

Biorremediación de cromo VI de aguas residuales de curtiembres por *Pseudomonas sp* y su efecto sobre el ciclo celular de *Allium cepa*.

Capacity of chromium VI bioremediation from waste waters of tanneries by *Pseudomonas sp* and its effect over the cellular cycle of *Allium cepa*

OTINIANO GARCÍA, Milly¹; TUESTA COLLANTES, Lurdes²; ROBLES CASTILLO, Heber³; LUJÁN VELÁQUEZ, Manuela⁴ y CHAVEZ CASTILLO, Milciades⁵.

RESUMEN

Con el objeto de evaluar la capacidad de biorremediación de cromo VI de aguas residuales de curtiembres por *Pseudomonas sp*, y su efecto sobre el ciclo celular de *Allium cepa*, se trabajó en un biorreactor de tanque agitado, al que se adicionó glucosa, aminoácidos, sales minerales y el inóculo de *Pseudomonas* a una concentración equivalente a 3×10^5 células/mL. El proceso fue monitoreado cada 24 horas durante 6 días, mediante: Determinación de cromo total y cromo VI por espectrofotometría de absorción atómica; recuento microbiano por el método de placa vertida y determinación de pH por potenciometría. Se observó que *Pseudomonas sp.* no lleva a cabo una reducción significativa de cromo VI, pues solo lo reduce en un 13,51%, con una velocidad de reducción de $4,16 \times 10^{-4}$ ppm/h, mientras el cromo total alcanza una reducción considerable a las 24 horas pasando de 2460 a 340 ppm. Con una velocidad de reducción de 89.166 ppm/h. Se observa que en este mismo tiempo de tratamiento la población bacteriana alcanza su fase logarítmica, alcanzando una velocidad de crecimiento de 0,198/h y que la población empieza a disminuir a partir de las 24 horas, después de las 24 horas no hay reducción de cromo total en cantidades apreciables. Al determinar el efecto sobre el ciclo celular de *Allium cepa* se observa que se produce daño celular en todas las concentraciones por lo que se concluye que no se alcanza un nivel de reducción suficiente para evitar el daño celular y para ser aceptable según las normas de saneamiento de aguas residuales.

Palabras clave: Biorremediación, *Pseudomonas*, ciclo celular.

ABSTRACT

In order to evaluate the capacity of chromium VI bioremediation from waste waters of tanneries by *Pseudomonas sp* and its effect over the cellular cycle of *Allium cepa*, it was worked in a bioreactor of stirring tank, adding glucose, amino acids, mineral salts as nutrients and an inoculum at equivalent concentration of 3×10^6 cell/mL. The process was monitored every 24 hours during 6 days, by means of: Determination of total chromium and VI chromium by atomic absorption spectrophotometry; microbial recount by the poured badge method and pH determination by potentiometer. It was observed that *Pseudomonas sp.* doesn't carry out a significant reduction of VI chromium, because only reduces it in 13,51%, with a rate of reduction of $4,16 \times 10^{-4}$ ppm/h, while total chromium reaches a considerable reduction at the 24 hours passing from 2460 to 340 ppm. With a rate of reduction of 89.166 ppm/h. It was observed that in this same time of treatment the bacterial population reaches its logarithmic phase, reaching a growth rate of 0,198/h, and that the population begins to diminish since the 24 hours, after the 24 hours there is not reduction of total chromium in appreciable quantities. When determining the effect on the cellular cycle of *Allium cepa* it was observed that cellular damage takes place at all the concentrations. It was concluded that was not reached a level of enough reduction to avoid the cellular damage and to be acceptable according to the standards of saneation of residual waters.

Key words: Bioremediation, *Pseudomonas*, cell cycle.

1. Docente Universidad Nacional de Trujillo, Facultad de Ciencias Biológicas.

1. Docente Universidad Nacional de Trujillo, Facultad de Ciencias Biológicas.

1. Docente Universidad Nacional de Trujillo, Facultad de Ciencias Biológicas.

1. Docente Universidad Nacional de Trujillo, Facultad de Ciencias Biológicas.

1. Docente Emérito. Universidad Nacional de Trujillo, Facultad de Ciencias Biológicas.

Correspondencia: revistamedica@ucv.edu.pe Escuela de Medicina Universidad César Vallejo. Telf. 485000 anexo 5096. Trujillo, Perú

INTRODUCCIÓN

Las aguas residuales son materiales derivados de la actividad industrial y de los residuos domésticos, los cuales por razones de salud pública no pueden ser vertidos a los cursos de aguas corrientes o lagos. A pesar de las recomendaciones y ordenanzas en los últimos años los ambientes naturales han recibido un creciente aporte de efluentes industriales y domésticos que han llevado al deterioro de muchos cursos de agua haciéndolos incompatibles con la vida.

Los efluentes industriales que contienen Cr (VI) son descargados por industrias químicas, de construcción de maquinarias e instrumentos, de radio electrónica, curtiembres, efluentes de torres refrigerantes de estaciones generadoras de energía eléctrica, entre otras. La concentración de Cr (VI) varía en los efluentes desde docenas a cientos de gramos o miligramos, la cantidad de aguas contaminadas con cromo que se vierten al ambiente varía de docenas a cientos de metros cúbicos por hora (UNEP y CIP, 1998). Aun cuando internacionalmente las Concentraciones Máximas permitidas (MAC) en el ambiente son 0,1 mg/L de Cr (VI) y 0,5 mg/L de Cr (III).

Las operaciones y procesos de las curtiembres generan líquidos y sólidos que se distinguen por su elevada carga orgánica y presencia de agentes químicos que pueden tener efectos tóxicos, como es el caso del sulfuro y el cromo. Las variaciones en cuanto al volumen de los residuos y a la concentración de la carga contaminante se presentan de acuerdo a la materia prima procesada y a la tecnología empleada (1).

El cromo en la etapa de curtido, es uno de los contaminantes, que produce impactos negativos en el crecimiento del país, ya que compromete la salud humana, dañando los procesos ecológicos que sostiene la producción de alimentos, y desde el punto de vista económica la descarga de residuos es un desperdicio de recursos que son escasos (2).

Existen referencias sobre el cromo; que indican que es un metal pesado que funciona químicamente con distintas valencias: bivalente, trivalente y hexavalente, siendo este último de gran importancia por su alto poder tóxico. El cromo trivalente y el cromo hexavalente en particular es un desnaturador de proteínas y precipitante de los ácidos nucleicos; además, es considerable la acción cancerígena de los cromatos sobre el pulmón y el aparato digestivo (3).

El Cr (VI) por ser un poderoso oxidante de sustancias orgánicas, es peligroso para los organismos vivos y para la salud humana. El ácido crómico y los cromatos pueden producir intoxicaciones accidentales agudas por vía

digestiva. El envenenamiento agudo por ingestión produce vértigo, sed intensa, dolor abdominal, vómito, choque y oliguria o anuria. La muerte se produce por uremia. La inhalación de vapores de cromo por largos periodos, causa ulceración indolora, hemorragia y perforación del tabique nasal, acompañado de secreción nasal fétida, También se ha observado conjuntivitis, lagrimeo y hepatitis aguda con ictericia. Los datos de laboratorio indican que en personas que sobrepasan el valor máximo permisible hay hematuria y proteinuria y deterioro de la función hepatocelular; así mismo, que el cromo y los cromatos son irritantes y destructores para todas las células del organismo. En las muertes por envenenamiento agudo, se encuentra nefritis hemorrágica. Dreisbach y col (1987). Buzo y col (1960), mencionan que en el segundo período puede aparecer hipotermia y metahemoglobinuria transitorias (5,6).

En contraste con la biorremediación de compuestos orgánicos, que destruyen las moléculas, y dan como productos finales CO₂ o CH₄, los iones de Cromo no son destruidos por procesos microbianos, sin embargo, la molécula que contiene el metal puede ser modificada, inmovilizada, o destoxificada conduciendo a una apreciable o en algunos casos completa remediación del ambiente contaminado.

Las principales vías por las cuales se lleva a cabo esta biorremediación incluyen biosorción, bioacumulación, reducción, solubilización (asociada comúnmente con la oxidación de sulfuros o ión ferroso), precipitación y mutilación. Algunas de estas tecnologías son desarrolladas completamente y han sido y siguen siendo usadas en la práctica.

Son muchos los microorganismos que pueden llevar a cabo la reducción de metales como As, Pb, Cu, Mo, U, Se, Bi, Te, Va, Mn, Fe, Ag, Au, Hg y Cr, mediante la reducción convierten un alto estado de oxidación del elemento a un estado de oxidación menor ejemplo: Hg (II) a Hg (0) o Cr (VI) a Cr (III). Entre los microorganismos capaces de reducir iones metálicos tenemos una gran variedad de géneros, y las transformaciones las llevan a cabo de acuerdo a su capacidad fisiológica, algunos lo hacen mediante reacciones enzimáticas, mientras que otros lo hacen mediante la excreción de un compuesto reductor que convierte abióticamente el ión de un alto estado de oxidación a uno menor.

Se han investigado intensamente los potenciales de la biorremediación de cromo, Se han estudiado tres modos: La biosorción, la reducción enzimática, y la reducción abiótica acoplados a la

reducción microbiana del sulfato (7).

Es ampliamente conocido que las bacterias en cultivo pueden reducir cromatos y dicromatos (8), estas bacterias están ampliamente y listas para ser aisladas del suelo, sedimentos y aguas contaminadas, se han reportado especies de *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, entre otras con capacidad de reducir el Cr (VI). Tanto aerobios como anaerobios son activos (7). Los organismos a elegir deben presentar un alto grado de tolerancia. Bajo condiciones adecuadas, se ha logrado 99% de reducción de Cr (VI), pero a concentraciones muy altas del ión, el porcentaje de reducción disminuye (9,10)

Estos materiales tóxicos o indeseables deben ser tratados para hacerlos inocuos. En condiciones de laboratorio, el tratamiento se efectúa en un biorreactor donde se realiza el proceso en forma controlada, es decir, se suministran nutrientes, se inocula con los microorganismos deseados, se dan las condiciones adecuadas de pH y temperatura. Los investigadores en la materia sugieren que el Cr (VI) puede ser reducido en sólidos acuíferos cuando se agrega benzoato como fuente de carbono y energía. Se han llevado a cabo estudios en biorreactores de agitación continua suplementado con molasas como fuente de carbono e inoculado con *Pseudomonas mendocina* (9) y en un biorreactor de lecho empacado, inoculado con *Bacillus sp* (11), logrando la reducción del Cr (VI) y la precipitación de la forma trivalente. Otra manera de lograr la reducción fue la adición de sulfato y la provisión de condiciones anaeróbicas y una fuente de carbono disponible que permita la reducción de sulfato generando H₂S, el H₂S, reacciona abióticamente para reducir Cr (VI).

En nuestro medio, específicamente Trujillo, una de las industrias que destacan es la de curtido de cueros, industria que se inicia en forma artesanal, alcanzando actualmente un gran desarrollo en cuanto a tecnología moderna y prueba de ello es la obtención de productos de óptima calidad, junto a ello se han presentado nuevos problemas como la contaminación

ambiental (12) Trujillo, es el segundo productor de pieles y cueros después de Lima, contando con 122 curtiembres formales, distribuidas de siguiente manera: distrito de Trujillo 17.21%, Porvenir 24.59%, Florencia de Mora 8.20%, La Esperanza 46.72% Laredo 0.82% y Moche 2.46% (13).

La industria de curtiembre es contaminadora y vuelca al ambiente altos contenidos de materia orgánica y concentraciones que alcanzan niveles tóxicos de sustancias como sulfuros y cromo, si el proceso es mineral. Las dos primeras etapas del proceso de curtido, son importantes por el volumen y la carga contaminante de los efluentes que descargan al ambiente y el tercero por las cantidades de residuos sólidos generados en las distintas operaciones del acabado del cuero (14).

En nuestro medio existen reportes de la concentración de cromo en los efluentes de las industrias de curtido de cuero, los cuales sobrepasa los valores máximos permisibles (15,16)

Ante estas alternativas, en las últimas décadas, los estudios en los ambientes acuáticos, se han orientado a las pruebas de bioensayos como técnica y herramienta básica, para evaluar el agua en relación con el tipo de tratamiento y disposición final, utilizando metales pesados (17) pruebas, con las cuales se ha logrado determinar, que los metales pesados cobre, zinc, plomo, hierro, mercurio, arsénico cromo y cadmio, que se encuentran reaccionando en el medio acuático, con frecuencia se acumulan en los tejidos de los organismos y causan efectos de inhibición enzimática y teratológica o en muchos casos muerte de los organismos (18,19,20,21).

Teniendo en cuenta, que la mayoría de industrias dedicadas al curtido de cuero emiten sus efluentes por encima de los valores máximos permisibles y sin ningún tipo de tratamiento a los colectores comunes, los cuales llegan a los ríos, de los que se proveen muchas veces las personas, animales y plantas ya sea de forma directa o indirecta, el presente trabajo tiene como propósito, evaluar la biorremediación de cromo en aguas residuales de curtiembres por *Pseudomonas sp*, y la evaluación de su efecto sobre el ciclo celular de *Allium cepa*.

MATERIAL Y MÉTODO

2.1. MATERIAL BIOLÓGICO: Cultivo puro de *Pseudomonas sp* y Ejemplares de *Allium cepa*

2.2. MATERIAL Y PROCEDIMIENTOS: Para evaluar la biorremediación de cromo VI en aguas residuales de curtiembres se aplicaron las siguientes técnicas:

2.2.1. Acondicionamiento del biorreactor:

Se acondicionó un biorreactor de tanque agitado con turbina tipo Rushton, de 2,5 litros de capacidad (22) con un volumen de trabajo de 2 litros, el cual fue previamente lavado y desinfectado (23). El biorreactor presenta dispositivos de salida de gases, de toma de

muestras, y monitoreo de temperatura y pH (24). El biorreactor se mantuvo en agitación constante durante todo el proceso de biodegradación del cromo (16 días). (Anexo 1)

2.2.2. Preparación del inóculo de *Pseudomonas sp*.

A partir de un cultivo puro de *Pseudomonas sp*, se preparó una suspensión en solución salina fisiológica estéril, similar al tubo N° 1 del Nefelómetro de Mac Farland (concentración aproximada 3×10^8 células/mL), a partir del cual se prepararon 200 mL de una dilución al 1/100 (aproximadamente 3×10^6 células/mL). (Anexo 2)

2.2.3. Preparación del sistema de tratamiento

En el biorreactor de tanque agitado se colocaron en condiciones asépticas:

1675 mL de agua residual de curtiembre, 200 mL de inóculo, 20 mL de solución de glucosa al 25%, 100 mL de peptona al 30%, 05 mL de solución de CaCl_2 al 32%, Luego se puso en marcha el sistema de agitación a una velocidad aproximada de 120 rpm. Durante 16 días. (Anexo 2)

2.2.4. Monitoreo del sistema

A tiempo cero y cada 4 días se tomaron muestras de 50 mL para evaluar:

- Concentración de cromo: Método de espectrofotometría de absorción atómica.
- pH: Potenciometría.
- Recuentos de bacterias: Según la técnica FDA Ch.3 (24).
- Temperatura: Empleando termómetro de 1 -100 °C. (Anexo 2)

2.2.5. Evaluación del efecto del cromo sobre el ciclo celular de *Allium cepa* “cebolla”.

- Se prepararon soluciones ideales de cromo en concentraciones similares a las

concentraciones determinadas en los diferentes tiempos de evaluación.

- En 10 vasos descartables de 4 onzas de capacidad, se colocaron 100 mL de agua de caño, sobre los cuales se colocaron los bulbos de *Allium cepa*, durante tres días realizando cambio diario de agua para estimular la proliferación de raicillas.
- Cuando las raicillas alcanzaron una longitud de 2,5 a 3,0 cm, los bulbos se transfirieron a otros vasos conteniendo las soluciones ideales de cromo a diferentes concentraciones, y dejando dos como testigos, se suministró aire a los vasos con soluciones de cromo mediante una bomba dispensadora, aprox. 0,5 vvm.
- A las 2, 12, 16 y 34 horas, se procedió a cortar de 5 a 10 raicillas y se fijaron con Carnoy's.
- Luego, las raicillas fueron lavadas dos veces con agua destilada, y se colocaron en una luna de reloj.
- Se adicionaron 9 gotas de orceína acética y 1 gota de ácido clorhídrico 1N, se dejó en reposo 30 minutos y se cortó el ápice, el cual se colocó sobre una lámina portaobjeto con una gota de gelatina fenicada, se cubrió con una laminilla y se realizó un aplastamiento uniforme.
- Las láminas debidamente selladas y etiquetadas fueron observadas al microscopio a 40 aumentos para observar si el cromo causa alguna alteración sobre la fase mitótica de las células meristemáticas de *Allium cepa*.

Este procedimiento se repitió para cada una de las concentraciones de cromo evaluadas. (Anexo 3)

2.3. EVALUACION ESTADISTICA: Se empleó el análisis de regresión para calcular la velocidad

RESULTADOS

Al evaluar la capacidad de reducción de cromo VI de aguas residuales de curtiembre por *Pseudomonas sp*, se determinó que la reducción de cromo total ocurre en mayor proporción durante las primeras 24 horas de tratamiento (de 2460 a 320 ppm), como se ilustra en la figura N° 1. En cuanto al cromo VI, a pesar de mostrar una reducción progresiva, los niveles de reducción no son muy significativos (0,37 a 0,35 ppm durante las primeras 48 horas) (figura N° 2).

Se observa que el mayor incremento de

biomasa ocurre durante las primeras 24 horas de tratamiento, alcanzando una velocidad de crecimiento de $0,198 \text{ h}^{-1}$ (Tabla N° 1), después de las cuales los recuentos empiezan a disminuir (Figura N° 3).

El pH sufre una ligera variación de 6,5 a 5,5 durante el proceso (figura N° 3). Al determinar matemáticamente las velocidades de reducción de cromo total y cromo VI se nota claramente que la mayor velocidad de reducción corresponde al cromo total (Tabla N° 1).

Al evaluar el efecto de las concentraciones de cromo sobre el ciclo celular de *Allium cepa*, se observa que el daño celular persiste en todas las concentraciones, siendo más notorio a las 24 y 48 horas en las cuales se observa endurecimiento y

opacidad de las células que impide la visibilidad de la zona intracelular, a partir de las 96 horas el daño se reduce aunque permanece hasta el final del tratamiento (120 horas) (Figuras N° 5a a 5f).

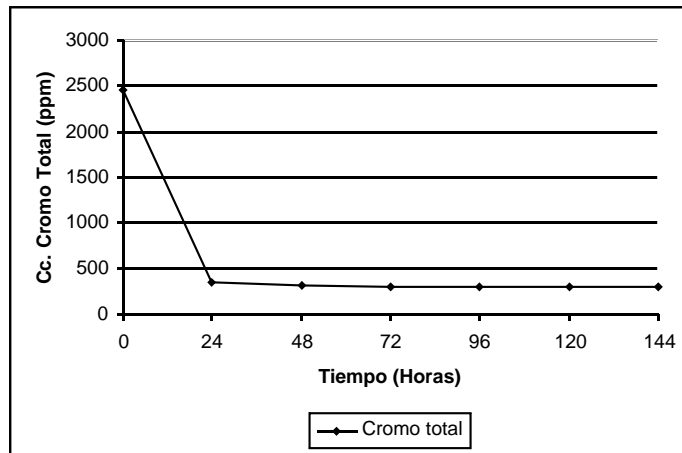


Figura N° 1. Reducción de Cromo total de aguas residuales de curtiembre por *Pseudomonas sp.* en biorreactor agitado.

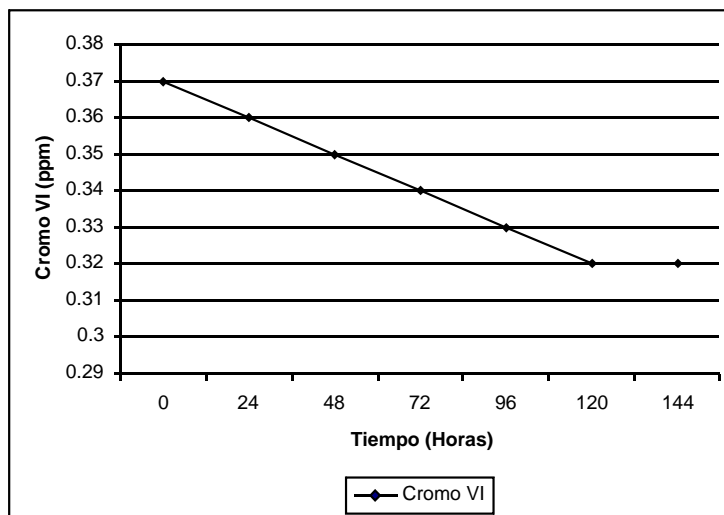


Figura N° 2. Reducción de Cromo VI de aguas residuales de curtiembre por *Pseudomonas sp.* en biorreactor agitado.

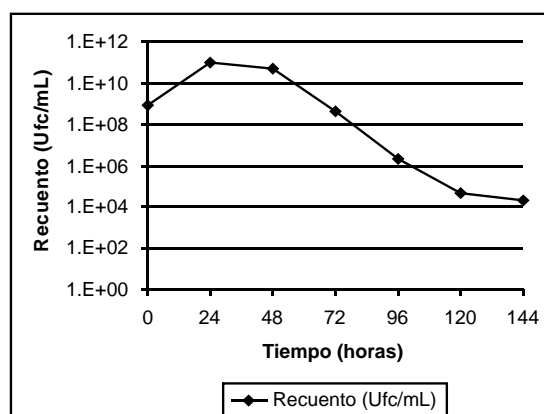


Figura N°3. Curva de crecimiento de *Pseudomonas sp.* durante la biorremediación de aguas residuales de curtiembre en biorreactor agitado.

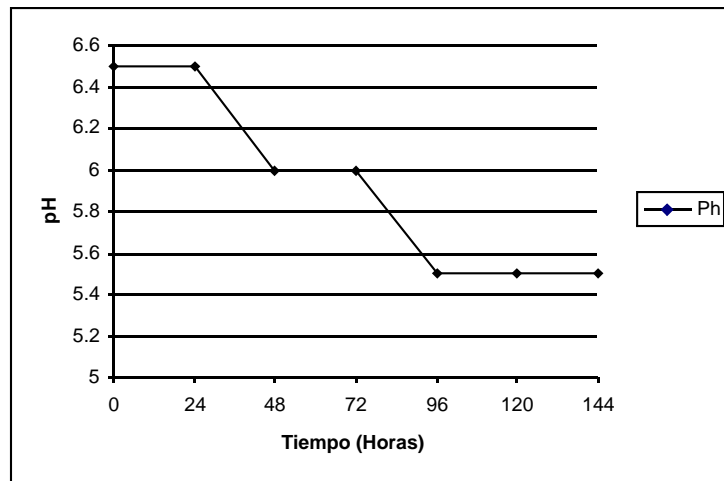


Figura N°4. Variación del pH durante la biorremediación de aguas residuales de curtiembre por *Pseudomonas sp*, en biorreactor agitado.

Tabla N° 1. Velocidad de crecimiento de *Pseudomonas sp*, y velocidades de reducción de cromo total y Cromo VI de aguas residuales de curtiembre a las 24 horas de tratamiento.

Velocidad de crecimiento de biomasa (h ⁻¹)	Velocidad de reducción de Cromo Total (ppm/h)	Velocidad de reducción de Cromo VI (ppm/h)
0,198	89.17	4.16 x 10 ⁻⁴

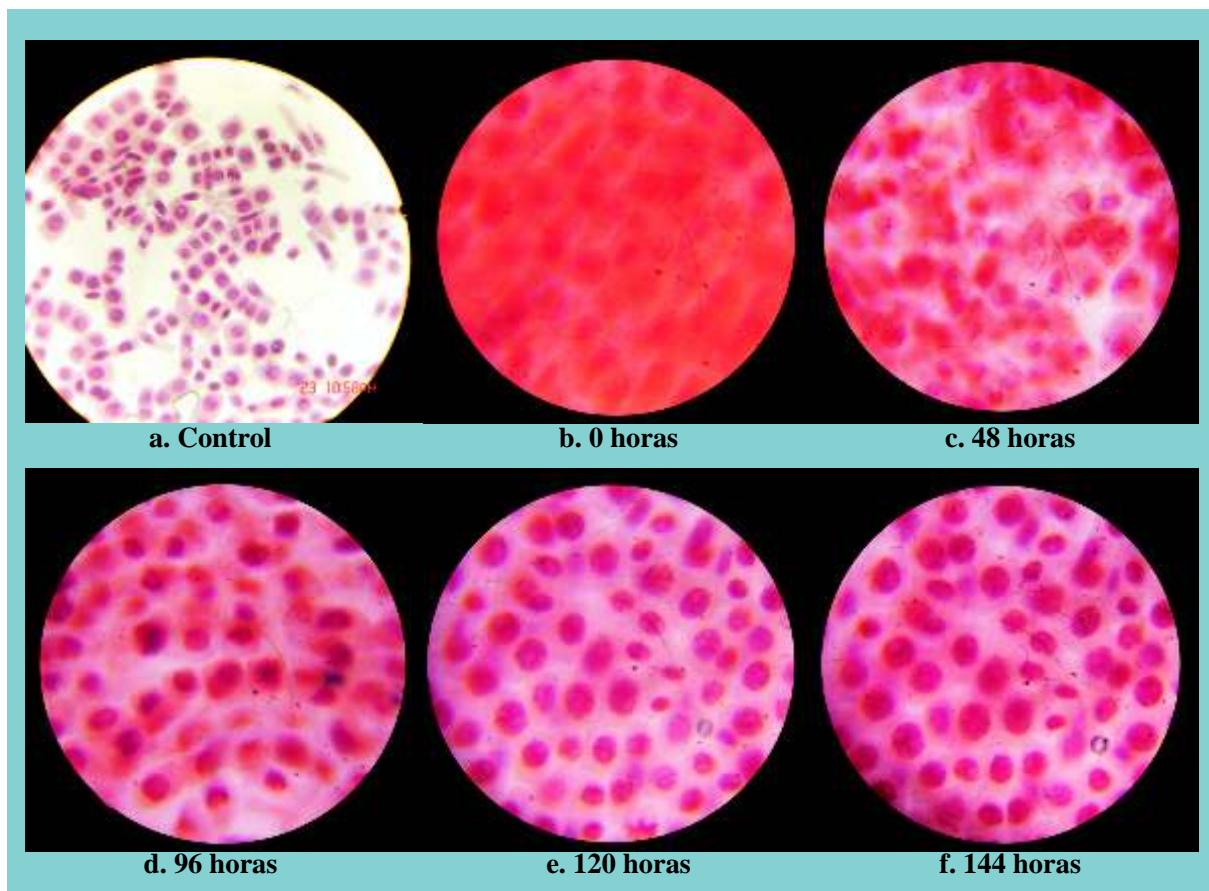


Figura N° 5. Características morfológicas de las raicillas de *Allium cepa* expuestas a las aguas residuales de curtiembre a diferentes tiempos de biorremediación con *Pseudomonas sp*. Microfotografía a 400 aumentos.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos indican que *Pseudomonas sp.* posee una gran capacidad de reducción cromo total, sin embargo, la capacidad de reducción de cromo VI no es muy notoria, pues como se puede observar en la figura N° 2, el cromo VI se reduce de 0,37 a 0,32 ppm en 140 horas (5 días), lo que corresponde al 13,51% del cromo VI inicial, con una velocidad de reducción de 4.16×10^{-4} , la concentración alcanzada continua siendo muy elevada con respecto a las normas Internacionales que solo permiten una concentración máxima de 0,05 ppm (26). Estos hallazgos no coinciden con los de Mc Clean y Beveridge (2000) quienes determinaron que *Pseudomonas* puede reducir el cromo VI a cromo III tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas, mediante una reacción mediada por una enzima reductasa soluble contenida en el citoplasma. Así mismo postularon que la reducción de cromo tanto en condiciones aeróbicas como anaeróbicas puede deberse a una estrategia de destoxicación de las bacterias que puede ser explotada para biorremediar ambientes contaminados con cromo y con metales pesados tóxicos.

Son muchos los factores que pueden hacer variar la capacidad de reducción de cromo por los organismos vivos, entre estos el pH de la solución, la concentración de materia orgánica, la presencia de otras sustancias como los sulfuros metálicos. Esto fue demostrado por Goodel y Col en 1996, (27) quienes observaron que la capacidad de reducción de cromo VI por diversos cultivos bacterianos, aumentaba en presencia de estiércol de vaca, que la presencia de carbono también facilita la reducción del cromo VI, y que el lodo activo, inhibe la biorreducción aeróbica de cromo VI. Por otro lado, Sala y Granhen en 2001 (28), al estudiar la aplicación de la biosorción en la remoción de cromo de efluentes de curtiembres, determinaron que el pH de la solución tiene una influencia muy grande, logrando las mayores remociones a pH 2, mientras que la temperatura al aumentar de 25 a 45 °C provoca una reducción de la capacidad de retención de los adsorbentes. Los investigadores justifican este comportamiento por el aumento de protones ligados a las paredes celulares que aumenta el punto isoelectrico de muchas paredes celulares provocando un acceso más fácil de aniones a lugares cargados positivamente. En este caso se trabajó a temperatura ambiental (19 ± 1 °C) y el pH no bajó de 5,5, lo cual podría haber sido una de las causas ya que para que *Pseudomonas* pueda reducir en cromo VI, este debe ser internalizado a través de las paredes celulares.

En cuanto al crecimiento de *Pseudomonas sp.*, se observa que la mayor proporción de crecimiento se alcanza durante las primeras 24 horas de tratamiento, alcanzando una velocidad de crecimiento de 0,198/hora. Después de este tiempo la población empieza a disminuir, esto se explica porque se está trabajando en un proceso tipo batch, en el cual se coloca una determinada concentración de nutrientes que posiblemente es agotada a las 24 horas, por otro lado las bacterias no metabolizan el cromo, solamente lo reducen por lo que no ayuda en la formación de nueva biomasa, otro aspecto podría ser la saturación de iones de cromo dentro de las estructuras celulares que podrían estar afectando el metabolismo bacteriano, pues como se sabe, el cromo afecta las funciones biológicas, principalmente el crecimiento ya que este metal es bioacumulable, y en el efluente se encuentra en concentraciones muy elevadas con respecto a los máximos límites permitidos en los desagües que varían de 5 a 2 ppm para el cromo trivalente y de 0,2 a 0,05 ppm para el cromo hexavalente. Cuando en el medio ambiente están presentes niveles bajos de cromo, el Cr (III) aparentemente juega un rol esencial en el metabolismo de plantas y animales, mientras que el cromo (VI) es directamente tóxico tanto para bacterias como plantas y animales, además de ser muy móvil y migrar a distancias considerables de su fuente (29).

La concentración de cromo hexavalente en el agua residual también pudo haber influido en la disminución de la población bacteriana pues ciertas concentraciones resultan inhibitorias para las bacterias, como lo demostraron Camargo y col (2004) al estudiar la diversidad de bacterias resistentes al cromo aisladas de suelos contaminados con dicromato, determinando que la concentración mínima inhibitoria de cromo VI que afectaba el crecimiento de las bacterias aisladas fue de 7,5 μ M.

Con relación al efecto que causa el agua residual de curtiembre sobre los organismos vivos, es evidente, ya que estas aguas contienen diferentes compuestos químicos, principalmente los metales pesados.

En este sentido la industria de curtiembres es contaminadora y vierte al ambiente altos contenidos de materia orgánica y concentraciones que alcanzan niveles tóxicos de sustancias como sulfuros y cromo trivalente, si el proceso es mineral. Las dos primeras etapas del proceso de curtiembre, son importantes por el volumen y la carga contaminante de los efluentes que descargan al ambiente y el tercero por las cantidades de residuos sólidos generados en las distintas

operaciones del acabado del cuero (14)

Chiang, 1988, indica que, los factores más peligrosos de contaminación de los cuerpos de agua son los metales pesados, considerados como elementos químicos altamente tóxicos para la mayor parte de organismos en un ecosistema. También es preciso indicar que, estos elementos químicos no se degradan química ni biológicamente, pueden formar compuestos complejos con diferentes iones y moléculas (ejemplo, los grupos amino y sulfhidrilo), y solamente estabilizan su estructura ante la efectividad de las enzimas que controlan las reacciones metabólicas.

Ante esta problemática, en las últimas décadas, los estudios se han orientado a las pruebas de bioensayos como técnica y herramienta básica, para evaluar el agua en relación con el tipo de tratamiento y disposición final, utilizando metales pesados (14). Mediante estas pruebas, se ha logrado determinar, que los metales pesados cobre, zinc, plomo, hierro, mercurio, arsénico, cromo y cadmio, se encuentran reaccionando en el medio acuático, que con frecuencia se acumulan en los tejidos de los organismos y causan efectos teratológicos y de inhibición enzimática o en muchos casos muerte de los organismos (18,19,20,21).

Para el bioensayo se eligió trabajar con *Allium cepa* por tener un ciclo celular corto y presentar células meristemáticas grandes donde se puede evidenciar un ciclo celular con sus diferentes fases (Figura N° 5a). Las raicillas de *Allium cepa* fueron sumergidas en las muestras de agua extraídas del biorreactor a los diferentes tiempos de tratamiento, que cuyas concentraciones de cromo total oscilaban entre 2460 a 293 ppm, y de cromo VI de 0,37 a 0,32 ppm, y se pudo observar que todas estas concentraciones tuvieron efecto negativo sobre la división celular (Figuras N° 5a–5f).

Para el caso de las muestras expuestas a la concentración de la muestra original (2460 ppm), las raicillas presentaron una reacción celular notoria, produciéndose un engrosamiento meristemático, esto puede deberse a la alta concentración de compuestos químicos específicamente las sales de cromo que estarían influyendo en este proceso (Figura N° 5b). Como se sabe, en las plantas las lesiones tanto en el sistema radicular como en otros órganos, difieren considerablemente por el modo de asimilar el cromo y en el tipo de lesiones que presentan. Los efectos tóxicos que el cromo ejerce sobre las plantas han sido descritos fundamentalmente, en base a ensayos vasculares, así pudo comprobarse que en la avena, las raíces no se desarrollan y que las hojas se mantienen angostas, tomando una

coloración pardo-rojiza con aparición de pequeñas manchas necróticas. (30).

Los compuestos de cromo VI poseen un fuerte poder carcinogénico, La gran toxicidad de los cromatos está originada no sólo en su solubilidad y en la facilidad con que pueden penetrar en las membranas sino, también en los daños que pueda provocar su fuerte poder oxidante y los potenciales efectos de las especies de Cr (III) originadas en su reducción, que suele ocurrir muy rápidamente y que en concentraciones elevadas empieza a competir con otros esenciales por los sitios activos de diversas biomoléculas (3).

Al exponer las raicillas a las concentraciones de cromo obtenidas a los diferentes tiempos de tratamiento, se observaron diversas alteraciones en las células una de las cuales fueron los desordenes en la división celular que impidieron la observación de la misma; sin embargo a medida que la concentración de cromo se reduce, estas fueron disminuyendo, así a las 120 horas de tratamiento, en donde la concentración de cromo total fue de 293 ppm y la de cromo VI de 0,32 ppm, el daño fue menor, pudiéndose observar algunas formas de división celular. (Figura N° 5e)

Estas evidencias pueden deberse específicamente a la influencia del cromo hexavalente, este puede disminuir la replicación y fidelidad de la DNA polimerasa, fijándose directamente a los grupos tioles a lo largo de la enzima produciendo un daño oxidativo que la llevan a una inhibición. También puede alterar directamente la síntesis de DNA, ya que puede disminuir los niveles de nucleótidos en el interior de la célula, por alteración de los receptores de membrana involucrados en la captación de nucleótidos (nucleótidos permeasas) o Parece ser que el mecanismo de muerte celular inducida por el cromo hexavalente en donde la célula muere por daño en el núcleo, se observa fragmentación y marginación de la cromatina, condensación citoplasmática con conservación de la membrana celular y los organelos citoplasmáticos, incluye daño en la síntesis del DNA y cambios en los ciclos celulares (31).

El efecto tóxico de algunos metales sobre las células, también fue demostrado por Lerda (1992), quien observó que el Pb reduce el crecimiento radicular y la frecuencia de células mitóticas, así como el incremento de la frecuencia de células aberrantes en *A. cepa*, en la que la intensidad del efecto estuvo en función de la concentración del Pb.

Esto pues corrobora el efecto que tienen las diferentes sustancias químicas, que estarían presentes en las aguas residuales de las curtiembres y que en forma indirecta por riego llegarían a

afectar a plantas especialmente de tallo corto que se encuentran expuestas a este tipo de sustancias químicas

Así mismo, los metales pesados pueden

acumularse en forma iónica o como compuestos orgánicos y permanecer en un organismo por largos periodos de tiempo (21).

CONCLUSIONES

En las condiciones de trabajo del experimento:

- No se observa una reducción considerable del cromo VI por *Pseudomonas sp.*
- La cepa de *Pseudomonas sp.* tiene una alta capacidad de reducción de cromo total.

- No se logra reducir la concentración de cromo VI hasta niveles en los que no se produzca daño celular en *Allium cepa.*
- El cromo VI tiene efecto negativo sobre el ciclo celular de *Allium cepa.*

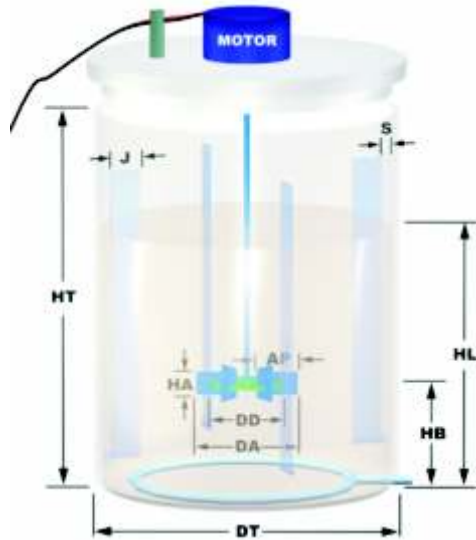
RECOMENDACIONES: Llevar a cabo estudios de biorremediación con la misma cepa de *Pseudomonas sp.*, pero trabajando en cultivo de lote alimentado, o con células inmovilizadas, para evitar la saturación celular con cromo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Armas, C. ;C. Armas. 2002. Tecnología Ambiental en Nuestro Hogar la Nave Sideral Tierra. Edit. APLIGRAF S.R.L. Trujillo-Perú.
2. García, M. 1993. Guía Técnica para Minimización de Residuos en curtiembres. Resumen Ejecutivo, Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Medio Ambiente CEPIS. Lima-Perú.
3. Quer-Brossa, S. 1983. Toxicología Industrial. Edit. Salvat S.A. Barcelona. España.
4. Calabrese, A.; E. Astolfi, 1972. Toxicología . 2^{da} Edic. Edit. Kapelus, S.A. Buenos Aires Argentina.
5. Dreisbach, R.; W. Roberton. 1988. Toxicología clínica , edit. El manual moderno S.A. - México
6. Buzzo, A.; M. Soria. 1960. Toxicología. 5ta. Edic. Edit. López Libreros- Buenos Aires Argentina .
7. Alexander, M. 1999. Biodegradation and Biorremediation. 2^o ed. Edit. Academic Press. New Cork. U.S.A.
8. Romanenko, V.; v. Kerenkov. Mikrobiologiya. 46, 414 – 417 (1977).
9. Bride, J.; P. Dhakephalkar; K. Paknikar. Biotechnol. Lett. 18, 667 – 672. (1996).
10. Cooke, V.; M. Hughes, R. Poole. J. Ind. MicroBiol. 14, 323 – 328 (1995).
11. Chirwa, E.; N, Wang. Environm. Sci. Technol. 31, 1446 – 1451 (1997).
12. Ibañez, V. Y J. Plasencia. 1997. Evaluación de los Factores de Reducción de DBO y DQO en el líquido Residual de Pelambre en el curtido de pieles y cueros. Tesis para optar el título de Ingeniero Químico. Fac. de Ingeniería Química. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.
13. López, M. 1999. Minimización de cromo en los efluentes de la etapa de curtido en las curtiembres de Trujillo- Perú. Tesis para optar el grado de Maestro en Ciencias. Mención Gestión ambiental. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.
14. CEPIS, 1993. Guía Técnica para la minimización de Residuos en curtiembres. Lima-Perú.
15. Venegas, V. 1998. Evaluación de la Contaminación Química de los Efluentes Residuales de la Curtiembre el Cortijo. Tesis para optar el Título de Ingeniero Químico. Facultad de Ingeniería Química. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.
16. Chancupe, 1996. Estudio Químico de las aguas Residuales de una curtiembre. Facultad de Ingeniería química - Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo- Perú
17. Doudoroff, P. y M. Katz. 1953. Review of literature on the toxicity of industrial wastes an their components to fish. The metals as salts sewage and industrial wastes. 25; 802.
18. Valenzuela, F. 1983. Contaminación de las aguas continentales marinas. Bol. Of. Sanit. Panam. 94: 413-414
19. Gallardo, V. 1984. Revisión actualizada a 1983 de la contaminación marina proveniente de fuentes terrestres en la región del Pacífico Sudoeste (Colombia, Chile, Ecuador, Panamá y Perú). Rev. Com. Perm. Pacífico Sur. 14:19-173.
20. Sanchez, G. Y M. Tupayachi. 1988. Pruebas preliminares sobre toxicidad agua del cobre en la "concha de abanico" (*Arpecten purpuratus*). H. Salzdewel y A. Landa (eds). Recursos y dinámica del ecosistema del afloramiento peruano. Pp. 191-194-. Inf. Inst. Mar Callao. Perú.
21. Campos, N. 1990. La contaminación por metales pesados en la Ciénaga Grande de Santa María. Caribe Colombiano. Caldasia. 16:231-244.
22. Atkinson, B y F. Mavituma. 1983. Biochemical Engineering and Biotechnological Handbook. MacMillan Publisher Ltd. G. B.
23. Otiniano-García, M. 2003. Esterilización de biorreactores de laboratorio. En: Robles_Castillo,H.; E. Villanueva; B. Soriano y M. Otiniano-García. Biotecnología. Manual de Prácticas de Laboratorio. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.
24. Robles-Castillo, H. E. Villanueva; B. Soriano; M. Otiniano-García. 2003. Manual de prácticas Microbiología Industrial, para Ingeniería Industrial. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.
25. Scheffler, W. 1981. Bioestadística. Edit. Fondo Interamericano. S.A. EE.UU.
26. American Public Health Association (Apha); American Water Works Association (Awwa); Water Polution Control Federation (WPCF) 1995. Standard methods for examination of water and wastw water. 19th ed. American Health Association. Washington D.C.
27. Goodell, P.; S. Pillai; M. Ali. 1996. Bioreduction of Chromium in Contaminated Soils and Potential Application to the Bioremediation of Cr(VI) Contaminated Sites. , Texas A&M Research Station, El Paso, Texas.
28. Sala, E.; Granhen, C; Kakuta, T. 2001. Uso da Biossorção na Remoção de Cromo de Efluente de Curtumes. Universidade Estadual de Maringá –Departamento de Engenharia Química, Maringá-PR-Brasil.

29. Sun_Kou, M.; M. Apolaya; E. Balvin; E. Neira. 1999. Procesos para el tratamiento de las aguas residuales de una Planta galvanica de cromo. Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Ingeniería, Lima, Perú.
30. Iannacone, J; L, Alvariño. 2005. Efecto Ecotoxicológico de Tres Metales Pesados Sobre El Crecimiento Radicular de Cuatro Plantas Vasculares. Agricultura Técnica (Chile) 65(2):198-203 (Abril-Junio 2005)
31. Téllez M; R. Carvajal; M. Roxs; A. 2004. Aspectos Toxicológicos Relacionados Con La Utilización Del Cromo En El Proceso Productivo De Curtiembres. Rev Fac Med Univ Nac Colomb 2004 Vol. 52 No. 1.

ANEXO 1



Esquema del biorreactor de tanque aireado y agitado con impulsor tipo turbina de Roushton.

Dimensiones geométricas del biorreactor de tanque aireado y agitado,

VT = 0,00357 m ³
VB = 0,00250 m ³
DT = 0,0156 m
HT = 0,187 m
J = 0,0156 m
S = 0,003 m
DA = 0,052 m
DD = 0,035 m
AP = 0,016 m
HA = 0,013 m

CARACTERÍSTICAS DE FLUJO:
 Número de Reynolds: 4506.667
 Régimen de flujo: De transición
 Número de potencia: 4,4940

CARACTERÍSTICAS DEL MOTOR:
 Rpm del agitador: 100
 Eficiencia del motor: 90 %
 Potencia real: 00 Kw
 Potencia real sin aireación: 00 hp
 Potencia real con aireación: 9,6480 hp
 Tiempo de mezcla: 1,96 s.
 Flujo de aire: 0,00 m³/s
 Potencia de compresor: 0,00 hp

Nota: Como se trata de un proceso de reducción se trabajó solamente con el agitador, no entró en funcionamiento el sistema de aireación.

ANEXO 2



Figura N° 2. Biorreactor de tanque agitado, en donde se llevó a cabo la biorremediación de cromo VII por *Pseudomonas sp*, en donde se muestra la variación del color del agua residual de azul oscuro a verde y la precipitación del cromo III.

Tabla N° 1. Valores promedio de los recuentos microbianos durante la biorremediación de aguas residuales de curtiembre por *Pseudomonas sp*

Tiempo (Horas)	Recuento (Ufc/mL)
0	82 x 10 ⁷
24	96 x 10 ⁹
48	51 x 10 ⁹
72	45 x 10 ⁷
96	2 x 10 ⁶
120	5 x 10 ⁴
144	2 x 10 ⁴



Figura N° 3. Variación del aspecto físico del agua residual de curtiembre durante la biorremediación con *Pseudomonas sp*, en biorreactor de tanque agitado.

Tabla N° 2. Variación del de la concentración de cromo total y cromo VI del agua residual de curtiembre durante la biorremediación con *Pseudomonas sp*, en biorreactor de tanque agitado

Tiempo (horas)	Cromo Total (ppm)	Cromo VI (ppm)
0	2460	0.37
24	340	0.36
48	320	0.35
72	297	0.34
96	295	0.33
120	294	0.32
144	293	0.32

ANEXO 3

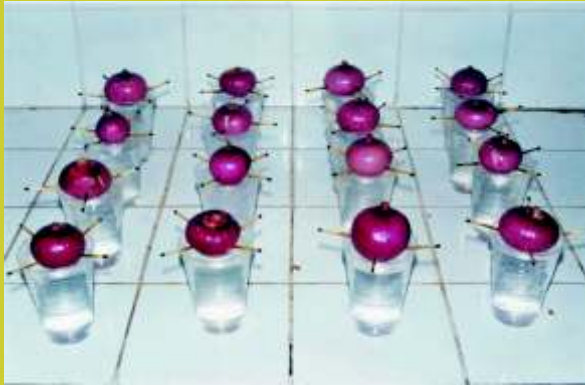


Figura N° 4. Bulbos de *Allium cepa* sumergidos en agua de caño para proliferación de raicillas

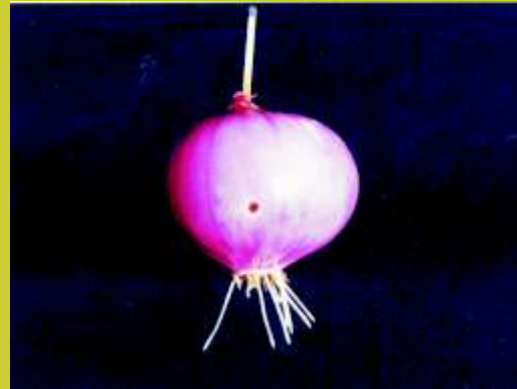


Figura N° 5. Raicillas de *Allium cepa* de longitud adecuada para ser expuestas a las muestras de agua de curtiembre a diferentes tiempos de tratamiento con *Pseudomonas sp.*

RECIBIDO: 10.02.2007 ■ ACEPTADO: 30.04.2007