

EFFECTOS CITÓTOXICOS DEL Cr(VI) SOBRE EL DESARROLLO DE CEPAS BACTERIANAS AISLADAS DE UN SITIO CONTAMINADO CON CROMATOS.

⁽¹⁾Cortés Camacho, E.; Martínez Palacios, C.E. ⁽²⁾ y Reyna López, G. E. ⁽²⁾

⁽¹⁾Facultad de Química Universidad Autónoma de Querétaro.

⁽²⁾Departamento de Biología/ División de Ciencias Naturales y Exactas Universidad de Guanajuato.

RESUMEN

En trabajos previos realizados en el laboratorio, se habían aislado y caracterizado 6 cepas bacterianas resistentes a cromatos, provenientes de un sitio contaminado con cromatos. Por pruebas bioquímicas y morfológicas se había establecido que las cepas eran muy semejantes o iguales entre sí; sin embargo no se conoce el efecto que los elevados niveles de cromatos tienen sobre el crecimiento, la morfología y la capacidad de reducir el Cromo, de estas cepas. Por ello, en el presente trabajo se llevaron a cabo experimentos para determinar en que medio de cultivo crecen y reducen Cromo mejor, así como el efecto que sobre el crecimiento y la morfología de estas cepas bacterianas, tienen elevadas concentraciones de cromatos. Los resultados nos indicaron que tanto el crecimiento como la reducción de cromo de las diferentes cepas se dan de mejor manera en el medio de soya.

INTRODUCCIÓN.

Debido a actividades industriales tales como el cromado electrolítico y el curtido de cuero, algunos sitios de Guanajuato se encuentran contaminados con Cr(VI). El cromo se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza en estados de oxidación que van desde el 0 hasta el + 6; siendo los más estables el +III y el +VI. De estas especies, se conoce que Cr(VI) tiene un mayor potencial tóxico, por su solubilidad y capacidad de ser transportado a través de membranas biológicas. También se han descrito que tiene efectos genotóxicos, mutagénicos y carcinogénicos (ASTDR, 2000) sin embargo todos estos efectos se han descrito para sistemas complejos tales como células en cultivo, plantas y animales (Piñon-Castillo y col., 2010).

A la fecha no existen estudios, o son muy pocos, en los cuales se describa el efecto que el cromo, ya sea +3 o +6 tienen sobre sistemas microbianos.

Los métodos convencionales usados para la recuperación de efluentes contaminados con cromo, van desde la precipitación química, oxidación o reducción, intercambio iónico, filtración y tecnologías de membrana hasta la recuperación por evaporación; sin embargo estos procesos pueden llegar a ser ineficaces, especialmente en la disposición y almacenamiento de sus desechos (Agrawal y col., 2006).

Considerando que en los lugares donde se procesa, usa y desecha cromo se encuentran microorganismos, es de esperar que estos hayan desarrollado estrategias para tolerarlo y/o eliminarlo. Se conoce que algunas de estas estrategias pueden ser la adsorción, la biotransformación (de Cr +6 a Cr +3) y la expulsión del ión hacia fuera de la célula (Cervantes y col., 2004). Al poseer algunas de estas estrategias, es que se ha propuesto el uso de microorganismos como una alternativa para el tratamiento de estos sitios contaminados con Cr(VI) (Piñon-Castillo, Tesis doctoral en proceso).

EXPERIMENTAL.

Cepas y Medios de cultivo. En este trabajo se usaron las cepas bacterianas denominadas como 13, 16, 21, 24, 26 y 34, aisladas del suelo y las tinas de lavado de la cromadora

“Domínguez”, ubicada en la ciudad de Celaya, Gto (Vázquez Rivera, 2008). Los medios de cultivo usados para los diferentes experimentos fueron LB, Soya, Nutritivo y M9, tanto sólidos como líquidos.

Determinación de crecimiento y del efecto del Cr(VI) sobre el mismo. Para estas determinaciones se usaron placas de 96 pozos conteniendo los diferentes medios de cultivo líquido, los cuales se inocularon con una asada de cada cepa. En estas condiciones las placas se incubaron por 24 h a 37°, para luego determinar el crecimiento por medición de la D.O._{620nm}, en un lector de placas y tomando el medio sin inocular como blanco.

Los resultados obtenidos para cada una de las cepas nos permitió elegir el medio en el cual había un mejor crecimiento. Después de esto, se inocularon tubos de ensayo conteniendo 3 mL del medio en el que mejor se desarrollaban, con diferentes concentraciones de Cr(VI). Los tubos se incubaron por 24 h a 30°C y 200 r.p.m., determinando crecimiento de la manera ya descrita a las 12 y 24 h. En alícuotas de estos mismos cultivos se determinó la concentración de Cr(VI) por el micrométodo de la difenilcarbazida (Greenberg y col., 1981).

Efectos del Cr(VI) sobre la morfología. De los cultivos bacterianos conteniendo diferentes concentraciones de Cr(VI) se tomaron alícuotas las cuales se pusieron en tubos eppendorf para adicionarles formaldehído hasta una concentración al 10%. Las alícuotas se almacenaron en refrigeración a 4 °C para después tomarles fotografías con el microscopio axiostar plus de Carl Zeiss a una amplificación 100X

DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Efecto del Cr(VI) sobre el crecimiento bacteriano. De acuerdo a los resultados obtenidos durante el crecimiento de las cepas en los diferentes medios, elegimos seguir trabajando para todas ellas con medios líquidos de Soya (complejo) y M9 (mínimo).

Después de estos resultados, las diferentes cepas bacterianas se crecieron en ambos medios en cultivos de 3 mL, de acuerdo a lo descrito en la metodología, determinando el crecimiento por D.O._{620 nm}. Los medios contenían diferentes concentraciones de Cr(VI) desde 0 hasta 100 ppm. Los resultados se muestran en la Figura 1 (panel A a F), en donde se puede observar que a medida que la concentración de Cromo aumenta, hay una mayor inhibición del crecimiento (disminución de la D.O. comparado con el que no contiene Cromo) y que, al parecer, los ingredientes del medio complejo (Soya), ayudan a las bacterias a contrarrestar el efecto inhibitorio del Cr(VI). Es también notorio que las cepas 13,16 y 34 tienen una mayor capacidad para soportar elevadas concentraciones del ión.

Efecto del Cr(VI) sobre la capacidad bacteriana para disminuir la concentración del ión. Esta capacidad también es función de la concentración del ión, pues como se muestra en la **Figura 2**, a mayor concentración, las cepas bacterianas tienen una menor capacidad para disminuirlo. Esta capacidad se observa mejor en medio complejo (Soya) que en medio mínimo. En la Figura también se observa que la mayor disminución del ión se realiza en las primeras 12 h (un 60%), siendo las cepas 13, 26 y 34 con mayor capacidad de remoción, aún con 50 o 100 ppm. De todas las cepas probadas, la 21 mostro la mayor capacidad para disminuir la concentración del Cr(VI).

CONCLUSIONES.

- El Cr(VI) tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento bacteriano, el cual es directamente proporcional a la concentración del ión en el medio de cultivo.
- Al parecer, los medios complejos (Soya) favorecen tanto el crecimiento como la disminución de cromo.

- Todas las cepas bacterianas probadas tienen la capacidad de disminuir la concentración de Cr(VI) en el medio de cultivo.
- Esta capacidad es mayor para las cepas 13, 26 y 34, a concentraciones menores; a 50 y 100 ppm de Cr(VI), la de mayor capacidad de disminución es la cepa 21.
- De acuerdo a los niveles de crecimiento de cada cepa, no se observa una relación directa de este parámetro con la capacidad de disminución de Cr(VI).

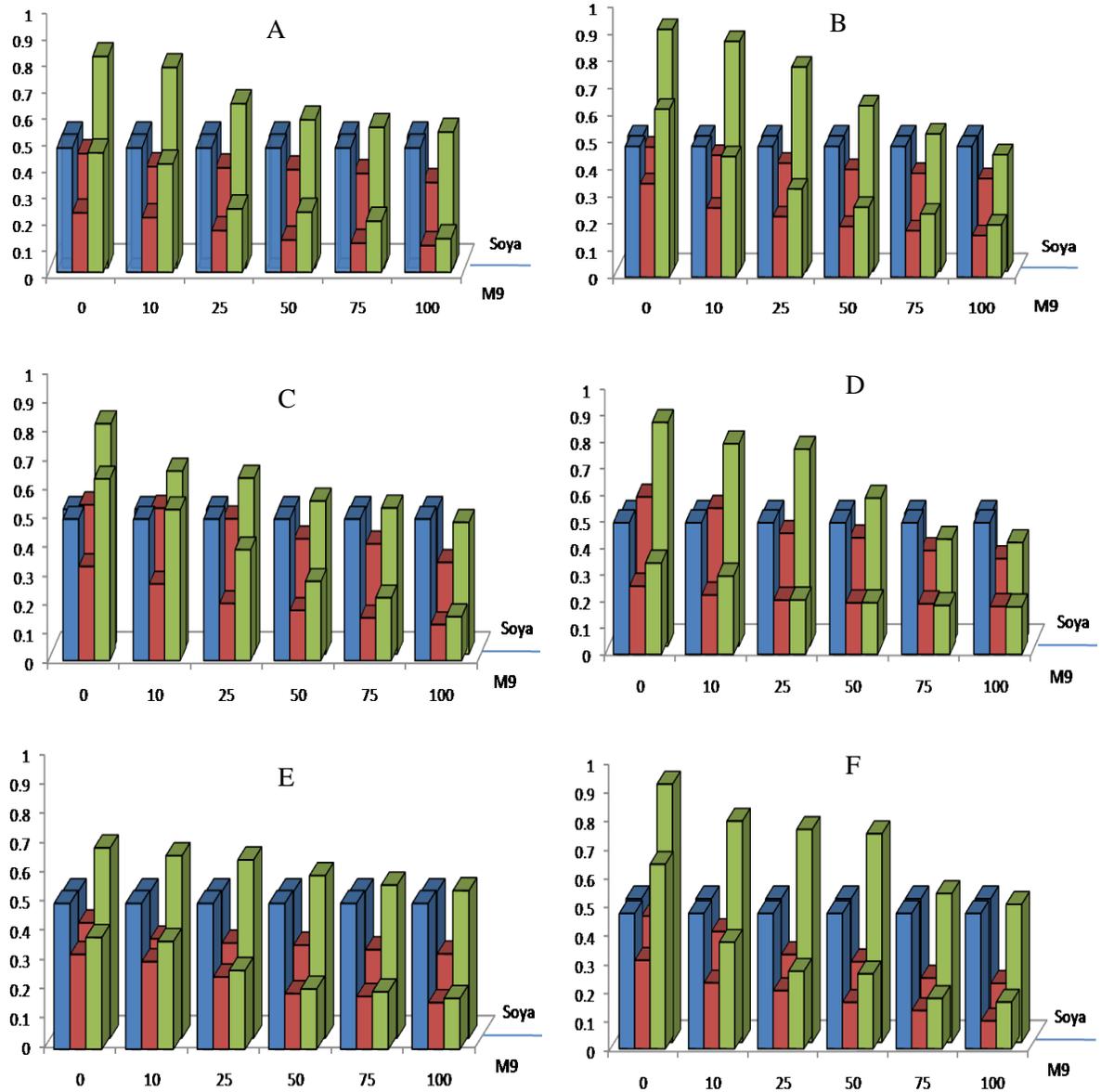


Figura 1. Efecto del Cr(VI) sobre el crecimiento. Se determinó el crecimiento por D.O. 620 nm en medio M9 y de soya de las cepas 13 (A), 16 (B), 21 (C), 24 (D), 26 (E) y 34 (F), conteniendo diferentes concentraciones de Cr(VI) (indicados en ppm en el eje X. Estas determinaciones se realizaron al tiempo 0 (■), 12 h (■) y 24 h (■) de incubación a 37°C y agitación rotatoria.

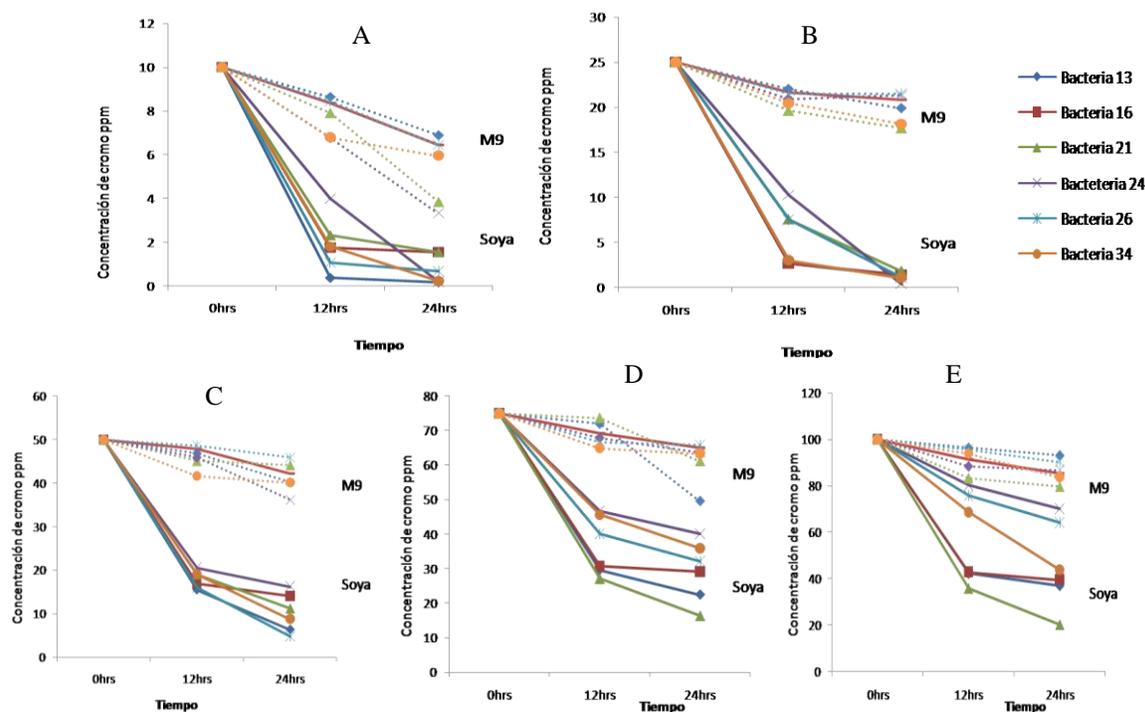


Figura 2. Efecto del Cr(VI) sobre la capacidad bacteriana para disminuir la concentración del ion. A las diferentes cepas bacterianas (recuadro superior derecho) se les determino la capacidad para disminuir la concentración de Cr(VI) adicionado al medio de cultivo. En el panel A, los cultivos contenían 10 ppm de Cr(VI), en B 25 ppm, en C 50 ppm, en D 75 ppm y en E 100 ppm.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Agrawal, A., Kumar, V. y Pandey, B.D. "Remediation options for the treatment of electroplating and leather tannin effluent containing chromium-A Review". *Miner Process Extr Metall Rev* **27**, 99-130, **2006**.
- ASTDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Division of Toxicology, **2000**.
- Cervantes C. Campos-Garcia J., Devars S., Gutierrez-Corona F., Loza-Tavera H., Torres-Guzman J. y Moreno-Sanchez R. "Interactions of chromium with microorganisms and plants". *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 335-347, **2004**.
- Greenberg, A.E., Connors, J.J., Jenkis, D. y Franson, M.A. "Standard methods for the examination of water and wastewater", 15thed., pp.187-190, Amer Public Health Assoc Washington, D.C., **1981**
- Piñon Castillo, H.A., Brito E.M.S., Goñi Urriza M.S., Guyoneaud R., Duran R., Nevarez Moorillon V.G., Gutierrez Corona J.F., y Reyna López G.E. "Hexavalent Chromium Reduction by Bacterial consortia and pure strains from an alkaline Industrial Effluent". En revisión, **2010**.
- Piñón-Castillo H. Tesis doctoral en proceso.
- Vázquez Rivera, R. "Aislamiento de microorganismos resistentes a cromato provenientes de desechos industriales". Tesis de Licenciatura. Universidad de Guanajuato, **2008**.