



## **Evaluación de la capacidad de remoción de Cr(VI) en medio líquido mediante hongos endófitos.**

María Guadalupe González Bravo

Vicente Peña Caballero

Adan Topiltzin Morales Vargas

Universidad de Guanajuato, Departamento de Ingeniería Agroindustrial,

CP: 38060, Celaya, Gto.

### **Resumen**

El cromo es un metal de transición duro, blanco y plateado resistente a la corrosión y en su forma hexavalente es considerado altamente tóxico para el ser humano. Sin embargo, se han encontrado alternativas para contrarrestar la contaminación por Cr(VI), en hongos filamentosos se ha encontrado resistencia a Cr(VI) mediante el aislamiento de microorganismos encontrados en ambientes contaminados con cromo (Cervantes et. al, 2001). En esta investigación se trabajó con cepas de hongos endófitos, las cuales se evaluaron en experimentos de tolerancia a crecer en medio PDA adicionado con cromo y posteriormente se realizaron cinéticas de reducción en concentraciones de 50 y 100 ppm de Cr(VI) respectivamente. Las cinéticas se evaluaron a tres valores de pH: 4.5, 5 y 6. Teniendo como objetivo evaluar a qué concentración de Cr(VI) y que valor de pH se obtenía el mejor rendimiento de disminución de Cr (VI). Siendo dos de las cepas evaluadas las que cumplieron con el objetivo planteado.



## Introducción

Diversos microorganismos se han utilizado para la biorremediación de ambientes contaminados con metales pesados, como el cromo, plomo, arsénico, entre otros. Un ejemplo de estos microorganismos son los hongos endófitos, los cuales colonizan los órganos de las plantas y son transitoriamente asintomáticos (Stone et. al, 2000). En este proyecto se evaluaron 20 cepas de hongos endófitos aisladas del lirio acuático el cual se encuentra en un efluente de residuos industriales, se determinó su capacidad de reducción de Cr(VI) a diferentes concentraciones y valores de pH en medio líquido.

## Objetivos

- Determinar la capacidad de disminución de Cr(VI) en medio líquido sobre biomasa de hongos endófitos.
- Determinar a qué pH ocurre la mayor disminución de Cr(VI) en medio líquido.

## Justificación

La contaminación del ecosistema por cromo generalmente ocurre por desechos industriales, especialmente por la tenería, conservación de la madera, pigmentos, industria automotriz, entre otros (Owlad et. al, 2009). En 1978, una compañía ubicada en el Estado de México que se dedicaba al cromado fue cerrada debido a las constantes quejas de los vecinos, por el daño ambiental que esta causaba alrededor de 3600 toneladas de Cr(VI) fueron encontradas en el lugar (Castro-Rodríguez et. al, 2015), en consecuencia, se han encontrado concentraciones de Cr(VI) de 3.93 a 116 mg/L en pozos de agua cercanos, lo que supera la concentración permitida por la OMS en agua (II UNAM, 2009). La mayoría de las industrias causantes de este tipo de contaminación se encuentran asentadas en Guanajuato, causando un problema de contaminación en los mantos freáticos. Desde hace algunos años se han buscado soluciones a este problema, sin embargo, las



técnicas de remoción de Cr(VI) son costosas y, además incluyen el uso de agentes químicos lo que al final resulta en una contaminación secundaria incrementando así el problema de contaminación (Sen y Dastidar, 2010). Por otra parte, se han buscado alternativas para disminuir el uso de agentes químicos, una de estas alternativas es el uso de la biorremediación la cual es un proceso en la que se utilizan principalmente microorganismos para degradar los contaminantes a formas menos tóxicas (Vidali, 2001) para que puedan estar dentro de los rangos establecidos en los cuales no representan un daño en el ecosistema (Mueller et. al, 1996). Por lo que con este trabajo se busca brindar una solución alternativa al tratamiento químico de efluentes contaminados con Cr(VI) utilizando hongos endófitos.

### **Metodología**

Las 20 cepas de hongos endófitos que se utilizaron en este proyecto fueron aisladas en trabajos anteriores del Lirio acuático (*Eichhornia crassipes*) en el Canal “Ing. Antonio Coria” ubicado en la ciudad de Irapuato, Gto. Y fueron donadas por el laboratorio de diversidad e interacciones microbianas del Instituto Tecnológico Superior de Irapuato (ITESI). Las cepas fueron sembradas en medio PDA e incubadas a 28 °C hasta que se observó crecimiento.

Antes de realizarse las cinéticas de reducción de Cr(VI) con diferentes valores de pH, se llevó a cabo un análisis de 20 cepas en medio PDA adicionado con una solución de cromo a diferentes concentraciones para evaluar su tolerancia de crecimiento. De las 20 cepas evaluadas, seis mostraron tolerancia a crecer en diferentes concentraciones de cromo.

Una vez identificadas las cepas que presentaron tolerancia a crecer en PDA adicionado con cromo se llevaron a cabo las cinéticas de reducción con una concentración de 50 y 100 ppm de Cr(VI). Se evaluaron tres valores de pH: 4.5, 5 y 6, para lo cual se utilizó un buffer citratos con una concentración de 0.1 M. Cada cinética se hizo por triplicado.



Se utilizó un medio basal mínimo compuesto por: glucosa 20 g/L,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 g/L,  $\text{CaCl}_2$  0.6 g/L,  $\text{FeSO}_4$  0.005 g/L,  $\text{CoSO}_4$  0.002 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0.6 g/L.

Para conocer la cantidad de esporas con el que serían inoculados los matraces, se estandarizó el número de esporas. Se utilizó una solución de Tween 80 al 1%, para realizar un lavado de esporas, se hicieron diluciones a la  $-1$  y  $-2$  y posteriormente se contaron en cámara de Neubauer. Una vez conocido el número de esporas que se utilizarían como inóculo, se agregó a los matraces el medio basal mínimo y la cantidad de la solución de dicromato de potasio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ) necesaria para llevar el medio a concentraciones de 50 y 100 ppm respectivamente, de igual manera se agregó la cantidad de buffer necesario para llevar a los valores de pH anteriormente mencionados. Antes de agregar el inóculo se tomó una muestra de 1 mL en microtubos de centrifuga estériles para tomarlo como control de referencia, los microtubos se llevaron a congelación a  $-20$  °C y posteriormente se agregó el inóculo a cada matraz. Los matraces se llevaron a incubación a  $28$  °C a 150 rpm durante cinco días. Cada 24 horas se tomó una muestra de 500  $\mu\text{l}$  cada matraz y se llevaron a congelación.

Al transcurrir los cinco días las muestras fueron analizadas por el método de la 1,5-difenilcarbazida, la cual en medio ácido reacciona con el Cr(VI) dando un color rojo violeta. Este análisis se basó en la Norma Mexicana (NMX-AA-044-SCFI-2014).

Previo al análisis, las muestras se descongelaron y posteriormente se centrifugaron a 10000 rpm durante cinco minutos. El análisis se llevó a cabo en matraces aforados de 5 mL mediante la siguiente metodología:

1. En cada matraz se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de la muestra.
2. Se agregaron 50  $\mu\text{l}$  de la solución de ácido sulfúrico al 50 %.
3. Se agitaron brevemente.



4. Se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de la solución de difenilcarbazida al 0.5 %.
5. Se agitaron brevemente.
6. Se aforaron con agua desionizada.
7. Se agitaron brevemente.
8. Se dejaron reposar por 5 min.

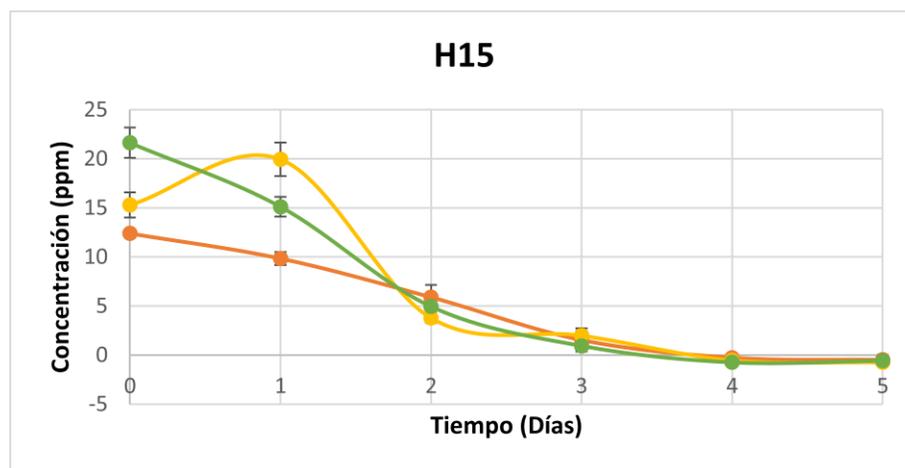
Una vez transcurrido ese tiempo, en una placa de 96 pocillos se colocaron 100  $\mu\text{l}$  de la solución de cada matraz por triplicado, se leyó al espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

Posteriormente los resultados obtenidos fueron comparados con la curva de calibración previamente hecha.

## Resultados

Las seis cepas que presentaron tolerancia a crecer en medio PDA adicionado con cromo fueron utilizadas para realizar las cinéticas en las cuales dos cepas H15 y H33 mostraron la mejor disminución de Cr(VI) en un valor de pH: 6 y a una concentración de 50 ppm de Cr(VI).

En la figura 1 se pueden observar las curvas de concentración para la cepa H15, donde en el primer día dos de las curvas siguen la misma tendencia de disminución, sin embargo, a partir del segundo día las tres curvas muestran la misma tendencia de disminución hasta que llegan a un valor de cero.



**Figura 1.** Evolución de la disminución de Cr(VI) a 50 ppm inicial sobre la cepa H15.



Mientras que, en la figura 2 se muestran las curvas de concentración para la cepa H33 la cual en el primer y segundo día dos de las curvas siguen la misma tendencia de disminución de cromo mientras que la tercera sigue la misma tendencia hasta el tercer día para finalmente el quinto día las tres curvas llegan a un valor alrededor de uno.

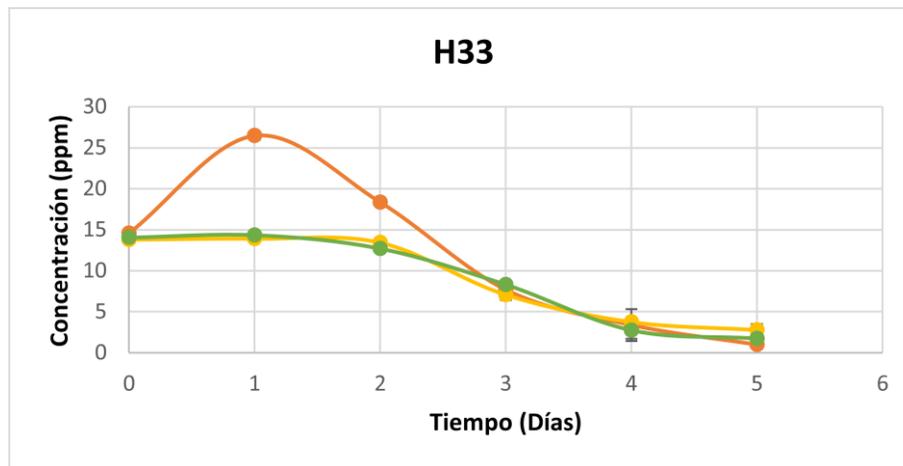


Figura 2. Evolución de la disminución de Cr(VI) a 50 ppm inicial sobre la cepa H33.

## Conclusiones

De las 20 cepas evaluadas en medio PDA con cromo, seis mostraron tolerancia a crecer en presencia de este y de las cuales dos mostraron la mejor capacidad de disminución de Cr(VI) en concentración de 50 ppm.

La cepa H15 obtuvo una disminución de la concentración inicial de Cr(VI) en un 100 %. Mientras que la cepa H33 obtuvo un 85 % de disminución de la concentración inicial de Cr(VI).

Sen et. al. (2013), Acevedo et. al (2006) y Sharma y Malaviya (2014), han demostrado que *Fusarium spp.* Tiene la capacidad de remover Cr(VI) hasta en 500 ppm, siendo estos aislados de ambientes contaminados con este metal.



## Referencias

- I. Acevedo-Aguilar, F. J., Espino-Saldaña, A. E., Leon-Rodriguez, I. L., Rivera-Cano, M. E., Avila-Rodriguez, M., Wrobel, K., ... & Gutiérrez-Corona, J. F. (2006). *Hexavalent chromium removal in vitro and from industrial wastes, using chromate-resistant strains of filamentous fungi indigenous to contaminated wastes. Canadian journal of microbiology*, 52(9), 809-815. doi: 10.1139/w06-037
- II. Castro-Rodríguez, A., Carro-Pérez, M. E., Iturbe-Argüelles, R., & González-Chávez, J. L. (2015). *Adsorption of hexavalent chromium in an industrial site contaminated with chromium in Mexico. Environmental earth sciences*, 73(1), 175-183. doi: 10.1007/s12665-014-3405-4
- III. Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzmán, J. C., & Moreno-Sánchez, R. (2001). *Interactions of chromium with microorganisms and plants. FEMS microbiology reviews*, 25(3), 335-347. doi: 10.1111/j.1574-6976.2001.tb00581.x
- IV. II-UNAM (Instituto de Ingeniería, UNAM) (2009) *Ejecución de pruebas de bombeo y de tres pozos de monitoreo para el saneamiento del acuífero Cuautitlán-Pachuca contaminado localmente en el municipio de Tultitlán, Edo. de México*. No. De convenio SGT-GAS-002-2008
- V. Owlad, M., Aroua, M. K., Daud, W. A. W., & Baroutian, S. (2009). *Removal of hexavalent chromium-contaminated water and wastewater: a review. Water, Air, and Soil Pollution*, 200(1-4), 59-77. doi: 10.1007/s11270-008-9893-7
- VI. Sen, M., Dastidar, M. G. (2011). *Biosorption of Cr (VI) by resting cells of Fusarium solani. Journal of Environmental Health Science & Engineering*, 8(2), 117-120.



- VII. Sen, M., Dastidar, M. G., & Roychoudhury, P. K. (2013). *Hexavalent chromium reduction and its distribution in the cell and medium by chromium resistant Fusarium solani. International Journal of Engineering and Technology Innovation*, 3(1), 1.
- VIII. Sharma, S., & Malaviya, P. (2014). *Bioremediation of tannery wastewater by chromium resistant fungal isolate Fusarium chlamydosporium SPFS2-g. Current World Environment*, 9(3), 721. doi: 10.12944/CWE.9.3.21
- IX. Stone, J. K., Bacon, C. W., & White Jr, J. F. (2000). *An overview of endophytic microbes: endophytism defined. In Microbial endophytes* (pp. 17-44). CRC Press.
- X. Vidali, M. (2001). *Bioremediation. an overview. Pure and Applied Chemistry*, 73(7), 1163-1172. doi: 10.1351/pac200173071163