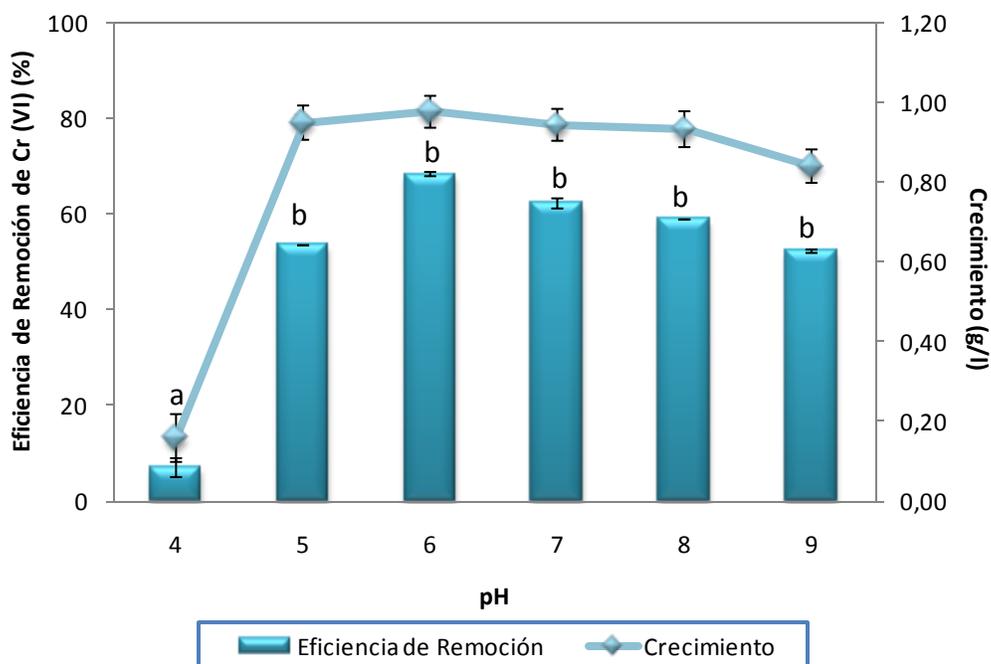
Si bien estadísticamente la remoción con 1 y 1,5 g/l de glucosa no mostró diferencias significativas ( $p>0,05$ ), se seleccionó la concentración 1 g/l de glucosa como óptima para continuar con los próximos ensayos de optimización, ya que implica un menor costo en la implementación del sistema de remoción.

#### 4.4.4 Efecto del pH sobre el crecimiento y la remoción de Cr (VI)

El pH del medio es un importante factor a tener en cuenta ya que de él depende la forma química en la cual se encuentra el Cr (VI), así como también la formación de los estados insolubles de Cr (III) (Mohan y Pittman, 2006), siendo esto último de suma importancia ya que permitiría remover la forma trivalente del cromo del medio por métodos sencillos como filtración.

Además, de este parámetro dependen diferentes fenómenos, tal como la protonación y desprotonación de la superficie bacteriana, proceso de importancia en la interacción de las moléculas de cromo con los grupos químicos que forman parte de los componentes de membrana o pared expuestos al medio, por lo que es un factor a tener en cuenta al analizar la remoción por bioadsorción (Silva y col., 2009).

En la mayoría de los ambientes naturales suelen encontrarse valores de pH entre 5 y 9, y es dentro de este rango donde generalmente se encuentra el pH óptimo de crecimiento de la mayor parte de los microorganismos. Para estudiar el efecto del pH sobre el crecimiento y la remoción de *Serratia* sp. C8, se decidió evaluar valores de pH comprendidos entre 4 y 9, en medio TY suplementado con 1 g/l de glucosa y 20 mg/l Cr (VI) (Figura 13).



**Figura 13:** Crecimiento y eficiencia de remoción de Cr (VI), variando el pH inicial del medio de cultivo, medido a tiempo final (día 5). Los datos de remoción con letras iguales no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellos ( $p > 0,05$ ).

Analizando los resultados se puede observar que a pH 4 el crecimiento del microorganismo fue marcadamente menor que el registrado entre valores de pH 5-9, rango de pH al cual los microorganismos pertenecientes al género *Serratia* pueden desarrollarse (Grimont y Grimont, 2007). El mayor crecimiento a estos valores se debe a que un microorganismo neutrófilo (pH óptimo 6-8) como el ensayado, requiere que su pH intracelular sea cercano a la neutralidad para mantener la integridad de sus macromoléculas, sensibles a pH ácido o alcalino y la estabilidad de su pared celular (Madigan y col., 2004). Esta neutralidad no se alcanzaría a pH 4 por lo que se produciría una desestabilización, tanto estructural como funcional (alteración del metabolismo, transporte activo y pasivo) que conduciría a la muerte del microorganismo.

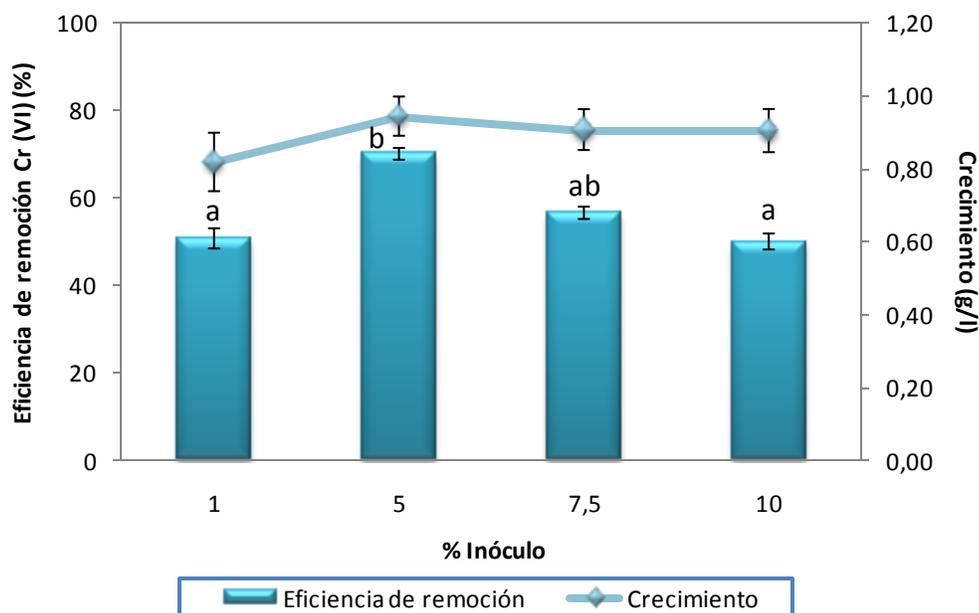
De manera similar, a pH 4 se observaron los mínimos valores de remoción. Mientras que a valores de pH comprendidos entre 5 y 9 la eficiencia de remoción fue relativamente constante, variando entre 52-68%. Sin embargo, a pH 6-7 se obtuvieron los mayores porcentajes de remoción.

Diferentes autores han reportados distintos valores de pH como óptimos, tanto para remoción de Cr (VI) como para crecimiento, encontrándose la mayoría en el rango entre 5 y 9 (Liu y col., 2004; Chaturvedy, 2011; Dey y Paul, 2012).

Debido a que las mayores eficiencias de remoción fueron alcanzadas a pH 6 y 7 y el medio TY tiene un pH cercano a la neutralidad, se seleccionó el pH 7 para continuar con los ensayos de optimización.

#### 4.4.5 Efecto de la concentración inicial de inóculo sobre el crecimiento y la remoción de Cr (VI)

Otro parámetro por el cual la remoción de un contaminante puede verse afectado es la concentración de inóculo. Para evaluar este parámetro, medio TY con 20 mg/l Cr (VI) y 1 g/l de glucosa fue inoculado con distintas concentraciones de cultivo bacteriano (Figura 14).



**Figura 14:** Crecimiento y eficiencia de remoción de 20 mg/l Cr (VI) variando la concentración inicial de inóculo. Los resultados presentados son los obtenidos a tiempo final (día 5). Los datos de remoción con letras iguales no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellos ( $p > 0,05$ ).

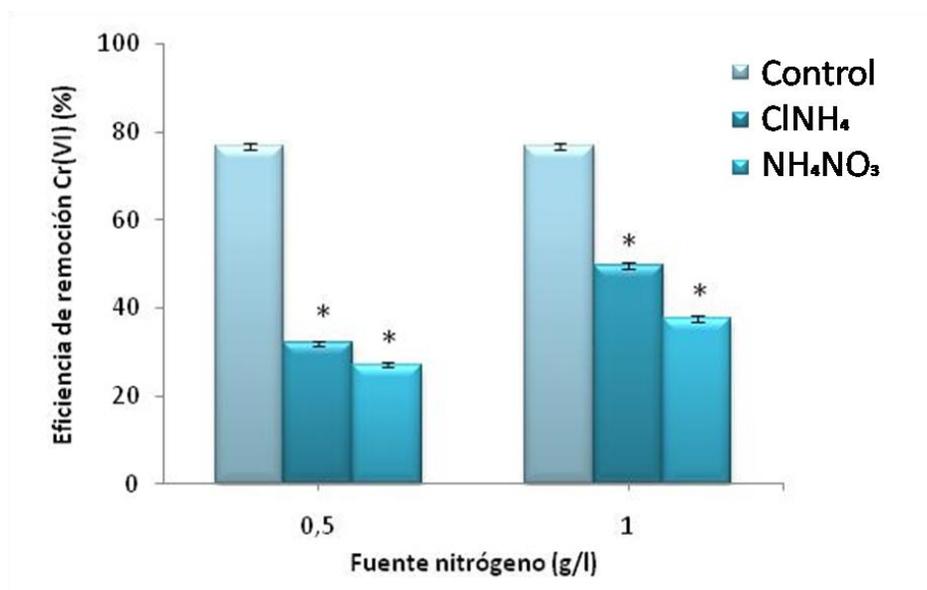
El crecimiento alcanzado a tiempo final no varió significativamente ( $p < 0,05$ ) cuando las concentraciones de inóculo inicial fueron 5, 7,5 y 10%, mientras que cuando la concentración inicial de inóculo fue 1% el crecimiento alcanzado fue menor.

Con respecto a la eficiencia de remoción alcanzada por *Serratia* sp. C8 se pudo observar que la máxima eficiencia se logró cuando la concentración inicial de inóculo fue del 5% (70% de remoción), a pesar de que la biomasa alcanzada al final del experimento fue similar para concentraciones iniciales de inóculo de 5, 7,5 y 10%.

De modo similar a lo hallado en este trabajo, Rajendran y col. (2012), en su estudio sobre la detoxificación de colorantes azoicos por aislamientos fúngicos, observaron que al utilizar un inóculo del 5%, se obtenían mayores porcentajes de reducción de los parámetros ensayados. Además, observaron que al aumentar la concentración inicial de inóculo de 5 a 7 y 9% la eficiencia de reducción disminuía, lo cual podría deberse a una aglomeración de las células como consecuencia del aumento de la concentración de inóculo, este fenómeno disminuiría la superficie de contacto los microorganismos y el contaminante, disminuyendo así la remoción por bioadsorción. Por el contrario, otros autores han publicado que al aumentar la concentración de inóculo inicial la eficiencia de remoción también aumentaba, tal es el caso de Kathiravan y col. (2011) quienes reportaron un aumento del 18% en la eficiencia de remoción de Cr (VI) por *Bacillus* sp. Del mismo modo, Liu y col. (2004), obtuvieron un aumento del 35% en la eficiencia de remoción de Cr (VI) por *Pseudomonas aeruginosa*. Esto demuestra la necesidad de analizar las condiciones óptimas de concentración de inóculo para cada microorganismo y sistema en estudio.

#### 4.4.6 Efecto de distintas fuentes de nitrógeno sobre la remoción de Cr (VI)

Con el fin de comprobar si con una fuente de nitrógeno adicional aumentaba la eficiencia de remoción del contaminante, se utilizaron dos sales de amonio ( $\text{CINH}_4$  y  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), en diferentes concentraciones (Figura 15).

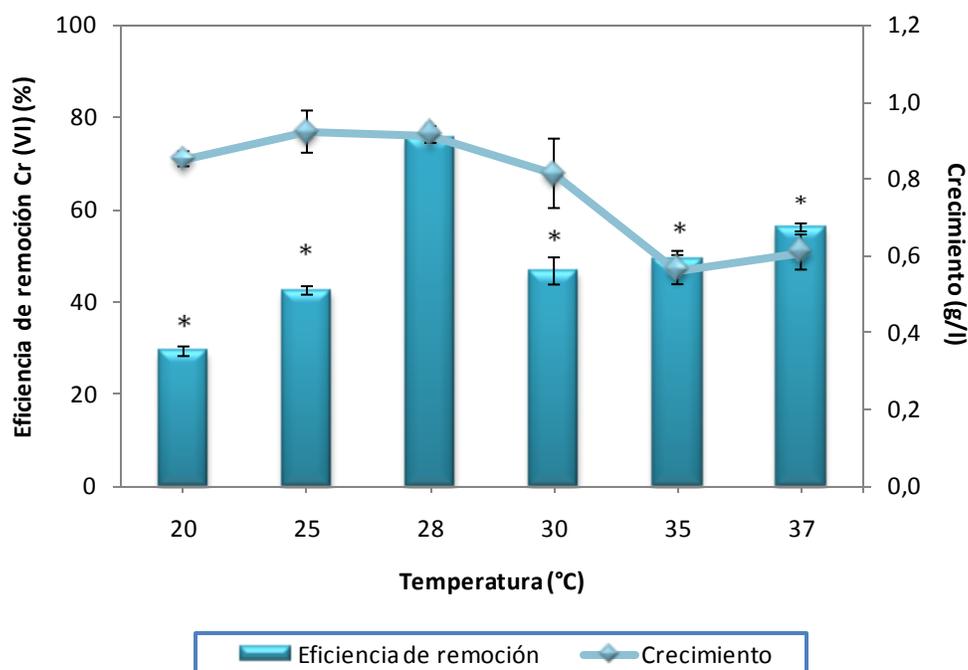


**Figura 15:** Efecto del agregado de una fuente de nitrógeno adicional al medio de cultivo TY con 1 g/l de glucosa sobre la remoción de 20 mg/l de Cr (VI). Los asteriscos (\*) indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al control.

Como se puede observar en la Figura 15 ninguna de las condiciones evaluadas superó la eficiencia de remoción lograda por el control (75%), por lo que no sería conveniente la adición de una fuente de nitrógeno extra al medio de cultivo. La disminución en la remoción podría deberse a que la relación C:N no fue la adecuada, puesto que en los procesos de biorremediación las relaciones óptimas C:N serían 10:1 a 30:1 (Martínez-Prado y col., 2011).

#### 4.4.7 Efecto de la temperatura sobre el crecimiento y la remoción de Cr (VI)

A fines de determinar la temperatura óptima de remoción, se seleccionaron diferentes temperaturas comprendidas entre 20°C y 37°C. Se utilizó medio TY, con 20 mg/l Cr (VI) y 1 g/l de glucosa, los resultados se observan en la Figura 16.



**Figura 16:** Crecimiento y remoción de 20 mg/l Cr (VI) a distintas temperaturas a tiempo final (día 5). Los asteriscos (\*) indican que los valores de remoción presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al cultivo crecido a 28°C.

El crecimiento se mantuvo sin mayores cambios cuando las temperaturas variaron entre 20°C y 28°C, sin embargo, el mismo mostró una disminución entre 30°C y 37°C.

Se pudo observar que a 28°C se obtuvo la máxima eficiencia de remoción, lo cual coincidió con el mayor crecimiento observado. A temperaturas de 20°C, 25°C, 30°C, 35°C y 37°C las eficiencias de remoción fueron significativamente inferiores ( $p < 0,05$ ) al valor obtenido a 28°C (75%). Las diferencias en los porcentajes de remoción obtenidos, podrían deberse a que la conformación de las enzimas responsables de la reducción de Cr (VI) se vería afectada, ya que estas macromoléculas son sumamente sensibles a los cambios de temperatura y estos cambios estructurales podrían ser los responsables de la disminución de la actividad enzimática.

Se ha informado una gran variedad de microorganismos capaces de remover Cr (VI) cuya eficiencia de remoción se vio modificada al variar la temperatura de cultivo. Ilias y col. (2011) demostraron que el crecimiento y remoción de Cr (VI) de los microorganismos *Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus* y *Pediococcus pentosaceus* fue óptimo a temperaturas entre 35°C y 40°C, disminuyendo con temperaturas superiores a 40°C. Por otro lado, Dey y Paul (2012) reportaron

que el microorganismo *Artrobacter* sp. SUK 1201 creció y removió Cr (VI) a una temperatura óptima de 35°C, mientras que a 40°C la eficiencia de remoción disminuyó bruscamente pasando de 65% a aproximadamente un 12% de remoción. El microorganismo *Serratia* sp. Cr-10 aislado por Zhang y Li (2011) alcanzó una remoción óptima a los 37°C a pesar de pertenecer al mismo género que el microorganismo caracterizado en este trabajo. Tanto estos microorganismos como *Serratia* sp. C8 presentaron comportamientos distintos frente a los cambios de temperaturas.

Dado que la mayor eficiencia de remoción se alcanzó a los 28°C se decidió seleccionar esta temperatura como óptima.

#### **4.5 Evaluación de la tolerancia y capacidad de remoción de Cr (VI) de *Serratia* sp. C8 en presencia de fenol y en efluentes industriales**

Las técnicas de remediación tienen como objetivo disminuir la toxicidad generada por compuestos de carácter tóxico antes de ser liberados al ambiente. Estos componentes llegan allí mayormente como consecuencia de las actividades del hombre, sobre todo de la actividad industrial. Cuando los efluentes industriales no son tratados previo a su liberación los mismos afectan el ambiente y la salud humana, ya que estos contienen gran variedad de componentes orgánicos e inorgánicos.

El objetivo de la obtención de una cepa microbiana con alta eficiencia de remoción de Cr (VI) sería el de poder utilizarla para tratar el efluente del cual proviene, ya que sería tolerante a los componentes nocivos que allí se encuentran, como así también remediar otros efluentes provenientes de procesos industriales que generen Cr (VI), tales como la galvanoplastia, refinamiento del petróleo, preservación de madera, industrias textiles y producción de cromo, entre otras (Liu y col., 2004; Silva y col., 2009).

Con este fin se analizó la tolerancia y remoción de Cr (VI) en presencia de fenol, ya que este contaminante orgánico es frecuentemente hallado en efluentes con alto contenido de Cr (VI), procedentes de las industrias de curtido de cueros, entre otras (Liu y col., 2008). Además, se investigó la capacidad de *Serratia* sp. C8 de tolerar distintos efluentes industriales.

4.5.1 Tolerancia en placa a distintas concentraciones de Cr (VI), fenol y a ambos contaminantes

Los estudios de tolerancia se realizaron en medio rico (TY) y medio mínimo de crecimiento (MM9). Se pudo observar que la tolerancia del microorganismo se vio favorecida cuando éste desarrolló en medio rico, siendo capaz de crecer a mayores concentraciones de Cr (VI), fenol y de ambos contaminantes comparado con el medio mínimo MM9 (Tabla 5).

**Tabla 5:** Concentración máxima tolerada (CMT) de Cr (VI), fenol y de ambos contaminantes, en medio TY y medio MM9.

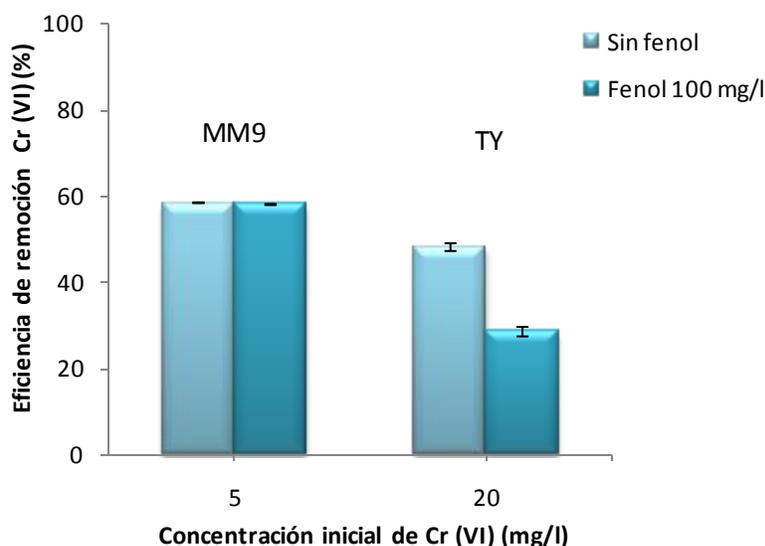
CMT (mg/l)		
Contaminante	Medio rico (TY)	Medio mínimo (MM9)
Cromo (VI)	175	50
Fenol	1000	750
Cromo (VI) y Fenol	F500 C175	F200 C5

MM9 contenía 3% de glucosa como fuente de carbono para el crecimiento con Cr (VI).

Cuando el microorganismo fue crecido en presencia de ambos contaminantes, se observó un mayor efecto sobre el mismo, ya que en general, las concentraciones toleradas de ambos contaminantes fueron menores que la CMT de cada contaminante por separado, lo que era esperable debido a un efecto aditivo de toxicidad por ambos sustratos sobre la bacteria.

4.5.2 Remoción de Cr (VI) por *Serratia* sp. C8 en presencia de fenol

Una vez analizada la tolerancia, se analizó la remoción de Cr (VI) en presencia de fenol en medio rico (TY) y en medio mínimo (MM9). Debido a que la tolerancia en MM9 fue menor, se utilizó 5 mg/l Cr (VI) en MM9 y 20 mg/l en medio TY (Figura 17).



**Figura 17:** Eficiencia de remoción de Cr (VI) en presencia y ausencia de fenol (100 mg/l) a tiempo final (día 5). Medio mínimo MM9 (Cr (VI) 5mg/l), Medio rico TY (Cr (VI) 20 mg/l).

En la Figura 17 podemos ver que en el medio mínimo de crecimiento (MM9) el porcentaje de remoción de Cr (VI) en presencia de fenol no sufrió modificaciones respecto a la remoción en ausencia de fenol, lo contrario ocurrió en medio rico, en donde la presencia de fenol redujo un 50% la eficiencia de remoción alcanzada en ausencia del mismo. Esto podría deberse a la mayor concentración de Cr (VI) presente en el medio rico, ya que al aumentar las concentraciones de Cr (VI) aumenta su toxicidad, lo cual sumado a la presencia de fenol contribuiría a la disminución en la remoción como consecuencia de un menor crecimiento bacteriano.

Estos resultados demuestran que el microorganismo fue capaz de remover Cr (VI) aún en presencia de otro contaminante como el fenol, frecuentemente encontrado en efluentes contaminados con cromo. Si bien en presencia de fenol la remoción fue menor en medio TY quizás a mayor tiempo de incubación podrían obtenerse resultados similares a los hallados en el control sin fenol.

#### 4.5.3 Tolerancia en placa a diferentes efluentes industriales

Con el objetivo de analizar la tolerancia de *Serratia* sp. C8 a una mezcla de contaminantes presentes en un efluente industrial, se hizo crecer al microorganismo en placas conteniendo diferentes efluentes industriales, a los que se les agregó agar para lograr su gelificación, incluyendo el efluente de la curtiembre del cual fue aislado el microorganismo en estudio (Tabla 6).

**Tabla 6:** Tolerancia en placa de *Serratia* sp. C8, en presencia de distintos efluentes industriales.

Efluente	<i>Serratia</i> sp. C8
QUÍMICA-1	++
QUÍMICA-2	+
PETROQUÍMICA	-
CURTIEMBRE	+

Como se observa en la Tabla 6, el microorganismo fue capaz de crecer en los distintos efluentes denominados Química-1, Química-2 y Curtiembre, aunque no fue capaz de desarrollar en el efluente proveniente de una industria petroquímica, probablemente debido a la presencia de una mayor concentración de compuestos tóxicos.

En cuanto a los resultados obtenidos, podemos decir que *Serratia* sp. C8 fue capaz de tolerar los distintos contaminantes presentes, en la mayoría de los efluentes analizados. Esto sería de interés para la realización de futuros ensayos de remoción directamente en los efluentes, para así dilucidar si el microorganismo sería capaz no sólo de tolerar sino también de remover Cr (VI) en presencia de los distintos contaminantes presentes en éstos.

#### 4.6 Determinación de los mecanismos de remoción de Cr (VI) presentes en *Serratia* sp. C8

Existen diferentes mecanismos mediante los cuales los microorganismos interactúan con iones metálicos. Algunos de estos requieren células viables, tal es el caso de la biotransformación del Cr (VI) a Cr (III) mediante reducción enzimática y la bioacumulación de Cr (VI) en el interior del microorganismo mediante el ingreso del metal por transportadores putativos. De manera contraria, la remoción de Cr (VI) por bioadsorción no requiere necesariamente de células viables para llevarse a cabo, ya que se basa en la interacción del metal con los grupos expuestos en la superficie del microorganismo, por lo que este mecanismo de remoción depende mayormente de parámetros relacionados al medio que rodea las células, siendo el pH uno de los parámetros identificados como claves.

##### 4.6.1 Ensayos de bioadsorción de Cr (VI)

Dado que la bioadsorción es un proceso que tiene lugar tanto en células vivas como muertas, y con el objetivo de comprobar si éste fue uno de los mecanismos por los cuales se llevó a cabo la remoción de Cr (VI), se realizaron dos ensayos, uno con células inactivadas por pH ácido (pH 2) y otro con células autoclavadas. De esta manera se aseguró que la remoción se debió sólo a un proceso pasivo de unión a componentes de la membrana externa y no a reducción enzimática.

##### 4.6.1.1 Bioadsorción a pH 2

Como se muestra en la Tabla 7, *Serratia* sp. C8 fue capaz de remover Cr (VI) del medio de cultivo por medio de la adsorción del contaminante a su biomasa. Cuando el microorganismo fue incubado tanto en presencia de 10 mg/l como de 20 mg/l de Cr (VI) durante 24 hs, se observó que la adsorción fue de aproximadamente 25 mg de Cr (VI) por gramo de peso fresco siendo el porcentaje de adsorción de 7,7% y 4,4% respectivamente (Tabla 7).

**Tabla 7:** Adsorción de Cr (VI) por gramo de peso fresco de *Serratia* sp. C8

<b>Bioadsorción Día 1 (10 mg/l)</b>	
Cr (VI) adsorbido/peso fresco (mg/g)	25,5 ± 3,7
Adsorción (%)	7,7 ± 1,3
<b>Bioadsorción Día 1 (20 mg/l)</b>	
Cr (VI) adsorbido/peso fresco (mg/g )	26,2± 15,2
Adsorción (%)	4,4 ± 2,5

Además con 20 mg/l de Cr (VI) se midió el porcentaje de adsorción también al día 5, observándose que la adsorción aumentaba hasta 35 mg/g peso fresco, lo cual corresponde a un 5,9% de adsorción.

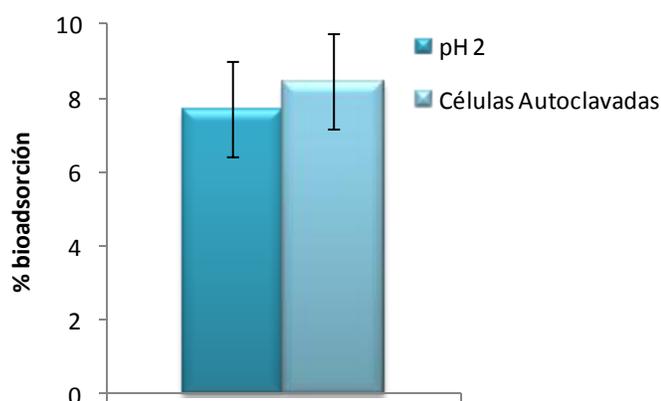
Debido a que la cantidad de metal adsorbido depende de la conformación de las estructuras externas bacterias, los valores de adsorción entre microorganismos pueden ser muy diferentes. Mediante este mismo procedimiento Garza González (2005) observó, luego de transcurridas 16 hs de contacto entre los microorganismos analizados y el medio con Cr (VI), valores de adsorción entre 13,7 y 19,5 mg/g Cr (VI) en 3 cepas del género *Bacillus*, mientras que los hongos filamentosos testeados superaron los 28 mg/g Cr (VI). En comparación los valores de adsorción obtenidos por *Serratia* sp. C8 al día 1 tanto con 10 como con 20 mg/l de Cr (VI) fueron superiores a los registrados en las cepas de *Bacillus* y en el microorganismo *P. fluorescens*, también analizado por los autores. No sólo las diferencias estructurales entre bacterias G (+) y G (-) afectan la bioadsorción, sino también la presencia de cápsula, flagelos, pilis, capas mucoides, etc. El pH es también un factor importante ya que modifica las cargas de la célula tornándolas positivas a medida que desciende, lo que en este caso favorecería la adsorción de Cr (VI) a la célula.

La valencia del Cr (VI) adsorbido a la superficie bacteriana podría ser tanto 6 como 3, dado que a pH 2 suele formarse cierta cantidad de Cr (III) como consecuencia de la acidez (Murugavekh y Mohanty, 2012). La adsorción a la superficie celular podría llevarse a cabo mediante la interacción del metal con diversos grupos químicos con capacidad ionizable como es el caso de los grupos hidroxilo, amino, carboxilo y fosfato. Mary Mangaiyarkarasi y col. (2011) reportaron como los principales sitios de unión a Cr (VI) en *Bacillus subtilis*, a los grupos carboxilo del ácido teicoico presente en la pared celular y a los grupos fosfatos en segundo lugar,

además la remoción por adsorción estaría asociada a la reducción del metal a Cr (III), lo cual estaría sucediendo en la superficie celular.

#### 4.6.1.2 Bioadsorción por células autoclavadas

En este segundo ensayo de bioadsorción las células fueron inactivadas por calor, los resultados se muestran en la Figura 18.



**Figura 18:** Porcentaje de adsorción en células inactivadas a pH 2 y células autoclavadas, a las 24 hs.

El porcentaje de adsorción logrado por las células autoclavadas al día 1 del ensayo fue del 8,45% aumentando hasta un valor de 22,5% al día 5 del mismo. Al comparar los resultados obtenidos en ambos tratamiento (inactivación a pH 2 y células autoclavadas), concluimos que no se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) entre los porcentajes de adsorción alcanzados al día 1 del experimento. Por lo tanto, mediante dos técnicas diferentes se verificó la capacidad de bioadsorción de Cr (VI) de *Serratia* sp. C8, además ambas técnicas coincidieron en la cantidad de Cr (VI) bioadsorbido por las células.

#### 4.6.2 Ensayos de detección de cromato reductasas

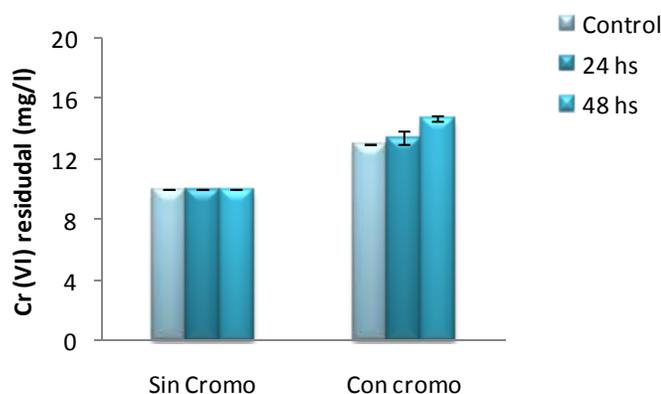
La reducción de Cr (VI) puede ser llevada a cabo por cromato reductasas, las cuales pueden tener diferentes localización: cromato reductasas extracelulares, las cuales son excretadas

al medio por el microorganismo, cromato reductasas citoplasmáticas o solubles y cromato reductasas asociadas a membrana, éstas últimas generalmente involucradas en la remoción anaerobia del Cr (VI).

Los análisis de Cr total realizados en el sobrenadante mediante espectrofotometría de absorción atómica (EAA) indicarían que habría Cr (III) en el mismo, por lo tanto uno de los mecanismos empleados por *Serratia* sp. C8 para remover Cr (VI) del medio sería el de reducción enzimática. Mediante los siguientes ensayos se determinó la presencia y localización de cromato reductasas y se analizó su carácter constitutivo o inducible haciendo crecer al microorganismo en presencia y ausencia de Cr (VI).

#### 4.6.2.1 Detección de cromato reductasas extracelulares

Para determinar si la síntesis de cromato reductasas extracelulares se veía inducida o no en presencia de Cr (VI) se hizo crecer al microorganismo en presencia y ausencia del contaminante (Figura 19).



**Figura 19:** Cr (VI) residual en el sobrenadante de cultivos crecidos en presencia y ausencia de Cr (VI) luego de una incubación de 24 hs y 48 hs.

Al analizar los resultados, los mismos indicaron que la concentración de Cr (VI) residual en el sobrenadante fue de 13,4 mg/l, dicho valor no disminuyó a las 24 y 48 hs, lo mismo ocurrió en el cultivo crecido en ausencia del contaminante. Contrariamente a lo hallado en este trabajo Chen y col. (2012) reportaron que el microorganismo *Bacillus cereus* fue capaz de remover casi en su totalidad, a las 120 hs de cultivo, 150 mg/l Cr (VI) al crecer en ausencia de Cr (VI),

mientras que tanto el sobrenadante de cultivos de *Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus* como de *Pediococcus pentosaceus* crecidos en presencia de Cr (VI) presentaron actividad reductora (Ilias y col., 2011).

Los resultados obtenidos indicarían que *Serratia* sp. C8 no liberaría cromato reductasas extracelulares en las condiciones ensayadas ya que no se observó remoción de Cr (VI) en los sobrenadantes.

#### 4.6.2.2 Detección de cromato reductasas intracelulares

Con el fin de evidenciar la presencia de cromato reductasas en el citoplasma bacteriano y de determinar si su síntesis se veía inducida o no al hacer crecer el microorganismo en contacto con el contaminante, se procedió de la misma manera descrita anteriormente (Figura 2).

Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8:** Remoción de Cr (VI) por cromato reductasas intracelulares a las 24 hs de incubación en presencia y ausencia de Cr (VI).

	Con cromo		Sin cromo	
	Eficiencia de remoción (%)	Cr (VI) residual (mg/l)	Eficiencia de remoción (%)	Cr (VI) residual (mg/l)
Ensayo 1	32,6	6,74	46,2	5,38
Ensayo 2	80,3	1,97	81,4	1,86

Ensayo 1: la concentración de contaminante en los cultivos crecidos en presencia de Cr (VI) fue de 10 mg/l.

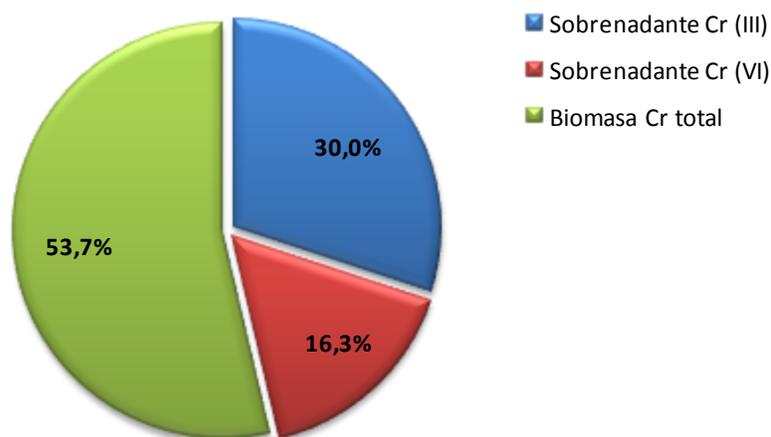
Ensayo 2: la concentración de contaminante en los cultivos crecidos en presencia de Cr (VI) fue de 20 mg/l.

Los resultados obtenidos indicarían que habría cromato reductasas en el citoplasma de *Serratia* sp. C8, y que las mismas serían sintetizadas de forma constitutiva ya que en los cultivos crecidos en ausencia de Cr (VI) también se observó una disminución de la concentración inicial del contaminante (10 mg/l). Además pudimos observar remoción tanto en los cultivos crecidos con 10 como con 20 mg/l Cr (VI).

En el experimento realizado al crecer el microorganismo en presencia de 20 mg/l de Cr (VI) se observó una mayor remoción que la alcanzada al hacerlo crecer 10 mg/l Cr (VI). Esta mayor eficiencia de remoción podría deberse a un estado metabólico más activo de las células utilizadas crecidas en presencia de 20 mg/l Cr (VI), ya que de tratarse de un aumento en la síntesis enzimática como consecuencia de una mayor concentración del contaminante, debería haberse observado una eficiencia de remoción significativamente mayor en los cultivos crecidos con cromo en comparación con los crecidos sin el contaminante.

#### 4.7 Determinación del destino final del Cr (VI) incorporado al medio de cultivo

Para evaluar el destino del Cr (VI) incorporado, se determinó el contenido de Cr total (Cr (III) y Cr (VI)) en sobrenadante y en la biomasa (Figura 20).



**Figura 20:** Distribución del Cr (VI) incorporado al medio de cultivo (20 mg/l) luego de 5 días de incubación.

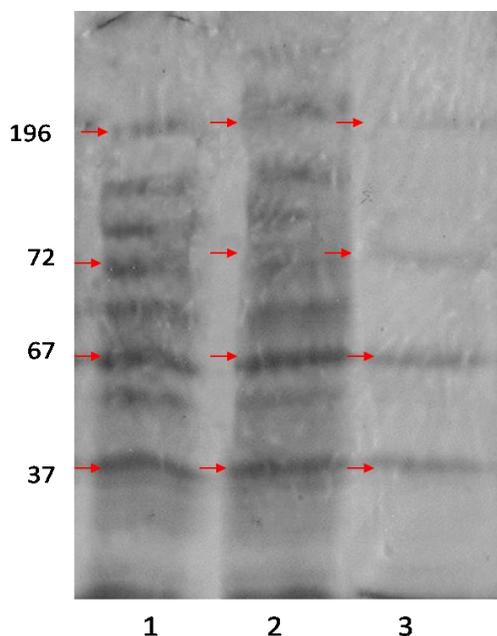
Se puede observar que a tiempo final (día 5) el 46,3% del Cr se encontró en sobrenadante y el 53,7% en la biomasa bacteriana. Del 46,3% del Cr total presente en sobrenadante, el 30% correspondió a Cr (III), mientras que el 16,3% a Cr (VI). Por otro lado, si bien el Cr determinado en biomasa fue Cr total, sería de esperar que el Cr acumulado sea en su mayoría Cr (III), ya que podría estar siendo reducido por acción de cromato reductasas intracelulares y posteriormente

acumulado. Además al pH en el que se llevó a cabo el experimento (pH 7) es probable que los grupos químicos de los componentes de membrana se encontraran cargados negativamente, favoreciendo la unión del Cr (III) a ellos (Silva y col., 2009). En este sentido Polti y col. (2011) observaron que en la biomasa de *Streptomyces* sp. MC1 procedente de un cultivo crecido en presencia de Cr (VI), no se detectaba Cr (VI) pero si Cr total, por lo que el Cr acumulado en la biomasa correspondería a la forma trivalente del mismo. Tanto en *Streptomyces* sp. MC1 como en el microorganismo *Acinetobacter haemolyticus* pudo evidenciarse la presencia de Cr en el interior de la célula, observable como sitios de mayor densidad electrónica mediante microscopía electrónica de transmisión, (Pei y col., 2009). Estos autores propusieron que estos sitios de mayor densidad en *Acinetobacter haemolyticus* estarían formados por Cr (III) el cual se uniría a sitios iónicos generando así un punto de nucleación y formación de cristales de Cr (III).

Por otro lado, debido a que los estudios de cromato reductasas extracelulares indicaron que estas enzimas estarían ausentes en *Serratia* sp. C8, el Cr (III) en sobrenadante podría producirse debido a la interacción del Cr (VI) con grupos reductores presentes en la estructura externa bacteriana y su consecuente reducción a Cr (III), el mismo podría unirse a grupos químicos de los componentes de membrana cargados negativamente o bien podría ser liberado al medio de cultivo.

#### **4.8 Análisis del perfil de proteínas de *Serratia* sp. C8 crecida en presencia y ausencia de Cr (VI)**

Con la finalidad de analizar si se producían variaciones en el perfil proteico de *Serratia* sp. C8 al hacer crecer al microorganismo en presencia y ausencia de Cr (VI), se prepararon tres cultivos bacterianos de 24 hs, uno de ellos sin Cr (VI) mientras que a los otros dos se les adicionó 10 y 20 mg/l Cr (VI). Los extractos obtenidos a partir de estos cultivos fueron sembrados en un gel de poliacrilamida conteniendo SDS, para brindar condiciones desnaturalizantes (Figura 21).



**Figura 21:** SDS-PAGE de proteínas totales de *Serratia* sp. C8. Calle 1: control. Calle 2: Cr (VI) 10 mg/l. Calle 3: Cr (VI) 20 mg/l. A la izquierda se muestran los pesos moleculares (kDa) de las bandas señaladas con flechas rojas.

Como puede observarse el perfil proteico de *Serratia* sp. C8 crecido en presencia de Cr (VI) presentó variaciones respecto a los perfiles de los cultivos crecidos en ausencia del contaminante.

El patrón de proteínas obtenido en condiciones control, es decir sin la presencia de Cr (VI), presentó un perfil similar al obtenido en presencia de Cr (VI) 10 mg/l. En el perfil obtenido con 20 mg/l Cr (VI) se observó una gran disminución en el número de bandas respecto a los perfiles hallados con 10 mg/l y en condiciones control. Además, puede observarse que en todos los tratamientos las 4 bandas marcadas con flechas rojas, permanecen presentes incluso con 20 mg/l Cr (VI), siendo las bandas de 67 y 37 kDa las que presentan mayor intensidad.

En la investigación realizada por Abskharon y col. (2009) el perfil de proteínas de *E. coli* obtenido al hacerlo crecer con bajas concentraciones de Cr (VI) (1, 5 y 10 mg/l) no mostró grandes diferencias respecto al control, aunque de manera similar a lo hallado en *Serratia* sp. C8 algunas de las bandas comenzaron a disminuir de intensidad al aumentar la concentración de Cr (VI).

## **Conclusiones**

## 5. Conclusiones

⊕ A partir de los 8 aislamientos obtenidos de una curtiembre de la región, se seleccionó a la cepa bacteriana C8 debido a su mayor tolerancia y remoción de Cr (VI) en medio rico de crecimiento. Esta cepa fue identificada como *Serratia* sp. mediante métodos bioquímicos y moleculares.

⊕ La morfología de *Serratia* sp. C8 resultó alterada al crecer en presencia de Cr (VI) duplicando su tamaño.

⊕ El crecimiento de *Serratia* sp. C8 disminuyó a medida que aumentó la concentración de Cr (VI), y en todos los casos fue menor que el crecimiento observado en la condición control. La eficiencia de remoción también disminuyó a medida que aumentaron las concentraciones de Cr (VI) tanto en medio mínimo como en medio rico de crecimiento.

⊕ El medio de cultivo influyó en la eficiencia de remoción, obteniéndose mejores resultados en los medios ricos de crecimiento.

⊕ La adición de glucosa como fuente de carbono extra incrementó la eficiencia de remoción en el medio TY y en el Medio I. Las demás fuentes de carbono ensayadas no mostraron diferencias de remoción entre sí ni respecto al control.

⊕ La variación de ciertos parámetros tales como concentración de glucosa, el pH, la concentración de inóculo y la temperatura causaron efectos positivos en la eficiencia de remoción alcanzada por el microorganismo, mientras que la adición de una fuente de nitrógeno extra produjo un efecto negativo sobre la remoción.

⊕ *Serratia* sp. C8 fue capaz de tolerar y remover Cr (VI) aún en presencia de fenol, tanto en medio rico como en medio mínimo.

## Conclusiones

- ⊕ El microorganismo creció en presencia de distintos efluentes industriales obtenidos de industrias químicas y de una curtiembre, mientras que su crecimiento se inhibió en presencia del efluente de una industria petroquímica.
- ⊕ *Serratia* sp. C8 fue capaz de remover Cr (VI) mediante bioadsorción. Además, la remoción se llevó a cabo por cromato reductasas intracelulares.
- ⊕ Alrededor del 50% del cromo incorporado se adsorbió y/o acumuló en la biomasa bacteriana, mientras que el porcentaje restante se encontró en el sobrenadante como Cr (VI) y Cr (III), lo cual pone de manifiesto la presencia de cromato reductasas.
- ⊕ El Cr (VI) alteró el perfil proteico de *Serratia* sp. C8, disminuyendo la cantidad de bandas a medida que la concentración de Cr (VI) aumentó.
- ⊕ Los resultados obtenidos indicarían que *Serratia* sp. C8 sería una potencial candidata para el biotratamiento de efluentes o ambientes contaminados con Cr (VI).

## **Bibliografía**

## 6. Bibliografía

**Abdulsalam S., Burgaje S., Adefila S., Ibrahim S.** (2011). Comparison of biostimulation and bioaugmentation for remediation of soil contaminated with spent motor oil. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 8(1): 187-194.

**Abskharon R. N. N., El-rab Gab S. M. F., Hassan S. H. A., Shoreit A. A. M.** (2009). Reduction of toxic hexavalent chromium by *E. coli*. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, 4(2): 98-103.

**Agarwal S. K.** (2005). Advanced environmental biotechnology. *Publishing by S. B. Nangia*. Chapter 4: Biorremediation, p.44-45.

**Agarwal S. K.** (2009). Heavy metal pollution. *Publish by N. G. Nangia, APH Publishing corporation*. Chapter 1: Introduction, p.3.

**Ajao A. T., Adebayo G. B., Yakubu S.** (2011). Bioremediation of textile industrial effluent using mixed culture of *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* immobilized on agar-agar in a Bioreactor. *Journal of Microbiology and Biotechnology Research*, 1(3): 50-56.

**Alisi C., Musella R., Tasso F., Ubaldi C., Manzo S., Cremisini C., Sprocati A. R.** (2009). Bioremediation of diesel oil in a co- contaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance. *Science of the Total Environment.*, 407: 3024-3032.

**Amestoy A. J.** (2010). El planeta tierra en peligro: Calentamiento global, cambio climático, soluciones. Editorial Club Universitario, p.219-222.

**Bagad A.** (2009). Environmental Science and Engineering, First edition. *Technical publications Pune*. Unit III- Environmental pollution, p.1-17.

**Barrera-Díaz C. E., Lugo-Lugo V., Bilyeu B.** (2012). A review of chemical, electrochemical and biological methods for aqueous Cr (VI) reduction. *Journal of Hazardous Materials*, 223-224: 1-12.

**Barrios San Martín, Y.** (2011). Biorremediación: una herramienta para el saneamiento de ecosistemas marinos contaminados con petróleo. *Biotecnología Aplicada*, 28: 60-68.

**Belay, A. A.** (2010). Impacts of chromium from tannery effluent and evaluation of alternative treatment options. *Journal of Environmental Protection*, 1: 53-58.

**Benazir J. F., Suganthi R., Rajvel D., Pooja M. P., Mathithumilan B.** (2010). Bioremediation of chromium in tannery effluent by microbial consortia. *African Journal of Biotechnology*, 9(21): 3140-3143.

**Bopp L. H., Ehrlich H. L.** (1988). Chromate resistance and reduction in *Pseudomonas fluorescens* strain LB 300. *Archives of Microbiology*, 150: 426-431.

**Bradford M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.

**Burriel Martí F., Arribas J. S., Lucena Conde F., Hernández Méndez J.** (2008). Química Analítica Cuantitativa; 18<sup>va</sup> edición; *Editorial Paraninfo*. Capítulo V “Reacciones de óxido-reducción”, p.175- 176.

**Cárdenas-González J. F., Acosta-Rodríguez I.** (2011). Remoción de cromo hexavalente por el hongo *Paecilomyces* sp. aislado del medio ambiente. *Información Tecnológica*, 22(1): 9-16.

**Castillo Rodríguez F., Roldán Ruiz M. D., Blasco Plá R., Huertas Romera M. J., Caballero Domínguez F. J., Moreno-Vivián C., Martínez Luque-Romero M.** (2005). Biotecnología Ambiental, *Editorial Tebar*. Capítulo 13: Biodegradación de compuestos naturales II, Glosario, p.424.

**Chaturvedi, M. K.** (2011). Studies on chromate removal by chromium-resistant *Bacillus* sp. isolated from tannery effluent. *Journal of Environmental Protection*, 2: 76-82.

**Chen Z., Huang Z., Cheng Y., Pan D., Pan X., Yu M., Pan Z.** (2012). Cr (VI) uptake mechanism of *Bacillus cereus*. *Chemosphere*, 87(3): 211-216.

**Clesceri L.S., Greenberg A.E., Eaton A.D.** (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater. *American Public Health Association*, p. 67.

**Covington A. D.** (2009). Tanning Chemistry: The Science of Leather. *Published by The Royal Society of Chemistry*, 2009. Chapter 10: Tanning p.195; Chapter: 11 Mineral Tanning: Chromium (III), p.204.

**Cubero E., Rodriguez A. I., Prieto E.** (2009). Niveles de cromo y alteraciones de salud en una población expuesta a las actividades de curtiembres en Bogotá Colombia. *Revista de Salud Pública*, 11(2): 278-289.

**Dey S., Paul A. K.** (2012). Optimization of cultural conditions for growth associated chromate reduction by *Arthrobacter* sp. SUK 1201 isolated from chromite mine overburden. *Journal of Hazardous Materials*, 213-214: 200-206.

**Diez Lázaro, J.** (2008). Fitocorrección de suelos contaminados con metales pesados: evaluación de plantas tolerantes y optimización del proceso mediante prácticas agronómicas. Tesis para optar por el título Doctor en Biología. Universidad de Santiago de Compostela, Departamento de Edafología y Química Agrícola. Santiago de Compostela, España. p.21.  
[http://dspace.usc.es/bitstream/10347/2540/1/9788498872026\\_content.pdf](http://dspace.usc.es/bitstream/10347/2540/1/9788498872026_content.pdf)

**Dwivedi S., Srivastava S., Mishra S., Kumar A., Tripathi R. D., Rai U. N., Dave R., Tripathi P., Charkrabarty D., Trivedi P. K.** (2010). Characterization of native microalgal strains for their chromium bioaccumulation potential: phytoplankton response in polluted habitats. *Journal of Hazardous Materials*, 173: 95-101.

**Eswaramoorthy S., Poulain S., Hienerwadel R., Bremond N., Sylvester M. D., Zhang Y-B., Berthomieu C., Van Der Lelie D., Matin A.** (2012). Crystal structure of ChrR-a quinone reductase with the capacity to reduce chromate. *PloS one*, 7(4): e36017.

**Farag S., Zaki S.** (2010). Identification of bacterial strains from tannery effluent and reduction of hexavalent chromium. *Journal of Environmental Biology*, 31(5): 877-882.

**Furini A.** (2012). Plants and heavy metals. *Springer editorial*. Preface, p(v).

**Ganguli A., Tripathi A. K.** (2002). Bioremediation of toxic chromium from electroplating effluent by chromate-reducing *Pseudomonas aeruginosa* A2Chr in two bioreactors. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(3): 416-420.

**Gangwar K. K. D.** (2010). Metals concentration in textile and tannery effluents, associated soils and ground water. *New York Science Journal*, 3: 82-89.

**Garza González M. T.** (2005). Aislamiento de microorganismos con alta capacidad de tolerar y remover Pb(II), Cr(VI), Cd(II), Cu(II), Zn(II) y Ni(II). Resumen de tesis para optar al grado científico de Doctor en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León, Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas. Monterrey, México. p.18.

**Grimont F., Grimont P. A. D.** (2007). Genus XXXIV. *Serratia*. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Volumen II: The proteobacteria, Parte B The Gammaproteobacteria.

**Brennen D. J., Krieg N. R., Staley J. T.** *Editorial Springer*, p799.

**Guha H., Jayachandran K., Maurrasse F.** (2001). Kinetics of chromium (VI) reduction by a type strain *Shewanella alga* under different growth conditions. [\*Environmental Pollution\*](#), 115: 209-218.

**He M., Li X., Guo L., Miller S. J., Rensing C., Wang G.** (2010). Characterization and genomic analysis of chromate resistant and reducing *Bacillus cereus* strain SJ1. *BMC Microbiology*, 10: 1-10.

**He M., Li, X., Liu, H., Miller S. J., Wang, G., Rensing C.** (2011). Characterization and genomic analysis of a highly chromate resistant and reducing bacterial strain *Lysinibacillus fusiformis* ZC1. *Journal of Hazardous Materials*, 185: 682-688.

<http://www.agro.faua.info/node/161>

**Agronomía Informa, Facultad de Agronomía de la UBA.** (2007). Para remediar al Matanza-Riachuelo.

<http://www.fundacionecosur.org.ar/doc/2CT.pdf>

**Fundación Ecosur.** (2008). 15 años de contaminación por cromo cáncer y muertes fallo favorable para los vecinos de Vicente López contra Diacrom S.A. Amparo Ecosur.

<http://www.greenpeace.org/argentina/es/campanas/contaminacion/riachuelo/Situacion-actual/>

**GREENPEACE.** (2010). Riachuelo, situación actual.

<http://www.nj.gov/health/eoh/rtkweb/documents/fs/0432sp.pdf>

**New Jersey Department of Health and Senior Services.** (2009). Programa derecho a saber, Hoja informativa sobre sustancias peligrosas.

[http://www.ose.com.uy/descargas/reclutamiento/norma\\_interna\\_de\\_calidad\\_agua\\_potable\\_de\\_OSE.pdf](http://www.ose.com.uy/descargas/reclutamiento/norma_interna_de_calidad_agua_potable_de_OSE.pdf)

**OSE Obras Sanitarias del Estado,** Uruguay. (2006). Norma Interna de Calidad del Agua Potable OSE.

<http://www.pagina12.com.ar/2001/01-05/01-05-04/pag19.htm>

**Página 12.** Abrupto aumento del cáncer en un área denunciada por contaminación: Las aguas bajan turbias en Las Toscas. (2001).

<http://www.unesco.org/new/es/natural-sciences/environment/water/wwap/facts-and-figures/all-facts-wwdr3/fact-36-industrial-wastewater/>

<http://www.unesco.org/new/es/natural-sciences/ioc-oceans/world-oceans-day/world-oceans-day-2012/>

### **UNESCO United National Educational, Scientific and Cultural Organization.**

- Programa Mundial de Evaluación de los Recursos Hídricos (WWAP), Hechos y Cifras, Hecho 36: aguas residuales industriales.
- Día Mundial de los Océanos.

**Ilias M., Rafiqullah I. M., Debnath B. C., Mannan K. S., Mozammel Hoq M.** (2011). Isolation and characterization of chromium (VI)-reducing bacteria from tannery effluents. *Indian Journal of Microbiology*, 51(1): 76-81.

**Ingole N. W., Dharpal S. V.** (2012). State of art of biosorption technique for treatment of heavy metals bearing wastes. *International Journal of Advanced Engineering Technology*, 3(2): 143-153.

**Jin H., Zhang Y., Buchko G. W., Varnum S. M., Robinson H., Squier T. C., Long P. E.** (2012). Structure determination and functional analysis of a chromate reductase from *Gluconacetobacter hansenii*. *PloS one*, 7(8): e42432.

**Karuppiah P., Rajaram S.** (2011). Exploring the potential of chromium reducing *Bacillus* sp. and there plant growth promoting activities. *Journal of Microbiology Research*, 1(1): 17-23.

**Kathiravan M. N., Karthick R., Muthukumar K.** (2011). *Ex situ* bioremediation of Cr (VI) contaminated soil by *Bacillus* sp.: Batch and continuous studies. *Chemical Engineering Journal*, 169: 107-115.

**Kavamura N. V., Esposito E.** (2010). Biotechnological strategies applied to the decontamination of soils polluted with heavy metals. *Biotechnology Advances*. 28: 61-69.

**Kiliç E., Puig R., Baquero G., Font J., Colak S., Gürler D.** (2011). Environmental optimization of chromium recovery from tannery sludge using a life cycle assessment approach. *Journal of Hazardous Materials*, 192(1): 393-401.

**Ko K-S., Lee P-K., Kong I. C.** (2012). Evaluation of the toxic effects of arsenite, chromate, cadmium, and copper using a battery of four bioassays. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 95(5): 1343-1350.

**Krishna R. K., Phillip L.** (2005). Bioremediation of Cr (VI) in contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*. B121: 109-117.

**Laemmli U.K.** (1970). [Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4](#). *Nature*, 227(5259): 680-685.

**Leung, M.** (2004). Bioremediation : Techniques for Cleaning up a mess. *Bio Teach Journal*, 2: 18-22.

**Ley 24051: Residuos Peligrosos**, Decreto 831/93, Anexo II, Tabla 9.

**Li K., Ramakrishna W.** (2011). Effect of multiple metal resistant bacteria from contaminated lake sediments on metal accumulation and plant growth. *Journal of Hazardous Materials*, 189: 531-539.

**Li X., Lin X., Li P., Liu W., Wang L., Ma F., Chukwuka K. S.** (2009). Biodegradation of the low concentration of poly- cyclic aromatic hydrocarbons in soil by microbial consortium during incubation. *Journal of Hazardous Materials*, 172: 601-605.

**Liu G., Yang H., Wang J., Jin R., Zhou J., Lv H.** (2010). Enhanced chromate reduction by resting *Escherichia coli* cells in the presence of quinone redox mediators. *Bioresource Technology*, 101(21): 8127-8131.

**Liu Y-G., Pan C., Xia W., Zeng G-M., Zhou M., Liu Y-Y., Ke J., Huang C.** (2008). Simultaneous removal of Cr (VI) and phenol in consortium culture of *Bacillus* sp. and *Pseudomonas putida* Migula (CCTCC AB92019). *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*, 18: 1014-1020.

**Liu Y-G., Xu W-H., Zeng G-M., Tang C-F., Li C-F.** (2004). Experimental study on Cr (VI) reduction by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Environmental Sciences*, 16: 797-801.

**Madigan T. M., Martinko M. J., Parker J.** (2004). Brock: Biología de los Microorganismos, 10<sup>ma</sup> edición. *Editorial Pearson Prentice Hall*. Capítulo 6: Crecimiento microbiano, p.158.

**Magan P., Ankita G., Maheshwari R.** (2012). Decontamination of polluted water employing bioremediation processes. *International Journal of Life Sciences Biotechnology and Pharma Research*, 1(3): 11-21.

**Martinez-Prado A., Perez-Lopez M. E., Pinto-Espinoza J., Gurrola-Nevarez B. A., Osorio-Rodriguez A. L.** (2011). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos empleando lodos residuales como fuente alternativa de nutrientes. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 27(3): 241-252.

**Martins M., Santos E. S., Faleiro M. L., Alegria A., Costa M. C.** (2008). Bioremediation studies of chromium (VI) using sulphate-reducing bacteria. *4<sup>th</sup> European Bioremediation Conference*, p.1-3.

**Martorell M. M., Fernández P. M., Fariña J. I., Figueroa L. I. C.** (2012). Cr (VI) reduction by cell-free extracts of *Pichia jadinii* and *Pichia anomala* isolated from textile-dye factory effluents. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 71: 80-85.

**Mary Mangaiyarkarasi M. S., Vincent S., Janarthanan S., Subba Rao T., Tata, B. V. R.** (2011). Bioreduction of Cr(VI) by alkaliphilic *Bacillus subtilis* and interaction of the membrane groups. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18(2): 157-167.

**Mishra S., Doble M.** (2008). Novel chromium tolerant microorganisms: isolation, characterization and their biosorption capacity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71(3): 874-879.

**Mishra R. R., Dhal B., Dutta S. K., Dangar T. K., Das N. N., Thatoi H. N.** (2012) Optimization and characterization of chromium(VI) reduction in saline condition by moderately halophilic *Vigribacillus* sp. isolated from mangrove soil of Bhitarkanita, India. *Journal of Hazardous Materials*, 227-228: 219-226.

**Mistry K., Desai C., Patel K.** (2010). Chromate Reduction by *Vogococcus* sp. Isolated from Cr (VI) Contaminated Industrial Effluent. *Electronic Journal of Biology*, 6(1): 6-12.

**Mohan D., Pittman C. U.** (2006). Activated carbons and low cost adsorbents for remediation of tri- and hexavalent chromium from water. *Journal of Hazardous Materials*, 137(2): 762-811.

**Mohee R., Mudhoo A.** (2012). Elements of sustainability and bioremediation. In: *Bioremediation and Sustainability: Research and Applications*, **Mohee R., Mudhoo A.** Scrivener, p. 10.

**Morais P. V., Branco R., Francisco R.** (2011). Chromium resistance strategies and toxicity: what makes *Ochrobactrum tritici* 5bvll a strain highly resistant. *Biometals*, 24(3): 401-410.

**Mugerfeld I., Law B.A., Wickham G.S., Thompson D.K.** (2009). A putative azoreductase gene is involved in the *Shewanella oneidensis* response to heavy metal stress. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 82: 1131-1141.

**Murugavelh S., Mohanty K.** (2012). Bioreduction of hexavalent chromium by free cells and cell free extracts of *Halomonas* sp. *Chemical Engineering Journal*, 203: 415-422.

**Mythilly K., Karthikeyan B.** (2011). Bioremediation of Chromium [Cr (VI)] in tannery effluent using *Bacillus* spp. and *Shapyloccus* spp. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 2: 1460-1463.

**Ng T. W., Cai Q., Wong C-K., Chow A. T., Wong P-K.** (2010). Simultaneous chromate reduction and azo dye decolourization by *Brevibacterium casei*: azo dye as electron donor for chromate reduction. *Journal of Hazardous Materials*, 182: 792-800.

**Oh Y-S., Choi S-C.** (1997). Reduction of hexavalent chromium by *Pseudomonas aeruginosa* HP014. *Journal of Microbiology*, 35: 25-29.

**Oliveira, H.** (2012). Chromium as an environmental pollutant: insights on induced plant toxicity. *Journal of Botany*, 2012: 1-8.

**Osredkar J., Sustar N.** (2011). Copper and zinc, biological role and significance of copper/zinc imbalance. *Clinical Toxicology*. 3: 1-18.

**Oves M., Khan M. S., Zaidi A., Ahmad E.** (2012). soil contamination, nutritive value, and human health risk assesment of heavy metals: an overview. In: *Toxicity of Heavy Metals to Legums and Biorremediation*. **Zaidi A., Wani A., Khan M. S.** Springer, p.12.

**Pajor F., Póti P., Bodnár Á., Bárdos L.** (2012). Accumulation of some heavy metals (Pd, Cd and Cr) in milk of grazing sheep in north-east Hungary. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, 2(1): 389-394.

**Peralta-Videa J. R., Lopez M. L., Narayan M., Saupe, G., Gardea-Torresdey J.** (2009). The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants: implications for the food chain. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 41: 1665-1677.

**Pei Q. H., Shahir S., Santhana Raj, A. S., Zakaria Z. A., Ahmad W. A.** (2009). Chromium (VI) resistance and removal by *Acinetobacter haemolyticus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(6): 1085-1093.

**Pinilla Ponz P.** (2010). Biorremediación de pendimentalina en ensayos de microcosmos controlados. *Conama 10 Congreso Internacional del medioambiente*, p.1-16.

**Polti M., Amoroso M. J., Abate C. M.** (2011). Intracellular chromium accumulation by *Streptomyces* sp. MC1. *Water, Air, & Soil Pollution*, 214: 49-57.

**Quintelas C., Fonseca B., Silva B., Figueiredo H., Tavares T.** (2009). Treatment of chromium (VI) solutions in a pilot-scale bioreactor through a biofilm of *Arthrobacter viscosus* supported on GAC. *Bioresource technology*, 100(1): 220-226.

**Rajendran R., Karthik Sundaram S., Sridevi B. V., Prabhavathi P., Gopi V.** (2012). Biotoxification of azo dye containing textile effluent through adapted fungal strains. *Journal of Environmental Science and Technology*, 5: 29-41.

**Ramírez-Díaz M. I., Díaz-Pérez C., Vargas E., Riveros-Rosas H., Campos-García J., Cervantes C.** (2008). Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals*, 21(3): 321-332.

**Ramirez-Díaz M. I, Díaz-Magaña A., Meza-Carmen V., Johnstone L., Cervantes C., Rensing C.** (2011). Nucleotide sequence of *Pseudomonas aeruginosa* conjugative plasmid pUM505 containing virulence and heavy-metal resistance genes. *Plasmid*, 66(1): 7-18.

**Romero C. H., Pellerano R. G., Acevedo H. A., Vázquez F. A.** (2006). Estandarización condiciones preliminares para la determinación de cromo en muestras ambientales. *Universidad Nacional del Nordeste, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2006*. Resumen: E-039.

**Sagar S., Dwivedi A., Yadav S., Tripathi M., Kaistha, S. D.** (2012). Hexavalent chromium reduction and plant growth promotion by *Staphylococcus arlettae* strain Cr11. *Chemosphere*, 86(8): 847-852.

**Saha B., Orvig C.** (2010). Biosorbents for hexavalent chromium elimination from industrial and municipal effluents. *Coordination Chemistry Reviews*, 254: 2959-2972.

**Saxena P., Misra N.** (2010). Remediation of heavy metal contaminated tropical land. In: *Soil Biology, Soil Heavy Metals*. **Sherameti I., Ajit V.** Springer-Verlag Berlin Heidelberg, p.442.

**Sen M., Ghosh Dastidar M.** (2010). Chromium removal using various biosorbents. *Iranian Journal of Environmental Health Science and Engineering*. 7(3): 182-190.

**Shi Y., Chai L., Yang Z., Jing Q., Chen R., Chen Y.** (2012). Identification and hexavalent chromium reduction characteristics of *Pannonibacter phragmitetus*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35(5): 843-850.

**Silva B., Figueiredo H., Neves I. C., Tavares T.** (2009). The role of pH on Cr (VI) reduction and removal by *Arthrobacter viscosus*. *International Journal of Chemical and Biological Engineering*, 2(2): 100-103.

**Smutok O., Broda D., Smutok H., Dmytruk K., Gonchar M.** (2011). Chromate-reducing activity of *Hansenula polymorpha* recombinant cells over-producing flavocytochrome b<sub>2</sub>. *Chemosphere*, 83(4): 449-454.

**Song H., Liu Y., Xu W., Zeng G., Aibibu N., Xu L., Chen B.** (2009). Simultaneous Cr (VI) reduction and phenol degradation in pure cultures of *Pseudomonas aeruginosa* CCTCC AB91095. *Bioresource Technology*, 100(21): 5079-5084.

**Srinath T., Verma T., Ramteke P. W., Garg S. K.** (2002). Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. *Chemosphere*, 48: 427-435.

**Srivastava S., Thakur I. S.** (2006). Isolation and process parameter optimization of *Aspergillus* sp. for removal of chromium from tannery effluent. *Bioresource Technology*, 97(10): 1167-1173.

**Srivastava S., Thakur I. S.** (2007). Evaluation of biosorption potency of *Acinetobacter* sp. for removal of hexavalent chromium from tannery effluent. *Biodegradation*, 18(5): 637-646.

**Tariq S. R., Shah M. H., Shaheen N., Khaliq A., Manzoor S., Jaffar M.** (2005). Multivariate analysis of selected metals in tannery effluents and related soil. *Journal of Hazardous Materials*, 122: 17-22.

**Tripathi M., Vikram S., Jain R. K., Garg, S. K.** (2011). Isolation and growth characteristics of chromium(VI) and pentachlorophenol tolerant bacterial isolate from treated tannery effluent for its possible use in simultaneous bioremediation. *Indian journal of microbiology*, 51(1): 61-69.

**Tortora G. J., Funke R. B., Case L. C.** (2007). Introducción a la Microbiología. 9<sup>na</sup> edición. *Editorial Médica Panamericana*, Capítulo 5: Metabolismo microbiano, p.146. Capítulo 8: Genética Microbiana, p.228-229.

**Vargas-García M. D. C., López M. J., Suárez-Estrella F., Moreno J.** (2012). Compost as a source of microbial isolates for the bioremediation of heavy metals: in vitro selection. *The Science of the Total Environment*, 431: 62-67.

**Vidali M.** (2001). Bioremediation: an overview. *Pure and Applied Chemistry*, 73: 1163-1172.

**Vijayaraghavan K., Yun Y-S.** (2008). Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology advances*, 26(3): 266-291.

**Volesky, B.,** (1999). Biosorption for the next century. In: *Biohydrometallurgy and the Environment toward the Mining of the 21st Century*. **Amils R., Ballester A.** Elsevier, Amsterdam, p.161-170.

**Volke Sepúlveda T., Velasco Trejo J. A.** (2002). Tecnologías de remediación para suelos contaminados. *Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT)*, p.31.

**Wang J., Chen C.** (2009). Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances*, 27(2): 195-226.

**Wang P-C., Mori T., Komori K., Sasatsu M., Toda K., Ohtake H.** (1989). Isolation and characterization of an *Enterobacter cloacae* strain that reduces hexavalent chromium under anaerobic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 55: 1665-1669.

**Wang S., Choi J. H.** (2013). Simulating fate and transport of chromium in saturated sediments. *Applied Mathematical Modelling*, 37: 102-111.

**WHO World Health Organization.** (2009). Inorganic chromium (III) compounds Volumen 76 de Concise International Chemical Assessment Document No 76 Series. *World Health Organization*. Chapter 4: Source of human and environmental exposure, p.10.

**Zahoor A., 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*, 21: 814-820.

**Zhang K., Li F.** (2011). Isolation and characterization of a chromium-resistant bacterium *Serratia* sp. Cr-10 from chromate-contaminated site. *Environmental Biotechnology*, 90: 1163-1169

## Anexo

Composición medio TY sólido.

<b>Medio TY (g/l)</b>	
Triptona	5
Extracto de Levadura	3
Cl <sub>2</sub> Ca	0,65
Agar	12-14

Composición medio mínimo MM9 sólido.

<b>Medio Mínimo 9 (MM9) (g/l)</b>	
CINa	2,5
NH <sub>4</sub> Cl	1
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	9
Agar	12-14

Composición medio rico I (Yun-guo y col., 2004).

<b>Medio I (g/l)</b>	
Peptona	5
Extracto de Levadura	3
NaCl	5
Glucosa	1

Composición Buffer fosfato salino.

<b>Buffer Fosfato Salino (PBS) pH: 7,4 (g/l)</b>	
NaCl	8,0
KCl	0,20
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,78
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,27

