

Bioreducción E Inmovilización In Situ De Cromo(VI) En Suelos.

María Pía Di Nanno, Gabriela Cordon, Leonardo Di Paolo, Leonardo Murruni y Gustavo Curutchet (1).

✿ Laboratorio de Análisis Ambiental. Escuela de Ciencia y Tecnología. Universidad Nacional de General San Martín. Avda. Gral Paz entre Constituyentes y Migueletes. Quonset 23. Tel: 54-11-4580-7296 interno 108.

* CONICET.

Email: gcuruche@unsam.edu.ar

María Pía Di Nanno: Becaria de Investigación de la Escuela de Ciencia y Tecnología. Estudiante avanzada de Lic.en Análisis Ambiental. Realiza trabajos de investigación en temáticas de biorremediación de sitios contaminados con metales y de biolixiviación. Autora de comunicaciones a congresos y artículos en revistas de divulgación. Auxiliar docente de la UNSAM. E-mail: dinanno@data54.com

Gabriela Cordon: Estudiante avanzada de Lic.en Análisis Ambiental. Realiza trabajos de investigación en el INQUIMAE, UBA, sobre stress en vegetales debido a contaminación en suelos. E-mail: gabicordon@yahoo.com.ar

Leonardo Di Paolo: Estudiante avanzado de Lic.en Análisis Ambiental. Becario del INA, realiza estudios de evaluación de impacto de obras hidráulicas en corrientes de agua. E-mail: leodipaolo@yahoo.com.ar

Leonardo Murruni. Estudiante avanzado de Lic.en Análisis Ambiental. Becario de Investigación de la Escuela de Ciencia y Tecnología. Realiza estudios de determinación de contaminantes atmosféricos. Autor de comunicaciones a congresos y artículos en revistas de divulgación. Auxiliar docente de la UNSAM. E-mail: leomurruni@hotmail.com

Gustavo Curutchet: Doctor en Ciencias Exactas de la Facultad de Ciencias Exactas UNLP. Especializado en biotecnología. Investigador Adjunto sin director del CONICET. Director de proyecto y Profesor en la Escuela de Ciencia y Tecnología UNSAM. Coautor de 25 publicaciones internacionales y numerosas comunicaciones a congresos nacionales e internacionales en temas relacionados con biolixiviación y biorremediación así como docencia universitaria. Actualmente coordinador de las actividades del proyecto de extensión Megapilas 2000. E-mail: gcuruche@unsam.edu.ar

Palabras clave: Acidithiobacillus, cromo(VI), lisímetros, remediación, inmovilización.

RESUMEN

Se estudió la reducción de cromo(VI) a cromo(III) en un suelo artificialmente contaminado por acción indirecta *in situ* de las bacterias autotrofas *Acidithiobacillus thiooxidans* crecidas sobre azufre elemental.

Para ello se utilizaron lisímetros donde se evaluó la lixiviación de cromo(VI) y cromo(III) bajo cierto régimen de riego y diferentes agregados superficiales del inóculo bacteriano.

Los resultados obtenidos muestran un alto porcentaje de reducción de cromo(VI) y su consecuente inmovilización en los sistemas inoculados, sugiriendo gran potencialidad del proceso para bioremediación de sitios contaminados.

INTRODUCCIÓN

La mayor cantidad del cromo en el medio ambiente se encuentra en la forma de cromo(III). Sin embargo pueden encontrarse altas concentraciones de cromo(VI) como resultado de procesos industriales como la minería, curtido de cueros y galvanoplastia entre otros (Chuan, 1996). El cromo(VI) es altamente soluble en toda condición de pH lo cual lo hace muy móvil en los ecosistemas, además de ser extremadamente tóxico y carcinógeno (grupo A EPA). El cromo(III) en cambio es mucho menos tóxico y no suele estar biodisponible ya que forma óxidos e hidróxidos insolubles. Por lo tanto, el primer paso en el tratamiento de un efluente o un sitio contaminado con cromo(VI) debe ser necesariamente su reducción a cromo(III), disminuyéndose así su toxicidad y movilidad.

La reducción microbiológica de cromo(VI) ha recibido especial atención en los últimos años, dada sus potenciales bajos costos y carácter de tecnología limpia. Sin embargo, las diferentes especies estudiadas capaces de realizar tal reducción, generalmente son heterótrofas y anaeróbicas (Lovley, 1986), lo cual implica condiciones de cultivo sofisticadas y agregado de sustratos orgánicos que encarecen notablemente el proceso. La posibilidad de utilizar organismos aeróbicos autótrofos como los *Acidithiobacillus* puede ser una alternativa atractiva para implementar procesos robustos y de bajo costo (Brierley, 2000).

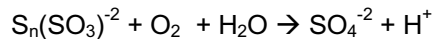
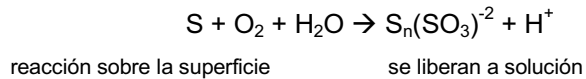
Trabajos previos sobre reducción de cromo(VI) en efluentes acuosos con *Acidithiobacillus* (Viera, 2003) han mostrado una buena performance del proceso, aunque aún no han sido realizados trabajos sobre suelos.

En este trabajo se evalúa la capacidad de reducción y consecuente inmovilización de cromo(VI) en un suelo contaminado artificialmente con cromo(VI) utilizando *Acidithiobacillus thiooxidans* y azufre elemental.

Las bacterias del género *Acidithiobacillus* son Gram negativas quimioautótrofas y acidófilas, ampliamente utilizadas en procesos biohidrometalúrgicos para la recuperación de oro, cobre y cobalto en varias partes del mundo (Brierley, 2000).

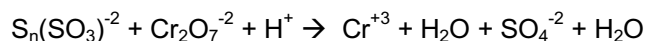
Estas bacterias pueden obtener su energía a partir de la catálisis de la oxidación de compuestos reducidos de azufre (azufre elemental, sulfuros, etc.) utilizando oxígeno como aceptor electrónico.

Esta oxidación genera una serie de compuestos intermediarios con un alto poder reductor (politionatos). Los politionatos pueden continuar siendo oxidados (tanto microbiana como químicamente) obteniéndose como producto final ácido sulfúrico (Steudel, 1987; Quintana, 2001).



Ecuaciones 1 y 2. Obtención de energía por Acidithiobacillus thiooxidans.

Los medios ácido-reductores así formados han sido utilizados en cultivos de *Acidithiobacillus thiooxidans* (A.t.) para conseguir la reducción de diferentes sustancias oxidantes, tales como manganeso(IV), vanadio(V), hierro(III) y cromo(VI) (Briand, 1996; Curutchet, 1995 Oliver, 2000).



Ecuacion 3. Reducción de Cr(VI) por los politionatos generados en la oxidación de azufre por A.t.

MATERIALES Y MÉTODOS

-Microorganismos

Se utilizó la cepa *Acidithiobacillus thiooxidans* DSM 11478. La misma se mantiene rutinariamente en cultivos líquidos utilizando medio 0K ((NH₄)₂SO₄ 2 g/L, K₂HPO₄ 0.5 g/L, MgSO₄.7H₂O 0.5 g/L, KCl 0.1 g/L, Ca(NO₃)₂ 0.01 g/L, pH = 2.50) con 1% m/v de azufre elemental como fuente de energía. Se cultivaron a 30° con agitación por burbujeo de aire.

-Lisímetros

Los sistemas fueron contruidos utilizando botellas plásticas (PET) de 1500 mL de capacidad. Los mismos fueron llenados con un suelo agrícola (horizonte A, 400 g), arena (300 g) y grava (90 g) (ver figura 1). Los lisímetros fueron cubiertos en la parte superior para evitar evaporación. El pH inicial del suelo (medido utilizando una relación 1:2,5 de suelo: solución de cloruro de calcio 0,02 M) fue de 7,3. El suelo presentó estructura migajosa, textura arcillo-limosa, 20% m/m de agua, densidad aparente de 0,67 g/cm³ y una gran capacidad de amortiguación de pH hacia valores ácidos (β= 11 mmol H⁺/L.upH). La determinación de las características del suelo se realizó de acuerdo a lo establecido por el U.S. Geological Service.



Figura 1-Fotografía de los lisímetros

Al suelo de algunos de los lisímetros se le incorporaron 0,1 g $K_2Cr_2O_7$ en forma superficial. Se inocularon los mismos con diferentes cantidades azufre elemental colonizado con *A.t.*, provenientes de cultivos en fase exponencial tardía de crecimiento realizados en frascos con aireación forzada. A los controles estériles se incorporó igual cantidad de azufre sin colonizar. El azufre fue añadido en la parte superficial del suelo y mezclado suavemente con una espátula, dado que siendo los microorganismos utilizados aerobios estrictos, requieren oxígeno y además el agregado superficial (no homogéneo) es más sencillo en el campo ya que no requiere movimiento de suelos.

Protocolo experimental:

Lisímetro	Contenido
1	Suelo + dicromato (0,1 g)
2	Suelo + dicromato (0,1 g) + azufre inoculado (5 g)
3	Suelo + dicromato (0,1 g) + azufre estéril (5 g)
4	Suelo + dicromato (0,1 g) + azufre inoculado (20 g)
5	Suelo + dicromato (0,1 g) + azufre estéril (20 g)
6	Suelo + azufre inoculado (20 g)

La experiencia tuvo una duración de 57 días, punto a partir del cual dejó de observarse cromo (VI) en el lixiviado. El riego de los lisímetros consistió en 125 mL de agua destilada por semana, repartidos en dos riegos de 50 mL y uno de 25 mL. Periódicamente sobre el lixiviado se midió el volumen y se determinaron pH, sulfatos y cromo(VI). En algunas muestras se realizaron análisis para determinar cromo total.

El pH se midió utilizando un electrodo de vidrio combinado, los sulfatos mediante un método turbidimétrico (precipitación de $BaSO_4$), el cromo(VI) por el método colorimétrico de difenilcarbazida y el cromo total se midió de la misma forma luego de oxidar el cromo(III) con $KMnO_4$ en medio ácido a $100^\circ C$ (APHA AWWA, 1992).

Luego de finalizada la experiencia se tomaron muestras de suelo a diferentes alturas de los lisímetros para evaluar la cantidad de cromo(VI) y cromo total retenido (en la parte superficial, intermedia e inferior del lisímetro, espaciando las muestras unos 5 centímetros entre sí). Para ello se realizó una extracción en frío durante 24 horas con H_2SO_4 0,9 M a un gramo de suelo, continuándose con las determinaciones sobre el extracto según lo descrito previamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La concentración de cromo(VI) y la cantidad total acumulada en el lixiviado se muestra en los siguientes gráficos:

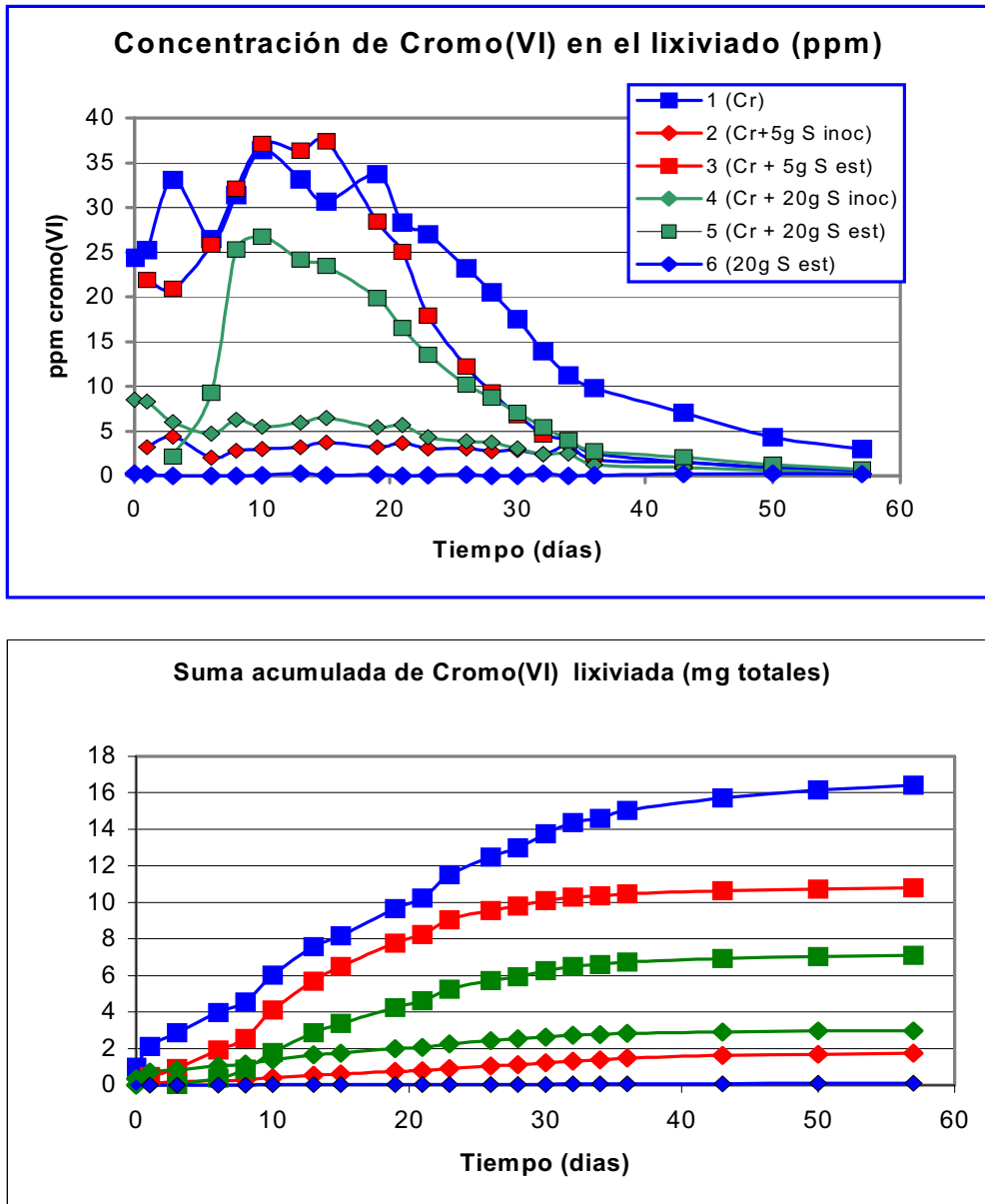


Figura 2- Cromo(VI) total y concentraciones del mismo en el líquido lixiviado. Las referencias son las mismas para ambos gráficos.

Se observa una notable reducción de la cantidad de cromo lixiviada en los sistemas con agregado de azufre inoculado con respecto a los controles estériles. En dichos sistemas a los que se agregó azufre colonizado con *A.t.* la cantidad total de cromo(VI) que lixivia es de 1,7 y 2,9 mg (representando un 4,9 y 8,6 % del total

agregado) respectivamente, mientras que en los sistemas a los que se agregó igual cantidad de azufre estéril y en el control sin azufre agregado lixivian 10,8; 7,1 y 16,4 mg de cromo(VI) (31,5; 29.1, y 47,5 % del total agregado) respectivamente.

Sistema	Porcentaje de retención de cromo (%)	Concentración máxima de cromo (VI) en el lixiviado (ppm)
1 (Cr)	53.55	36.43
2 (Cr + 5S inoc)	95.05	4.36
3 (Cr + 5S est)	69.5	37.41
4 (Cr + 20S inoc)	91.6	16.16
5 (Cr + 20S est)	79.9	26.74
6 (20S inoc)	- (no fue contaminado)	0

Tabla 2. mg totales y concentraciones máximas de cromo(VI) en el lixiviado.

A su vez las concentraciones de cromo(VI) alcanzadas en los lixiviados fueron considerablemente menores en los sistemas inoculados que en los controles respectivos. Se observa una rápida movilización del cromo(VI) en los sistemas estériles, con un pico máximo de concentración entre los 10 y 15 días, mientras que en los sistemas inoculados, la forma de las curvas sugiere actividad de reducción *in situ* y sostenida en el tiempo. Puede parecer extraño que bacterias acidófilas extremas como estas (pH óptimo alrededor de 2.00) mantengan su actividad en un suelo cercano a la neutralidad, pero se ha demostrado en estudios previos capacidad del *A.t.* de crecer sobre azufre elemental y generar politionatos aún hasta pH 7 (los cuales se estabilizan en pH neutro a alcalino) (Oliver 2000) y además hay que tener en cuenta que en el entorno del *biofilm* bacteriano sobre el azufre las condiciones pueden ser bastante diferentes al promedio del suelo.

La concentración de cromo(III) en el lixiviado (datos no mostrados) nunca fue detectable, por lo tanto todo el cromo que lixivia es cromo(VI), lo que indica inmovilización del Cromo(III) dentro de los sistemas. El pH de los lixiviados de todos los sistemas se mantuvieron entre 7.8 y 8.5, rango en el cual es de esperar la precipitación de hidróxidos, sulfatos e hidroxosulfatos de cromo(III).

El control sin agregado de azufre evidencia una reducción basal de cromo(VI) de alrededor de 50 %, probablemente debida al contenido de materia orgánica del suelo.

Si bien se puede considerar una acción bacteriana por el efecto producido sobre el cromo(VI), no se observó acidificación de los lixiviados durante el experimento. Esto podría ser atribuible a la capacidad buffer del suelo y la naturaleza alcalina de la arena y grava utilizadas.

El sistema inoculado con 1,25 % de azufre con respecto al suelo orgánico muestra una mayor reducción y retención del cromo(VI) que el sistema inoculado con 5 %. En este sistema (5%) pueden haber existido limitaciones en la transferencia de gases y agua hacia el *biofilm* bacteriano.

La cantidad de sulfato (mg totales) lixiviada no muestra una relación inequívoca con la cantidad de azufre agregado ni con la presencia de microorganismos. Este hecho podría ser explicado suponiendo la precipitación de sulfatos o hidroxosulfatos de cromo(III) cuya existencia se comprobará por difracción de rayos X.

En la determinación de cromo remanente en los suelos no se detecta cromo(VI) en ninguna altura, resultando que el cromo(VI) no reducido ha lixiviado totalmente. Por otra parte (ver más arriba) el cromo(III) formado se inmoviliza totalmente.

Las concentraciones de cromo(III) (se muestran solo 3 sistemas a modo ilustrativo) en mg cromo /Kg suelo se muestran en el siguiente gráfico:

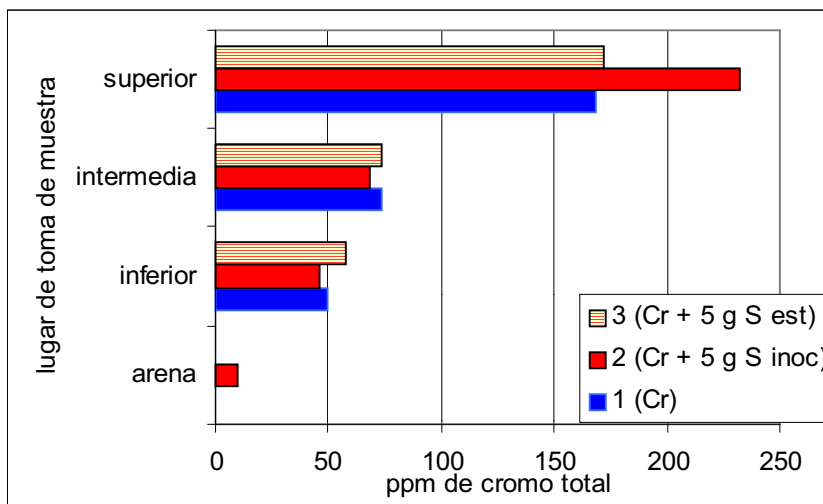


Figura 3- Cromo(III) remanente en el suelo de los lisímetros.

Se puede apreciar una muy superior reducción e inmovilización en el sistema con agregado de azufre inoculado con respecto a los controles estériles con y sin azufre. Dicha reducción se manifiesta directamente en los primeros centímetros del suelo, resultado lógico, dado que el proceso de formación de politionatos es aeróbico, y ambos (contaminante y azufre) fueron agregados sobre la superficie de manera de simular un posible proceso "real". En este caso, existe una ventaja adicional, dado que luego de lograr la reducción del cromo(VI), el cromo(III) remanente se podría extraer con la remoción de una capa superficial. Se aprecia además claramente como se mitiga la migración del cromo hacia los horizontes inferiores y posibles acuíferos.

CONCLUSIONES

El agregado de azufre inoculado con *A.t.* a un suelo contaminado con dicromato (al menos hasta 88 mg cromo(VI)/Kg suelo) favorece la reducción e inmovilización del cromo(VI). En esta experiencia mejora la retención en un 40% respecto de un sistema sin azufre.

Los resultados obtenidos permiten suponer una gran potencialidad de esta metodología para remediación de suelos contaminados con cromo(VI) evitando fundamentalmente la migración del contaminante hacia los acuíferos.

Se están realizando estudios para evaluar esta capacidad a diferentes concentraciones de cromo en el suelo, con el objeto de optimizar y escalar esta técnica.

BIBLIOGRAFIA

- APHA AWWA WPCP. Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Díaz de Santos. 1992.
- Bartlett, R.J. 1991. *Environ. Health Perspect.* 92, 17-24.
- Cifuentes F., W. Lindemann, L. Barton. 1996. *Soil Science.* 161, 233-241.
- Chuan, M. C. ; J.C. Liu. 1996. *Water Research.* 30, 932-938.
- Briand, L., Thomas, H., Donati, E. 1996. *Biotechnology Letters.* 18. 505-508.
- Brierley, J. *Mining Engineering.* Nov. 2000. 49-52.
- Curutchet, G., Pogliani, C., Donati, E. 1995. *Biotechnology Letters.* 17 (11) 1251.
- Lovley, D. 1994. *Advances in Agronomy.* 54. 175-229.
- Oliver, C., Curutchet, G. Donati, E. 2000. In *Environmental improvements in mineral processing and extractive metallurgy.* Vol. 2.
- Quintana, M., Curutchet, G., Donati, E. 2001. *Biochemical Engineering Journal.* 9 (1) 11-15.
- Steudel, R. 1987. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 26 (2)
- Viera, M., Curutchet, G., Donati, E.. 2003. *International Biodeterioration & Biodegradation.*
- www.usgs.gov

Agradecimientos: A Romina Hidalgo y Matías Nóbile por el material fotográfico empleado.