

## **Efecto de Factores Físicos y Químicos sobre la Remediación de Residuos Sólidos Contaminados con Cr(VI) por *Aspergillus niger*: Mecanismo de Detoxificación**

Cristina Rubio<sup>1\*</sup>, Antonela Márquez<sup>1</sup>, Soledad Suárez<sup>1</sup>, Gladys Duca<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. <sup>2</sup>Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Tucumán. Ayacucho 471 (4000). Tucumán.

Argentina. Tel: 54-03814107209.

E-mail: mcrubio@fbqf.unt.edu.ar

### **RESUMEN**

*Aspergillus niger* se usó para estudiar la remediación de pulpa de limón contaminada variando la concentración de Cr(VI), la temperatura y la concentración de conidios. La toxicidad del Cr(VI) sobre el desarrollo del hongo y la producción de poligalacturonasas (EC.3.2.1.15); naringinasa ( $\alpha$ -L-ramnosidasa, EC.3.2.1.40 y  $\beta$ -D-glucosidasa, EC.3.2.1.21) y reductasa fue también evaluada. Usando fermentación en estado sólido el hongo, remedió el 100% de la pulpa (80% humedad) contaminada con Cr(VI) a 5, 10 y 20 mg/L y alcanzó un 99% de eficiencia, cuando la concentración del metal pesado fue 50 mg/L en las siguientes condiciones:  $2 \cdot 10^5$  conidios/g de pulpa; 30 °C y pH 2.5. El Cr(VI) influyó en la maduración de los conidios del hongo (48 h), disminuyó la concentración de proteína intracelular (0.22 mg/mL) reflejada por la ausencia de bandas proteicas de una PAGE-no desnaturizante y redujo un 24 y 86%, la producción de poligalacturonasa (PG) y naringinasa (N), respecto al control (72 h; proteína: 0.25 mg/mL; PG: 0.17 y N: 0.02 U/ml). Se determinó actividad específica cromato reductasa ( $6.3 \cdot 10^{-2}$  U/mg) y por absorción atómica se verificó que el 97.30% del Cr(VI) se redujo a Cr(III). Se propone que el mecanismo de detoxificación de Cr(VI) por *A. niger* es por adsorción del metal a la pared celular y absorción al interior celular. La biorremediación puede suplementar a los tratamientos físicos químicos ya existentes o aquellos que no resultan completamente eficientes, para alcanzar una verdadera remediación.

**Palabras claves:** *Aspergillus niger*, biorremediación, detoxificación, Cr(VI), residuos sólidos

### **ABSTRACT**

*Aspergillus niger* was used to study the remediation of lemon pulp contaminated with various Cr(VI) concentrations at different temperatures and conidia concentrations. The Cr(VI) toxicity on fungal development and production of poligalacturonase (EC.3.2.1.15); naringinase ( $\alpha$ -L-ramnosidase, EC.3.2.1.40,  $\beta$ -D-glucosidase EC.3.2.1.21) and reductase was also evaluate. By using solid state fermentation, the fungus remediated a 100% pulp (80% humidity) contaminated with Cr(VI) to 5, 10- 20

mg/L and reached an efficiency of 99% when the heavy metal concentration was 50 mg/L under the following conditions:  $2 \cdot 10^5$  conidia/g of pulp; 30 °C and pH 2.5. Cr(VI) influenced the maturation of the fungus conidia (48 h), decreased intracellular protein concentration (0.22 mg/mL) reflected by the absence of protein bands of a non-denaturing PAGE and reduced by 24 and 86%, the production of polygalacturonase (PG) and naringinase (N), with respect to the control (72 h; protein: 0.25 mg/mL; PG: 0.17 and N: 0.02 U/mL). Chromate reductase specific activity ( $6.3 \cdot 10^{-2}$  U/mg) was determined and using atomic absorption was verified that 97.30% of the Cr(VI) was reduced to Cr(III). It is proposed that the mechanism of Cr(VI) detoxification by *A. niger* is by metal adsorption to the cell wall and absorption to the cell interior. Bioremediation can supplement the existing chemical physical treatments or those who are not fully efficient, to achieve a true remediation.

**Key Words:** *Aspergillus niger*, bioremediation, chromium (VI), detoxification, solid waste

## INTRODUCCIÓN

La contaminación ambiental se define como, presencia de cualquier agente químico o biológico, que a una determinada concentración es nociva para la salud humana, la vida vegetal y animal (Palacios, 1997). Las industrias y la actividad agrícola emiten contaminantes tóxicos como hidrocarburos, pesticidas, herbicidas y metales pesados, que son vertidos al medio ambiente (EPA, 2010). Los metales pesados no son ni química ni biológicamente degradables, por lo cual el metal puede estar disuelto en el agua o ser adsorbido por residuos sólidos que son empleados en la alimentación animal y al ser ingeridos, se transmiten a la cadena alimentaria. Argentina tiene muchas provincias con actividades industriales, mineras y de curtiembres (Gagneten & Ceresoli, 2004) que vierten sus efluentes al medio ambiente. Tucumán, es una de las provincias ubicadas al norte del país que tiene mayor actividad agroindustrial y cuya principal cuenca hidrográfica, Río Salí, recibe efluentes de organismos son capaces de colonizar la superficie de residuos como bagazo; cáscara de

ingenios azucareros, cítricos y de otras industrias, en cuyo suelo y aguas se determinó Cr(VI) y otros metales, además de pesticidas y plaguicidas organoclorados, etc. (Romero *et al.*, 1997; Benimeli, 2004). Las industrias reducen el contenido de metales pesados de los efluentes, por tratamientos físicos y químicos como precipitación, intercambio iónico, ósmosis inversa y adsorción, pero desechan los residuos sin controlar su toxicidad. Una alternativa, es recurrir a la biorremediación que utiliza organismos (vegetales y microbios) capaces de degradar, transformar o remover contaminantes (Robles González & Poggi Varaldo, 2008; Wood, 2008; Amini *et al.* 2009). Muchos son los trabajos publicados sobre remediación de metales pesados de soluciones acuosas con organismos (Vullo, 2003; Otiniano *et al.*, 2005; Congeevaram *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2010), mientras que la información disponible sobre remediación de residuos sólidos contaminados con Cr(VI) por hongos filamentosos es limitada. Estos cítricos; pulpa de limón, etc. Este sistema de cultivo o fermentación en estado sólido (FES) se

define como: proceso microbiológico que ocurre comúnmente en la superficie de materiales sólidos o inertes que tienen la propiedad de absorber y contener escaso volumen de agua libre, con o sin el agregado de nutrientes solubles” (Viniestra González, 1997; Maldonado, 2005). En este trabajo, se utilizó FES, ya que el hongo empleado puede desarrollarse sobre un residuo contaminado con Cr(VI). El objetivo del trabajo fue estudiar la influencia de factores físicos y químicos sobre el proceso de biorremediación de un residuo como pulpa de limón contaminada con Cr(VI) y determinar la toxicidad del metal sobre el desarrollo de *Aspergillus niger*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Microorganismos y mantenimiento de la cepa*

Se utilizó *A. niger*, del cepario del Instituto de Biotecnología (San Miguel de Tucumán), el cual se mantuvo activo por repiques sucesivos en medio Czapek modificado, que contiene, g/L: glucosa, 10; NaNO<sub>3</sub>, 3; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1; MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O, 0.5; KCl, 0.5 y agar, 15, a pH 4.5 (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 20 %, v/v). Las cepas se incubaron a 28 °C durante 96 h y se mantuvieron a 4°C hasta su utilización.

### *Suspensión de conidios*

La suspensión se preparó adicionando conidios de *A. niger* a 50 ml de solución fisiológica y 0.05 ml de Tween 80 (marca Cicarelli, pro-análisis), hasta alcanzar una densidad óptica de 0.250, equivalente a 2·10<sup>6</sup> conidios/ mL, para una longitud de onda de 560 nm.

### *Preparación de las soluciones de Cr(VI)*

Se preparó una solución madre de Cr(VI) de 500 mg/L, de esta solución se prepararon 50 mL para obtener las siguientes concentraciones del metal: 5, 10, 20 y 50 mg/L.

### *Proceso de adsorción de Cr(VI) en el residuo*

Se utilizó pulpa de limón (residuo) de una citrícola (Tucumán, Argentina), la cual se secó en estufa (60°C) hasta obtener 80% de humedad. Se pesaron 20 g de pulpa que se colocaron en un matraz Erlenmeyer (250-mL) con 50 mL de cada concentración del metal (5, 10, 20 y 50 mg/L). La adsorción de Cr(VI) por la pulpa se realizó en un agitador rotatorio a 100 rpm por 1 h, para obtener pulpa contaminada con el metal (Suárez & Rubio, 2011).

### *Concentración de Cr(VI)*

La pulpa de limón contaminada con Cr(VI): 5, 10, 20 y 50 mg/ L, se suplementó con urea 0.006, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.012, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.003 y KCl 0.001 g/g de pulpa, sin modificar el pH del residuo (pH 2.5). Este se colocó en cajas de Petri, que se esterilizaron a 121 °C por 15 min. Posteriormente se inoculó con 1 ml de suspensión de conidios de *A. niger* para obtener 1·10<sup>5</sup> conidios/g de pulpa; se incubaron a 30 °C y se tomaron muestras cada 24 h por 96 h.

### *Temperatura*

Se trabajó en las mismas condiciones de cultivo que el ensayo anterior. Los experimentos se incubaron en estufa a: 25, 30 y 35 °C por 96 h.

### *Número de conidios*

La pulpa de limón con Cr(VI) (50 mg/L) y adicionada de sales, fue inoculada con la suspensión de conidios para obtener 1, 2 y  $3 \cdot 10^5$  conidios/g de pulpa. Los ensayos se incubaron a 30 °C por 96 h.

## *Estudios de toxicidad del Cr(VI) sobre A. niger*

El hongo ( $2 \cdot 10^5$  conidios/g pulpa) se cultivó durante 48 h en pulpa sin y con Cr(VI) de 50 mg/L. La pulpa con el microorganismo desarrollado en la superficie se observó al microscopio (40X) marca Leica (DM 500), luego se colocó en un mortero, se agregó 10 ml de tampón acetato (0.2 M y pH 4.5) y se disgregó hasta obtener una mezcla homogénea. Esta se filtró por papel de filtro y con membrana de nitrato de celulosa (0.45  $\mu$ m) marca Microclar. Con el extracto crudo obtenido se realizaron las siguientes determinaciones: 1: Concentración de proteínas por Bradford (1976) y variación del perfil proteico por electroforesis de zona en gel de poliacrilamida, en condiciones no desnaturalizantes. 2: Actividad de poligalacturonasa, naringinasa y cromato reductasa para analizar posibles modificaciones fisiológicas con respecto al control.

## *Mecanismo de detoxificación*

El hongo ( $2 \cdot 10^5$  conidios/g pulpa) se cultivó en pulpa sin y con Cr(VI) de 50 mg/L, durante 96 h. Con la pulpa fermentada se determinó Cr(VI) extra e intracelular. Para determinar Cr(VI) extracelular, la pulpa con microorganismo se agitó 30 min en 15 ml de agua desionizada para extraer el Cr(VI) adsorbido a la pared de éstos. El líquido se filtró con membranas de nitrato de celulosa (0.45  $\mu$ m) y se obtuvo un filtrado 1.

Para medir el Cr(VI) intracelular, la pulpa con el microorganismo lavado anteriormente se disgregó en un mortero de porcelana con 15 ml de agua desionizada hasta obtener una mezcla homogénea. Se filtró con membrana y se obtuvo un filtrado 2. En los filtrados (F1 y F2) se midió el Cr(VI) residual por DFC y el cromo total por absorción atómica. La membrana filtrante se lavó con agua bidestilada (1 ml) y se midió Cr(VI) residual en las aguas de lavado, para verificar que el metal no fue adsorbido por la misma.

## *Condiciones de cultivo y control*

Todos los ensayos fueron realizados por procesos en lote usando un sistema de cultivo en superficie como la fermentación en estado sólido. Paralelamente, para cada ensayo se realizaron controles con pulpa sin Cr(VI) adicionada de sales a pH 2.5 y con la suspensión de conidios de *A. niger*, en las condiciones de cada experimento.

## *Determinación de biomasa*

Como medida indirecta de biomasa se utilizó la determinación de proteínas totales por el método de Kjeldahl (APHA, AWWA, WEF-1989), debido que las hifas no pueden ser separadas del sustrato sólido (Maldonado, 2005).

## *Actividad poligalacturonasa (PG)*

La mezcla de reacción contiene: 0.5 ml de extracto crudo, como sustrato 2 ml de ácido poligalacturónico al 0.1% (Sigma) en tampón ácido acético-acetato de sodio (0.1 M, pH 4.5), incubándose a 45 °C, 30 min.. Los ácidos galacturónicos liberados se determinaron con el

método de Somogyi (1945) y Nelson (1944) y el ácido liberado se calculó de una curva estándar DO vs ácido galacturónico (mg/mL). Una unidad enzimática se define como los mg de ácido galacturónico por min en condiciones estandarizadas.

### *Actividad naringinasa*

A 0.15 ml de extracto crudo, se agregaron 0.25 ml de naringina (0.1%) (Sigma) y 0.1 ml de tampón ácido acético-acetato de sodio (0.1 M) a pH 4.2. Las mezclas de reacción se incubaron a 37 °C por 15 min. Los azúcares reductores liberados por hidrólisis enzimática del flavonoide (naringina) se determinaron por Somogyi (1954) y Nelson (1944). Una unidad de naringinasa es la cantidad de enzima que cataliza la liberación de 1  $\mu$ mol de azúcares reductores por min, a pH 4.2 y 37 °C.

### *Actividad cromato reductasa*

A 1 ml de extracto crudo, se agregó 0.5 ml de tampón fosfato citrato (50 mM), pH 5.0 y como sustrato 1 ml de solución de Cr(VI) de 50 mg/L. Luego las mezclas se incubaron a 30 °C por 60 min y el Cr(VI) residual se midió con difenilcarbazida. Una unidad de reductasa se define como la cantidad de actividad de enzima que reduce 1 mg de Cr(VI) por min y se expresó como actividad específica (U/mg de proteína)

### *Controles enzimáticos*

En todos los ensayos de actividad, paralelamente a las mezclas de reacción, se realizaron controles de sustrato y enzima para determinar la presencia de grupos reductores

libres. *Cuantificación de Cr(VI) por difenilcarbazida (DFC)*

Se tomaron 2.5 ml de extracto crudo, se ajustó el pH a 2.0 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 20% (v/v), se agregó 0.5 ml de DFC (5 mg/ml), se dejó reposar 10 min para el desarrollo total de color y se midió la densidad óptica (DO) de las muestras a 540 nm. Los valores se obtuvieron de una curva patrón (DO vs Cr(VI) mg/L) (Greenberg & Clesceri, 1992).

Los extractos crudos extracelulares e intracelulares obtenidos anteriormente, fueron digeridos en horno de grafito y se midió por absorción atómica en el Laboratorio de Química de la Facultad de Bioquímica, Qca y Farmacia (UN de Tucumán).

### *Cromo total por adsorción atómica*

Los extractos crudos extracelulares e intracelulares obtenidos anteriormente, fueron digeridos en horno de grafito y se midió por absorción atómica en el Laboratorio de Química de la Facultad de Bioquímica, Qca y Farmacia (UN de Tucumán).

### *Electroforesis*

Con los extractos crudos intracelulares, se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida, en condiciones no desnaturizantes, según el método de Hames(1981) y el gel se reveló con nitrato de plata de acuerdo a Blum (1987).

### *Determinación de pH*

La acidez de la pulpa más microorganismo, se determinó por la técnica de medición de pH en suelos (Calderón & Pavlova, 1999).



## *Cálculos matemáticos: eficiencia de biorremediación (Ef)*

Es el porcentaje de remoción del Cr(VI) de la pulpa por el microorganismo y se calcula por la ecuación 1:  $Ef (\%) = [(C_i - C_r) / C_i] \times 100$  (1). Donde,  $C_i$ , es concentración inicial de Cr(VI) adsorbida por la pulpa;  $C_r$ , concentración residual de Cr(VI) en la pulpa fermentada (pulpa más microorganismo).

## *Velocidad de remoción*

Se determinó según la ecuación 2:  $(C_i - C_r)/t(2)$ ;  $(C_i - C_r)$  es la diferencia que provee los miligramos de metal removidos y  $t$ , tiempo de incubación (h).

## *Reproducibilidad de los resultados*

Todos los experimentos se realizaron por duplicado y en ensayos separados. Los valores son el promedio de dos mediciones. Los mismos se analizaron para obtener la desviación estándar con un MS-Excel y calculados para  $F=95\%$  (grado de confianza).

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

*Efecto de factores físico químicos sobre la remediación de pulpa con Cr(VI) por A. niger.*

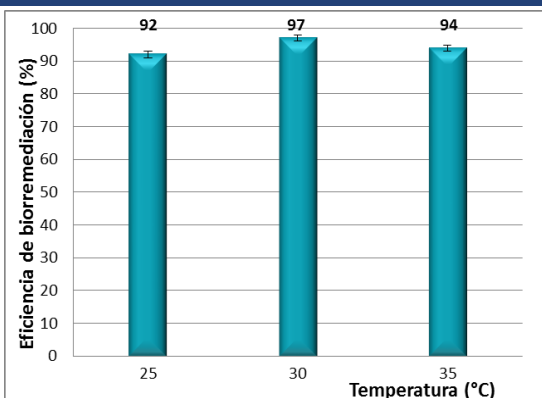
### *Variación de Cr(VI)*

Al aumentar la concentración de Cr(VI) a 5, 10, 20 y 50 mg/L en la pulpa, se obtuvo un incremento de la biomasa de *A. niger*, expresada como proteína total en porcentaje de:  $26 \pm 0.1$ ,  $27 \pm 0.2$ ,  $29 \pm 0.1$  y  $33 \pm 0.3$ , respectivamente, comparado al control ( $25 \pm 0.1$ ). Estos resultados sugieren que el cromo fue

utilizado por las células y participa, de alguna manera, estimulando la formación de la masa celular. Nuestros resultados coinciden con Moore *et al.* (1961), quienes mostraron que medios líquidos con Cr(VI) (25 mg/L), estimularon el crecimiento de bacterias de lodos activados. Mientras que *Mucor rouxii*; *Candida albicans*; *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus circulans* y *Bacillus megaterium* no desarrollaron en medios con Cr(VI) a 0.5, 25 y 40 mg/L, respectivamente (Cervantes *et al.*, 2001; Ramírez *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006; Martínez Yepes, 2009). Por el contrario, Otiniano *et al.* (2005), observaron que *Pseudomonas sp.*, únicamente reduce el metal. Las eficiencias de remoción de Cr(VI) de la pulpa por *A. niger*, disminuyó a 98.7, 98.2 y 97.3% con el aumento de Cr(VI) a 10, 20 y 50 mg/L en la pulpa, respectivamente, comparado con 5 mg/L de Cr(VI) (Ef. 99.2%). Estos resultados indican la influencia del metal en el metabolismo celular, lo cual sugiere que el crecimiento de algunas cepas biorremediadoras y la remoción de Cr(VI) no se encuentran necesariamente relacionadas y que la capacidad de biorremediación depende del mecanismo de detoxificación del microorganismo utilizado.

### *Efecto de la temperatura*

La figura 1, muestra que la Ef de remoción por *A. niger* no varió significativamente ( $p > 0.05$ ) en el rango de temperaturas ensayadas. Por el contrario, Goyal *et al.* (2003) obtuvieron con biomasa muerta de *S. cerevisiae* mayor remoción del metal a 45 °C. No obstante esta



**Fig. 1.** Efecto de la temperatura sobre la remediación de pulpa de limón (pH 2.5) con Cr(VI) [50 mg/L] por *Aspergillus niger* ( $1 \cdot 10^5$  conidios/g de pulpa de limón), a pH 2.5 y 30°C. Valores obtenidos a las 96 h de Incubación. Las barras de error muestran la desviación estándar.

temperatura no fue beneficiosa porque al usar organismos vivos interviene el metabolismo celular. De acuerdo a Vullo (2003) y Gutiérrez Corona *et al.* (2010), la remoción del metal se

realiza por adsorción a la pared celular y absorción al citoplasma celular.

### Variación del número de conidios

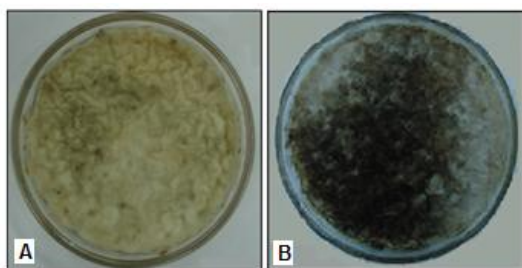
Al aumentar el número de conidios de *A. niger*, de 1 a 2 y  $3 \cdot 10^5$  conidios/g de pulpa, se obtuvieron Ef de 97.3; 99.0 y 98.8%, respectivamente. En la tabla 1, se muestra que las velocidades de remoción del metal fueron significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) cuando se aumentó el número de conidios de 1 a  $2 \cdot 10^5$  conidios/g (superíndice, a), pero al incrementar de 2 a  $3 \cdot 10^5$ /g de pulpa, los valores de velocidad no fueron diferentes como se esperaba ( $p > 0.05$ ) (índices iguales, b). Esto probablemente se debió a que al aumentar el número de conidios, los mismos compiten por el sustrato y no todos desarrollan.

**Tabla 1:** Cr(VI) removido de la pulpa y velocidad de remoción por diferentes números de conidios de *Aspergillus niger*, cultivado a pH 2.5 y 30°C. Los valores obtenidos a las 96 h son promedio de dos experimentos por duplicado.

Número de conidios $\cdot 10^5$ /g pulpa	Remoción de Cr(VI) de la pulpa (mg/L)	Velocidad de remoción de Cr(VI) (mg/h)
1	48.50±0.1	0.505±0.01 <sup>a</sup>
2	49.51±0.1	0.515±0.01 <sup>b</sup>
3	49.39±0.1	0.514±0.02 <sup>b</sup>

(a): difieren; (b): no difieren; (±), desviación estándar

Las observaciones al microscopio óptico de los cultivos de *A. niger*, no mostraron alteraciones en las hifas o cuerpos de fructificación. El indicio del efecto del Cr(VI), fue la maduración temprana de los conidios (48 h), respecto al cultivo control (72 h) (Fig. 2). De este resultado surgió la pregunta: ¿Es la concentración o la presencia de Cr(VI) la que estimuló la madurez temprana de los conidios? Para responder, los cultivos del hongo en pulpa con Cr(VI) (5,10 y 20 mg/L) fueron observados cada 24 h, mostrando que a las 48 h en todos aparecieron grandes zonas negras, a diferencia del control. Este resultado sugirió que es la presencia del metal, la que estimuló la maduración de los conidios de blancos a negros. Estos resultados, coinciden con el reporte de Martínez Yepes (2009), quien observó diferentes respuestas estructurales de cepas bacterianas frente al estrés oxidativo del Cr(VI).



**Fig. 2.** Desarrollo de *Aspergillus niger* en pulpa, a pH 2.5 y 30 °C. A) sin Cr(VI) y B) con 50 mg/L del metal. Fotografía tomada a las 48 h de incubación

## *Concentración de proteínas y Variaciones en el perfil proteico intracelular*

En cultivos con Cr(VI) (50 mg/L) la concentración de proteínas en el extracto crudo fue 0.22 mg/mL, respecto al control (0.25 mg/L). Esta disminución concuerda con la reducción del número de bandas proteicas obtenidas en una PAGE no desnaturizante, (como se muestra en la figura 3. Los resultados coinciden con los de Ksheminska *et al.* (2003) y Rodríguez Reyes & Gutiérrez Corona (2010), quienes con una electroforesis-PAGE, no desnaturizante, de los filtrados de hongos cultivados en medios con 25 y 50 mg/L de Cr(VI), revelaron la supresión de la síntesis de proteínas en respuesta al metal pesado.

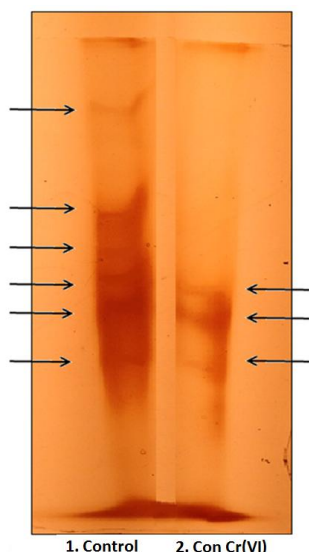
## *Actividad poligalacturonasa*

PG (EC 3.2.1.15), es una de las enzimas sintetizadas, mayoritariamente, por *A. niger* en sustratos líquidos o sólidos que contienen pectina, como en la pulpa de limón. En la Tabla 2, se muestra que la actividad de esta enzima disminuyó un 24% en cultivos con Cr(VI), con respecto al control.

## *Actividad naringinasa*

Naringinasa es un complejo enzimático ( $\alpha$ -L-ramnosidasa, EC.3.2.1.40 y  $\beta$ -D-glucosidasa, EC.3.2.1.21) que hidroliza naringina liberando naringenina y azúcares reductores que son metabolizados por el hongo (Soria *et al.*, 2004). En la Tabla 2, se muestra que en presencia de Cr(VI) la producción disminuyó un 85% respecto





**Fig. 3.** Perfil proteico de electroforesis-PAGE en condiciones no desnaturalizantes de: 1- Extractos crudos obtenidos a las 48 h de cultivos control de *A. niger* y 2- Extractos crudos de cultivos desarrollados con Cr(VI), 50 mg/L a pH 2.5 y 30°C. Las flechas indican las bandas proteicas.

al control. Esto sugiere, un fuerte efecto fisiológico del metal, sobre *A. niger*. Este resultado coincide con los de bacterias (Polti, 2008); levaduras como *Candida maltosa* (Ramírez Ramírez *et al.*, 2004) y hongos filamentosos (Acevedo Aguilar *et al.*, 2008; Coreño Alonso, 2009).

#### *Mecanismo de detoxificación de A. niger*

En el extracto crudo intracelular se determinó una actividad de cromato reductasa 60 veces más alta que en el cultivo control (Tabla 2), lo cual sugirió que el microorganismo utilizó la actividad de reductasa para su detoxificación a fin de minimizar la toxicidad del

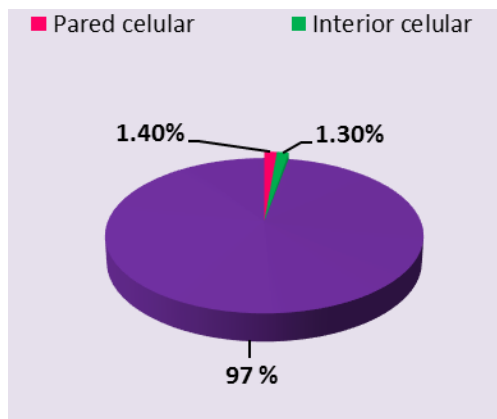
metal pesado. Para comprobar si el Cr(VI) fue reducido a Cr(III) se determinó cromo total y Cr(VI) residual en todo el sistema pulpa-microorganismo. En la figura 4 se muestra un bajo porcentaje de Cr(VI) adsorbido a las paredes celulares y en el interior celular. Mientras que, por absorción atómica se determinó que el 97.30% se encontró como Cr(III) en todo el sistema. Se conoce que éste interviene en funciones metabólicas celulares y en el metabolismo de la glucosa de los organismos (Balk *et al.*, 2007).

**Tabla 2:** Efecto del Cr(VI) sobre la producción de poligalacturonasas (U/mL); naringinasas (U/mL) y reductasas (U/mg proteínas), medidas en los extractos crudos de *A. niger*, desarrollado en pulpa sin el metal (control) y con Cr(VI) [50 mg/L], a pH 2.5 y 30°C. Valores obtenidos a las 96 h de incubación.

Actividad	Extractos crudos	
	Control	Cr(VI)
Poligalacturonasas	0.17 ±0.01	0.130 ±0.01
Naringinasas	0.02 ±0.01	0.003±0.001
Reductasas	0.001±0.0001	0.060 ±0.01

± desviación estándar

De acuerdo a estos resultados proponemos que el mecanismo de detoxificación del Cr(VI) por *A. niger* sería la reducción del metal tanto a nivel de pared (extracelular) como en el interior de la célula (intracelular) por actividades reductoras específicas, a fin de obtener un compuesto menos tóxico como el Cr(III). Los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por Coreño Alonso (2009) y Acevedo Aguilar *et al.*



**Fig. 4.** Distribución de Cromo en el sistema pulpa - microorganismo. Cr(VI) adsorbido a las paredes (■); Cr(VI) en el interior celular (■) y Cr(III) en el sistema (■). Valores obtenidos a las 96 h de incubación.

(2008), quienes reportaron que el Cr(VI) puede ser reducido tanto a nivel de pared como en el interior celular. Estos resultados son importantes porque el Cr(VI) se transforma en un compuesto menos tóxico y no es acumulado en el interior celular. Estos resultados son importantes porque el Cr(VI) se transforma en un compuesto menos tóxico y no es acumulado en el interior celular como ocurre en los vegetales. El proceso de biorremediación de residuos sólidos planteado resulta interesante ya que se demuestra la utilidad de los procesos de biorremediación para disminuir la contaminación de metales pesados o suplementar los tratamientos físico-químicos convencionales, a fin de obtener una verdadera remediación de residuos en el medio ambiente y disponer del mismo para ser empleado en la producción de metabolitos o como alimento animal.

## REFERENCIAS

- Acevedo-Aguilar F, Wrobel K, Lofthus K, Caruso J, Coreño Alonso A, Gutiérrez Corona J & Wrobel K (2008) Analytical speciation of chromium in in-vitro cultures of chromate-resistant filamentous fungi. *Anal. Bioanal. Chem.* 392:269-276.
- American Public Health Association (APHA), American Water Work Association (AWWA) & Water Environment Federation (WEF) (1989) Standards methods for examination of water and wastewater. 17 th Edition. Washington; USA.
- Amini M, Younesi H & Bahramifar N (2009) Bioprosorption of nickel (II) from aqueous solution by *Aspergillus niger*: response surface methodology and isotherm study. *Chemosph.* 75: 1483-1491.
- Balk E, Tatsioni A, Lichtenstein A, Lan J & Pittas A (2007) Effect of chromium supplementation on glucose metabolism and lipids a systematic review of randomized controlled trials. *Diabetes care.* 30: 2154-2163.
- Benimeli C (2004) Biodegradación de plaguicidas organoclorados por actinobacterias acuáticas. Tesis Doctoral. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán. Argentina.
- Blum H, Beier H & Gross H (1987) Improved silver staining of plant proteins RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electroph.* 8:93-99.

# Artículos

- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method y protein utilizing the principles of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Calderón F & Pavlova M (1999) Metodologías para Análisis Químico de Suelos. [http://www.drcalderonlabs.com/Metodos/Analisis\\_De\\_Suelos/MetodosQuimicosSuelos.htm](http://www.drcalderonlabs.com/Metodos/Analisis_De_Suelos/MetodosQuimicosSuelos.htm)
- Cervantes C, Campos García J, Devars S, Gutiérrez Corona F, Loza Tavera H, Torres Guzmán J & Moreno Sánchez R (2001) Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 25:335-347.
- Congeevaram S, Dhanarani S, Park J, Dexilin M & Thamaraiselvi K (2007) Biosorption of chromium and nickel by heavy metal resistant fungal and bacterial isolates. *J. Hazard. Mat.* 146:270-277.
- Coreño-Alonso A (2009) Caracterización del sistema de reducción de Cr (VI) de la cepa de *Aspergillus niger* Ed8 resistente a cromato. Tesis de doctorado (Biología), Posgrado en Biología Experimental, Universidad de Guanajuato, Guanajuato.
- EPA/IRIS (2010) U.S. Environmental Protection Agency. Toxicological Review of Hexavalent Chromium. *External Review Draft.* Washington.
- Gagneten A & Ceresoli N (2004) Efectos del efluente de curtiembre sobre la abundancia y riqueza de especies del zooplancton en el arroyo Las Prusianas (Santa Fe, Argentina). *Intercien.* 29: 702-708.
- Greenberg A & Clesceri L (1992) Standard methods for the examination of water and for the quantification of microgram qualities wastewater USA; Washington; *American Public Health Association.* 18:358-360.
- Gutiérrez-Corona J, Espino Saldaña A, Coreño Alonso A, Acevedo Aguilar F, Reyna López G, Fernández F, Tomasini A, Wrobel K & Wrobel K (2010) Mecanismos de interacción con cromo y aplicaciones biotecnológicas en hongos. *Rev. Lat. Biotecnol. Amb. Algal* 1:47-63.
- Goyal N, Jain S & Banerjee U (2003) Comparative studies on the microbial adsorption of heavy metals. *Adv. Environ. Res.* 7: 311-319.
- Hames B & Rickwood D (1981) Gel electrophoresis of proteins. *IRL Press;* Whashington; D.C.
- Ksheminska H, Jaglraz A, Fedorovych D, Babyak L, Yanovych D, Kaszycki P & Koloczek H (2003) Bioremediation of chromium by the yeast *Pichia guilliermondii*: Toxicity and accumulation of Cr (III) and Cr (VI) and the influence of riboflavin on tolerance. *Microbiol. Res.* 58:59-67.
- Liu Y, Xu W, Zeng G, Li X & Goa H (2006) Cr(VI) reduction by *Bacillus* sp. isolated from chromium landfill. *Proc. Biochem.* 41: 1981–1986.
- Machado M, Soares E & Soares H (2010) Removal of heavy metals using a brewers yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*: Chemical speciation as a tool in the prediction and improving of treatment efficiency of real electroplating effluents. *J. Hazard. Mat.* 180: 347:353. Maldonado M (2005) Fermentación en sustrato sólido *En: Biotecnología Microbiana.* Navarro A,

# Artículos

- Maldonado M. & Rubio C (eds.). *Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia*. UNT. 3:49-65.
- Martínez-Yepes M (2009) Aislamiento de cepas nativas bacterianas a partir de biopelícula obtenida de un sitio de vertimiento de aguas residuales con alto contenido de cromo. Tesis Maestría; Universidad Nacional de Colombia.
- Moore W, Mc Dermott G, Post M & Ettinger M (1961) Effects of chromium on the activated sludge process. *J. Water Pollution Cont. Fed.* 33:54-72.
- Nelson N (1944) A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* 153: 375–380.
- Otiniano M, Tuesta L, Robles H, Luján M & Chávez M (2005) Biorremediación de Cr(VI) de aguas residuales de curtiembres por *Pseudomonas sp.* y su efecto sobre el ciclo celular de *Allium cepa*. *Rev. Médica Vallej.* 4: 32- 42.
- Palacios A (1997) Contaminación ambiental, origen, clases, fuentes y efectos. En: Introducción a la toxicología ambiental. Palacio A & America L. (ed.). *Meteppec ECO.* 4: 37-52.
- Polti M (2008). Estudio de los mecanismos de resistencia a cromo por cepas de actinomicetes regionales. Tesis Doctoral. Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia. Universidad Nacional de Tucumán. Argentina.
- Ramírez-Ramírez R, Calvo Méndez C, Ávila Rodríguez M, Lappe P, Ulloa M, Vázquez Juárez R & Gutiérrez Corona J (2004) Cr(VI) reduction in a chromate-resistant strain of *Candida maltosa* isolated from the leather industry. *Ant. van Leeuwenhoek* 85:63-68.
- Robles-González F & Poggi Varaldo H (2008) A review on slurry bioreactors for bioremediation of soils and sediments. *Microb. Cell Fact.* 7:5.
- Rodríguez-Reyes S & Gutiérrez Corona F (2010) Efecto de factores nutricionales sobre la secreción de la enzima glucosa oxidasa (GOX) en cepas de *Aspergillus niger var. tubigenensis*. *Ver. Inv. Cient.* 3: 2-9.
- Romero N, Amoroso M & Tracanna R (1997) Estudio de la carga orgánica y bacteriana del embalse de Rio Hondo (Tucumán – Santiago del Estero; Argentina). *Miscel.* 103: 3-10.
- Somogyi M (1945) A new reagent for the determination of sugar. *J. Biol. Chem.* 160: 61–68.
- Soria F, Ellenrieder G, Graselli M, Navarro del Cañizo A & Cascone O (2004) Fractionation of the naringinase complex from *Aspergillus terreus* by dye affinity chromatography. *Biotechnol. Lett.* 26: 1265-1268.
- Suárez S & Rubio C (2011) Adsorción de iones Cr(VI) con residuos de la industria citrícola y su recuperación como producto enriquecido con proteína microbiana. Maestría en Gestión Ambiental. Fac. Ciencias Naturales. Universidad Nacional de Tucumán. Argentina.

# Artículos

Viniegra-González G (1997) Solid state fermentation: definition, characteristics, limitations and monitoring. In: *Advances in Solid State Fermentation*. Kluwer F (ed.), *Academic Publishers Dordrecht*. 2:5-22.

Vullo D (2003) Microorganismos y metales pesados. Una interacción en beneficio del medio ambiente. *Rev. Qca. Viva* 2: 93-104.

Wood T (2008) Molecular approaches in bioremediation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 19: 572-578.