

MONITOREO ECOTOXICOLÓGICO DE PARTÍCULAS BIOSINTETIZADAS ANTES Y DESPUÉS DE SU USO EN PROCESOS DE REMOCIÓN DE CROMO

Gabriela S. Paronetto¹, Gabriela V. Svartz¹, Melisa S. Olivelli¹, Roberto J. Candal¹, Jose L. Marco-Brown^{1*}

¹ IIIA-UNSAM-CONICET, Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental, EHyS-UNSAM, San Martín, Provincia de Buenos Aires, Argentina.

* Autor para correspondencias. josemarcobrown@gmail.com

RESUMEN

Se biosintetizaron partículas de baricita (fosfato de Fe(II)) soportadas en montmorillonita (BioFe-MMT) usando consorcios microbianos que reducen Fe(III). Se estudió la remoción de cromo usando BioFe-MMT (2,4 g L⁻¹), pH 4,0, partiendo de una solución de Cr(VI) de 10 mg L⁻¹, lográndose una remoción del 99,4% de Cr(VI) y 98,0% del Cr total, mediante reducción y adsorción. La eficiencia en la remoción mejoró al reducir el tiempo de biosíntesis, como consecuencia de la obtención de partículas más pequeñas. Además, se evaluó la toxicidad de BioFe-MMT y de la solución de Cr(VI) antes y después del proceso de remediación mediante bioensayos estandarizados en larvas de *Rhinella arenarum*. Cr(VI) en solución mostró toxicidad, pero el material BioFe-MMT y el sobrenadante obtenido post remoción no afectaron la sobrevivencia de las larvas. Por otro lado, el barro residual luego del tratamiento (Cr-BioFe-MMT) fue tóxico tras 216 h de exposición, debido a posibles efectos de lixiviación del Cr(VI) adsorbido. Aunque el tratamiento reduce la concentración de Cr(VI) y Cr total a niveles seguros, es necesario disponer adecuadamente el barro para evitar efectos secundarios por lixiviación.

Palabras Clave: Partículas biosintetizadas de hierro, remoción de cromo, metales pesados, larvas de anfibios, bioensayos estandarizados.

INTRODUCCIÓN

El vertido constante de cromo (Cr) por diversas industrias, incluyendo su uso en metalurgia, curtido de cuero, producción de pigmentos y preservantes para madera, es una preocupación ambiental y de salud. El Cr puede ser esencial en pequeñas cantidades, pero en su forma hexavalente (Cr(VI)) es altamente tóxico y se bioacumula en organismos acuáticos (Kamila et al., 2023). Además, su alta solubilidad en agua y baja adsorción en suelos contribuyen a la contaminación de aguas subterráneas. Debido a estos impactos, el Cr(VI) está clasificado como contaminante prioritario por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA) (Thangaraj and Bhaskarapillai, 2022), y la OMS ha establecido un límite máximo de $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ en el agua potable (OMS, 2019).

Resulta relevante la generación de nuevas tecnologías que sirvan como alternativas sostenibles para el tratamiento de cuerpos de agua contaminados. En este contexto, este equipo de trabajo ha desarrollado recientemente la biosíntesis de partículas de baricita, $(\text{Ca}, \text{Fe}^{2+})_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$, soportadas en arcilla montmorillonita (BioFe-MMT) a través de una metodología amigable con el ambiente. Las mismas fueron ensayadas en procesos de remediación de Cr(VI) obteniéndose resultados prometedores (Paronetto et al., 2024).

En el desarrollo de procesos de remoción de contaminantes utilizando materiales adsorbentes es necesario analizar que el material en sí mismo no se convierta en un contaminante y no genere toxicidad. Los bioensayos estandarizados con anfibios, como el ANFITOX, permiten detectar riesgos ambientales, asegurar la sostenibilidad de nuevas tecnologías, establecer límites seguros de exposición y estrategias de gestión ambiental al determinar la toxicidad de las sustancias en diferentes condiciones de exposición (Pérez Coll et al., 2018). Los anfibios son considerados bioindicadores de la salud ambiental, principalmente durante el período de desarrollo temprano de su ciclo de vida, debido a su piel permeable que absorbe fácilmente productos químicos del ambiente (Svartz et al., 2017).

El protocolo ANFITOX evalúa la toxicidad de muestras acuosas utilizando como modelo biológico el desarrollo temprano de *Rhinella arenarum*, un anfibio autóctono, proporcionando datos valiosos para estudios ambientales y evaluaciones de la calidad del agua (Svartz et al., 2017).

OBJETIVOS

En este trabajo se persiguió el propósito de reducir el tiempo de biosíntesis de las partículas de baricita soportadas en arcilla montmorillonita (BioFe-MMT) conservando la capacidad de eliminación de Cr(VI). Además, se evaluó la toxicidad de BioFe-MMT y de la solución de Cr(VI) antes y después del proceso de remediación, mediante bioensayos estandarizados con larvas de *Rhinella arenarum*.

METODOLOGÍA

Síntesis y caracterización de BioFe-MMT

El material BioFe-MMT se sintetizó utilizando un consorcio de bacterias reductoras de hierro (Paronetto et al., 2024). Se prepararon tres materiales variando el tiempo de crecimiento bacteriano durante 3, 4 y 6 semanas, respectivamente (BioFe-MMT 3, BioFe-MMT 4 y BioFe-MMT 6, respectivamente). Se obtuvieron micrografías mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) de los materiales y se evaluó la eficiencia de estos en la remoción de Cr(VI) y cromo total (Cr_{Total}).

Evaluación de la eficiencia de remoción de Cr(VI) y Cr total con BioFe-MMT

Se obtuvieron las cinéticas de remoción de Cr total y Cr(VI) usando BioFe-MMT 3, BioFe-MMT 4 y BioFe-MMT 6, según lo indicado en la ref. (Paronetto et al., 2024), partiendo de una solución de 10 mg L^{-1} de Cr(VI), pH 4,0 y dosis de adsorbente $2,4 \text{ g L}^{-1}$. Luego se obtuvieron el sobrenadante (R-S) y el barro después del tratamiento de remoción (Cr-BioFe-MMT) por filtración y se determinó la concentración de Cr(VI) y Cr total. Los datos reportados

son valores medios de dos experimentos replicados, con un error experimental típico menor al 5%.

Bioensayos de toxicidad

Los bioensayos consistieron en lotes de 10 larvas de *Rhinella arenarum* (estadio S.25), por triplicado, colocadas aleatoriamente en placas de Petri con 33 ml de solución de los diferentes tratamientos preparadas en una solución salina suave (solución ANFITOX, SA). Se expusieron durante 96 h (agudo), 168 h (subcrónico) y 504 h (crónico) en un régimen semi-estático, reemplazando las soluciones cada 48 h. Las larvas se alimentaron con alimento balanceado para peces Tetra Color® en cada cambio de soluciones. La temperatura se mantuvo a 20 ± 2 °C, con un fotoperíodo de luz/oscuridad de 12:12.

Se evaluó la toxicidad de Cr(VI) antes y después del tratamiento, y la seguridad del material de remoción en larvas de *R. arenarum*. Se estudiaron las condiciones: 1) SA (control negativo), 2) Soluciones de Cr(VI), 3) Suspensiones de BioFe-MMT, 4) Soluciones obtenidas luego del tratamiento de remoción con BioFe-MMT (R-S) y 5) Suspensiones del barro obtenido después del tratamiento de remoción (Cr-BioFe-MMT).

Para validar los bioensayos, la mortalidad en los controles no superó el 10%. Los experimentos se realizaron según los protocolos de cuidado animal aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales en Experimentación (CICUAE) de la Universidad Nacional de San Martín (Res. CD N°05/2024).

Registro y análisis de datos de toxicidad

La sobrevida se registró cada 24 h y las alteraciones etológicas (locomoción y comportamiento) cada 48 h. Las concentraciones letales (CLs) se estimaron mediante el método probit con el software TRAP (vs. 1.3) y se construyeron los perfiles de toxicidad (curvas TOPs) basados en CL 10, CL 50 y CL 90. Los porcentajes de efectos letales y subletales se analizaron

estadísticamente con el test ANOVA-Dunnett para comparar las medias de los tratamientos con el control (media \pm desviación estándar, $p < 0,05$). Los supuestos de ANOVA se corroboraron con los tests de Bartlett y Shapiro-Wilks. El valor NOEC (Concentración Sin Efecto Observado) se determinó como la máxima concentración que no causó mortalidad o efectos subletales significativos en comparación con el control en un tiempo de exposición específico. Los análisis se realizaron con GraphPad Prism (vs. 5.0)/Sigma Plot (vs. 11.0).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis mediante MEB mostró que las partículas de baricita biosintetizadas, estructuras con morfología cúbica en la Figura 1, aumentan de tamaño con el tiempo de síntesis: $1,5 \pm 0,1 \mu\text{m}$ a las 3 semanas (Figura 1A), $1,8 \pm 0,2 \mu\text{m}$ a las 4 semanas (Figura 1B) y $1,93 \pm 0,04 \mu\text{m}$ a las 6 semanas (Figura 1C). La síntesis prolongada favorece la formación de partículas más grandes.

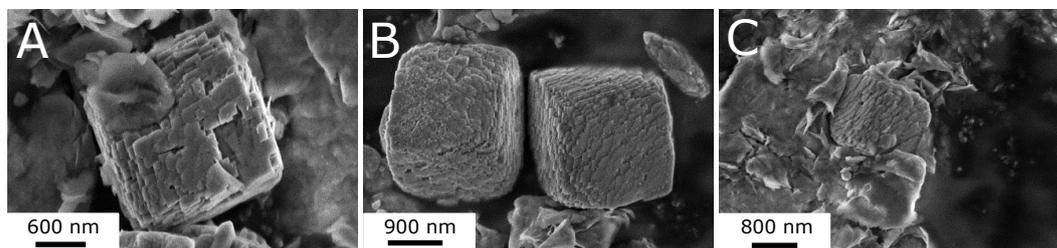


Figura 1. Imágenes MEB de BioFe-MMT a (A) 3 semanas, (B) 4 semanas y (C) 6 semanas.

En la Figura 2 se muestran cinéticas de remoción de Cr(VI) y Cr total obtenidas usando los tres materiales. Los resultados indicaron que la remoción de Cr(VI) y Cr total se vio favorecida con un tamaño menor de partícula. Dado que para todos los materiales la remoción cumple con los límites establecidos por ACUMAR ($\text{Cr}_{\text{Total}} < 2 \text{ mg L}^{-1}$, $\text{Cr(VI)} < 0,2 \text{ mg L}^{-1}$) (ACUMAR, 2020) y considerando que Cr(VI) es la especie más tóxica, se eligió BioFe-MMT 3 para los bioensayos por su rápida síntesis y eficiencia en la eliminación de Cr(VI).

Las curvas TOPs mostraron un aumento significativo de la toxicidad con el tiempo de exposición (Figura 3A). La CL 50 disminuyó de 67,3 mg L⁻¹ a las 48 h a 0,04 mg L⁻¹ a las 504 h, con un aumento de toxicidad de más de 1600 veces. El mayor incremento en toxicidad ocurrió entre las 48 y 96 h. Se determinaron los valores NOEC a distintos tiempos de exposición (Figura 3B). Hasta 1 mg L⁻¹ de Cr(VI) no se observó letalidad a las 96 h, ni anomalías a 0,01 mg L⁻¹. Para exposición subcrónica, concentraciones de 0,01 mg L⁻¹ no causarían alteraciones y con 0,1 mg L⁻¹ no se registraría mortalidad. Hacia el final del bioensayo, la exposición a 0.001 mg L⁻¹ no generaría mortalidad ni alteraciones en las larvas.

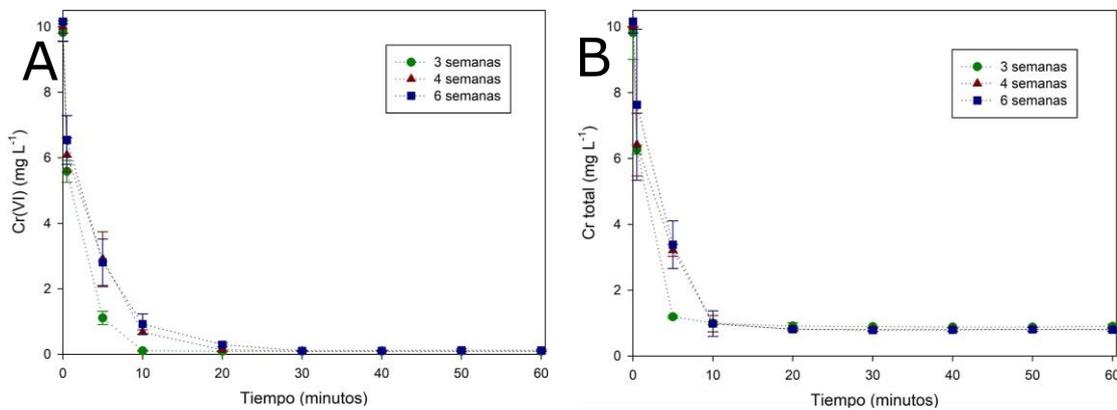


Figura 2. Perfiles de concentración de Cr(VI) (A) y Cr_{Total} (B) a lo largo del tiempo usando BioFe-MMT (2,4 g L⁻¹) sintetizado durante 3, 4 y 6 semanas, con un pH constante de 4,0, utilizando una solución inicial de Cr(VI) de 10 mg L⁻¹.

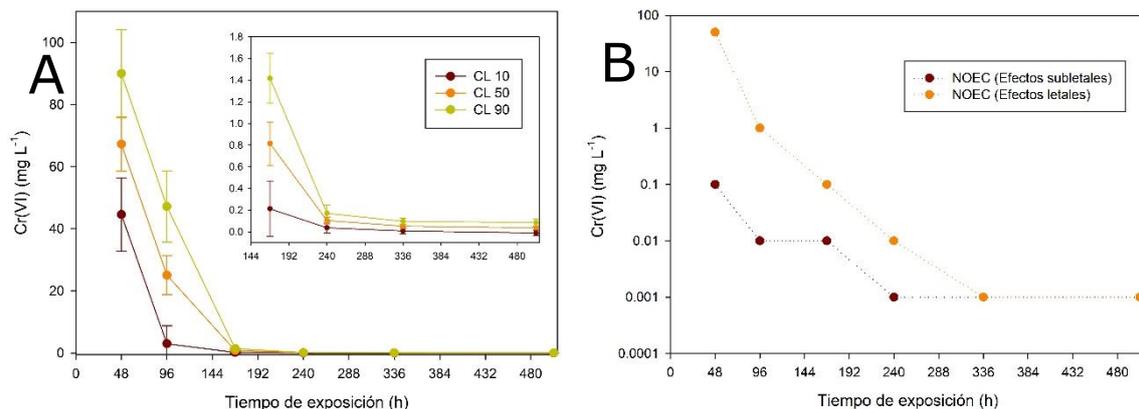


Figura 3. (A) Curvas del perfil de toxicidad basadas en CL 10, 50 y 90 para larvas de *R. arenarum* expuestas a Cr(VI), con un enfoque detallado en la exposición subcrónica y crónica (esquina superior derecha). (B) Valores NOEC para efectos subletales y letales en larvas de *R. arenarum* expuestas a Cr(VI) en diferentes tiempos.

La Figura 4 muestra las curvas de sobrevivencia de las larvas de *R. arenarum* expuestas a los distintos tratamientos. La exposición a 10 mg L^{-1} de Cr(VI) no causó mortalidad significativa en las primeras 72 h, pero alcanzó el 100 % a las 192 h. El sobrenadante tratado con BioFe-MMT (R-S) y el BioFe-MMT no causaron toxicidad. La suspensión de Cr-BioFe-MMT mostró efectos letales significativos a partir de las 216 h, alcanzando el 100 % de mortalidad a las 504 h. Esto sugiere la necesidad de retirar el material de remediación antes de las 216 h. La toxicidad podría deberse a la desorción de Cr(VI) tras 24 h, siendo el perfil de toxicidad de Cr-BioFe-MMT similar al de una solución de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de Cr(VI).

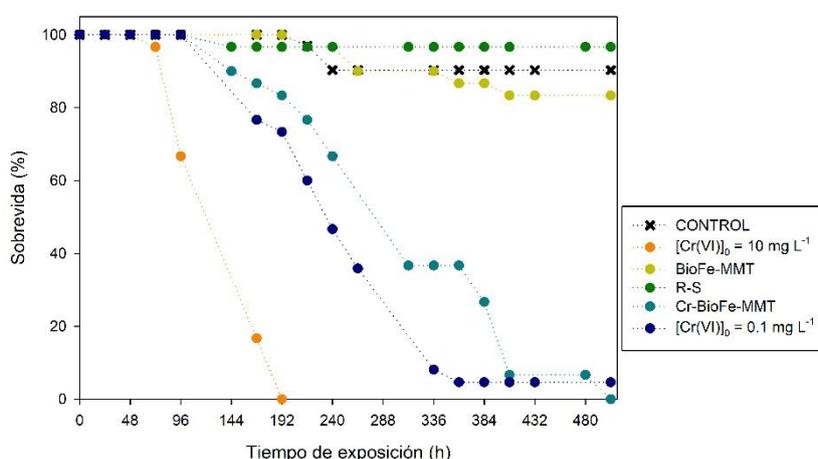


Figura 4. Curvas de sobrevivencia de larvas de *R. arenarum* expuestas a soluciones de $0,1$ y 10 mg L^{-1} de Cr(VI), partículas biosintetizadas suspendidas en solución ANFITOX (BioFe-MMT), sobrenadante obtenido después del tratamiento (R-S) y barro después del tratamiento de remoción (Cr-BioFe-MMT).

CONCLUSIONES

Se logró disminuir el tiempo de síntesis del material estudiado obteniéndose además una mejora en el proceso de remoción de Cr(VI) y Cr total al utilizar el material sintetizado en un período de tiempo corto (3 semanas). Con el tratamiento de remoción de cromo se consiguen niveles seguros de Cr(VI) para el desarrollo temprano de este anfibio, siendo necesario retirar y disponer adecuadamente el barro obtenido luego del proceso de remoción de Cr(VI) (Cr-BioFe-MMT) para evitar los posibles efectos secundarios

ocasionados por la lixiviación del Cr adsorbido.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACUMAR, Autoridad de Cuenca Matanza Riachuelo (2020), Resolución 283/2019,

<https://www.argentina.gob.ar/normativa/nacional/resoluci%C3%B3n-283-2019-334281/texto>

Kamila, S., Shaw, P., Islam, S., Chattopadhyay, A., (2023) Ecotoxicology of hexavalent chromium in fish: An updated review. *Science of The Total Environment*, 890, 164395.

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164395>

OMS, (2019) Guías para la calidad del agua de consumo humano. 4: 608.

Paronetto, G.S., Olivelli, M.S., Montes, M.L., Fernández, M.A., Delfosse, V.C., Marco-Brown, J.L., Candal, R., (2024) One-Pot Green-Synthesis of Supported Reductive Biogenic Iron-Based Materials for the Removal of Cr(VI). *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 63, 1893-1902.

<https://doi.org/10.1021/acs.iecr.3c04212>

Pérez Coll, C.S., Pabón-Reyes, C., Meichtry, J.M., Litter, M.I., (2018) Monitoring of toxicity of As(V) solutions by AMPHITOX test without and with treatment with zerovalent iron nanoparticles. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 60, 138-145.

<https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.04.018>

Svartz, G., Papa, M., Gosatti, M., Jordán, M., Soldati, A., Samter, P., Guraya, M.M., Pérez Coll, C., Perez Catán, S., (2017) Monitoring the ecotoxicity of γ -Al₂O₃ and Ni/ γ -Al₂O₃ nanomaterials by means of a battery of bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 144, 200-207. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.06.029>

Thangaraj, V., Bhaskarapillai, A., (2022) Crosslinked poly(ionic liquid)s as selective receptors for Cr(VI) – Counter anion effect and application in treating drinking water and tannery effluents. *Chemosphere*, 286, 131922. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131922>