



Pseudomonas fluorescens reductora de Cromo VI a partir de agua residual de una curtiembre

Isolation of *Pseudomonas* spp. Chromium VI reductants from wastewater from a tannery

Silvia Castillo¹, Tony Díaz¹, Andrés Holguín¹, Cristian Peláez¹, Miguel Ramírez¹, Heydi Rodríguez¹ y Heber Robles²

¹Escuela AP de Microbiología y Parasitología, Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo. Perú.

²Departamento de Microbiología y Parasitología, UNT

RESUMEN

La finalidad del presente trabajo fue aislar *Pseudomonas* spp. reductoras de Cromo VI. Se usó 150mL de agua residual de una curtiembre como muestra biológica a la cual se realizó un enriquecimiento no selectivo en medio Luria Bertani durante 24h a 30°C. Se preparó Medio King B suplementado con $K_2Cr_2O_7$ para el aislamiento obteniéndose 9 cultivos 1A, 1B, 1C; 2A, 2B, 2C; 3A, 3B, 3C y se seleccionó el cultivo 3C que se identificó fenotípicamente como *Pseudomonas fluorescens* mediante observación de colonias verdes fluorescentes en Medio King Base y pigmento verde fluorescente en Caldo Glutamato y mediante la Prueba de Lipasa, (permitiendo diferenciarla de otras especies) siendo *P. fluorescens* Lipasa negativo. La reducción de Cromo VI se llevó a cabo en Medio Luria Bertani suplementado con $K_2Cr_2O_7$ (Cr VI 69,75 mg/L) en condiciones de aerobiosis y agitación (130 RPM) a 22,3 °C durante 12 horas. La reducción se determinó mediante método colorimétrico que se basa en la reacción del cromo hexavalente con 1,5-difenilcarbazida en medio ácido, lo que produce la formación de un compuesto desconocido de color rojo violeta. Éste puede ser medido espectrofotométricamente a una longitud de onda de 540 nm y la absorbancia es proporcional a la concentración de cromo en la muestra, obteniéndose que el cultivo aislado identificado como *P. fluorescens* tiene la capacidad de reducir Cr VI en un 51.9 %. (de 69,75 mg/L a 33, 58 mg/L).

Palabras clave: Cromo VI, reducción, *Pseudomonas fluorescens*.

ABSTRACT

The purpose of this work was to isolate *Pseudomonas* spp. reducers of Chromium VI. 150mL of wastewater from a tannery it was used as a biological sample to which non-selective enrichment was carried out in Luria Bertani medium for 24h at 30°C. King B medium supplemented with $K_2Cr_2O_7$ was prepared for isolation to yield 9 cultures 1A, 1B, 1C; 2A, 2B, 2C; 3A, 3B, 3C and the 3C culture was selected which was phenotypically identified as *Pseudomonas fluorescens* by observation of fluorescent green colonies in Medium King Base and fluorescent green pigment in Glutamate Broth and by the Lipase Test (Allowing differentiation of other species), *Pseudomonas fluorescens* is Lipase negative. Chromium VI reduction was carried out in Luria Bertani medium supplemented with $K_2Cr_2O_7$ (Cr VI 69.75 mg / L) under aerobiosis and stirring conditions (130 RPM) at 22.3 ° C for 12 hours. The reduction was determined by colorimetric method which is based on the reaction of hexavalent chromium with 1,5-diphenylcarbazide in acid medium, which causes the formation of an unknown compound of red violet color. This can be measured spectrophotometrically at a wavelength of 540 nm and the absorbance is proportional to the concentration of chromium in the sample, with the isolated culture identified as *Pseudomonas fluorescens* being able to reduce Cr VI by 51.9%. (From 69.75 mg / L to 33.58 mg / L).

Keywords: Chromium VI, reduction, *Pseudomonas fluorescens*

INTRODUCCIÓN

Los compuestos de cromo hexavalente (cromatos y dicromatos) son altamente tóxicos y son considerados como mutágenos y carcinógenos. Estos compuestos son desechados frecuentemente hacia el medio ambiente como resultado de diversos procesos industriales¹. Las principales fuentes de contaminación por cromo provienen de su uso industrial en curtiembres.²

El curtido es el proceso por el cual las pieles de los animales como vacunos, ovinos y caprinos son convertidas en cuero, es una técnica que permite estabilizar la materia orgánica mediante una serie de etapas, en las que es necesario adicionar productos químicos. Se utiliza CrSO_4 con la finalidad de estabilizar la estructura de colágeno que compone al cuero.³ La descarga de cromo en efluentes contamina suelos, sedimentos y aguas superficiales y subterráneas. El Cr (VI) en el ambiente puede llegar a los seres humanos y animales a través del agua y los alimentos.⁴

Las empresas industriales que tratan el efluente de curtiembre utilizan métodos físico-químicos para eliminar la concentración Cr^{6+} tales métodos incluyen la reducción química, precipitación, filtración, electroforesis, tratamiento químico, las tecnologías de membrana, la recuperación por evaporación, extracción con disolvente, intercambio iónico, ósmosis inversa, y la adsorción sobre carbón activado. En países en desarrollo, ninguno de estos métodos ha alcanzado la viabilidad económica. Por lo tanto, los métodos convencionales para la eliminación de Cr^{6+} de residuales presentan un costo excesivo. Estas limitaciones han llevado a una continua búsqueda de tecnologías de tratamiento alternativos que se basan en la búsqueda de microorganismos con capacidad reductora de dicho metal como un enfoque eficaz y ambientalmente aceptable.⁴

Se sabe que los microorganismos pueden interactuar con iones de metales pesados. Tales interacciones se producen en muchos géneros de microorganismos utilizados para la biorremediación.⁴ Algunas especies de *Pseudomonas* pueden reducir eficazmente el Cr (VI) en las aguas residuales industriales y mostrar gran potencial en la biorremediación de Cr (VI). Sin embargo en presencia de exudados (metabolitos orgánicos celulares), bacterias tales como *Pseudomonas* spp. no solo puede reducir el Cr (VI), sino también formar Cr soluble (III) como productos finales.⁵ Las diferentes especies de *Pseudomonas* muestran una variada adaptabilidad a entornos y diferente capacidad de la reducción de Cr (VI). Se sabe entonces que especies del género *Pseudomonas* existentes en lugares contaminados con Cromo, tienen capacidad de reducir Cr (VI) a Cr (III) ⁶

En un estudio una cepa de *Pseudomonas fluorescens* fue aislada de los suelos industriales del estado de Aligarh, India. Esta cepa fue resistente a algunos de los principales contaminantes del agua, entre ellos el Cr VI. Se estimó la reducción en 74,2% para el cromo hexavalente durante el tratamiento en 24 horas.⁹ *Pseudomonas* spp. pueden asimilar distintos sustratos por lo que pueden colonizar distintos hábitats. Distintas especies de *Pseudomonas*, como *P. auriginosa*, *P. fluorescens* y *P. putida*, tienen la capacidad de reducir el Cr (VI) hasta Cr (III).

Las curtiembres utilizan Cr (III) durante el proceso de curtido bajo la forma de CrSO_4 . En el agua residual de este proceso el Cr (III) varía entre 10 a 1000 $\mu\text{g/mL}$, del cual el 3% en presencia de oxígeno se oxida a Cr (VI). El Cr (VI) en el ambiente puede llegar a los seres humanos y animales a través del agua y los alimentos.

Es por ello la importancia de aislar bacterias del género *Pseudomonas* que reduzcan el Cr (VI) en Cr (III) para posteriormente ser usados en la biorremediación. Por tal motivo esta investigación tuvo como objetivo aislar y caracterizar bacterias del género *Pseudomonas* que reduzcan el Cr (VI) a Cr (III).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico y medios de cultivo:

150mL de agua residual del proceso de curtido de cuero de una curtiembre ubicada en el distrito de Florencia de Mora, Trujillo, La Libertad, Perú.

Medio Luria Bertani: Triptona 10g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5g/L, pH final 7.2 (a 37°C) y

Medio King B: Peptona proteasa 20.00 g/L, fosfato dihidrogeno de potasio 1.50g/L, sulfato de magnesio heptahidratado 1.50 g/L, agar 20.00 g/L, pH final 7.2 ± 0.2 (a 25°C).

Toma de muestra y enriquecimiento no selectivo

La muestra fue tomada de tres puntos de la superficie del pozo, donde llegan las aguas del de curtido del cuero, utilizando 3 recipientes de polietileno de 50 mL de capacidad. De los 150 mL de muestra se realizó un enriquecimiento no selectivo de la muestra en medio Luria Bertani y se incubó a 30°C durante 24 horas.

Aislamiento e identificación

Posteriormente, se realizó el aislamiento en Medio Base King suplementado con $K_2Cr_2O_7$ (4 mg/L Cr VI) a 30°C por 24 horas. Se seleccionaron 9 colonias aisladas verde fluorescente y se purificó en Medio King B obteniendo 9 cultivos 1A, 1B, 1C; 2A, 2B, 2C; 3A, 3B, 3C que se conservaron en Agar Luria Bertani. Los nueve cultivos aislados presentaron las mismas características fenotípicas observando colonias verdes fluorescentes en Medio King B y pigmento verde fluorescente en Caldo Glutamato. Se seleccionó el cultivo 3C que se identificó fenotípicamente como *P. fluorescens* mediante pruebas usadas para tal fin (Tabla 1)

Tabla 1. Pruebas fenotípicas para la identificación del cultivo 3C

Prueba	Resultado
Oxidasa	negativo
Catalasa	Positivo
Lipasa *	negativo
Hidrólisis de gelatina	Positivo
Lisina descarboxilasa	negativo
Movilidad	Positivo
TSI	K/K --

*Prueba específica que permite diferenciar a *Pseudomonas fluorescens* (-) de *P. aeruginosa* (+).

Determinación de la reducción de Cr VI

La reducción de Cromo VI se llevó a cabo en Medio Luria Bertani suplementado con $K_2Cr_2O_7$ (Cr VI 69,75 mg/L) en condiciones de aerobiosis y agitación (130 RPM) a 22,3 °C durante 12 horas. La reducción se determinó mediante método colorimétrico que se basa en la reacción del cromo hexavalente con 1,5-difenilcarbazida en medio ácido, lo que produce la formación de un compuesto desconocido de color rojo violeta. Éste puede ser medido espectrofotométricamente a una longitud de onda de 540 nm y la absorbancia es proporcional a la concentración de cromo en la muestra.

RESULTADOS

El cultivo aislado identificado como *Pseudomonas fluorescens* tiene la capacidad de reducir Cr VI de 69,75 mg/L a 33, 58 mg/L en 12 horas, siendo el porcentaje de reducción de 51.9 %.

DISCUSIÓN

Esta investigación se orientó a la evaluación de la capacidad de reducción de Cr VI por un cultivo de *P. fluorescens* aislado del agua residual de una curtiembre con la finalidad de ser utilizada en futuros tratamientos de biorremediación de aguas residuales contaminadas por dicho metal tóxico.

La reducción de Cr VI se midió durante la fase logarítmica (12 horas); debido a la expresión del factor sigma conocido como RpoS, incrementando su concentración al final de la fase logarítmica y durante la fase estacionaria. El factor sigma RpoS controla la expresión de los genes involucrados en la producción de biofilm⁸, el cual podría interferir en la medición de la reducción ya que el Cromo VI podría ser adherido a estos biofilm.

El mecanismo por el cual el cultivo de *P. fluorescens* redujo el Cr VI, esto se debe a que el ión cromato es estructuralmente similar al ión sulfato por lo que puede atravesar la membrana celular de la bacteria a través de un transportador aniónico no específico de sulfato. En presencia de oxígeno, la enzima responsable de la reducción aeróbica de Cr VI a Cr III requiere NAD(P)H. La reacción se produce en dos pasos; primero Cr VI acepta un electrón de una molécula de NAD(P)H para generar Cr (V) como intermediario y luego el Cr (V) acepta dos electrones para formar Cr (III). Una vez reducido, Cr (III) usualmente se une a los grupos funcionales cargados electronegativamente de la superficie celular, la cual sirve como sitio de nucleación para la precipitación.

Por lo tanto se demostró que el cultivo identificado como *P. fluorescens* redujo el Cr VI a Cr III ya que la concentración de este disminuyó.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Garg SK, Tripathi M, Srinath T. Strategies for chromium bioremediation of tannery effluent. Rev Environm Contamin & Toxicol. 2012; 217: 75-140
2. Tapia J, Freer J, Mansilla J, Villaseñor J. Estudio de reducción fotocatalizada de cromo hexavalente Bol. Soc. Chil. Quím., 2002; 47 (4):
3. Aloy M. Tannerie et Pollution, Centre Technique du Cuir, Lyon, 1976; 1: 40
4. Garg SK, Tripathi M, Srinath T. Strategies for chromium bioremediation of tannery effluent. Rev Environm Contamin & Toxicol. 2012; 217: 75-140
5. Jian-Kun Zhang & Zhen-Hua Wang & Yun Ye. Heavy Metal Resistances and Chromium Removal of a Novel Cr (VI)-Reducing *Pseudomonas* Strain Isolated from Circulating Cooling Water of Iron and Steel Plant. Appl Biochem Biotechnol. 2016; 1(2): 2-3
6. Oves M, Khan MS, Zaidi A. Chromium reducing and plant growth promoting novel strain *Pseudomonas aeruginosa* OSG41 enhance chickpea growth in chromium amended soils. Eur J Soil Biol. 2013; 56:72-83
7. Huang H, Wu K, Khan A, Jiang Y. A novel *Pseudomonas gessardii* strain LZ-E simultaneously degrades naphthalene and reduces hexavalent chromium. Bioresource Technol. 2016; 207: 370-378
8. Jeyalakshmi D, Kanmani S. Bioremediation of chromium contaminated soil by *Pseudomonas fluorescens* and indigenous microorganisms. J Environ Sci Eng. 2008; 50(1):1-6.
9. Ali Khan MW1, Ahmad M. Detoxification and bioremediation potential of a *Pseudomonas fluorescens* isolate against the major Indian water pollutants. J Environ Sci Health & Tox Hazard Subst Environ Eng. 2006; 41(4):659-74.