



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MÉXICO**



---

---

**INSTITUTO INTERAMERICANO DE TECNOLOGÍA  
Y CIENCIAS DEL AGUA**

**ELIMINACIÓN DE ESPECIES DE CROMO EN SOLUCIONES ACUOSAS  
POR UN SISTEMA A BASE DE BIOPELÍCULAS SOPORTADAS  
EN MATERIAL ZEOLÍTICO**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**DOCTORA EN CIENCIAS DEL AGUA**

P R E S E N T A:

**M. en C. CECILIA ARACELI CERON RIOS**

DIRECTORES:

**DRA. MARINA ISLAS ESPINOZA**

**DRA. MARÍA TERESA OLGUÍN GUTIÉRREZ**

**DR. JUAN CARLOS VÁZQUEZ CHAGOYÁN**



**IITCA**

TOLUCA, DICIEMBRE 2021

## Contenido

Dedicatorias.....	I
Agradecimientos.....	II
Relación de tablas.....	VI
Relación de figuras.....	VII
Acrónimos.....	VIII
<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
<b>CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>8</b>
1.1 Antibióticos.....	9
1.2 Metales .....	13
1.3 Zeolita .....	14
1.4 Biopelículas bacterianas .....	15
1.4.1 Condiciones de adherencia.....	17
1.4.2 Unión irreversible y multiplicación bacteriana.....	18
1.4.3 Promoción de la dispersión.....	18
1.5 Bacterias reductoras de Cr y resistentes a antibióticos.....	18
1.6 Procesos de remediación .....	20
1.7 Zeolita, biopelícula y remoción de Cr.....	21
1.8 Zeolita, biopelícula, remoción de metales pesados y antimicrobianos.....	24
1.9 Biofiltros para la remoción de Cr.....	25
<b>CAPÍTULO II. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
2.1 JUSTIFICACIÓN CONTEXTUAL Y CIENTÍFICA.....	27
2.2 HIPOTESIS.....	27
2.3 OBJETIVO GENERAL.....	28
2.4 OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	28

<b>CAPÍTULO III. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>29</b>
3.1 Obtención y reactivación de cepas.....	31
3.2 Pruebas de compatibilidad.....	31
3.2.1 Difusión en agar.....	32
3.2.2 Detección con sensi-disco.....	32
3.3 Formación de consorcios.....	32
3.4 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para Cr(VI).....	33
3.5 Remoción de Cr(VI) en un medio acuoso.....	35
3.5.1 Preparación de la solución estándar.....	35
3.5.2 Preparación del inóculo bacteriano.....	35
3.5.3 Preparación e inoculación de cultivos con Cr(VI).....	35
3.5.4 Curvas de crecimiento bacteriano .....	36
3.5.5 Análisis de Cr(VI) extra e intracelular.....	36
3.5.6 Análisis de Cr total extra e intracelular.....	38
3.5.7 Análisis de Cr(III) extra e intracelular.....	38
3.6 Resistencia bacteriana a antibióticos.....	38
3.7 Acondicionamiento y caracterización zeolítico.....	39
3.7.1 Acondicionamiento.....	39
3.7.2 Caracterización.....	40
3.7.2.1 <i>Microscopía electrónica de barrido (MEB) y Análisis elemental (EDS)..</i>	40
3.8 Remoción de Cr(VI) en presencia de zeolita sódica (por lotes).....	40
3.9 Biorreactor .....	41
<b>CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>44</b>
4.1 Obtención y reactivación de las cepas .....	45
4.1.1 Morfología de las colonias reactivadas y tinción de Gram.....	45
4.2 Pruebas de compatibilidad.....	46
4.3 Formación de consorcios.....	48
4.4 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para Cr(VI).....	48
4.5 Remoción de Cr(VI) en un medio acuoso en un sistema en lote (Batch).....	55
4.5.1 Crecimiento de las bacterias en presencia y ausencia de Cr(VI).....	55
4.5.2 Reducción de Cr(VI) a Cr(III).....	59

4.5.3 Concentración de Cr(III) intra y extracelular.....	63
4.6 Parámetros fisicoquímicos.....	66
4.7 Resistencia bacteriana a antibióticos.....	71
4.8 Remoción de Cr(VI) con un sistema Bach utilizando <i>Pseudomonas</i> <i>graminis</i> soportada en zeolita sódica.....	77
4.8.1 Caracterización del material zeolítico.....	77
4.8.1.1 Microscopía electrónica de barrido de bajo vacío (MEB) y análisis elemental (EDS).....	77
4.8.2 Formación de una biopelícula en zeolita sódica.....	79
4.8.3 Remoción y reducción en bach de Cr(VI) utilizando <i>Pseudomonas</i> <i>graminis</i> y zeolita sódica.....	80
4.9 Remoción y reducción en columna de Cr(VI) utilizando <i>Pseudomonas</i> <i>graminis</i> y zeolita sódica.....	85
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>89</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>90</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>101</b>

## Relación de tablas

<b>Tabla 1.</b>	Clasificación de antibióticos de acuerdo a su estructura química.....	12
<b>Tabla 2.</b>	Remoción de Cr(VI) utilizando biopelículas soportadas en zeolitas..	23
<b>Tabla 3.</b>	Columnas utilizadas para la remoción de Cr(VI) .....	25
<b>Tabla 4.</b>	Concentración mínima inhibitoria a Cr(VI) de diferentes grupos microbianos.....	34
<b>Tabla 5.</b>	Grupos experimentales de las curvas de crecimiento y reducción bacteriana.....	37
<b>Tabla 6.</b>	Grupos experimentales para la remoción de Cr(VI) en lote.....	41
<b>Tabla 7.</b>	Características y condiciones de operación del biorreactor.	42
<b>Tabla 8.</b>	Remoción de Cr(VI) en un biorreactor de columna.....	43
<b>Tabla 9.</b>	Especies, origen y consorcios.....	45
<b>Tabla 10.</b>	Características morfológicas coloniales.....	45
<b>Tabla 11.</b>	Halos de inhibición en presencia de <i>S. aureus</i> .....	46
<b>Tabla 12.</b>	Lista de bacterias cromo-resistentes, origen y concentración mínima inhibitoria.....	51
<b>Tabla 13.</b>	Crecimiento máximo de cada microorganismo y los consorcios, en presencia y ausencia de Cr(VI) en el medio.....	55
<b>Tabla 14.</b>	Porcentaje de acumulación de Cr(III) en la biomasa bacteriana.....	64
<b>Tabla 15.</b>	Porcentaje de Cr(VI) removido, valores de O <sub>2</sub> y pH al final del proceso (196 h).....	69
<b>Tabla 16.</b>	Actividad antimicrobiana expresada como la zona de inhibición.....	73
<b>Tabla 17.</b>	Especies resistentes a antibióticos y su origen.....	76
<b>Tabla 18.</b>	Concentración de Cr(VI) en mg L <sup>-1</sup> promedio.....	81
<b>Tabla 19.</b>	Concentración de C <sub>TOTAL</sub> en mg L <sup>-1</sup> promedio.....	81
<b>Tabla 20.</b>	Lote 1 de columna de remoción con zeolita sódica.....	85
<b>Tabla 21.</b>	Lote 2 de columna de remoción con zeolita sódica.....	86
<b>Tabla 22.</b>	Porcentaje de remoción.....	86

## Relación de figuras

<b>Figura 1.</b>	Sitios de acción de los antibióticos.....	11
<b>Figura 2.</b>	Formación de una biopelícula multi-especie.....	17
<b>Figura 3.</b>	Metodología que se consideró para la remoción del Cr(VI) de soluciones acuosas por medio de un biofiltro multirresistente a antibióticos.....	30
<b>Figura 4.</b>	Bioreactor.....	41
<b>Figura 5.</b>	Pruebas de compatibilidad en AMS.....	47
<b>Figura 6.</b>	Crecimiento bacteriano de especies y consorcios según su origen en ausencia (A), (C), (E), (G) y presencia (B), (D), (F), (H) de 100 mg L <sup>-1</sup> de Cr(VI) en TBS, a pH 8 y 26°C, en agitación a 120 rpm.....	58
<b>Figura 7.</b>	Concentración de Cr(VI), Cr <sub>TOTAL</sub> y Cr(III) en el medio extracelular, Cr(III) en el medio intracelular (biomasa) y Cr <sub>FINAL</sub> (extra e intracelular) después del contacto con las especies <i>Brevundimonas diminuta</i> (A), <i>Microbacterium phyllosphaerae</i> (B), <i>Brevundimonas nasdae</i> (C), <i>Pseudomonas monteilli</i> (D), <i>Bacillus altitudinis</i> (E) y <i>Pseudomonas graminis</i> (F).....	60
<b>Figura 8.</b>	Concentración de Cr(VI), Cr <sub>TOTAL</sub> y Cr(III) en el medio extracelular, Cr(III) en el medio intracelular (biomasa) y Cr <sub>FINAL</sub> (extra e intracelular) después del contacto con las especies <i>E. cancerogenus</i> (A), <i>P. cedrina</i> (B), como cepa control <i>S. aureus</i> (C), así como los consorcios C1 (D), C2 (E) y C1+C2 (F).....	62
<b>Figura 9.</b>	Variaciones de los valores de pH durante el periodo experimental (192 h) para (A) especies provenientes del río Lerma, (B) cromadora, (C) consorcios, especies aisladas del río Lerma, cromadora y consorcios (D).....	67
<b>Figura 10.</b>	Imágenes (MEB) de ZNAT(A) y ZSODI (B).....	77
<b>Figura 11.</b>	Análisis elemental (EDS) de ZNAT (A) y ZSODI (B).....	78
<b>Figura 12.</b>	Imágenes (MEB) de ZNaTCr2(a) y ZNaCrTB (b).....	78
<b>Figura 13.</b>	Análisis elemental (EDS) ZNaTCr2(a) y ZNaCrTB (b).....	79
<b>Figura 14.</b>	Formación de biopelícula en zeolita sódica. (a) zeolita sódica con biopelícula formado por C1 y C1+C2, (b) zeolita sódica con biopelícula formado por <i>Pseudomonas graminis</i> en AST.....	80
<b>Figura 15.</b>	Reducción de Cr(VI) en presencia y ausencia de zeolita del grupo experimental D-1.....	82
<b>Figura 16.</b>	Diagrama de distribución de especies de cromo a 100 mg L <sup>-1</sup> (1.92 mM).....	82
<b>Figura 17.</b>	Diagrama de distribución de especies de cromo (A) 50 mg L <sup>-1</sup> (0.96 mM) y (B) 5 mg L <sup>-1</sup> (96.00 µM).....	83
<b>Figura 18.</b>	Vista frontal del reactor en columna.....	87
<b>Figura 19.</b>	Vista trasera del reactor en columna.....	87

## Acrónimos

Å	angstrom
ADN	ácido desoxirribonucleico
Al	Aluminio
AMS	Agar para métodos estándar
AST	Agar tripticaseína y soya
Ca	Calcio
As	Arsénico
°C	Grados centígrados
Cd	Cadmio
cm	Centímetros
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
Co	Cobalto
Cr	Cromo
Cu	Cobre
D.O.	Densidad óptica
EPS	sustancias poliméricas extracelulares
Fe	Hierro
h	Horas
Hg	Mercurio
K	Potasio
kg	Kilogramos
L	Litros
LB	Luria Bertani medio
m <sup>2</sup>	Metros cúbicos
mm	milímetros
M	Molar
MEB	Microscopia electrónica de barrido
MET	Microscopia electrónica de transmisión
meq	miliequivalentes
Mg	Magnesio
mg	miligramos
mL	Mililitros
mmol	Milimol
Na	Sodio
Ni	Níquel
nm	nanómetros
NOM	Norma Oficial Mexicana
O	Oxígeno
O <sub>2</sub>	Oxígeno disuelto
Pb	Plomo
rpm	Revoluciones por minuto
Si	Silicio
sp	Especie
TBS	caldo triptona de soya
UFC	Unidad Formadora de Colonias
µL	Microlitro
Zn	Zinc

## RESUMEN

Los antimicrobianos y metales son compuestos de distinto origen y naturaleza química, cuya presencia en el ambiente no se considera algunas veces significativa en términos de distribución y/o concentración sin embargo, la presencia de éstos genera impactos ecológicos y efectos adversos sobre la salud. Especies metálicas como el Cr, están presentes en algunos tipos de desinfectantes, tintes, etc., y es comúnmente detectado en agua residual de distinto origen (Fedaku *et al.*, 2015; Stuart, 2012). En este trabajo se evaluó el comportamiento de un sistema conformado por bacterias multirresistentes a antibióticos soportado en una zeolita natural acondicionada previamente, para remover de un medio acuoso al Cr(VI), como un sistema potencial para biorremediación del agua.

Para ello se utilizaron ocho especies provenientes de dos ambientes diferentes: sedimentos del río Lerma, agua residual de un taller cromado de piezas automotrices las cuales habían sido aisladas en trabajos anteriores. Todas las cepas fueron cultivadas individualmente para después determinar si existía la compatibilidad entre cepas por medio de las pruebas de difusión en agar y detección por sensi-discos para la formación de consorcios. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) a Cr(VI), la resistencia a antibióticos por el método Kirby Bauer, la remoción de Cr(VI) en presencia de zeolita natural en su forma sódica. Además, se determinaron las condiciones para un reactor en columna.

Todas las cepas utilizadas mostraron compatibilidad entre ellas, por lo que se formaron tres consorcios, las CMI variaron entre 150- 300 mg L<sup>-1</sup> para Cr(VI). Los resultados mostraron que las ocho especies utilizadas en esta investigación son: cromo-resistentes (*Bacillus altitudinis*, *Enterobacter cancerogenus*, *Pseudomonas cedrina*, *Pseudomonas monteilli*, *Pseudomonas graminis*, *Brevundimonas diminuta*, *Microbacterium phyllosphaerae* y *Brevundimonas nasdae*), cromo-reductoras (*Pseudomonas graminis*, *Pseudomonas cedrina*, *Pseudomonas monteilli*, *Brevundimonas diminuta*, *Enterobacter cancerogenus*, *Brevundimonas nasdae*, *Microbacterium phyllosphaerae* y *Bacillus altitudinis* a pH 8, 26°C, 120 rpm en Caldo Tripticaseína y Soya y siete de ellas, multirresistentes a antibióticos.

La especie *Pseudomonas graminis* se eligió, en combinación con la zeolita natural acondicionada con sodio, para la remoción de Cr(VI) en un sistema en lote (Batch), en donde se removió el 94.96% del Cr(VI) inicial, durante 192 horas. Se partió de una concentración

inicial de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr(VI) a pH 8,  $26^{\circ}\text{C}$  y 120 rpm. El reactor en columna se operó durante 72 h, en el cual después de las 24 primeras horas de experimentación, se registraron porcentajes de remoción mayores al 20%. La biopelícula formada por *Pseudomonas graminis* soportada en zeolita natural sódica y empacada en una columna, es eficiente para la remoción de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  Cr(VI) en solución acuosa, a pH 8 y  $26^{\circ}\text{C}$ . Este reactor en columna, puede ser utilizado durante 72 h en continuo.

## ABSTRACT

Antimicrobials and metals are compounds of different origin and chemical nature, whose presence in the environment is sometimes not considered significant in terms of distribution and / or concentration; however, the presence of systems generates ecological effects and adverse effects on health. Metallic species such as Cr are present in some types of disinfectants, dyes, etc., and it is exclusively detected in wastewater of different origin (Fedaku *et al.*, 2014; Stuart, 2012). In this work, the behavior of a system made up of bacteria multi-resistant to antibiotics supported on a previously conditioned natural zeolite was evaluated to remove Cr (VI) from an aqueous medium, as a potential system for water bioremediation.

For this, eight species from two different environments were used: sediments from the Lerma river, residual water from a chrome auto parts workshop, which have been isolated in previous works. All the strains were cultivated individually to later determine if the compatibility between strains existed by means of the tests of: diffusion in agar and detection by sensi-discs for the formation of consortia. The minimum inhibitory concentration (MIC) to Cr (VI), the resistance to antibiotics by the Kirby Bauer method, the removal of Cr (VI) in the presence of natural zeolite in its sodium form were determined. Furthermore, the conditions for a column reactor were determined.

All the strains used showed compatibility between them, for which three consortia were formed, the MICs varied between 150-300 mg L<sup>-1</sup> for Cr (VI). The results showed that the eight species used in this research are: chromium-resistant (*Bacillus altitudinis*, *Enterobacter cancerogenus*, *Pseudomonas cedrina*, *Pseudomonas monteilli*, *Pseudomonas graminis*, *Brevundimonas diminuta*, *Microbacterium phyllosphaerae* and *Brevundimonas nasdae*), cromo-reductoras *Pseudomonas cedrina*, *Pseudomonas monteilli*, *Brevundimonas diminuta*, *Enterobacter cancerogenus*, *Brevundimonas nasdae*, *Microbacterium phyllosphaerae* and *Bacillus altitudinis* at pH 8, 26 ° C, 120 rpm in Trypticasein and Soy Broth) and seven of them, multi-resistant to antibiotics.

The *Pseudomonas graminis* species was chosen, in combination with the natural zeolite conditioned with sodium, for the removal of Cr (VI) in a batch system (Bach), where 94.96% of the initial Cr (VI) was removed, during 192 hours. The starting point was an initial concentration of 100 mg L<sup>-1</sup> of Cr (VI) at pH 8, 26 ° C and 120 rpm. The column reactor was operated for 72 h, in which after the first 24 hours of experimentation, removal percentages greater than 20% were recorded. The biofilm formed by *Pseudomonas graminis* supported

on natural sodium zeolite and packed in a column is efficient for the removal of 100 mg L<sup>-1</sup> Cr (VI) in aqueous solution, at pH 8 and 26 ° C. This column reactor can be used continuously for 72 hours.

# INTRODUCCIÓN

## INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas sanitarios relativos a la contaminación ambiental es el vertido de residuos tóxicos en agua, lo que genera aguas residuales con presencia de metales y antibióticos, entre otros contaminantes. Estos desechos provienen de diferentes fuentes, tales como las industrias, los hogares, la agricultura, los hospitales, etc., los cuales utilizan una gran variedad de sustancias entre ellas los detergentes, los desinfectantes, los antibióticos, los radionúclidos y los disolventes (Fedaku *et al.*, 2014); formando parte de la composición del agua residual. En algunos países, no disponen estas sustancias de manera adecuada, por lo cual acceden a la red de alcantarillado municipal (Emmanuel *et al.*, 2009 y Emmanuel, 2005).

Las aguas residuales constituyen un riesgo para el ser humano y el ambiente, debido a la presencia de los contaminantes antes mencionados y a microorganismos patógenos, tales como bacterias, amibas, virus, protozoarios y hongos, los que podrían generar un impacto negativo, en materia de salud pública.

Entre los diferentes contaminantes que se pueden encontrar en este tipo de agua residual, se encuentran genotóxicas que son sustancias con la capacidad de inducir mutaciones y cambios genéticos en los organismos. Algunos análisis de resistencia fenotípica a metales y antibióticos señalan, que especies bacterianas aisladas de ambientes contaminados con ellos, han generado factores de multirresistencia para ambos contaminantes (Martins *et al.*, 2014 y Paz *et al.*, 2008). El incremento en la resistencia a metales y antibióticos tiene serias implicaciones, como la adaptación y selección de los organismos, debido al aumento de la presión selectiva del entorno.

Especies metálicas como el Cr(VI) están presentes en aguas residuales y en presencia de materia orgánica, éste se reduce a Cr(III). Sin embargo, niveles elevados de Cr(VI) pueden sobrepasar la capacidad reductora del ambiente y persistir como contaminantes, por lo que implementar métodos de bajos costos para la biorremediación de este tipo de aguas, se considera de suma importancia (Ilankoon, 2014).

Las bacterias aisladas de entornos contaminados con Cr y con poder reductor, se consideran una alternativa para resolver este problema, sin embargo, la combinación de

estos microorganismos con un material como las zeolitas naturales, contenidos ambos en un reactor, podría ser una alternativa atractiva para solucionar este problema ecológico.

# **CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO**

## 1. MARCO TEÓRICO

Los antibióticos y metales son compuestos de distinto origen y naturaleza química, cuya presencia en el ambiente no se considera algunas veces significativa, en términos de distribución y/o concentración. Sin embargo, la presencia de éstos genera impactos ecológicos y efectos adversos sobre la salud (Stuart et al., 2012; Barceló y López, 2007). A este tipo de productos farmacéuticos se les ha denominado emergentes, los cuales no necesitan estar constantemente presentes para causar efectos negativos, puesto que sus altas tasas de transformación/remoción se puede compensar, por su introducción continúa en el ambiente.

Se ha establecido que estos fármacos entran en el ambiente a través de algunas fuentes y vías tales como: aguas residuales de tipo doméstico e industrial (Fent *et al.*, 2006; Daughton, 2004), de los residuos de las plantas de tratamiento (Kolpin, 2002), de los efluentes hospitalarios (Kümmerer, 2001), de las actividades agrícolas y ganaderas (Watanabe, 2010) y de los tanques sépticos (Swartz et al., 2006); el problema es que, las plantas de tratamiento convencionales de aguas residuales, no están diseñadas para eliminarlos (Pal *et al.*, 2010; Gerzabek *et al.*, 2007).

### 1.1 Antibióticos

Es un término que incluye los compuestos obtenidos de forma natural o biosintética, así como los producidos en laboratorio, que debe cumplir tres condiciones como mínimo: poseer actividad antimicrobiana, desarrollarla a bajas concentraciones y ser tolerado por el huésped.

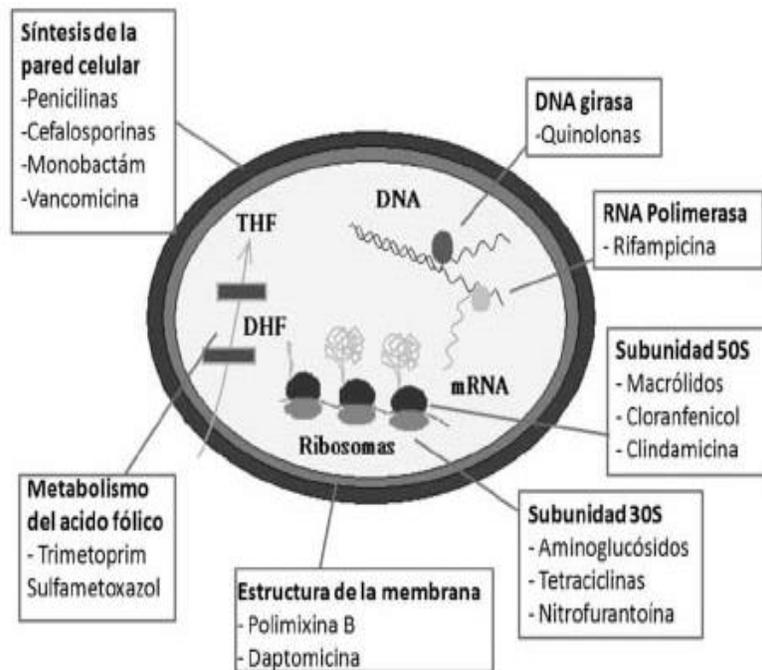
Los antibióticos se comportan de diversas maneras: como bactericidas y como bacteriostáticos. Los bactericidas producen la muerte de los microorganismos responsables del proceso infeccioso. Pertenecen a este grupo los  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, rifampicina, vancomicina, polimixinas, fosfomicina, quinolonas y nitrofurantoínas (Paredes y Roca, 2004). Los bacteriostáticos, inhiben el crecimiento bacteriano, aunque el microorganismo permanece viable, de forma que, cuando se suspende el tratamiento, puede volver a recuperarse y multiplicarse. El hecho de que un agente sea bactericida o

bacteriostático depende de su mecanismo de acción y, por tanto, de su estructura, pero también contribuyen paralelamente, otros factores como la concentración alcanzada en el sitio de la infección (Tafur *et al.*, 2011; Paredes y Roca, 2004).

Actualmente, existen tres categorías de antibióticos:

- a) Los que producen una acción bactericida poco relacionada con la concentración, como es el caso de los  $\beta$ -lactámicos y los aminoglucósidos, con los que se obtiene la máxima acción bactericida cuando se alcanzan concentraciones de 5 a 10 veces superiores, que la concentración mínima inhibitoria (CMI). El aumento en la concentración por encima de ésta, no se acompaña de mayor actividad, ni de mayor duración del efecto postantibiótico.
- b) Los que poseen actividad bactericida concentración-dependiente, como los aminoglucósidos y las fluorquinolonas.
- c) Los que se comportan como bacteriostáticos: macrólidos, tetraciclinas y cloranfenicol, entre otros.

La clasificación de antibióticos que se basa en su sitio de acción (Figura 1), resulta de gran utilidad, sobre todo si hay que utilizar simultáneamente varios de ellos.

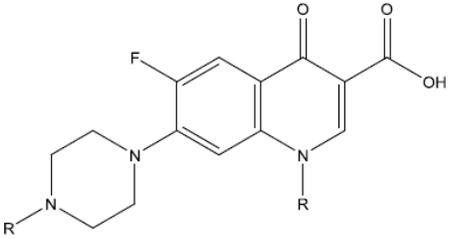
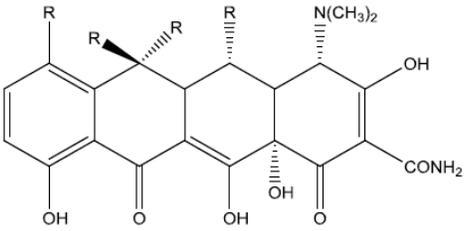
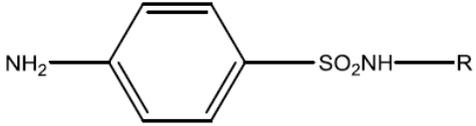
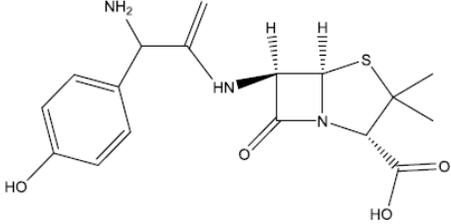
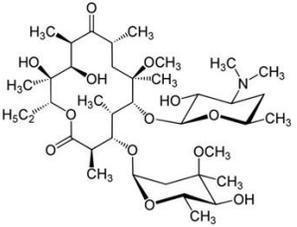
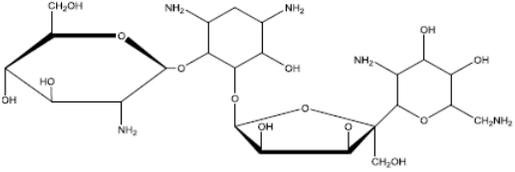


Tomado de Tafur *et al.*, 2011.

**Figura 1. Sitios de acción de los antibióticos.**

Por la estructura química de los antibióticos, es la clasificación más utilizada en la literatura científica; los miembros de un mismo grupo tienen estructuras, actúan por mecanismos y comportamiento similares (Seifrtová *et al.*, 2009). De acuerdo a esta clasificación (Tabla 1), existen más de 10 clases de antibióticos, seis de ellos son los más importantes tanto en medicina humana como en medicina veterinaria (Bouki, Venieri, y Diamadopoulos, 2013; Vosough y Mashhadiabbas, 2013).

**Tabla 1. Clasificación de antibióticos de acuerdo a su estructura química.**

Clase de antibiótico	Estructura	Ejemplos
Quinolonas		<p>Norfloxacin Sarafloxacin Ciprofloxacin</p>
Tetraciclinas		<p>Doxilina Tetraciclina</p>
Sulfonamidas		<p>Sulfametoxazol Sulfadimetoxina</p>
β-lactámicos		<p>Amoxicilina Ampicilina</p>
Macrólidos		<p>Azitromicina Claritromicina Eritromicina</p>
Aminoglicosidos		<p>Gentamicina Neomicina</p>

## 1.2 Metales

Los metales son especies químicas persistentes, por lo que, una vez presentes en el ambiente, pueden distribuirse en el aire, en el agua y en el suelo, a veces cambiando su estado de oxidación o bien incorporándose a los seres vivos.

Aunque existen metales conocidos como oligoelementos, que son necesarios para la célula viva, el exceso de ellos resulta dañino a la misma; es entonces cuando los metales en cantidades mayores a las habituales, son considerados como metales tóxicos. La NOM-001-ECOL-1996, incluye como metales pesados al Cd, Cu, Cr, Hg, Ni, Pb y Zn; entendiéndolos como tales, aquellos elementos químicos que poseen un peso atómico comprendido entre 63.55 g/mol (Cu) y 200.59 g/mol (Hg), y que presentan un peso específico superior a 4 g/cm<sup>3</sup>. Cabe destacar que en esta categoría entran prácticamente todos los elementos metálicos de interés económico, entre ellos el cromo (Rodríguez y Thelma, 2009).

El cromo es un metal de color blanco, duro, brillante y frágil, es muy soluble en ácidos minerales como el ácido sulfúrico. Los estados de oxidación del cromo varían desde -4 hasta +6, pero solo el estado +3 y +6 son estables en condiciones ambientales. En sistemas acuosos, el cromo existe en forma hexavalente y trivalente, de los cuales la especie más tóxica es el Cr(VI), ya que presenta una mayor movilidad en el ambiente por su alta solubilidad en agua (Almazan, 2011).

El cromo es un metal resistente a los agentes corrosivos, explicando su amplio uso como una capa protectora por medio de electro-depósito. Tiene grandes e importantes aplicaciones industriales, como en la producción de pigmentos, en la industria textil, en galvanoplastia y metalurgia, entre otros (Almaguer *et al.*, 2009).

El cromo hexavalente, es el causante de muchas afecciones en los seres vivos, principalmente en humanos y animales. Se ha reportado que el Cr(VI) tiene efectos cancerígenos. Estudios realizados en trabajadores de la industria que utilizan cromo, muestran niveles elevados del metal en la sangre, orina y en algunos tejidos del cuerpo, produciendo daños críticos como la esterilidad (Bhatti *et al.*, 2009, Chandra *et al.*, 2007).

El Cr(VI) también resulta tóxico para los microorganismos. En diversas especies bacterianas se ha demostrado, que este tipo de cromo en forma de cromato, entra en las células a través de un transportador de sulfato. El cromato es un inhibidor competitivo del transporte de sulfato, en algunas especies bacterianas, según lo mencionado por Cervantes *et al.*, (2001).

A nivel extracelular, el Cr(VI) es altamente tóxico para la mayoría de las bacterias, ya que es transportado al citoplasma, mientras que el Cr(III) es relativamente inofensivo, debido a que es insoluble y no puede atravesar la membrana celular. En el interior de la célula, la toxicidad del Cr se relaciona principalmente con el proceso de reducción del Cr(VI) a Cr(III), de este proceso pueden resultar la formación de radicales libres, los cuales generan estrés oxidativo y, en consecuencia, diversos efectos tóxicos sobre el ADN, los lípidos y las proteínas. Se considera que el daño oxidativo al ADN, es responsable de los efectos genotóxicos causados por el cromato (Ramírez-Díaz *et al.*, 2008).

### 1.3 Zeolita

Las zeolitas, son aluminosilicatos hidratados altamente cristalinos que, al deshidratarse, desarrollan una estructura porosa con diámetros entre 3 y 10 Å. Este material puede obtenerse de fuentes naturales o prepararse sintéticamente. Son ampliamente usadas en los procesos de intercambio iónico. Además, poseen grandes áreas superficiales internas y externas de varios cientos de m<sup>2</sup>/g (Vázquez *et al.*, 2007), así como capacidades de intercambio catiónico del orden de 1 a 3 meq/g. Su estructura consiste en un armazón tridimensional formado por tetraedros de SiO<sub>4</sub><sup>4-</sup> y AlO<sub>4</sub><sup>5-</sup>. El aluminio es lo suficientemente pequeño para ocupar el centro del tetraedro formado por cuatro átomos de oxígeno, y la sustitución isomórfica del Si<sup>4+</sup> por el Al<sup>3+</sup>, le otorga una carga negativa a la estructura. Esta carga es neutralizada por cationes de compensación intercambiables, siendo los más comunes el Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> y Mg<sup>2+</sup>. Estos cationes pueden intercambiarse a su vez con cationes en solución, tales como Pb<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>, entre otros. El hecho de que los cationes intercambiables de las zeolitas sean relativamente inocuos, las hace particularmente convenientes para ser utilizadas en los procesos de remoción de metales pesados, indeseables en efluentes de desecho.

Algunos autores, consideran a la zeolita como un eficiente y económico recurso, para el tratamiento de efluentes contaminados con metales pesados. Sin embargo, algunas investigaciones señalan que este material presenta una baja afinidad hacia las especies químicas aniónicas; esta limitante se ha reportado para su forma natural y sintética.

La biosorción de metales contaminantes ha sido investigada y parece ser una alternativa viable, para el tratamiento de estos contaminantes en el ambiente. La inmovilización de biomasa en un soporte, ofrece ventajas en cuanto al mecanismo de resistencia y aumenta la capacidad de retención del contaminante. Con respecto a esto, la zeolita es un material que puede servir como soporte de biomasas bacteriana y además, conservar sus propiedades para la remoción de especies químicas metálicas de naturaleza catiónica.

La zeolita natural es eficiente en la remoción de metales pesados (Pb, Cu, Ni, As, Cd, Hg, Zn) de efluentes metalúrgicos (Curi *et al.*, 2006). Sin embargo, el uso de zeolita en combinación con otros sistemas para tratamiento de aguas residuales, parece ser más prometedor. Al utilizar zeolita natural como un soporte para la generación de un biopelícula formada por un consorcio bacteriano resistente al metal cobre en un sistema en continuo, dio como resultado un desarrollo poblacional rápido y una mayor biosorción del metal, a diferencia de cuando se utilizaron estos mismos consorcios sin un material de soporte; aunado a esto, la densidad poblacional se mantuvo constante en el trascurso del estudio, debido a que el material zeolítico ayudó a conservar por más tiempo a la biomasa viable y evitó que se perdiera en el proceso (Monge *et al.*, 2008).

La zeolita como soporte de biomasa bacteriana, ha sido también utilizado para la sorción de Cr(VI). Las bacterias Gram (+) presentan estructuras en la pared celular, que mejoran la interacción entre el metal y el sorbente. Este tipo de bacterias soportadas en zeolita, resultaron ser una combinación prometedora para la sorción de este metal en agua, de acuerdo con lo reportado por Erdoğan y Ülkü, (2012).

#### **1.4 Biopelículas bacterianas**

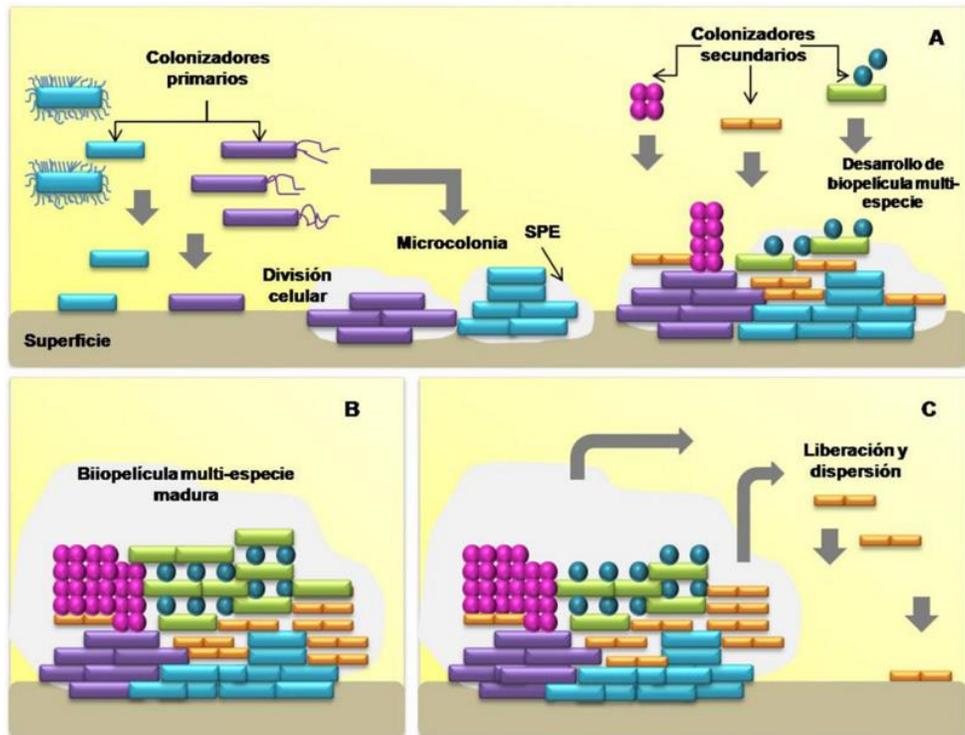
Las bacterias forman comunidades que se adhieren a diferentes superficies, mecanismo estratégico que les permite una mayor tasa de supervivencia frente a condiciones adversas,

al cual se le denomina biopelícula o biofilm. Estas comunidades consisten en células microbianas y una amplia gama de sustancias poliméricas extracelulares autogeneradas (EPS), incluyendo polisacáridos, ácidos nucleicos, proteínas y iones metálicos; su formación es un proceso dinámico y coordinado por las interacciones de diferentes especies microbianas, el cual desempeña un papel importante en los sistemas ecológicos (Pamp *et al.*, 2009).

La transición de la célula única planctónica bacteriana a biopelícula, depende de la producción de adhesinas y componentes de la matriz extracelular, que interconectan y envuelven a las bacterias en dicha estructura (Pamp *et al.*, 2009). Si las condiciones en la biopelícula se vuelven desfavorables, las bacterias pueden regular la producción de componentes de la matriz específicos y así poder disgregar la estructura formada (Gjermansen *et al.*, 2010; Gjermansen *et al.*, 2005).

De manera natural, el crecimiento dominante de los microorganismos es a través de consorcios de múltiples especies, regulados por gran variedad de interacciones intra e interespecíficas importantes en su desarrollo, composición, estructura y función (Bowen y Koo, 2011; Høiby *et al.*, 2011). Al mantener microambientes selectivos, la población no depende de la multiplicación rápida, sino aumenta la oportunidad de interacciones mono y multiespecíficas; se incrementa la probabilidad de la transferencia horizontal de genes, como genes de virulencia, resistencia a antibióticos y resistencia a drogas (Bordi y Bentzmann, 2011).

Las especies que conforman una biopelícula multiespecie, viven en un tipo particular de simbiosis, que ha sido denominado *sociomicrobiología*. Funcionan como una comunidad activa, coordinada con múltiples influencias sinérgicas o antagónicas entre sus integrantes, con reglas propias de “comportamiento” que permiten el éxito del consorcio (Bordi y Bentzmann, 2011; Høiby *et al.*, 2011). En estas comunidades se favorece el crecimiento, reproducción, estabilidad estructural, difusión de sustancias y reserva de energía (Bowen y Koo, 2011). Adicionalmente, la biopelícula permite la resistencia a diferentes tipos de estrés ambiental, como falta de alimento, presencia de metales pesados, luz UV, desecación, agentes bactericidas y bacteriostáticos, diferencias de temperatura y de pH, resistencia a fagocitosis, anticuerpos y otras defensas de los hospederos (Almeida *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2010).



Tomado de Muro *et al.*, 2012

**Figura 2. Formación de una biopelícula multi-especie. (A)** Los colonizadores primarios cubren una superficie (viva o inerte), a manera de una biopelícula, multiplicándose y formando microcolonias, lo anterior permite la llegada de los colonizadores secundarios y su adhesión a las biopelículas; **(B)** maduración y formación de la biopelícula multi-especie, caracterizado por el incremento en la producción de sustancias poliméricas extracelulares (EPS, por sus siglas en inglés); **(C)** promoción de la dispersión de células y cambio de células planctónica a células en biopelícula.

#### 1.4.1 Condiciones de adherencia

La adherencia de las bacterias a un medio de soporte, es el primer paso en el ciclo de formación de la biopelícula; las fuerzas de interacción entre las sustancias poliméricas extracelulares de las bacterias y la superficie, aunado con el efecto de la gravedad hidrodinámica, dan origen a la formación de un monocultivo. Además de estas interacciones fisicoquímicas, intervienen la motilidad flagelar, la translocación por medio del pili y la respuesta a un gradiente de concentración de nutrientes o toxinas (quimiotaxis). Para que se lleve a cabo un buen posicionamiento de la biopelícula, una vez adheridas, estas

bacterias proliferan dentro del monocultivo, permitiendo la adhesión de otros microorganismos a la biopelícula activa (Andrade-Molinar, 2007). Al inicio del proceso se adhieren los colonizadores primarios y tempranos a la superficie, éstos se multiplican formando micro colonias que, finalmente, conforme las condiciones micro ambientales, cubren totalmente la superficie colonizada, facilitando la llegada de los colonizadores tardíos o secundarios, induciendo el desarrollo de los consorcios multiespecie (Bowen y Koo, 2011) tal como se muestra en la Figura 2.

#### 1.4.2 Unión irreversible y multiplicación bacteriana

El siguiente paso para el desarrollo de la biopelícula es la unión irreversible a la superficie y la multiplicación de las bacterias, seguida por el incremento de la producción de sustancias poliméricas extracelulares, que refuerzan la adhesión celular y actúan como un “cemento intercelular” (Rickard *et al.*, 2003).

#### 1.4.3 Promoción de la dispersión

El estadio siguiente para la formación de la biopelícula, involucra la liberación de células bacterianas que pueden propagarse hacia otros espacios, permitiendo la formación de nuevas biopelículas. La liberación puede deberse a sustancias secretadas por las bacterias (liasas de alginato, DNAsas, etc.), por la actividad de bacteriófagos dentro de la biopelícula, o bien, por mecanismos físicos (Muro *et al.*, 2012).

### **1.5 Bacterias reductoras de Cr y resistentes a antibióticos**

Las bacterias aisladas de ecosistemas contaminados con metales como el Cr, pueden ser utilizadas para la remoción de éste y otros contaminantes, debido a las formas de adaptación que presentan (altas tasas de reproducción y mutación), lo cual resulta en organismos especializados que pueden ser aprovechados (Islas y Bojórquez, 2011). Los microorganismos resistentes a metales pesados, son un foco de atención para el diseño de tecnologías aplicables en el campo de la biorremediación, de ambientes contaminados. Por

lo que, los determinantes genéticos de resistencia a metales pesados, presentan una gran importancia desde el punto de vista de la biotecnología ambiental o biorremediación. Existen, tres áreas fundamentales de aplicación: 1) la incorporación de los determinantes de resistencia desde un organismo a otro; 2) en la restauración de los ambientes contaminados con metales; y 3) en la bioextracción de los metales directamente de los minerales o desde los efluentes de los procesos industriales (Marreto-Coto *et al.*, 2010).

La resistencia de los microorganismos a metales pesados, es el resultado de la intervención de múltiples sistemas con especificidad de sustratos diferentes, pero que comparten las mismas funciones. Algunos de estos sistemas están ampliamente distribuidos y contribuyen en la defensa elemental de la célula, frente a metales potencialmente dañinos; y otros, están especializados y se encuentran solo en algunas especies bacterianas (Marreto-Coto *et al.*, 2010).

Los determinantes genéticos que codifican las proteínas involucradas en los mecanismos de resistencia a metales, se encuentran generalmente localizados en el cromosoma bacteriano, en los elementos móviles como plásmidos. Hasta ahora se han descrito genes de resistencia a metales, entre ellos la plata, el cobre, el mercurio, el níquel, el plomo, zinc, cromo y cadmio; o de metaloides como el arsénico y el antimonio. Estos hallazgos son de vital importancia, ya que los plásmidos generalmente confieren resistencia a elevadas concentraciones de metales, y pueden moverse fácilmente de una célula a otra, por transmisión horizontal de material genético, de modo que contribuyen, considerablemente, en la adaptación a corto plazo de las comunidades microbianas en ambientes contaminados (Smets *et al.*, 2003).

La resistencia de los microorganismos no solo se presenta para los metales, ya que la presencia de antibióticos en aguas residuales, han sido determinantes para la adaptación de las bacterias en este medio, desarrollando al igual que con los metales, resistencia a los antimicrobianos. Por lo tanto, la exposición de comunidades bacterianas a metales, puede generar un proceso de selección en el cual no solo se presentan las bacterias metal-resistentes si no también, indirectamente, se seleccionan las bacterias resistentes a otros tóxicos, como es el caso de los antimicrobianos. En algunas investigaciones en donde se observó la presencia de metales y elevadas concentraciones de antibióticos, estuvieron presentes en abundancia, integrones de clase 1. Los integrones de clase 1 son capaces de

adquirir, intercambiar y acumular genes de resistencia en casetes genéticos, los que se encuentran frecuentemente en plásmidos del grupo Inc-P-1ε, según lo reportado por Jechalke *et al.* (2015). La exposición de bacterias a antibióticos, puede regular la expresión de casetes genéticos, que conducen a la resistencia de estos microorganismos a los metales pesados.

Se han encontrado especies bacterianas con resistencia a antibióticos y componentes tóxicos, en los cuales se incluyen los metales pesados como Co, Zn, Cu entre otros. En un estudio realizado por Bäumlisberger *et al.*, (2015), la especie *Campylobacter jejuni* estuvo expuesta a diferentes antimicrobianos, entre los cuales se encontraba la eritromicina. Esta especie presentó resistencia a metales pesados como el Co, Zn, Cd, As y a dicho antimicrobiano y otros antibióticos, por lo cual diferentes autores reportan que la resistencia a metales y antibióticos está vinculada o podrían estar estrechamente relacionados.

## **1.6 Procesos de remediación**

Existen una amplia gama de tratamientos para remover contaminantes del agua, específicamente para metales y antibióticos. Sin embargo, las propuestas más atractivas resultan de la combinación de tratamientos, a los cuales se les denomina procesos combinados, este es el caso de la biodegradación.

Las prácticas de biodegradación consisten principalmente, en el uso de diferentes organismos (plantas, levaduras, hongos, bacterias, etc.) del medio, para neutralizar sustancias tóxicas o bien transformarlas en sustancias de carácter menos dañino o inocuo para el ambiente y la salud humana. Una de las más empleada es la utilización de microorganismos para la absorción de las sustancias orgánicas, las cuales las utilizan como la fuente de carbono necesaria para su crecimiento y en algunos casos, para proveerse de energía, para sus funciones metabólicas (Rodríguez, 2003).

En su mayoría, las investigaciones hasta ahora realizadas, se han enfocado en el tratamiento de antimicrobianos o de metales, pero de forma independiente. Tran *et al.*, (2014), reportan la presencia de compuestos farmacéuticos activos en aguas residuales hospitalarias, lo cual demuestra que los efluentes hospitalarios deben ser considerados

como fuentes importantes de contaminación ambiental, contrastantemente las aguas residuales proveniente de centros de salud como hospitales, son poco investigadas según lo menciona Bäumlisberger *et al.*, en 2015.

La presencia de metales y antibióticos en los efluentes hospitalarios, tiene diferentes orígenes, por ejemplo, algunos son utilizados como parte del tratamiento en los pacientes, los cuales son parcialmente metabolizados y los residuos son desechados, formando parte del agua residual (Fekadu *et al.*, 2015).

En algunos países en desarrollo, los hospitales generalmente descargan sus aguas residuales en fosas sépticas, con una formación kárstica, las cuales experimentan un singular proceso de alteración química, debido a la presencia de diferentes ácidos que crean fisuras por donde se filtra el agua, lo que puede ocasionar la contaminación de los recursos hídricos subterráneos, según lo mencionado por Emmanuel *et al.*, en 2009.

### **1.7 Zeolita, biopelícula y remoción de Cr**

La eliminación del cromo del agua, es considerada como uno de los objetivos más importantes en los últimos 30 años. El Cr(VI) está presente en forma de dicromato o cromato y es carcinogénico, mientras que el Cr(III) se considera esencial para el metabolismo de algunos organismos. La combinación de la capacidad de sorción de metales pesados por bacterias soportadas o fijas en material zeolítico, fue propuesto por Figureido *et al.*, (2006). Diferentes autores han realizado propuestas para la remoción de este contaminante, algunos de ellos sugieren la utilización de zeolita como un soporte para la formación de biopelícula y así por medio de adsorción o reducción del metal, generar alternativas para este gran problema (Tabla 2).

En un estudio realizado en lotes, sobre la recuperación de Cr(III) y Cr(VI) a partir de soluciones acuosas, por una biopelícula de *Arthrobacter viscosus* soportado en zeolita (Silva *et al.*, 2008), se concluyó que en forma de Cr(III) se elimina fácilmente de la solución, debido a su carga positiva que permite su remoción por la zeolita mediante un intercambio iónico. Esto se debió a que, de su especie química aniónica, el Cr(VI) se redujo a Cr(III) por la acción de la biopelícula soportada en el material zeolítico. Este mismo género

*Arthrobacter* fue soportado en zeolita y utilizado en un tratamiento para la reducción de Cr(VI), presentando resultados exitosos, ya que esta bacteria formó un biofilm o biopelícula sobre la superficie de la zeolita (Figueiredo y Quintelas, 2014).

**Tabla 2. Remoción de Cr(VI) utilizando biopelículas soportadas en zeolitas.**

Tipo de zeolita	Características de la biopelícula	Pretratamiento de la zeolita	Condiciones experimentales	Referencias
Sintética Na Y (Si/Al 2.83, área BET 700 m <sup>2</sup> g <sup>-1</sup> )	<i>Arthrobacter viscosus</i> En fase exponencial, 5 g L <sup>-1</sup> concentración utilizada para inocular 1 g de zeolita. Medio: 10 g L <sup>-1</sup> glucosa, 5 g L <sup>-1</sup> peptona, 3 g L <sup>-1</sup> extracto de malta y 3 g L <sup>-1</sup> extracto de levadura.	Calcinación a 500°C por 8 h bajo una corriente de aire seco.	Adsorción por lote A 150 rpm, 28°C en un volumen de 150 mL, pH 4 100 mg L <sup>-1</sup> Cr(VI) utilizando K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Rosales <i>et al.</i> , 2011
Clinoptilolita	<i>Escherichia coli</i> (PTCC1330) Medio: extracto de carne, peptona y NaCl. 2 g de zeolita por 15 mL de <i>E. coli</i>	--	Adsorción por lote En matraces de 250 mL: 2 g de zeolita, 15 mL de <i>E. coli</i> y 100 mL de K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> (50-100 mg L <sup>-1</sup> ) 120 rpm, 37°C durante 10 días a pH 6	Ebrahimi <i>et al.</i> , 2014
Sintética: NaY y NaX	<i>Arthrobacter viscosus</i> Medio: 10 g L <sup>-1</sup> glucosa, 5 g L <sup>-1</sup> peptona, 3 g L <sup>-1</sup> extracto de malta y 3 g L <sup>-1</sup> extracto de levadura.	Calcinación a 500°C por 8 h bajo una corriente de aire seco.	Adsorción por lote ("batch") 150 rpm, 28°C a un volumen de 150 mL 100 mg L <sup>-1</sup> Cr(VI) utilizando K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Tavares y Neves, 2008
Sintética: 13X (5-8 mm)*	<i>Arthrobacter viscosus</i> (CECT 908) Medio: 10 g L <sup>-1</sup> glucosa, 5 g L <sup>-1</sup> peptona, 3 g L <sup>-1</sup> extracto de malta y 3 g L <sup>-1</sup> extracto de levadura.	0.1 M H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> Medio basal	Biorreactor (columnas) reducción de Cr(VI) 100 mg L <sup>-1</sup> (pH 3-5) Plexiglass 30 cm de alto, 4 cm diámetro interno.	Pazos <i>et al.</i> , 2010
Clinoptilolita (2-5 mm)*	<i>Arthrobacter viscosus</i> Medio: 10 g L <sup>-1</sup> glucosa, 5 g L <sup>-1</sup> peptona, 3 g L <sup>-1</sup> extracto de malta y 3 g L <sup>-1</sup> extracto de levadura.	--	Biorreactor (columnas) reducción de Cr(VI) 70 mg L <sup>-1</sup> (pH 6.5) 30 cm de alto y 0.9 cm diámetro interno.	Lameiras <i>et al.</i> , 2008
Sintética: NaY	<i>Escherichia coli</i> Medio: extracto de carne, peptona y NaCl	Calcinación a 500°C por 8 h bajo una corriente de aire seco.	Biosorción en lote 1g de zeolita con 15 mL de <i>E. coli</i> y 150 mL de Cr(VI) de 10-100 mg L <sup>-1</sup> a 2.7-3.5 pH, 37°C	Quintelas <i>et al.</i> , 2009
Sintética: NaY / NaX y Clinoptilolita (2-5 mm)*	<i>Arthrobacter viscosus</i> Medio: 10 g L <sup>-1</sup> glucosa, 5 g L <sup>-1</sup> peptona, 3 g L <sup>-1</sup> extracto de malta y 3 g L <sup>-1</sup> extracto de levadura.	Calcinación a 500°C por 8 h bajo una corriente de aire seco.	Biorreactor (columnas) reducción de Cr(VI) 50-150 mg L <sup>-1</sup> , pH 4.5-5.5, 26°C 30 cm de alto y 0.9 cm diámetro interno.	Tavares <i>et al.</i> , 2006
Sintética: NaY	<i>Arthrobacter viscosus</i> Medio: 10 g L <sup>-1</sup> glucosa, 5 g L <sup>-1</sup> peptona, 3 g L <sup>-1</sup> extracto de malta y 3 g L <sup>-1</sup> extracto de levadura.	Calcinamiento a 500°C por 8 h bajo una corriente de aire seco.	Adsorción por lote en 150 mL, 1g de zeolita, 5 g L <sup>-1</sup> de biomasa, a pH 4, 28°C y 150 rpm. Cr(VI) 100 mg L <sup>-1</sup>	Rosales <i>et al.</i> , 2012

-- datos no reportados, \* se refiere al tamaño de grano del material zeolítico

La zeolita natural modificada con Fe(II), disminuye la concentración de Cr(VI), a un nivel de carga de 55 mmol kg<sup>-1</sup> y 0.3 % de contenido de Fe, partiendo de pruebas por lotes y de columna (Lv *et al.*, 2014). También, la adsorción de Cr(VI) puede ocurrir en materiales derivados de cenizas volcánicas y toba, los cuales contiene cantidades significativas de zeolita con recubrimiento de Fe(III), como lo indica Du *et al.*, (2012).

Erdogan y Ülkü en 2012, proponen un proceso combinado el cual consiste en la formación de una biopelícula sobre zeolita para remover Cr(VI), los resultados mostraron que la biopelícula incrementó la sorción del material zeolítico. Lo anterior es de suma importancia, porque a diferencia de otros métodos, en éste se aprovecha la capacidad de los microorganismos para la remoción de los contaminantes y además, se prueba que la combinación de procesos es prometedora.

### **1.8 Zeolita, biopelícula, remoción de metales pesados y antimicrobianos**

Además de la reducción de Cr, algunas especies bacterianas aisladas de ambientes contaminados con metales, pueden ser utilizadas para la remoción de estos mismos contaminantes y antimicrobianos, de manera simultánea. Investigaciones recientes han mostrado, que los genes que confieren resistencia a metales y antibióticos, se encuentran ligados en el mismo plásmido. En un estudio realizado por Contreras *et al.*, (2011), encontraron que la especie *Staphylococcus aureus* es resistente a la eritromicina y otros antimicrobianos al mismo tiempo que a Cr, Cd, Pb, Hg y As, por lo que concluyeron que la elevada resistencia a metales pesados que presentaron las cepas de esta especie, pueden ser aprovechadas y utilizarse para la detoxificación de ecosistemas contaminados.

Este tipo de sistemas también han sido utilizados para la remoción de algunos antimicrobianos, según lo reportado por Zhang *et al.*, (2015), quienes utilizaron un biofiltro inoculado con las especies aerobias *Pseudomonas sp.* y *Leptothrix sp.*, soportado en zeolita natural. Este biofiltro tardó 1.5 meses en ser madurado y poder sorber a los antimicrobianos utilizados, entre los cuales se encontraba el sulfametoxazol, Sin embargo, concluyeron que este tipo de biofiltro tiene un largo periodo de adaptación, lo cual es un inconveniente, aunque el material es poco costoso. Estos investigadores propusieron agregar manganeso al biofiltro, para acortar dicho tiempo de maduración o adaptación.

## 1.9 Biofiltros para la remoción de Cr

Algunos autores, centran su atención en proponer biofiltros o columnas, los cuales son sistemas combinados que como se había mencionado, son prometedores para la remoción de diferentes contaminantes. A continuación se mencionan, algunos de los biofiltros propuestos para la remoción de Cr(VI) (Tabla 3).

**Tabla 3. Columnas utilizadas para la remoción de Cr(VI).**

Columna			Biopelícula			pH	Referencia
Material	Dimensiones		Substrato	Especies formadoras de la biopelícula	Tamaño de grano (mm)		
	Altura (cm)	Diámetro interno (cm)					
plexiglass	30	4	Zeolita 13X	<i>Arthrobacter viscosus</i> (CECT 908)	5-8	3-5	Pazos <i>et al.</i> , 2010
--	30	0.9	Zeolita clinoptilolita	<i>Arthrobacter viscosus</i>	2-5	6.5	Lameiras <i>et al.</i> , 2008
--	30	0.9	Zeolita clinoptilolita	<i>Arthrobacter viscosus</i>	2-5	4.5-5.5	Tavares <i>et al.</i> , 2006

-- datos no reportados

## **CAPÍTULO II: JUSTIFICACIÓN E HIPÓTESIS**

## **2.1 JUSTIFICACIÓN CONTEXTUAL Y CIENTÍFICA**

La presencia de metales pesados y antibióticos en agua residuales impacta en diferentes formas de vida. En los últimos años, se ha cuantificado una mayor cantidad de especies bacterianas resistentes a estos dos contaminantes. El incremento de la resistencia a metales pesados como Cr(VI), conlleva a serias implicaciones, debido a que contribuye a la evolución de genes resistentes a los antibióticos, los cuales son seleccionados por el ambiente, generando simultáneamente la resistencia a ambos compuestos, lo que podría causar un posible desequilibrio ambiental. Sin embargo, las bacterias resistentes resultado de este proceso, pueden ser de utilidad para sistemas de biorremediación, ya que éstas están adaptadas a condiciones que generalmente serían desfavorables para la mayoría de los microorganismos. Por lo cual, la remoción de Cr(VI) de aguas residuales, podría llevarse a cabo utilizando en conjunto zeolita natural como soporte de una biopelícula bacteriana formada por microorganismos aislados de ambientes con presencia de metales y/o antibióticos, como el caso del agua residual de una industria de galvanoplastia, agua residual hospitalaria y sedimentos del río Lerma.

## **2.2 HIPÓTESIS**

Los consorcios bacterianos formados por especies puras y aisladas de ambientes con altas concentraciones de metales y/o antibióticos se fijan a la zeolita natural formando un sistema eficaz para remover de aguas residuales, tanto metales como el Cr(VI) y antibióticos, comparado con la eficiencia de la remoción de éstos, por los consorcios o las zeolitas, de manera individual.

## **2.3 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar tanto el comportamiento de un sistema conformado por bacterias y zeolita acondicionada para la remoción del Cr(VI) de un medio acuoso, así como la multirresistencia a los antibióticos, para su uso potencial en la biorremediación del agua.

## **2.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Los objetivos específicos, derivados del objetivo general de este trabajo de investigación fueron:

- i. Conformar consorcios microbianos a partir de cepas aisladas de ambientes contaminados con metales pesados.
- ii. Comparar la reducción de Cr(VI) en un medio acuoso entre especies y consorcios.
- iii. Evaluar la multirresistencia de cepas cromo-resistentes y cromo-reductoras frente a antibióticos.
- iv. Elegir la cepa o consorcio que presente la mejor reducción de Cr(VI), multirresistente a antibióticos y probarla en conjunto con zeolita sódica.
- v. Establecer las condiciones para la operación de un biorreactor en columna empacada con zeolita sódica como soporte de una biopelícula, multirresistente a antibióticos y cromo-reductora.

# **CAPÍTULO III:**

# **DESARROLLO EXPERIMENTAL**

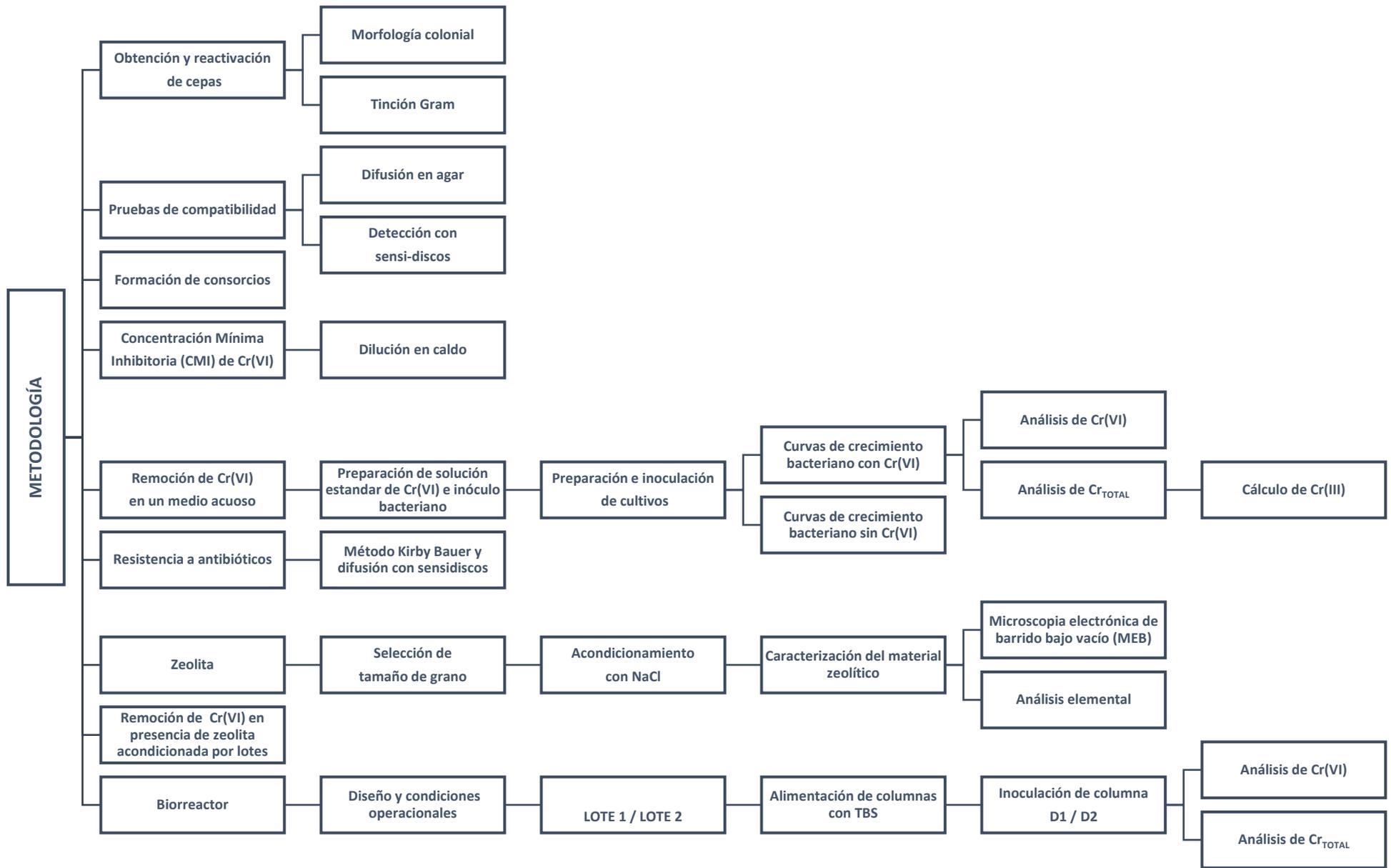


Figura 3. Metodología que se consideró para la remoción del Cr(VI) de soluciones acuosas por medio de un biofiltro multiresistente a antibióticos.

### 3.1 Obtención y reactivación de cepas

Las cepas bacterianas utilizadas, se aislaron en otros trabajos previos (Avedaño, 2012; Islas *et al.*, 2013; Ceron, 2015; Islas *et al.*, 2011) y tuvieron dos orígenes: a) sedimentos del río Lerma (*Pseudomonas graminis*, *Pseudomonas cancerigenus* y *Enterobacter cancerogenus*) y b) agua residual de un taller de cromado de piezas automotrices (*Brevundimonas diminuta*, *Microbacterium phyllosphaerae*, *Brevundimonas nasdae*, *Pseudomonas monteilli* y *Bacillus altitudinis*), todas las especies fueron reportadas como reductoras de Cr(VI).

Las cepas bacterianas utilizadas, se conservaban bajo refrigeración en el Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA), a -20°C en caldo triptona de soya (TBS) y glicerol, como agente crioprotector. La reactivación de estas cepas, se realizó transfiriendo asépticamente de 2-3 asadas de los cultivos congelados a caldo TBS y fueron incubadas a 35°C durante 48 h, para posteriormente ser cultivadas en agar para métodos estándar (AMS), utilizando la técnica de agotamiento por estría en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Se verificó la pureza y viabilidad de los cultivos bacterianos mediante la siembra por estría cruzada e incubación en aerobiosis, utilizando como medio nutritivo agar tripticaseína y soya (AST) a 35°C, durante 24 h.

Se observaron las características de las colonias bacterianas en AMS, tales como forma, borde, elevación, superficie, color, transparencia y brillo (Mudili, 2007). Se utilizó un microscopio óptico marca Leica CME® a 40X y contraste de fases 100X, registrándose la forma celular y tinción Gram (Burguet y Sierra, 2012; Radianingtyas *et al.*, 2003).

### 3.2 Pruebas de compatibilidad

Las cepas bacterianas se cultivaron de manera individual, en AMS durante 24 h a 35°C. Posteriormente se seleccionaron de 2 a 3 colonias, para llevar a cabo la inoculación en tubos, los cuales contenían caldo tripticaseína y soya (TBS) y así preparar un inóculo bacteriano correspondiente al 0.5 de la escala de McFarland ( $1.5 \times 10^8$  UFC/mL).

### 3.2.1 Difusión en agar

Se inocularon las placas con AMS empleando los cultivos contenidos en los tubos antes mencionados (inciso 6.2), por medio de hisopado en tres direcciones, para asegurar una completa y homogénea distribución del inóculo. Posteriormente, en cada una de las placas se realizaron 4 orificios de 6 mm de diámetro por 1 cm de alto, vertiendo 40 µL de las bacterias antagónicas. Finalmente, las placas se incubaron a 35°C por 24 h (Pérez *et al.*, 2014).

### 3.2.2 Detección con sensi-disco

Se efectuó la misma técnica de sembrado utilizada para difusión en agar, pero en esta prueba se colocaron discos de papel filtro marca Whatman™ grado 40. Los filtros se humedecieron previamente con cada una de las cepas utilizadas como antagonistas y se incubaron bajo las mismas condiciones antes mencionadas (*sección 3.2.1*).

Para ambas pruebas, después de haber transcurrido el tiempo de incubación, se midieron los halos de inhibición. La presencia de éstos probaría la actividad antimicrobiana y su ausencia, indicaría de compatibilidad entre especies para formar los consorcios (Avedaño, 2012).

El efecto antagónico se evaluó, midiendo el diámetro de cada uno de los halos alrededor de los discos, tomando como antagonismo positivo a las cepas que, enfrentándose entre sí, inhiben el crecimiento de las otras y presentan un halo de inhibición mayor de 5 mm. Se consideró, un antagonismo negativo, para las cepas que presenten entre sí, un halo de inhibición < 5 mm (Rueda *et al.*, 2002).

## 3.3 Formación de consorcios

El desarrollo de consorcios bacterianos solo es posible si las cepas logran crecer en forma conjunta, por lo cual previamente se evaluó la compatibilidad de especies. La concentración necesaria de cada una de las cepas que integraron los consorcios, se determinó de acuerdo con los estándares de la escala de Mc Farland, eligiendo el tubo 0.5 ( $1.5 \times 10^8$  células por

mL), como la concentración ideal. Con ello, se alcanzó la turbidez requerida para la conformación de tales consorcios, debido a que la absorbancia a 625 nm (0.08-0.1) obtenida, representa la fase exponencial de los microorganismos en la cual su metabolismo y crecimiento son óptimos (patrón de turbidez BBL, BD© 2005). La estabilización de los siete cultivos se llevó a cabo durante un periodo de dos meses, bajo condiciones de agitación continua (120 rpm), en baño María a  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Para la preparación de los cultivos se procedió de la siguiente manera:

- a) Cada una de las cepas o sp (especie) se cultivaron en AST, después de 2 días de incubación, se escogieron de 2 a 3 colonias bien diferenciadas, las cuales se cultivaron en CTS, durante 20 días a  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ . Cada 4 días se realizó la renovación del medio, extrayendo el 30% del medio antiguo y adicionando la misma cantidad de medio fresco. Al final de dicho procedimiento, se obtuvieron los consorcios primarios.
- b) A partir de los cultivos de los consorcios primarios, que fueron estandarizados con el tubo 0.5 de Mc Farland, se tomaron 3 mL de cada uno y se formó el consorcio secundario, de tal forma que al combinarlos cada uno de ellos, se adicionara la misma cantidad y en la misma concentración. Posteriormente, se cultivaron en las mismas condiciones que las de los consorcios primarios.
- c) Para utilizar todos los consorcios, se tomaron de cada uno de ellos una alícuota que se cultivó en caldo TBS, durante 48 h a  $30\pm 2^{\circ}\text{C}$  y 120 rpm. Posteriormente, se ajustó el cultivo con el tubo 2, de la escala de Mc Farland, con ayuda de un espectrofotómetro HACH DR 2800.
- d) Para corroborar la presencia de todas las especies, cuando éstas se encontraban formando los consorcios, se realizaron cultivos en AMS y se observaron las características morfológicas individuales de las colonias, tinción Gram y forma celular (Radianingtyas *et al.*, 2003), con ayuda de un microscopio óptico, al igual que lo mencionado en la sección 3.1.

### **3.4 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para Cr(VI)**

La CMI se determinó, utilizando el método de dilución en caldo (Madigan *et al.*, 2004), el cual consiste en una serie de soluciones con caldo TBS y diferentes concentraciones del metal Cr(VI), para lo cual se utilizó una solución madre de  $1000\text{ mg L}^{-1}$ , que se preparó a

partir de  $K_2Cr_2O_7$  como fuente de Cr(VI). Esta solución se filtró utilizando discos Whatman™, de 40 µm. Utilizando la solución madre, se prepararon tubos con 600 y 500 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI), con los cuales se elaboraron dos series: la primera con 600, 300, 150, 75 mg L<sup>-1</sup> y la segunda con 500, 250, 125, 62.5 mg L<sup>-1</sup>, los cuales se incubaron con cada una de las ocho especies, los tres consorcios y el control. Las bacterias se cultivaron en tubos de vidrio de 10 mL y la densidad óptica (OD) inicial se ajustó a 0.1 (tubo 0.5 de Mc Farland) y a un pH de 8 e incubados a 120 rpm a 26°C durante 24 horas, periodo en cual se observó la ausencia o presencia de crecimiento bacteriano en el medio. Además se prepararon tubos testigos con caldo TBS y Cr(VI), los cuales no se inocularon con la bacteria, además de una serie de tubo control y testigo (Tabla 4). Cada prueba se realizó por triplicado.

**Tabla 4. Concentración mínima inhibitoria a Cr(VI) de diferentes grupos microbianos.**

Grupos	Medio Nutritivo	Cr(VI) (mg L <sup>-1</sup> )	Especies y consorcios
A-1	TBS	600	<i>Brevundimonas diminuta</i>
A-2		500	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>
A-3		300	<i>Brevundimonas nasdae</i>
A-4		250	<i>Pseudomonas monteilli</i>
A-5		150	<i>Bacillus altitudinis</i>
A-6		125	<i>Pseudomonas cedrina</i> <i>Enterobacter cancerogenus</i>
A-7		75	<i>Pseudomonas graminis</i> C1 ( <i>Pseudomonas graminis</i> , <i>Enterobacter cancerogenus</i> y <i>Pseudomonas cedrina</i> )
A-8		62.5	C2 ( <i>Brevundimonas diminuta</i> , <i>Microbacterium phyllosphaerae</i> , <i>Brevundimonas nasdae</i> , <i>Pseudomonas monteilli</i> y <i>Bacillus altitudinis</i> ) C1+C2
A-9 (TESTIGO)		600, 500, 300, 250, 150, 125, 75 y 62.5	*
A-10 (CONTROL)		*	*

C1, C2 y C3 se refiere a consorcios microbianos y \* denota la ausencia de microorganismos

La CMI se determinó, como la concentración más baja de Cr(VI) capaz de inhibir completamente el desarrollo bacteriano en el medio, lo cual se comprobó midiendo la absorbancia del tubo y comparándola tanto con la concentración inicial, como la de los grupos testigos.

### **3.5 Remoción de Cr(VI) en un medio acuoso**

#### **3.5.1 Preparación de la solución estándar**

Se preparó una solución madre a una concentración de  $1000 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr, empleando 2.826 g de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ . La solución se esterilizó por filtración, utilizando discos Whatman™ de  $40 \mu\text{m}$  y el pH se ajustó a 8, utilizando una solución de NaOH.

#### **3.5.2 Preparación del inóculo bacteriano**

El inóculo bacteriano empleado en las pruebas de biorreducción, se preparó a partir de un cultivo de 48 h de incubación en CTS a pH 8, 120 rpm de agitación y con una densidad óptica de 0.1.

#### **3.5.3 Preparación e inoculación de cultivos con Cr(VI)**

Todos los cultivos se prepararon utilizando: inóculo que se ajustó al tubo 2 de Mc Farland (Larcher y Yargeau, 2011), 20% de la solución de Cr(VI) de  $500 \text{ mg L}^{-1}$  y TBS al 60%. Todas las cantidades se calcularon con respecto al volumen final de 100 mL. En el caso de los controles que contuvieron solo Cr (VI) y TBS, el 20% correspondiente al cultivo bacteriano se reemplazó por 20% de la solución estándar y 80% de TBS.

Los cultivos (matraces Erlenmeyer de 250 mL con un volumen líquido final de 100 mL) se prepararon utilizando caldo TBS BD © (digerido de polvo de soya  $3.0 \text{ g L}^{-1}$ , digerido pancreático de caseína  $17 \text{ g L}^{-1}$ , cloruro de sodio  $5 \text{ g L}^{-1}$ , fosfato dibásico  $2.5 \text{ g L}^{-1}$  y dextrosa  $2.5 \text{ g L}^{-1}$ , como fuente de carbono),  $\text{O}_2$  3-5  $\text{mg L}^{-1}$ , pH 8 (se ajustaron con NaOH), a una concentración de  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , todos los cultivos, incluidos los controles (por triplicado), se incubaron durante 192 h en agitación a 120 rpm y temperatura e  $26^\circ\text{C}$ .

### 3.5.4 Curvas de crecimiento bacteriano

El crecimiento bacteriano fue monitoreado en presencia y ausencia de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr(VI), para cada uno de los grupos experimentales (Tabla 5), además se contó con un testigo y un control. De manera aséptica, se tomaron alícuotas cada 24 h durante 8 d y se determinó la densidad óptica ( $D.O_{600}$ ), bajo las mismas condiciones antes mencionadas. Todas las mediciones se realizaron por triplicado (Dhal *et al.*, 2010). Es importante mencionar, que se emplearon como blancos medio TBS sin y con Cr(VI).

### 3.5.5 Análisis de Cr(VI) extra e intracelular

A partir de las alícuotas obtenidas para las curvas de crecimiento estas mismas fueron utilizadas para la medición de Cr(VI) para lo cual se procedió de la siguiente manera: Se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 minutos con la finalidad de separar la biomasa del medio. La concentración de Cr(VI) en el medio extracelular (caldo nutritivo) e intracelular (biomasa) se determinó utilizando el método colorimétrico 1,5 difenilcarbazida (APHA, 1998) y se utilizó un espectrofotómetro UV-Visible a 543 nm. La solución de difenilcarbazida fue preparada según lo sugerido por la NMX-AA-044-SCFI-2001, la concentración del metal fue medida en la biomasa y medio previamente separados y con ayuda de una curva de calibración.

Al obtener la biomasa bacteriana, previamente se separó del medio y se centrifugó a 6000 rpm durante 5 min, para así remover los excedentes del agar, que aun pudieran encontrarse. Posteriormente, se trató por medio de choque térmico (congelación-descongelación) para lo cual los tubos en los cuales se encontraba contenida la biomasa, se congelaron durante 12 h y posteriormente se descongelaron en un baño María a  $70^{\circ}\text{C}$  durante 3 min, para después volver a congelarlos con ayuda de alcohol-hielo. Dicho proceso se repitió 5 veces para cada una de las muestras, con la finalidad de provocar la lisis celular y liberar el Cr acumulado en las células. Al finalizar este proceso, la biomasa se resuspendió en 5 mL de agua destilada acidificada con  $\text{HNO}_3$  y se procedió al análisis de Cr(VI).

**Tabla 5. Grupos experimentales de las curvas de crecimiento y reducción bacteriana.**

Grupos	Medio	Especies y consorcios
B-1	TBS + Cr(VI) 100 mg L <sup>-1</sup>	<i>Brevundimonas diminuta</i>
B-2		<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>
B-3		<i>Brevundimonas nasdae</i>
B-4		<i>Pseudomonas monteilli</i>
B-5		<i>Bacillus altitudinis</i>
B-6		<i>Pseudomonas cedrina</i>
B-7		<i>Enterobacter cancerogenus</i>
B-8		<i>Pseudomonas graminis</i>
B-9		C1 ( <i>Pseudomonas graminis</i> , <i>Enterobacter cancerogenus</i> y <i>Pseudomonas cedrina</i> )
B-10		C2 ( <i>Brevundimonas diminuta</i> , <i>Microbacterium phyllosphaerae</i> , <i>Brevundimonas nasdae</i> , <i>Pseudomonas monteilli</i> y <i>Bacillus altitudinis</i> )
B-11		C1+C2
B-12	TBS	<i>Brevundimonas diminuta</i>
B-13		<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>
B-14		<i>Brevundimonas nasdae</i>
B-15		<i>Pseudomonas monteilli</i>
B-16		<i>Bacillus altitudinis</i>
B-17		<i>Pseudomonas cedrina</i>
B-18		<i>Enterobacter cancerogenus</i>
B-19		<i>Pseudomonas graminis</i>
B-20		C1 ( <i>Pseudomonas graminis</i> , <i>Enterobacter cancerogenus</i> y <i>Pseudomonas cedrina</i> )
B-21		C2 ( <i>Brevundimonas diminuta</i> , <i>Microbacterium phyllosphaerae</i> , <i>Brevundimonas nasdae</i> , <i>Pseudomonas monteilli</i> y <i>Bacillus altitudinis</i> )
B-22		C1+C2
B-23 (TESTIGO)	TBS + Cr(VI) mg L <sup>-1</sup>	*
B-24 (CONTROL)	TBS	*

C1, C2 y C3 se refiere a consorcios microbianos y \* denota la ausencia de microorganismos

### 3.5.6 Análisis de Cr Total extra e intracelular

Se realizó una dilución de 1:10, acidificando posteriormente la dilución para cuantificar el contenido de cromo total, mediante espectrofotometría de absorción atómica, empleando un equipo Varian® SpectrAA,

### 3.5.7 Análisis de Cr(III) extra e intracelular

La concentración de Cr(III) fue el resultado de restar el Cr<sub>total</sub> – Cr(VI), de acuerdo con lo reportado por Ozturk *et al.* (2012).

Todas las pruebas fueron realizadas por triplicado y los resultados que se muestran son el promedio de las lecturas.

El porcentaje de cromo removido de la solución acuosa por el biofiltro se calculó mediante la fórmula (Ozturk *et al.*, 2012):

$$[\text{Cr removido}] / [\text{Cr inicial}] \times 100$$

## 3.6 Resistencia bacteriana a antibióticos

La prueba de sensibilidad antimicrobiana in vitro, se realizó por el método Kirby Bauer y el método de difusión con sensidiscos (MULTIBAC ID y BIORAD), utilizando Mueller-Hinton (Difco) como medio nutritivo. Para ello, se emplearon los siguientes antibióticos: (AM) Ampicilina 10 µg, (AK) Amikacina 30 µg, (CB) Carbenicilina 100 µg, (GE) Gentamicina 10 µg, (CF) Cefalotina 30 µg, (CFX) Cefotaxima 30 µg, (NET) Netilmicina 30 µg, (CPF) Ciprofloxacina 5 µg, (NOF) Norfloxacina 10 µg, (CL) Cloranfenicol 30 µg, (SXT) Sulfametoxazol Trimetoprim 25 µg, (NF) Nitrofurantoína 300 µg, (CRO) Ceftriaxone 30 µg, (PEF) Pefloxacin 5 µg, (E) Eritromicina 15 µg, (VA) Vancomicina 30 µg, (TE) Tetraciclina 30 µg, (DC) Dicloxacilina 1 µg, (CLM) Clindamicina 30 µg y (PE) Penicilina 10 U.

Se utilizaron cultivos en TBS, que se incubaron a 35°C durante 5 h y se ajustaron a la turbidez del inóculo con el nivel 0.5 de la escala de McFarland. A continuación, los cultivos se sembraron en placas de agar Mueller-Hinton (Difco), utilizando un hisopo de algodón estéril. Después de 30 min, las placas se invirtieron e incubaron a 37°C entre 16 y 18 h. Se

llevó a cabo la lectura midiendo con un vernier, el diámetro del halo de inhibición en mm y los aislados se consideraron sensibles (S), sensibles a intermedios (I) y resistentes (R), de acuerdo a los estándares del NCCLS (2006). Se utilizaron los microorganismos *Staphylococcus aureus* ATCC™ 29213 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC™ 27853 como cepas de referencia, según lo recomendado por CLSI (2012), como organismos de control, para verificar el efecto antibacteriano de los discos en placas de agar Mueller-Hinton.

### **3.7 Acondicionamiento y caracterización zeolítico**

#### 3.7.1 Acondicionamiento

La zeolita natural empleada en este trabajo, provino de los yacimientos de Taxco, Guerrero (México).

La zeolita natural se molió y se tamizó, seleccionando dos tamaños de partícula (30 y 60 mallas), que correspondieron a 2 y 5 mm, según lo sugerido por Lameiras *et al.* (2008) y Tavares *et al.* (2006).

El material zeolítico se secó a 300°C, durante 48 h en una estufa, con el fin de eliminar cualquier contaminante orgánico. Dicho material se colocó en un desecador, hasta su utilización (Ötker y Akmehmet-Balcioğlu, 2005).

Para la preparación de la zeolita sódica, se pesaron 25 g de zeolita natural, los cuales se pusieron en contacto con una solución 1 M de NaCl (250 mL), durante 1 h a temperatura ambiente y agitación constante. Al finalizar, la solución se decantó y nuevamente se agregaron 250 mL de la solución de NaCl y se repitió el mismo proceso cuatro veces más. Posteriormente, el material zeolítico se lavó con abundante agua destilada en varias ocasiones y al finalizar se tomó el agua del último lavado, agregando 5 gotas de AgNO<sub>3</sub> al 25%, para verificar la ausencia de cloruros. Cuando aún había cloruros en el agua de lavado, se observaron hilos lechosos en la solución, derivados de la precipitación del AgCl.

### 3.7.2 Caracterización

La caracterización se efectuó para valorar la morfología y composición del material zeolítico. A continuación, se mencionan las técnicas empleadas.

#### *3.7.2.1 Microscopia electrónica de barrido (MEB) y Análisis elemental (EDS)*

Se llevó a cabo el análisis de la morfología de los materiales mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB), empleando un Microscopio marca JEOL JSM ®, modelo 5900LV a 20 Kv, entre 500 y 2000 X.

El análisis químico elemental semicuantitativo por espectroscopia de energía dispersa de rayos-X (EDS) se llevó a cabo con una sonda marca OXFORD ® INCAx-act acoplada al microscopio, las muestras se colocaron en cinta de carbón y se realizó el análisis a 500X por triplicado.

### **3.8 Remoción de Cr(VI) en presencia de zeolita sódica (por lotes)**

Se siguió el mismo procedimiento que en el apartado 6.5.3, por lo que se colocaron 20 mL de inóculo de *Pseudomonas graminis*, 20 mL de una solución de Cr(VI) a 500 mg L<sup>-1</sup>, 60 mL de caldo TBS a 26°C, 3-5 mg L<sup>-1</sup> O<sub>2</sub>, para un volumen final de 100 mL, a los cuales se les agregó 1±0.8 gramo de zeolita sódica previamente esterilizada. Se ajustó el pH inicial a 8, y la mezcla se incubó durante 192 h. Además, se consideró un blanco sin inocular, un control sin inóculo y el medio de cultivo. Todas las muestras se hicieron por triplicado, bajo las mismas condiciones experimentales (Tabla 6).

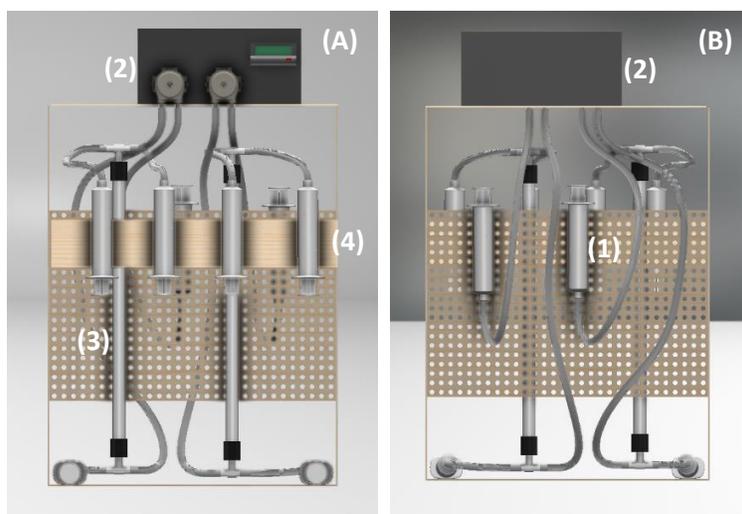
La medición de Cr (VI), Cr<sub>TOTAL</sub> y Cr(III) en el medio, se realizaron siguiendo los mismos procedimientos antes mencionados en las secciones 3.5.5, 3.5.6 y 3.5.7.

**Tabla 6. Grupos experimentales para la remoción de Cr(VI) en lote.**

Muestra	Medio
D-1	TBS + 100 mg L <sup>-1</sup> Cr(VI) + zeolita sódica (1 g) + <i>Pseudomonas graminis</i>
D-2 (TESTIGO)	TBS + 100 mg L <sup>-1</sup> Cr(VI) + zeolita sódica (1 g)
D-3 (CONTROL)	TBS + 100 mg L <sup>-1</sup> Cr(VI)

### 3.9 Biorreactor

El biorreactor consistió en dos columnas de vidrio de 30 cm de largo y 1 cm de diámetro interno (Tavares *et al.*, 2006; Lameiras *et al.*, 2008; Fernández *et al.*, 2013).



Modelo elaborado en SOLID WORKS 2020

**Figura 4. Biorreactor, (1) contenedor de agua sintética, (2) bomba dosificadora, (3) columna de vidrio y (4) contenedor de muestras. Vista de frontal (A) y trasera (B).**

Dos tercios de cada columna (20 cm), contenían zeolita natural (cliptopilolita) en su forma sódica, con tamaño de grano entre 2 y 5 mm, previamente esterilizada (Lameiras *et al.*, 2008). Ambas columnas se sellaron con tapones de polietileno de alta densidad tipo hongo. Dichos tapones se perforaron, para introducir un conector de dos salidas, una de las cuales se utilizó para la recolección del cultivo bacteriano (manguera 1) y la segunda para el medio

con Cr(VI) (manguera 2). El biorreactor se muestra en la Figura 4, las características y condiciones de operación se encuentran en la Tabla 7.

**Tabla 7. Características y condiciones de operación del biorreactor.**

<b>Componente</b>	<b>Características</b>	
Columna	Altura	30 cm
	Diámetro interno	1 cm
Soporte de zeolita	Altura	20 cm
	Volumen medio	6 mL
	Masa zeolita	11.9 g
	Tamaño de grano	2-5 mm
Biorreactor	<b>Condiciones iniciales de operación</b>	
	pH	8
	T°	26°C
	Inóculo inicial	D.O. <sub>600</sub> 0.568
	O <sub>2</sub>	3-5 mg L <sup>-1</sup>
	Donador de e <sup>-</sup>	dextrosa 2.5 g L <sup>-1</sup>
	Medio nutritivo	TBS
	TRH	24 h
	Flujo	1 mL cada 4 h
	g de zeolita/mL del medio	2.16

El medio de cultivo previamente estéril y aireado, se adicionó a través de la jeringa de alimentación (contenedor de agua sintética), el cual era succionada por la bomba dosificadora Jebao Dp-2, hasta la columna (de vidrio) de remoción, en donde se llevó a cabo el contacto con la zeolita (flujo ascendente) y pasado el tiempo de retención, se depositó mediante la jeringa recolectora (contenedor de muestras). A continuación, se menciona a detalle el proceso.

- a) Primer contacto: se alimentó a la columna con medio TBS estéril, durante 24 h para que la zeolita se impregnara del medio, lo que ayudó a la formación de la biopelícula.

- b) Formación de la biopelícula: pasado este tiempo, se alimentó la columna con el cultivo de *Pseudomonas graminis*, con una concentración que correspondió a  $1.5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, durante 24 h.
- c) A continuación, se pasó medio TBS estéril, durante 24 h con el propósito de eliminar aquellas bacterias no adheridas en la biopelícula.
- d) Remoción del metal: se alimentó la columna con la mezcla: TBS y el metal, con una concentración de 100 mg L<sup>-1</sup> Cr(VI).
- e) Recolección de muestras: se recolectaron las muestras cada 24 h a través de la manguera número 2.

Al obtener las muestras, se procedió conforme al apartado 6.5.5 y 6.5.6 para determinar la concentración de Cr(VI) y Cr<sub>TOTAL</sub> en el medio.

El proceso se llevó a cabo por duplicado en dos lotes diferentes ya que solo se contaba con una bomba dosificadora (Tabla 8).

**Tabla 8. Remoción de Cr(VI) en un biorreactor de columna.**

Lote	Muestra	Masa de zeolita natural en su forma sódica		Medio
1	F-1	11.9 g	<i>Pseudomonas graminis</i> (biofilm)	TBS + 100 mg L <sup>-1</sup> Cr(VI)
	F-2 (Testigo)		*	
2	F-3		<i>Pseudomonas graminis</i> (biofilm)	
	F-4 (Control)		*	

\* denota la ausencia de la biopelícula

# **CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### 4.1 Obtención y reactivación de las cepas

Se reactivaron ocho cepas (Tabla 9) con las cuales se procedió a trabajar después de haber sido cultivadas y descartar presencia de contaminación u otras alteraciones.

**Tabla 9. Especies, origen y consorcios.**

Especie	Origen	Consortios	
		primarios	secundarios
<i>Pseudomonas graminis</i> <i>Enterobacter cancerogenus</i> <i>Pseudomonas cedrina</i>	río Lerma	C1	C1+C2
<i>Pseudomonas monteilli</i> <i>Bacillus altitudinis</i> <i>Brevundimonas diminuta</i> <i>Brevundimonas nasdae</i> <i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	cromadora	C2	

##### 4.1.1 Morfología de las colonias reactivadas y tinción de Gram

La morfología colonial descrita en la Tabla 10, corresponde a cultivos de 24 h (incubación) en AST, solo dos de las ocho especies utilizadas son Gram positivas, las seis restantes son Gram negativas.

**Tabla 10. Características morfológicas coloniales.**

Tinción Gram	Especie	Características morfológicas					
		forma	borde	elevación	transparencia	brillo	color
(-)	<i>Pseudomonas graminis</i>	irregular	entero	elevada	opaca	no	amarillo
(-)	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	irregular	rizado	convexa	--	no	blanco
(-)	<i>Pseudomonas cedrina</i>	irregular	entero	convexa	opaca	no	blanco
(-)	<i>Pseudomonas monteilli</i>	circular	entero	lisa	opaca	no	beige
(+)	<i>Bacillus altitudinis</i>	irregular	entero	convexa	opaca	no	blanco
(-)	<i>Brevundimonas diminuta</i>	circular	entero	convexa	opaca	no	gris
(-)	<i>Brevundimonas nasdae</i>	circular	--	convexa	brillante	si	amarillo
(+)	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	circular	entero	convexa	transparente	no	amarillo

--se refiere a datos no registrados

Las características morfológicas de los microorganismos *Pseudomonas graminis*, *Brevundimonas diminuta*, *Microbacterium phyllosphaerae*, *Enterobacter cancerogenus*,

*Pseudomonas cedrina*, *Pseudomonas monteilli*, *Brevundimonas nasdae* y *Bacillus altitudinis*, concuerdan con las reportadas previamente por otros autores (Qi *et al.*, 2020; Sánchez *et al.*, 2019; Crovadore *et al.*, 2016; Jha *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2011; Burguet y Sierra, 2012; Shivaji *et al.*, 2006; Behrendt *et al.*, 2001). Con ello, se corroboró la presencia de las diferentes bacterias en cada prueba realizada, además de ayudar a la detección de contaminación, cuando la hubo.

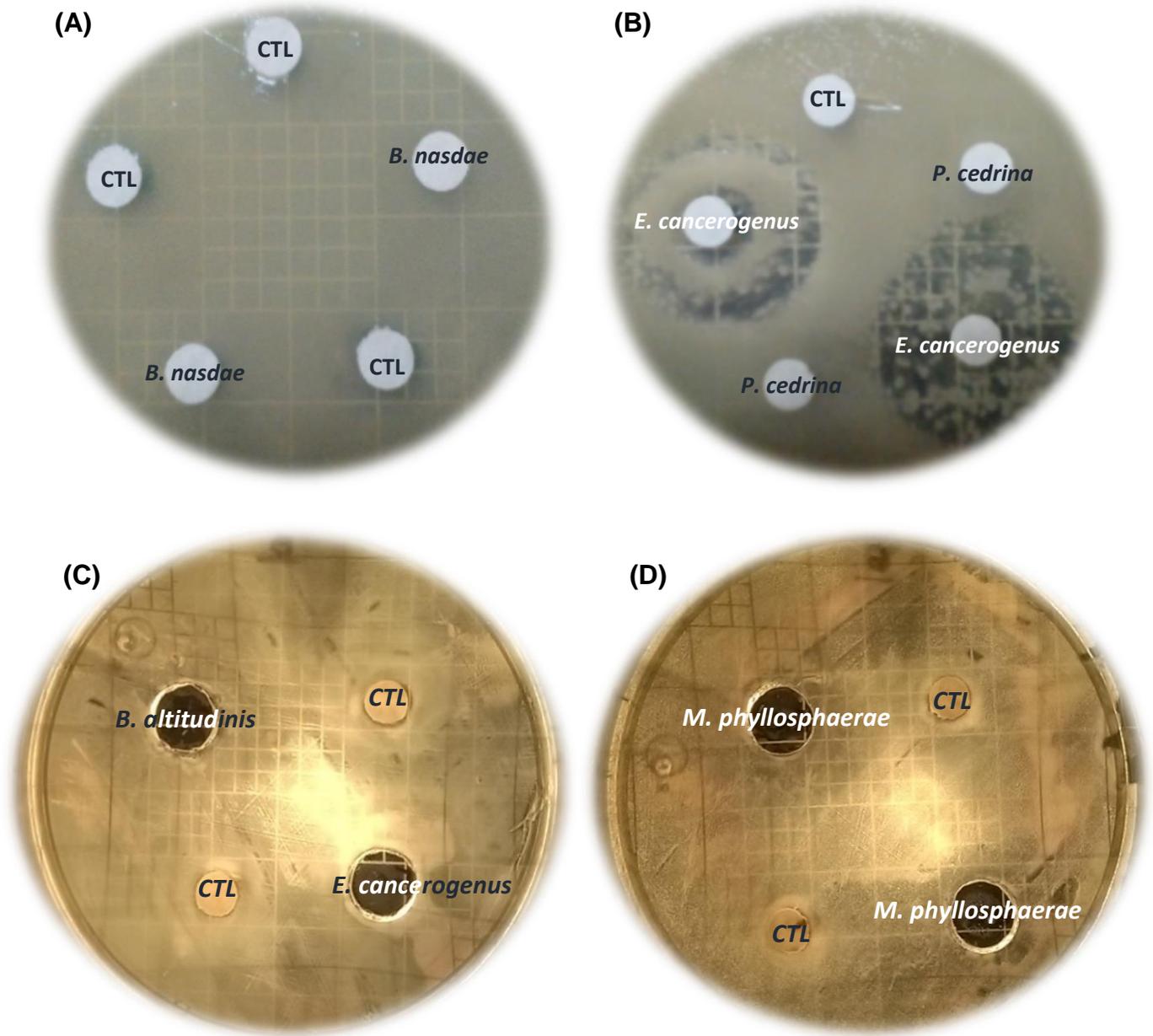
#### 4.2 Pruebas de compatibilidad

Las pruebas de compatibilidad mostraron, que las ocho cepas utilizadas en este trabajo fueron compatibles entre sí, ya que ninguna de las especies bacterianas provenientes del río Lerma o la cromadora (Tabla 9), inhibió el crecimiento de la otra. Ninguna de las especies reactivadas al ser cultivadas de manera conjunta, mostró un halo de inhibición mayor a 5 mm, por lo que se consideraron compatibles bajo este criterio (Figura 5). Se utilizó *S. aureus* como cepa control, debido al antagonismo que presentaba con algunas de las especies utilizadas como *Pseudomonas monteilli*, *Pseudomonas graminis*, *Pseudomonas cedrina* y *Bacillus altitudinis* frente a las cuales, se observaron halos mayores a 5 mm, tal como lo muestra la Tabla 11.

**Tabla 11. Halos de inhibición en presencia de *S. aureus*.**

<b>Especie</b>	<b>mm</b>
<i>Pseudomonas monteilli</i>	12
<i>Pseudomonas graminis</i>	10
<i>Pseudomonas cedrina</i>	7
<i>Bacillus altitudinis</i>	9

El antagonismo que presenta el género *Pseudomonas* frente a *S. aureus*, ha sido ampliamente investigado en el campo de la medicina. Sin embargo, las interacciones entre estos microorganismos son complejas. *Pseudomonas aeruginosa*, produce un sin número de moléculas que interfieren con el crecimiento, metabolismo y la homeostasis celular de *S. aureus* (Radlinski *et al.*, 2017) generando un proceso de antagonismo cuando ambos géneros se encuentran desarrollándose en el mismo ambiente. El uso de esta cepa control, fue un indicador de compatibilidad entre especies.



**Figura 5. Pruebas de compatibilidad en AMS.** Crecimiento de (A) *Brevundimonas nasdae* sobre la superficie de ambas cajas en agar TBS, dos discos impregnados con la misma especie y tres discos control libres de bacterias, (B) dos discos impregnados con *Enterobacter cancerogenus* y *Pseudomonas cedrina*, un disco CTL (control) y *Pseudomonas graminis* sobre el agar, (C) *Bacillus altitudinis* y *Enterobacter cancerogenus* vertidos en los pozos y *Brevundimonas diminuta* sobre el agar (D) *Microbacterium phyllosphaerae* vertido en los pozos, dos discos control libres de bacterias y *Brevundimonas nasdae* sobre el agar.

### 4.3 Formación de consorcios

El criterio utilizado para la formación de consorcios fue su origen, el cual se muestra en la Tabla 9. Tres especies formaron el consorcio C1 y las cinco restantes a C2, la combinación de todas las especies se denotó como C1+C2.

Las tres especies que formaron al consorcio C1 fueron Gram negativas a diferencia de C2, el cual estaba conformado por tres especies Gram negativas y dos positivas (Tabla 10). Todos los miembros de ambos consorcios fueron bacilos. Las características morfológicas particulares de cada colonia, ayudaron a identificarlos para corroborar su presencia en los cultivos puros y cuando se encontraban formando los consorcios.

### 4.4 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para Cr(VI)

Se determinaron las CMI por el método de difusión en caldo, para todos los grupos experimentales A1-A10 (Tabla 4), en los cuales las concentraciones variaron entre los 150-300 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI), esta última concentración para cuatro de las ocho especies (*Pseudomonas montelli*, *Bacillus altitudinis*, *Pseudomonas cedrina* y *Enterobacter cancerogenus*) utilizadas en este trabajo, así como para el consorcio C2; 250 mg L<sup>-1</sup> para *Pseudomonas graminis* y los consorcios C1 y C1+C2; 200 mg L<sup>-1</sup> para *Brevundimonas diminuta* y *Microbacterium phyllosphaerae*; 150 mg L<sup>-1</sup> para *Brevundimonas nasdae*; y 125 mg L<sup>-1</sup> para la especie control *S. aureus* (Tabla 12).

Las especies *Pseudomonas monteilli* y *Pseudomonas graminis* presentaron la misma CMI, habiendo sido aisladas de medios diferentes, esta última y *Pseudomonas cedrina* comparten el mismo origen, sin embargo, la CMI fue diferente para cada una de ellas.

El consorcio C2 mostró la misma CMI que dos de las especies, las cuales lo conformaron (*Pseudomonas monteilli* y *Bacillus altitudinis*), lo anterior podría sugerir que, aunque las especies se encuentren en conjunto la tolerancia al metal no es mayor.

Los datos del presente trabajo, evidencian la tolerancia de algunas especies frente a diferentes concentraciones del Cr(VI) en solución acuosa, redundando en la CMI característica de cada microorganismo. Uno de los géneros más investigados es *Bacillus*, en este trabajo la especie *Bacillus altitudinis* exhibió una menor CMI con respecto a *B. cereus* SJ1 (1561 mg L<sup>-1</sup>), reportada por He *et al.*, (2010). Estos investigadores, mencionan haber encontrado genes *chrA*, los cuales codifican para transportadores putativos, que confieren resistencia al cromato, a diferencia de las especies analizadas en este trabajo, a las cuales no se determinó la presencia de dichos genes. Sin embargo, la especie *Bacillus cereus* SJ1 mostró una CMI 5 veces mayor, en comparación con la de la especie *Bacillus altitudinis*, las cuales fueron aisladas de ambientes similares, tal como lo muestra la Tabla 12. Se encontró, que algunas otras especies pertenecientes al mismo generó, también superaron a esta cepa con respecto a las CMI reportadas, tales como: *Bacillus sp.* JDM-2-1 (Zahoor y Rehman, 2009), *Bacillus sp.* (Cheng y Li, 2009), *Bacillus sp.* (Dhal *et al.*, 2010), *Bacillus sp.* (Massod y Malik, 2011), *Bacillus subtilis* (Upadhyay *et al.*, 2017), *Bacillus subtilis*, (Mangaiyarkaras *et al.*, 2011) y *Bacillus sp.* (Kathiravan *et al.*, 2010). En contraste, la especie *Bacillus altitudinis* superó las CMI de las cuatro especies reportadas por Verma *et al.*, (2009), quien menciona que este género es de los más comunes en sitios contaminados con cromo.

Otro género ampliamente estudiado es *Pseudomonas*, en este trabajo las especies *Pseudomonas cedrina*, *Pseudomonas monteilli* y *Pseudomonas graminis* mostraron CMI menores, a las reportadas por Mistry *et al.*, (2009) y Poormina *et al.*, (2010); a diferencia de las mencionadas por Farag y Zaki (2010) y Gutiérrez *et al.*, (2010), a las cuales superaron en cuanto a la CMI (Tabla 12).

La especie *Microbacterium phyllosphaerae*, perteneciente al género *Microbacterium* utilizada en este trabajo, presentó una CMI cercana a la del mismo género reportado por Gutiérrez *et al.*, (2010), siendo de 200 y 208 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI), respectivamente (Tabla 12). Ambas cepas pertenecen al mismo género pero aisladas de ambientes distintos: agua residual de una cromadora (*Microbacterium phyllosphaerae*) y muestras de suelo, encontrando en ambos casos, la presencia de Cr(VI) en el medio.

La resistencia de los microorganismos a los metales, no se considera un parámetro absoluto, ya que depende del medio que sea utilizado para la prueba. En este sentido,

diferentes cepas cromo-resistentes se han aislado y las condiciones a las que se someten para realizar las pruebas de CMI varían (Nayari y Shetty, 2013). Algunos autores mencionan que el uso de medios nutritivos que contengan extracto de levadura, peptona etc., no son apropiados para determinar la resistencia a Cr(VI), debido a que pueden enmascarar la toxicidad del metal, dando como resultado una sobreestimación de la prueba (Patra *et al.*, 2010; Megharaj *et al.*, 2003). Debido a ello, este parámetro se utilizó en este trabajo, como un indicio a la capacidad de resistencia de los microorganismos a la concentración inicial de Cr(VI), a la cual serían posteriormente expuestas.

**Tabla 12. Lista de bacterias cromo-resistentes, origen y concentración mínima inhibitoria.**

Espece	Origen	CMI Cr(VI) mg L <sup>-1</sup>	Medio nutritivo	Concentración inicial de Cr(VI) mg L <sup>-1</sup>	% de Cr(VI) reducido	Tiempo h	pH inicial	Temperatura °C	Referencia
<i>Bacillus sp.</i> JDM-2-1	Efluente industrial	4500	Luria Bertani (LB)	100	40 66 77 85	24 48 72 96	6	37	Zahoor y Rehman, (2009)
<i>Bacillus sp.</i>	Suelo con hierro	2500	Lurian- Bertani (LB)	10	100	24	8	37	Cheng y Li, (2009)
<i>Bacillus sp.</i>	Suelo de una mina de cromita	2000	LB (cromoreducción)	100	32.33 76.1	120	7 9	25 35	Dhal <i>et al.</i> , (2010)
<i>Bacillus cereus</i> SJ1	Agua residual de una industria de galvanoplastia	1560	LB	52	97	57	7	37	He <i>et al.</i> , (2010)
<i>Bacillus sp.</i>	Suelo agrícola contaminado con metales pesados	1000		100	100	48	8	37	Massod y Malik, (2011)
<i>Bacillus subtilis</i>	Suelo contaminado de una mina de carbón	900	Muller Hinton (CMI) LB (cromo-reducción)	50	26.46	72	6.5	30	Upadhyay <i>et al.</i> , (2017)
<i>Bacillus subtilis</i>	Efluente de industria de curtido	800	CA-M9 minimal media	100	71	144	9	**	Mangaiyarkarasi <i>et al.</i> , (2011)
<i>B. amyloliquefaciens</i> (CSB 9)	Suelo de una mina de cromita	**	LB	100	100	45	7	35	Das <i>et al.</i> , (2014)
<i>Pseudomonas olevorans</i>	Suelo contaminado con Cr(VI)	780	Agar Nutritivo	**	**	**	7	37	Mistry <i>et al.</i> , (2009)
<i>Pseudomonas putida</i>	Suelo (rizosfera)	700	LB	100	93.02 95.44	12 24	8	30-37	Poornima <i>et al.</i> , (2010)

Especie	Origen	CMI Cr(VI) mg L <sup>-1</sup>	Medio nutritivo	Concentración inicial de Cr(VI) mg L <sup>-1</sup>	% de Cr(VI) reducido	Tiempo h	pH inicial	Temperatura °C	Referencia
<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	Suelo (rizosfera)	600	LB	**	**	**	**	30-37	Poornima <i>et al.</i> , (2010)
<i>Bacillus sp.</i>	Industria de cuero	500	Agar nutritivo	100	95.2	78	7	37	Kathiravan <i>et al.</i> , (2010)
<i>Bacillus altitudinis</i>	Sedimentos (río Lerma)	300	TBS	100	16.40	24	8	26	Presente trabajo de investigación Ceron (2021)
<i>Enterobacter cancerogenus</i>					17.14	48			
					20.84	72			
					24.65	96			
					30.76	120			
					34.21	144			
					40.52	168			
					42.23	192			
<i>Pseudomonas cedrina</i>					5.70	24			
					19.87	48			
					38.75	72			
					45.44	96			
					45.91	120			
					55.45	144			
					63.63	168			
	67.05	192							
<i>Pseudomonas cedrina</i>	16.57	24							
	34.66	48							
	34.15	72							
	55.49	96							
	63.44	120							
	77.45	144							
	81.62	168							
81.57	192								

Especie	Origen	CMI Cr(VI) mg L <sup>-1</sup>	Medio nutritivo	Concentración inicial de Cr(VI) mg L <sup>-1</sup>	% de Cr(VI) reducido	Tiempo h	pH inicial	Temperatura °C	Referencia
<i>Pseudomonas monteilli</i>	Sedimentos (río Lerma)	300	TBS	100	8.67	24	8	26	Presente trabajo de investigación Ceron (2021)
					17.40	48			
	29.49	72							
	33.17	96							
	40.68	120							
	42.93	144							
	44.12	168							
	44.53	192							
<i>Pseudomonas graminis</i>		250			5.64	24			
					20.84	48			
					39.56	72			
					87.21	96			
					81.93	120			
					89.95	144			
					93.94	168			
					94.61	192			
<i>Microbacterium sp.</i>	Rizosfera	208	Medio mineral basal	10.4	10	1	7	28	Gutiérrez <i>et al.</i> , (2010)
<i>Pseudomonas sp</i>			Tris minimal medium						
<i>Pseudomonas S.</i>	Efluente de una industria de cuero	200	LB	120	60	24	7	30	Farag y Zaki, (2010)
					64	48			
					72.5	72			
					81.4	96			
					82	120			
					82.1	144			
					82.12	168			

Especie	Origen	CMI Cr(VI) mg L <sup>-1</sup>	Medio nutritivo	Concentración inicial de Cr(VI) mg L <sup>-1</sup>	% de Cr(VI) reducido	Tiempo h	pH inicial	Temperatura °C	Referencia
<i>Brevundimonas diminuta</i>	Agua residual industrial (cromadora)		TBS	100	1.87	24	8	26	Presente trabajo de investigación Ceron (2021)
					17.31	48			
					23.04	72			
					40.92	96			
					54.83	120			
					57.89	144			
					67.04	168			
					67.01	192			
<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>					10.72	24			
					28.76	48			
					39.73	72			
					60.26	96			
					61.55	120			
					61.96	144			
	62.69	168							
	62.66	192							
<i>Bacillus pumilis</i>	Industria de cuero	200	Agar nutritivo	200	57	28	**	35	Verma <i>et al.</i> , (2009)
<i>Bacillus brevis</i>		180		**	**	**	**		
<i>Bacillus megaterium</i>		170		170	18.5	28	-	35	
<i>Brevundimonas nasdae</i>	Agua residual industrial (cromadora)	150	TBS	100	9.11	24	8	26	Presente trabajo de investigación Ceron (2021)
					29.11	48			
					39.49	72			
					41.04	96			
					55.03	120			
					59.86	144			
					77.47	168			
					77.96	192			
<i>Bacillus coagulans</i>	Industria de cuero	140	Agar nutritivo	140	17.3	28		35	Verma <i>et al.</i> , (2009)

\*\* datos no encontrados

## 4.5 Remoción de Cr(VI) en un medio acuoso en un sistema en lote (Batch)

### 4.5.1 Crecimiento de las bacterias en presencia y ausencia de Cr(VI)

Las curvas de crecimiento bacteriano en ausencia y presencia de 100 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI), para los grupos experimentales B1-B24 (medio líquido TBS a pH 8, 26°C y 120 rpm), se monitorearon durante 192 h para las ocho especies, los tres consorcios y la especie control *S. aureus* (Figura 5). Se observó, que los valores más altos de crecimiento (D.O) obtenidos fueron para *Pseudomonas monteilli* en ausencia del Cr(VI) y *Pseudomonas graminis* en presencia de éste en el medio. El consorcio C1+C2 fue el que registro mayor crecimiento tanto en ausencia como en presencia del metal. Sin embargo, el menor crecimiento se observó para *Brevundimonas diminuta* y C1 en ausencia del Cr(VI), así como para *Pseudomonas cedrina* y C2 en presencia de dicho metal en el medio (Tabla 13).

**Tabla 13. Crecimiento máximo de cada microorganismo y los consorcios, en presencia y ausencia de Cr(VI) en el medio.**

Especies y consorcios	D.O. 600 máx sin Cr(VI)	Especies y consorcios	D. O. 600 máx con Cr(VI)
<b>C1+C2</b>	<b>1.303 ± 0.005</b>	<b>C1+C2</b>	<b>0.937 ± 0.003</b>
C2	0.888 ± 0.010	C1	0.803 ± 0.005
<b><i>Pseudomonas monteilli</i></b>	<b>0.734 ± 0.003</b>	C2	0.687 ± 0.001
C1	0.703 ± 0.005	<b><i>Pseudomonas graminis</i></b>	<b>0.602 ± 0.002</b>
<i>Bacillus altitudinis</i>	0.629 ± 0.001	<i>Pseudomonas monteilli</i>	0.568 ± 0.002
<i>Brevundimonas nasdae</i>	0.582 ± 0.004	<i>Bacillus altitudinis</i>	0.513 ± 0.004
<i>Pseudomonas graminis</i>	0.393 ± 0.004	<i>Brevundimonas nasdae</i>	0.455 ± 0.004
<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	0.374 ± 0.001	<i>Enterobacter cancerogenus</i>	0.381 ± 0.003
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	0.369 ± 0.004	<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	0.321 ± 0.003
<i>S. aureus</i> (CTL)	0.307 ± 0.003	<i>S. aureus</i> (CTL)	0.268 ± 0.002
<i>Pseudomona cedrina</i>	0.276 ± 0.002	<i>Brevundimonas diminuta</i>	0.204 ± 0.003
<i>Brevundimonas diminuta</i>	0.257 ± 0.003	<i>Pseudomonas cedrina</i>	0.185 ± 0.003

\*CTL: especie control

El 87.5% de las especies planctónicas y el 66.66% de los consorcios utilizados en este trabajo, mostraron un mayor crecimiento en ausencia de Cr(VI) en el medio.

Una de las ocho especies utilizadas, no siguió este comportamiento, siendo ésta *Pseudomonas graminis* (Figura 6). En el caso del consorcio C1, hubo un ligero aumento en el crecimiento en presencia del metal, como puede observarse en las Figuras 6.

La especie control *S. aureus*, mostró un ligero decremento del crecimiento bacteriano cuando el metal estuvo presente en el medio (Figura 6). Los consorcios presentaron el mayor crecimiento a diferencia de las especies planctónicas, en presencia y ausencia de Cr(VI). El consorcio C1 mostró ligeramente un mayor crecimiento en presencia del Cr(VI), en contraste con los otros dos, en donde se observó que el crecimiento fue mayor cuando el metal no se encontraba presente en el medio nutritivo (Figura 6).

Cuando se observa el comportamiento de las especies en conjunto, agrupándolas según su origen, que fue el criterio elegido para la formación de los consorcios, las especies pertenecientes al género *Pseudomonas* (*P. graminis* y *P. monteilli*) mostraron el mayor crecimiento con respecto a las otras especies en presencia del Cr(VI) ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ), (Figura 5).

El crecimiento del consorcio C1+C2 se observó claramente disminuido por la presencia del metal en el medio, al comparar el crecimiento de los microorganismos en ausencia del Cr(VI). Este fenómeno también se encontró para el consorcio C2 a diferencia del C1, en donde el crecimiento de los microorganismos fue ligeramente mayor, en la presencia del metal (Figura 6).

En este trabajo, los resultados sugieren que la concentración inicial de Cr(VI) utilizada tuvo un impacto negativo en el crecimiento de la mayoría de los cultivos bacterianos (Tabla 13). Para las especies *Pseudomonas monteilli* y *Pseudomonas cedrina*, la presencia de Cr(VI) en el medio las afectó de forma negativa, ya que se observó un mayor crecimiento de ambas especies en ausencia del metal en el medio, este hallazgo fue mencionado también por Poornima *et al.*, (2010), para *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas plecoglossicida*, en donde el crecimiento de ambas especies se inhibió en presencia de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  Cr(VI), en el medio de cultivo.

Para la especie *Pseudomonas cedrina*, el patrón de crecimiento que se observó en presencia y ausencia del metal en el medio, concuerda con el reportado por Farag y Zaki (2010), para un cultivo bacteriano al cual denominaron S4, perteneciente al género *Pseudomonas* (Tabla 12). Éste mostró un comportamiento similar, que el del cultivo utilizado en este trabajo. El crecimiento celular, se incrementó del tiempo cero hasta las 96 h de incubación, después de este tiempo no se observaron diferencias significativas en el crecimiento y las lecturas de D.O comenzaron a decrecer (ANEXO O).

También *Bacillus altitudinis* exhibió un mayor crecimiento en ausencia del metal, en contraste de cuando éste se encontraba presente. Algunos trabajos mencionan este comportamiento en cultivos del mismo género, pero diferente especie. En este sentido, Masood y Malik (2011), señalan que para el género *Bacillus* sp en ausencia y presencia de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr(VI) en el medio (Tabla 12), el crecimiento de esta cepa se ve afectado por la presencia del metal, exhibiendo un menor crecimiento e indicando un efecto tóxico del Cr(VI), en los cultivos celulares. Panneerselvam *et al.*, (2013), reportaron el mismo comportamiento para *Bacillus simplex*, en la misma concentración del metal en medio acuoso. En contraste con lo que reporta Perea *et al.*, (2014), las cepas de *Bacillus cereus* aisladas de ambientes contaminados, como las aguas residuales de la industria metalúrgica, expresan una mayor cantidad de genes que provoca que no se afecte el crecimiento, frente a concentraciones elevadas de cromo. Sin embargo, la especie *B. altitudinis* utilizada en este trabajo claramente se afectó por la presencia del metal en el medio. Liu *et al.*, (2006), observaron que a partir de  $40 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr(VI), se inhibe el crecimiento de *Bacillus* sp y que a  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , el crecimiento del microorganismo, se afectó significativamente, lo cual coincide con lo encontrado en este trabajo. Algunas otras investigaciones indican que un bajo crecimiento microbiano, se puede atribuir al efecto inhibidor del metal, que a altas concentraciones como la utilizada en este trabajo, impide la multiplicación de las bacterias (Panneerselvam *et al.*, 2013; Ezaka y Anyanwu, 2011).

Es probable que, debido a su origen los consorcios C1 y C2 al combinarse generaron un proceso de sinergismo, lo cual se reflejó en el incremento de su crecimiento en comparación con el de su forma individual (ANEXO P). Esta observación sugiere, que la combinación de bacterias aisladas de ambientes distintos, pero que comparten características similares como la presencia de metales (Figura 6), muestra un mejor crecimiento en condiciones adversas o estresantes (Panneerselvam *et al.*, 2013).

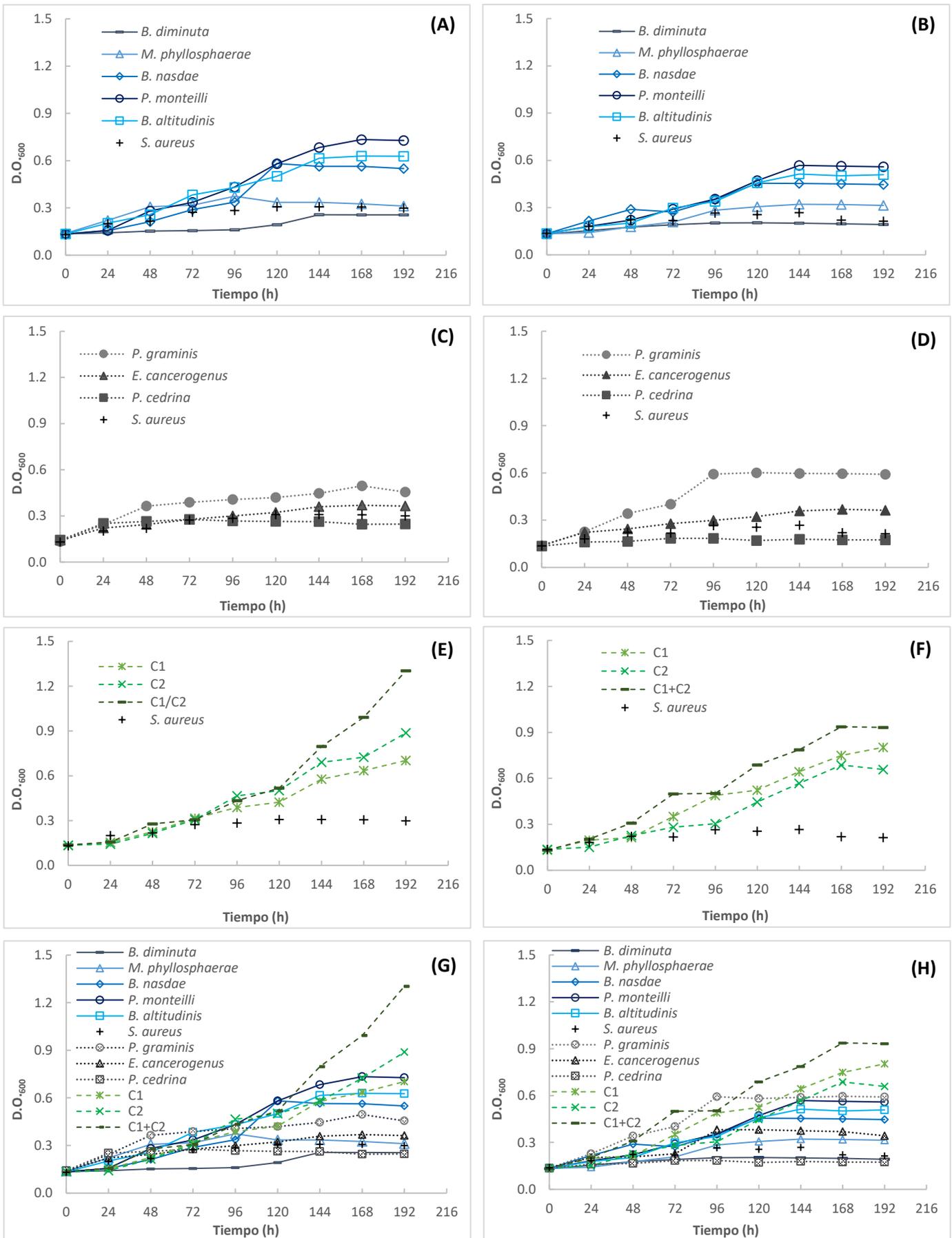


Figura 6. Crecimiento bacteriano de especies y consorcios según su origen en ausencia (A), (C), (E), (G) y presencia (B), (D), (F), (H) de 100 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) en TBS, a pH 8 y 26°C, en agitación a 120 rpm.

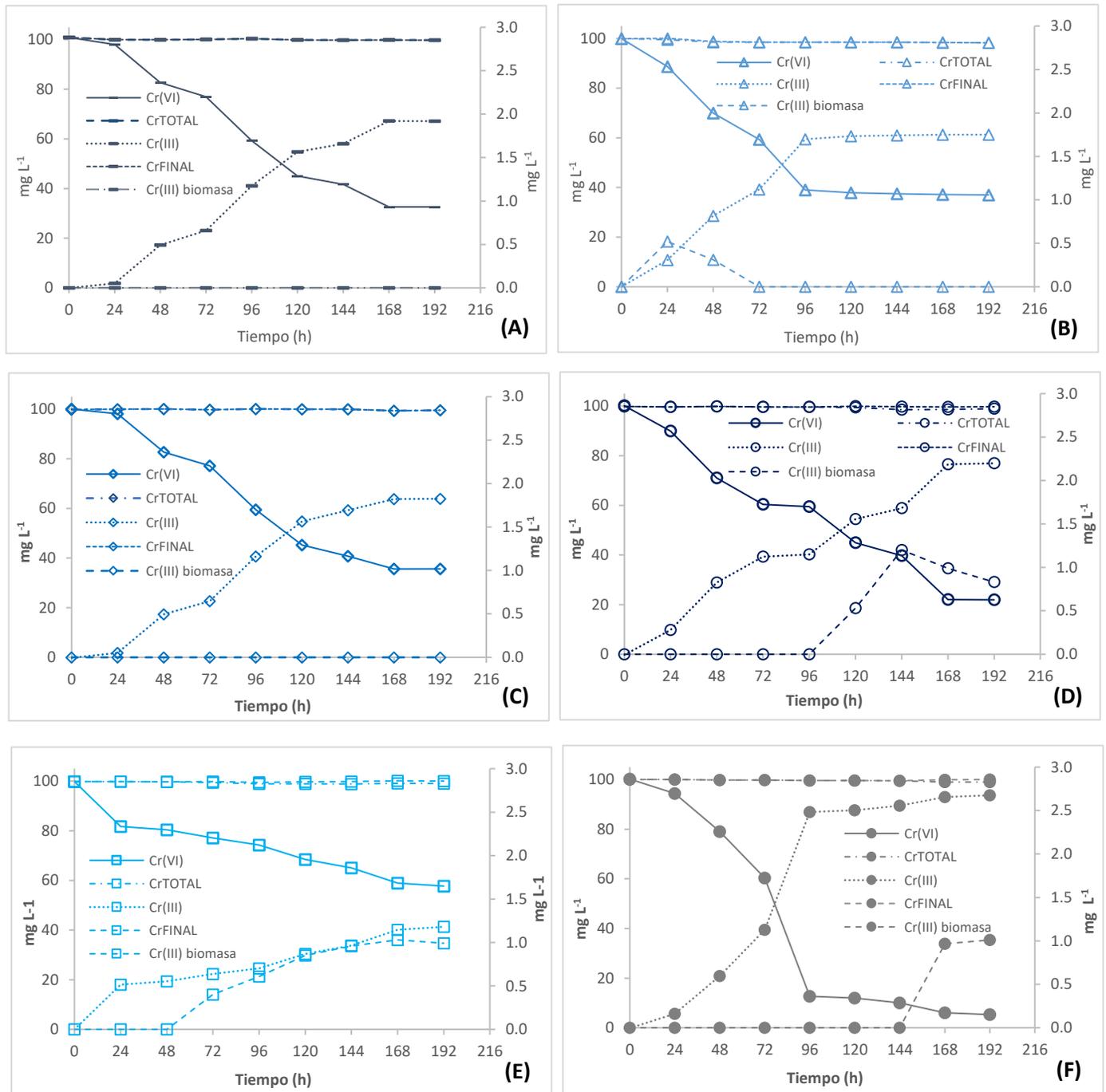
#### 4.5.2 Reducción de Cr(VI) a Cr(III)

Las ocho especies, los tres consorcios y la cepa control, se monitorearon durante 192 h. La concentración inicial de Cr(VI) en medio fue de 100 mg L<sup>-1</sup> a pH 8 y 26°C, en agitación a 120 rpm. Se observó, que al aumentar el crecimiento bacteriano hubo un decremento en la concentración inicial de Cr(VI) en el medio, a las 196 h del proceso. *Pseudomonas graminis* (Figura 7) y C2 (Figura 8) presentaron la menor concentración del metal 5.33 y 7.3 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Sin embargo, *Bacillus altitudinis* presentó la mayor concentración de dicho metal, (57.71 mg L<sup>-1</sup>). El Cr(VI) se redujo a Cr(III) al entrar en contacto con todas las cepas de microorganismos, incluyendo los tres consorcios. *S. aureus* se utilizó como la cepa control, debido a que ésta no redujo el metal. Sin embargo, se detectó una fracción de Cr(VI) en el interior de su biomasa, siendo la cantidad más alta cuantificada de 4.83 mg L<sup>-1</sup>, a las 96 h del proceso.

La mayor reducción del Cr(VI) a Cr(III), la llevo a cabo la cepa *Pseudomonas graminis*, en un 47.67%, entre las 72-96 h del proceso, C2 redujo a dicha especie metálica en un 30.67%, entre las 96-120 h y en el caso de *Pseudomonas graminis*, la reducción más alta que se encontró coincidió con el mayor crecimiento de la cepa, en este mismo periodo de tiempo.

El consorcio C2 formado por: *Brevundimonas diminuta*, *Brevundimonas nasdae*, *Pseudomonas monteilli*, *Bacillus altitudinis* y *Microbacterium phyllosphaerae*, mostró la mayor reducción de Cr(VI) en el medio con respecto a los otros dos consorcios. Cuando las especies se encontraban individualmente, no se registraron valores de reducción tan altos, a diferencia de cuando éstas conformaron el consorcio (Figura 7 y 8).

Según los resultados obtenidos en este trabajo, se puede observar que la capacidad de reducción de las especies de Cr, está ligada al crecimiento bacteriano. Esto también lo mencionan Ramírez-Ramírez y Benítez-Campos (2014), quienes observaron que el crecimiento de *Bacillus cereus* estaba relacionada con la reducción del Cr(VI) a Cr(III) en el medio (100 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) en medio líquido LB), concluyendo que el cambio en el estado de oxidación del contaminante, es el causante de este comportamiento.

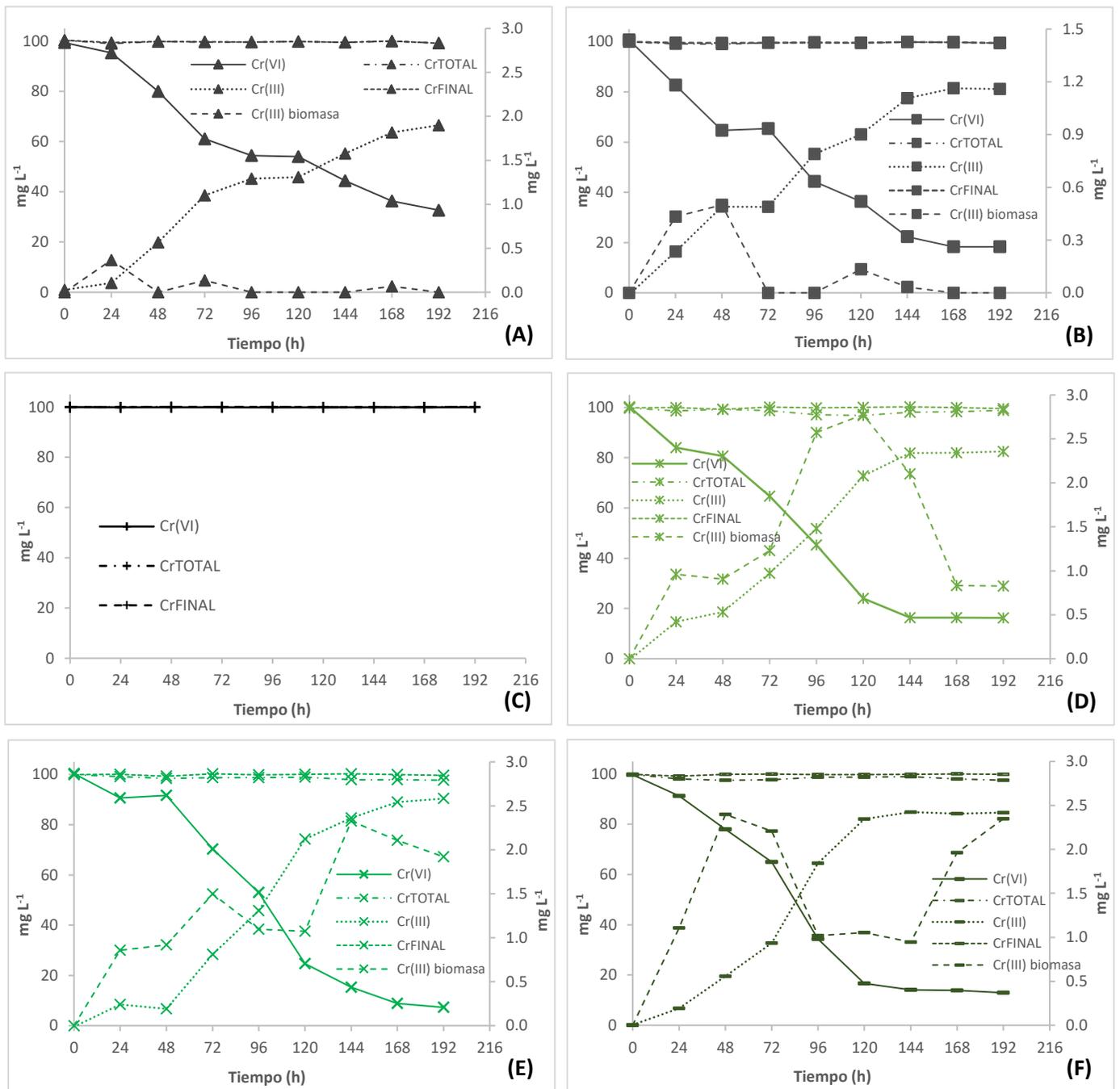


**Figura 7. Concentración de Cr(VI), Cr<sub>TOTAL</sub> y Cr(III) en el medio extracelular, Cr(III) en el medio intracelular (biomasa) y Cr<sub>FINAL</sub> (extra e intracelular) después del contacto con las especies *Brevundimonas diminuta* (A), *Microbacterium phyllosphaerae* (B), *Brevundimonas nasdae* (C), *Pseudomonas montelli* (D), *Bacillus altitudinis* (E) y *Pseudomonas graminis* (F).**

El crecimiento de *Pseudomonas graminis* en presencia del Cr(VI) superó los valores registrados para cuando éste no se encontraba presente en el medio, aunado a ello esta especie bacteriana fue la que mayor cantidad de Cr(VI) redujo del medio. La tasa de reducción llevada a cabo por *Pseudomonas graminis* en este intervalo de tiempo, fue de 1.97 mg Cr(VI) L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>, la cual es mayor a *Serratia sp.* con 0.28 mg Cr(VI) L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Zhang y Li, 2011) pero menor a CBS 9 con 2.22 mg Cr(VI) L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> (Das *et al.*, 2014).

Los resultados muestran que 100 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI), no es una concentración lo suficientemente tóxica para el microorganismo, permitiendo que se lleven a cabo los procesos metabólicos necesarios, e incluso, la población bacteriana se benefició. Este hecho sugiere, que la reducción del Cr(VI) al Cr(III) está ligada al crecimiento celular, tal como lo mencionan Ramírez-Ramírez y Benítez-Campos (2014).

Los resultados que mostró C2 en cuanto a reducción, podrían deberse a la presencia *Bacillus altitudinis* y *Microbacterium phyllosphaerae*, ya que como lo mencionan Panneerselvam *et al.*, (2013), los cultivos mixtos (consorcios) formados por los géneros *Bacillus* y *Microbacterium*, muestran una mayor reducción del Cr(VI) en el medio, a diferencia de cuando estos géneros se encuentran de forma individual y frente al mismo contaminante. Este tipo de comportamiento podría deberse a un efecto sinérgico, resultado de la combinación de especies (Panneerselvam *et al.*, 2013). Ninguno de los cultivos en su forma planctónica redujo la misma cantidad de Cr(VI) en el medio, como cuando se encontraban formando el consorcio C2.



**Figura 8. Concentración de Cr(VI), Cr<sub>TOTAL</sub> y Cr(III) en el medio extracelular, Cr(III) en el medio intracelular (biomasa) y Cr<sub>FINAL</sub> (extra e intracelular) después del contacto con las especies *E. cancerogenus* (A), *P. cedrina* (B), como cepa control *S. aureus* (C), así como los consorcios C1 (D), C2 (E) y C1+C2 (F).**

#### 4.5.3 Concentración de Cr(III) intra y extracelular

Se determinó la concentración de Cr(III) en el medio (extracelular) respecto al tiempo, el cual se incrementó a medida de que el Cr(VI) era reducido por las ocho especies y tres consorcios, excepto para la cepa control (*S. aureus*), en la cual no se detectó este mismo fenómeno. La especie *Pseudomonas graminis* fue la que registró la concentración más alta de Cr(III) en el medio extracelular, en comparación con los otros siete cepas y los consorcios, de los cuales C2 fue el que mayor concentración del metal registró.

También se cuantificó la concentración de Cr(III), en la biomasa producida por las diferentes especies y consorcios, con respecto al tiempo.

No se detectaron concentraciones del metal en la biomasa de las especies *Brevundimonas diminuta* y *Brevundimonas nasdae*. La mayor concentración de Cr(III) registrada en las especies planctónicas fue de 1.20 mg L<sup>-1</sup> a las 144 h, en *Pseudomonas monteilli*. Para las especies *Microbacterium phyllospareae* y *Pseudomonas graminis* solo se detectó Cr(III) en la biomasa al inicio del proceso (24 y 48 h) y al finalizar (168 y 192 h), respectivamente (Figura 7).

Las concentraciones de Cr(III) encontradas en las biomasas (medio intracelular) de *Bacillus altitudinis* y *Pseudomonas graminis*, fueron las más altas, al finalizar el proceso (192 h). En la figura 7, se puede observar el incremento de la especie metálica reducida en las biomasas a lo largo del proceso, lo que sugiere que estas especies microbianas acumulan al Cr(III) de manera intracelular. Este comportamiento también lo presentaron los tres consorcios, en los cuales se detectaron concentraciones mayores, con respecto a las especies en forma planctónica. En los tres consorcios se detectaron concentraciones del metal en la biomasa, durante todo el periodo de experimentación (192 h). La concentración más baja registrada fue de 0.86 mg L<sup>-1</sup> de Cr(III) para C2 a las 24 h de iniciado el proceso y C1, cuya concentración fue la mayor (2.78 mg L<sup>-1</sup>), a las 120 h (Figura 8).

El consorcio C1+C2 fue el que presentó el mayor porcentaje de Cr(III) acumulado, seguido de *Enterobacter cancerogenus* (Tabla 14).

**Tabla 14. Porcentaje de acumulación de Cr(III) en la biomasa bacteriana.**

<b>Especies y consorcios</b>	<b>Cr(III) acumulado %</b>
C1+C2	11.06
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	9.16
<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	4.63
C1	3.64
C2	2.74
<i>Bacillus altitudinis</i>	2.52
<i>Pseudomonas monteilli</i>	1.99
<i>Pseudomonas cedrina</i>	1.39
<i>Pseudomonas graminis</i>	1.06

Las concentraciones de Cr(III) encontradas en las ocho especies utilizadas en este trabajo, fueron menores con respecto a lo reportado por otros autores, tal es el caso de *Bacillus amyloliquefaciens* la cual acumuló 62.6 mg L<sup>-1</sup> de Cr(III) en el medio intracelular, después de 48 h, para una concentración inicial de 100 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) en el medio. La mayoría del metal reducido, fue inmovilizado dentro de la biomasa bacteriana producida por esta especie, según lo mencionan Das *et al.*, (2014).

En las especies *Pseudomonas graminis*, *Pseudomonas cedrina* y *Pseudomonas monteilli*, se encontraron diferentes concentraciones de Cr(III) dentro del medio intracelular, las tres especies redujeron el Cr(VI) a Cr(III). Algunos autores sugieren, que el proceso de reducción del Cr(VI) por algunas especies pertenecientes al género *Pseudomonas*, se lleva a cabo en el área intracelular (Xu *et al.*, 2011). El proceso antes mencionado, ha sido reportado en investigaciones previas para las especies *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas* sp. CRB5 (Thatoi *et al.*, 2014). De acuerdo a lo anterior, es razonable suponer que estas tres especies (*Pseudomonas graminis*, *Pseudomonas cedrina* y *Pseudomonas monteilli*) llevaron a cabo el proceso de una forma similar. Sin embargo, no se tiene claro si se trata de un proceso de acumulación o inmovilización, ya que los datos muestran que ambos mecanismos podrían estar presentes para Cr(III).

Los resultados encontrados para *Pseudomonas graminis* y *Bacillus altitudinis* sugieren que el metal se acumuló, ya que las concentraciones no disminuyeron (Figura 7), contrariamente a la de las otras especies y consorcios, en donde se observó el incremento o decremento de la concentración del Cr(III), en el medio intracelular (Figura 7). Lo antes mencionado, coincide con lo reportado por Das *et al.*, (2014), quienes sugieren dos tipos de remoción para Cr(III), la inmovilización y la acumulación intracelular.

En la investigación realizada por Mishra *et al.*, (2012), se menciona que *Vigribacillus sp.* inmovilizó y redujo el Cr(VI) a Cr(III) en un 35%, de una concentración inicial de 100 mg L<sup>-1</sup>. Así mismo, Dömez y Koçberber (2005), evaluaron la bioacumulación con la misma concentración inicial de algunos aislados bacterianos, encontrando que éstos acumularon alrededor del 99% del Cr(III) reducido. Los porcentajes mencionados, superan a los obtenidos para las seis especies bajo investigación, del presente trabajo, en donde las especies bioacumularon entre el 0.57 y 4.84% de la especie metálica.

En los consorcios, se registraron concentraciones más grandes de Cr(III), en comparación con las especies planctónicas. C1 registró la máxima concentración de Cr(III) con 2.78 mg L<sup>-1</sup> a las 120 h. Kılıç, *et al.*, (2007), utilizaron un consorcio formado por *Ochrobactrium sp.*, *Salmonella enterica* y *Pseudomonas aeruginosa*, encontrando que el pH óptimo para el crecimiento del consorcio fue de 8, para una concentración de 50 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) en el medio, además mencionan que la biomasa bacteriana acumuló del 90 al 99% del metal, dentro de un periodo de 2 a 4 d. Lo anterior difiere con los resultados encontrados en este trabajo, ya que en 8 d de experimentación no se alcanzaron concentraciones similares de Cr(III) en los consorcios.

En la presente investigación, al igual que lo reportado por Xu *et al.*, (2011), una cantidad considerable del Cr(III) reducido se encontró fuera de las bacterias (Figura 7). Los resultados sugieren, que el principal mecanismo de las especies planctónicas (cepas) y consorcios utilizados en esta investigación, es la biorreducción de Cr(VI) a Cr(III) y que la presencia de microorganismos en el medio acelera el proceso de reducción del Cr(VI), ésto al compararlos con los blancos que carecían de inóculos bacterianos.

Al observar los balances de materia, se encontró que la concentración del Cr<sub>TOTAL</sub> del control, al ser comparado con los de las especies y consorcios, fue menor de la que se

había determinado inicialmente (Anexo A-N). Para la especie *Microbacterium phyllosphaerae* (Anexo B), el cromo faltante es más evidente a diferencia de las otras especies y consorcios, lo anterior podría atribuirse a la formación de  $\text{Cr}(\text{OH})_3$ , ya que se observó la presencia de un precipitado verde, el cual ha sido mencionado en otros trabajos y al que se le atribuye que se aprecie una disminución de la concentración del  $\text{Cr}_{\text{TOTAL}}$  en el medio (Sugiyama *et al.*, 2012). Algunos otros autores mencionan el mismo precipitado, pero de color blanquecino. En la presente investigación, no se realizó digestión de las muestras con  $\text{HNO}_3$  previamente a la lectura mediante espectrofotometría de absorción atómica, esto debido a la cantidad disponible de la muestra, por lo no puedo corroborarse si el cromo faltante se encontraba en dicho precipitado.

Además de explicar la pérdida de Cr, derivada de la formación de un precipitado, también puede atribuirse al acomplejamiento con el medio de cultivo utilizado, ya que está conformado principalmente por peptona y caseína (proteínas). En este sentido, Moral *et al.*, (2010), mencionan que el Cr(III), forma complejos de coordinación con diferentes compuestos como amoníaco, aminas y aminoácidos, presentes en altas concentraciones en aguas residuales.

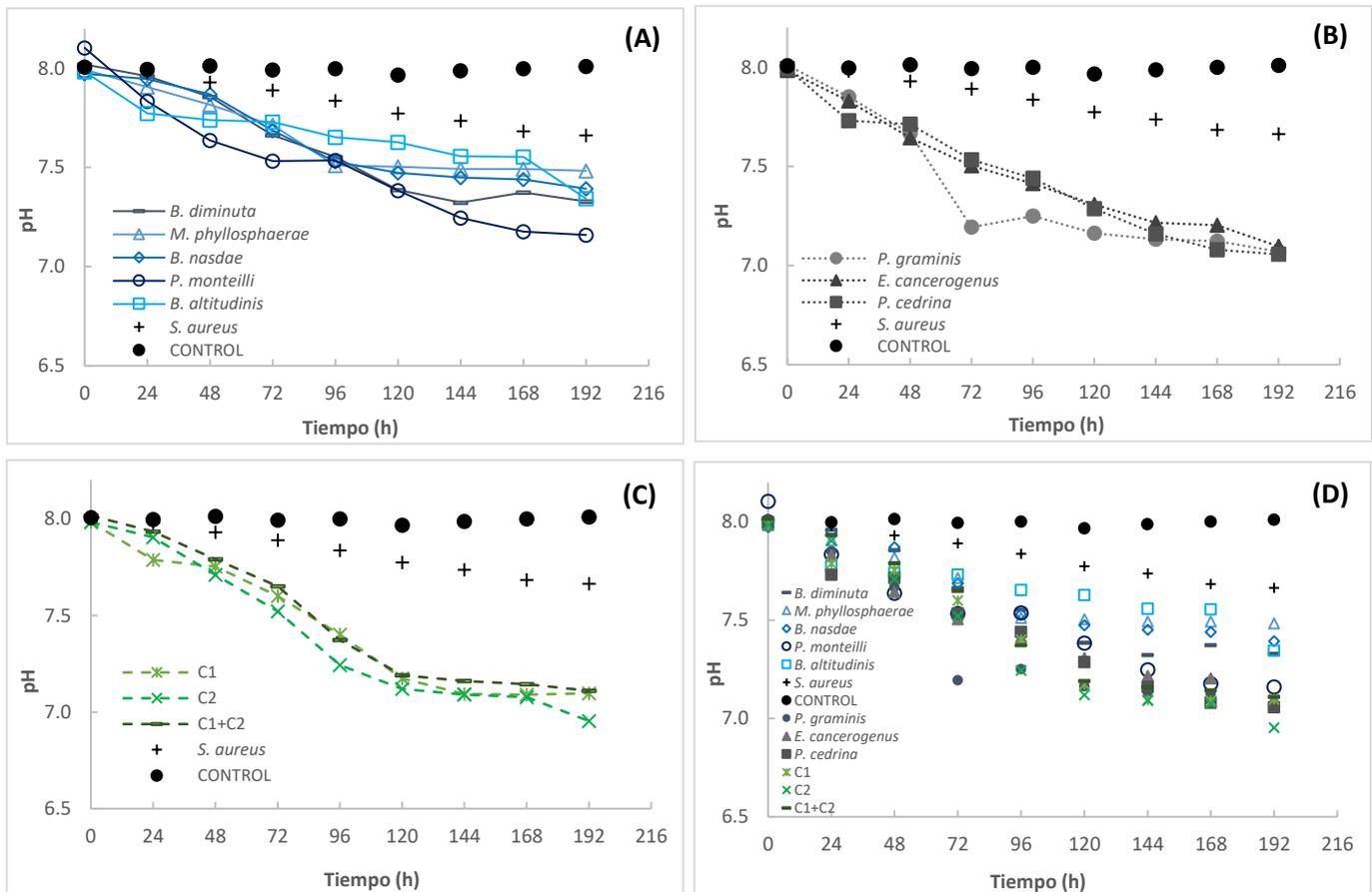
#### 4.6 Parámetros fisicoquímicos

El valor inicial de pH varió durante todo el proceso de reducción de Cr(VI), para cada una de las especies, consorcios y la especie control *S. aureus* (Tabla 15). Sin embargo, para el caso del medio TBS con 100 mg Cr/L, utilizado como medio de referencia, se observaron cambios mínimos (Figura 9).

La especie control *S. aureus* mostró variación en los valores de pH, con respecto al inicial (pH 8). Sin embargo, ésta no fue tan notoria en comparación con las observadas en las ocho especies o cuando éstas se encontraban formando los consorcios C1, C2 y C1+C2. El consorcio C1 registró el valor más bajo de pH, la especie *Microbacterium phyllosphaerae* el mayor, con relación a las otras especies y consorcios.

Al observar la curva de pH para la especie *Pseudomonas graminis* se puede apreciar, al compararla con las otras dos especies con las cuales comparte origen de aislamiento, que

el comportamiento difiere en el intervalo entre las 48 y 120 h, mientras que *Enterobacter cancerogenus* y *Pseudomonas cedrina* muestran patrones de comportamiento muy similares, durante todo el proceso. Al ser comparadas en conjunto todas las especies y consorcios, se encuentra que *Pseudomonas graminis* muestra un comportamiento específico (Figura 9).



**Figura 9. Variaciones de los valores de pH durante el periodo experimental (192 h) para (A) especies provenientes del río Lerma, (B) cromadora, (C) consorcios, especies aisladas del río Lerma, cromadora y consorcios (D).**

Algunos parámetros físico-químicos afectan al crecimiento, reducción y acumulación de los cultivos, frente a los metales como el Cr. En el caso del pH, el cambio en el valor de este parámetro debido a la reducción de Cr(VI) en medio líquido, lo han mencionado otros autores. Poormina *et al.*, (2010), reportaron que para *Pseudomonas putida* este parámetro cambio con respecto al valor inicial de 8 a 7.91 después de 24 h. Las especies

*Pseudomonas monteilli*, *Pseudomonas cedrina* y *Pseudomonas graminis*, al igual que lo reportado por estos autores, mostraron una disminución del pH llegando a valores de  $7.83 \pm 0.02$ ,  $7.73 \pm 0.02$  y  $7.85 \pm 0.02$ , respectivamente. Poormina *et al.*, (2010), además consideraron que en el intervalo de pH entre 7 y 8, es óptimo para que se lleve a cabo la reducción Cr(VI) en el medio, utilizando monocultivos de las especies *Pseudomonas putida* y *Pseudomonas plecoglossicida*.

Algunos trabajos difieren en cuanto al valor del pH idóneo, para el crecimiento de las especies y la reducción de Cr(VI). Tal es el caso de *Enterobacter sp* DU17, que según lo reportado por Rahman y Singh (2014), un intervalo de pH de 7 a 9 es óptimo para el crecimiento y solo a pH 7 se lleva a cabo la reducción más eficiente de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr(VI) en medio LB. La especie *Enterobacter cancerogenus*, utilizada en la presente investigación, mostró una baja reducción (ANEXO H) del metal en el medio, con respecto a *Pseudomonas graminis* (ANEXO G) que redujo la mayor cantidad del Cr(VI), esto podría deberse a que el pH inicial en el cual se llevó a cabo el proceso no era el idóneo para este género, como lo mencionan Rahman y Singh (2014). En cuanto a la especie *Bacillus altitudinis*, fue la que menor concentración de Cr(VI) redujo del medio, esto con respecto a las otras siete especies y a los tres consorcios (ANEXO F).

A diferencia de lo mencionado para *Enterobacter cancerogenus*, esta especie se encontraba en un valor de pH inicial óptimo para la remoción del metal en el medio, según lo reportado por Masood y Malik (2011), quienes encontraron que a pH 8 y después de 48 h de experimentación, con una concentración inicial de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr(VI) en medio LB, la especie *Bacillus sp* FM1 redujo en su totalidad al Cr(VI) (Tabla 12), lo que contrasta con los resultados obtenidos para *Bacillus altitudinis*, la cual no redujo la totalidad de la concentración inicial después de 192 h y solo redujo  $40.89 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr(VI) en el medio.

El valor de pH para esta especie varió durante todo el proceso, llegando a un pH final de 7.34 (Tabla 15). Estos resultados no coinciden con los valores reportados por Okeke *et al.*, (2008), para *Bacillus sp*. PB-2, quienes reportan que el valor final de este parámetro fue de 6.25 y el inicial de 8. La reducción de esta cepa se llevó a cabo en medio TBS, el mismo que fue utilizado para la presente investigación. Sin embargo, la concentración inicial empleada fue de  $500 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  Cr, que fue mayor a la utilizada en la presente investigación. Cabe mencionar que *Bacillus sp*. PB-2, redujo  $403.7 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  de Cr(VI) en 24 h.

Las variaciones del pH influyen sobre el grado de ionización de los componentes de un sistema y como consecuencia, afectan la conformación de las proteínas y las funciones de las enzimas, impactando sobre el metabolismo celular, responsable de la crono-reducción. Un ejemplo de ello, son las variaciones del pH en el medio que causan cambios en la forma iónica de los sitios activos de la enzima crono reductasa, lo cual afecta su actividad. El intervalo de pH entre 6 y 8.5, se considera el óptimo para la reducción de Cr(VI) por la mayoría de las especies, según Kathiravan *et al.*, (2010). Por lo tanto, es importante encontrar el pH óptimo para cada especie, ya que este parámetro varía dependiendo de las características individuales de cada organismo y con ello, lograr la máxima reducción de Cr(VI) en el medio (Masood y Malik, 2011).

**Tabla 15. Porcentaje de Cr(VI) removido, valores de O<sub>2</sub> y pH al final del proceso (196 h).**

Microorganismos y consorcios	Reducción %	O <sub>2</sub> mg L <sup>-1</sup>	pH
<i>Brevundimonas diminuta</i>	67.34	2.59	7.33
<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>	63.01	2.37	7.48
<i>Brevundimonas nasdae</i>	78.16	2.41	7.39
<i>Pseudomonas monteilli</i>	45.08	2.48	7.16
<i>Bacillus altitudinis</i>	40.62	2.51	7.34
<i>Pseudomona graminis</i>	95.33	2.6	7.07
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	66.67	2.27	7.1
<i>Pseudomonas cedrina</i>	82.33	2.23	7.06
C1	84.06	1.98	7.10
C2	93.03	2.06	6.95
C1+C2	86.74	1.85	7.11
<i>S. aureus</i>	SR	2.51	7.66
Referencia	0	3.45	8.01

SR: Sin Reducción

Los valores iniciales de O<sub>2</sub> se encontraban en el intervalo de 3 a 5 mg L<sup>-1</sup>, a 26±2°C y 120 rpm, para todos los grupos experimentales B-1 hasta B-24 (Tabla 5). Los valores de O<sub>2</sub> variaron con respecto a los iniciales, en especial los consorcios mostraron una mayor variación, ya que como se muestra en la Tabla 15, éstos fueron los que menor concentración registraron al terminar el periodo experimental.

Las diferencias encontradas en las Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) entre las obtenidas en la presente investigación y las reportadas por otros autores, podrían estar asociadas a la temperatura de incubación, ya que *Bacillus altitudinis* exhibió una CMI menor en comparación con *Bacillus cereus* SJ1 (1561 mg L<sup>-1</sup>), reportada por He *et al.*, (2010).

Ambas especies se aislaron de ambientes similares (Tabla 12), por lo que podría esperarse una similitud en su comportamiento. Sin embargo, la especie *Bacillus cereus* SJ1 mostró una CMI 5 veces mayor, en comparación a la especie *Bacillus altitudinis*, la cual fue incubada a 37°C (Tabla 12). Este resultado podría considerarse una ventaja para dicho microorganismo (*Bacillus cereus* SJ1) frente al Cr(VI) al cual fue expuesto. Lo anterior podría deberse, a que la temperatura de incubación afecta la viabilidad de las células bacterianas, sin embargo, la temperatura óptima de crecimiento depende mayormente de la naturaleza de cada especie, por lo que en la presente investigación, se decidió incubar a los microorganismos considerando la temperatura en la cual fueron aisladas las cepas. En el trabajo de Dhal *et al.*, (2010), se reportó que a 25°C la CMI para *Bacillus sp.* fue de 2000 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI), cuya concentración difiere para las cepas pertenecientes a ese género y consideradas en la presente investigación. Algunos trabajos como el de Zhang y Li (2011), reportan que las bacterias cromo tolerantes, se desarrollan mejor a temperaturas entre 25 y 40°C.

Este parámetro (la temperatura), también impacta de manera significativa a la cromo-reducción. A bajas temperaturas, la fluidez de la membrana decrece y el sistema de transporte se afecta, por lo que diferentes substratos no pueden entrar a la célula rápidamente y esto repercute sobre el crecimiento celular (Narayani y Shetty, 2013). La investigación realizada por Das *et al.*, (2013), hace notar la importancia de encontrar la temperatura adecuada para que se lleve a cabo el proceso de cromo reducción. Estos autores reportaron que para la especie *Bacillus amyloliquefaciens* a 35° C y pH 7, se obtiene la reducción total de Cr(VI) en el medio (Tabla 12), en comparación cuando dicha especie se incubó a 25°C, ya que solo redujo el 16.56 % del Cr(VI) en el medio, a las 144 h. Lo anterior contrasta con la especie *Bacillus altitudinis* utilizada en la presente investigación, ya que a 26°C y pH 8 ésta logro reducir la especie metálica del medio, en un porcentaje ligeramente mayor (18.06 %) pero en un menor tiempo (24 h) del proceso, partiendo de una concentración inicial de Cr(VI) de 100 mg L<sup>-1</sup>.

Debido a que la temperatura óptima para la reducción de Cr(VI), depende mayormente de la naturaleza de cada especie (Zhang y Li, 2011), en la presente investigación se decidió realizar todos los experimentos a la temperatura a la cual fueron aisladas de sus medios de origen (26°C), las ocho especies.

#### 4.7 Resistencia bacteriana a antibióticos

Se consideraron como cepas multirresistentes a antibióticos, aquellas que presentaron resistencia a tres o más antibióticos en las pruebas de sensibilidad con sensidiscos y de las ocho especies analizadas, solamente *Bacillus altitudinis* no presentó multirresistencia, fue sensible a los 13 antibióticos a los que fue expuesta. En contraste a ello, *Enterobacter cancerogenus* fue multirresistente a los doce antibióticos a los cuales estuvo expuesta (Tabla 16).

Todas las especies incluida la bacteria control, se expusieron a gentamicina, cefalotina y cefotaxima, siendo este último en el cual siete de las ocho especies fueron resistentes. La mayor sensibilidad de las bacterias fue a la gentamicina, ya que cinco de las ocho especies fueron sensibles a dicho antibiótico (Tabla 16).

Las especies *Pseudomonas graminis* y *Pseudomonas monteilli* se expusieron al mismo número de antibióticos (13), esta última presentó una mayor resistencia (a diez de los trece antibióticos), a diferencia de *Pseudomonas graminis* que solo fue resistente a cinco de los trece antibióticos.

Al comparar las tres especies pertenecientes al género *Pseudomonas* y tomando en cuenta solo los once antibióticos en común, a los que fueron expuestas, los resultados mostraron que el orden de mayor a menor resistencia fue: *Pseudomonas monteilli*  $\geq$  *Pseudomonas cedrina*  $\geq$  *Pseudomonas graminis*. Las tres especies presentaron resistencia a los siguientes antibióticos: nitrofurantoína (NF), cloranfenicol (CL), ciprofloxacina (CPF) y cefotaxima (CFX). Sin embargo, todas fueron sensibles a la amikacina (AK) (Tabla 16).

Las diferencias particulares de los ambientes de aislamiento de los organismos bajo investigación en el presente trabajo, pudieron influir en los patrones de resistencia que

presentaron las diferentes especies y consorcios. Sin embargo, una de las características que todas comparten es la presencia de metales pesados en sus entornos, por lo que es posible que hayan adquirido resistencia frente a éstos y otros contaminantes.

Las especies *Pseudomonas monteilli* y *Pseudomonas graminis*, presentaron resistencia a nitrofurantoína (NF), gentomicina (GE) y clorafenicol (CL), esto resultados coinciden con los obtenidos para las diferentes especies de *Pseudomonas*, reportadas por Matyar *et al.*, (2010). Contrario a lo reportado por los autores antes mencionados (Tabla 17), las especies *Pseudomonas monteilli* y *Pseudomonas graminis* utilizadas en la presente investigación, fueron sensibles a la amikacina (AK). En esa investigación, los aislamientos fueron realizados en tres diferentes sitios, en los cuales se encontraron seis diferentes especies del género *Pseudomonas* (Matyar *et al.*, 2010), las cuales presentaron, al igual que en el presente trabajo de investigación, diversos patrones de resistencia.

**Tabla 16. Actividad antimicrobiana expresada como la zona de inhibición.**

especies	Antibióticos																			
	AM	AK	CB	GE	CF	CFX	NET	CPF	NOF	CL	SXT	NF	CRO	PEF	E	VA	TE	DC	CLM	PE
<i>B. diminuta</i>	*	R(9)	*	R(9)	R(8)	R(1)	R(12)	*	*	R(5)	I(14)	R(7)	R(3)	R(13)	*	*	*	*	*	*
<i>M. phyllosphaerae</i>	*	*	*	S(-)	S(-)	R(0)	*	R(12)	*	*	*	*	*	*	R(5)	--	R(10)	--	R(8)	*
<i>B. nasdae</i>	*	S(-)	*	S(-)	R(3)	R(2)	S(-)	I(17)	S(-)	R(12)	S(-)	R(6)	S(-)	(S-)	*	*	*	*	*	*
<i>P. monteilli</i>	*	S(-)	R(11)	R(9)	R(7)	R(6)	R(9)	R(10)	S(-)	R(0)	I(12)	R(7)	R(2)	R(11)	*	*	*	*	*	*
<i>B. altitudinis</i>	*	S(-)	*	S(-)	S(-)	S(-)	S(-)	S(-)	S(-)	S(-)	S(-)	S(-)	S(-)	S(-)	*	*	*	*	S(-)	--
<i>P. graminis</i>	*	S(-)	I(15)	S(-)	S(-)	R(7)	S(-)	R(10)	S(-)	R(3)	S(-)	R(7)	I(15)	R(10)	*	*	*	*	*	*
<i>E. cancerogenus</i>	R(0)	R(8)	R(0)	R(8)	R(1)	R(1)	R(7)	R(8)	R(8)	R(9)	R(5)	R(3)	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>P. cedrina</i>	*	S(-)	R(4)	S(-)	R(3)	R(3)	S(-)	R(10)	S(-)	R(4)	S(-)	R(8)	*	*	*	*	*	*	*	*
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	R(4)	*	*	R(6)	R(9)	R(10)	*	R(9)	*	*	R(9)	*	*	*	R(6)	(3)	R(6)	R(6)	R(11)	R(4)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	*	R(8)	R(0)	R(7)	R(0)	R(6)	R(0)	R(11)	R(10)	R(0)	R(0)	R(0)	*	*	*	*	*	*	*	*

Se refiere a: (mm diámetro), S(sensible), R(resistente), I (intermedia), – (sin crecimiento) y \*PRUEBA NO REALIZADA.

(AM) Ampicilina 10 mcg, (AK) Amikacina 30 mcg, (CB) Carbenicilina 100 mcg, (GE) Gentamicina 10 mcg, (CF) Cefalotina 30 mcg, (CFX) Cefotaxima 30 mcg, (NET) Netilmicina 30 mcg, (CPF) Ciprofloxacina 5 mcg, (NOF) Norfloxacina 10 mcg, (CL) Cloranfenicol 30 mcg, (SXT) Sulfametoxazol Trimetoprim 25 mcg, (NF) Nitrofurantoína 300 mcg, (CRO) Ceftriaxone 30 mcg, (PEF) Pefloxacin 5 mcg, (E) Eritromicina 15 mcg, (VA) Vancomicina 30 mcg, (TE) Tetraciclina 30 mcg, (DC) Dicloxacilina 1 mcg, (CLM) Clindamicina 30 mcg y (PE) Penicilina 10 U.

La especie *Pseudomonas graminis*, *Pseudomonas cedrina* y *Pseudomonas monteilli*, además de ser resistentes a la cefotaxima (CFX), ciprofloxacina (CPF), cloranfenicol (CL) y nitrofurantoína (NF) (Tabla 16), son cromo-reductoras y tolerantes a Cr(VI), a diferencia de lo reportado por Matyar *et al.*, (2010), quienes mencionan que para las especies que aislaron (pertenecientes al género *Pseudomonas*), éstas son solo resistentes a Cr(III), además de mostrar resistencia a otros metales.

La especie *Bacillus altitudinis*, fue sensible a cefotaxima (CFX) (Tabla 17), en contraste con lo reportado por Martínez *et al.*, (2010), quienes mencionan que *Bacillus sp* A3-30 presenta resistencia a cefotaxima (CFX), ceftriaxone (CRO) y cloranfenicol (CL). Estos investigadores, consideraron a dicha cepa como multirresistente para antibióticos y metales, entre los cuales se encuentra Cr(VI). Sin embargo, las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) de ambas especies, difieren ya que *Bacillus altitudinis* presenta una mayor resistencia al metal (Tabla 17) en comparación con *Bacillus sp* A3-30 (Tabla 17). En contraste, *Bacillus sp* C39, C52 y C57 mostraron unas concentraciones mínimas inhibitorias, mayores a la especie utilizada en la presente investigación, de acuerdo con lo reportado por Shammi y Ahmed, en el 2013. Además, estas tres especies presentaron resistencia a ceftriaxone (CRO), mientras que *Bacillus altitudinis* fue sensible ante este antibiótico, pero coinciden en la sensibilidad frente a gentamicina (GE) y ciprofloxacina (CPF). Frente a cloranfenicol (CL), *Bacillus altitudinis* presentó sensibilidad al igual que *Bacillus brevis*, *Bacillus magaterium*, *Bacillus pumilis* y *Bacillus coagulans* (Verma *et al.*, 2009) y superó todas las CMI reportadas para estas especies, en relación al Cr(VI).

La especie *Enterobacter cancerogenus*, presentó 100% de resistencia frente a la ampicilina (AM), amikacina (AK), gentamicina (GE), cloranfenicol (CL) y ciprofloxacina (CPF) (Tabla 17), en contraste con lo reportado por Akhavan *et al.*, (2015), quienes para *Enterobacter sp* encontraron que solo fue resistente frente a ampicilina (AM) y cloranfenicol (CL), siendo sensible a todos los demás antibióticos. La especie utilizada en la presente investigación también superó la CMI, en comparación con la reportada por estos autores.

En algunos trabajos reportados en la literatura, coinciden en cuanto a que la resistencia frente a antibióticos por especies autóctonas, se debe a la presencia de metales en su ambiente, presentando patrones de multirresistencia que pudieran estar determinados en los plásmidos, los cuales ayudarían a promover la resistencia a antibióticos de forma

indirecta (Shammi y Ahmed, 2013; Matyar *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2010). Además, las bacterias pueden presentar mecanismos de resistencia en común, frente a metales, biocidas y antibióticos (Mgbemena *et al.*, 2012; Rajbanshi, 2008).

**Tabla 17. Especies resistentes a antibióticos y su origen.**

<i>Microorganismos</i>	Antibióticos	Origen de la muestra	CMI Cr(VI) mg L <sup>-1</sup>	Referencias
<i>Bacillus sp</i> C39 <i>Bacillus sp</i> C52 <i>Bacillus sp</i> C57	GE (S) CRO (R) CPF (S)	río	500	Shammi y Ahmed, (2013)
<i>Bacillus altitudinis</i>	GE(S) CFX(S) CPF(S) CL(S) CRO(S)	Sedimentos de un río	300	Presente trabajo de investigación Ceron, (2021)
<i>Bacillus pumilis</i> <i>Bacillus brevis</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Bacillus coagulans</i>	CL (S)	Efluente de una planta de tratamiento	200 180 170 140	Verma, Garg y Ramteke, (2009)
<i>Bacillus sp.</i> (A3-30)	CL (R) CFX (R) CRO (R)	río	78	Martínez <i>et al.</i> , (2010)
<i>Enterobacter sp</i>	AM(R) CL(R) AK(S) CPF(S) GE(S)	Agua residual industrial	520 (10 mM)	Akhavan <i>et al.</i> , (2015)
		Agua residual domestica	416 (8 mM)	
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	AM (R) CL(R) AK(R) CPF(R) GE(R)	Sedimentos de un río	300	Presente trabajo de investigación Ceron, (2021)
<i>Pseudomonas cedrina</i>	AK(S) GE(S) CL(R) NF(R)	Agua residual de una cromadora		
<i>Pseudomonas monteilli</i>	AK(S) GE(R) CL(R) NF(R)	Sedimentos de un río		
<i>Pseudomonas graminis</i>	AK(S) GE(S) CL(R) NF(R)	Agua residual de una cromadora		
<i>Pseudomonas sp</i>	AK (R) GE (R) CL (R) NF (R)	bahía	Cr(III) resistentes 100 200 400 800 1600 3200	Matyar <i>et al.</i> , (2010)

Se refiere a: actividad antimicrobiana frente a antibióticos, S(sensible), R(resistente) e I (intermedia).

#### 4.8 Remoción de Cr(VI) con un sistema Bach utilizando *Pseudomonas graminis* soportada en zeolita sódica

##### 4.8.1 Caracterización del material zeolítico

##### 4.8.1.1 Microscopia electrónica de barrido de bajo vacío (MEB) y análisis elemental (EDS)

A continuación, se presenta la caracterización de la zeolita mediante imágenes MEB y EDS. En la figura 10 se muestran las imágenes de a) la roca zeolítica natural y b) acondicionada con sodio. En ambas imágenes se pueden observar estructuras en forma de loseta hexagonal, características de la clinoptilolita, por lo que el acondicionamiento con NaCl no afecta la morfología.

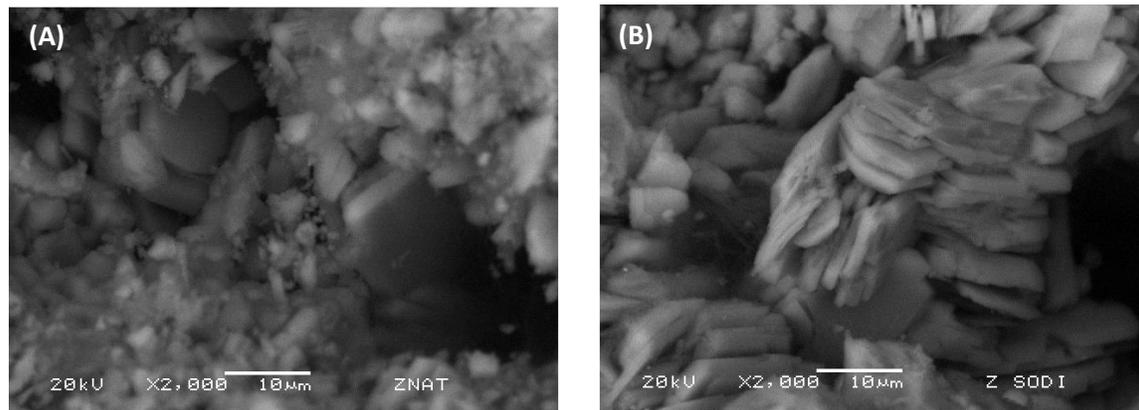
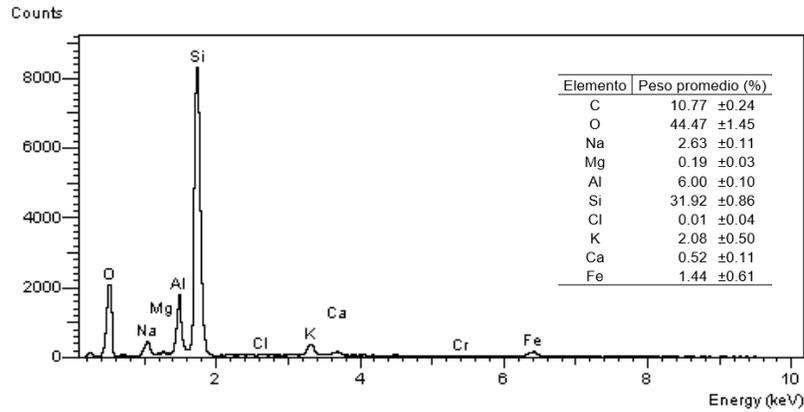


Figura 10. Imágenes (MEB) de ZNAT(A) y ZSODI (B).

El análisis elemental del material zeolítico natural (ZNAT), los elementos de mayor concentración fueron: oxígeno, silicio y carbono. También presenta como elementos minoritarios: aluminio, sodio, potasio, fierro, calcio, manganeso, cloro. La zeolita sódica (ZSODI) mostro la misma composición elemental que la zeolita natural (Figura 11).

(A)



(B)

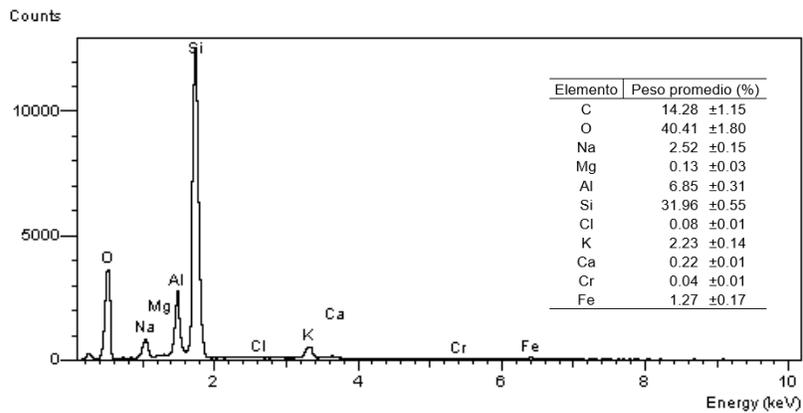


Figura 11. Análisis elemental (EDS) de ZNAT (A) y ZSODI (B).

A continuación se observan las mismas estructuras en forma de loseta (Figura 12) para la zeolita sódica en presencia de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr(VI), Caldo TBS (ZNaCrTB) y con *Pseudomonas graminis* (ZNaTCr2).

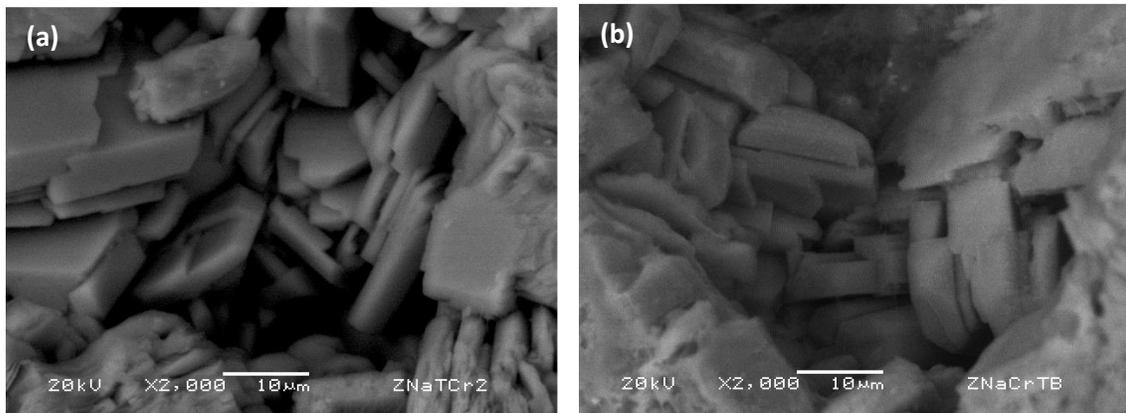
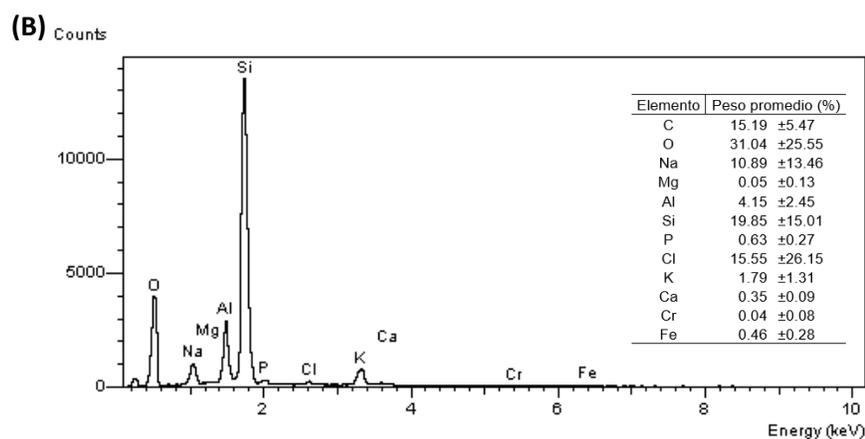
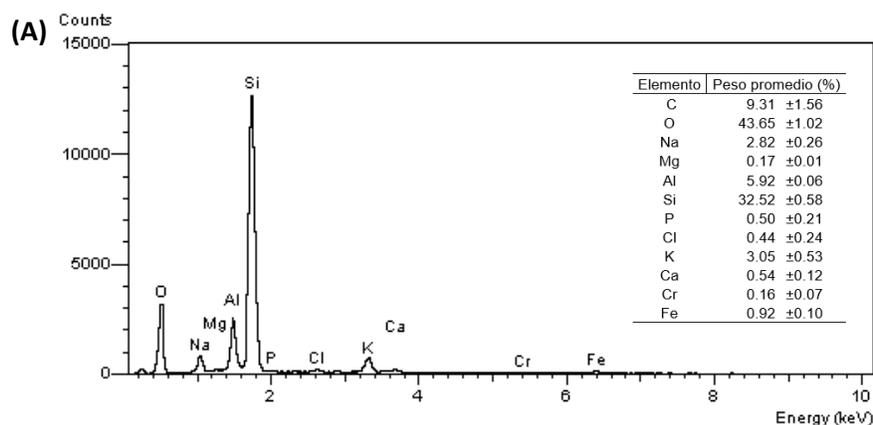


Figura 12. Imágenes (MEB) de ZNaTCr2(A) y ZNaCrTB (B)



**Figura 13. Análisis elemental (EDS) ZNaCr2(A) y ZNaCrTB (B)**

Al observar el análisis elemental de grupo ZNaCr2 (Figura 13) los resultados muestran una mayor cantidad de Cr, en comparación de ZNaCrTB y ZSODI (Figura 11 y 13), también se observó una disminución en Na en ZNaCrTB en contraste con ZNaTCr2.

#### 4.8.2 Formación de una biopelícula en zeolita sódica

Se observó crecimiento de la biopelícula sobre la zeolita sódica (Figura 13) sin embargo, no pudieron contabilizarse el número de colonias u organismos en este material, debido a que estas no se diferenciaron en ninguna de las técnicas utilizadas.

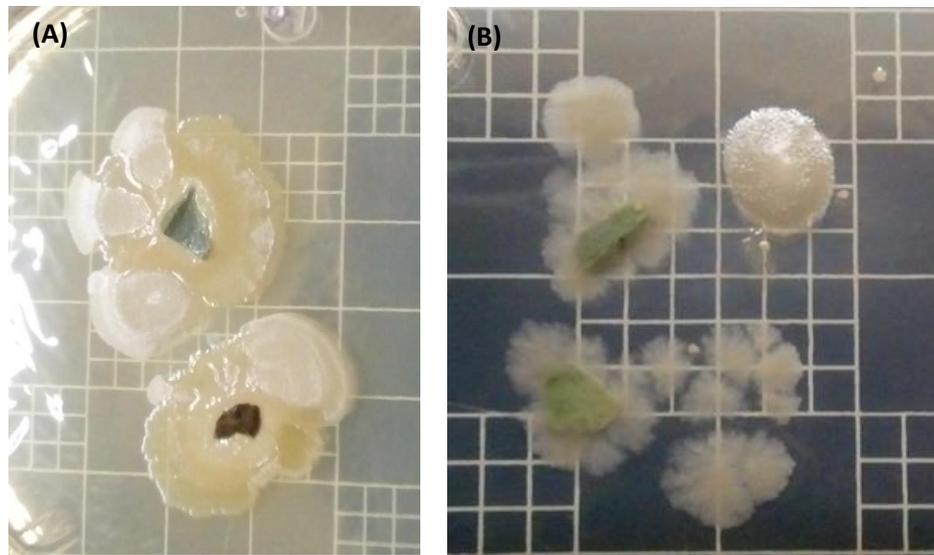


Figura 14. Formación de biopelícula en zeolita sódica. (A) zeolita sódica con biopelícula formado por C1 y C1+C2, (B) zeolita sódica con biopelícula formado por *Pseudomonas graminis* en AST.

#### 4.8.3 Remoción y reducción en bach de Cr(VI) utilizando *Pseudomonas graminis* y zeolita sódica

La remoción de Cr(VI) en el medio se llevó a cabo durante todo el proceso en presencia de *Pseudomonas graminis* y zeolita, a diferencia del control y testigo, en los cuales se puede observar una disminución del metal en el medio pero muy por debajo del grupo experimental.

**Tabla 18. Concentración de Cr(VI) en mg L<sup>-1</sup> promedio.**

Horas	D-1	D-2 (CONTROL)	D-3 (TESTIGO)
0	100.00 ±0.09	99.99 ±0.02	99.94 ±0.03
24	95.81 ±0.03	99.75 ±0.02	99.77 ±0.01
48	85.23 ±0.03	99.58 ±0.01	99.63 ±0.02
<b>72</b>	<b>60.85 ±0.15</b>	99.47 ±0.02	99.22 ±0.01
<b>96</b>	<b>14.14 ±0.03</b>	99.24 ±0.01	99.12 ±0.02
120	10.54 ±0.04	99.14 ±0.02	99.08 ±0.01
144	5.22 ±0.03	99.06 ±0.01	99.08 ±0.02
168	5.15 ±0.04	99.03 ±0.01	99.07 ±0.01
192	5.04 ±0.03	99.02 ±0.01	99.07 ±0.02
D-1 ( <i>Pseudomonas graminis</i> + Cr(VI) 100 mg L <sup>-1</sup> + TBS+ 1 gr de zeolita sódica), D-2 ( Cr <sup>6+</sup> 100 mg L <sup>-1</sup> + TBS+ 1 gr de zeolita sódica), D-3 (Cr <sup>6+</sup> 100 mg L <sup>-1</sup> + TBS)			

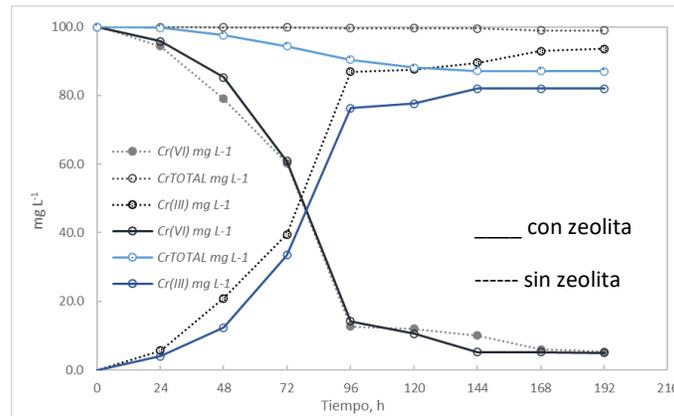
Al utilizar zeolita sódica en combinación con *Pseudomonas graminis* (D-1) se observó la mayor remoción del Cr(VI) en el medio en el lapso de 72-96 horas del 46.71% , al finalizar el proceso (192 horas) se removió el 94.96% (grupo experimental), 0.97% (control) y 0.87% (testigo) del metal en el medio (Tabla 18).

**Tabla 19. Concentración de Cr<sub>TOTAL</sub> en mg L<sup>-1</sup> promedio.**

Horas	D-1	D-2 (CONTROL)	D-3 (TESTIGO)
0	99.99 ±0.02	99.97 ±0.01	99.97 ±0.01
24	99.77 ±0.01	99.73 ±0.02	99.76 ±0.01
48	97.54 ±0.01	99.60 ±0.02	99.65 ±0.02
<b>72</b>	<b>94.34 ±0.01</b>	99.46 ±0.01	99.43 ±0.01
<b>96</b>	<b>90.45 ±0.01</b>	99.26 ±0.02	99.22 ±0.01
120	88.17 ±0.01	99.15 ±0.01	99.18 ±0.02
144	87.16 ±0.04	99.07 ±0.01	99.07 ±0.01
168	87.12 ±0.01	99.05 ±0.02	99.06 ±0.01
192	87.04 ±0.02	99.04 0.01	99.03 ±0.03
D-1 ( <i>Pseudomonas graminis</i> + Cr(VI) 100 mg L <sup>-1</sup> + TBS+ 1 gr de zeolita sódica), D-2 ( Cr(VI) 100 mg L <sup>-1</sup> + TBS+ 1 gr de zeolita sódica), D-3 (Cr(VI) 100 mg L <sup>-1</sup> + TBS)			

Se observo una disminución en la concentración del Cr<sub>TOTAL</sub> en el medio de D-1 12.95 mg L<sup>-1</sup>, 0.93 mg L<sup>-1</sup> para el D-2 y 0.92 mg L<sup>-1</sup> para el D-3 al finalizar el experimento (192 horas).

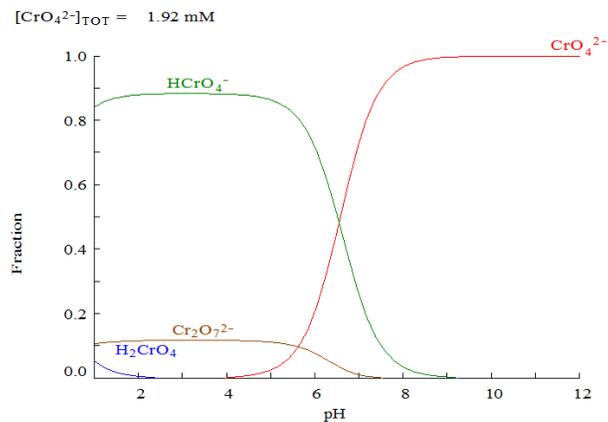
En el lapso de 72-96 horas se observó la mayor falta de  $Cr_{TOTAL}$  de  $3.89 \text{ mg L}^{-1}$  en D-1 (Tabla 19).



**Figura 15. Reducción de Cr(VI) en presencia y ausencia de zeolita del grupo experimental D-1.**

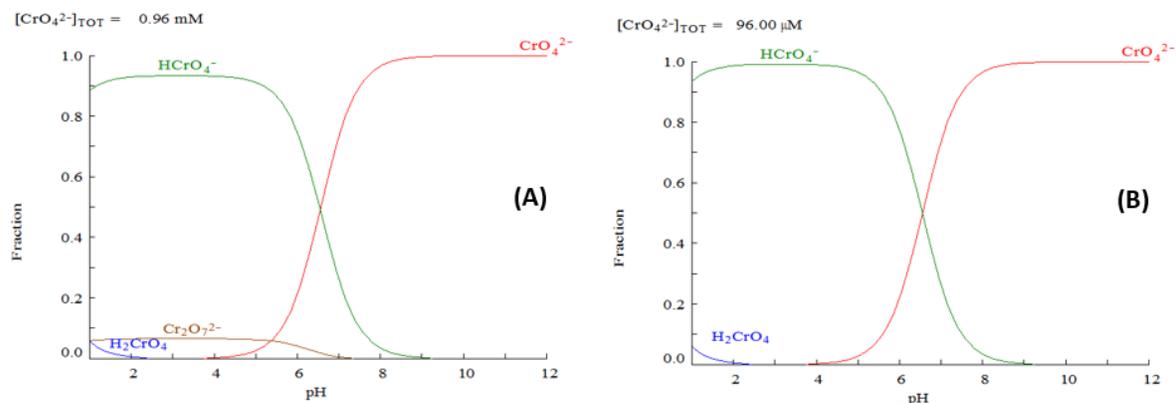
Al comparar los resultados en ausencia de zeolita se observa una menor reducción de las 0 a las 96 horas del proceso, sin embargo a partir de las 96-192 horas la reducción aumento en comparación cuando la zeolita se encontraba presente (Figura 15).

Ya que esta especie se probó previamente sin la presencia de zeolita bajo las mismas condiciones, en donde se observó que la biomasa solo acumulo un pequeño porcentaje de Cr(III) (ANEXO G), los resultados podrían sugerir que D1 formado por *Pseudomonas graminis* en presencia de 1 gr de zeolita sódica redujo el Cr(VI) a Cr(III) y que el cromo total faltante es Cr(III) que fue adsorbido por la zeolita sódica.



**Figura 16. Diagrama de distribución de especies de cromo a  $100 \text{ mg L}^{-1}$  ( $1.92 \text{ mM}$ ).**

Las dos especies predominantes de Cr(VI) entre 7-8 de pH son  $\text{CrO}_4^{2-}$  y  $\text{HCrO}_4^-$  como puede observarse en la Figura 16 y 17.



**Figura 17. Diagrama de distribución de especies de cromo (A)  $50 \text{ mg L}^{-1}$  ( $0.96 \text{ mM}$ ) y (B)  $5 \text{ mg L}^{-1}$  ( $96.00 \text{ }\mu\text{M}$ ).**

Diferentes trabajos de investigación muestran, que la modificación de la superficie zeolítica incrementa la eficiencia de la remoción de Cr (Batista *et al.*, 2000), ya que la zeolita natural presenta una baja remoción de especies químicas aniónicas, que dependiendo del estado de oxidación del Cr, puede formar (Barros *et al.*, 2001). El material zeolítico fue elegido para el presente trabajo de investigación, por su capacidad de inmovilizar microorganismos, tal como lo menciona Milán *et al.*, (2001). Los resultados mostraron la formación de una biopelícula sobre la superficie zeolítica (Figura 20). Sin embargo, los métodos convencionales para el recuento bacteriano, presentaron ciertas limitaciones, tales como: el análisis de la estructura de la película y la disminución del número de células viables. Además, no todos los microorganismos de la biopelícula son cultivables (Linsay y Von Holy, 2008), debido a las complejidades que llegan a presentar estas estructuras.

La especie *Pseudomonas graminis* se probó previamente, sin la presencia de zeolita bajo las mismas condiciones, en donde se observó que la biomasa solo acumuló un pequeño porcentaje de Cr(III) (Tabla 16). Los resultados sugieren que el sistema D-1 formado por *Pseudomonas graminis* en presencia de 1 g de zeolita sódica, redujo el Cr(VI) a Cr(III) y que el cromo faltante es Cr(III), que fue sorbido por la zeolita sódica. Algunas investigaciones sugieren que la biopelícula, juega un importante rol en la biosorción del cromo, mencionando que en primera instancia, la biopelícula reduce el Cr(VI) a Cr(III) y después este último se fija en la estructura zeolítica, debido a que el Cr(III) en fase acuosa

y en contacto con un grupo donador-electrón del biomaterial forma complejos o es retenido en la matriz zeolítica por un proceso de intercambio iónico (Quintelas *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2005).

Al observar el análisis elemental del material ZNaTCr2 (Figura 13), los resultados muestran una mayor cantidad de Cr, en comparación con el encontrado para ZNaCrTB y ZSODI (Figura 11 y 13). Lo anterior puede explicarse, considerando que una cantidad de Cr(III), producto de la reducción del Cr(VI) por el biofilm, se encuentra en el material zeolítico derivado de un intercambio iónico entre el Cr<sup>3+</sup> y el Na<sup>+</sup> de la zeolita en su forma sódica, o debido a una biosorción derivada del film de *Pseudomonas graminis* soportado en el material zeolítico. Se encuentra reportado en la literatura (Figueiredo *et al.*, 2006; Quintelas y Tavares, 2001), que el papel principal del biofilm es la reducción de Cr(VI) a un catión de menor tamaño como lo es el Cr (III). La reducción del Cr(VI) como Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub><sup>2-</sup>, solo puede ocurrir en la superficie exterior de la zeolita, ya que no puede entrar a las cavidades del material zeolítico, según lo menciona Figueiredo *et al.*, (2010). Debido a que esta especie aniónica de Cr es la de menor presencia, cuando la concentración inicial es 100 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) en el intervalo de pH entre 7 y 8, como lo muestra la Figura 16, se sugiere que el Cr(VI) no pudo ser adsorbido por la zeolita.

Por otra parte, Rosales *et al.*, (2012) mencionan que la presencia de Cr(VI) en un medio acuoso, como un anión de gran radio implica fuerzas de repulsión y un tamaño que dificulta la adsorción dentro de la zeolita, lo que está relacionado con su forma iónica, a diferencia del Cr(III) el cual es un ion que se intercambia fácilmente con los iones nativos de dicho material, por formar especie catiónicas en solución.

El sistema D-1, favorece la remoción tanto del Cr(VI) como del Cr(III) al igual que lo sugerido por Rosales *et al.*, (2012), quienes al utilizar *Arthrobacter viscosus* para formar una biopelícula sobre 1 g de zeolita NaY para la remoción de 100 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) a 28°C en 150 ml de solución en 8 días, encontraron una remoción del 70% del metal hexavalente del medio. Además estos autores sugieren, que los sistemas conformados por zeolita-biomasa son viables para remover niveles altos (mayores de 50%) de cromo. Además, probaron su sistema para cromo y un colorante (Azure B), encontrando un 99% de remoción.

Al acondicionar el material zeolítico con una solución de NaCl, en el análisis elemental se observa, que la cantidad de sodio disminuye al estar presente la especie *Pseudomonas graminis* y después del proceso en lote (“batch”), en donde se redujo el Cr(VI) a Cr(III), en comparación con el material en donde la bacteria no se encontraba presente. Por lo que, con base en el análisis elemental, se sugiere que el Cr(III) quedó retenido en el material zeolítico, debido a un proceso de intercambio iónico, antes mencionado. Estos resultados coinciden con los reportados por Figueredo *et al.*, (2010), quienes utilizaron una zeolita acondicionada con una solución de NaOH. Los análisis elementales que realizaron, mostraron la retención del cromo en la zeolita acondicionada, señalando que el intercambio de iones entre la zeolita y la especie metálica de cromo, estuvo fuertemente afectado por el tratamiento alcalino, al que fue expuesto el material zeolítico.

#### 4.9 Remoción y reducción en columna de Cr(VI) utilizando *Pseudomonas graminis* y zeolita sódica

Los resultados mostraron disminución en la concentración inicial de 100 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) en el medio contenido en la columna desde las 24 primeras horas de experimentación cuando la cepa *Pseudomonas graminis* (F-1) se encontraba presente, en contraste con la columna control (F-2) en la cual la concentración disminuyó pero en menor cantidad (Tabla 19).

**Tabla 20. Lote 1 de columna de remoción con zeolita sódica.**

Tiempo (horas)	F-1				F-2			
	Cr(VI)		Cr <sub>TOTAL</sub>		Cr(VI)		Cr <sub>TOTAL</sub>	
0	99.97	±0.02	99.99	±0.02	99.99	±0.03	99.97	±0.01
24	72.70	±0.02	82.69	±0.02	99.88	±0.02	99.90	±0.02
48	60.17	±0.01	81.21	±0.01	99.75	±0.03	99.71	±0.01
72	60.03	±0.02	77.99	±0.02	99.73	±0.01	99.70	±0.02
F-1 columna con: zeolita sódica + <i>Pseudomonas graminis</i> (biopelícula) + 100 mg L <sup>-1</sup> Cr(VI) + TBS								
F-2 columna (CONTROL) con: zeolita sódica + 100 mg L <sup>-1</sup> Cr(VI) + TBS								

Al igual que en el primer lote los resultados mostraron la disminución en la concentración de Cr(VI) en el medio, en este segundo lote (Tabla 20) se observó que en presencia de *Pseudomonas graminis* (F-3) a diferencia de cuando no se encontraba presente en la columna (D4) las concentraciones del metal eran menores.

**Tabla 21. Lote 2 de columna de remoción con zeolita sódica.**

	F-3				F-4			
Tiempo (horas)	Cr(VI)		Cr <sub>TOTAL</sub>		Cr(VI)		Cr <sub>TOTAL</sub>	
0	100.04	±0.03	99.99	±0.04	99.98	±0.02	99.97	±0.01
24	74.21	±0.03	88.74	±0.02	99.87	±0.02	99.90	±0.01
48	65.33	±0.04	80.54	±0.02	99.83	±0.01	99.83	±0.01
72	60.04	±0.02	80.16	±0.01	99.82	±0.03	99.80	±0.02
F-3 columna con: zeolita sódica + <i>Pseudomonas graminis</i> (biopelícula) + 100 mg L <sup>-1</sup> Cr(VI) + TBS								
F-4 columna (CONTROL) con: zeolita sódica + 100 mg L <sup>-1</sup> Cr(VI) + TBS								

Se determino la remoción de 100 mg L de Cr(VI) en el medio nutritivo TBS en 72 horas de proceso, este solo pudo ser analizado durante este periodo de tiempo debido a que después de este se detectó contaminación bacteriana en la columna control en ambos lotes.

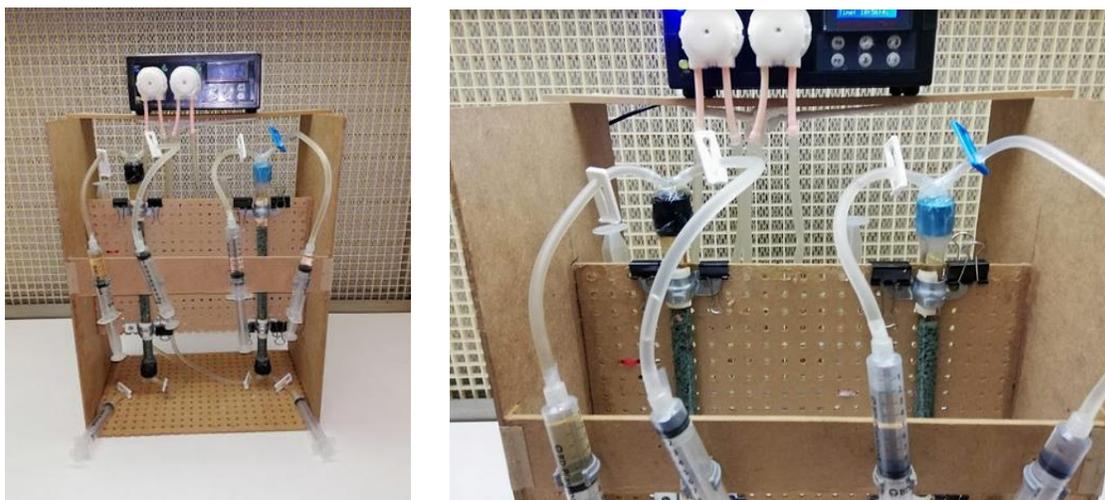
**Tabla 22. Porcentaje de remoción.**

Lote	Grupo experimental	Tiempo (horas)	Cr(VI) (%)	pH
1	F-1	24	27.28	6.81
		48	12.53	6.57
		72	0.15	6.53
2	F-3	24	25.83	6.83
		48	8.88	6.61
		72	5.28	6.58

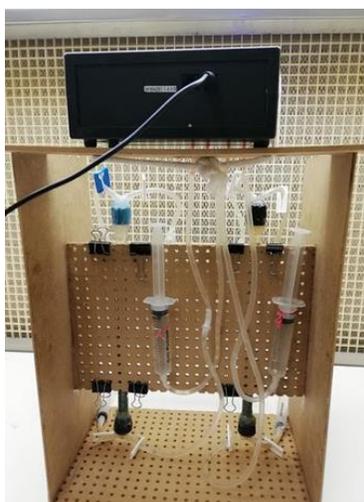
Después de las primeras 24 horas de experimentación se registraron porcentajes de remoción mayores al 20% para ambos lotes, en las dos siguientes lecturas de remoción los valores disminuyeron considerablemente para ambos grupos experimentales (Tabla 22).

Se registraron variaciones en el valor del pH en el medio, en las primeras 24 horas es notable el mayor cambio para posteriormente ser más estable. Los grupos experimentales control no mostraron estos cambios para este parámetro ya que se inició en: pH 8.02±0.02 (F-2), 7.98 ±0.01 (F-4), finalizó en 7.91±0.03 (F-2) y 7.95±0.01 (F-4) al ser comparados con los grupos experimentales F-1 y F-3.

El reactor que constaba de dos columnas pudo ser operado durante 72 horas ya que después de este tiempo de detecto contaminación en la columna control. La Figuras 18 y 19 muestran al reactor en vista frontal y trasera cuando el material zeolítico era irrigado con TBS.



**Figura 18. Vista frontal del reactor en columna.**



**Figura 19. Vista trasera del reactor en columna.**

Los porcentajes de remoción obtenidos en la presente investigación, superaron a los reportados por Lameiras *et al.*, (2008), quienes encontraron una remoción del 18% ( $12.6 \text{ mg L}^{-1}$ ), a partir de una concentración inicial de  $70 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr(VI) en el medio, al utilizar

una biopelícula de *A. viscous* soportada en zeolita natural y empacada en una columna, después de 27 h de experimentación.

Los resultados obtenidos en la presente investigación, muestran una mayor remoción del metal en el medio, en un menor tiempo (24 h). Sin embargo, la zeolita natural utilizada se modificó previamente debido a que, diferentes investigaciones señalan que al modificar la superficie del material zeolítico, se incrementa la eficiencia de los sistemas de remoción para especies no catiónicas (Batista *et al.*, 2000). Lo anterior coincide con los resultados mostrados en la presente investigación, al ser comparados con los obtenidos por Lameiras *et al.*, (2008).

Los resultados de  $Cr_{TOTAL}$ , en donde se observa una diferencia entre la concentración inicial y final de Cr (a la cual se le denominó  $Cr_{FALTANTE}$ ), podrían sugerir una retención de Cr(III) en el material zeolítico y/o en la biomasa. Algunos autores sugieren, que el contacto entre la zeolita y la biopelícula favorece la retención de Cr(III) dentro de ésta (Pazos *et al.*, 2010). Sin embargo, la concentración de Cr retenido en la biopelícula y/o zeolita no fue medido en la presente investigación, a diferencia de lo realizado por Pazos *et al.*, (2010), quienes concluyeron que el Cr removido de la fase líquida, se incorporó en la zeolita 13X que utilizaron.

El utilizar zeolita natural, que es un material de bajo costo (Zhang *et al.*, 2015; Ebrahimi *et al.*, 2014; Lameiras *et al.*, 2008), en combinación con *Pseudomonas graminis*, especie bacteriana autóctona adaptada a un ambiente natural (Tavares y Neves, 2008) cromoreductora, cromo tolerante y multirresistente, representa una estrategia atractiva de bajo costo (Baldiris *et al.*, 2018), para el tratamiento de efluentes con presencia del Cr(VI) y antibióticos. Además, la inmovilización bacteriana en una zeolita natural, presenta una mayor eficiencia para la remoción de iones (Djukic-Vukovic *et al.*, 2016).

## 9. CONCLUSIONES

La cromo resistencia de las bacterias sigue el orden: *Bacillus altitudinis*, *Enterobacter cancerogenus*, *Pseudomonas cedrina*, *Pseudomonas monteilli*, *Pseudomonas graminis*, *Brevundimonas diminuta*, *Microbacterium phyllosphaerae*, *Brevundimonas nasdae* y la cromo-reducción: *Pseudomonas graminis*, *Pseudomonas cedrina*, *Pseudomonas monteilli*, *Brevundimonas diminuta*, *Enterobacter cancerogenus*, *Brevundimonas nasdae*, *Microbacterium phyllosphaerae*, *Bacillus altitudinis*, bajo las condiciones experimentales de la presente investigación.

*Pseudomonas graminis* mostró los mejores resultados en cuanto a mayor crecimiento en presencia de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr(VI) en el medio y la mayor reducción de Cr(VI) a Cr(III). Dicha especie es la que menor cantidad de Cr(III) presenta.

Siete de las ocho especies bacterianas son multirresistentes a diferentes antibióticos. *Enterobacter cancerogenus* presenta la mayor multirresistencia en comparación con las otras siete especies. La especie *Bacillus altitudinis* es la única especie que no presenta resistencia a ninguno de los antibióticos, considerados en esta investigación.

*Pseudomonas graminis* forma una biopelícula sobre el material zeolítico y tanto la remoción como la reducción del Cr en un sistema lote ("batch") es muy similar en comparación con la ausencia de la zeolita natural. El material zeolítico acondicionado interviene en el proceso de remoción del Cr del medio, mediante un mecanismo de intercambio iónico.

La biopelícula de *Pseudomonas graminis* soportada en zeolita sódica y empacada en una columna es viable para la remoción de Cr(VI) en solución acuosa, bajo las condiciones establecidas en esta investigación.

## 10. REFERENCIAS

- Akhavan Sepahy, A., Sharifian, S., Zolfaghari, M. R., Khalily Dermany, M., y Rashedi, H. (2015). Study on Heavy Metal Resistant Fecal Coliforms Isolated From Industrial, Urban Wastewater in Arak, Iran. *International Journal of Environmental Research*, 9(4), 1217-1224.
- Almaguer-Busso, G., Velasco-Martínez, G., Carreño-Aguilera, G., Gutiérrez-Granados, S., Torres-Reyes, E., y Alatorre-Ordaz, A. (2009). A comparative study of global hexavalent chromium removal by chemical and electrochemical processes. *Electrochemistry communications*, 11(6), 1097-1100.
- Almazán S.P. (2011). *Electro-reducción de Cr(VI) proveniente de la industria de la galvanoplastia, empleando electrodos de diamante dopados con boro (ddb)*. (Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de México).
- Almeida, C., Azevedo, N. F., Santos, S., Keevil, C. W., y Vieira, M. J. (2011). Discriminating multi-species populations in biofilms with peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization (PNA FISH). *PLoS One*, 6(3), e14786.
- Andrade Molinar C. (2007) Caracterización de biopelículas formadas sobre membranas utilizadas para el tratamiento de aguas residuales, *Tesis de titulación de maestría en ciencias en biotecnología Universidad autónoma de Chihuahua*.
- Avendaño Flores, Y. S. (2012) *Biorreducción de cr (vi) a cr (iii) por bacterias resistentes a cromo aisladas del río Lerma* (Tesis de Maestría, Universidad Autónoma del Estado de México).
- Baldiris, R., Acosta-Tapia, N., Montes, A., Hernández, J., y Vivas-Reyes, R. (2018). Reduction of hexavalent chromium and detection of chromate reductase (ChrR) in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Molecules*, 23(2), 406.
- Batista, M., Laza, M., Fuentes, G. R., y Ruiz, J. L. (2000). Preparation and characterisation of a natural zeolites modified with the cationic surfactant BR-HDTMA, for Cr (VI) removal. *Jornadas Iberoamericanas de Catálisis Ambiental*, 294.
- Barceló, D. y López, M. J. (2007). Contaminación y calidad química del agua: el problema de los contaminantes emergentes. En: Panel Científico- Técnico de seguimiento de la política de aguas. Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales-CSIC. Barcelona.
- Barros, M. A., Machado, N., Sousa-Aguilar, E., Alves, F. y Pedroza. (2001) Removal of Cr(III) from industrial and synthetic wastewater by naturally occurring clinoptilolite. *Catalizadores y adsorbentes para la protección ambiental en la región Iberoamericana*, Ed. J. Blanco, P. Avila, CYTED, Madrid, pp 219-224.
- Bäumlisberger, M., Youssar, L., Schilhabel, M. B., y Jonas, D. (2015). Influence of a non-hospital medical care facility on antimicrobial resistance in wastewater. *PLoS One*, 10(3), e0122635.

Behrendt, U., Ulrich, A., y Schumann, P. (2001). Description of *Microbacterium foliorum* sp. nov. and *Microbacterium phyllosphaerae* sp. nov., isolated from the phyllosphere of grasses and the surface litter after mulching the sward, and reclassification of *Aureobacterium resistens* (Funke et al. 1998) as *Microbacterium resistens* comb. nov.. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 51(4), 1267-1276.

Bordi, C., y Bentzmann, S. (2011). Hacking into bacterial biofilms: a new therapeutic challenge. *Annals of intensive care*, 1(1), 1-8.

Bouki, C., Venieri, D., y Diamadopoulos, E. (2013). Detection and fate of antibiotic resistant bacteria in wastewater treatment plants: a review. *Ecotoxicology and environmental safety*, 91, 1-9.

Bowen, W. H., y Koo, H. (2011). Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries research*, 45(1), 69-86.

Burguet, N., y Sierra, N. (2012). Evaluación de una estrategia de conservación para *Brevundimonas diminuta*. *Vaccimonitor*, 21(1), 10-13.

Ceron Rios, C. A. (2015). *Remoción de Cd y Pb y reducción de Cr (VI) en agua sintética y residual proveniente de una industria de galvanoplastia utilizando biomasa bacteriana* (Tesis de Maestría).

Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzmán, J. C., y Moreno-Sánchez, R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS microbiology reviews*, 25(3), 335-347.

Chandra, A. K., Chatterjee, A., Ghosh, R., y Sarkar, M. (2007). Effect of curcumin on chromium-induced oxidative damage in male reproductive system. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 24(2), 160-166.

Cheng, G., y Li, X. (2009). Bioreduction of chromium (VI) by *Bacillus* sp. isolated from soils of iron mineral area. *European Journal of Soil Biology*, 45(5-6), 483-487.

Contreras, E. M., Orozco, A. F., y Zaritzky, N. E. (2011). Biological Cr (VI) removal coupled with biomass growth, biomass decay, and multiple substrate limitation. *water research*, 45(10), 3034-3046.

Crovadore, J., Calmin, G., Chablais, R., Cochard, B., Schulz, T., y Lefort, F. (2016). Whole-genome sequence of *Pseudomonas graminis* strain UASWS1507, a potential biological control agent and biofertilizer isolated in Switzerland. *Genome announcements*, 4(5), e01096-16.

Curi, A., Granda, W. J., Lima, H. M., y Sousa, W. T. (2006). Las Zeolitas y su Aplicación en la descontaminación de efluentes Mineros. *Información tecnológica*, 17(6), 111-118.

Das, S., Mishra, J., Das, S. K., Pandey, S., Rao, D. S., Chakraborty, A., y Thatoi, H. (2014). Investigation on mechanism of Cr (VI) reduction and removal by *Bacillus amyloliquefaciens*,

a novel chromate tolerant bacterium isolated from chromite mine soil. *Chemosphere*, 96, 112-121.

Daughton, C. G. (2004). Non-regulated water contaminants: emerging research. *Environmental impact assessment review*, 24(7-8), 711-732.

Dhal, B., Thatoi, H., Das, N., y Pandey, B. D. (2010). Reduction of hexavalent chromium by *Bacillus* sp. isolated from chromite mine soils and characterization of reduced product. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 85(11), 1471-1479.

Djukić-Vuković, A. P., Jokić, B. M., Kocić-Tanackov, S. D., Pejin, J. D., y Mojović, L. V. (2016). *Mg-modified zeolite as a carrier for Lactobacillus rhamnosus in L(+) lactic acid production on distillery wastewater*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 59, 262–266.

Dönmez, G., y Koçberber, N. (2005). Isolation of hexavalent chromium resistant bacteria from industrial saline effluents and their ability of bioaccumulation. *Enzyme and microbial technology*, 36(5-6), 700-705.

Du, G., Li, Z., Liao, L., Hanson, R., Leick, S., Hoepfner, N., y Jiang, W. T. (2012). Cr (VI) retention and transport through Fe (III)-coated natural zeolite. *Journal of hazardous materials*, 221, 118-123.

Ebrahimi, R., Zandi, S., y Gharibi, F. (2014). Removal of nickel and total chromium using *Escherichia coli* biofilm supported on clinoptilolite. *Journal of Advances in Environmental Health Research*, 2(2), 126-133.

Emmanuel, E., Perrodin, Y., Keck, G., Blanchard, J. M., y Vermande, P. (2005). Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network. *Journal of hazardous materials*, 117(1), 1-11.

Emmanuel, E., Pierre, M. G., y Perrodin, Y. (2009). Groundwater contamination by microbiological and chemical substances released from hospital wastewater: Health risk assessment for drinking water consumers. *Environment international*, 35(4), 718-726.

Erdoğan, B. C., y Ülkü, S. (2012). Cr (VI) sorption by using clinoptilolite and bacteria loaded clinoptilolite rich mineral. *Microporous and Mesoporous Materials*, 152, 253-261.

Ezaka, E., y Anyanwu, C. U. (2011). Chromium (VI) tolerance of bacterial strains isolated from sewage oxidation ditch. *International Journal of Environmental Sciences*, 1(7), 1725-1734.

Farag, S., y Zaki, S. (2010). Identification of bacterial strains from tannery effluent and reduction of hexavalent chromium. *Journal of Environmental Biology*, 31(5), 877.

Fekadu, S., Merid, Y., Beyene, H., Teshome, W., y Gebre-Selassie, S. (2015). Assessment of antibiotic-and disinfectant-resistant bacteria in hospital wastewater, south Ethiopia: a cross-sectional study. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 9(02), 149-156.

- Fent, K., Weston, A. A., y Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic toxicology*, 76(2), 122-159.
- Fernández, A. M. L., Rendueles, M., y Diaz, M. (2013). Sulfamethoxazole removal from synthetic solutions by ion exchange using a strong anionic resin in fixed bed. *Solvent Extraction and Ion Exchange*, 31(7), 763-781.
- Figueiredo, H., Neves, I. C., Quintelas, C., Tavares, T., Taralunga, M., Mijoin, J., y Magnoux, P. (2006). Oxidation catalysts prepared from biosorbents supported on zeolites. *Applied Catalysis B: Environmental*, 66(3-4), 274-280.
- Figueiredo, H., Silva, B. A. N. A., Quintelas, C., Pereira, M. F., Neves, I. C., y Tavares, M. T. (2010). Biosorption of hexavalent chromium based on modified Y zeolites obtained by alkali-treatment.
- Figueiredo, H., y Quintelas, C. (2014). Tailored zeolites for the removal of metal oxyanions: Overcoming intrinsic limitations of zeolites. *Journal of hazardous materials*, 274, 287-299.
- Gerzabek, M. H., Barceló, D., Bellin, A., Rijnaarts, H. H. M., Slob, A., Darmendrail, D., ... y Barth, J. A. C. (2007). The integrated project AquaTerra of the EU sixth framework lays foundations for better understanding of river–sediment–soil–groundwater systems. *Journal of environmental management*, 84(2), 237-243.
- Gjermansen, M., Nilsson, M., Yang, L., y Tolker-Nielsen, T. (2010). Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms: genetic elements and molecular mechanisms. *Molecular microbiology*, 75(4), 815-826.
- Gjermansen, M., Ragas, P., Sternberg, C., Molin, S., y Tolker-Nielsen, T. (2005). Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Environmental microbiology*, 7(6), 894-904.
- Gutiérrez, A. M., Cabriales, J. J. P., y Vega, M. M. (2010). Isolation and characterization of hexavalent chromium-reducing rhizospheric bacteria from a wetland. *International journal of phytoremediation*, 12(4), 317-334.
- He, M., Li, X., Guo, L., Miller, S. J., Rensing, C., y Wang, G. (2010). Characterization and genomic analysis of chromate resistant and reducing *Bacillus cereus* strain SJ1. *BMC microbiology*, 10(1), 221.
- Højby, N., Ciofu, O., Johansen, H. K., Song, Z. J., Moser, C., Jensen, P. Ø., ... y Bjarnsholt, T. (2011). The clinical impact of bacterial biofilms. *International journal of oral science*, 3(2), 55.
- Ilankoon, N. (2014). Use of iron oxide magnetic nanosorbents for Cr (VI) removal from aqueous solutions: A review. *Journal of Engineering Research and Applications*, 4(10), 55-63.
- Islas, E. M. y Bojorquez, A. R. (2011). Reducing bacteria and Cr<sup>+6</sup> biotechnological potential. *Revista internacional de contaminación ambiental*. 27(3): 231-239.

Islas-Espinoza, M., Vázquez Chagoyán, J. C., Bojórquez Aguilar, R. y Linares Hernández, I. (2013). Aislamiento de bacterias resistentes y transformadoras de Cr (VI) y Metil Paratión.

Jha, C. K., Patel, B., y Saraf, M. (2012). Stimulation of the growth of *Jatropha curcas* by the plant growth promoting bacterium *Enterobacter cancerogenus* MSA2. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(3), 891-899.

Jechalke, S., Broszat, M., Lang, F., Siebe, C., Smalla, K., y Grohmann, E. (2015). Effects of 100 years wastewater irrigation on resistance genes, class 1 integrons and IncP-1 plasmids in Mexican soil. *Frontiers in microbiology*, 6, 163.

Kathiravan, M. N., Karthick, R., Muthu, N., Muthukumar, K., y Velan, M. (2010). Sonoassisted microbial reduction of chromium. *Applied biochemistry and biotechnology*, 160(7), 2000-2013.

Kılıç, N. K., Nielsen, J. L., Yüce, M., y Dönmez, G. (2007). Characterization of a simple bacterial consortium for effective treatment of wastewaters with reactive dyes and Cr (VI). *Chemosphere*, 67(4), 826-831.

Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B., & Buxton, H. T. (2002). Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999– 2000: A national reconnaissance. *Environmental science & technology*, 36(6), 1202-1211.

Kümmerer, K. (2001). Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources—a review. *Chemosphere*, 45(6-7), 957-969.

Lameiras, S., Quintelas, C., y Tavares, T. (2008). Biosorption of Cr (VI) using a bacterial biofilm supported on granular activated carbon and on zeolite. *Bioresource technology*, 99(4), 801-806.

Larcher, S., y Yargeau, V. (2011). Biodegradation of sulfamethoxazole by individual and mixed bacteria. *Applied microbiology and biotechnology*, 91(1), 211-218.

Lee, M. R., Huang, Y. T., Liao, C. H., Chuang, T. Y., Lin, C. K., Lee, S. W., ... y Hsueh, P. R. (2011). Bacteremia caused by *Brevundimonas* species at a tertiary care hospital in Taiwan, 2000–2010. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 30(10), 1185-1191.

Lindsay, D. y Von Holy, A. (2008). Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *Journal of Hospital Infection*, 64(4), 313-325.

Liu, Y. G., Xu, W. H., Zeng, G. M., Li, X., y Gao, H. (2006). Cr (VI) reduction by *Bacillus* sp. isolated from chromium landfill. *Process Biochemistry*, 41(9), 1981-1986.

Lv, G., Li, Z., Jiang, W. T., Ackley, C., Fenske, N., y Demarco, N. (2014). Removal of Cr (VI) from water using Fe (II)-modified natural zeolite. *Chemical Engineering Research and Design*, 92(2), 384-390.

Madigan, M. T., Martinko, J. M., y Parker, J. (2004). Brock. Biología de los microorganismos.

Marrero-Coto, J., Díaz-Valdivia, A., y Coto-Pérez, O. (2010). Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 41(1), 67-78.

Martínez, A., Cruz, M., Veranes, O., Carballo, M. E., Salgado, I., Olivares, S., ... y Rodríguez, D. (2010). Resistance to antibiotics and heavy metals in bacteria isolated from the Almendares River. *Revista CENIC. Biological Sciences*, 45(2), 418-424.

Martins, V. V., Zanetti, M. O. B., Pitondo-Silva, A., y Stehling, E. G. (2014). Aquatic environments polluted with antibiotics and heavy metals: a human health hazard. *Environmental Science and Pollution Research*, 21(9), 5873-5878.

Mangaiyarkarasi, M. M., Vincent, S., Janarthanan, S., Rao, T. S., y Tata, B. V. R. (2011). Bioreduction of Cr (VI) by alkaliphilic *Bacillus subtilis* and interaction of the membrane groups. *Saudi journal of biological sciences*, 18(2), 157-167.

Masood, F., y Malik, A. (2011). Hexavalent chromium reduction by *Bacillus* sp. strain FM1 isolated from heavy-metal contaminated soil. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 86(1), 114-119.

Matyar, F., Akkan, T., Uçak, Y., y Eraslan, B. (2010). *Aeromonas* and *Pseudomonas*: antibiotic and heavy metal resistance species from Iskenderun Bay, Turkey (northeast Mediterranean Sea). *Environmental monitoring and assessment*, 167(1), 309-320.

Megharaj, M., Avudainayagam, S., y Naidu, R. (2003). Toxicity of hexavalent chromium and its reduction by bacteria isolated from soil contaminated with tannery waste. *Current microbiology*, 47(1), 0051-0054.

Mgbemena, I. C., Nnokwe, J. C., Adjeroh, L. A., y Onyemekara, N. N. (2012). Resistance of bacteria isolated from Otamiri River to heavy metals and some selected antibiotics. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 4(5), 551-556.

Milán, Z., Sánchez, E., Borja, R., Weiland, P., y Cruz, M. (2001). Synergistic effects of natural and modified zeolites on the methanogenesis of acetate and methanol. *Biotechnology letters*, 23(7), 559-562.

Mishra, R. R., Dhal, B., Dutta, S. K., Dangar, T. K., Das, N. N. y Thatoi, H. N. (2012). Optimization and characterization of chromium (VI) reduction in saline condition by moderately halophilic *Vigribacillus* sp. isolated from mangrove soil of Bhitarkanika, India. *Journal of hazardous materials*, 227, 219-226.

Mistry, K., Desai, C., y Patel, K. (2009). Reduction of chromium (VI) by bacterial strain KK15 isolated from contaminated soil. *Journal of Cell and Tissue Research*, 9(2), 1821.

Monge-Amaya, O., Valenzuela-García, J. L., Acedo-Félix, E., Certucha-Barragán, M. T., y Almendáriz-Tapia, F. J. (2008). Biosorción de cobre en sistema por lote y continuo con

bacterias aerobias inmovilizadas en zeolita natural (clinoptilolita). *Revista internacional de contaminación ambiental*, 24(3), 107-115.

Moral, A., Tijero, A., Tijero, J., Torres, E., y Pérez, I. (2010). Depuración de Cromo III en aguas residuales que contienen alta carga proteica. In *10 Congreso Nacional Del Medio Ambiente CONAMA10-Researchgate* (pp. 1-10).

Mudili, J. (2007). *Introductory practical microbiology*. Alpha Science International Limited.

Muro, A. L., Castillo, F. Y. R., González, F. J. A., y Barrera, A. L. G. (2012). Biopelículas multi-especie: asociarse para sobrevivir. *Investigación y Ciencia: de la Universidad Autónoma de Aguascalientes*, (54), 49-56.

Narayani, M., y Shetty, K. V. (2013). Chromium-resistant bacteria and their environmental condition for hexavalent chromium removal: a review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43(9), 955-1009.

NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) (2006) Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. 9<sup>th</sup> ed, vol 26, no 1. Approved Standards M2-A9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

NOM-001-ECOL-1996, Que establece los límites máximos permisibles de contaminante en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales. Consultado el 19/10/2015.

Ozturk, S., Kaya, T., Aslim, B., y Tan, S. (2012). Removal and reduction of chromium by *Pseudomonas* spp. and their correlation to rhamnolipid production. *Journal of hazardous materials*, 231, 64-69.

Okeke, B. C., Laymon, J., Crenshaw, S., y Oji, C. (2008). Environmental and kinetic parameters for Cr (VI) bioreduction by a bacterial monoculture purified from Cr (VI)-resistant consortium. *Biological trace element research*, 123(1), 229-241.

Ötker, H. M., y Akmehmet-Balcioğlu, I. (2005). Adsorption and degradation of enrofloxacin, a veterinary antibiotic on natural zeolite. *Journal of Hazardous Materials*, 122(3), 251-258.

Pamp, S. J., Gjermansen, M., y Tolker-Nielsen, T. (2009). The biofilm matrix: a sticky framework. *Kjelleberg S, Givskov*.

Panneerselvam, P., Choppala, G., Kunhikrishnan, A., y Bolan, N. (2013). Potential of novel bacterial consortium for the remediation of chromium contamination. *Water, Air, & Soil Pollution*, 224(12), 1-11.

Paredes, F. y Roca, J.J. (2004). Acción de los antibióticos: Perspectiva de la medicación antimicrobiana. *OFFARM*. 23(3), 116-124.

Park, D., Yun, Y. S., y Park, J. M. (2005). Studies on hexavalent chromium biosorption by chemically-treated biomass of *Ecklonia* sp. *Chemosphere*, 60(10), 1356-1364.

Paz, M., Magdaleno, A., Tornello, C., Balbis, N., & Moretton, J. (2008). Genotoxicidad y determinación de compuestos tóxicos en un residuo líquido hospitalario de Buenos Aires, Argentina. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 24(2), 79-87.

Pazos, M., Branco, M., Neves, I., Sanromán, M., y Tavares, T. (2010). Removal of Cr(VI) from Aqueous Solutions by a Bacterial Biofilm Supported on Zeolite: Optimisation of the Operational Conditions and Scale-Up of the Bioreactor. *Chemical Engineering & Technology*, 33(12), 2008-2014.

Pereira, A. L., Silva, T. N., Gomes, A. C., Araújo, A. C., y Giugliano, L. G. (2010). Diarrhea-associated biofilm formed by enteroaggregative *Escherichia coli* and aggregative *Citrobacter freundii*: a consortium mediated by putative F pili. *BMC microbiology*, 10(1), 1-18.

Perea, Y. M. V., Poveda, J. C. V., Leal, L. C. S., y Diaz, A. G. L. (2014). Evaluación de un sistema de medio fijo como soporte para una película microbiana capaz de reducir Cr (VI) de lodos residuales de curtiembres. *Nova*, 12(21).

Poornima, K., Karthik, L., Swadhini, S. P., Mythili, S., y Sathivelu, A. (2010). Degradation of chromium by using a novel strains of *Pseudomonas* species. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*, 2(4).

Qi, X., Xue, M., Cui, H., Yang, K., Song, K., Zha, J., ... y Ling, F. (2020). Antimicrobial activity of *Pseudomonas monteilii* JK-1 isolated from fish gut and its major metabolite, 1-hydroxyphenazine, against *Aeromonas hydrophila*. *Aquaculture*, 526, 735366.

Quintelas, C., y Tavares, T. (2001). Removal of chromium (VI) and cadmium (II) from aqueous solution by a bacterial biofilm supported on granular activated carbon. *Biotechnology letters*, 23(16), 1349-1353.

Quintelas, C., Rocha, Z., Silva, B., Fonseca, B., Figueiredo, H., y Tavares, T. (2009). Biosorptive performance of an *Escherichia coli* biofilm supported on zeolite NaY for the removal of Cr(VI), Cd(II), Fe(III) and Ni(II). *Chemical Engineering Journal*, 152(1), 110-115.

Radianingtyas, H., Robinson, G. K., y Bull, A. T. (2003). Characterization of a soil-derived bacterial consortium degrading 4-chloroaniline. *Microbiology*, 149(11), 3279-3287.

Radlinski, L., Rowe, S. E., Kartchner, L. B., Maile, R., Cairns, B. A., Vitko, N. P., ... y Conlon, B. P. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* exoproducts determine antibiotic efficacy against *Staphylococcus aureus*. *PLoS biology*, 15(11), e2003981.

Rahman, Z., y Singh, V. P. (2014). Cr (VI) reduction by *Enterobacter* sp. DU17 isolated from the tannery waste dump site and characterization of the bacterium and the Cr (VI) reductase. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 91, 97-103.

Rajbanshi, A. (2008). Study on heavy metal resistant bacteria in Guheswori sewage treatment plant. *Our nature*, 6(1), 52-57.

Ramírez-Díaz, M. I., Díaz-Pérez, C., Vargas, E., Riveros-Rosas, H., Campos-García, J., y Cervantes, C. (2008). Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biomaterials*, 21(3), 321-332.

Ramírez Ramírez, A., y Benítez-Campo, N. (2014). Tolerancia y reducción de cromo (VI) por *Bacillus cereus* B1, aislado de aguas residuales de una curtiembre. *Revista de Ciencias*, 17(2), 51-63.

Rickard, A. H., Gilbert, P., High, N. J., Kolenbrander, P. E., y Handley, P. S. (2003). Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends in microbiology*, 11(2), 94-100.

Rueda, A., Rodríguez, E., Pedroza A., y Poutou, R. (2002) Aislamiento, identificación y caracterización de bacterias termófilas aeróbicas, con actividad proteolítica, a partir de pilas de compost en fase termofílica. *Ciencias de la Salud*, 1-13.

Rodríguez, D. T. (2003). El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos. *Ecosistemas*, 12(2).

Rodríguez, W., y Thelma, W. (2009). Estudio de la remoción vía microbiana de Ni y V presentes en catalizadores gastados. *M. Sc. Instituto Politécnico Nacional, Santiago de Querétaro, México*.

Rosales, E., Pazos, M., Sanromán, M. A., y Tavares, M. T. (2011). Biosorption of heavy metal and dyes: a promising technology leather wastewater treatment.

Rosales, E., Pazos, M., Sanromán, M. A., y Tavares, T. (2012). Application of zeolite-*Arthrobacter viscosus* system for the removal of heavy metal and dye: chromium and Azure B. *Desalination*, 284, 150-156.

Sánchez-Tafolla, L., Padrón, J. M., Mendoza, G., Luna-Rodríguez, M., Fernández, J. J., Norte, M., y Trigos, Á. (2019). Antiproliferative activity of biomass extract from *Pseudomonas cedrina*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 40, 40-44.

Seifrtova, M., Novakova, L., Lino, C., Pena, A., y Solich, P. (2009). An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters. *Analytica chimica acta*, 649(2), 158-179.

Shammi, T., y Ahmed, S. (2013). Heavy metal tolerance and antibiotic resistance of *Bacillus* spp. isolated from two major rivers in Bangladesh. *Bangladesh Journal of Microbiology*, 30(1-2), 17-22.

Shivaji, S., Chaturvedi, P., Suresh, K., Reddy, G. S. N., Dutt, C. B. S., Wainwright, M., ... y Bhargava, P. M. (2006). *Bacillus aerius* sp. nov., *Bacillus aerophilus* sp. nov., *Bacillus stratosphericus* sp. nov. and *Bacillus altitudinis* sp. nov., isolated from cryogenic tubes used for collecting air samples from high altitudes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(7), 1465-1473.

Silva, B., Figueiredo, H., Quintelas, C., Neves, I. C., y Tavares, T. (2008). Zeolites as supports for the biorecovery of hexavalent and trivalent chromium. *Microporous and Mesoporous Materials*, 116(1-3), 555-560.

Smets, B. F., Morrow, J. B., y Arango Pinedo, C. (2003). Plasmid introduction in metal-stressed, subsurface-derived microcosms: plasmid fate and community response. *Applied and environmental microbiology*, 69(7), 4087-4097.

Stuart, M., Lapworth, D., Crane, E., y Hart, A. (2012). Review of risk from potential emerging contaminants in UK groundwater. *Science of the Total Environment*, 416, 1-21.

Sugiyama, T., Sugito, H., Mamiya, K., Suzuki, Y., Ando, K., y Ohnuki, T. (2012). Hexavalent chromium reduction by an actinobacterium *Flexivirga alba* ST13T in the family Dermacoccaceae. *Journal of bioscience and bioengineering*, 113(3), 367-371.

Swartz, C. H., Reddy, S., Benotti, M. J., Yin, H., Barber, L. B., Brownawell, B. J., & Rudel, R. A. (2006). Steroid estrogens, nonylphenol ethoxylate metabolites, and other wastewater contaminants in groundwater affected by a residential septic system on Cape Cod, MA. *Environmental science & technology*, 40(16), 4894-4902.

Tafur, J. D., Torres, J. A., y Villegas, M. V. (2011). Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. *Infectio*, 12(3).

Tavares, M. T., Quintelas, C., Figueiredo, H., y Neves, I. (2006). Comparative study between natural and artificial zeolites as supports for biosorption systems. In *Materials science forum* (Vol. 514, pp. 1294-1298). Trans Tech Publications Ltd.

Tavares, M. T. J. S. C., y Neves, M. I. P. C. (2008). *U.S. Patent Application No. 12/029,057*.

Thatoi, H., Das, S., Mishra, J., Rath, B. P., y Das, N. (2014). Bacterial chromate reductase, a potential enzyme for bioremediation of hexavalent chromium: a review. *Journal of Environmental Management*, 146, 383-399.

Upadhyay, N., Vishwakarma, K., Singh, J., Mishra, M., Kumar, V., Rani, R., ... y Sharma, S. (2017). Tolerance and reduction of chromium (VI) by *Bacillus* sp. MNU16 isolated from contaminated coal mining soil. *Frontiers in plant science*, 8, 778.

Vázquez Morillas, A., Vaca Mier, M., Beltrán Villavicencio, M., López Callejas, R., y Álvarez, P. J. (2007). Reducción de percloroetileno y cromo hexavalente mediante FE (0) y bioestimulación de microorganismos anaerobios. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 23(2), 51-58.

Verma, T., Garg, S. K., y Ramteke, P. W. (2009). Genetic correlation between chromium resistance and reduction in *Bacillus brevis* isolated from tannery effluent. *Journal of applied microbiology*, 107(5), 1425-1432.

Vosough, M. y Mashhadiabbas Esfahani, H. (2013). Fast HPLC-DAD quantification procedure for selected sulfonamids, metronidazole and chloramphenicol in wastewaters using second order calibration based on MCR-ALS. *Talanta*, 113, 68-75.

Watanabe, N., Bergamaschi, B. A., Loftin, K. A., Meyer, M. T., y Harter, T. (2010). Use and environmental occurrence of antibiotics in freestall dairy farms with manured forage fields. *Environmental science & technology*, 44(17), 6591-6600.

Xu, L., Luo, M., Li, W., Wei, X., Xie, K., Liu, L., ... y Liu, H. (2011). Reduction of hexavalent chromium by *Pannonibacter phragmitetus* LSSE-09 stimulated with external electron donors under alkaline conditions. *Journal of Hazardous Materials*, 185(2-3), 1169-1176.

Yang, L., Liu, Y., Wu, H., Høiby, N., Molin, S., y Song, Z. J. (2011). Current understanding of multi-species biofilms. *International journal of oral science*, 3(2), 74-81.

Zahoor, A., y Rehman, A. (2009). Isolation of Cr (VI) reducing bacteria from industrial effluents and their potential use in bioremediation of chromium containing wastewater. *Journal of Environmental Sciences*, 21(6), 814-820.

Zhang, K. y Li, F. (2011). Isolation and characterization of a chromium-resistant bacterium *Serratia* sp. Cr-10 from a chromate-contaminated site. *Applied microbiology and biotechnology*, 90(3), 1163-1169.

Zhang, Y., Zhu, H., Szewzyk, U., y Geissen, S. U. (2015). Removal of pharmaceuticals in aerated biofilters with manganese feeding. *water research*, 72, 218-226.

## ANEXOS

Anexo A: Balance de materia de la biorreducción de 100 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) por *Brevundimonas diminuta*

<i>Brevundimonas diminuta</i>					
Medio extracelular				Medio intracelular	Cr <sub>FINAL</sub>
Biorreducción Cr(VI)----Cr(III)				Biomasa	Cr <sub>TOTAL</sub> + Cr(III) <sub>intracelular</sub>
Horas	Cr(VI) <sub>inicial</sub> mg L <sup>-1</sup>	Cr <sub>TOTAL</sub> mg L <sup>-1</sup>	Cr(III) mg L <sup>-1</sup>	Cr(III) mg L <sup>-1</sup> (biomasa)	mg L <sup>-1</sup>
0	100.90	100.86	-0.04	0	100.86
24	98.08	99.95	1.87	0	99.95
48	82.67	99.97	17.30	0	99.97
72	77.01	100.07	23.07	0	100.07
96	59.32	100.41	41.09	0	100.41
120	45.11	99.87	54.77	0	99.87
144	41.70	99.82	58.12	0	99.82
168	32.61	99.84	67.23	0	99.84
192	32.66	99.83	67.17	0	99.83

Anexo B: Balance de materia de la biorreducción de 100 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) por *Microbacterium phyllosphaerae*.

<i>Microbacterium phyllosphaerae</i>					
Medio extracelular				Medio intracelular	Cr <sub>FINAL</sub>
Biorreducción Cr(VI)----Cr(III)				Biomasa	Cr <sub>TOTAL</sub> + Cr(III) <sub>intracelular</sub>
Horas	Cr(VI) <sub>inicial</sub> mg L <sup>-1</sup>	Cr <sub>TOTAL</sub> mg L <sup>-1</sup>	Cr(III) mg L <sup>-1</sup>	Cr(III) mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>
0	99.96	99.96	0.00	0.00	99.96
24	88.72	99.55	10.83	0.52	100.07
48	70.01	98.53	28.52	0.31	98.84
72	59.37	98.53	39.16	0.00	98.53
96	39.04	98.53	59.49	0.00	98.53
120	37.88	98.53	60.65	0.00	98.53
144	37.47	98.49	61.02	0.00	98.49
168	37.11	98.37	61.26	0.00	98.37
192	36.99	98.25	61.26	0.00	98.25

Anexo C: Balance de materia de la biorreducción de 100 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) por *Brevundimonas nasdae*.

<i>Brevundimonas nasdae</i>					
Medio extracelular				Medio intracelular	Cr <sub>FINAL</sub>
Biorreducción Cr(VI)----Cr(III)				Biomasa	Cr <sub>TOTAL</sub> + Cr(III) <sub>intracelular</sub>
Horas	Cr(VI) <sub>inicial</sub> mg L <sup>-1</sup>	Cr <sub>TOTAL</sub> mg L <sup>-1</sup>	Cr(III) mg L <sup>-1</sup>	Cr(III) mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>
0	100.02	99.83	-0.19	0	99.83
24	98.07	99.91	1.84	0	99.91
48	82.65	100.03	17.38	0	100.03
72	77.13	99.76	22.63	0	99.76
96	59.42	100.07	40.65	0	100.07
120	45.22	99.95	54.73	0	99.95
144	40.71	99.94	59.23	0	99.94
168	35.61	99.35	63.74	0	99.35
192	35.66	99.55	63.89	0	99.55

Anexo D: Balance de materia de la biorreducción de 100 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) por *Pseudomonas monteilli*.

<i>Pseudomonas monteilli</i>					
Medio extracelular				Medio intracelular	Cr <sub>FINAL</sub>
Biorreducción Cr(VI)----Cr(III)				Biomasa	Cr <sub>TOTAL</sub> + Cr(III) <sub>intracelular</sub>
Horas	Cr(VI) <sub>inicial</sub> mg L <sup>-1</sup>	Cr <sub>TOTAL</sub> mg L <sup>-1</sup>	Cr(III) mg L <sup>-1</sup>	Cr(III) mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>
0	100.10	99.87	-0.24	0.00	99.87
24	89.88	99.67	9.79	0.00	99.67
48	71.04	99.88	28.84	0.00	99.88
72	60.36	99.67	39.31	0.00	99.67
96	59.41	99.60	40.19	0.00	99.60
120	44.95	99.39	54.44	0.53	99.92
144	39.71	98.54	58.83	1.20	99.74
168	22.08	98.64	76.56	0.99	99.63
192	21.94	98.87	76.93	0.83	99.70

Anexo F: Balance de materia de la biorreducción de 100 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) por *Bacillus altitudinis*.

<i>Bacillus altitudinis</i>					
Medio extracelular				Medio intracelular	Cr <sub>FINAL</sub>
Biorreducción Cr(VI)----Cr(III)				Biomasa	Cr <sub>TOTAL</sub> + Cr(III) <sub>intracelular</sub>
Horas	Cr(VI) <sub>inicial</sub> mg L <sup>-1</sup>	Cr <sub>TOTAL</sub> mg L <sup>-1</sup>	Cr(III) mg L <sup>-1</sup>	Cr(III) mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>
0	99.83	99.80	-0.03	0.00	99.80
24	81.77	99.81	18.04	0.00	99.81
48	80.42	99.75	19.33	0.00	99.75
72	77.14	99.45	22.31	0.40	99.85
96	74.29	98.86	24.57	0.61	99.47
120	68.47	98.89	30.42	0.85	99.74
144	65.03	98.84	33.81	0.96	99.80
168	58.94	99.10	40.16	1.03	100.13
192	57.71	99.02	41.31	0.99	100.01

Anexo G: Balance de materia de la biorreducción de 100 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) por *Pseudomonas graminis*.

<i>Pseudomonas graminis</i>					
Medio extracelular				Medio intracelular	Cr <sub>FINAL</sub>
Biorreducción Cr(VI)----Cr(III)				Biomasa	Cr <sub>TOTAL</sub> + Cr(III) <sub>intracelular</sub>
Horas	Cr(VI) <sub>inicial</sub> mg L <sup>-1</sup>	Cr <sub>TOTAL</sub> mg L <sup>-1</sup>	Cr(III) mg L <sup>-1</sup>	Cr(III) mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>
0	100.17	100.01	-0.16	0.00	100.01
24	94.33	99.97	5.63	0.00	99.97
48	79.00	99.85	20.85	0.00	99.85
72	60.33	99.82	39.49	0.00	99.82
96	12.67	99.62	86.95	0.00	99.62
120	11.97	99.59	87.62	0.00	99.59
144	10.00	99.51	89.51	0.00	99.51
168	6.00	98.97	92.97	0.97	99.94
192	5.33	98.99	93.65	1.01	100.00

Anexo H: Balance de materia de la biorreducción de 100 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) por *Enterobacter cancerogenus*.

<i>Enterobacter cancerogenus</i>					
Medio extracelular				Medio intracelular	Cr <sub>FINAL</sub>
Biorreducción Cr(VI)----Cr(III)				Biomasa	Cr <sub>TOTAL</sub> + Cr(III) <sub>intracelular</sub>
Horas	Cr(VI) <sub>inicial</sub> mg L <sup>-1</sup>	Cr <sub>TOTAL</sub> mg L <sup>-1</sup>	Cr(III) mg L <sup>-1</sup>	Cr(III) mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>
0	99.33	100.27	0.93	0.00	100.27
24	95.33	98.98	3.65	0.37	99.35
48	80.00	99.83	19.83	0.00	99.83
72	61.00	99.59	38.59	0.13	99.73
96	54.35	99.59	45.24	0.00	99.59
120	54.00	99.84	45.84	0.00	99.84
144	44.33	99.51	55.17	0.00	99.51
168	36.33	99.90	63.56	0.07	99.96
192	32.67	99.13	66.46	0.00	99.13

Anexo I: Balance de materia de la biorreducción de 100 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) por *Pseudomonas cedrina*.

<i>Pseudomonas cedrina</i>					
Medio extracelular				Medio intracelular	Cr <sub>FINAL</sub>
Biorreducción Cr(VI)----Cr(III)				Biomasa	Cr <sub>TOTAL</sub> + Cr(III) <sub>intracelular</sub>
Horas	Cr(VI) <sub>inicial</sub> mg L <sup>-1</sup>	Cr <sub>TOTAL</sub> mg L <sup>-1</sup>	Cr(III) mg L <sup>-1</sup>	Cr(III) mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>
0	100.67	99.93	-0.73	0.00	99.93
24	82.67	99.08	16.42	0.43	99.52
48	64.67	98.97	34.30	0.50	99.47
72	65.33	99.55	34.22	0.00	99.55
96	44.33	99.60	55.27	0.00	99.60
120	36.33	99.39	63.06	0.13	99.53
144	22.33	99.82	77.49	0.03	99.85
168	18.33	99.77	81.43	0.00	99.77
192	18.33	99.47	81.14	0.00	99.47

Anexo J: Balance de materia de la biorreducción de 100 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) por la especie control *S. aureus*

<i>S. aureus</i>						
Medio extracelular			Medio intracelular	Cr <sub>FINAL</sub>		
Biorreducción Cr(VI)----Cr(III)			Biomasa	Cr <sub>TOTAL</sub> + Cr(III) <sub>intracelular</sub>		
Horas	Cr(VI) <sub>inicial</sub> mg L <sup>-1</sup>	Cr <sub>TOTAL</sub> mg L <sup>-1</sup>	Cr(III) mg L <sup>-1</sup>	Cr(III) mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	
0	99.95	99.89	0.00	0.00	99.89	
24	99.83	99.89	0.00	0.00	99.89	
48	99.86	99.94	0.00	0.00	99.94	
72	99.86	99.96	0.00	0.00	99.96	
96	99.83	99.92	0.00	0.00	99.92	
120	99.86	99.87	0.00	0.00	99.87	
144	99.87	99.89	0.00	0.00	99.89	
168	99.85	99.88	0.00	0.00	99.88	
192	99.88	99.93	0.00	0.00	99.93	

Anexo K: Balance de materia de la biorreducción de 100 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) por el consorcio C1

C1						
Medio extracelular			Medio intracelular	Cr <sub>FINAL</sub>		
Biorreducción Cr(VI)----Cr(III)			Biomasa	Cr <sub>TOTAL</sub> + Cr(III) <sub>intracelular</sub>		
Horas	Cr(VI) <sub>inicial</sub> mg L <sup>-1</sup>	Cr <sub>TOTAL</sub> mg L <sup>-1</sup>	Cr(III) mg L <sup>-1</sup>	Cr(III) mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	
0	100.33	99.80	-0.54	0.00	99.80	
24	84.00	98.69	14.69	0.96	99.65	
48	80.67	99.23	18.56	0.91	100.14	
72	64.67	98.75	34.05	1.23	99.98	
96	45.33	97.16	51.85	2.57	99.74	
120	24.00	96.83	72.77	2.78	99.61	
144	16.33	98.15	81.84	2.10	100.25	
168	16.40	98.36	81.96	0.83	99.19	
192	16.27	98.81	82.50	0.83	99.64	

Anexo L: Balance de materia de la biorreducción de 100 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) por el consorcio C2

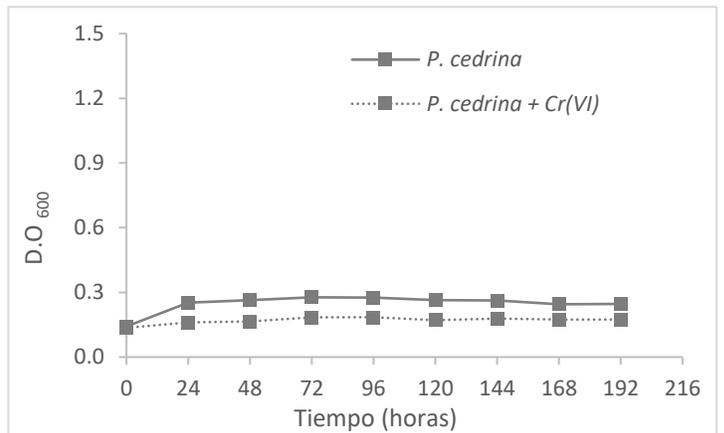
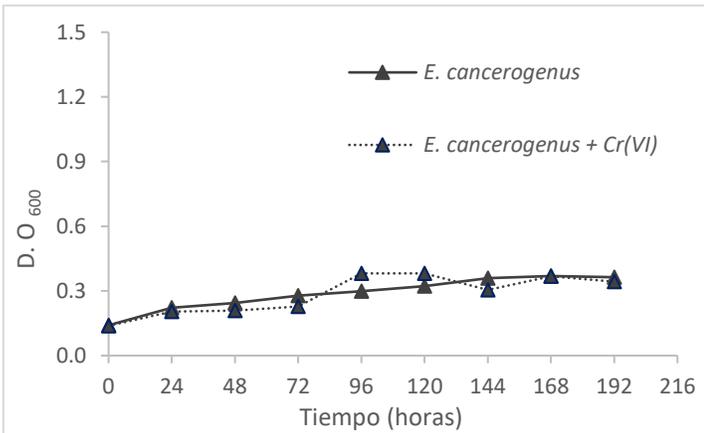
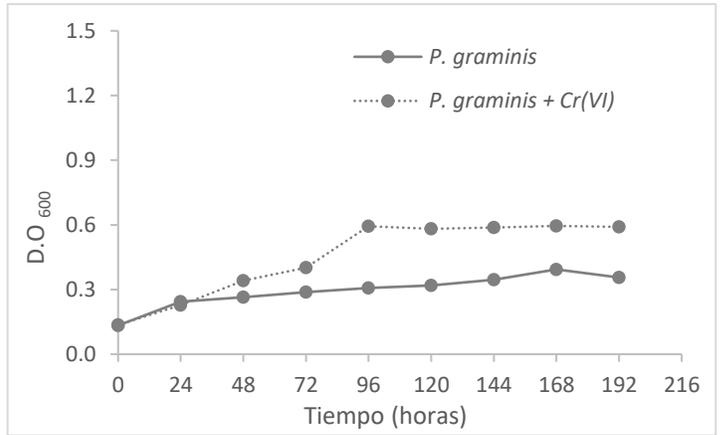
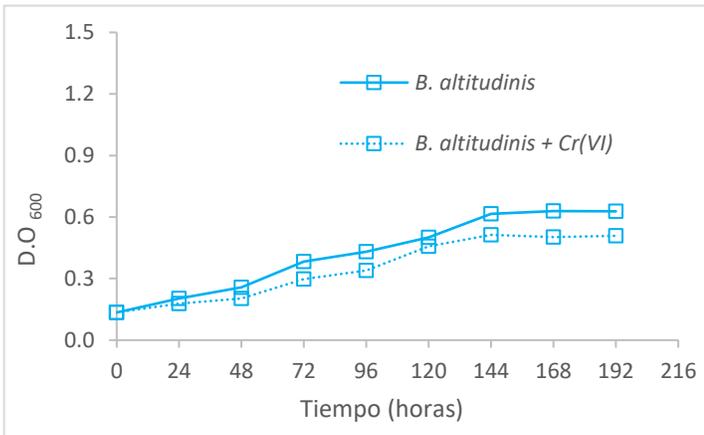
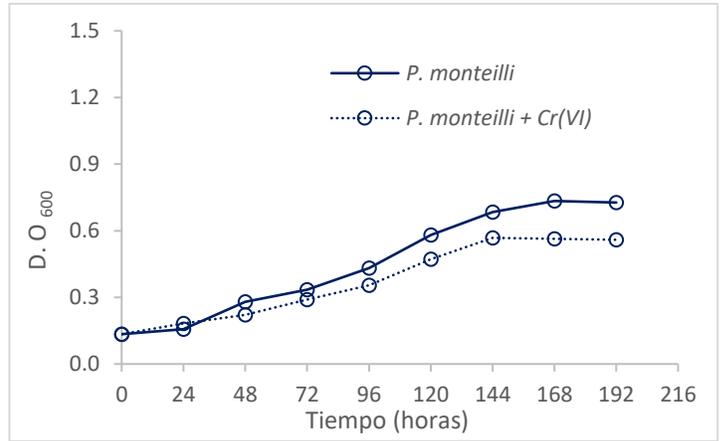
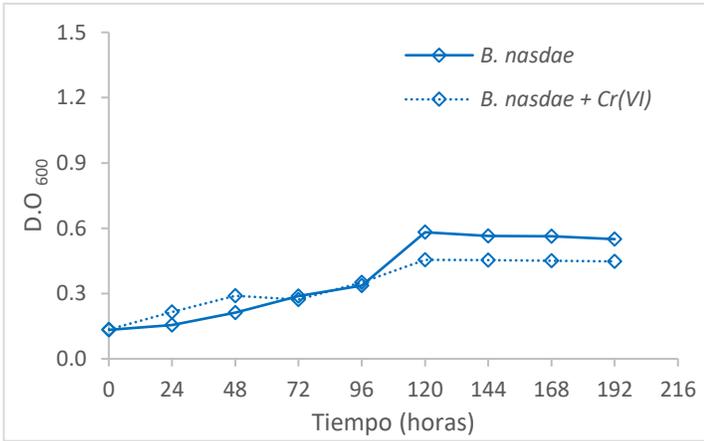
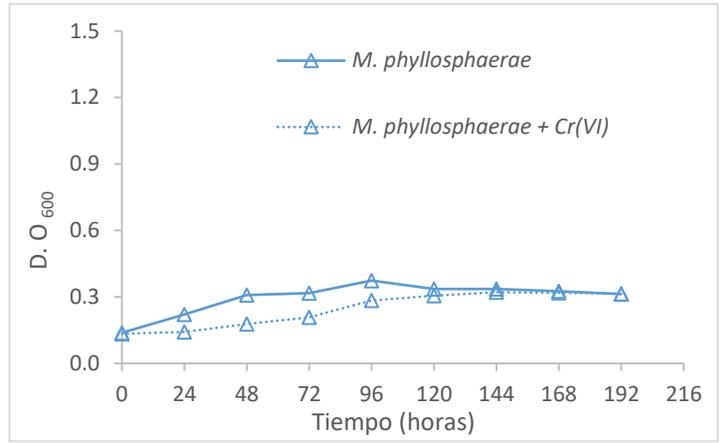
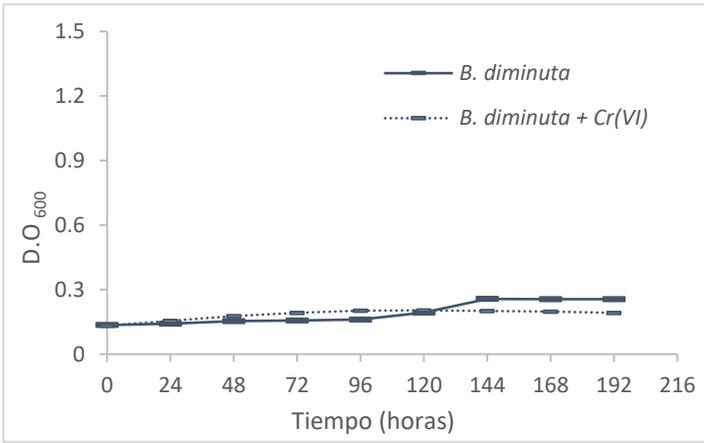
C2						
Medio extracelular			Medio intracelular	Cr <sub>FINAL</sub>		
Biorreducción Cr(VI)----Cr(III)			Biomasa	Cr <sub>TOTAL</sub> + Cr(III) <sub>intracelular</sub>		
Horas	Cr(VI) <sub>inicial</sub> mg L <sup>-1</sup>	Cr <sub>TOTAL</sub> mg L <sup>-1</sup>	Cr(III) mg L <sup>-1</sup>	Cr(III) mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>	
0	100.33	99.90	-0.43	0.00	99.90	
24	90.67	99.14	8.47	0.86	100.00	
48	91.67	98.36	6.69	0.92	99.28	
72	70.33	98.71	28.37	1.50	100.20	
96	53.00	98.75	45.75	1.10	99.85	
120	24.67	98.96	74.30	1.07	100.04	
144	15.33	97.94	82.62	2.33	100.27	
168	8.90	97.87	88.97	2.11	99.98	
192	7.30	97.70	90.41	1.92	99.62	

Anexo M: Balance de materia de la biorreducción de 100 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) por el consorcio C1+C2

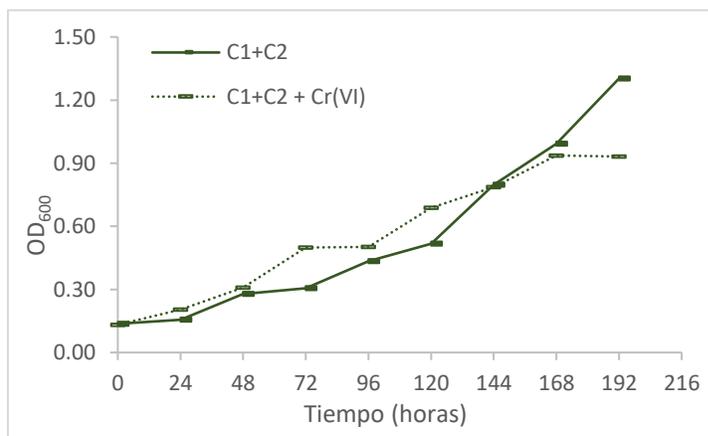
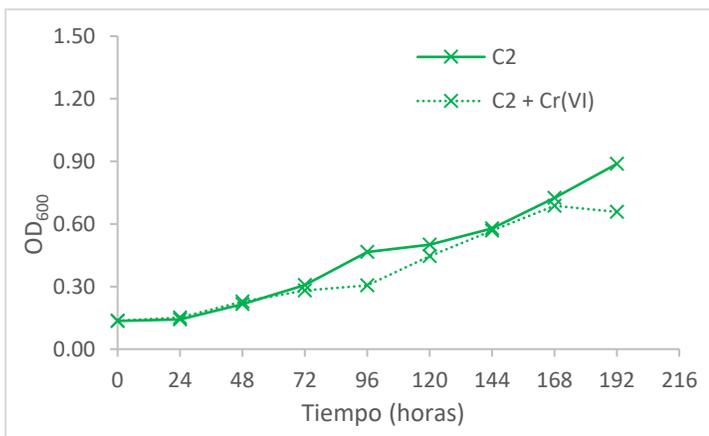
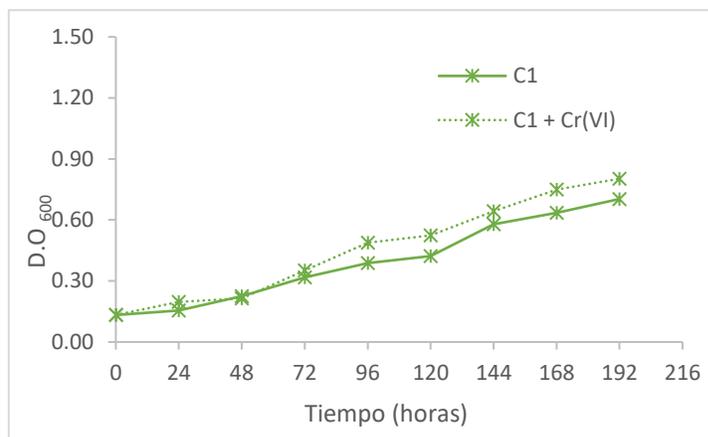
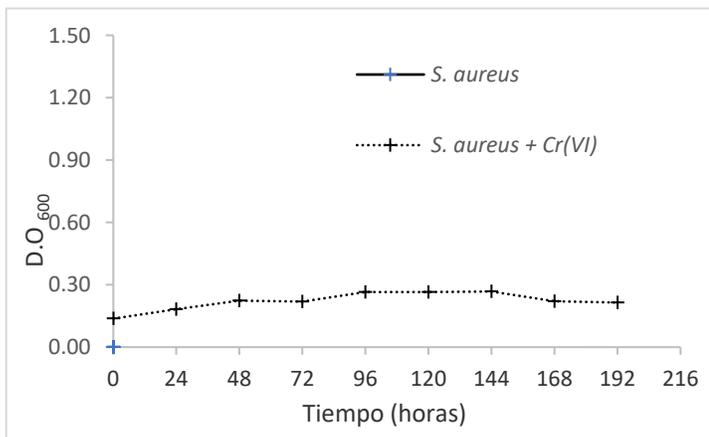
C1+C2					
Medio extracelular				Medio intracelular	Cr <sub>FINAL</sub>
Biorreducción Cr(VI)----Cr(III)				Biomasa	Cr <sub>TOTAL</sub> + Cr(III) <sub>intracelular</sub>
Horas	Cr(VI) <sub>inicial</sub> mg L <sup>-1</sup>	Cr <sub>TOTAL</sub> mg L <sup>-1</sup>	Cr(III) mg L <sup>-1</sup>	Cr(III) mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>
0	99.67	99.83	0.15	0.00	99.83
24	91.33	98.05	6.72	1.11	99.16
48	78.00	97.49	19.50	2.40	99.89
72	65.00	97.71	32.71	2.21	99.92
96	34.33	98.78	64.45	1.02	99.80
120	16.67	98.72	82.04	1.05	99.77
144	14.11	98.95	84.85	0.95	99.90
168	13.85	98.06	84.21	1.96	100.02
192	12.93	97.55	84.63	2.35	99.90

Anexo N: Balance de materia de la biorreducción de 100 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) por el medio control

CONTROL					
Medio extracelular				Medio intracelular	Cr <sub>FINAL</sub>
Biorreducción Cr(VI)----Cr(III)				Biomasa	Cr <sub>TOTAL</sub> + Cr(III) <sub>intracelular</sub>
Horas	Cr(VI) <sub>inicial</sub> mg L <sup>-1</sup>	Cr <sub>TOTAL</sub> mg L <sup>-1</sup>	Cr(III) mg L <sup>-1</sup>	Cr(III) mg L <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>
0	99.96	99.97	0.01	0.00	99.97
24	99.94	99.96	0.02	0.00	99.96
48	99.93	99.96	0.04	0.00	99.96
72	99.92	99.98	0.06	0.00	99.98
96	99.88	99.98	0.10	0.00	99.98
120	99.87	99.98	0.11	0.00	99.98
144	99.86	99.96	0.10	0.00	99.96
168	99.86	99.96	0.10	0.00	99.96
192	99.86	99.98	0.12	0.00	99.98



Anexo O. Crecimiento de las especies en ausencia y presencia de 100 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) en TBS a pH 8, 26°C y 120 rpm.



Anexo P. Crecimiento consorcios y *S. aureus* (como la cepa control) en ausencia y presencia de 100 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) en TBS a pH 8, 26°C y 120 rpm.