

REMOCIÓN DE CROMO HEXAVALENTE DE AGUAS RESIDUALES CON MICROORGANISMOS ADAPTADOS A MEDIOS RICOS EN CROMO

REMOVAL OF HEXAVALENT CHROMIUM FROM WASTEWATER USING MICROORGANISMS ADAPTED TO CHROMIUM-RICH MEDIA

Eliana Marcela Soto Rueda¹, Patricia Landazuri², Nelsy Loango^{3*}.

1. Programa de Química, Facultad de Ciencias Básicas y Tecnologías. Universidad del Quindío. Armenia-Quindío, Colombia.
2. Programa de medicina, Facultad Ciencias de la Salud, Universidad del Quindío. Armenia-Quindío, Colombia.
3. Programa de Biología, Facultad de Ciencias Básicas y Tecnologías. Universidad del Quindío. Armenia-Quindío, Colombia.

Recibido: Agosto 1 de 2017

Aceptado: Octubre 2 de 2017

*Correspondencia del autor: Nelsy Loango. Universidad del Quindío.
Armenia-Quindío, Colombia, E-mail: neloango@uniquindio.edu.co

RESUMEN

Introducción: Los problemas de contaminación de acuíferos a nivel mundial son motivo de preocupación y requieren métodos eficaces de remediación que permitan minimizar el impacto ambiental generado por vertimientos industriales y domésticos. **Objetivo:** En el presente estudio se determinó la capacidad de remoción de Cr^{6+} en bacterias y levaduras adaptadas a concentraciones altas de este metal. **Métodos:** Los ensayos de remoción se llevaron a cabo en medio de cultivo BHI y en agua residual (AR) a los cuales se les adicionó dicromato de potasio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). **Resultados:** Las bacterias y levaduras aisladas y adaptadas a Cr^{6+} demostraron ser reductoras de este metal. Los aislados bacterianos *Raoultella* sp, *Serratia* sp y *Klebsiella* sp presentaron mayor reducción de Cr^{6+} en AR alcanzando el 100% de reducción de cromo en 30 horas, estos tres aislados se destacaron por su capacidad de reducir Cr^{6+} tanto en medio de cultivo como en agua residual en todas las concentraciones de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ evaluadas. Los aislados levaduriformes *Candida Tropicalis*, *Candida Famata* y *Cryptococcus neoformans* no presentaron diferencias significativas con el control en el ensayo de reducción del metal en AR con diferentes concentraciones de Cr^{6+} . **Conclusiones:** La capacidad de reducción del Cr^{6+} , así como el crecimiento bacteriano en condiciones altas de este metal, permiten proponer a *Klebsiella* sp, *Raoultella* sp, y *Serratia* sp como microorganismos promisorio para la bioremediación de sitios contaminados con Cr^{6+} a escala real.

Palabras claves: Agua residual, microorganismos, metales pesados, cromo hexavalente.

ABSTRACT

Introduction: Global aquifer contamination problems are a cause for concern and require effective remediation methods to minimize the environmental impact generated by industrial and domestic dumping. **Objective:** In the present study, the ability to remove Cr^{6+} from bacteria and yeasts adapted to high concentrations of this metal was determined. **Methods:** Removal tests were carried out in BHI culture medium and in residual water to which potassium dichromate ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) was added. **Results:** Bacteria and yeasts isolated and adapted to Cr^{6+} were shown to be reductive of this metal. The bacterial isolates *Raoultella* sp, *Serratia* sp and *Klebsiella* sp presented higher reduction of Cr^{6+} in residual water (AR) reaching 100% reduction of chromium in 30 hours, these three isolates were highlighted by their ability to reduce Cr^{6+} in both culture medium As in residual water at all concentrations of $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ evaluated. The yeast isolates *Candida Tropicalis*, *Candida Famata* and *Cryptococcus neoformans* did not present significant differences with the control in the reduction test of the metal in RA with different concentrations of Cr^{6+} . **Conclusions:** The ability of Cr^{6+} reduction, as well as the bacterial growth in high conditions of this metal, allow to propose *Klebsiella* sp, *Raoultella* sp, and *Serratia* sp as promising microorganisms for the bioremediation of sites contaminated with Cr^{6+} in real scale.

Keywords: Waste water, microorganisms, heavy metals, hexavalent chromium

INTRODUCCIÓN

El cromo es uno de los metales tóxicos más abundantes de la tierra que causa la contaminación de las aguas superficiales y subterráneas debido a su frecuente aplicación industrial, como en la galvanoplastia, la fabricación de acero y automóviles, la minería, el curtido de cuero, el procesamiento de metales como el cromado, la producción de pigmentos para pintura y los tintes.

El cromo generalmente se encuentra en dos estados de oxidación estables, el trivalente (Cr^{3+}) y hexavalente (Cr^{6+}) (1). La forma hexavalente es bien conocida por ser mutagénico, carcinogénico y tóxico, a diferencia del Cromo trivalente que es menos reactivo y tóxico, es casi insoluble y puede precipitarse fácilmente en solución.

El Cr^{6+} es un contaminante peligroso, ya que se propaga fácilmente a través de los sistemas acuáticos superficiales y las aguas subterráneas, debido a su alta solubilidad en agua (2, 3).

Por lo tanto, para reducir o eliminar Cr^{6+} , de residuos sólidos y líquidos, se han desarrollado diversos métodos físicos y químicos tales como reducción y precipitación química, adsorción, intercambio iónico, osmosis inversa, electrodiálisis, entre otros (3, 4). La mayoría de estos tratamientos tienen un alto costo y algunos tienen

desventajas como la remoción incompleta de metales, alto consumo de reactivos, alto requerimiento energético y la generación de residuos secundarios (5). Varios estudios han reportado la capacidad de algunos microorganismos para interactuar con diferentes formas de Cromo, lo cual los hace muy atractivos en el campo de la biotecnología ambiental, enfocados a la detoxificación de aguas residuales (6 - 10).

La búsqueda de microorganismos con potencial para remover contaminantes como los metales pesados es muy importante para desarrollar métodos biológicos eficaces para el tratamiento de aguas residuales. Este estudio describe la capacidad de remoción de Cr^{6+} por bacterias y levaduras aisladas de agua residual de curtiembre.

METODOLOGÍA

Remoción de Cr^{6+} por tratamiento con microorganismos adaptados

Los ensayos de remoción se trabajaron con aislados bacterianos que fueron clasificados con los siguientes números, 4, 5, 6, 10 y 11 e identificados respectivamente como, *Raoultella* sp, *Enterobacter* sp, *Klebsiella* sp, *Serratia* sp y *Klebsiella* sp, también se evaluaron tres levaduras numeradas como 1, 2 y 3 e identificadas como *Candida Tropicalis*, *Candida Famata* y *Cryptococcus neoformans* respectivamente. Los ensayos de remoción

se llevaron a cabo en medio de cultivo BHI y en AR.

Remoción de Cr⁶⁺ en medio de cultivo BHI

El análisis de remoción de Cr⁶⁺ en medio de cultivo BHI se realizó adicionando K₂Cr₂O₇ en las siguientes concentraciones: 100, 200, 300, 400 y 500 ppm de Cr⁶⁺. Para determinar la capacidad de remoción de Cr⁶⁺ por los microorganismos adaptados, se inocularon 15 mL de medio con Cr⁶⁺ con 10 µL de una concentración microbiana conocida, posteriormente se tomaron muestras en diferentes tiempos para observar el proceso de remoción de cromo.

Los medios sin Cr⁶⁺ pero inoculados con bacterias, y los medios no inoculados que contenían Cr⁶⁺ sirvieron como controles. Todos los cultivos incluyendo los controles se llevaron a cabo por duplicado, la temperatura de incubación fue de 37°C.

Remoción de Cr⁶⁺ en agua residual

La capacidad de remoción de cromo en agua residual con los microorganismos adaptados, se llevó a cabo en dos tipos de agua residual, en agua residual tratada (ART) a una temperatura de 122 °C y con una presión de 20 libras/pulgadas² y en agua residual sin tratar (AR). Con el fin de comparar la remoción de Cr⁶⁺ en AR la cual contiene su carga microbiana normal y el ART a la cual se le eliminó la carga microbiana.

Se utilizaron Erlenmeyers de 250 mL, con 45 mL de agua residual (AR o ART), 5 ml de inóculo bacteriano (tomado a partir de un cultivo de 8 horas, con una concentración de 7,0 x10⁸ UFC/mL). Se adicionó a las muestras de agua residual (AR y ART) dicromato de potasio (K₂Cr₂O₇) hasta tener una concentraciones aproximada de 200 a 400 ppm y 2 g*L⁻¹ de sacarosa, las muestras fueron incubadas a 35 °C en agitación constante de 150 rpm durante 30 h.

Determinación de cromo hexavalente

Para determinar la presencia de Cr⁶⁺ en las muestras tratadas con los microorganismos adaptados a cromo se llevó a cabo el método descrito por Severiche-Sierra en 2013 con algunas modificaciones. Se tomó cada hora 1 mL de muestra y se centrifugó, el sobrenadante se analizó para Cr⁶⁺. Las muestras se acidificaron hasta tener pH de 2, con ácido sulfúrico al 50%. La presencia de Cr⁶⁺ se evidenció por la formación de un complejo coloreado al añadir 200 µL de difenilcarbazida, esta mezcla se agitó y dejó reposar 5 minutos para desarrollar color. La lectura en el espectrofotómetro fue a una longitud de

onda de 540 nm. La concentración de Cr⁶⁺ en las muestras se calculó con la ecuación obtenida por medio de la curva de calibración realizada con el estándar de Cr⁶⁺ (K₂Cr₂O₇).

Se determinó la velocidad de remoción de Cr⁶⁺ en el tratamiento con microorganismos y la constata de velocidad haciendo uso de las siguientes de ecuaciones:

$$\text{Velocidad de remoción de Cr}^{6+}: V = \frac{(X_f - X_o)}{t}$$

$$\text{Constante de Velocidad (K): } -Kt = Ln \frac{X_f}{X_o}$$

Dónde: X_o= concentración inicial de Cr⁶⁺ (ppm); X_f= concentración final de Cr⁶⁺ (ppm); t= tiempo de tratamiento biológico (hora)

Determinación de cromo total por espectrometría de absorción atómica

El análisis de cromo total se desarrolló siguiendo el protocolo estandarizado por el laboratorio de análisis instrumental de la Universidad del Quindío para la medición de este metal por espectrofotometría de absorción atómica (A.A).

Descripción del Protocolo: Preparación de estándares para la curva de calibración:

Estándares de calibración: Las curvas se realizaron con tres estándares de alta, media y baja concentración hasta cubrir el rango de linealidad de acuerdo a lo establecido en el manual del Espectrofotómetro Perkin Elmer, de la siguiente manera:

Estándares para la curva de calibración de Cromo Total de 1, 2 y 4 mg/L. El estándar de ajuste de sensibilidad es de 4 mg/L. Los estándares se prepararon a partir de una solución concentrada de 100 mg/L con agua acidulada. Después de tener la curva de calibración se procedió a la medición de las muestras.

Preparación de la muestra problema: Las muestras con material orgánico como las de agua residual, requieren una digestión ácida para obtener los iones libres de cromo. La digestión se realizó con ácido nítrico (HNO₃) concentrado al 65% y se calentó suavemente por media hora, este proceso se desarrolló en cabina de extracción de gases.

RESULTADOS

Remoción de Cr⁶⁺ en medio de cultivo BHI

En la presente investigación, se determinó la capacidad de remoción de cromo VI en cinco bacterias y tres levaduras aisladas de agua residual de curtiembre, estos microorganismos fueron previamente adaptados a diferentes concentraciones de K₂Cr₂O₇ en medio de cultivo BHI.

En la tabla 1 se muestra el proceso de remoción de cada aislado bacteriano y levaduriforme. Donde se puede observar que el proceso de remoción de Cr⁶⁺, es una reducción del estado de oxidación de Cr⁶⁺ a Cr³⁺. En la tabla 1 se muestran los datos del cromo total, Cr⁶⁺ y Cr³⁺ en el sobrenadante, después de un cultivo de 24 horas. Como control se utilizó medio de cultivo con una concentración inicial de trabajo que fue 129,89 ppm de Cr⁶⁺.

Tabla 1. Cromo total, Cr⁶⁺ y Cr³⁺ en medio de cultivo con aislados bacterianos y de levaduras en 24 horas de cultivo.

Muestra Bacterias	cromo total (ppm)	Cr ⁶⁺ (ppm)	Cr ³⁺ (ppm)
control	129,86	123,51	6,35
Aislado 4	111,82	13,67	98,15
Aislado 5	116,96	18,79	98,17
Aislado 6	125,73	23,92	101,81
Aislado 10	106,59	10,25	96,34
Aislado 11	124,92	6,83	118,09
Muestra Levaduras			
control	135,33	130,53	4,8
Aislado 1	100,84	33,40	67,44
Aislado 2	111,46	28,39	83,07
Aislado 3	100,23	30,90	69,33

Los aislados 11, 10 y 4 (*Klebsiella* sp, *Serratia* sp y *Raoultella* sp) presentaron mayor capacidad de reducción de Cr⁶⁺ en medio de cultivo con diferentes concentraciones de K₂Cr₂O₇, mientras que el aislado 6 (*Klebsiella* sp) tuvo la menor capacidad de reducción de cromo.

Los porcentajes de reducción de cromo hexavalente por las bacterias en un tiempo aproximado de 45 horas en medio de cultivo con K₂Cr₂O₇ se muestran en la tabla 2, Los aislados bacterianos 11, 10 y 4 obtuvieron un porcentaje de reducción superior al 90% en el medio

de cultivo con una concentración inicial 102,02 ppm de K₂Cr₂O₇. A partir de una concentración inicial de 198,96 ppm, todos los aislados bacterianos lograron remover más del 70% de Cr⁶⁺. La capacidad de reducción de Cr⁶⁺ disminuye a partir de la concentración de 297,89 ppm, donde estos microorganismos redujeron en promedio entre 66% y 42% de Cr⁶⁺.

Los aislados bacterianos 11 y 10 presentaron una mayor reducción de Cr⁶⁺ en medio de cultivo a la concentración inicial más elevada de 487,32 ppm; alcanzando un porcentaje mayor al 65% de reducción. Estos aislados se identificaron como *Klebsiella* sp y *Serratia* sp.

En la tabla 3 se observa la velocidad de remoción de Cr⁶⁺ de los aislados 11 y 10 en diferentes concentraciones iniciales de dicromato de potasio, se relacionó la concentración inicial y final del cromo y el tiempo de tratamiento biológico. La menor velocidad de reducción de Cr⁶⁺ se observó en la concentración inicial de 102,02 ppm e incrementó en las concentraciones siguientes.

Los porcentajes de reducción en levaduras para un tiempo de 45 horas en medio de cultivo con diferentes concentraciones de K₂Cr₂O₇, se observó que el porcentaje de reducción de Cr⁶⁺ fue mayor a menor concentración de K₂Cr₂O₇, esto puede deberse al carácter tóxico del dicromato de potasio. Los aislados levaduriformes tuvieron su máxima reducción de Cr⁶⁺ en los medios de cultivo que contenían 98,53 ppm, en concentraciones mayores se vio afectada significativamente su capacidad de reducción. La resistencia a Cr⁶⁺ puede ser independiente de la reducción, la reducción se ha sugerido principalmente como un mecanismo de resistencia microbiana a Cr⁶⁺ al disminuir la concentración (7).

Se determinó la velocidad de remoción de Cr⁶⁺ de los aislados 2 y 3 en diferentes concentraciones iniciales de dicromato de potasio Tabla 4 en un periodo de 45 horas. La menor velocidad de reducción de Cr⁶⁺ se observó a una concentración inicial de 98,53 ppm.

Remoción de Cr⁶⁺ en agua residual

La capacidad de remoción de cromo VI en agua residual con los microorganismos adaptados, se determinó en dos tipos de agua residual, en agua residual tratada (ART) y en agua residual sin tratar (AR). Con una concentraciones de 123,58 ppm en AR y en ART de 187,04 ppm de Cr⁶⁺.

Tabla 2. Porcentaje de reducción de cromo hexavalente con los aislados bacterianos en diferentes concentraciones de cromo VI en medio de cultivo.

Concentración de Cr ⁶⁺ (ppm)	Porcentaje de remoción de cromo VI				
	Aislado 4	Aislado 5	Aislado 6	Aislado 10	Aislado 11
102,02	91,08 ± 5,06	81,47 ± 4,11	60,68 ± 4,04	93,25 ± 4,96	93,57 ± 2,89
198,96	86,15 ± 3,87	86,99 ± 5,09	73,98 ± 3,28	86,57 ± 4,65	88,25 ± 3,78
297,89	66,36 ± 4,01	81,5 ± 4,98	63,56 ± 4,09	55,71 ± 3,01	65,8 ± 4,87
400,56	73,73 ± 4,36	73,73 ± 3,54	62,89 ± 4,15	67,05 ± 3,86	64,59 ± 4,23
487,32	48,94 ± 5,12	42,77 ± 3,32	50,31 ± 4,97	66,07 ± 3,29	66,76 ± 3,38

Tabla 3. Velocidad de reducción de Cr⁶⁺ de los aislados 10 y 11 en diferentes concentraciones iniciales.

Aislado 10			Aislado 10			
Concentración inicial (ppm)	concentración final (ppm)	V (ppm*h ⁻¹)	K	concentración final (ppm)	V (ppm*h ⁻¹)	K
102,02	6,88	2,11	0,0599	6,55	2,12	0,061
198,97	26,72	3,83	0,0446	23,38	26,81	0,0476
297,89	131,93	3,69	0,018	101,87	8,38	0,0238
415,04	141,95	6,07	0,0238	146,96	2,63	0,0231
487,33	165,33	7,16	0,024	161,99	2,21	0,0245

K: constante de velocidad

Los porcentajes de reducción de la concentración de Cr⁶⁺ en agua residual (AR y ART) obtenidos por el tratamiento con los aislados bacterianos en un tiempo de 30 horas, se presentan en la tabla 5. Los aislados bacterianos 4, 10 y 11 (*Klebsiella* sp, *Serratia* sp y *Raoultella* sp) alcanzaron un 100% de reducción de Cr⁶⁺ en AR que en ART (en concentraciones de Cr⁶⁺ ± 120), esto puede ser posible debido a la carga microbiana nativa del agua residual y a la presencia de compuestos químicos entre estos los sulfatos, principalmente sulfato de hierro que reduce el cromo hexavalente, sin embargo el agua residual sin la adición de los aislados solo alcanzo el 50,01% de reducción de Cr⁶⁺ en el mismo tiempo de incubación. La reducción de Cr⁶⁺ en ART sin adicionar

algún aislado microbiano fue mínima, al adicionar los aislados 4, 10 y 11 en ART paso de reducir el 16,07% a reducir el 67,41, 61,61 y 67,41 % respectivamente en ART con una concentración inicial de 187.04 ppm de K₂Cr₂O₇. Se realizó la prueba de Wilconxon para ver si había diferencias significativas en la reducción de cromo en agua residual (AR y ART), donde se comparó los tratamientos con las bacterias (4, 10 y 11) y el control. Este estudio demostró que había diferencias significativas entre los tratamientos microbianos y el control ($p_4=0,00$, $p_{10}=0,02$, $p_{11}=0,00$) donde los tratamientos con las bacterias fueron significativamente superiores en el porcentaje de reducción en AR y en ART. Feng Su y colaboradores en el 2016 realizaron un estudio con una

Tabla 4. Velocidad de reducción de Cr⁶⁺ por los aislado 2 y 3 en diferentes concentraciones iniciales.

Aislado Lev.2			Aislado Lev. 3			
Concentración inicial (ppm)	concentración final (ppm)	V (ppm*h ⁻¹)	K	concentración final (ppm)	V (ppm*h ⁻¹)	K
98,53	16,70	1,70	0,0370	19,21	1,65	0,0341
197,06	103,54	1,95	0,0134	94,36	2,14	0,0153
278,06	189,55	1,84	0,0080	193,72	1,76	0,0075
372,83	248,83	2,58	0,0084	216,74	3,25	0,0113
497,66	392,45	2,19	0,0049	394,12	2,16	0,0049

Lev = Levadura

Tabla 5. Porcentaje de remoción en diferentes concentraciones de Cr⁶⁺ en AR y ART por los aislados bacterianos.

Aislado	AR		ART	
	Concentración inicial = 123,58 ppm	Concentración inicial = 248,83 ppm	Concentración inicial = 187,04 ppm	Concentración inicial = 383,26 ppm
	% de reducción de Cr ⁶⁺		% de reducción de Cr ⁶⁺	
4	100 ± 7,18	51,34 ± 8,42	67,41 ± 4,88	61,44 ± 3,91
5	92,56 ± 7,39	69,46 ± 8,07	52,68 ± 4,02	52,56 ± 4,01
6	91,22 ± 8,14	67,11 ± 7,78	33,93 ± 3,97	10,46 ± 3,77
10	100 ± 6,46	70,47 ± 7,12	61,61 ± 4,56	54,90 ± 4,56
11	100 ± 8,08	89,60 ± 8,23	67,41 ± 3,89	55,99 ± 4,01
*Control	53,1 ± 9,20	21,48 ± 8,45	16,07 ± 4,45	8,71 ± 3,89

Ar = agua residual; ART= agua residual tratada con calor.

*Control: agua residual (AR o ART) sin adición de microorganismos.

Tabla 6. Porcentaje de remoción en diferentes concentraciones de Cr⁶⁺ en AR y ART por los aislados levaduriformes

Aislado	AR		ART	
	Concentración inicial = 119,82 ppm	Concentración inicial = 228,73 ppm	Concentración inicial = 167,34 ppm	Concentración inicial = 349,76ppm
	% de reducción de Cr ⁶⁺		% de reducción de Cr ⁶⁺	
1	58,60 ± 7,18	22,31 ± 8,12	21,41 ± 4,18	11,04 ± 3,10
2	65,45 ± 7,89	37,88 ± 7,07	28,68 ± 3,92	18,56 ± 4,2
3	60,11 ± 7,14	30,17 ± 7,68	19,93 ± 3,97	10,46 ± 3,07
*Control	48,82 ± 8,43	22,30 ± 8,26	13,97 ± 4,51	7,91 ± 4,09

*Control: agua residual (AR o ART) sin adición de microorganismos.

cepa del género *Klebsiella* donde se pudo determinar la cinética de reducción de Fe³⁺, esta bacteria tuvo la capacidad de remover completamente este metal. También se han encontrado estudios realizados con cepas como *Serratia* y *Routella* donde demostraron su capacidad para remover materia orgánica de agua residual y dimetoato respectivamente (18, 19). Todos estos estudios han descrito un tipo de resistencia a contaminantes por parte de las bacterias de este estudio, con respecto a la resistencia a cromo se han descrito diferentes interacciones entre este metal y bacterias, se han reportado reducciones enzimáticas, no enzimáticas intra y extracelular de cromo, donde la mayoría de bacterias reductoras estudiadas pertenecen al filo proteobacterias y muchas de estas a la familia *Enterobacteriaceae* al igual que las bacterias de este estudio (20).

Los porcentajes de reducción en agua residual (AR y ART) con diferentes concentraciones de Cr⁶⁺, demostraron que los aislados levaduriformes poseen menor capacidad de reducción de este metal en agua residual (Tabla 6), comparado con los porcentajes obtenidos en medio de cultivo BHI. El análisis estadístico de los

tratamientos con microorganismos reportaron que los tratamientos con las levaduras 1,2 y 3 no presentaron diferencias significativas ($p= 0.54, 0.12$ y 0.25 respectivamente) en los porcentajes de reducción del cromo hexavalente comparado con el control. Un estudio realizado con *Saccharomyces cerevisiae* observó las levaduras expuestas a cromo, posteriormente presentaban mayor sensibilidad a este metal ya que los genes implicados en la biogénesis de las vacuolas de esta levadura son sensibles a cromo hexavalente, lo cual fue perjudicial para la viabilidad de *S. cerevisiae* (21). Es posible que las levaduras de estudio también tengan algún tipo de sensibilidad al cromo después del proceso de adaptación a Cr⁶⁺. El bajo porcentaje de reducción de Cr⁶⁺ reportado por el tratamiento con levaduras en AR y ART, también puede deberse a las bajas condiciones nutritivas del agua residual para las levaduras, ya que por lo general estas crecen y se desarrollan en medios ricos en carbohidratos.

DISCUSION

Varios mecanismos de reducción de Cr⁶⁺ se han identificado en microorganismos y éstos incluyen la reducción

por DT-diaforasa, aldehído oxidasa en el citoplasma celular, cromo reductasa y citocromo P450 en la membrana celular, así como nitrorreductasa (3, 4).

La bioreducción de Cr^{6+} a la forma trivalente no tóxica por las bacterias reductoras de cromo, ofrece una opción para la remoción de Cr^{6+} para lograr la bioremediación del medio contaminado.

La disminución del cromo total en el sobrenadante como se muestra en la tabla 1 y 2, puede deberse a fenómenos biológicos como la biosorción (4, 5), proceso de captación pasiva del metal en células que ocurre gracias a las características de las paredes celulares de bacterias y hongos que acumulan el metal.

Ramírez y colaboradores obtuvieron porcentajes de reducción similar con *Bacillus cereus* B1, donde esta bacteria redujo el 100% del Cr^{6+} de una concentración inicial de 100 ppm en 96 horas de incubación en medio de cultivo. En este estudio los aislados bacterianos 4, 10 y 11 redujeron más del 90% en 45 horas de incubación en medio de cultivo BHI.

Los porcentajes de reducción de Cr^{6+} pueden estar limitados por algunos factores, por ejemplo, a concentraciones elevadas de un contaminante específico (14) o a las adaptaciones metabólicas del microorganismo.

Las observaciones anteriores proponen dos tipos de respuesta del microorganismo frente al agente de estrés (Cr^{6+}). Una respuesta donde los microorganismos bajo condiciones de estrés inducido por la alta concentración del contaminante experimentan una etapa conservativa, donde el proceso de reducción puede estar asociado a fenómenos químicos y mecanismos de transporte, de tal forma que el microorganismo invierte gran cantidad de energía en el proceso de transporte activo para controlar la entrada masiva del catión altamente tóxico, frenándose considerablemente los procesos de división celular, al punto que la población viable permanece en un estado de equilibrio. El otro tipo de respuesta se da cuando las concentraciones de Cr^{6+} son lo suficientemente tóxicas para el microorganismo, permitiendo que se lleven a cabo procesos metabólicos que incrementan exponencialmente la población microbiana y que a su vez participan directamente en la reducción del Cr^{6+} , aumentando la velocidad de reducción.

El proceso de reducción de Cr^{6+} tuvo un comportamiento similar al reportado por Rahman en 2104, donde el

proceso de reducción de Cr^{6+} se desaceleró y el crecimiento celular también disminuyó cuando se aumentó de las concentraciones de Cr^{6+} hasta 500 ppm. Esta disminución del porcentaje de reducción de Cr^{6+} y el crecimiento microbiano es causada por los efectos tóxicos del Cr^{6+} . Huang H. y col encontraron que a concentraciones mayores de 80 ppm afectaba el crecimiento de algunas cepas de *Pseudomonas*. En el presente estudio se observó que a concentraciones mayores de 297,89 ppm se afecta el crecimiento microbiano y disminuye el porcentaje de reducción.

Los aislados levaduriformes tuvieron su máxima reducción de Cr^{6+} en los medios de cultivo que contenían 98,53 ppm, en concentraciones mayores se vio afectada significativamente su capacidad de reducción. La resistencia a Cr^{6+} puede ser independiente de la reducción, la reducción se ha sugerido principalmente como un mecanismo de resistencia microbiana a Cr^{6+} al disminuir la concentración (7).

El pH del AR de ensayo siempre estuvo en un rango de 7,8 a 8,1. El rango de pH reportado por Kamakura y col. En 2014, para aislar e identificar Cr^{6+} por diferentes técnicas fue de 6 a 10, la recuperación de Cr^{6+} disminuyó a niveles de pH más bajos.

CONCLUSIONES

Los microorganismos aislados y adaptados a Cr^{6+} demostraron ser reductores de este metal. Los microorganismos con mayor potencial para reducir Cr^{6+} fueron, los aislados bacterianos 4, 10 y 11 (*Raoultella* sp, *Serratia* sp, y *Klebsiella* sp), estas presentaron diferencias significativas con el control y los demás microorganismos evaluados, siendo superiores en el porcentaje de reducción de cromo hexavalente en agua residual (AR y ART) y en medio de cultivo.

Las levaduras aisladas y adaptadas (*Candida Tropicalis*, *Candida Famata* y *Cryptococcus neoformans*) a cromo presentaron baja reducción de Cr^{6+} en agua residual (AR y ART), comparada con la reducción en medio de cultivo.

Los aislados bacterianos adaptados 4, 10 y 11 realizaron la reducción de Cr^{6+} en medio de cultivo en menor tiempo que microorganismos reportados por otros autores. Quedó evidenciada la influencia de la concentración del Cr^{6+} en el proceso de bioreducción, a concentraciones mayores de 278,06 ppm de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, disminuye la velo-

cidad de crecimiento y la reducción de Cr⁶⁺.

La capacidad de reducción del Cr⁶⁺, así como el comportamiento del crecimiento bacteriano, permiten proponer a *Raoultella* sp, *Serratia* sp y *Klebsiella* sp como microorganismos promisorios para la biorremediación de sitios contaminados con Cr⁶⁺ a escala real.

Financiación:

Universidad del Quindío, Gobernación del Quindío y Sistema General de Regalías, Convenio especial de cooperación 005 de 2015.

REFERENCIAS

1. N me ek, J., Pokorný, P., Lhotský, O., Knytl, V., Najmanová, P., Steinová, J., and Cajthaml, T. (2016). Combined nano-biotechnology for in-situ remediation of mixed contamination of groundwater by hexavalent chromium and chlorinated solvents. *Sci. Total Environ*, 563, 822-834.
2. Rivera-Martínez, E., Cárdenas-González, J. F., Martínez-Juárez, V. M., and Acosta- Rodríguez, I. (2015). Remoción de Cromo (VI) por una Cepa de *Aspergillus niger* Resistente a Cromato. *Inf tecnol*, 26(4), 13-20.
3. Dhal, B., Thatoi, H. N., Das, N. N., and Pandey, B. D. (2013). Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and mining/metallurgical solid waste: a review. *J Hazard Mater* 250, 272-291.
4. Barrera-Díaz, C. E., Lugo-Lugo, V., & Bilyeu, B. (2012). A review of chemical, electrochemical and biological methods for aqueous Cr (VI) reduction. *J Hazard Mater*, 223, 1-12.
5. Mamais, D., Noutsopoulos, C., Kavallari, I., Nyktari, E., Kaldis, A., Panousi, E & Nasioka, M. (2016). Biological groundwater treatment for chromium removal at low hexavalent chromium concentrations. *Chemosphere*, 152, 238-244.
6. Ge, S., Zhou, M., Dong, X., Lu, Y., & Ge, S. (2013). Distinct and effective biotransformation of hexavalent chromium by a novel isolate under aerobic growth followed by facultative anaerobic incubation. *App microbiol biotech*, 97(5), 2131-2137.
7. Ahemad, M. (2014). Bacterial mechanisms for Cr (VI) resistance and reduction: an overview and recent advances. *Folia microbiol*, 59(4), 321-332.
8. Bahafid, W., Joutey, N. T., Sayel, H., Iraqui-Houssaini, M., & El Ghachtouli, N. (2013). Chromium adsorption by three yeast strains isolated from sediments in Morocco. *Geomicrobiol J*, 30(5), 422-429.
9. Bhattacharya, A., & Gupta, A. (2013). Evaluation of *Acinetobacter* sp. B9 for Cr (VI) resistance and detoxification with potential application in bioremediation of heavy-metals- rich industrial wastewater. *Environmental Science and Pollution Research*, 20(9), 6628- 6637.
10. Rahman, Z., & Singh, V. P. (2014). Cr (VI) reduction by *Enterobacter* sp. DU17 isolated from the tannery waste dump site and characterization of the bacterium and the Cr (VI) reductase. *Int Biodeterior Biodegradation* 91, 97-103.
11. Bahafid, W., TahriJoutey, N., Sayel, H., Boularab, I., & El Ghachtouli, N. (2013). Bioaugmentation of chromium-polluted soil microcosms with *Candida tropicalis* diminishes phytoavailable chromium. *J app microbiol* 115(3), 727-734.
12. Severiche-Sierra, C., & García, H. G. (2013). Verificación analítica para las determinaciones de cromo hexavalente en aguas por espectrofotometría. *Rev Inge USB med*, 4(1), 22-26.
13. Ramírez Ramírez, A., & Benítez-Campo, N. (2014). Tolerancia y Reducción de Cromo (Vi) por *Bacillus Cereus* B1, Aislado de Aguas Residuales de una Curtiembre. *Rev Cien*, 17(2), 51-63.
14. Qian, J., Wei, L., Liu, R., Jiang, F., Hao, X., & Chen, G. H. (2016). An exploratory study on the pathways of Cr (VI) reduction in sulfate-reducing up-flow anaerobic sludge bed (UASB) reactor. *Sci rep* 6.

15. Huang, H., Wu, K., Khan, A., Jiang, Y., Ling, Z., Liu, P., & Li, X. (2016). A novel *Pseudomonas gesardii* strain LZ-E simultaneously degrades naphthalene and reduces hexavalent chromium. *Bioresour technol* 207, 370-378.
16. Kamakura, N., Inui, T., Kitano, M., & Nakamura, T. (2014). Determination of Chromium (III), Chromium (VI), and Chromium (III) acetylacetonate in water by ion-exchange disk extraction/metal furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 93, 28-33.
17. Feng Su, J., Cheng, C., Ma, F., Lin Huang, T., Suo Lu, J., & Cheng Shao, S. (2016). Kinetic analysis of Fe³⁺ reduction coupled with nitrate removal by *Klebsiella* sp. FC61 under different conditions. *RSC Advances*, 6(52), 46616-46624.
18. Gupta, A., & Thakur, I. S. (2015). Biodegradation of wastewater organic contaminants using *Serratia* sp. ISTVKR1 isolated from sewage sludge. *Biochem Eng J* 102, 115-124.
19. Liang, Y., Zeng, F., Qiu, G., Lu, X., Liu, X., & Gao, H. (2009). Co-metabolic degradation of dimethoate by *Raoultella* sp. X1. *Biodegradation*, 20(3), 363-373.
20. Ramírez-Díaz, M. I., Riveros-Rosas, H., Campos-García, J., & Cervantes, C. (2009). Reducción bacteriana de Cromo Hexavalente: mecanismos y aplicaciones. *Rev Edu Bioquím* 28(3), 73-79.
21. Jin, Y. H., Dunlap, P. E., McBride, S. J., Al-Refai, H., Bushel, P. R., & Freedman, J. H. (2008). Global transcriptome and deletome profiles of yeast exposed to transition metals. *PLoS Genet*, 4(4), e1000053.
22. Muñoz, A. J., Espínola, F., & Ruiz, E. (2016). Removal of Pb (II) in a packed-bed column by a *Klebsiella* sp. 3S1 biofilm supported on porous ceramic Raschig rings. *J Ind Eng Chem* 40, 118-127.
23. Thatoi, H., Das, S., Mishra, J., Rath, B. P., & Das, N. (2014). Bacterial chromate reductase, a potential enzyme for bioremediation of hexavalent chromium: a review. *J Environl manage*, 146, 383-399.