

# REMOCIÓN BIOLÓGICA DE CROMO HEXAVALENTE EN REACTORES BATCH DE BARROS ACTIVADOS: EFECTO TÓXICO DE LA CONCENTRACIÓN DEL METAL EN EL METABOLISMO MICROBIANO

A. Micaela Ferro Orozco<sup>1</sup>, Edgardo M. Contreras<sup>1</sup>, Noemí E. Zaritzky<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA) CCT La Plata CONICET - Fac. de Cs. Exactas, UNLP. 47 y 116 (B1900AJJ) - La Plata, Argentina. <sup>2</sup>Fac. de Ingeniería, UNLP. 47 y 1 (B1900AJJ) - La Plata, Argentina.

## Resumen

El cromo es un contaminante ampliamente difundido en el ambiente proveniente de industrias metalúrgicas, de cromado y químicas principalmente. La reducción de Cr(VI) a Cr(III) representa esencialmente la manera de descontaminar ambientes, ya sean aguas o suelos, contaminados con cromo en su forma hexavalente. El objetivo del presente estudio fue evaluar la toxicidad del cromo hexavalente, teniendo en cuenta un rango de concentración entre 0 y 300 mgCr(VI)/L, sobre el sistema de barros activados analizando el efecto de la adición de concentraciones crecientes del metal sobre la cinética de crecimiento microbiana en ensayos batch. Asimismo, se evaluó la eficiencia del proceso de reducción biológica de Cr(VI). Los resultados indican que tanto la velocidad de crecimiento ( $\mu_{\max}$ ) como el rendimiento en biomasa ( $Y_{x/s}$ ) disminuyeron con el incremento en la concentración de Cr(VI). Por otro lado, los valores correspondientes al coeficiente de oxidación del sustrato ( $Y_{o/s}$ ) aumentaron progresivamente con la concentración de cromo hexavalente, lo que estaría indicando que, debido a las condiciones de estrés que presenta el ambiente por la presencia de Cr(VI), los microorganismos estarían utilizando mayor cantidad de energía para mantener su metabolismo activo. La eficiencia del proceso de remoción biológica de Cr(VI) disminuyó con el aumento en la concentración del metal dentro del sistema como consecuencia del efecto negativo que ejerce el mismo sobre el metabolismo microbiano.

## 1. Introducción

La remoción de metales pesados de aguas residuales plantea un problema de difícil solución debido a que no son biodegradables y usualmente presentan una elevada toxicidad para los organismos acuáticos de los cuerpos receptores. El cromo es un contaminante ampliamente difundido en el ambiente proveniente de industrias metalúrgicas, de cromado y químicas principalmente. El Cr(VI) se encuentra generalmente bajo la forma de aniones cromatos o dicromatos solubles los cuales son muy tóxicos debido a su alto poder oxidante; por otra parte el Cr(III) forma complejos altamente estables con gran cantidad de sustancias y puede ser encontrado tanto bajo la forma catiónica ( $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6^{+3}$ ,  $\text{Cr}(\text{OH})^{+2}$ ,  $\text{Cr}(\text{OH})_2^+$ ) como aniónica ( $\text{CrCl}_6^{-3}$ ,  $\text{Cr}(\text{OH})_4^-$ ). A diferencia del Cr(VI), el Cr(III) no es oxidante y por ello presenta menor toxicidad (Stasinakis y col., 2003). Debido a esto, es que la reducción de Cr(VI) a Cr(III) representa esencialmente la manera de descontaminar ambientes, ya sean aguas o suelos, contaminados con cromo en su forma hexavalente. Las metodologías convencionales para el tratamiento de residuos que contengan Cr(VI) incluyen su reducción química a Cr(III) y posterior precipitación como  $\text{Cr}(\text{OH})_3$  en condiciones alcalinas, o su remoción por intercambio iónico y adsorción (Patterson, 1985). Todos estos métodos presentan algunas desventajas ya que la precipitación alcalina produce una gran cantidad de barros químicos y el intercambio iónico y la adsorción pueden ser costosos y muchas veces poco específicos para remover Cr(VI) en presencia de otros iones. En la actualidad la utilización de métodos biológicos o biorremediación para la descontaminación de aguas residuales conteniendo Cr(VI) es un campo emergente. Se han descripto un gran número de géneros bacterianos con la capacidad de reducir

el Cr(VI) a Cr(III). Si bien los cultivos puros son de gran utilidad a la hora de estudiar los mecanismos involucrados en el proceso de reducción de Cr(VI), los mismos presentan desventajas relacionadas con la necesidad de trabajar en condiciones de esterilidad. En este sentido, la utilización de cultivos mixtos como los barros activados parece ser una tecnología económicamente viable y prometedora. Varios investigadores (Maziersky, 1995; Stasinakis y col., 2002; Gikas y Romanos, 2006) han estudiado el efecto de la adición de Cr(VI) dentro del sistema de barros activado y otros cultivos microbianos mixtos; los resultados encontrados en literatura son muy diversos debido principalmente a la gran diversidad en cuanto a composición y comportamientos que pueden presentar los cultivos mixtos. Por otra parte, debe tenerse en cuenta el tipo de reactor utilizado para el crecimiento de los microorganismos (batch, continuo, etc.), las condiciones de operación como el tiempo de residencia celular e hidráulico, la aclimatación previa de la biomasa frente al metal, el sustrato utilizado, los métodos de medida y técnicas utilizadas. Es por ello que a la hora de utilizar un cultivo microbiano para la remediación de aguas contaminadas con cromo hexavalente, resulta de gran importancia estudiar la respuesta que presenta el mismo frente a la adición del metal. Deben tenerse en cuenta los efectos negativos que pueden provocarse sobre el metabolismo bacteriano, ya que la eficiencia del proceso biológico de remoción de Cr(VI) podría disminuir. Debido a lo señalado anteriormente, en el presente trabajo se evaluó la toxicidad del Cr(VI) sobre el sistema de barros activados analizando el efecto del metal sobre la cinética de crecimiento microbiano.

## **2. Objetivos**

Analizar la toxicidad del Cr(VI) sobre el sistema de barros activados mediante el estudio de la cinética de crecimiento microbiano en presencia de concentraciones crecientes del metal.

## **3. Metodología**

### **3.1. Barros activados**

Los barros activados utilizados en el presente trabajo fueron cultivados en una planta de tratamiento de efluentes a escala laboratorio alimentada con un medio de cultivo sintético compuesto por 1500 mg de suero de queso deshidratado, 94 mg de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  y 1030 mg de  $\text{NaHCO}_3$  por litro de agua. El tiempo de residencia celular fue mantenido en 45 días mediante purga directa, el tiempo de residencia hidráulico fue de 2 días. La concentración de oxígeno disuelto (OD) fue mantenida encima de 5  $\text{mgO}_2/\text{L}$ . En estado estacionario el pH de la planta fue de  $7.0 \pm 0.2$ .

### **3.2. Ensayos de remoción de cromo hexavalente**

Los ensayos fueron realizados en batch (250 ml) a temperatura y pH constantes ( $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  y pH  $7.0 \pm 0.1$ ). Antes de realizar los experimentos la biomasa fue lavada tres veces con buffer fosfato ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.5g/L). En todos los casos la concentración de biomasa inicial fue de  $0.7 \pm 0.1$  gSST/L. La composición del medio utilizado en los ensayos fue la siguiente: suero de queso (5 gDQO/L) como fuente de carbono,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1 g/L) como fuente de nitrógeno y soluciones M1 (1ml/L) y M2 (1ml/L) de micronutrientes. La composición de la solución M1 (en g/100ml) fue la siguiente:  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.5,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.3,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.075,  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.015, y ácido cítrico 0.6. La solución M2 contenía (en g/100ml):  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.05,  $\text{BO}_3\text{H}_3$  0.01, KI 0.01. Las concentraciones de Cr(VI) testeadas (10, 25, 50, 100 y 300 mg/L) fueron obtenidas adicionando la cantidad adecuada de una solución stock de Cr(VI) (10 gCr(VI)/L). La misma fue preparada utilizando  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  de grado analítico. Asimismo, se realizaron ensayos batch control sin la adición de cromo hexavalente.

A distintos tiempos se tomaron muestras y se determinaron las concentraciones de biomasa (X), sustrato carbonáceo (S) y Cr(VI), así como también la velocidad de consumo de oxígeno (R) de los microorganismos. Los valores de oxígeno consumido (OC) fueron calculados integrando las curvas correspondientes a la velocidad de consumo de oxígeno en función del tiempo.

A partir de los datos se obtuvieron los valores del rendimiento en biomasa ( $Y_{x/s}$ , mgSST/gDQOs) como la pendiente de la recta obtenida al graficar X en función de S. De la misma manera se calculó el coeficiente  $Y_{o/s}$  (oxígeno consumido por unidad de sustrato consumido, mgO<sub>2</sub>/mgDQOs) graficando la concentración de OC en función de S. Por otro lado, se calcularon los valores de la velocidad específica máxima de crecimiento ( $\mu_{max}$ , h<sup>-1</sup>) para cada concentración de Cr(VI) ensayada; éste valor se obtuvo a partir de la pendiente que se obtiene al graficar el ln(X) en función del tiempo, asumiendo una cinética de primer orden.

Para cada concentración inicial de cromo hexavalente se obtuvo la eficiencia de remoción de Cr(VI) ( $E_R$ ) mediante la siguiente expresión:

$$E_R = 100 \left( \frac{C_o - C}{C_o} \right) \quad (\text{ec.1})$$

donde  $C_o$  es la concentración inicial de Cr(VI) y  $C$  es la concentración a un tiempo  $t$ .

### 3.3. Métodos analíticos

La concentración de sustrato (S) fue medida como Demanda Química de Oxígeno (DQO) utilizando un equipo Hach. La concentración de biomasa (X) fue determinada como sólidos suspendidos totales (SST). El cromo hexavalente fue determinado colorimétricamente a 540 nm utilizando difenilcarbazida en medio ácido (APHA, 1989).

## 4. Resultados

En la Figura 1 se observan las curvas de crecimiento, consumo de sustrato carbonáceo (S) y velocidad de consumo de oxígeno para los cultivos batch de barros activados en presencia de concentraciones crecientes de Cr(VI) (0-300 mg/L).

En los ensayos realizados con 300 mgCr(VI)/L no se observó actividad metabólica; tanto la fase de crecimiento, como el consumo de sustrato carbonáceo y oxígeno estuvieron ausentes. Teniendo en cuenta los experimentos realizados con concentraciones de cromo hexavalente menores a 100 mg/L, el aumento en la concentración de cromo provocó un incremento en la fase de latencia (período que antecede la fase de crecimiento microbiano). Se obtuvieron valores de 6, 18.5, 22, 35 y 45 horas para las concentraciones de 0, 10, 25, 50 y 100 mgCr(VI)/L respectivamente (Fig.1a). El aumento en el tiempo de duración de la fase de latencia también puede verse reflejado en las curvas correspondientes a consumo de sustrato carbonáceo (Fig.1b) y velocidad de consumo de oxígeno (Fig.1c). El aumento en la duración de ésta fase debido al incremento en la concentración de Cr(VI) ha sido descrito por otros investigadores. Bae y col. (2000) realizaron ensayos de remoción de cromo hexavalente utilizando un cultivo puro de *E. coli* ATCC 33456 obteniendo valores correspondientes a la fase de latencia de 0, 2, 8, 15, 24, 32 y 41 horas para 0, 5, 10, 15, 20, 30 y 50 mgCr(VI)/L respectivamente. Gikas y Romanos (2006) trabajaron con cultivos batch de barros activados realizando ensayos de remoción de cromo hexavalente en un rango de concentraciones entre 0 y 320 mg/L. Coincidiendo con los resultados informados en el presente trabajo, estos investigadores encontraron que el aumento en la duración de la fase de latencia se hacía más pronunciado para concentraciones mayores a 30 mgCr(VI)/L. Li y col.(2007) utilizaron como inóculo microbiano el lixiviado de un vertedero e informaron que la fase de latencia comenzaba a aumentar a partir de la adición de concentraciones de Cr(VI) mayores a 10 mg/L. El aumento en la duración de la fase de latencia ha sido explicado de diferentes maneras teniendo en cuenta características relacionadas con el

metabolismo microbiano sometido a condiciones de estrés. Se ha descrito que los compuestos de cromo hexavalente son capaces de inducir mutaciones, que muchas veces hasta pueden provocar la sustitución de bases (G-C y A-T) en el DNA bacteriano (Bae et al., 2000). Se ha propuesto que la función SOS de reparación de daños podría desempeñar un rol importante frente a la presencia de Cr(VI). De esta manera, el aumento en la duración de la fase de latencia podría estar asociado al tiempo requerido para que entre en funcionamiento dicha función SOS y se produzca la reparación de los daños en el cromosoma bacteriano (Bae y col., 2000). Vankova y col. (1999) atribuyen el aumento del período de latencia a la aclimatación gradual de la biomasa frente al cromo (VI). El fenómeno de aclimatación generalmente involucra la utilización de rutas metabólicas alternativas, las cuales no fueron perturbadas (o al menos en menor grado) por la presencia del metal.

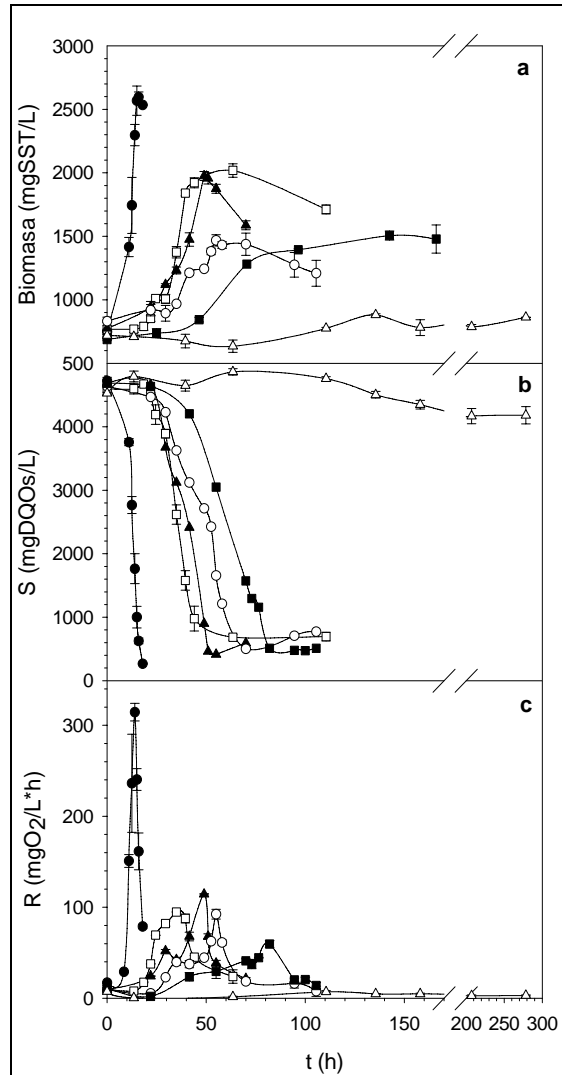
Por otro lado, en la Figura 1a puede notarse que el rendimiento en biomasa y la velocidad de crecimiento también se vieron afectados debido al aumento en la concentración de cromo hexavalente. Con el objeto de realizar comparaciones, se obtuvieron los valores de los parámetros de crecimiento en cada experimento. Las Figuras 2 y 3 muestran la variación de los valores correspondientes a los coeficientes  $Y_{x/s}$  e  $Y_{o/s}$ , así como también los valores de  $\mu_{max}$  obtenidos a partir de los ensayos realizados con concentraciones crecientes de Cr(VI). Comparados con el experimento control (sin adición de Cr(VI)), tanto el rendimiento en biomasa ( $Y_{x/s}$ ) como la velocidad de crecimiento máxima ( $\mu_{max}$ ) disminuyeron con el aumento en la concentración de Cr(VI). Por otro lado, los valores de  $Y_{o/s}$  aumentaron progresivamente con la concentración de cromo hexavalente. Esto podría explicarse teniendo en cuenta que los microorganismos estarían utilizando mayor cantidad de energía para mantener su metabolismo activo frente a las condiciones de estrés que presenta el ambiente.

El efecto de la adición de cromo hexavalente sobre los parámetros de crecimiento, tanto en cultivos puros como mixtos, ha sido analizado por otros investigadores. Gikas y Romanos (2006) informaron que los valores de  $\mu_{max}$ , en cultivos batch de barros activados, se incrementaron con respecto al control (sin cromo) hasta concentraciones de 10 mgCr(VI)/L. Por encima de dicha concentración, observaron un descenso en los valores del parámetro. Maziersky (1995) informó una continua disminución de los valores de  $\mu_{max}$  con la adición de concentraciones de cromo entre 0.1 y 11 mgCr(VI)/L en el sistema de barros activados. En el trabajo realizado por Li y col. (2007), utilizando como inóculo bacteriano el lixiviado proveniente de un vertedero, se observa que el cromo (VI) no provocó cambios significativos en el rendimiento ( $Y_{x/s}$ ) para concentraciones de 10 mgCr(VI)/L o menores, sin embargo observaron un descenso de este valor cuando las concentraciones de Cr(VI) fueron mayores a 50 mg/L. Stasinakis y col. (2002) también informaron la disminución en los valores de  $Y_{x/s}$  y de  $\mu_{max}$  debido al aumento en la concentración de Cr(VI) por encima de 25 mg/L. Por otro lado, Bopp y Ehrlich (1988) no encontraron disminución en los parámetros de crecimiento hasta la adición de 500 mgCr(VI)/L. Con ésta concentración sólo encontraron una disminución en el valor de  $\mu_{max}$ , pero no en el de  $Y_{x/s}$ ; el rendimiento en biomasa solo disminuyó cuando adicionaron una concentración de 1000 mgCr(VI)/L. Srinath y col. (2002) utilizaron dos cepas bacterianas, *Bacillus megaterium* y *Bacillus circulans* para realizar los ensayos de remoción de cromo hexavalente. Con ambos microorganismos encontraron que tanto el rendimiento en biomasa como la velocidad de crecimiento se veían afectados negativamente cuando adicionaban concentraciones de Cr(VI) mayores a 25 mg/L.

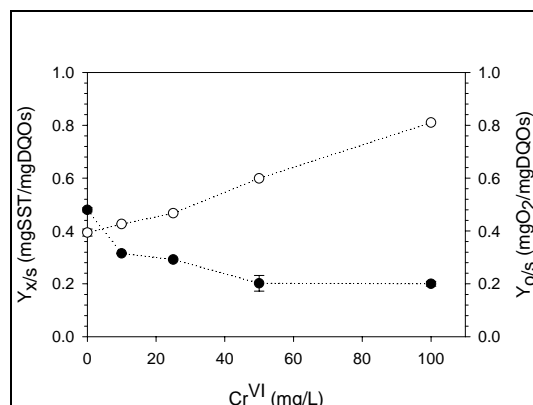
En el presente trabajo, teniendo en cuenta el rango de concentraciones de cromo hexavalente analizado, no se encontró que ninguna de ellas provocara un efecto estimulador en el crecimiento microbiano, lo cual ha sido informado por algunos investigadores ( Moore y col., 1961; Gokcay y Yetis, 1991; Gikas y Romanos, 2006).

En trabajos previos (Ferro Orozco et al., 2007) se informó que la reducción de Cr(VI) a Cr(III) por barros activados se limitaba en caso de insuficiencia de sustrato carbonáceo. Debido a esto,

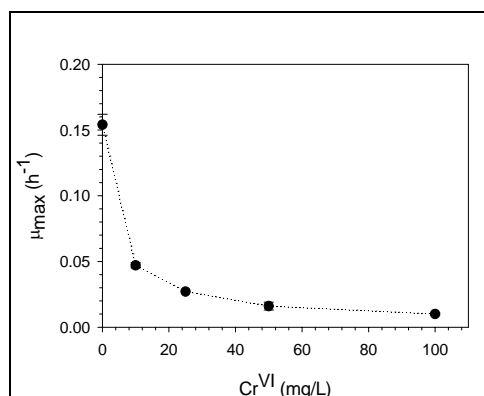
para la obtención de la eficiencia de remoción ( $E_R$ ) de cada ensayo, se tuvo en cuenta un tiempo final que varió según el consumo de sustrato carbonáceo en cada experimento. Así, el tiempo final de cada ensayo correspondió a aquel valor final de DQO mayor a los 500 mg/L. Los valores de  $E_R$  obtenidos fueron del 68, 40, 28, 14 y 0 % para los ensayos con concentraciones iniciales de Cr(VI) de 10, 25, 50, 100 y 300 mg/L respectivamente. Estos resultados indican que la toxicidad que ejerce el cromo hexavalente sobre el metabolismo microbiano, tiene una influencia negativa sobre la eficiencia del proceso de remoción biológica de Cr(VI).



**FIGURA 1.** Efecto de la concentración de Cr(VI) en (a) concentración de biomasa; (b) concentración de sustrato carbonáceo; (c) velocidad de consumo de oxígeno en función del tiempo. Cada curva fue realizada por duplicado para una concentración diferente de Cr(VI): 0 mg/L (●); 10 mg/L (□); 25 mg/L (▲); 50 mg/L (○); 100 mg/L (■); 300 mg/L (△).



**FIGURA 2.** Efecto de la concentración de Cr(VI) sobre el rendimiento en biomasa ( $Y_{x/s}$ ) (●) y sobre el coeficiente de oxidación de sustrato ( $Y_{o/s}$ ) (○). Las barras indican el desvío estándar.



**FIGURA 3.** Efecto de la concentración de Cr(VI) sobre la velocidad de crecimiento máxima ( $\mu_{max}$ ). Las barras indican el desvío estándar.

## 5. Conclusiones

Se observó actividad metabólica de los barros activados (presencia de fase de crecimiento, consumo de sustrato y oxígeno) hasta concentraciones de Cr(VI) de 100 mg/L; sin embargo, dicha actividad se redujo casi totalmente para una concentración de 300 mgCr(VI)/L. Esto indica que el umbral de inhibición de los barros activados debido a la presencia de cromo hexavalente se encuentra entre los 100 y los 300 mg/L.

La fase de latencia se prolongó con el aumento en la concentración de cromo inicial. Se calcularon los valores correspondientes a los parámetros de crecimiento de los cultivos batch. El rendimiento en biomasa y la velocidad de crecimiento disminuyeron con el aumento en la concentración de Cr(VI). Por el contrario, los valores correspondientes al coeficiente de oxidación de sustrato ( $Y_{o/s}$ ) aumentaron progresivamente con el incremento en la concentración de cromo hexavalente; este hecho podría explicarse teniendo en cuenta que, bajo las condiciones de estrés en que se encuentran, los microorganismos estarían conduciendo mayor cantidad de energía para mantener su metabolismo activo.

La eficiencia del proceso de remoción biológica de Cr(VI) disminuyó con el aumento en la concentración inicial del metal.

## 6. Bibliografía

- APHA (1989) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 17th ed. American Public Health Association.
- Bae W.C., Kang T.G., Kang I.K., Won Y.J. y Jeong B.C. (2000). Reduction of hexavalent chromium by *Escherichia coli* ATCC 33456 in batch and continuous cultures. The Journal of Microbiology 38, 36-39. The Microbiological Society of Korea.
- Bopp L.H. y Ehrlich H.L. (1988). Chromate resistance and reduction in *Pseudomonas fluorescens* strain LB300. Arch. Microbiol. 150, 426-431.
- Ferro Orozco A.M., Contreras E.M., Bertola N.C. y Zaritzky N.E. (2007). Hexavalent chromium removal using aerobic activated sludge batch systems added with powdered activated carbon. Water SA 33, 239-244.
- Gikas P. y Romanos P. (2006). Effects of tri-valent (Cr(III)) and hexa-valent (Cr(VI)) chromium on the growth of activated sludge. Journal of Hazardous Materials B133, 212-217.
- Gokcay C.F. y Yetis U. (1991). Effect of chromium (VI) on activated sludge. Water Res. 25, 65-73.
- Li Y., Low G.K.-C., Scott J.A. y Amal R. (2007). Microbial reduction of hexavalent chromium by landfill leachate. Journal of Hazardous Materials 142, 153-159.
- Maziersky J. (1995). Effect of chromium (Cr<sup>VI</sup>) on the growth rate of activated sludge bacteria. Water. Res. 9, 1479-1482.
- Moore W.A., Mc Dermott G.N., Post M.A. y Ettinger M.B. (1961). Effects of chromium on the activated sludge process. J. Water Pollut. Control Federation 33, 54-72.
- Patterson J.W. (1985) Industrial Wastewater Treatment Technology. Butterworth publishers. Stoneham, MA. pp. 53-393.
- Srinath T., Verma T., Ramteke P.W. y Garg S.K. (2002). Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. Chemosphere 48, 427-435.
- Stasinakis, A.S, Mamais, D., Thomaidis, N., Lekkas, T.D. (2002). Effect of chromium (VI) on bacterial kinetics of heterotrophic biomass of activated sludge. Water Res. 36, 3341-3349.
- Stasinakis A.S., Thomaidis N.S., Mamais D., Karivali Marianna y Lekkas T.D. (2003). Chromium species behaviour in the activated sludge process. Chemosphere 52, 1059-1067.
- Vankova S., Kupec J. y Hoffman J. (1999). Toxicity of chromium to activated sludge. Ecotoxicol. Environ. Safety 42, 16-21.