

## USO DE *ESCHERICHIA COLI* PARA BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES CONTAMINADOS POR CROMO (VI)

### USE OF *ESCHERICHIA COLI* FOR BIOREMEDIATION OF CONTAMINATED WASTEWATER BY CHROMIUM (VI)

**María C. Panigatti<sup>1</sup>, Carina Griffa<sup>1</sup>, Rosana Boglione<sup>1</sup>, Fabiana Gentinetta<sup>1</sup>, David Cassina<sup>1</sup>**

(1) Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Rafaela, Bv. Roca 989, Rafaela, Santa Fe - Argentina  
(e-mail: maria.panigatti@frra.utn.edu.ar)

Recibido: 21/01/2011 - Evaluado: 06/04/2011 - Aceptado: 16/06/2011

#### RESUMEN

El objetivo del trabajo fue estudiar el uso de la *Escherichia coli* en la detoxificación de aguas residuales con Cr (VI) perteneciente a una planta metalmeccánica. Se evaluó el crecimiento y desarrollo de E. coli con distintas concentraciones de Cr (VI), en diferentes tiempos y condiciones de trabajo. Se estudió la biorreducción de cromo utilizando la cepa en estudio, en diferentes soportes y se evaluó la influencia de la presencia de metales tales como plomo, níquel y zinc. La bacteria fue capaz de reducir Cr(VI) trabajando con concentraciones de hasta 200 mg . L-1. Se comprobó la adaptabilidad de la cepa para adoptar como mecanismo de detoxificación, la biorreducción del metal pesado. La presencia de otros metales como plomo, níquel y zinc retrasa el proceso, pero no lo inhibe totalmente. Los resultados obtenidos demuestran la posibilidad de utilizar E. coli en la biorremediación de un efluente industrial conteniendo Cr(VI).

#### ABSTRACT

The aim of this work was to study the use of *Escherichia coli* in wastewater detoxifying Cr (VI) belonging to a metalworking plant. The growth and development of E. coli with different concentrations of Cr (VI), in different work times and conditions was evaluated. Bioreduction of chromium using the strain under study, in different media was studied and the influence of the presence of metals such as lead, nickel and zinc was evaluated. The bacterium was able to reduce Cr (VI) working with concentrations up to 200 mg. L-1. It was confirmed the adaptability of the strain to adopt as a mechanism of detoxification, the bioreduction of heavy metal. The presence of other metals such as lead, nickel and zinc slows the process, but it is not completely inhibited. The results demonstrate the possibility of using E. coli in the bioremediation of industrial effluent containing Cr (VI).

Palabras clave: biorremediación; cromo hexavalente; *Escherichia coli*; metales  
Keywords: bioremediation; hexavalent chromium; *Escherichia coli*; metals

## INTRODUCCIÓN

La contaminación causada por metales pesados en aguas superficiales ha sido siempre un problema muy grave, ya que estos elementos no son biodegradables y se acumulan en los tejidos vivos. El cromo es ampliamente utilizado en diversas aplicaciones industriales como la producción de acero, galvanoplastia, curtido de pieles, industrias textil, de conservación de la madera, de aluminio anodizado y refrigeración por agua (Garg *et al.*, 2007). El cromo existe en una amplia gama de estados de oxidación desde -2 a +6, siendo las especies dominantes en la naturaleza el hexavalente ( $\text{Cr}^{6+}$ ) y trivalente ( $\text{Cr}^{3+}$ ) (Fukai, 1967). El cromo hexavalente, por lo general presente como cromato ( $\text{CrO}_4^{2-}$ ) y dicromato ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ ), posee niveles de toxicidad más elevados comparado con otros estados de valencia (Horsfall *et al.*, 2006). Además de ser altamente perjudicial, es móvil y tiene un elevado período de residencia en las aguas superficiales y subterráneas, lo que supone un riesgo para la salud de los seres humanos y animales, afectando además el desarrollo y crecimiento de las plantas (Kleiman & Cogliatti, 1998; Chandra & Kulshreshtha, 2004; Shankers *et al.*, 2005). El Cr (III), en cambio es mucho menos nocivo y se puede separar precipitándolo como hidróxido.

Los tratamientos fisicoquímicos tradicionales de efluentes conteniendo metales consisten en el ajuste del pH, reducción química, seguida de coagulación y floculación. Hace un tiempo, se han comenzado a estudiar, como alternativa, una serie de métodos biológicos utilizando microorganismos. El uso de los mismos para tratar aguas residuales contaminadas con metales es un campo emergente, ya que en un principio se desarrollaron para remediar las aguas contaminadas con metales e hidrocarburos, pero actualmente se utilizan como alternativa de tratamiento. Éstos podrían reducir significativamente los costos de los productos químicos y el consumo de energía, en comparación con los procesos convencionales de tratamiento fisicoquímico.

Los dos procesos más importantes involucrados en el tratamiento biológico de metales, son la adsorción en microorganismos o plantas (bioadsorción) y la reducción de iones metálicos de un estado de valencia superior a una inferior (biorreducción), a través de reacciones enzimáticas o indirectamente con el metabolito producido (Lovley, 1993; Wang & Shen, 1995; Tobin & Roux, 1998; Lee *et al.*, 2000; Valls *et al.*, 2000). En el caso particular del cromo, la reducción de Cr (VI) a Cr (III) no sólo disminuye la toxicidad del elemento que actúa en los organismos vivos, sino también ayuda a precipitarlo a un pH cercano a la neutralidad (principalmente como  $\text{Cr}(\text{OH})_3$ ), lo que favorece una mayor eliminación física. Este tratamiento, es considerado actualmente como una alternativa económica y una herramienta biotecnológica para el tratamiento de aguas residuales (Yamamoto *et al.*, 1993; Shen & Wang, 1995; Ganguli & Tripathi, 2002; Thacker *et al.*, 2006; Abskharon *et al.*, 2010).

Muchos microorganismos son conocidos por ser capaces de concentrar especies de metales de soluciones acuosas diluidas y de acumularlas dentro de su estructura celular. Estos microorganismos incluyen levaduras, hongos, algas y bacterias (Tunali *et al.*, 2006; Kazy *et al.*, 2006; Quintelas *et al.*, 2006; Lameiras *et al.*, 2008). Los microorganismos pueden movilizar o inmovilizar metales, metaloides y compuestos organometálicos a partir de procesos de oxidación y reducción (Gadd & White, 1993; Ghariieb *et al.*, 1999; Lovley, 2000). Mientras que el Fe(III) y el Mn(VI) aumentan su solubilidad a partir de la reducción, otros metales como el Cr(VI) la disminuyen, dando lugar a la inmovilización (Phillips *et al.*, 1995; Smith & Gadd, 2000). Especies tales como *Acinetobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Bacillus coagulans*, *E. coli* ATCC 33456 y *Desulfomicrobium norvegicum* fueron estudiados bajo diferentes condiciones operativas, en el estudio de la reducción de Cr(VI), tanto en sistemas de suspensión como adheridos (Elangovan & Philip, 2009).

Los mecanismos fisiológicos involucrados en la reducción de cromo hexavalente varían ampliamente entre las diferentes especies. En algunos casos la reacción es catalizada por enzimas asociadas a la membrana celular, mientras que en otros las mismas se encuentran en la fracción soluble (Park *et al.*, 2000; Horitsu *et al.*, 1983).

En particular, la reducción biológica de Cr (VI) a Cr (III) permite considerar a los microorganismos como una herramienta biotecnológica para el tratamiento de las aguas residuales contaminadas con cromatos.

El objetivo del trabajo fue evaluar el uso de la bacteria *Escherichia coli* en la detoxificación de aguas residuales contaminadas con Cr (VI), perteneciente a una planta metalmeccánica, estudiando la influencia de diferentes variables (medios soporte, presencia de otros metales).

## MATERIALES Y MÉTODOS

En experiencias de laboratorio, realizadas anteriormente, se estudió el crecimiento de la bacteria *Escherichia coli* (aislada de un efluente de una empresa metalmeccánica mezclado con efluente cloacal), trabajando con reactores batch, tanto en estado libre (plantónico) como soportada sobre distintos medios, con y sin aireación. (Panigatti *et al.*, 2007; Panigatti *et al.*, 2008). Se comprobó que la bacteria *E. coli* puede crecer en presencia de Cr (VI) y reducirlo trabajando con concentraciones de hasta 50 mg.L<sup>-1</sup> Cr. Además se verificó que la velocidad de reducción del metal es mayor cuando las bacterias se encuentran en presencia de oxígeno y soportadas sobre un material inerte (arena o cerámica).

### Estudio de reducción de Cromo (VI) utilizando arena como soporte

En función de los resultados obtenidos anteriormente, se simuló el proceso de biorreducción en condiciones de laboratorio utilizando reactores batch discontinuos empleando arena como medio soporte y trabajando a mayores concentraciones que las estudiadas hasta el momento. Se trabajó con caldo nutritivo como alimento (fuente de carbono, nitrógeno y macronutrientes), arena al 5% (tamizada de manera de obtener un diámetro de partícula entre 150 y 300 µm), inóculo de la cepa *Escherichia coli* (concentración inicial: 10<sup>8</sup> UFC . ml<sup>-1</sup>). La experiencia se efectuó a temperatura ambiente (25 ± 3 °C) con agitación constante y aireación mecánica. Al cabo de un período de 24 horas y obtenida la biopelícula sobre el medio soporte, se suplementó con 20, 50, 100 y 200 mg . L<sup>-1</sup> de Cr (VI), a partir de una solución de dicromato de potasio concentrada. Se tomaron muestras a las 24, 48, 72 y 120 horas, las cuales fueron centrifugadas a 3.500 rpm durante 20 minutos. Al líquido sobrenadante se le determinó el contenido de Cr (VI), por duplicado, utilizando el método colorimétrico de la difenilcarbazida (APHA, 2001). También se midió el pH de la solución utilizando un pHmetro Hanna. Al finalizar el ensayo se determinó la presencia de Cr (VI) en la biomasa soportada. A su vez, se evaluó la presencia de *Escherichia coli* en agar EMB al inicio y al final de la experiencia para cada una de las condiciones de trabajo. En la experiencia no se pudo evaluar el crecimiento bacteriano a partir de la medición de densidad óptica (D.O.), ya que la arena produce turbidez enmascarando el resultado.

### Estudio de Reducción de Cromo (VI) utilizando como material soporte anillos Pall

Se estudió el uso de un material sintético (anillos Pall) como material soporte de microorganismos. El anillo Pall, es un cilindro con paredes ranuradas y costillas internas, donde el diámetro y la altura del anillo son iguales. Son fabricados en Polipropileno (PP) y en el mercado se encuentran de distintas medidas.

El uso de este material es relativamente nuevo en los sistemas de tratamientos de efluentes. La ventaja que presentan es su baja densidad y elevada superficie específica, por lo que estas características lo hacen interesante como material soporte de microorganismos.

Los anillos utilizados en la experiencia tienen las siguientes características: Medida 5/8", Área Superficial 340 m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup>, Espacio Libre 87 %, Peso Aprox. 145 Kg/m<sup>3</sup>

Se evaluó la eliminación de cromo hexavalente utilizando la bacteria en estudio, trabajando con reactores batch y empleando anillos Pall como medio soporte. Se adicionaron 300 ml de caldo nutritivo inoculado con 1 ml de la suspensión bacteriana en estudio, lográndose una concentración inicial de 10<sup>7</sup> UFC. ml<sup>-1</sup>. Se incubaron a temperatura ambiente (25 ± 3°C) con agitación y aireación constante.

Como en la experiencia anterior, utilizando arena, no se lograron buenos resultados a elevadas concentraciones, se trabajó con adición de cromo hexavalente obteniendo las siguientes diluciones: 10, 30 y 50 mg . L<sup>-1</sup> Cr. Éste

fue agregado a las 24 horas de comenzada la experiencia para permitir la formación de la biopelícula antes del agregado del metal. Se determinó el crecimiento bacteriano en solución a partir de Recuento Total en placa. A su vez se efectuó la medición de Cr (VI) colorimétricamente y pH a las 6, 24, 46, 72, 96, 120 y 144 horas.

#### Reducción de Cromo (VI) en presencia de metales

Los efluentes de industrias metalmeccánicas que realizan cromado de piezas también contienen otros metales en su composición. Se estudió la biorreducción de cromo hexavalente utilizando *E. coli* y se evaluó la influencia de la presencia de otros metales como níquel, plomo y zinc.

#### Plomo

Se prepararon erlenmeyers conteniendo caldo nutritivo, inoculados con suspensión bacteriana ( $10^{10}$  UFC.  $\text{ml}^{-1}$ ) y adicionados con una solución de dicromato de potasio de manera de obtener una concentración inicial de  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  Cr (VI). Se trabajó con concentraciones iniciales de plomo de 5, 8 y  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  a partir de una solución concentrada de acetato de plomo.

#### Níquel

En forma similar, se prepararon erlenmeyers conteniendo caldo nutritivo, suspensión bacteriana ( $10^{10}$  UFC.  $\text{ml}^{-1}$ ) y solución de dicromato de potasio con una concentración inicial de  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  Cr (VI). Se trabajó con concentraciones de níquel de 5, 8 y  $20 \text{ mg.L}^{-1}$ , agregando una solución de sulfato de níquel concentrada.

#### Zinc

Se prepararon distintos cultivos batch conteniendo caldo nutritivo, inoculados con *E. coli* ( $10^9$  UFC. $\text{ml}^{-1}$ ) y adicionados con una solución de Cr (VI) manera de obtener una concentración inicial de  $20 \text{ mg.L}^{-1}$  Cr. Se efectuaron agregados de zinc (como cloruro de zinc) trabajando con concentraciones iniciales de 5, 10 y  $15 \text{ mg.L}^{-1}$  de metal.

En todas las experiencias con metales, se trabajó con un blanco con adición de cromo y sin agregado de metal; las mismas se llevaron a cabo a temperatura ambiente y con aireación. Se evaluó el crecimiento bacteriano a través de la medición de densidad óptica (D.O.) a 590 nm, utilizando un Espectrofotómetro UV-Visible T60. Para plomo y níquel se muestreo a las: 2, 4, 20, 26, 34, 46 y 70 horas, mientras que para el zinc a las 6, 24, 46, 72, 96, 120 y 144 horas. Se evaluó la presencia de *Escherichia coli* en agar EMB a lo largo de la experiencia para cada una de las condiciones de trabajo. Se estudió la reducción de cromo (VI) tomando muestras en distintos intervalos de tiempos y efectuándose la determinación colorimétrica del mismo. Para plomo y níquel se muestreo a las: 2, 4, 20, 26, 34, 46, 70 y 96 horas, mientras que para el zinc a las 6, 24, 46, 72, 96, 120, 144 y 192 horas. Se realizó la determinación de los metales (plomo, níquel y zinc) al comienzo y al final de la experiencia para cada concentración de trabajo, la cual se llevó a cabo por Absorción Atómica por atomización por llama.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Estudio de reducción de Cromo (VI) utilizando arena como soporte

En la Figura 1 se presenta la evolución de la concentración de cromo hexavalente utilizando arena como medio soporte para la bacteria. Cabe aclarar que estos sistemas presentan crecimiento bacteriano tanto sobre un medio soporte como en estado libre. En esta experiencia, se lograron mayores remociones que trabajando con la bacteria sólo en estado planctónico. Para la menor concentración de trabajo ( $20 \text{ mg.L}^{-1}$ ) se logró una remoción del 95 % a las 48 horas, llegándose a la reducción total en la medición realizada a los 3 días. Con las

mayores concentraciones se observa una inhibición durante las primeras 24 horas, llegando a remociones del 92,6 %, 49,8 % y 30,0 % para 50, 100 y 200 mg . L<sup>-1</sup> respectivamente al cabo de 5 días.

Se han logrado mejores resultados que en las experiencias realizadas por Abskharon *et al.* (2010), quienes estudiaron la reducción de cromo en un rango de concentraciones de 1 a 10 ppm utilizando *E. coli*, durante 48 horas. Estos autores, obtienen disminuciones de 41 % con concentraciones iniciales de 10 ppm y hasta 55 % con concentraciones de 1 ppm, demostrando que la velocidad de reducción aumenta con la disminución de la concentración de cromo utilizada. Por otra parte Lin *et al.* (2011), estudiaron la adsorción y reducción de cromo hexavalente empleando granos de quitosano como medio soporte y *E. coli* 33456, trabajando con una concentración inicial de 5 mg .L<sup>-1</sup> Cr(VI) lograron una reducción del 85 % al cabo de 50 días.

El análisis de *Escherichia coli* sobre medio EMB dio escaso desarrollo al inicio de la experiencia, obteniéndose desarrollo típico de la bacteria al cabo de los 5 días para todas las condiciones de trabajo, pero con menor intensidad en el caso el empleo de 200 mg.L<sup>-1</sup>. El crecimiento se evidencia a partir del desarrollo de colonias negras con brillo metálico.

Al finalizar la experiencia, no se detectó la presencia de Cr(VI) al analizar la biomasa soportada sobre la arena, lo que podría descartar la disminución de la concentración de cromo hexavalente por bioadsorción.

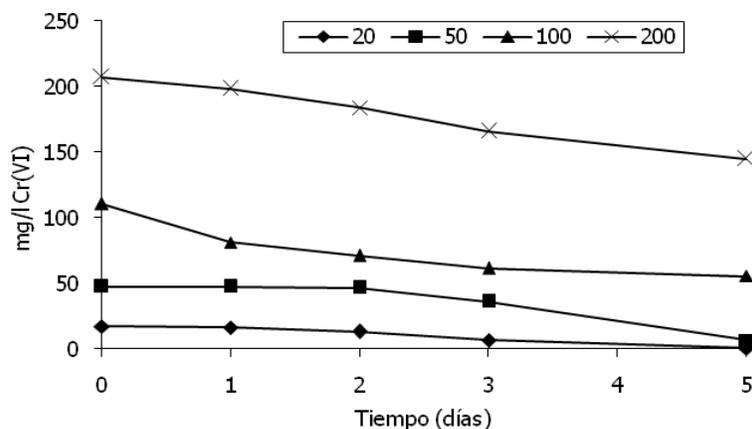


Fig. 1: Variación de la concentración de cromo (VI) trabajando con arena como medio soporte y diferentes agregados de cromo.

Al analizar la variación de pH durante el desarrollo de la experiencia, se observó un pequeño aumento del parámetro a lo largo de los días (Figura 2). Se comprobó esta variación para todas las concentraciones, excepto para 200 mg.L<sup>-1</sup>. En todos los casos, excepto la mayor concentración, se llegó hasta valores ligeramente alcalinos. *Escherichia coli* es lisina y ornitina decarboxilasa positiva, lo que implica que degrada dichos aminoácidos generando dióxido de carbono y aminas las que producen alcalinidad en el medio (Schegel, 1997). Lisina y ornitina se encuentran presentes en la peptona y extracto de carne del medio de cultivo utilizado. El aumento de pH observado sería consecuencia de la cantidad de compuestos básicos producidos durante el crecimiento de la bacteria.

Los valores de pH durante la experiencia estuvieron dentro del rango recomendado para el tratamiento biológico. A su vez, fue adecuado para lograr la remoción del cromo (III) formado, a través de la precipitación del mismo como hidróxido, debido a que este metal presenta menor solubilidad teórica (0,08 mg.L<sup>-1</sup>) a un pH de 7,5. La precipitación del cromo trivalente se debe considerar como un mecanismo de detoxificación.

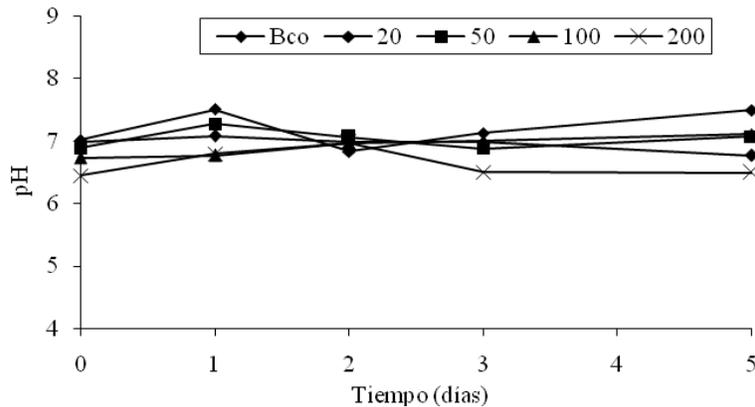


Fig. 2: Evolución del pH en experiencias con el agregado de diferentes concentraciones de cromo hexavalente y utilizando arena como medio soporte.

Estudio de Reducción de Cromo (VI) utilizando anillos Pall como soporte.

En el estudio de la remoción de cromo hexavalente utilizando un medio sintético como material soporte, se pudo observar que trabajando con  $10 \text{ mg.L}^{-1}$  de Cr se logró la reducción en 3 días (Figura 3). En cambio trabajando con 30 y  $50 \text{ mg.L}^{-1}$ , la disminución fue gradual y fue del 78% y 47 % respectivamente en 6 días.

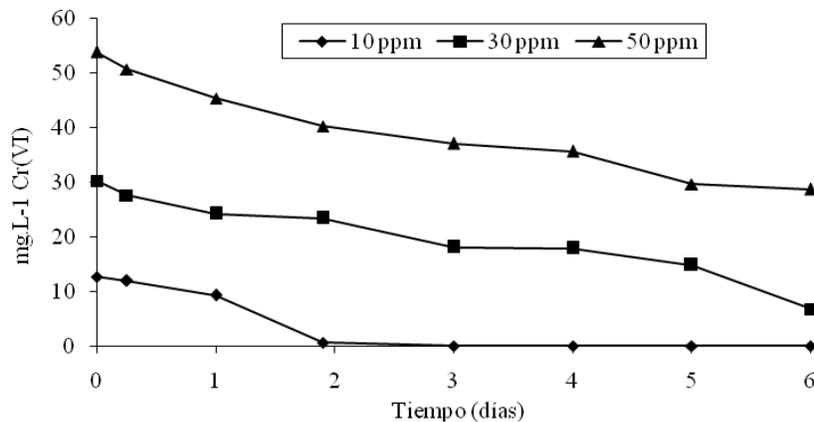


Fig. 3: Variación de la concentración de cromo hexavalente durante el transcurso de la experiencia utilizando anillos Pall como medio soporte de bacterias.

En cuanto a la medición de pH los resultados fueron similares a los obtenidos en el ensayo con arena, hubo un pequeño aumento durante el transcurso de la experiencia para todas las concentraciones, variando los valores desde aproximadamente 6,8 hasta 7,6.

Se midió el crecimiento del microorganismo en estudio (en estado libre) para todas las concentraciones de trabajo. Partiendo de  $10^7 \text{ UFC.ml}^{-1}$  se llegó a  $10^9 \text{ UFC.ml}^{-1}$  en todos los casos, al final de la experiencia. No hubo

diferencias significativas en el crecimiento teniendo en cuenta las distintas concentraciones de inicio. No se pudieron contabilizar las colonias adheridas al material soporte.

Los microorganismos inmovilizados se encuentran más protegidos a la acción tóxica del cromo (VI) a elevadas concentraciones, comparado con los que se encuentran en estado libre o planctónico. Trabajando a elevadas concentraciones se lograron mejores remociones que en las de experiencias previas sin material soporte.

Al comparar las experiencias utilizando los diferentes materiales soportes, se pudieron observar mejores rendimientos empleando arena, de acuerdo a las condiciones ensayadas. Se podrían mejorar las tasas de remoción aumentando la cantidad de anillos y en consecuencia elevando el número de colonias adheridas.

El beneficio de los soportes sintéticos es su bajo peso, elevada resistencia a diferentes compuestos y elevada superficie específica. Esto último permite aumentar el número de microorganismos presente en el sistema.

#### Reducción de Cromo (VI) en presencia de metales

Para determinar el efecto de otros metales, que pueden estar presentes en los efluentes de empresas metalmecánicas, se evaluó la influencia de plomo, níquel y zinc en la reducción de cromo hexavalente trabajando con *E. coli*.

Según se observa en las Figuras 4, 5 y 6, al analizar el crecimiento bacteriano a partir de la medición de D.O., durante las primeras horas no se evidencia crecimiento. La presencia de metales en el sistema pudo inhibir el desarrollo de la bacteria al inicio del tratamiento. Trabajando con agregado de níquel el crecimiento bacteriano es más rápido, en cambio con zinc el crecimiento se ve limitado. En todos los casos, el mayor crecimiento se evidencia en los sistemas sin agregado de metal y el más lento se observa en aquellos sistemas con agregado de mayor concentración de metal.

La detección de *Escherichia coli* sobre medio EMB dio escaso desarrollo al inicio de la experiencia, aumentando el desarrollo de la bacteria al finalizar la misma, para todas las condiciones de trabajo. El escaso desarrollo observado al inicio del ensayo, podría deberse a que la bacteria debe resistir y adaptarse a la presencia de dos metales en cada uno de los casos (cromo + otro metal). Esto coincide con los resultados obtenidos a partir de la medición de densidad óptica.

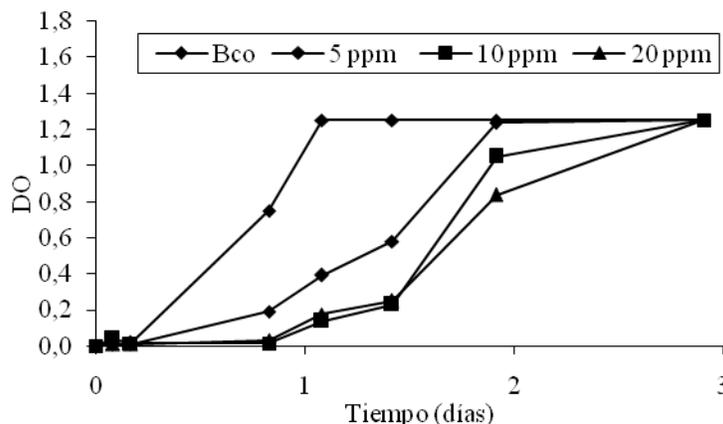


Fig. 4: Crecimiento de *E. coli* con presencia de  $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cr(VI)}$  y diferentes agregados de plomo.

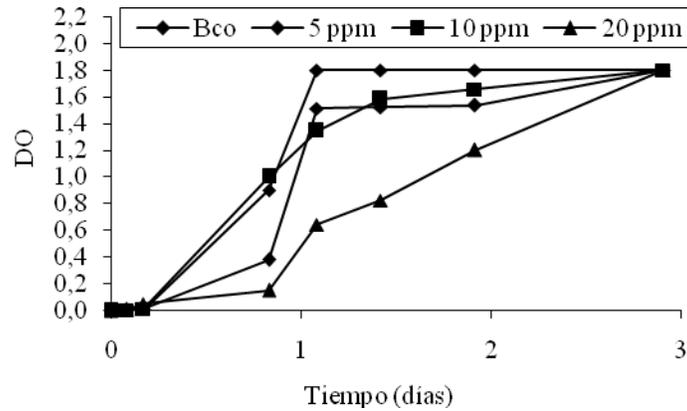


Fig. 5: Crecimiento de *E. coli* con presencia de 20 mg . L<sup>-1</sup> Cr(VI) y diferentes agregados de níquel.

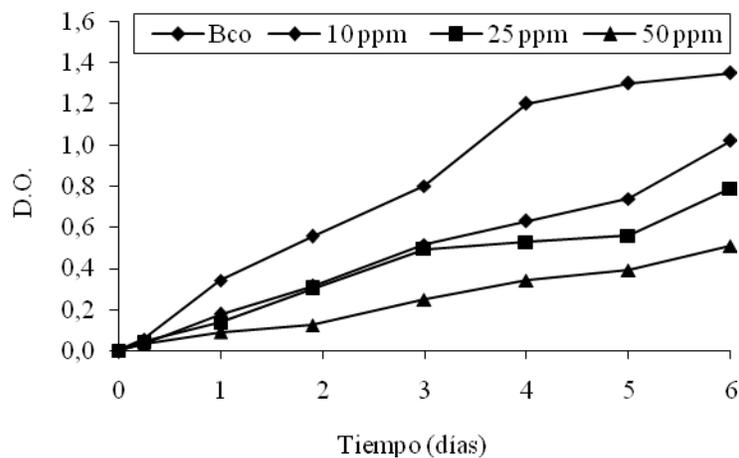


Fig. 6: Crecimiento de *E. coli* con presencia de 20 mg . L<sup>-1</sup> Cr(VI) y diferentes agregados de zinc.

En las Figuras 7, 8 y 9 se presentan los resultados de la reducción de cromo hexavalente en presencia de los diferentes metales estudiados. Se puede observar una inhibición durante las primeras horas de experiencia, que se correlaciona con el bajo crecimiento de la bacteria logrado en ese periodo. Si bien en presencia de plomo se midieron menores crecimientos de la bacteria en estudio, la eliminación de Cr (VI) se logra en tiempos menores en dichos sistemas, siendo de 3 días para las concentraciones de 5 y 20 mg.L<sup>-1</sup>. En el caso del níquel se logra la remoción total, para los tres agregados de cromo en 4 días.

Al analizar el caso del zinc, se observa cierta inhibición en la reducción de las concentraciones de cromo (VI) a lo largo de la experiencia, ya que en el único sistema donde se logró una eliminación total de Cr(VI) es en aquel sin agregado de zinc (Blanco) (Fig. 9). La presencia del metal influye en la remoción de cromo hexavalente, obteniéndose para el sistema con 5 y 10 mg.L<sup>-1</sup> de Zn, una disminución en las primeras 48 y 72 horas respectivamente, formando posteriormente una meseta. Trabajando a mayores concentraciones (15 mg.L<sup>-1</sup> de

Zn), no se origina una reducción significativa del Cr (VI). Todos los sistemas tienden a estabilizarse en el tiempo sin lograr una remoción efectiva.

La remediación biológica de efluentes conteniendo cromo se basa en el consumo de Cr(VI) como un electrón aceptor durante la respiración. En todas las experiencias el proceso de reducción de cromo (VI) estuvo acompañado del crecimiento de biomasa microbiana

Se puede destacar que en general las curvas de remoción de Cr(VI) presentan tres etapas. Durante las primeras horas no se observa una remoción significativa de cromo, coincidiendo con la fase de latencia del cultivo y adaptación a las condiciones del medio. En este período no se observa crecimiento medido a partir de la D.O. Luego, hay un descenso de la concentración de cromo que correspondería a la reducción biológica de cromo hexavalente por acción enzimática. Durante esta etapa es cuando se produce el mayor crecimiento bacteriano. Finalmente el desarrollo de los microorganismos se ve limitado ya sea por la disminución de alimento (fuente de N y C) o por la toxicidad de los metales, disminuye la velocidad de remoción del cromo.

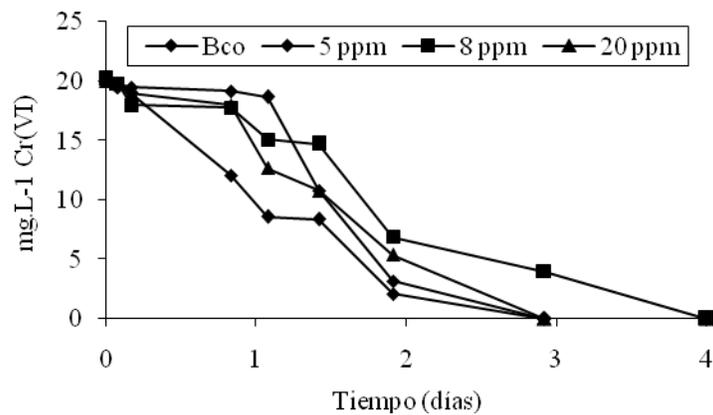


Fig. 7: Variación de la concentración de Cr(VI) en presencia de *E. coli* y diferentes agregados de Plomo.

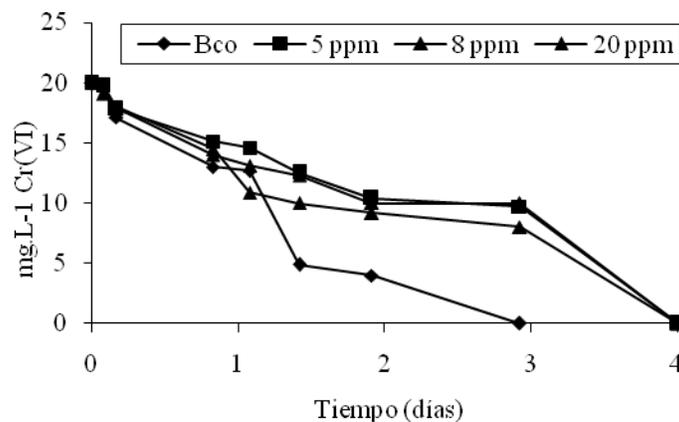


Fig. 8.: Variación de la concentración de Cr(VI) en presencia de *E. coli* y diferentes agregados de Níquel.

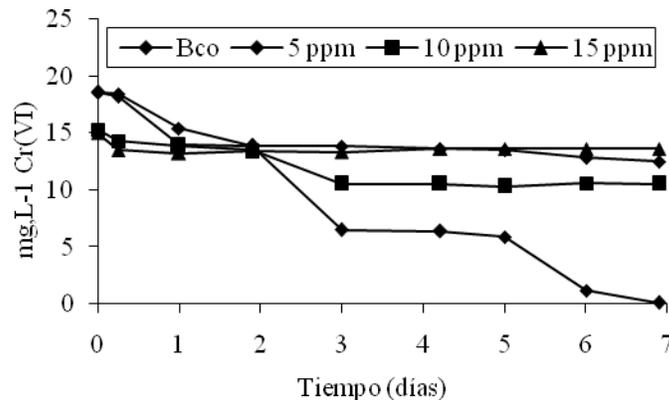


Fig. 9: Variación de la concentración de Cr(VI) en presencia de *E. coli* y diferentes agregados de zinc.

En las Figuras 10, 11 y 12 se presentan las concentraciones iniciales y finales de metales para las distintas condiciones de trabajo. Al analizar los sistemas con agregado de plomo, se observa disminución del metal, lográndose remociones del 65% para la concentración inicial de 5 mg.L<sup>-1</sup> y 10 % para 8 mg.L<sup>-1</sup>. En cambio para la mayor concentración se produjo solo un 1 % de eliminación. Estas remociones se podrían atribuir a procesos de bioadsorción o precipitación.

En el caso del agregado de níquel, no se presentó variación del mismo en el transcurso de la experiencia para ninguna de las concentraciones de trabajo. Se puede inferir que no hubo procesos de bioadsorción o precipitación que disminuyeran la concentración del metal en el líquido. La capacidad de sorción de los cationes níquel sobre biomasa bacteriana generalmente es baja, comparada con otros elementos de transición. Los valores reportados por diferentes autores son de pocos mg de Ni por gramo de peso seco de biomasa, trabajando con una concentración de níquel de 50 a 11 mg.L<sup>-1</sup> (Tzezos *et al.*, 1995; Kutsal, 1995; Scout *et al.*, 1995).

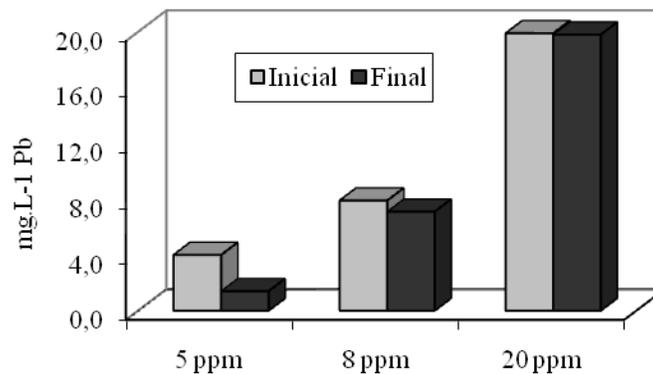


Fig. 10: Plomo al inicio y al final de la experiencia trabajando con distintas concentraciones iniciales del metal 5, 8 y 20 mg.L<sup>-1</sup> de Cr(VI).

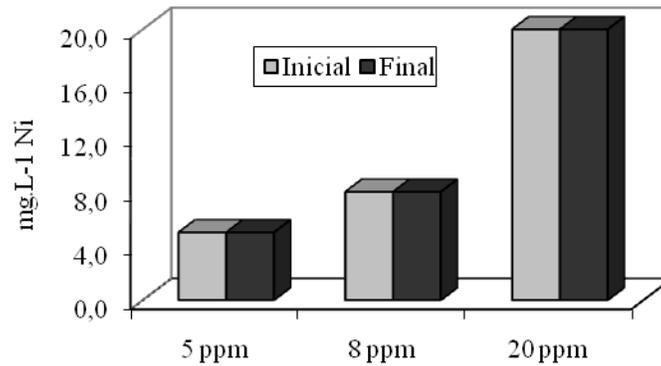


Fig. 11: Níquel al inicio y al final de la experiencia trabajando con distintas concentraciones iniciales del metal 5, 8 y 20 mg.L<sup>-1</sup> Cr(VI).

En la Figura 12 se puede observar la variación de la concentración de zinc a lo largo de la experiencia. En todos los casos hubo una disminución del metal pero en ningún caso se logró la eliminación. Las remociones logradas fueron del 18,0, 10,8 y 29,2 % para 5, 10 y 15 ppm respectivamente. Este hecho se podría atribuir a procesos de bioadsorción o precipitación.

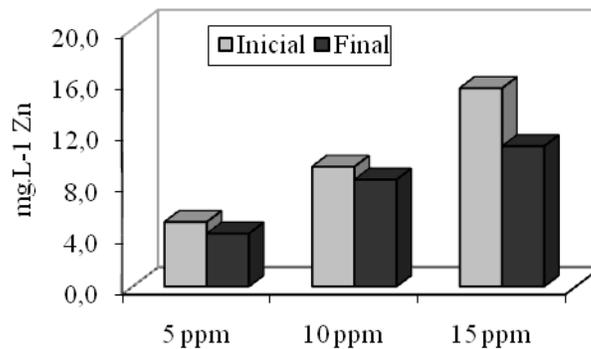


Fig. 12: Zinc al inicio y al final de la experiencia trabajando con distintas concentraciones iniciales del metal 5, 10 y 15 mg.L<sup>-1</sup> Cr(VI).

## CONCLUSIONES

Se corroboró la tolerancia de la bacteria *Escherichia coli* a diferentes concentraciones de cromo hexavalente y utilizando diferentes medios soportes (arena y material plástico). El crecimiento bacteriano está influenciado por la cantidad de metal presente, disminuyendo a medida que aumenta la concentración.

Se verificó la tolerancia de la bacteria *Escherichia coli* a concentraciones de cromo hexavalente de hasta 200 mg.L<sup>-1</sup>. Se comprobó la adaptabilidad de la cepa para adoptar como mecanismo de detoxificación, a la biorreducción del metal pesado.

Se lograron buenos rendimientos de reducción de cromo hexavalente, trabajando con material soporte, lo que se atribuye a un aumento de la concentración de bacterias debido a la elevada superficie específica que presentan. Se corroboró la ausencia de mecanismos de adsorción sobre los soportes.

Se determinó que la presencia de otros metales como plomo, níquel y zinc retrasa el proceso de reducción de cromo hexavalente, pero no lo inhibe totalmente.

Los mecanismos que se suponen actuaron en esta investigación fueron la biorreducción y la precipitación química de Cr(III) provocada por los pHs de trabajo

Los resultados obtenidos demuestran la aplicación potencial de la remoción de cromo hexavalente de efluentes industriales utilizando la bacteria *Escherichia coli*. Las experiencias realizadas a escala laboratorio permitirán el ajuste de variables para futuras experiencias a escala piloto.

## REFERENCIAS

1. Abskharon, R.N.N., Gab El-Rab, S.M.F., Hassan S.H.A. & Shoreit A.A.M. (2010). Reduction of toxic hexavalent chromium by *E. coli*. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*: 5(2), 129-135.
2. APHA (2001). "Standard Methods for Examination of Water and Wastewater". 20<sup>th</sup> Edition. American Public Health Assoc., New York.
3. Chandra, P. & Kulshreshtha, K. (2004). Chromium accumulation and toxicity in aquatic vascular plants. *Botan. Rev.*: 70(3), 313-327.
4. Elangovan, R. & Philip, L. (2009). Performance evaluation of various bioreactors for the removal of Cr(VI) and organic matter from industrial effluent. *Biochem. Eng. J.*: 44, 174-186.
5. Fukai, R. (1967). Valency state of chromium in seawater. *Nature* (London): 213, 901.
6. Gadd, G.M. & White, C. (1993). Microbial treatment of metal pollution: a working biotechnology. *Trends in Biotechnology*: 11, 353-392.
7. Ganguli, A. & Tripathi, A.K. (2002). Bioremediation of toxic chromium from electroplating effluent by chromate-reducing *Pseudomonas aeruginosa* A2Chr in two bioreactors. *Applied Microbiology & Biotechnology*: 58, 416-420.
8. Garg, U.K., Kaur, M.P., Garg, V.K. & Sud, D. (2007). Removal of hexavalent chromium from aqueous solution by agricultural waste biomass. *J. Hazard. Mater.*: 140, 60-68.
9. Gharieb, M.M., Kierans, M. & Gadd, G.M. (1999). Transformation and tolerance of tellurite by filamentous fungi: accumulation, reduction and volatilization. *Mycol. Res.*: 103, 299-305
10. Horitsu, H., Futo, S., Miyazawa, Y., Ogai, S. & Hawaii, K. (1983). Enzymatic reduction of hexavalent chromium by hexavalent chromium tolerant *Pseudomonas ambigua* G-1. *Agric. Bio. Chem.*: 51, 2417-20.
11. Horsfall Jr. M., Ogban, F. & Akporhonor, E.E. (2006). Sorption of chromium (VI) from aqueous solution by cassava (*Manihot sculenta* CRANZ) waste biomass. *Chem. Biodivers.*: 3, 161-173.
12. Kazy, S., Das, S.K. & Sar, P. (2006). Lanthanum biosorption by a *Pseudomonas sp.*: equilibrium studies and chemical characterization. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*: 33, 773-783.

13. Kleiman, I.D. & Cogliatti, D.H. (1998). Chromium removal from aqueous solutions by different plant species. *Environ. Technol.*: 19, 1127-1132.
14. Kutsal, Y.S.T. (1995). Biosorption of heavy metals by *Zoogloea ramigera*: use of adsorption isotherms and a comparison of biosorption characteristics. *Chem. Eng. J.*: 60, 181-188.
15. Lameiras, S., Quintelas, C. & Tavares, M.T. (2008). Biosorption of Cr (VI) using a bacterial biofilm supported on granular activated carbon and on zeolite. *Bioresour. Technol.*: 99, 801-806.
16. Lee, D.-C., Park, C.-J., Yang, J.-E., Jeong, Y.-H. & Rhee H.-I. (2000). Screening of hexavalent chromium biosorbent from marine algae. *Applied Microbiology & Biotechnology*: 54, 445-448.
17. Lin, Y.H., Wu, C.L., Li, H.L. & Hsu, C.H. (2011). Verification of model for adsorption and reduction of chromium (VI) by *Escherichia coli* 33456 using bead as supporting medium. *Appl. Mathematical Modeling*: 35, 2736-2751.
18. Lovley, D.R. (2000). Fe(III) and Mn(IV) reduction. In Environmental Microbe–Metal Interactions. Edited by D. R. Lovley. Washington, DC: American Society for Microbiology, pp. 3-30.
19. Lovley, D.R. (1993). Dissimilatory metal reduction. *Annual Review of Microbiology*: 47, 263-290.
20. Panigatti, M.C., Torres, J.M., Griffa, C., Boglione, R. & Gentinetta, F. (2007). Biorremediación de Efluentes conteniendo Cromo (VI) provenientes de plantas metalmecánica. *Ingeniería Sanitaria y Ambiental*: 92, 72-79.
21. Panigatti, M.C., Griffa, C., Boglione, R., Torres, J.M. & Gentinetta F. (2008). Uso de *Escherichia coli* para biorremediación de efluentes conteniendo Cromo (VI). Libro de Actas del II Congreso Internacional sobre Gestión y Tratamiento Integral del Agua, pp. 347-355.
22. Park, C.H., Keyhan, M., Wielingo, B., Fendorf, S. & Martin, A. (2000). Purification to homogeneity and characterization of a novel *Pseudomonas putidachromate* reductase. *App. Environ. Microbiol.*: 66, 1788-95.
23. Phillips, E.J.P., Landa, E.R. & Lovley, D.R. (1995). Remediation of uranium contaminated soils with bicarbonate extraction and microbial U(VI) reduction. *J. Ind. Microbiol.*: 14, 203-207
24. Quintelas, C., Sousa, E., Silva, F., Neto, S. & Tavares, T. (2006). Competitive biosorption of ortho-cresol, phenol, chlorophenol and chromium (VI) from aqueous solution by a bacterial biofilm supported on granular activated carbon. *Process Biochem.*: 41, 2087-2091.
25. Scout, J.A., Karanjkar, A.M. & Rowe, D.L. (1995). Biofilm covered granular activated carbon for decontamination of streams containing heavy metals and organic chemicals. *Miner. Eng.*: 8, 221-230.
26. Shankers, A.K., Cervantes, C., Losa-Tavera, H. & Avdainayagam, S. (2005). Chromium toxicity in plants. *Environ. Int.*: 31(5), 739-753.
27. Schegel, H.G. (1997). Microbiología General. Editorial Omega. Barcelona, España, 654p.
28. Shen, H. & Wang, Y.-T. (1995). Simultaneous chromium reduction and phenol degradation in a coculture of *Escherichia coli* ATCC 33456 and *Pseudomonas putida* DMP-1. *Applied and Environmental Microbiology*: 61, 2754-2758.
29. Smith, W.L. & Gadd, G.M. (2000). Reduction and precipitation of chromate by mixed culture sulphate-reducing bacterial biofilms. *Journal of Applied Microbiology*: 88(6), 983-991.

30. Thacker, U., Parikh, R., Shouche, Y. & Madamwar, D. (2006). Hexavalent chromium reduction by *Providencia sp.* *Process Biochem.*: 41, 1332-1337.
31. Tobin, J.M. & Roux, J.C. (1998). Mucor biosorbent for chromium removal from tanning effluent. *Water Research*: 32, 1407-1416.
32. Tunali, S., Çabuk, A. & Akar, T. (2006). Removal of lead and copper ions from aqueous solutions by bacterial strain isolated from soil. *Chem. Eng. J.*: 115, 203-211.
33. Tzezos, M., Remoudaki, E. & Angelatou, V. (1995). A systematic study on equilibrium and kinetics of biosorptive accumulation: the case of Ag and Ni. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*: 35(1-3), 129-153.
34. Valls, M., Atrian, S., de Lorenzo, V. & Fernandez, L.A. (2000). Engineering a mouse metallothionein on the cell surface of *Ralstonia eutropha* CH34 for immobilization of heavy metals in soil. *Nature Biotechnology*: 18, 661-665.
35. Wang, Y.-T. & Shen, H. (1995). Bacterial reduction of hexavalent chromium. *Journal of Industrial Microbiology*: 14, 159-163.
36. Yamamoto, K., Kato, J., Yano, T. & Ohtake, H. (1993). Kinetics and modeling of hexavalent chromium reduction in *Enterobacter cloacae*. *Biotechnology and Bioengineering*: 41, 129-133.