



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

---

---



FACULTAD DE INGENIERÍA

CENTRO INTERAMERICANO DE RECURSOS DEL AGUA

**“BIORREDUCCIÓN DE Cr(VI) A Cr(III) POR BACTERIAS  
RESISTENTES A CROMO AISLADAS DEL RÍO LERMA”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS DEL AGUA**

P R E S E N T A:

**BIÓL. YESICA SUJEIL AVENDAÑO FLORES**

*DIRECTORES DE TESIS:*

**DRA. MARINA ISLAS ESPINOZA**

**DR. MARIO ESPARZA SOTO**

TOLUCA, MÉXICO

DICIEMBRE DE 2012

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUCCIÓN**

Todas las actividades industriales generan una gran cantidad de contaminantes y desechos como resultado de sus operaciones internas de transformación, muchas de ellas crean una contaminación a gran escala con metales pesados. Éstos, en el caso de los suelos, regularmente afectan la fertilidad y/o el uso posterior de los mismos, mientras que en los acuíferos y aguas superficiales, pueden comprometer seriamente el uso de este recurso como fuente de agua para consumo humano.

En México, la contaminación industrial se ha convertido en un problema de salud pública debido a la gran cantidad de contaminantes que, día a día, son generados y vertidos a diferentes cuerpos de agua; ejemplo de ello es el Río Lerma, que actualmente funciona como un enorme colector de desechos urbanos e industriales. La contaminación por metales pesados resulta de particular interés, ya que éstos son considerados entre los contaminantes más problemáticos en el medio acuático pues usualmente no son eliminados por procesos naturales como ocurre con algunos de los contaminantes orgánicos.

Durante los procesos industriales de acabados metálicos se generan aguas residuales con altas concentraciones de cromo hexavalente, éste puede entrar al cuerpo humano al absorberse por las vías cutánea, oral y respiratoria. Atraviesa fácilmente las membranas biológicas y puede ser transportado activamente al interior de las células por medio del transportador de sulfato. Es tóxico y mutagénico para la mayoría de los organismos, puede causar irritación en la piel, en el tracto respiratorio y también se ha relacionado con cáncer de pulmón en humanos (Thacker y Madamwar, 2005).

El cromo hexavalente [Cr(VI)] es un fuerte agente oxidante y en presencia de materia orgánica es reducido a cromo trivalente [Cr(III)]. Sin embargo, niveles elevados de Cr(VI) pueden sobrepasar la capacidad reductora del ambiente y persistir así, como un contaminante (Gutiérrez y Cervantes, 2008). Debido a la toxicidad del Cr(VI) como

contaminante ambiental, es de considerable interés implementar métodos de bajo costo para la biorremediación de aguas contaminadas con éste. Un método potencial es el uso de bacterias que puedan reducir el Cr(VI) a Cr(III).

En esta investigación se emplearon tres cepas bacterianas aisladas de sedimentos del Río Lerma: *Pseudomonas cedrina* CFML 96-198, *Enterobacter cancerogenus* LMG 2693 y *Pseudomonas graminis* DSM 11363. Las tres especies son resistentes a cromo hexavalente y tienen la capacidad de biorreducir el Cr(VI) a Cr(III) (Islas-Espinoza y Bojórquez-Aguilar, 2011). Con las tres cepas se formó un consorcio bacteriano, se determinó la posible acumulación celular de Cr, se realizaron las cinéticas de crecimiento y biorreducción de Cr(VI) de las cepas individuales y del consorcio, se obtuvieron sus constantes cinéticas de biorreducción y se realizaron pruebas con biomasa suspendida y biomasa fija.

## CAPÍTULO 2

### ANTECEDENTES

#### 2.1 Cromo

El cromo elemental es un metal de transición que pertenece al grupo VIB de la tabla periódica, tiene estados de oxidación que van del -II al +VI de los cuales, las formas divalente, trivalente y hexavalente son las más importantes. El cromo elemental no se encuentra naturalmente en el ambiente. El estado divalente es oxidado rápidamente a la forma trivalente que es más estable. Aunque el estado hexavalente es más estable que la forma divalente, éste es raramente encontrado en la naturaleza. Lo anterior es porque los compuestos de Cr(VI) son agentes fuertemente oxidantes y altamente corrosivos; en el ambiente estos compuestos generalmente son reducidos a Cr(III) (NTP, 2011).

Dentro de los intervalos de potencial redox y pH comúnmente encontrados en suelos y sistemas acuáticos, el cromo existe predominantemente como oxianiones de Cr(III) y Cr(VI). El Cr(VI) es un fuerte oxidante y existe sólo en especies oxigenadas que son muy solubles y dependientes del pH (Figura 1) de acuerdo con los siguientes equilibrios:



El ácido crómico ( $H_2CrO_4$ ) es un fuerte agente oxidante y es la especie dominante a un pH menor a 0.6. El ion cromato ácido ( $HCrO_4^-$ ) existe entre valores de pH de 1 y 6. El ion cromato ( $CrO_4^{2-}$ ) se encuentra a pH 6 o mayor. El ion dicromato ( $Cr_2O_7^{2-}$ ) es un dímero del ion cromato ácido, el cual se forma cuando la concentración de cromo excede aproximadamente de  $1 \text{ g L}^{-1}$ .



Debido a su baja afinidad por los iones óxido e hidróxido, el Cr(III) forma numerosos complejos con ligandos orgánicos e inorgánicos. Las especies complejas de Cr(III) tienden a ser más estables en solución y pueden ser aisladas. Las principales especies acuosas de Cr(III) incluyen  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Cr(OH)}^{2+}$ ,  $\text{Cr(OH)}_3$  y  $\text{Cr(OH)}_4^-$ . El  $\text{Cr}^{3+}$  es la especie dominante a pH menor de 3.6, en donde el  $\text{Cr(OH)}_4^-$  predomina a  $\text{pH} > 11.5$  (Guevara, 2010; Sharma, 2002).

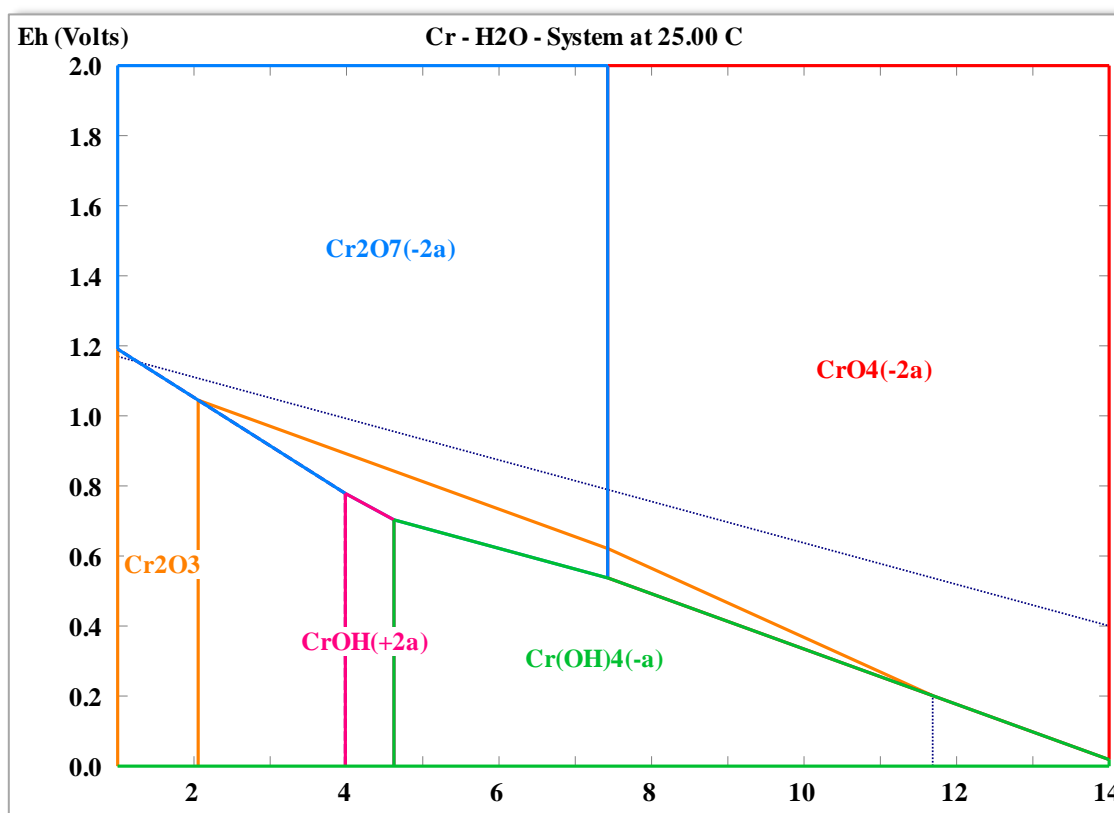


Figura 1. Diagrama pE-pH de la distribución de especies de cromo en agua.

### 2.1.1 Cromo trivalente: Cr(III)

Nutricionalmente, el Cr(III) es un elemento traza esencial para todos los seres vivos ya que participa en el metabolismo de azúcares y grasas; aunque su función no está totalmente definida, aparentemente potencia la acción de la insulina. La deficiencia de cromo en la dieta es poco frecuente, la mayoría de los casos se observa en personas desnutridas o diabéticas. Esta deficiencia se caracteriza por intolerancia a la glucosa, glucosuria,

hipercolesterolemia, reducción de la cuenta espermática y disfunción del sistema nervioso. Para los adultos, se recomienda una ingesta diaria de 50 a 200 µg de Cr(III) (Albert, 1997). Sin embargo, la exposición prolongada a cantidades excesivas de Cr(III) puede causar sensibilidad al cromo, enrojecimiento de la piel y lesiones.

### *2.1.2 Cromo hexavalente: Cr(VI)*

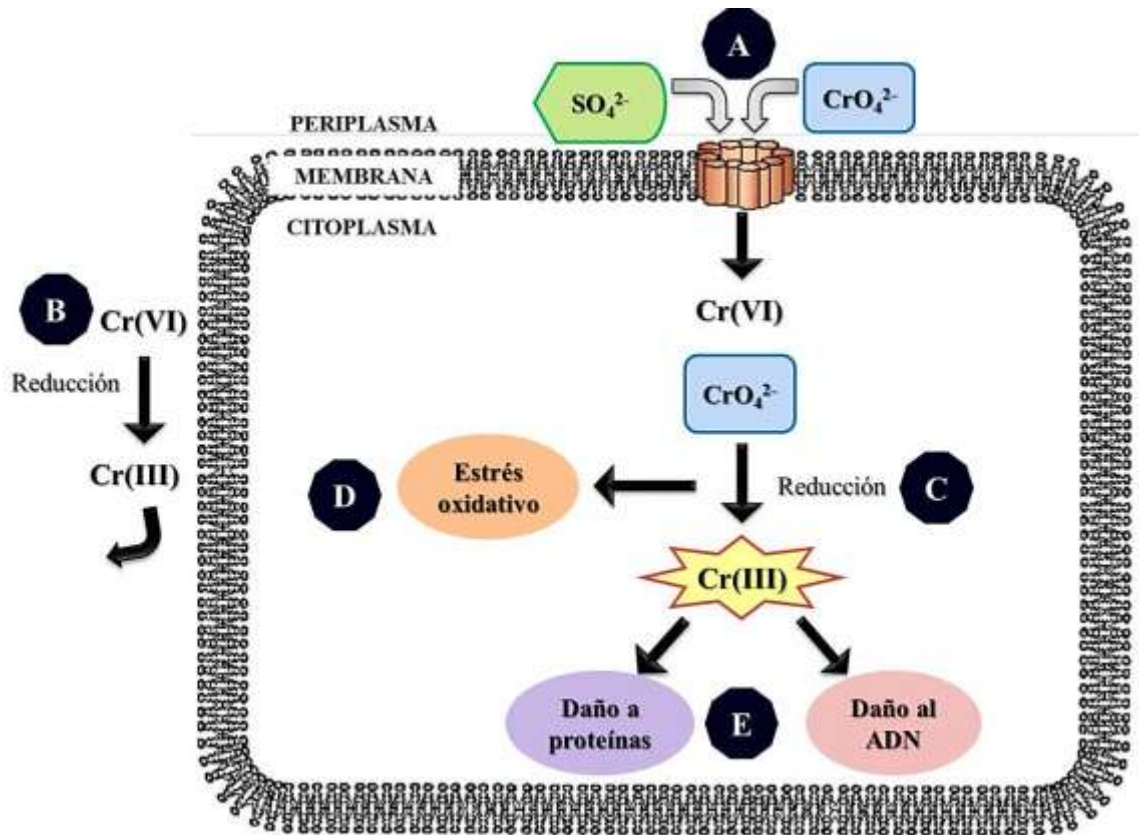
El Cr(VI) está clasificado por el CIIC (Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer) en el Grupo 1: cancerígeno para el ser humano (OMS, 2006). Puede entrar al cuerpo humano al absorberse por las vías cutánea, oral y respiratoria. Atraviesa fácilmente las membranas biológicas y puede ser transportado activamente al interior de las células por medio del transportador de sulfato (Thacker y Madamwar, 2005). Se ha determinado una asociación entre la exposición por inhalación al Cr(VI) y el cáncer de pulmón. La inhalación de Cr(VI) a relativamente altas concentraciones puede causar escurrimiento nasal, estornudos, picazón, sangrado por la nariz, úlceras y perforaciones en el tabique nasal. La ingestión de altas dosis de Cr(VI) puede provocar daño en riñón e hígado, irritación del tracto gastrointestinal, úlceras gástricas, convulsiones y muerte. La exposición dérmica puede provocar úlceras en la piel o reacciones alérgicas (Pellerin y Booker, 2000).

Algunos estudios realizados en roedores muestran que el consumo de altas dosis de Cr(VI) en ratones tiene efectos sobre la función reproductiva, incluyendo la disminución de la camada y un decremento del peso fetal. En un estudio realizado por Becerra et al. (2008) observaron que ratas Wistar tratadas con dicromato de potasio presentaron daño estructural en riñón, caracterizado por hinchazón y derrame del contenido celular. Los riñones son el blanco principal de la acción tóxica del Cr(VI), ya que es un agente oxidante capaz de dañar a las células. Otro estudio señala que los principales órganos afectados por la exposición al cromo hexavalente en roedores son los riñones, el hígado y los pulmones. Estos resultados concuerdan con estudios de la toxicidad del Cr(VI) reportados en humanos (Tsapakos et al. 1983; OMS, 2006).

El Cr(VI) también resulta tóxico para los microorganismos. En diversas especies bacterianas se ha demostrado que el Cr(VI) en forma de cromato entra activamente en las células a través del transportador de sulfato (Fig. 2A). El cromato y el sulfato tienen una analogía química. El cromato es un inhibidor competitivo del transporte del sulfato en todas las especies bacterianas que han sido estudiadas (Cervantes et al. 2001). El Cr(III) atraviesa las membranas con muy baja eficiencia debido a que forma compuestos insolubles en soluciones acuosas no ácidas (Fig. 2B). A nivel extracelular, el Cr(VI) es altamente tóxico para la mayoría de las bacterias ya que es transportado activamente al citoplasma, mientras que el Cr(III) es relativamente inofensivo debido a su insolubilidad e incapacidad de atravesar las membranas celulares (Cervantes y Campos-García, 2007). En el interior de la célula, la toxicidad del Cr se relaciona principalmente con el proceso de reducción del Cr(VI) a estados de oxidación inferiores como Cr(III) (Fig. 2C). Este proceso puede ocasionar la formación de radicales libres, generando estrés oxidativo (Fig. 2D) y, en consecuencia, diversos efectos tóxicos en el ADN, los lípidos y las proteínas (Fig. 2E). Se considera que el daño oxidativo al ADN es responsable de los efectos genotóxicos causados por el cromato (Ramírez-Díaz et al. 2009).

### *2.1.3 Cr(VI) en la industria*

Los compuestos de Cr(VI) son altamente oxidantes y corrosivos. Los compuestos más comúnmente encontrados en la industria son el cromato de calcio, trióxido de cromo, cromato y dicromato de sodio, cromato y dicromato de potasio, cromato de plomo, cromato de estroncio y cromato de zinc. El dicromato de potasio es la materia prima básica para la producción de compuestos de cromo y es usado como inhibidor de la corrosión en tratamiento de metales, en la producción de colorantes, preservación de madera y en la elaboración de químicos orgánicos sintéticos y catalizadores. Se presenta en forma de cristales rojos o anaranjados, con un peso molecular de 294.2 y una densidad de  $2.68 \text{ g mL}^{-1}$  a  $25^\circ\text{C}$ . Es soluble en agua e insoluble en alcohol y acetona (NTP, 2011).



**Figura 2.** Transporte y toxicidad del cromo en la célula bacteriana. A) Captación del Cr(VI) a través del sistema de transporte de sulfato. B) Reducción extracelular de Cr(VI) a Cr(III) el cual no atraviesa la membrana. C) Reducción intracelular de Cr(VI) a Cr(III). D) Estrés oxidativo causado por la generación de especies reactivas de oxígeno como consecuencia de la reducción del Cr(VI) y E) Daño ocasionado a las proteínas y al ADN. Modificado de Ramírez-Díaz et al. (2008).

El cromo es ampliamente utilizado en actividades manufactureras como cromado electrolítico, fabricación de explosivos, curtido de pieles, aleación de metales, fabricación de colorantes y pigmentos (NTP, 2011).

El recubrimiento electrolítico o galvánico consiste en depositar por vía electroquímica finas capas de metal sobre la superficie de una pieza sumergida en una solución de agua con iones metálicos, al conectar una fuente externa de corriente directa. Las capas formadas generalmente son de un espesor entre 1 y 100  $\mu\text{m}$ . El metal que constituye la capa se encuentra en el electrolito en forma de iones (CAM, 1998).



En el recubrimiento con cromo se distinguen dos procesos: el cromado brillante (cromado decorativo) y cromado duro. En el cromado brillante se depositan capas de cromo delgadas y brillantes de efecto decorativo o como protección anticorrosiva, sobre capas intermedias de níquel. El cromado duro se utiliza principalmente para aumentar la dureza de herramientas, así como para incrementar la resistencia al desgaste de moldes, válvulas, etc. En el cromo duro se depositan galvánicamente capas de cromo de mayor espesor a temperaturas elevadas. En el cromado brillante, se utilizan soluciones electrolíticas que contienen aproximadamente: 250 g L<sup>-1</sup> de ácido crómico, de 2.5 a 4 g L<sup>-1</sup> de ácido sulfúrico y 3 g L<sup>-1</sup> de cromo trivalente (Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>); para aumentar la dureza pueden agregarse además entre 5 y 10 g L<sup>-1</sup> de ácido bórico (CAM, 1998). Los principales residuos que se generan en estos procesos son lodos de concentrado (lodos de la tina de baño), aguas de enjuague contaminadas por arrastres, emisiones y lodos del sistema de tratamiento.

#### *2.1.4 Normatividad*

Las normas internacionales para el agua potable de la OMS recomiendan una concentración máxima admisible de cromo hexavalente de 0.05 mg L<sup>-1</sup> basándose en sus posibles efectos perjudiciales para la salud. Cabe mencionar que el límite indicado para el cromo es muy inferior a la dosis tóxica pero se estima que este elemento debería estar completamente ausente en el agua potable.

En México, el cromo hexavalente es considerado un residuo peligroso por la Norma Oficial Mexicana (NOM-052-SEMARNAT-2005). En el caso de las descargas industriales y debido al peligro que el Cr(VI) representa para la salud humana y el ambiente, el tratamiento de los residuos y aguas residuales generados debe estar regulado. Es por eso que las aguas residuales generadas por procesos industriales deben tratarse a fin de reducir el Cr(VI) a Cr(III), esto generalmente se hace con bisulfito de sodio, sin embargo, en muchos casos los residuos provenientes de este tipo de industrias no son tratados antes de disponerlos en los cuerpos receptores (CAM, 1998).

En México, la ley que rige el uso y aprovechamiento del agua es la Ley de Aguas Nacionales. También existen dos normas que establecen los límites permisibles de contaminantes en el agua. La Norma Oficial Mexicana (NOM-001-ECOL-1996) que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales con el objeto de proteger su calidad y posibilitar sus usos, y es obligatoria para los responsables de dichas descargas (DOF, 1996a). Esta norma sólo establece los límites máximos permitidos para cromo total de acuerdo al tipo de cuerpo de agua receptor (Tabla 1).

**Tabla 1.** Límites máximos permisibles de cromo total ( $\text{mg L}^{-1}$ ) para descarga de aguas residuales según el tipo de cuerpo receptor. Los valores muestran el promedio mensual permitido.

RÍOS			EMBALSES NATURALES Y ARTIFICIALES		AGUAS			HUMEDALES NATURALES
Uso en riego agrícola	Uso público urbano	Protección de vida acuática	Uso en riego agrícola	Uso público urbano	Explotación pesquera	Recreación	Estuarios	
1.0	0.5	0.5	1.0	0.5	0.5	1.0	0.5	0.5

Por otro lado, la Norma Oficial Mexicana (NOM-002-ECOL-1996) establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal con el fin de prevenir y controlar la contaminación de las aguas y bienes nacionales, así como proteger la infraestructura de dichos sistemas. Es una norma obligatoria para los responsables de dichas descargas (DOF, 1996b). En la tabla 2 se muestran los límites máximos permitidos de Cr(VI) para descargas en los sistemas de alcantarillado.

**Tabla 2.** Límites máximos permisibles de cromo hexavalente ( $\text{mg L}^{-1}$ ) para descarga de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado.

PARÁMETRO	PROMEDIO MENSUAL	PROMEDIO DIARIO
Cromo hexavalente	0.5	0.75

## **2.2 Biorremediación de Cr(VI)**

La contaminación por cromo es un problema de salud debido a los efectos biológicos que causa. Aparte de su toxicidad, el Cr(VI) también es muy soluble y por lo tanto móvil y biológicamente disponible en el ecosistema. Es por ello que su persistencia en el ambiente es un motivo de preocupación (Zhu et al. 2008).

Entre los métodos convencionales para remoción de Cr(VI) destacan: la precipitación, ultrafiltración, nanofiltración, ósmosis inversa, electrodiálisis y electrólisis. Ciertos métodos pueden remover hasta el 99% de la toxicidad del metal. Sin embargo, y a pesar de su eficacia, el alto costo de instalación y mantenimiento de estas tecnologías hace imposible su aplicación a las pequeñas y medianas empresas. En consecuencia, el sector productivo que trabaja con metales pesados sigue generando descargas acuosas con desechos altamente contaminantes. Es por ello que cada vez se presta más atención en los métodos de reducción microbiana del cromo hexavalente (Cheung y Gu, 2007).

Debido a que los microorganismos fueron las primeras formas de vida sobre la Tierra, estos pudieron haber desarrollado resistencia a los metales en respuesta a los gases de metales tóxicos que existieron cuando la Tierra se creó. Otra posibilidad es que los microorganismos hayan desarrollado recientemente resistencia a los metales por el incremento de la contaminación antropogénica (Roane y Pepper, 2000).

Para que los microorganismos puedan crecer y desarrollar sus funciones vitales necesitan un aporte de nutrientes, así como aceptores y donantes de electrones, estos últimos son imprescindibles como fuente de energía. Debido a que algunos metales pesados pueden actuar como aceptores y donantes de electrones, las bacterias pueden biotransformarlos; esto, en el caso del cromo, involucra un cambio químico sobre dicho metal (biorreducción). Es común que los microorganismos nativos de sitios contaminados con cromo muestren resistencia al ion, debido a que poseen mecanismos que les permiten removerlo o detoxificarlo.

Entre los microorganismos involucrados en la reducción de Cr(VI) se han reportado los géneros de *Pseudomonas* y *Enterobacter*.

### 2.2.1 Bacterias no entéricas: *Pseudomonas*

Las *Pseudomonas* son bacilos rectos o ligeramente curvados, Gram negativos y aerobios con flagelos polares. Tienen requerimientos nutritivos muy simples y crecen quimioorganotróficamente a pH neutro en un rango mesofílico de temperaturas. Este género de bacterias puede utilizar un amplio abanico de compuestos como fuentes de carbono y energía; algunas de las especies utilizan más de 100 compuestos. Por lo anterior, las *Pseudomonas* son ecológicamente muy significativas en el suelo y agua y probablemente son las responsables de la degradación de muchos compuestos solubles derivados de la descomposición de plantas y animales. La temperatura óptima de crecimiento para la mayoría de las cepas es aproximadamente 28°C, no obstante, algunas especies puede crecer a 4°C y ser consideradas psicrófilicas. Ninguno de los miembros de este género puede tolerar condiciones ácidas por lo que no se observa crecimiento a pH 4.5 (Madigan et al. 2003).

Las *Pseudomonas* son bacterias ampliamente distribuidas en la naturaleza. Ciertas especies del género *Pseudomonas* son patógenas. Entre las *Pseudomonas* fluorescentes, la especie *Pseudomonas aeruginosa* está frecuentemente asociada a infecciones de los tractos respiratorio y urinario en humanos. Sin embargo, no es un parásito estricto sino un oportunista típico, iniciando una infección cuando el individuo se encuentra bajo de defensas (Madigan et al. 2003).

Los plásmidos son componentes importantes del diseño genético de las *Pseudomonas*. Algunos de ellos funcionan como factores de fertilidad, algunos (plásmidos R) pueden conferir resistencia a varios agentes y otros otorgan la capacidad de degradación de fuentes inusuales de carbono, lo que contribuye a su versatilidad nutricional. Algunos ejemplos de las propiedades de *Pseudomonas* que son codificadas en plásmidos son:

1. Resistencia a antibióticos y otros compuestos antibacteriales como la carbenicilina, cloranfenicol, gentamicina, estreptomina, tetraciclina, sulfonamidas;
2. Resistencia a agentes físicos y químicos (borato, cromato, varios iones metálicos, organomercuriales, radiación ultravioleta);
3. Resistencia a bacteriocinas.

Las especies del género *Pseudomonas* son miembros importantes de las comunidades microbianas naturales. La capacidad de estos organismos para reaccionar a los cambios ambientales está relacionada con su capacidad para intercambiar material genético (Garrity et al. 2008).

En esta investigación, se emplearon dos cepas del género *Pseudomonas*: *Pseudomonas cedrina* y *Pseudomonas graminis*. En la tabla 3, se muestra la sistemática de ambas especies.

**Tabla 3.** Sistemática de las dos cepas de *Pseudomonas* empleadas en esta investigación.

PHYLUM. Proteobacteria	PHYLUM. Proteobacteria
CLASE III. Gammaproteobacteria	CLASE III. Gammaproteobacteria
ORDEN IX. Pseudomonadales	ORDEN IX. Pseudomonadales
FAMILIA. Pseudomonadaceae	FAMILIA. Pseudomonadaceae
GÉNERO I. <i>Pseudomonas</i>	GÉNERO I. <i>Pseudomonas</i>
LINAJE. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	LINAJE. <i>Pseudomonas fluorescens</i>
GRUPO. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	GRUPO. <i>Pseudomonas lutea</i>
SUBGRUPO. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	ESPECIE. <i>Pseudomonas graminis</i>
ESPECIE. <i>Pseudomonas cedrina</i>	

### 2.2.2 Bacterias entéricas: *Enterobacter*

Las bacterias entéricas comprenden un grupo relativamente homogéneo de Proteobacterias gamma que se caracterizan fenotípicamente por ser microorganismos Gram negativos, bacilos no esporulados, móviles por flagelos peritricos o no móviles, anaerobios facultativos, con requerimientos nutricionales relativamente simples y fermentan azúcares

con diversos productos finales. Entre las bacterias entéricas se encuentran especies patógenas para el hombre, animales y plantas. La enterobacteria más estudiada es sin duda, *Escherichia coli* (Madigan et al. 2003).

Las enterobacterias están distribuidas en todo el mundo. Se pueden encontrar en suelo, agua, frutos, carne, vegetales, árboles y animales. Su patogenicidad para el hombre y los animales y su importancia económica, así como su rápido tiempo de generación, su habilidad para crecer en medio definido y la facilidad de su manipulación genética las ha convertido en objeto de intensos estudios de laboratorio. Las especies del género *Enterobacter* se cultivan mejor a 30°C (Madigan et al. 2003).

En la presente investigación, se empleó la cepa *Enterobacter cancerogenus* que también se conoce como *Enterobacter taylorae* y anteriormente era conocida como *Erwinia cancerogena*. La tabla 4 muestra la sistemática de *E. cancerogenus*.

*E. cancerogenus* generalmente es aislada de fuentes ambientales o vegetales y es considerada principalmente como fitopatógena (Garrity et al. 2008). Raramente se ha encontrado asociada a infecciones humanas, sin embargo, se ha observado en pacientes con septicemia e infecciones del tracto urinario o asociada a infecciones después de un trauma severo, especialmente cuando el tratamiento con aminopenicilina no es exitoso o cuando el paciente se expone a una contaminación ambiental evidente (Garazzino et al. 2005).

**Tabla 4.** Sistemática de la cepa *E. cancerogenus* empleada en esta investigación.

PHYLUM. Proteobacteria
CLASE III. Gammaproteobacteria
ORDEN XIII. Enterobacteriales
FAMILIA I. Enterobacteriaceae
GÉNERO XII. <i>Enterobacter</i>
ESPECIE. <i>Enterobacter cancerogenus</i>

### 2.2.3 Mecanismos de reducción bacteriana de Cr(VI)

Dentro de la amplia diversidad microbiana existen microorganismos resistentes a metales. En respuesta a los metales presentes en el ambiente, los mecanismos de resistencia y detoxificación de los microorganismos han evolucionado. Estos pueden ser divididos en tres categorías: (1) mecanismos generales, que no requieren la presencia del metal; (2) los generales y activados por el estrés que aporta el metal; y (3) los dependientes de un metal específico para su activación.

Los mecanismos generales de resistencia al metal a menudo cumplen también otras funciones. Por ejemplo, la producción de materiales extracelulares que proveen una barrera efectiva contra la entrada del metal a la célula, pero que también sirven como superficie de adhesión y como protección contra la desecación y la depredación. Entre los mecanismos de resistencia dependientes del metal, el más conocido involucra la unión o secuestro del metal por metalotioneínas o proteínas similares. Las proteínas similares a las metalotioneínas han sido aisladas de especies como *Synechococcus* spp., *Escherichia coli* y *Pseudomonas putida*. Algunos microorganismos también usan sistemas de flujo de salida del metal que son codificados en plásmidos. Estos mecanismos bombean hacia afuera los iones tóxicos que han entrado a la célula, ya sea vía transporte activo o difusión. El arsénico, cromo y cadmio son los tres metales más comúnmente asociados con la resistencia por flujo de salida, sin embargo, los mecanismos de resistencia pueden variar dependiendo de la especie (Roane y Pepper, 2000).

Por otro lado, se ha visto que la reducción de Cr(VI) puede ser cometabólica (no participa en la conservación de la energía) en ciertas especies de bacterias; en otros casos, el Cr(VI) funciona como aceptor terminal de electrones en la vía respiratoria de transporte de electrones, dicho proceso resulta en conservación de energía para el crecimiento y mantenimiento de la célula.

Se ha demostrado que existen enzimas especializadas en reducir el Cr(VI) (reductasas) que se encuentran dentro de las células bacterianas, varios componentes del protoplasma celular

también reducen el Cr(VI). Componentes como el NADH, flavoproteínas y otras proteínas reducen rápidamente el Cr(VI) a Cr(III) (Ackerley et al. 2004). Por otra parte, existen enzimas reductoras de Cr(VI) que son producidas por la célula y exportadas al medio para reducir el Cr(VI) (Cheung y Gu, 2007). Debido a que la excreción de proteínas es un proceso que consume mucha energía, estas enzimas son producidas únicamente cuando el Cr(VI) es detectado en la solución y, de esa manera, es regulado (Chirwa y Molokwane, 2011).

Se han sugerido dos vías de reducción del Cr(VI) para bacterias Gram-negativas. El primer mecanismo sugiere que la reducción de Cr(VI) está mediada por una reductasa soluble con NADH sirviendo como donador de electrones. En el segundo mecanismo, el Cr(VI) actúa como un aceptor de electrones en un proceso mediado por la actividad de una reductasa ligada a la membrana (Chirwa y Molokwane, 2011). Otros trabajos han revelado que la capacidad de reducción del Cr(VI) o bien puede ser transmitida por un plásmido como en el caso de varias especies de *Pseudomonas*, o bien localizarse en el ADN cromosómico como en el caso de varios *Bacillus* y *Enterobacteriaceae* (Li y Krumholz, 2007).

Debido a que las bacterias tienen un alto potencial de biorremediación, varios investigadores han reportado la reducción bacteriana de Cr(VI) bajo diferentes condiciones.

#### *2.2.4 Cultivos puros*

La reducción microbiana de Cr(VI) fue reportada por primera vez en 1977, en donde Romamenko y Korenkov (1977) observaron la capacidad para reducir el Cr(VI) en bacterias del género *Pseudomonas* bajo condiciones anaerobias. Desde entonces, se ha acrecentado la atención en bacterias capaces de reducir el Cr(VI), de tal forma que varios investigadores han aislado nuevos microorganismos que catalizan la reducción de Cr(VI) a Cr(III) bajo diversas condiciones.

En un estudio realizado por McLean y Beveridge (2001) llevaron a cabo el aislamiento de una *Pseudomona* denominada CRB5. Dicha especie pudo reducir cromato en condiciones aerobias y anaerobias, así como acumular Cr(III) en su membrana plasmática. Debido a que



la CRB5 fue aislada de un sitio contaminado con cobre y arsénico, se evaluó la reducción de Cr(VI) bajo la presencia de Cu y As. Para ello, se prepararon células en suspensión que fueron añadidas a tubos Balch con medio Vogel-Bonner, glucosa y diferentes concentraciones de cromato, cobre y arsénico. La tolerancia al cromato fue evaluada al incubar CRB5 por 24 horas en caldo VB y concentraciones de cromato de 52, 520, 2600 y 5200 mg L<sup>-1</sup>; posteriormente, las células (100µL de cultivo) fueron sembradas sobre agar tripticaseína y soya. Respecto a la tolerancia a cromato, la concentración máxima tolerada fue de 520 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) puesto que a concentraciones mayores no se recuperaron células viables. La cepa CRB5 sólo fue capaz de reducir totalmente una concentración de 20 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) en 120 horas. Las pruebas realizadas con As y Cu no mostraron efectos significativos sobre la reducción de Cr(VI), únicamente, la concentración de 120 mg L<sup>-1</sup> de As tuvo un efecto sobre la reducción inicial de Cr(VI).

El grupo de trabajo de Dmitrenko et al. (2003) empleó las bacterias no reductoras de nitrato: *Pseudomonas fluorescens* B-53, *P. putida* cepas B-117 y B-139, *P. alcaligenes* B-146, *P. pseudoalcaligenes* B-167, *P. fragi* B-184, *P. taetrolens* B-196, *P. "rathonis"* P-17, *P. putida* P-15 y *P. fluorescens* P-9 y las pseudomonas desnitrificantes: *P. aeruginosa* P-1, *P. fluorescens* var. *pseudo-iodinum* P-11, *P. mendocina* P-13 y *P. stutzeri* P-19. Todas las especies fueron cultivadas en medio mineral M9. La fuente de carbono fue glucosa a una concentración de 5 g L<sup>-1</sup>. El medio fue inoculado con células creciendo sobre agar nutritivo. La turbidez inicial del cultivo fue de 0.03-0.06. La concentración inicial de Cr(VI) en el medio fue de 11, 15, 20 y 30 mg L<sup>-1</sup>. Con la concentración inicial de Cr(VI) de 11 mg L<sup>-1</sup> *P. fluorescens* B-53, *P. putida* B-139, *P. fragi* B-184 y *P. "rathonis"* P-17 redujeron completamente el Cr(VI) dentro de los primeros 9 días de incubación, mientras que *P. putida* B-117 hizo lo mismo en 13 días. A la concentración inicial de 15 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI), *P. fluorescens* var. *pseudo-iodinum* P-11, *P. mendocina* P-13, *P. fluorescens* P-9 y *P. putida* P-15 redujeron el Cr(VI) en un periodo de 5 a 7 días. Cuando aumentaron la concentración de Cr(VI) a 20 mg L<sup>-1</sup>, este fue reducido completamente por la bacteria desnitrificante *P. fluorescens* var. *pseudo-iodinum* P-11 en 19 días y, en 21 días, por las bacterias *P. "rathonis"* P-17, *P. putida* B-139 y *P. fragi* B-184. A la concentración de 30

mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI), las bacterias *P. "rathonis"* P-17 y *P. putida* B-139 redujeron completamente el Cr(VI) en 25 días.

Thacker y Madamwar (2005) aislaron un total de 38 cepas a partir de muestras de suelo colectadas en las cercanías de una industria de colorantes. Para verificar su tolerancia al Cr(VI), transfirieron las colonias morfológicamente diferentes a agar Luria modificado con 25 a 300 ppm de Cr(VI). La única cepa capaz de tolerar 300 ppm de Cr(VI) fue seleccionada y nombrada como DM1. Con base en el análisis bioquímico, esta bacteria fue identificada como *Ochrobactrum* sp. El efecto de la concentración de cromo se evaluó en caldo Luria modificado con varias concentraciones iniciales de cromo, desde 50 hasta 300 ppm en donde se inoculó la cepa seleccionada y se incubó a 35°C con agitación. Posteriormente, a intervalos regulares, tomaron alícuotas de 3 mL para medir el crecimiento bacteriano y la reducción de Cr(VI) en el medio. La concentración de 50 ppm fue reducida a cero en un lapso de 54 horas. Arriba de 100 ppm no se observó reducción total del cromato, sin embargo, la de 100 ppm fue casi totalmente reducida en 82 horas. Para las concentraciones de 150, 200 y 300 ppm se observó cromo residual. La concentración de 150 ppm fue reducida a 10.2 ppm en 127 horas, 200 ppm a 66.2 ppm en 144 horas y 300 ppm a 175.2 ppm en 127 horas. También se observó una disminución gradual en la tasa de crecimiento conforme aumentó la concentración de Cr(VI), lo cual se apreció particularmente a la concentración de 300 ppm. Asimismo señalan que los grupos control, libres de células, no mostraron capacidad para reducir Cr(VI), lo que indica que la reducción de Cr(VI) es un proceso enzimático y no debido a adsorción ni reacción química.

En otro estudio, Zhu et al. (2008) aislaron e identificaron a la bacteria *Leucobacter* sp. CRB1 del suelo de un sitio de disposición de residuos de mineral cromita. La cepa fue incubada en caldo Luria modificado a 30°C en agitación continua (150 rpm) durante 18 horas. Evaluaron la tolerancia de esta cepa a altas concentraciones de Cr(VI), de 1000 a 4000 mg L<sup>-1</sup> y midieron la densidad celular después de 48 horas. Para observar la reducción de Cr(VI) por esta cepa emplearon diferentes concentraciones de Cr(VI), incubaron a 30°C y tomaron alícuotas de cada muestra a diferentes tiempos para cuantificar el Cr(VI) residual. Los resultados obtenidos mostraron una reducción en la densidad de células

conforme eran expuestas a una mayor concentración de Cr(VI), sin embargo, a la concentración más alta (4000 mg L<sup>-1</sup>) aún se observó crecimiento celular después de las 48 horas de incubación, lo cual demostró que la cepa estudiada fue resistente a altas concentraciones de Cr(VI). En lo concerniente a la reducción de Cr(VI), se pudo observar una eficiencia del 100% a la concentración de 1000 mg L<sup>-1</sup>, mientras que a la concentración de 4000 mg L<sup>-1</sup> las bacterias sólo redujeron el 34.5%.

Por otra parte, Okeke et al. (2008) aislaron 12 bacterias resistentes a Cr(VI), sin embargo, seleccionaron una de ellas por reducirlo rápidamente, esta bacteria fue identificada como *Bacillus* sp. PB2. Evaluaron los efectos de la temperatura, el pH y la salinidad sobre la biorreducción del Cr(VI) y determinaron los efectos de diferentes concentraciones de Cr(VI) de 1 a 200 µg mL<sup>-1</sup> del mismo. Respecto al efecto de la temperatura, se observó la mayor reducción de Cr(VI) entre 25 y 35°C, pero la temperatura óptima fue de 35°C con una reducción del 91.8% a las 12 horas. El rango óptimo de pH para reducción del Cr(VI) fue de 7 a 9. En cuanto al efecto de las diferentes concentraciones de Cr(VI), observaron que la eliminación de Cr(VI) aumentó conforme se incrementó la concentración hasta aproximadamente 150 µg mL<sup>-1</sup>. Las dinámicas de reducción del Cr(VI) mostraron que durante las 2 primeras horas, el Cr(VI) fue reducido lentamente, pero posteriormente se aceleró la remoción hasta un 90% en 8 horas cuando la concentración inicial fue de 8000 µg L<sup>-1</sup> de Cr(VI). El monitoreo de la biomasa también reflejó un crecimiento exponencial en las primeras 4 horas después de la incubación y de la hora 5 a la 8, mostró un crecimiento en fase estacionaria.

Otra bacteria evaluada respecto a la reducción de Cr(VI) fue *Escherichia coli*. Abskharon et al. (2009) aislaron e identificaron las cepas *E. coli* ASU 3, *E. coli* ASU 7, *E. coli* ASU 8 y *E. coli* ASU 18. Para evaluar la resistencia de esta cepa al cromo determinaron la concentración mínima inhibitoria (CMI) de cromo hexavalente y trivalente. Para ello, usaron caldo mínimo tris con diferentes concentraciones de CrCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (0-300 ppm) y K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (0-25 ppm) y lo inocularon con 200 µL del cultivo de *E. coli*. La CMI fue determinada como la concentración más baja del metal que impidió totalmente el

crecimiento. Por otro lado, la reducción de cromato fue evaluada usando caldo mínimo tris con concentraciones de Cr(VI) de 1 a 10 ppm. La CMI de las cepas ASU 3 y ASU 8 fue de 20 ppm de Cr(VI), mientras que la de las cepas ASU 7 y ASU 18 fue de 25 ppm. Respecto a la reducción de cromo, la tasa de reducción incrementó con el decremento de la concentración usada de Cr. La máxima reducción observada luego de 48 horas de incubación fue la de la cepa *E. coli* ASU 7, que redujo el 54.62% del Cr(VI) de una concentración inicial de 1 ppm. A 10 ppm de Cr(VI) la reducción obtenida fue de 41.35%.

### *2.2.5 Consorcios bacterianos*

Un consorcio es una mezcla de bacterias colectadas de un ambiente natural. Usualmente un sitio contaminado se elige por ser una fuente ideal para hallar un consorcio particularmente útil. Éste provee un panorama muy cercano a lo que ocurre naturalmente en el ambiente en donde los microorganismos no viven como cultivos puros. Las comunidades bacterianas pueden degradar una amplia variedad de contaminantes en el ambiente debido a la diversidad de vías metabólicas que comparten (Cervantes et al. 2001).

Benazir et al. (2010) trabajaron con las especies *Bacillus subtilis* (B), *Pseudomonas aeruginosa* (P) y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Y) y evaluaron la reducción de 570 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) al formar 3 consorcios microbianos. El consorcio (P + B) tuvo una eficiencia de 99.6% y una tasa de reducción de 1.565 mg L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>. El consorcio (Y + B) mostró una eficiencia de 97.2% con una tasa de remoción de 2.185 mg L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>. Por otro lado, el consorcio (Y + P) redujo el 99.3% con una tasa de reducción de 2.302 mg L<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>, siendo este último el más efectivo.

### *2.2.6 Biomasa fija*

Existen algunas desventajas al emplear sistemas de tratamiento con biomasa suspendida tales como el crecimiento sin control de los microorganismos, la pérdida de la biomasa, así como la susceptibilidad que pueden tener a factores ambientales como temperatura, pH, entre otros (Cohen, 2001). Para minimizar el impacto de estos factores en el desempeño de los sistemas biológicos y lograr un sistema más eficiente, se ha impulsado el uso de

técnicas como la inmovilización de la biomasa activa. Esta puede definirse como la ubicación física de células en una región específica, de forma natural o inducida, en la cual son capaces de mantener su actividad catalítica (Garzón-Jiménez y Barragán-Huerta, 2008). La inmovilización artificial de bacterias puede darse por atrapamiento en los espacios o poros de fibras y geles. Los alginatos son sales del ácido algínico. El ácido algínico es un polisacárido complejo (biopolímero) que se obtiene de las algas pardas especialmente de las divisiones *Phaeophyceae* (feofitas) y *Rhodophyceae* (rodofitas) por reacción alcalina y está compuesto por ácido manurónico y ácido gulurónico. El alginato sódico es usado como medio inmovilizador de microorganismos y enzimas o como coagulante en el tratamiento de aguas (Oliveira, 2003).

Ganguli y Tripathi (2002) evaluaron la habilidad de *Pseudomonas aeruginosa* A2Chr para reducir el cromato. Probaron 2 biorreactores, un biorreactor de diálisis con biomasa suspendida y un cilindro rotatorio con biomasa fija, ambos fueron comparados contra un cultivo en “batch” (en lote). El biorreactor con biomasa suspendida consistió en una bolsa de diálisis con medio succinato inoculado con un cultivo en fase lag con una densidad celular de  $5.5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> sumergida en un efluente diluido proveniente de una industria de galvanoplastia con concentraciones de 10, 25, 50 y 100 mg L<sup>-1</sup>, dicho efluente fue suplementado con carbono, nitrógeno y fósforo. Por otra parte, la biopelícula empleada en el cilindro con biomasa fija fue formada al mezclar 5 g de células con 5 mL de un solución con 4% (p/v) de alginato de sodio y 4% de agarosa a 50°C. La mezcla de gel fue difundida uniformemente para formar una película de grosor no mayor a 0.5 mm sobre redes de nylon, la biopelícula fue colocada en el disco rotatorio del biorreactor. Cada 2 horas se tomaron alícuotas de 5 mL del efluente en ambos reactores con el fin de cuantificar el Cr(VI) residual. En los cultivos en “batch” la reducción máxima de Cr(VI) fue a la concentración de 10 mg L<sup>-1</sup>. En el reactor de biomasa suspendida (diálisis) la máxima reducción también ocurrió con 10 mg L<sup>-1</sup>. A las concentraciones de 25 y 50 mg L<sup>-1</sup> la reducción de cromato fue inhibida de 15 a 20%. Este biorreactor resultó ser efectivo sólo con grandes diluciones del efluente, ya que concentraciones mayores de Cr(VI) afectan negativamente la biorreducción. A una concentración de 100 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI), el biorreactor con cilindro rotatorio redujo el doble y el triple de la cantidad de Cr(VI)

reducida por el cultivo en “batch” y por el reactor en diálisis, respectivamente. La durabilidad de la biopelícula, sin embargo, fue de sólo 10 horas.

En algunos estudios se ha probado la reducción de Cr(VI) con células inmovilizadas, formando gránulos o biopelículas. Benazir et al. (2010) trabajaron con *Bacillus subtilis* (B), *Pseudomonas aeruginosa* (P) y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Y). La inmovilización de células microbianas consistió en la mezcla de volúmenes iguales de cultivo microbiano con alginato de sodio estéril al 4%. La mezcla fue goteada lentamente en una solución de cloruro de calcio 0.1M usando una jeringa estéril para obtener gránulos de tamaño similar. Las células inmovilizadas (formando gránulos) mostraron una mayor eficiencia de reducción que las células en suspensión, por lo que el uso de gránulos bacterianos puede ser efectivo para emplearse en biorreactores de pequeña y gran escala. La levadura inmovilizada redujo el 100% del cromo a una tasa de  $2.332 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  con una gran estabilidad. Su eficiencia radica en el control del tamaño de partícula, su mejor capacidad de regeneración y una fácil separación de la biomasa.

### *2.2.7 Cinéticas de biorreducción de Cr(VI) a Cr(III)*

Para entender y definir el crecimiento de un microorganismo particular, las células son puestas en un matraz en el cual se suministra un nutriente y las condiciones ambientales son controladas. Si el medio líquido suplementa todos los nutrientes requeridos para el crecimiento y los parámetros ambientales son óptimos, el incremento en el número o masa de bacterias puede ser medido en función del tiempo para obtener una curva de crecimiento. Se pueden observar distintas fases de crecimiento dentro de la curva de crecimiento (Figura 3). Estas incluyen: la fase de latencia o fase lag, la fase exponencial o fase log, la fase estacionaria y la fase de muerte (Maier, 2000).

La **fase de latencia** es la primera fase observada bajo condiciones “batch”. Cuando un inóculo es puesto en medio fresco, el crecimiento inicia después de un periodo de tiempo. Esta fase es debida a la adaptación fisiológica de las células a las condiciones del cultivo. Usualmente dura de minutos hasta algunas horas.

La segunda fase observada de crecimiento en un sistema “batch” es la **fase exponencial**. Esta fase está caracterizada por un periodo de división celular en donde la tasa de incremento de células en el cultivo, es proporcional al número de células presentes a cualquier tiempo. Si un cultivo inicia con un bajo número de células en crecimiento exponencial, no se producen inicialmente un gran número de células. Sin embargo, como las células se acumulan después de varias generaciones, el número de nuevas células con cada división incrementa explosivamente. Se puede describir el crecimiento exponencial matemáticamente con la ecuación:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (1)$$

Donde:  $X$  es el número o masa de células (masa/volumen),  $t$  es el tiempo, y  $\mu$  es la constante de la tasa específica de crecimiento ( $1/t$ ).

La tercera fase de crecimiento es la **fase estacionaria** y puede ser definida como un estado en el cual no hay crecimiento neto, la cual puede ser expresada con la siguiente ecuación:

$$\frac{dX}{dt} = 0 \quad (2)$$

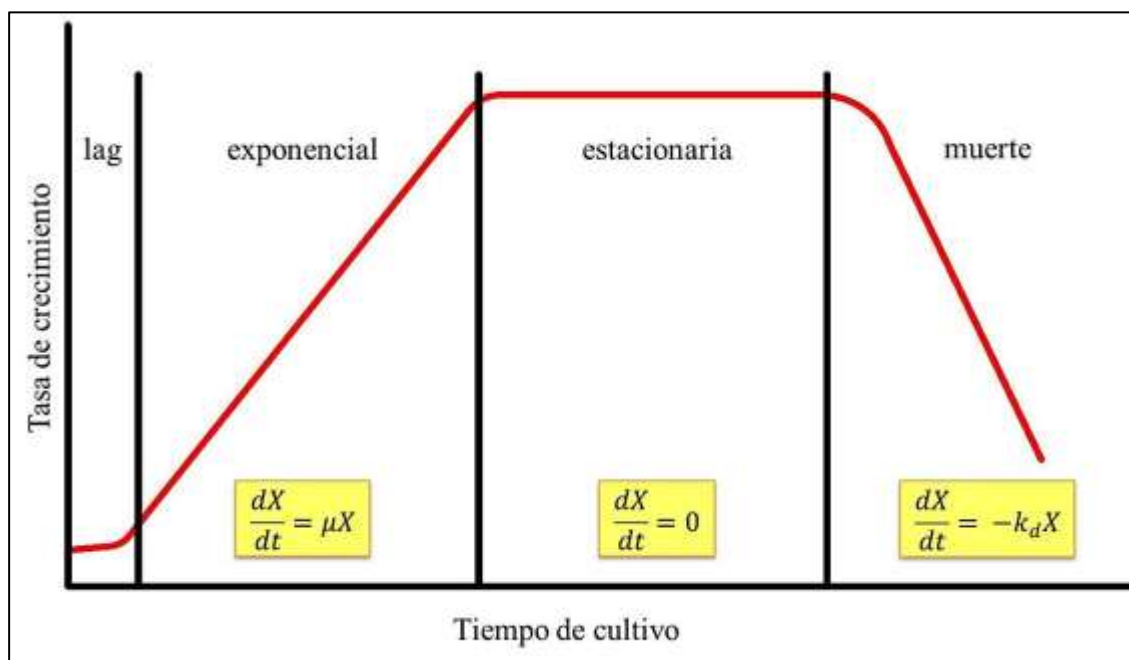
Aunque no se observa crecimiento neto en la fase estacionaria, las células aún puede crecer y dividirse. El crecimiento es simplemente balanceado por un número igual de células muriendo. Las principales razones por las que esto ocurre es que 1) un nutriente esencial del medio de cultivo se usa y llega a ser un factor limitante del crecimiento; o bien 2) se acumulan en el medio algunos productos de desecho hasta niveles inhibitorios que hacen que cese el crecimiento exponencial (Maier, 2000).

La fase final de la curva de crecimiento es la **fase de muerte**, la cual es caracterizada por una pérdida neta de células cultivables. Incluso en la fase de muerte hay muchas células individuales que están metabolizando y dividiéndose, pero el número de células viables perdidas es mayor que las células nuevas, por lo que hay una pérdida neta de células viables. La fase de muerte es a menudo exponencial, sin embargo, la tasa de muerte celular

es usualmente más baja que la tasa de crecimiento durante la fase exponencial (Madigan et al. 2003) La fase de muerte puede ser descrita por la siguiente ecuación:

$$\frac{dX}{dt} = -k_d X \quad (3)$$

Donde:  $k_d$  es la *tasa de muerte específica*.



**Figura 3.** Curva de crecimiento bacteriano.

Se han realizado distintos estudios sobre cinéticas de reducción de Cr(VI) en bacterias.

McLean y Beveridge (2001) estudiaron la reducción de Cr(VI) a Cr(III) por un aislado de Pseudomonales denominado CRB5. En esta investigación realizaron pruebas con las células completas y con extractos celulares con el fin de obtener las constantes cinéticas de la enzima reductasa cruda. Estas constantes cinéticas fueron calculadas ajustando las tasas de reducción inicial con una gráfica Lineweaver-Burk de  $1/V$  ( $\text{mg de Cr(VI) h}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$ ) versus  $1/[\text{Cr(VI)}]$  ( $\text{mg Cr(VI) L}^{-1}$ ). Para calcularlas, se monitoreó la pérdida de Cr(VI) a lo largo del tiempo, de esta manera obtuvieron las tasas de reducción inicial. La



constante de Michaelis-Menten,  $K_m$  se estimó en  $1.16 \text{ mg L}^{-1}$  y la velocidad máxima,  $V_{max}$  fue de  $0.25 \text{ mg de Cr h}^{-1}$ . Sus resultados mostraron que la reducción de cromato por la cepa CRB5 fue mediada por una enzima soluble que encontraron principalmente contenida en el citoplasma.

Okeke et al. (2008) estudiaron la reducción de Cr(VI) por la cepa *Bacillus* sp. PB2 a diferentes tiempos y calcularon la constante media de saturación ( $k_m$ ) y la velocidad máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) usando la ecuación de regresión no lineal hiperbólica, equivalente a la ecuación de Michaelis-Menten, donde  $V = V_{m\acute{a}x}[S]/k_m + [S]$ . Estas constantes también fueron determinadas por la gráfica Lineweaver-Burk por regresión lineal. Asimismo, ajustaron sus datos sobre la tasa de reducción de Cr(VI) a un modelo de orden cero y calcularon la constante  $k$  de una curva de regresión lineal. Los cálculos del análisis de regresión no lineal revelaron una  $k_m$  de  $82.5 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$  y una  $V_{m\acute{a}x}$  de  $7.78 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , mientras que los valores obtenidos con la gráfica Lineweaver-Burk fueron:  $k_m$  de  $80.9 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$  y  $V_{m\acute{a}x}$  de  $10.6 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . La constante cinética  $k$  fue estimada en  $0.84 \mu\text{g mL}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (con  $r^2 = 0.985$ ). La forma hiperbólica del efecto de la concentración de Cr, mostró que la dependencia de la remoción de Cr(VI) sobre la concentración de Cr, corresponde a una reacción típica catalizada por una enzima.

Contreras et al. (2011) desarrollaron un modelo matemático sobre la reducción biológica del Cr(VI) acoplada con el crecimiento de la biomasa, el decaimiento de la biomasa y la limitación de substrato en condiciones aeróbicas. El modelo fue calibrado usando los resultados obtenidos de cultivos en “batch” bajo diferentes condiciones. La estimación de los coeficientes del modelo matemático fue realizada con un paquete de software Gepasi 3. El modelo obtenido predijo la concentración de Cr(VI) en sistemas de flujo continuo en función del tiempo y en respuesta a los cambios en la concentración de Cr(VI) de entrada. Por lo anterior, dicho modelo puede ser útil para predecir el efecto de las condiciones de operación sobre el rendimiento de un reactor de lodos activados para tratar agua contaminada con Cr(VI).

### *2.2.8 Investigaciones realizadas en México*

En algunas partes de México, el desarrollo industrial y el manejo inadecuado de los residuos que contienen metales pesados han generado una problemática muy grave. En 1958 se estableció en San Francisco Chilpan, municipio de Tultitlán, la empresa Cromatos de México S.A. que utilizaba cromita para obtener cromatos de sodio y potasio en un proceso de producción a cielo abierto, sin control sobre las emisiones de polvos, descargas de aguas residuales y sobre el manejo de residuos tóxicos. Los residuos de polvo generados en el proceso de cromado sirvieron para pavimentar calles y avenidas en diferentes colonias de Lechería. La colonia Recursos Hidráulicos, es el caso más crítico ya que sus calles fueron "emparejadas" con el polvo amarillo por carecer ésta de pavimento. De esta forma, la contaminación por cromo se diseminó por distintos lugares, afectando en mayor o menor medida a toda la región (Albert, 1997).

Se realizó un estudio epidemiológico para investigar los posibles efectos de la exposición crónica al cromo en 863 personas de la población general (residentes de una zona urbana ubicada a varios kilómetros de distancia) y laboral (trabajadores expuestos y empleados de la planta). Se determinaron las manifestaciones clínicas por la exposición a las emisiones de dicha fábrica. Se encontró perforación del septum nasal en el 65% de los obreros y 3% de los empleados; irritación conjuntival en 32% de obreros, 4% de los empleados y en 4.2% de los habitantes; hipertrofia de los cornetes en 49% de los obreros, 6% de los empleados y 4.7% de los habitantes (Neri, 1980). En la escuela primaria federal "Reforma", situada cerca de la empresa Cromatos, perecieron algunas alumnas a causa de los desechos de cromo. A raíz de esta situación la población exigió el cierre de esta empresa en 1975, logrando la clausura en 1978. Después de la clausura, se inició la construcción de un cementerio industrial que inició sus operaciones en 1983, en él se almacenaron 77 mil toneladas de residuos de cromo (Pérez, 2006).

Por otra parte, en el Valle de Toluca existe un gran número de industrias registradas, lo cual ha provocado la sobreexplotación de sus mantos acuíferos y la contaminación del agua. Debido a que gran parte de las aguas residuales generadas son vertidas al Río Lerma, este

Río se ha convertido en el principal colector de desechos industriales y domésticos de la zona. Mantilla et al. (2000) estudiaron las zonas de contaminación del Río Lerma. Establecieron 12 estaciones de monitoreo sobre el Río Lerma, 9 en sus principales afluentes y 54 puntos de monitoreo de descargas municipales e industriales. Para apoyar la identificación de zonas de contaminación en la cuenca se emplearon imágenes generadas por el sensor mapeador temático del satélite Landsat (Landsat-TM). Determinaron que las combinaciones de bandas más apropiadas para definir la concentración de los contaminantes eran la 1,2,3 (azul, verde y rojo) y la 2,3,4 (verde, rojo e infrarrojo cercano), mientras que para la delimitación de los cuerpos de agua se utilizó una combinación de bandas infrarrojas 4,5,7. En dicho estudio encontraron la presencia de cromo trivalente y hexavalente.

Por otro lado, Zarazúa (2008) evaluó la presencia y distribución de metales pesados en el Río Lerma en las fracciones total, suspendida y soluble del agua, así como en el sedimento para inferir su movilidad química y disponibilidad. Las muestras fueron analizadas con un espectrómetro de fluorescencia de rayos X. En este trabajo se determinó que las zonas de mayor contribución y acumulación de Cr, Mn, Cu, Zn y Pb son Mezapa, Totoltepec y México-Toluca, por lo que se pueden considerar zonas de alerta y requieren acciones de prevención, control y remediación de manera prioritaria. Se detectó la presencia de cromo en agua ( $21 \mu\text{g L}^{-1}$ ), sedimento depositado ( $297 \text{ mg kg}^{-1}$ ) y sedimento suspendido ( $32 \text{ mg kg}^{-1}$ ).

En una investigación sobre la calidad bacteriológica del Río Lerma (Lima, 2007) trabajaron con 8 puntos de muestreo, dos de los cuales pertenecían al Valle de Toluca y zonas cercanas. Se muestreó la columna de agua correspondiente al puente México-Toluca y la zona de Atlacomulco. Las especies bacterianas identificadas fueron divididas en tres grupos. *Enterococcus*: encontrando *Enterococcus sp.*, *E. faecium* y *E. avium*, consideradas como parásitos oportunistas. Enterobacterias: en donde encontraron *Aeromonas hydrophila*, *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Hafnia alvei* y *Enterobacter cloacae*. Y bacterias no entéricas del grupo de *Pseudomonas aeruginosa* como *Acinetobacter iwoffii*. Entre las especies identificadas, se encontraron algunas que son consideradas como

resistentes a Cr(VI): *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*.

La presente investigación corresponde a la continuación del trabajo realizado por Bojórquez (2010). En dicho trabajo se colectaron sedimentos provenientes del Río Lerma a partir de 3 sitios de muestreo: a) Calle Alfredo del Mazo y Villa Mar, puente peatonal Totoltepec; b) Puente peatonal colonia Isidro Fabela a 500 m aguas arriba de la empresa Reciclagua y c) Puente sobre el Río Lerma, a lo largo de la carretera Toluca-Naucalpan. A partir de los sedimentos colectados, Bojórquez (2010) aisló 21 cepas resistentes a Cr(VI), de las cuales eligió 7 cepas para llevar a cabo su identificación bioquímica y molecular. Dichas cepas fueron identificadas como: *Comamonas testosteroni* A, *Pseudomonas fluorescens* B, *Pseudomonales sp.*, *Pseudomonas fluorescens* A, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas sp.* y *Pseudomonas entomophila* L48. De ellas, 5 cepas lograron tolerar concentraciones de hasta 19.23 mM (1000 mg L<sup>-1</sup>) de Cr(VI). Además, 3 cepas también mostraron tener la capacidad para reducir el Cr(VI) (*Pseudomonales sp.*, *Pseudomonas fluorescens* A y *Pseudomonas entomophila* L48). La cepa más eficiente fue *Pseudomonas entomophila* L48 al reducir en un 40.8% una concentración inicial de ≈200 mg L<sup>-1</sup> en 12 días.

## **CAPÍTULO 3**

### **PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN**

#### **3.1 Justificación contextual y científica**

La contaminación por cromo es un problema de salud debido a sus efectos sobre los organismos vivos; se ha comprobado que es mutagénico y carcinogénico en humanos, debido a su fuerte naturaleza oxidante. Es por ello que la persistencia del Cr(VI) en el ambiente es un motivo de preocupación. En el Valle de Toluca, el Río Lerma se ha convertido en el principal colector de desechos municipales e industriales de la zona, puesto que gran parte de las aguas residuales generadas son vertidas al mismo. Lo anterior ha propiciado una gran contaminación por cromo.

La existencia de tratamientos para la detoxificación de cuerpos de agua contaminados con cromo, generalmente involucra la reducción de Cr(VI) a Cr(III) por un reductor y un ajuste subsecuente del pH hasta rangos neutrales, con el fin de precipitar el Cr(III), que es poco soluble. Sin embargo, este proceso requiere grandes cantidades de reactivos y energía, lo cual es poco factible económicamente (Thacker y Madamwar, 2005). Otros métodos inmovilizan los iones cromato en una fase sólida, sin reducirlo; estos incluyen intercambio iónico, adsorción en carbón activado, entre otros. Estos métodos pueden tener un bajo costo pero usualmente se produce la desorción cuando el sólido adsorbente es depositado en vertederos, lo cual contamina aguas subterráneas (Córdoba et al. 2008).

Se ha encontrado que microorganismos aislados de sitios contaminados con cromato tienen la capacidad de reducir el Cr(VI), por lo cual, la biorremediación de Cr(VI) por bacterias resistentes a cromo, imita un proceso natural de detoxificación, con la ventaja de poder ser optimizado en el laboratorio. Además, la biorreducción de Cr(VI) ofrece una opción económica, así como ecológicamente amigable para la detoxificación de zonas contaminadas. Lo anterior es aunado a que, no requieren de gran energía de entrada ni de

reactivos químicos, además de ofrecer la posibilidad de emplear cepas nativas (Abskharon et al. 2009).

Las bacterias aisladas de sedimentos del Río Lerma por Bojórquez (2010) pueden sobrevivir en ambientes altamente contaminados y tienen la capacidad de tolerar altas concentraciones de Cr(VI). Por lo tanto, estas bacterias poseen un alto potencial de biorremediación.

### **3.2 Hipótesis**

Las bacterias *Pseudomonas cedrina* CFML 96-198, *Pseudomonas graminis* DSM 11363 y *Enterobacter cancerogenus* LMG 2693 resistentes a cromo hexavalente, pueden reducir el Cr(VI) a Cr(III) de manera individual, sin embargo, su eficiencia de reducción se incrementará al trabajar con las tres especies en consorcio, lo cual se verá reflejado en la cinética de biorreducción de Cr(VI) a Cr(III).

### **3.3 Objetivos**

#### **3.3.1 Objetivo general**

Comparar la reducción de Cr(VI) a Cr(III) por bacterias individuales respecto a un consorcio bacteriano, obteniendo sus constantes cinéticas de reducción en medio líquido y su tasa de crecimiento poblacional. Además, evaluar la eficiencia del consorcio bacteriano para reducir el Cr(VI) con biomasa suspendida y con biomasa fija.

#### **3.3.2 Objetivos específicos**

- Evaluar la compatibilidad entre especies para la formación de un consorcio bacteriano.
- Determinar la capacidad para reducir Cr(VI) a Cr(III) de las bacterias individuales y del consorcio bacteriano, así como el tiempo requerido para hacerlo.
- Obtener las curvas de crecimiento bacteriano.
- Realizar las cinéticas de reducción de Cr(VI) a Cr(III) y obtener las constantes cinéticas de las bacterias individuales y del consorcio bacteriano.
- Comprobar la posible acumulación celular de Cr(VI) y/o Cr(III).

## CAPÍTULO 4

### MATERIALES Y MÉTODOS

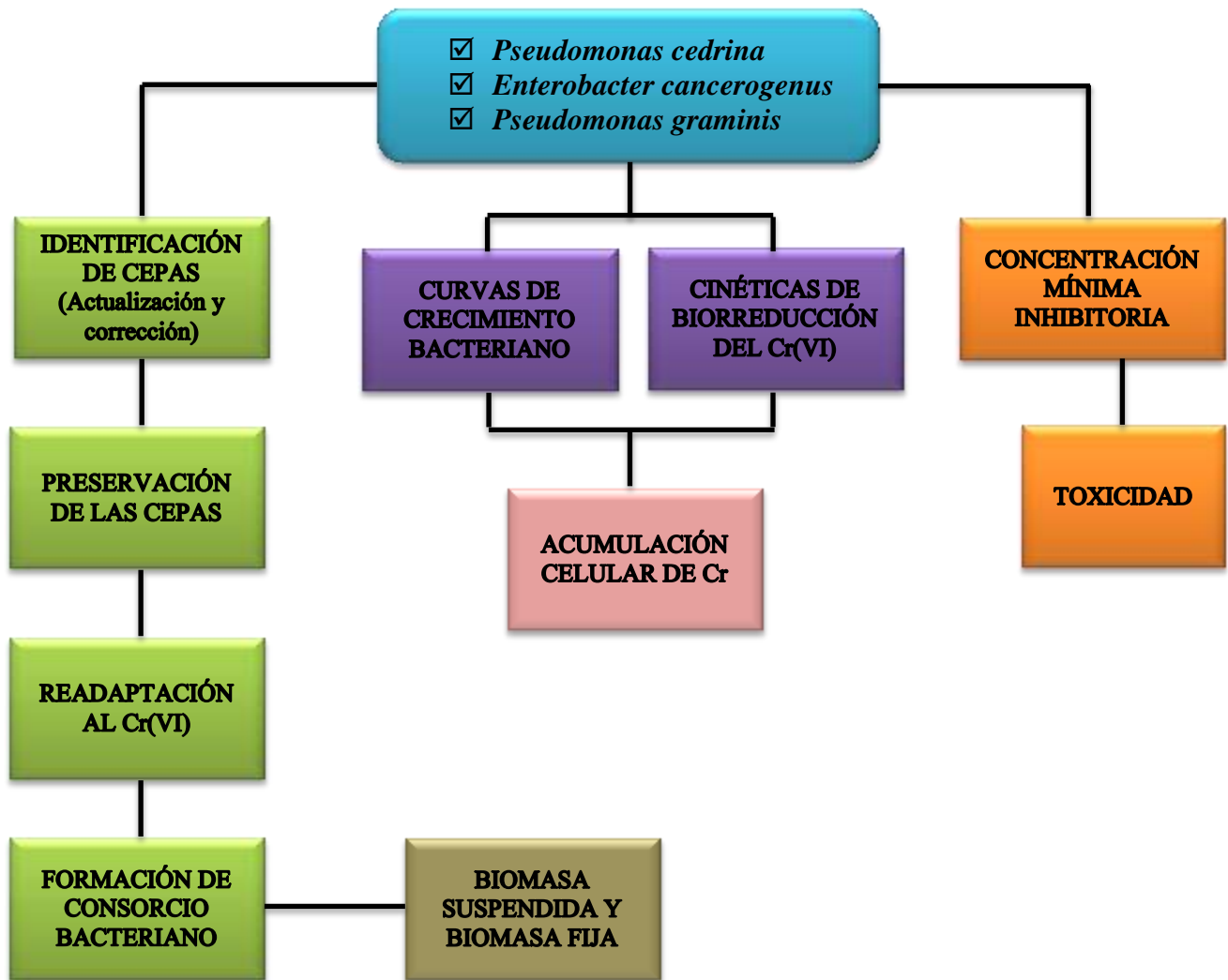


Figura 4. Diagrama general de las actividades realizadas.



## 4.1 Reactivos

Los químicos empleados fueron grado reactivo y se obtuvieron de Sigma-Aldrich de México® y J. T. Baker®. Para la determinación de cromo total se empleó ácido nítrico ultrapuro. Los medios de cultivo fueron obtenidos de Bioxon®. El dicromato de potasio y la difenilcarbazida fueron adquiridos de Fermont®.

## 4.2 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

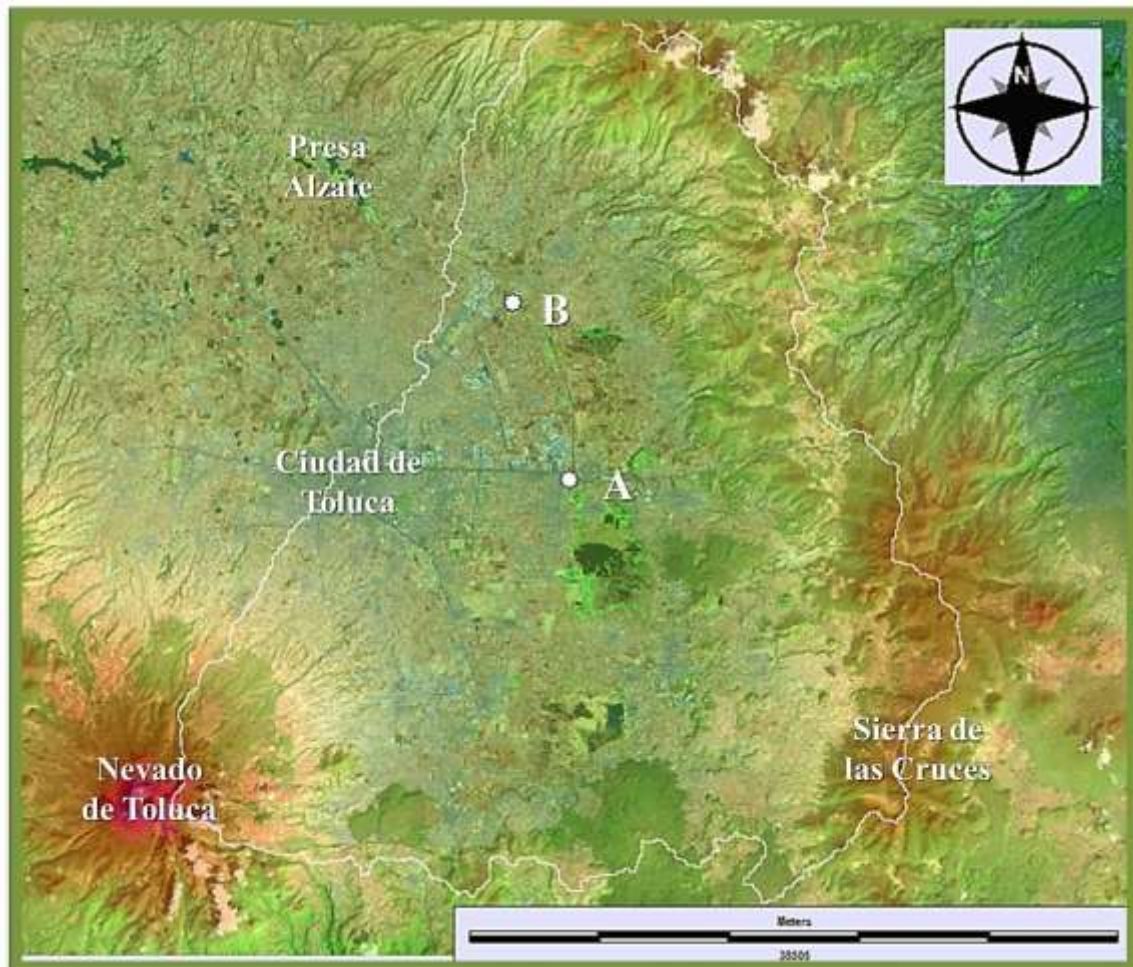
En esta investigación se emplearon tres cepas resistentes a Cr(VI) que fueron aisladas de sedimentos del Río Lerma en un estudio previo. Las cepas *Pseudomonas cedrina* y *Pseudomonas graminis* fueron aisladas en el Río Lerma bajo un puente peatonal en la colonia Isidro Fabela, 500 metros aguas arriba de la empresa Reciclagua, mientras que la cepa *Enterobacter cancerogenus* fue aislada bajo un puente ubicado a lo largo de la carretera Toluca-Naucalpan (Islas-Espinoza y Bojórquez-Aguilar, 2011). Las coordenadas UTM y geográficas de los sitios de muestreo se presentan en la Tabla 5. En la Figura 5, se puede observar la ubicación de ambos sitios de muestreo.

**Tabla 5.** Sitios de muestreo de sedimentos del Río Lerma. Fuente: Bojórquez (2010)

SITIO DE MUESTREO	Coordenadas			
	UTM		Geográficas	
	X	Y	LATITUD	LONGITUD
A. Puente peatonal, col. Isidro Fabela.	431052	2132630	19°17'.174''	99°39'.373''
B. Puente, carretera Toluca-Naucalpan.	441678	2142669	19°22'.637''	99°33'.323''

En la investigación previa realizada por Bojórquez (2010) las cepas se dejaron conservadas en agar inclinado y sin una fuente de Cr(VI). Una vez iniciado este proyecto se procedió a reactivar a las células por medio de resiembras de Agar para Métodos Estándar (AMS) a Caldo Tripticaseína y Soya (CTS) (ANEXO 1). Cada lote de resiembras se dejó en incubación a temperatura ambiente (18-20°C) en agitación constante a 150 rpm hasta conseguir el crecimiento de las bacterias.

Una vez recuperadas las cepas bacterianas, se mantuvieron viables cultivándolas en tubos con CTS, incubadas a temperatura ambiente (18-20°C) y en agitación en un oscilador digital Big Bill de Thermolyne® a 150 rpm. Durante el desarrollo de toda la investigación, se realizaron resiembras en CTS fresco suplementado con 100 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) cada 3 semanas para asegurar la viabilidad de las células, así como su resistencia al cromo.



**Figura 5.** Ubicación de los sitios de muestreo donde fueron colectadas las cepas empleadas en esta investigación. A) Colonia Isidro Fabela. B) Carretera Toluca-Naucaipan. (Delimitación de la cuenca del CARL, Franco-Plata (2008), imagen SRTM con bandas 2, 4, 5 (2009)).

### **4.3 Actualización y corrección de la identificación**

En el trabajo realizado por Bojórquez (2010) no se obtuvo una identificación precisa de las cepas bacterianas ya que en dos casos la identificación sólo llegó al nivel de género. Por esta razón, en la presente investigación se procedió a actualizar y corregir la identificación de las cepas. Las secuencias ya existentes de las bacterias fueron introducidas y comparadas con la base de datos actualizada del National Center for Biotechnology Information (NCBI) que se encuentra en el sitio web: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Se obtuvieron los porcentajes de similitud entre la secuencia introducida y las secuencias del gen ARN 16S del BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). El procedimiento para realizar la identificación de las bacterias en el BLAST es el siguiente:

- 1) Se accesa al sitio web <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
- 2) Se selecciona la base de datos a emplear. En este caso se trata de secuencias de nucleótidos, por lo tanto se eligió la base Nucleotide blast (Figura 6).
- 3) Se introduce la secuencia de nucleótidos en la sección correspondiente y se elige como opción de búsqueda la base específica: 16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea) (Figura 7). Se inicia la búsqueda.
- 4) El sistema procede a buscar las secuencias que más se asemejen a la secuencia introducida por el usuario y arroja un listado de posibles especies junto con un porcentaje de similitud entre ambas secuencias. Se elige la especie con el mayor porcentaje de similitud.

Cabe destacar que rara vez se obtiene un 100% de concordancia ya que ésta depende de las características de la secuencia introducida. Una secuencia de nucleótidos ideal se compone de 1300 a 1500 pb y debe contener menos del 1% de posiciones ambiguas (nucleótidos no identificados).

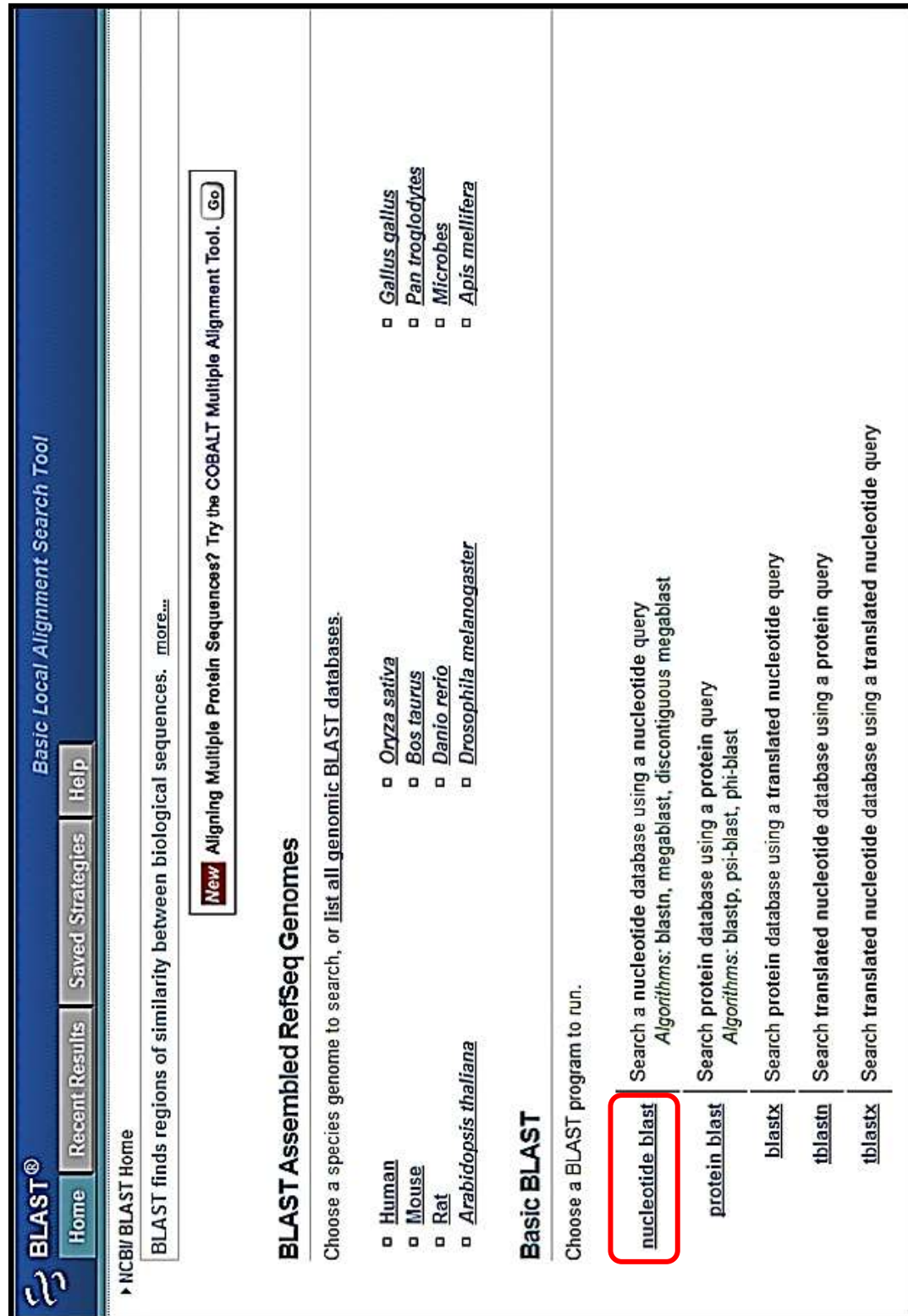


Figura 6. Apariencia del sitio web del BLAST donde se realizó la actualización de la identificación de las cepas. El recuadro muestra la base de datos empleada para la identificación de las cepas.

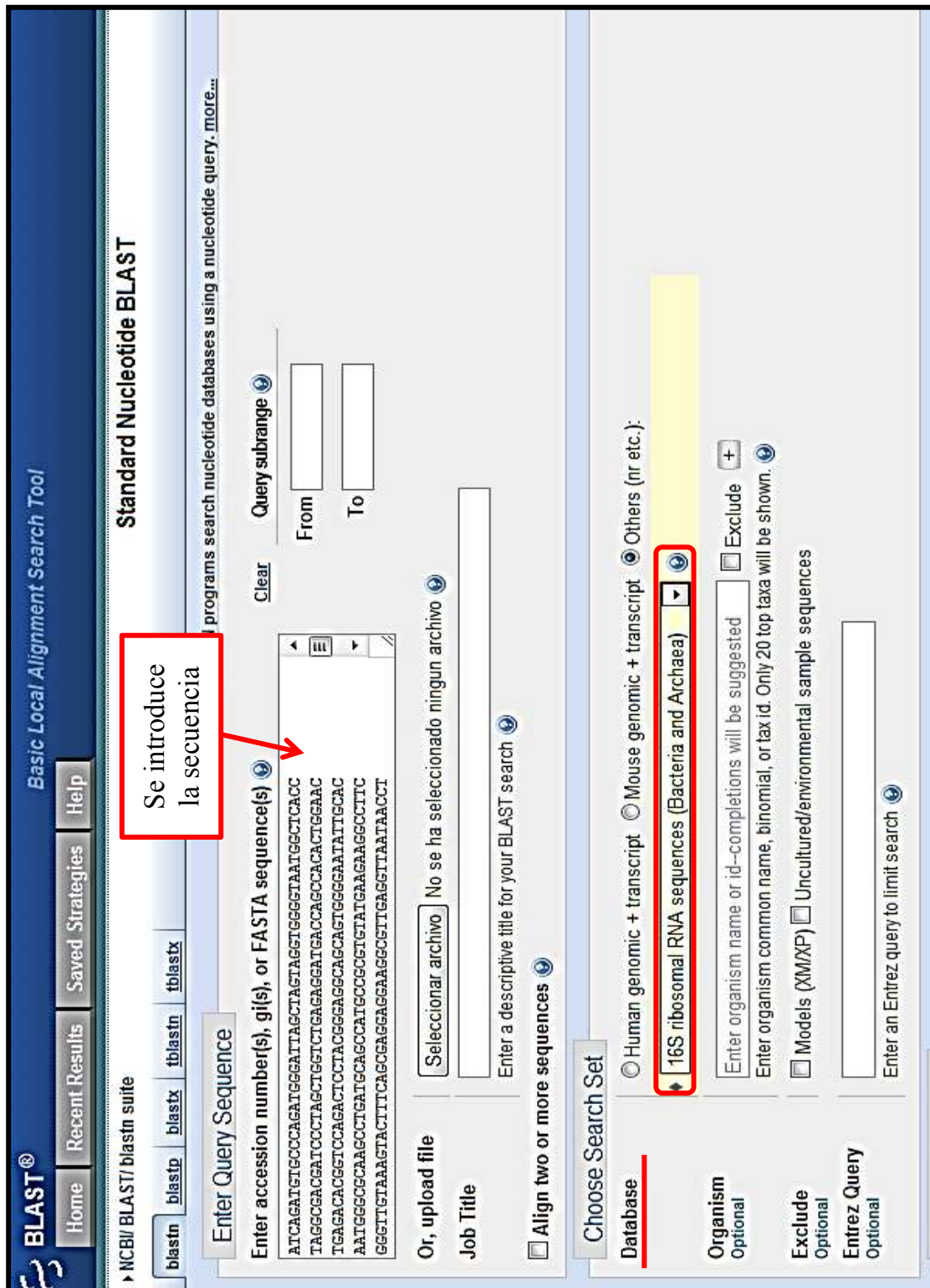


Figura 7. Sitio web del BLAST. La flecha situada en la parte posterior indica el sitio donde se introduce la secuencia que se requiere buscar. El recuadro inferior muestra la base de datos específica que se utilizó para la identificación de las cepas.

#### **4.4 Preservación de cepas bacterianas**

Las 3 especies fueron preservadas en glicerol de acuerdo con el siguiente procedimiento: las bacterias fueron cultivadas en tubos con 8 mL de CTS. Los cultivos se dejaron incubar durante 48 horas a temperatura ambiente y en agitación a 150 rpm. Posteriormente los tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante. De la biomasa obtenida, se tomó una asada de bacterias y se resuspendió en un vial para congelación con 1 mL de medio fresco (CTS) con 15% (v/v) de glicerol. Lo anterior se realizó por duplicado. Los viales se etiquetaron y la mitad de ellos se conservaron en un ultracongelador a -80°C, mientras que la otra mitad se conservaron en un tanque con nitrógeno líquido a -196°C.

#### **4.5 Fase de readaptación**

Debido a que antes de reactivar las bacterias, estas permanecieron conservadas por un periodo aproximado de 6 meses sin una fuente de Cr(VI) en el medio de cultivo, se realizó una fase de readaptación de las bacterias al contacto con el Cr(VI) antes de realizar las pruebas para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI). Se inició la readaptación en tubos con CTS + 50 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI), continuando con 100 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) y posteriormente 200 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI). Entre cada fase de readaptación se dejaron incubar las bacterias durante al menos 48 horas, para después hacer una resiembra en caja Petri con AMS y observar el crecimiento bacteriano. Una vez que se comprobó la viabilidad de las células, se procedió a resembrarlas en medio fresco (CTS) con la siguiente concentración de Cr(VI).

#### **4.6 Formación de consorcios**

En esta investigación se llevaron a cabo pruebas con cultivos individuales así como con consorcios bacterianos. El desarrollo de consorcios bacterianos sólo es posible si las bacterias logran crecer en forma conjunta en un cultivo. Es por ello que se evaluó la posibilidad de que las bacterias liberaran alguna actividad antimicrobiana (Barrionuevo et al. 2009).

Para la formación de los consorcios bacterianos previamente se mantuvieron los cultivos individuales de las 3 especies en tubos con CTS incubados durante 48 horas. Se prepararon cajas Petri con AMS. En cada caja Petri se resembraron las 3 especies juntas de la siguiente manera: Se tomaron 50  $\mu\text{L}$  de una cepa y se resembró con el método de difusión con hisopo estéril con el objetivo de formar una capa uniforme de bacterias en toda la superficie del agar. Una vez que se realizó la resiembra por difusión, se realizaron dos perforaciones en el agar de 6 mm de diámetro con un sacabocados estéril, posteriormente, se tomaron alícuotas de 50  $\mu\text{L}$  de cultivo líquido de las dos especies restantes y se vertieron dentro de cada orificio realizado en el agar. Las cajas se dejaron incubar a temperatura ambiente (20°C) durante 48 horas, transcurrido este tiempo, se revisó la presencia de halos de inhibición alrededor de los orificios (ANEXO 2). Lo anterior se llevó a cabo por triplicado.

Los halos de inhibición son prueba de actividad antimicrobiana. La ausencia de halos de inhibición es indicio de compatibilidad entre las especies para formar consorcios bacterianos.

## **4.7 Resistencia bacteriana a Cr(VI)**

### *4.7.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)*

La CMI se determinó con el método de dilución en caldo (Madigan et al. 2003) que consiste en una serie de tubos con CTS y Cr(VI) con diluciones sucesivas, lo que resulta en tubos con diferentes concentraciones de Cr(VI), dichos tubos son inoculados e incubados, la ausencia de turbidez en los tubos es muestra de la inhibición en el crecimiento bacteriano. Las bacterias fueron cultivadas en tubos de plástico con 8 mL de CTS e incubadas en agitación (150 rpm) a temperatura ambiente por 48 horas. Por cada cepa, se preparó una serie de 13 tubos: uno de ellos fue el control negativo que contenía 400  $\mu\text{L}$  de inóculo sin Cr(VI); dos tubos correspondieron a los controles positivos que contenían la concentración más alta de Cr(VI) sin inóculo; los 10 tubos restantes contenían concentraciones descendentes de Cr(VI) ( $\text{mg L}^{-1}$ ) 600, 400, 300, 200, 150, 100, 75, 50, 37.5 y 25 con el fin de probar un amplio intervalo de concentraciones. Se trabajó con 2 series:

una serie de 600 a 37.5 mg L<sup>-1</sup> Cr(VI) y otra de 400 a 25 mg L<sup>-1</sup> Cr(VI) (ANEXO 3). Los 10 tubos fueron inoculados con 400 µL de la cepa correspondiente y se dejaron incubar a temperatura ambiente, en agitación a 150 rpm. Cada prueba se realizó por triplicado.

La CMI fue determinada como la concentración más baja de Cr(VI) capaz de inhibir completamente el desarrollo bacteriano en el tubo, el punto final quedó definido a simple vista por la falta de turbidez en el caldo (INEI, 2001).

#### 4.7.2 Prueba de toxicidad

El análisis de toxicidad fue realizado con el método Microtox®, este se empleó para comparar las concentraciones de Cr(VI) que pueden resistir las 3 especies bacterianas empleadas en esta investigación contra la bacteria *Photobacterium phosphoreum*. El bioensayo de toxicidad aguda con Microtox® está basado en el efecto que una muestra ambiental tiene sobre la intensidad de la luz emitida por la bacteria marina bioluminiscente *Photobacterium phosphoreum*, en condiciones controladas de exposición por un período de 5 a 30 minutos (NMX-AA-112-1995-SCFI). La toxicidad reduce la actividad enzimática y, por lo tanto, reduce la producción de luz en esta bacteria. La intensidad de la luz emitida por las bacterias expuestas a la muestra se compara con la emitida por bacterias que permanecen en las condiciones óptimas del sistema control.

##### - Preparación del reactivo (Reactivación de la bacteria liofilizada)

Se colocaron 5 celdillas en los pozos de incubación del sistema Microtox y se colocó un vial en la celdilla del pozo de activación. A este último se agregaron 1000 µL de solución de reconstitución y se dejaron estabilizar de 5 a 10 minutos. Se tomó un frasco de bacteria liofilizada del congelador y se vació en él la solución de reconstitución. Estas acciones se efectuaron rápidamente para evitar un efecto de choque osmótico a las bacterias. Se transfirió la mezcla nuevamente a la celdilla de activación y se continuó su incubación a 5 ± 1 °C. Se dejó reposar por un tiempo aproximado de 15 minutos con el propósito de que la bacteria se hidratara y revitalizara.

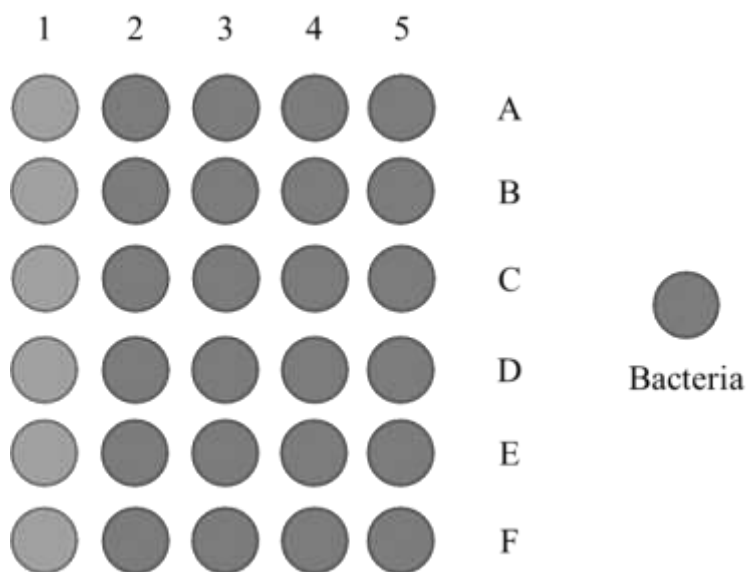


- *Preparación de la muestra*

Para el análisis de las muestras, el sistema se preparó de la siguiente manera: Se agregaron 1000  $\mu\text{L}$  de solución diluyente en las celdillas 1, 2, 3 y 4. Se agregaron 250  $\mu\text{L}$  de solución de ajuste osmótico y 2500  $\mu\text{L}$  de la muestra problema en la celdilla 5. Se mezclaron por pipeteo. De forma paralela, se prepararon controles negativos con una solución de agua desionizada libre de compuestos tóxicos, adicionada con solución diluyente al 2%.

- *Preparación de diluciones*

Se elaboraron una serie de diluciones transfiriendo 1000  $\mu\text{L}$  de la celdilla 5 a la 4, de la 4 a la 3 y de la 3 a la 2, mezclando cada vez. Se desecharon 1000  $\mu\text{L}$  de la celdilla 2 y 750  $\mu\text{L}$  de la celdilla 5 con el objetivo de uniformizar volúmenes a 1000  $\mu\text{L}$ . La celdilla 1 fue considerada como control negativo (Figura 8). Una vez concluido lo anterior, se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de la bacteria *Photobacterium phosphoreum* en las filas B, D, y F. Posteriormente, se inició la lectura de las diluciones y la adquisición de datos. Al concluir el bioensayo se obtuvieron los valores de concentración efectiva media ( $\text{CE}_{50}$ ) a través del programa Omni Software, las cuales se expresaron en porcentaje (%).



**Figura 8.** Esquema de disposición de las celdillas en Microtox®.

## 4.8 Biorreducción y acumulación de Cr

### 4.8.1 Preparación de solución madre de Cr(VI)

Se preparó una solución madre a una concentración de 10 000 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI), empleando 28.269 g de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> por litro de agua destilada. La solución fue esterilizada por filtración y añadida a medio estéril en la concentración deseada. Se empleó la solución madre concentrada con el objetivo de utilizar alícuotas pequeñas y obtener una mínima dilución del medio de cultivo (DeLeo y Ehrlich, 1994).

### 4.8.2 Preparación del inóculo bacteriano

El crecimiento bacteriano y la determinación del inóculo inicial empleado se determinó por densidad óptica. La determinación de la biomasa mediante la luz dispersada por una suspensión de bacterias permite la medición de las mismas en forma instantánea. Las suspensiones de microorganismos dispersan luz generando turbiedad, la cual puede ser estimada a partir de la cantidad de luz transmitida. La densidad óptica de un cultivo es proporcional a la turbidez, la cual a su vez, es proporcional a la densidad bacteriana presente en el cultivo. (Martín, 2001).

La densidad óptica a una longitud de onda específica se describe con la siguiente ecuación:

$$D.O._{\lambda} = \frac{A_{\lambda}}{l} = -\frac{1}{l} \log T = \frac{1}{l} \log \left( \frac{I_o}{I} \right) \quad (4)$$

Donde:

$l$  es la distancia que la luz viaja a través de una muestra (grosor celda) (cm).

$A_{\lambda}$  es la absorbancia a una longitud de onda específica  $\lambda$ .

$T$  es la transmitancia.

$I_o$  es la intensidad del rayo de luz incidente.

$I$  es la intensidad del rayo de luz transmitido.

El inóculo bacteriano empleado en las pruebas de biorreducción se preparó a partir de un cultivo de 48 horas de incubación en CTS. Los tubos con dicho cultivo se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos con el fin de separar las células del medio de cultivo. El sobrenadante se desechó y las células fueron lavadas 2 veces con agua destilada estéril. Posteriormente las células fueron resuspendidas en 1 mL de agua destilada estéril, a partir de esta solución se prepararon tubos con agua destilada estéril a los que se agregaron alícuotas del cultivo hasta obtener una densidad óptica de 0.06 para las cepas individuales y de 0.02 de cada especie para formar el consorcio bacteriano. La densidad óptica fue medida en un espectrofotómetro HACH DR 2800 a una longitud de onda  $\lambda = 600$  nm empleando agua destilada como blanco (ANEXO 4).

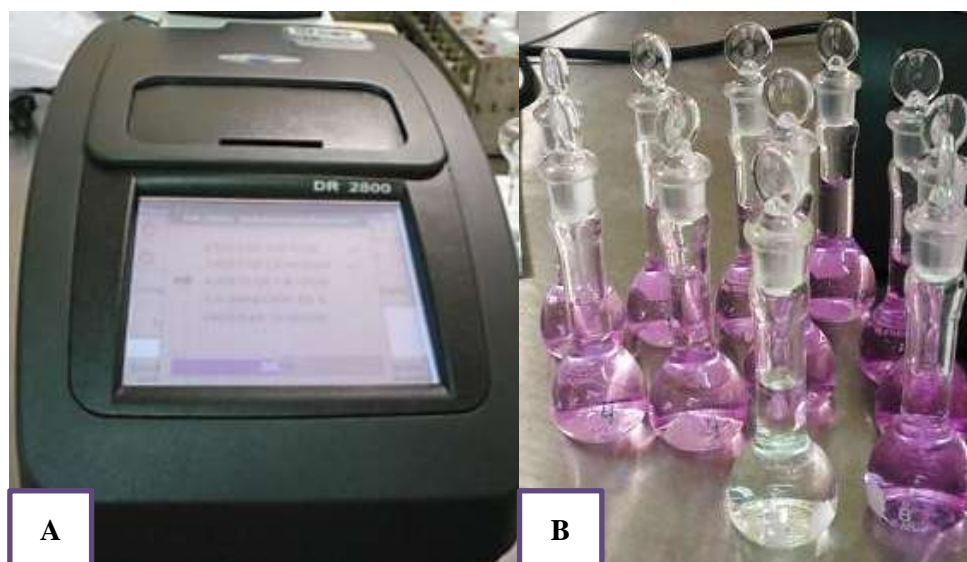
La densidad óptica inicial del inóculo fue de 0.06 como la emplearon Dmitrenko et al. (2003), Thacker y Madamwar, (2005) y Córdoba et al. (2008). Se empleó 1 mL de cultivo para inocular cada matraz. El número inicial de UFC se estimó con base en el reportado por Poustka et al. (1984) en donde la densidad óptica de 0.06 equivale aproximadamente a  $3 \times 10^5$  UFC/mL. No se determinó el peso seco del cultivo ya que dicho procedimiento requiere mínimo de 25 mL de muestra con una densidad bacteriana de al menos  $1 \times 10^7$  células, además es una técnica que arroja bastantes errores cuando la densidad bacteriana es baja pues es difícil pesar menos de 1 mg con exactitud.

#### *4.8.3 Medición de Cr(VI)*

Las muestras obtenidas para medición de Cr(VI) fueron centrifugadas a 6000 rpm durante 10 minutos. Para las pruebas de biorreducción el Cr(VI) se midió en el sobrenadante y para el caso de acumulación celular se midió en el precipitado. El Cr(VI) se determinó por el método colorimétrico con 1,5-difenilcarbazida (APHA, 1998). El método se basa en una reacción de óxido reducción donde el Cr(VI) reacciona con la 1,5-difenilcarbazida en medio ácido para dar Cr(III) y 1,5-difenilcarbazona de color rojo-violeta que se lee espectrofotométricamente a  $\lambda = 543$  nm. La reacción con difenilcarbazida es prácticamente específica para el Cr(VI). Las sales de molibdeno hexavalente y de mercurio pueden reaccionar para formar color con el reactivo pero sólo en concentraciones mayores de 200

mg L<sup>-1</sup> (DOF, 2001). La solución de difenilcarbazida (5 mg L<sup>-1</sup>) se preparó disolviendo 250 mg de difenilcarbazida en 50 mL de acetona. Dicha solución se almacenó en un frasco ámbar y en refrigeración a 4°C.

Para realizar las mediciones se empleó un espectrofotómetro HACH DR 2800. El Cr(VI) fue medido a una longitud de onda  $\lambda = 543$  nm (Figura 9). Las concentraciones de Cr(VI) se determinaron con ayuda de una curva de calibración (0.01, 0.03, 0.07, 0.1, 0.3 y 0.7 mg L<sup>-1</sup>) previamente elaborada y modificada a microescala (ANEXO 5).



**Figura 9.** A) Espectrofotómetro HACH DR 2800 en donde se determinó la cantidad de Cr(VI). B) La coloración violeta se forma luego de la reacción de la difenilcarbazida con el Cr(VI), la intensidad de la coloración es proporcional a la cantidad de Cr(VI) presente en la muestra.

#### 4.8.4 Medición de cromo total (Cr) y Cr(III)

Para medición de cromo total se emplearon alícuotas de 5 mL de cada muestra y se realizaron diluciones 1:10 y 1:2 con HNO<sub>3</sub> 0.5 M dependiendo de la concentración de cromo presente en la muestra. El contenido de cromo total en las muestras fue determinado mediante espectrofotometría de absorción atómica en un equipo Varian® modelo SpectrAA-600 con una llama de aire-acetileno (Figura 10).



**Figura 10.** A) Espectrofotómetro de absorción atómica SpectrAA-600 empleado para la determinación de cromo total. B) Medición de cromo total en las muestras.

Para las pruebas de biorreducción se emplearon 3 curvas de calibración de acuerdo con la concentración de Cr (**ANEXO 6**).

- ⊙ 5, 10, 15 y 25 mg L<sup>-1</sup> Cr y control de 20 mg L<sup>-1</sup> Cr;
- ⊙ 10, 15, 25 y 30 mg L<sup>-1</sup> Cr y control de 20 mg L<sup>-1</sup> Cr, ambas leídas a una longitud de onda  $\lambda = 425.4$  nm y
- ⊙ 2, 4, 6 y 8 mg L<sup>-1</sup> Cr y control de 5 mg L<sup>-1</sup> Cr a una longitud de onda  $\lambda = 357.9$  nm.

Para las pruebas de acumulación celular de Cr también se emplearon 3 curvas de calibración (**ANEXO 6**):

- ⊙ 0.16, 0.3, 0.6, 1.2 mg L<sup>-1</sup> Cr y control de 0.5 mg L<sup>-1</sup> Cr y
- ⊙ 0.6, 1.2, 2, 5 mg L<sup>-1</sup> Cr y control de 4 mg L<sup>-1</sup> Cr, ambas leídas a una longitud de onda  $\lambda = 357.9$  nm y
- ⊙ 1.2, 2, 4, 8 mg L<sup>-1</sup> y control de 5 mg L<sup>-1</sup> Cr, leída a  $\lambda = 429$  nm.

El Cr(III) fue considerado como la diferencia entre Cr total y el Cr(VI).

#### 4.8.5 Curvas de crecimiento bacteriano

En las curvas de crecimiento bacteriano se comparó el crecimiento de cada cepa y del consorcio bacteriano en presencia de Cr(VI) y sin él (Tabla 6). De manera aséptica se tomaron alícuotas de 1 mL de cada muestra a diferentes tiempos para la medición de biomasa por densidad óptica, ésta se midió en un espectrofotómetro HACH DR 2800 a una longitud de onda  $\lambda = 600$  nm. Se empleó CTS estéril como blanco. La densidad óptica inicial fue de 0.06 para cada curva de crecimiento. Todas las pruebas se hicieron por triplicado. Para la elaboración de las curvas de crecimiento se empleó la escala logarítmica (ln D.O.) con el fin de apreciar las fases del crecimiento bacteriano. La densidad óptica fue monitoreada hasta que se observó una reducción completa del Cr(VI) en el medio.

**Tabla 6.** Grupos experimentales de las curvas de crecimiento bacteriano.

Curva de crecimiento	CTS + <i>Pseudomonas cedrina</i>
Curva de crecimiento	CTS + <i>Pseudomonas graminis</i>
Curva de crecimiento	CTS + <i>Enterobacter cancerogenus</i>
Curva de crecimiento	CTS + Consorcio bacteriano
Curva de crecimiento	CTS + 50 mg L <sup>-1</sup> Cr(VI) + <i>Pseudomonas cedrina</i>
Curva de crecimiento	CTS + 50 mg L <sup>-1</sup> Cr(VI) + <i>Pseudomonas graminis</i>
Curva de crecimiento	CTS + 50 mg L <sup>-1</sup> Cr(VI) + <i>Enterobacter cancerogenus</i>
Curva de crecimiento	CTS + 50 mg L <sup>-1</sup> Cr(VI) + Consorcio bacteriano

#### 4.8.6 Cinéticas de biorreducción de Cr(VI) a Cr(III)

Se utilizó la concentración de Cr(VI) de 50 mg L<sup>-1</sup> para llevar a cabo las cinéticas de biorreducción de Cr(VI) a Cr(III) de las tres cepas y del consorcio bacteriano. Se emplearon matraces Erlenmeyer con CTS, la concentración de cromo elegida y el inóculo, el volumen final de cada matraz fue de 80 mL. Se prepararon 2 controles positivos: uno con agua destilada y otro con CTS, ambos con 50 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI), sin inóculo. Asimismo se empleó un matraz con CTS estéril y sin Cr(VI) que sirvió como blanco.

Los matraces se mantuvieron a temperatura ambiente (18-20°C), en agitación constante a 150 rpm. Se tomaron, de manera aséptica, alícuotas de 7 mL, a diferentes tiempos (h): 0, 24, 72, 120 o hasta obtener la máxima reducción de Cr(VI). Se empleó 1 mL para la medición de Cr(VI) (sección 4.8.3) y 5 mL para la medición de Cr(III) (sección 4.8.4). En la Tabla 7 se muestran los grupos experimentales de las cinéticas de biorreducción. También se midió el pH con tiras reactivas de todas las muestras a lo largo del tiempo. Todas las cinéticas se hicieron por triplicado.

**Tabla 7.** Grupos experimentales de las cinéticas de crecimiento bacteriano y biorreducción de Cr(VI).

1	Blanco	CTS
2	Control positivo	CTS + 50 mg L <sup>-1</sup> Cr(VI)
3	Control positivo	H <sub>2</sub> O destilada + 50 mg L <sup>-1</sup> Cr(VI)
C1, C2, C3	Cinética de biorreducción	CTS + 50 mg L <sup>-1</sup> Cr(VI) + <i>Pseudomonas cedrina</i>
C4, C5, C6	Cinética de biorreducción	CTS + 50 mg L <sup>-1</sup> Cr(VI) + <i>Pseudomonas graminis</i>
C7, C8, C9	Cinética de biorreducción	CTS + 50 mg L <sup>-1</sup> Cr(VI) + <i>Enterobacter cancerogenus</i>
C10, C11, C12	Cinética de biorreducción	CTS + 50 mg L <sup>-1</sup> Cr(VI) + Consorcio bacteriano

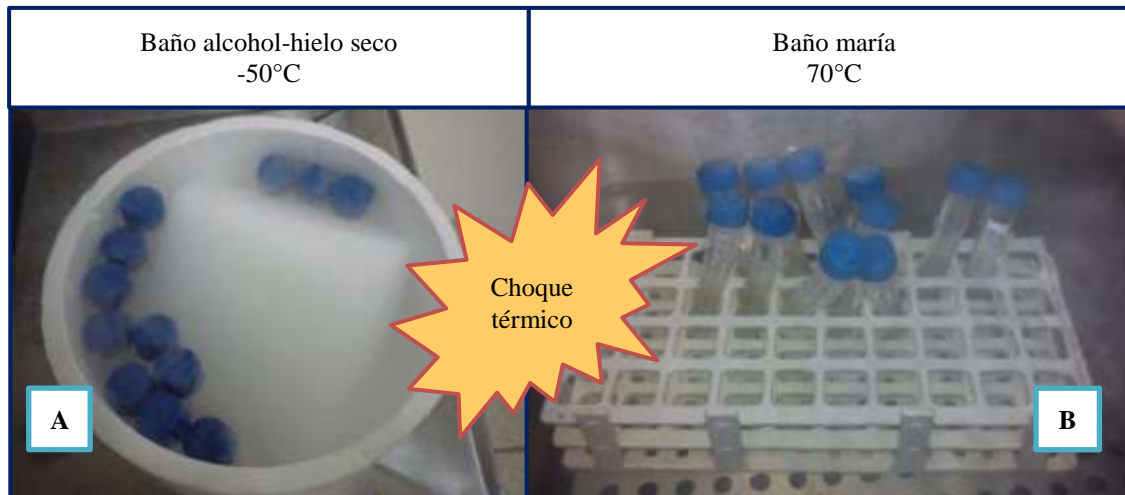
Por otra parte, debido a que cada cepa bacteriana puede interactuar con el Cr(VI) de manera distinta, fue necesario obtener las constantes cinéticas de cada especie, así como del consorcio bacteriano. Todas las cinéticas de biorreducción se ajustaron a un modelo polinomial de segundo grado (ec. 5) y la ecuación originada fue derivada (ec. 6) a fin de determinar la tasa de biorreducción de Cr(VI) a Cr(III) correspondiente a la tasa máxima de utilización del substrato  $k$ .

$$y = ax^2 - bx + c \quad (5)$$

$$\frac{dy}{dx} = 2ax - b \quad (6)$$

#### 4.8.7 Determinación de acumulación celular de Cr(VI) y/o Cr(III)

Debido a que se desconoce el mecanismo de detoxificación que presentan las bacterias empleadas en esta investigación, se llevó a cabo una prueba para corroborar o descartar la acumulación celular de Cr(VI) y/o Cr(III). Las muestras fueron centrifugadas a 6000 rpm durante 5 minutos. La biomasa precipitada se trató por el método de choque térmico (congelación-descongelación). Los tubos fueron congelados durante 5 minutos en un baño de alcohol-hielo seco (-50°C) y posteriormente descongelados en un baño maría a 70°C durante 3 minutos, dicho proceso fue repetido 5 veces con cada muestra con el fin de provocar la lisis celular y liberar el Cr acumulado en las células (Figura 11). Realizado esto, se resuspendió la biomasa con 5 mL de agua destilada. Se midió Cr(VI) y Cr(III) como se describe en el apartado 4.8.3. y 4.8.4, respectivamente.



**Figura 11.** Método de lisis celular por choque térmico. A) Los tubos se congelaron durante 5 minutos en un baño de alcohol-hielo seco. B) Los tubos ya congelados se transfirieron a un baño maría a 70°C, permanecieron ahí por 3 minutos. El proceso se repitió 5 veces con cada muestra.

#### 4.9 Biorreducción de Cr(VI) con biomasa suspendida y biomasa fija

Esta prueba se realizó en “batch” y únicamente con el consorcio bacteriano con el fin de comparar la reducción de Cr(VI) con biomasa suspendida y con biomasa fija.

Para las pruebas con biomasa suspendida se emplearon matraces Erlenmeyer con 80 mL de volumen total que contenían: CTS con 50 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) y 1 mL de inóculo bacteriano



(sección 4.8.2). Se tomaron alícuotas a diferentes tiempos (h): 0, 24, 48, 72 y hasta obtener la reducción completa del Cr(VI) (Tabla 8). A partir de cada alícuota se determinaron el Cr(VI) y el Cr(III), como se describió anteriormente (secciones 4.8.3 y 4.8.4).

**Tabla 8.** Grupos experimentales de las pruebas con biomasa suspendida y biomasa fija.

Blanco	CTS
Control positivo	CTS + 50 mg L <sup>-1</sup> Cr(VI)
Control positivo	CTS + 50 mg L <sup>-1</sup> Cr(VI) + gránulos sin biomasa
Control negativo	CTS + biomasa suspendida (consorcio)
Control negativo	CTS + gránulos con biomasa (consorcio)
Biomasa suspendida	CTS + 50 mg L <sup>-1</sup> Cr(VI) + biomasa suspendida (consorcio)
Biomasa fija	CTS + 50 mg L <sup>-1</sup> Cr(VI) + gránulos con biomasa (consorcio)

En lo que concierne a los experimentos con biomasa fija, se formaron gránulos con alginato de sodio al 4% para inmovilizar las células bacterianas como lo reportaron Benazir et al. (2010). Se mezcló 1 mL de cultivo del consorcio bacteriano (D.O. = 0.6) con 9 mL de alginato de sodio estéril (4 %) para tener una D. O. final de 0.06. La mezcla obtenida se añadió goteando lentamente con una micropipeta en tubos con 20 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.1M estéril para obtener gránulos de tamaño similar. Los gránulos permanecieron en el CaCl<sub>2</sub> 0.1M durante 24 horas en agitación a 60 rpm, se añadieron 3 mL de CTS a cada tubo para mantener las células viables. Posteriormente, los gránulos fueron filtrados (con papel filtro estéril), se enjuagaron con agua destilada estéril y se colocaron en los matraces correspondientes (Tabla 8). Los matraces se mantuvieron a temperatura ambiente (18-20°C) en agitación constante a 60 rpm (Figura 12).

Se tomaron alícuotas de 5.1 mL de cada matraz y se emplearon 5 mL para medición de Cr(III) (sección 4.8.4) y 0.1 mL para medición de Cr(VI) (sección 4.8.3). También se tomó 1 mL de cada muestra para medición de biomasa por densidad óptica. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.



**Figura 14.** Prueba de biomasa fija. A) Inmovilización de la biomasa en gránulos de alginato, se goteó el alginato de sodio en una solución de  $\text{CaCl}_2$  0.1 M. B) Los gránulos formados permanecieron en agitación por 24 horas, posteriormente se filtraron y C) se colocaron en los matraces correspondientes. D) Los matraces se mantuvieron en agitación a 60 rpm hasta la completa reducción del Cr(VI).

#### 4.10 Análisis estadístico

Se utilizó un diseño de bloques al azar con 3 tratamientos (3 cepas) más el consorcio bacteriano formado y 3 repeticiones. Para comparar los resultados entre los diferentes tratamientos, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con  $\alpha = 0.05$  en Excel. Posteriormente se aplicó la prueba de Tukey al 0.05 de probabilidad.

## **CAPÍTULO 5**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **5.1 Preservación y mantenimiento de cepas bacterianas**

De las 7 cepas aisladas e identificadas en el trabajo de Bojórquez (2010) sólo se lograron reactivar 5 cepas bacterianas, las restantes dos especies perdieron su viabilidad.

Debido a que antes de hacer la reactivación de las cepas bacterianas, estas permanecieron alrededor de 6 meses en tubos con agar inclinado, es probable que los nutrientes del medio de cultivo se hayan agotado y por ende, esto haya conducido a la muerte de las bacterias. Como menciona Maier (2000) el crecimiento de las bacterias es balanceado por un número igual de células muriendo. Cuando se trabaja con un cultivo cerrado, como el caso de tubos con agar inclinado, pueden ocurrir dos fenómenos: 1) un nutriente esencial del medio de cultivo se usa y llega a ser un factor limitante del crecimiento, es decir, el nutriente se agota; o bien 2) se acumulan en el medio algunos productos de desecho hasta niveles inhibitorios que hacen que cese el crecimiento exponencial. El metabolismo de las bacterias varía con la especie, las especies con un metabolismo más acelerado pueden agotar con mayor rapidez los nutrientes del medio de cultivo y si no son transferidas a medio fresco, las bacterias mueren. Es probable que las dos cepas que no pudieron ser reactivadas agotaran los nutrientes del medio de cultivo y murieran. El proceso de transferir las células bacterianas a medio fresco permitió que las 5 cepas restantes recuperaran su viabilidad.

Las 5 cepas recuperadas se preservaron en glicerol (al 15%) para su posterior análisis y se guardaron en un congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  y también en nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  (Sánchez y Corrales, 2005). Las cepas bacterianas actualmente se encuentran preservadas en el laboratorio de Análisis Molecular del Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Salud Animal (CIESA) de la UAEMex.

## 5.2 Identificación actualizada de las cepas bacterianas

En el trabajo realizado por Bojórquez (2010) no se obtuvo una identificación bien definida de las cepas bacterianas, por lo tanto, las secuencias de las bacterias volvieron a ser introducidas en el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) para realizar una búsqueda en la base de datos actualizada del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Cabe mencionar que dicha base de datos es actualizada frecuentemente cada vez que los investigadores descubren nuevas especies u obtienen nuevas secuencias. La nueva búsqueda permitió obtener un acercamiento más definido a las posibles especies, así como los porcentajes de similitud entre la secuencia introducida y las secuencias del gen ARN 16S del BLAST.

En la Tabla 9 se muestran las especies que corresponden a cada una de las 5 cepas identificadas, su porcentaje de similitud entre las secuencias, así como los números de acceso con los que cada cepa es identificada en la base de datos. Como se observa, las cepas 2a, 7, y 17 resultaron ser de la misma especie. Las especies propuestas en esta investigación son las que correspondieron al mayor porcentaje de similitud (98%) entre la secuencia introducida en el BLAST y la secuencia encontrada en la base de datos del mismo. Por lo tanto, las secuencias de nucleótidos de las bacterias empleadas en este trabajo poseen un 98% de similitud entre las secuencias de las especies mostradas en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Identificación actualizada de las 5 cepas bacterianas.

ID	Organismos relacionados	% Similitud	Número de Acceso
2a	<i>Pseudomonas cedrina</i> CFML 96-198	98	NR_024912.1
7	<b><i>Pseudomonas cedrina</i> CFML 96-198</b>	98	NR_024912.1
8	<b><i>Enterobacter cancerogenus</i> LMG 2693</b>	98	NR_044977.1
17	<i>Pseudomonas cedrina</i> CFML 96-198	98	NR_024912.1
20	<b><i>Pseudomonas graminis</i> DSM 11363</b>	98	NR_026395.1

Las 3 cepas empleadas en esta investigación se indican en “negritas” en la Tabla 9. En la sección 5.9 se describe la razón de dicha elección.

### **5.3 Fase de readaptación**

Debido a que las cepas empleadas en esta investigación permanecieron un tiempo prolongado en medio libre de Cr(VI), perdieron su resistencia. Esto fue comprobado en una prueba preliminar en donde las bacterias, una vez reactivadas, fueron resembradas en medio (CTS) con una concentración de 150 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI). Ninguna de las 3 cepas creció bajo dichas condiciones. Por esa razón, se procedió a readaptar a las cepas bacterianas a concentraciones crecientes de Cr(VI).

En las pruebas de readaptación al Cr(VI) se pudo observar que con 50 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) las 3 cepas presentaron crecimiento por incremento de turbidez a las 48 horas de incubación. Al colocarles 100 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI), el crecimiento se observó hasta las 72 horas. Para readaptar a las bacterias a 200 mg L<sup>-1</sup> se requirió dejarlas incubando durante 168 horas, sin embargo, transcurrido este tiempo, presentaron crecimiento. Este procedimiento permitió que las cepas crearan nuevamente resistencia al Cr(VI) ya que se ha investigado que bacterias resistentes pueden perder su resistencia al cultivarse en medio libre de contaminante (Chandrasekaran y Lalithakumari, 1998).

Algunas bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Enterobacter* poseen resistencia a diferentes sustancias (metales pesados o antibióticos) mediada por plásmidos (Ünaldi, 2005; Chandrasekaran y Lalithakumari, 1998). En su estudio, Smith y Bidochka (1998) mencionan que los plásmidos de resistencia son estables en tanto no cambien las condiciones de almacenamiento de las cepas. Las condiciones ambientales también pueden influenciar en la inestabilidad o desamplificación del plásmido. Los plásmidos que confieren resistencia a ciertos antibióticos son los más estudiados y se sabe que el mejor método para conservar dichos plásmidos es mantener a las bacterias en un cultivo en presencia de antibióticos. En una investigación realizada por Chandrasekaran y Lalithakumari (1998) estudiaron la estabilidad de un plásmido multirresistente a

antibióticos en *Pseudomonas putida* y *E. coli* bajo condiciones libres de estrés. Encontraron que ambas cepas perdieron dicho plásmido dentro de los 25 días subsecuentes al ser resembradas repetidamente en medio sin ninguna fuente de antibiótico. Por otra parte, también existen enzimas reductoras de Cr(VI) (reductasas solubles) que son producidas por la célula y exportadas al medio para reducirlo (Cheung y Gu, 2007), sin embargo, debido a que dicho proceso consume mucha energía, estas enzimas sólo son producidas cuando el Cr(VI) es detectado en la solución y de esa manera es regulado (Chirwa y Molokwane, 2011).

La ventaja de trabajar con cepas que fueron aisladas de un sitio altamente contaminado como el Río Lerma, es que dichas especies llevaban años expuestas a una gran variedad de contaminantes, lo que les confirió adaptabilidad a condiciones extremas. El resultado de las pruebas de readaptación al Cr(VI) mostró que las 3 especies requirieron de 7 días para adaptarse a una concentración de 200 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) en medio líquido. Esto demuestra que las cepas aisladas del Río Lerma aún tienen el potencial para adaptarse rápidamente a condiciones extremas, lo que resulta particularmente útil para la biorremediación de agua contaminada con Cr(VI).

## 5.4 Formación de consorcios bacterianos

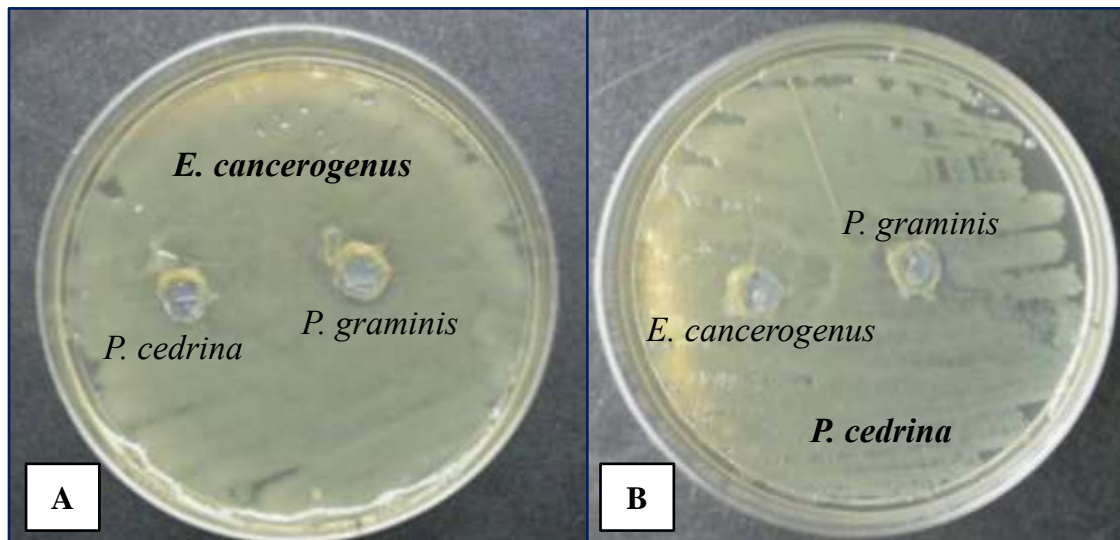
Las pruebas realizadas para corroborar la compatibilidad entre especies mostraron ausencia de actividad antimicrobiana. Lo anterior significa que las especies son compatibles y pueden vivir en consorcio. Romero et al. (2008) analizaron el efecto antagónico de la bacteria *Zymomonas mobilis mobilis* (Zm) y/o sus metabolitos sobre *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (Xc). Encontraron que dichos sobrenadantes inhibieron el crecimiento de Xc, lo cual se observa en los halos de inhibición formados (Figura 15).

A diferencia del trabajo realizado por Romero et al. (2008), en esta investigación, las 3 especies resultaron ser compatibles para vivir en consorcio, lo cual se comprobó al no encontrar halos de inhibición cuando las bacterias fueron resembradas en la misma caja petri. En la Figura 16, A) se observa la cepa *E. cancerogenus* como base y los orificios

contienen 50  $\mu$ L de cultivo de las cepas *P. cedrina* y *P. graminis*, B) *P. cedrina* se encuentra difundida y las cepas *P. graminis* y *E. cancerogenus* se encuentra en los orificios internos.



**Figura 15.** Presencia de halos de inhibición por actividad antimicrobiana de los sobrenadantes concentrados (Sc) de *Zymomonas mobilis mobilis* sobre *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Fuente: Romero et al. (2008).



**Figura 16.** Cajas petri resembradas con las 3 especies. A) Se aprecia la cepa *E. cancerogenus* difundida por todo el agar y los orificios contienen las cepas *P. cedrina* y *P. graminis*. B) *P. cedrina* se encuentra difundida por todo el agar y las cepas *P. graminis* y *E. cancerogenus* se encuentra en los orificios internos. No se aprecian halos de inhibición en los dos casos presentados.

Estos resultados concordaron con lo reportado por Muneer et al. (2009), señalan que los consorcios bacterianos formados por microbiota nativa representan una ventaja en términos de competitividad para el uso de nutrientes, sobre organismos exógenos. Cuando se emplean cepas exógenas para formar consorcios con organismos nativos aumenta la probabilidad de provocar alteraciones en pH y en la producción de metabolitos inhibidores.

Una vez determinado que las cepas bacterianas pudieron convivir en consorcio, se procedió a formar un único consorcio compuesto de las 3 cepas, el cual fue utilizado en los experimentos posteriores.

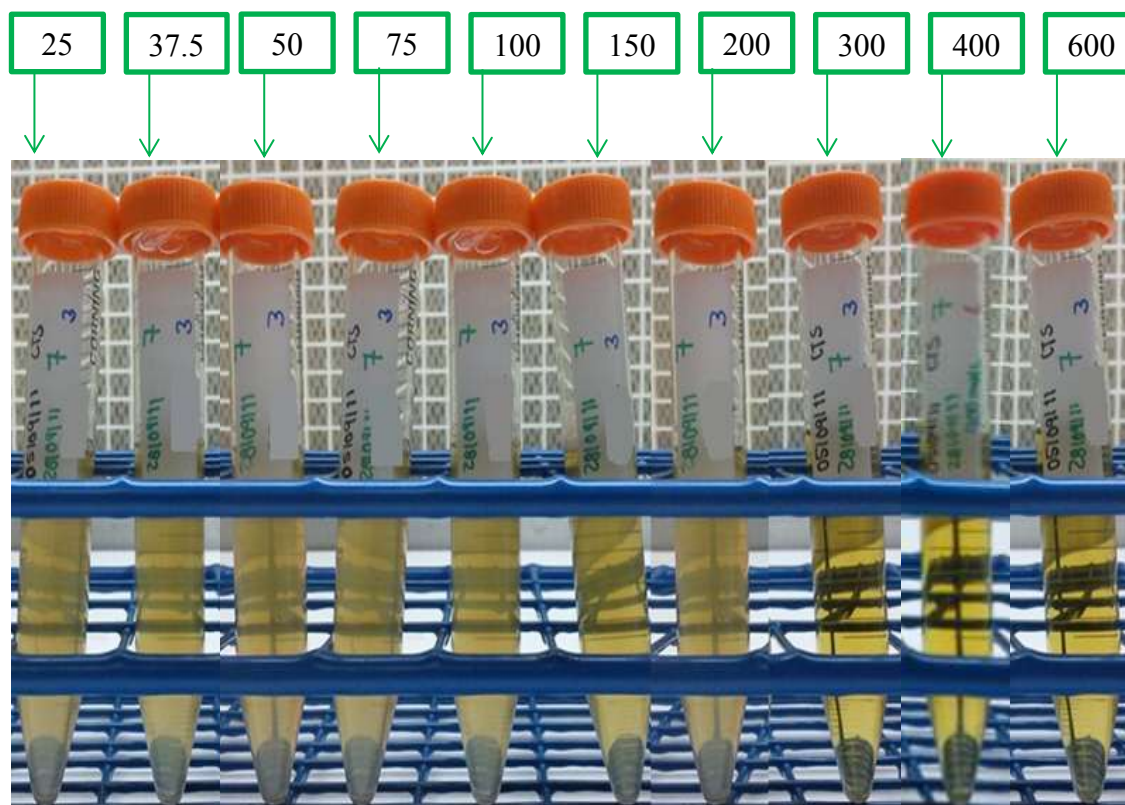
## **5.5 Concentración mínima inhibitoria**

Las pruebas para obtener la concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de dilución en caldo mostraron que la CMI de las 3 cepas bacterianas fue de 300 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI), concentración a la cual no se observó turbidez en el medio, signo de crecimiento bacteriano (Figura 17). Como se mencionó anteriormente (sección 5.3) las cepas bacterianas habían perdido su resistencia al Cr(VI) y para readaptarlas al mismo, se probaron las mismas concentraciones de Cr(VI) con cada cepa. Esto puede ser la razón por la cual las 3 especies tuvieron la misma CMI. Este resultado difiere del trabajo de Bojórquez (2010) en donde menciona que la CMI de la cepa *P. cedrina* fue de 1000 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) y las de *E. cancerogenus* y *P. graminis* fueron de 500 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI). Debido a que en dicha investigación las cepas estaban recién aisladas de sedimentos del Río Lerma, es probable que las bacterias contaran con plásmidos de resistencia que les permitían sobrevivir a las condiciones de extrema contaminación que prevalece en el Río Lerma.

La CMI determinada en este estudio difiere con el trabajo Singh et al. (2010) en el que aislaron 8 cepas del género *Pseudomonas* y determinaron sus CMI's. La cepa con mayor resistencia a Cr(VI) fue la denominada Ps-3 cuya CMI fue de 140 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI). En el presente estudio las cepas resistieron más del doble de Cr(VI). No obstante, McLean y Beveridge (2001) determinaron que una *Pseudomona* denominada CRB5 tuvo una CMI de 520 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI). Con respecto a otras cepas, la CMI aquí reportada resultó ser mayor



o igual a la obtenida en otros trabajos. Abskharon et al. (2009) obtuvieron las CMI's de 4 cepas de *Escherichia coli*. La CMI de 2 de ellas fue de 20 mg L<sup>-1</sup> y de las dos restantes fue de 25 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI). Por otra parte, Thacker y Madamwar (2005) aislaron una cepa de *Ochrobactrum* sp. denominada DM1 que presentó una CMI de 300 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI).



**Figura 17.** Ejemplificación de la prueba de dilución en caldo para determinar la CMI cepa *P. cedrina*. Los tubos con turbidez reflejan crecimiento bacteriano, por el contrario, la ausencia de turbidez es signo de inhibición de crecimiento. La CMI fue de 300 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI).

## 5.6 Análisis de toxicidad con Microtox®

El bioensayo de toxicidad aguda con Microtox® está basado en el efecto que una muestra ambiental puede tener sobre la intensidad de la luz emitida por la bacteria marina bioluminiscente: *Photobacterium phosphoreum*. En la Tabla 10 se muestran los criterios empleados para determinar el grado de toxicidad de una muestra (Bennett y Cubbage, 1992).

Como se observa en la Tabla 11, las concentraciones de 10 y 30 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) resultaron Tóxicas (T) para *Photobacterium phosphoreum*, mientras que el resto de las

concentraciones resultaron ser Muy tóxicas (MuyT), a excepción de la concentración de 300 mg L<sup>-1</sup> a los 15 minutos de contacto que resultó ser Extremadamente tóxica (ET). Estos resultados muestran que las bacterias utilizadas en esta investigación son altamente resistentes a concentraciones de Cr(VI) (≈300 mg L<sup>-1</sup>) que para otros microorganismos resultan muy tóxicas.

**Tabla 10.** Escala para determinar el grado de toxicidad de una muestra (Bennett y Cubbage, 1992).

EC50 (%)	GRADO DE TOXICIDAD
0-19	EXTREMADAMENTE TÓXICO (ET)
20-39	MUY TÓXICO (MuyT)
40-59	TÓXICO (T)
60-79	MODERADAMENTE TÓXICO (MT)
80-99	LEVEMENTE TÓXICO (LT)
≥100	NÓ TÓXICO (NT)

**Tabla 11.** Grado de toxicidad obtenido con diferentes concentraciones de Cr(VI) con Microtox®.

Concentración Cr(VI) (mg L <sup>-1</sup> )	10	30	50	60	100	150	200	300
<b>EC50 (%) 5 min</b>	45.56	47.05	39.675	37.79	38.455	32.48	32.295	28.47
Grado de toxicidad	T	T	MuyT	MuyT	MuyT	MuyT	MuyT	MuyT
<b>EC50 (%) 15 min</b>	50.55	42.86	31.595	24.96	32.540	22.32	25.715	17.06
Grado de toxicidad	T	T	MuyT	MuyT	MuyT	MuyT	MuyT	ET

## 5.7 Curvas de crecimiento bacteriano

El crecimiento bacteriano fue monitoreado a lo largo del tiempo. La cepa *E. cancerogenus* fue la que presentó mayor crecimiento en comparación con las otras dos especies y con el consorcio bacteriano (Figuras 19, 20 y 21).

Las cepas *E. cancerogenus* y *P. graminis* (Figuras 18 y 19) mostraron una tendencia similar de crecimiento, ya que en ambos casos, las cepas que fueron expuestas a 50 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) mantuvieron una menor tasa de crecimiento comparada con las bacterias sin Cr(VI). Las 2 especies mostraron una fase exponencial de crecimiento (fase log) durante las

primeras 32 horas de incubación, posteriormente ocurrió una desaceleración del crecimiento. Las bacterias expuestas a Cr(VI) llegaron a su fase estacionaria de crecimiento a las 120 horas de incubación.

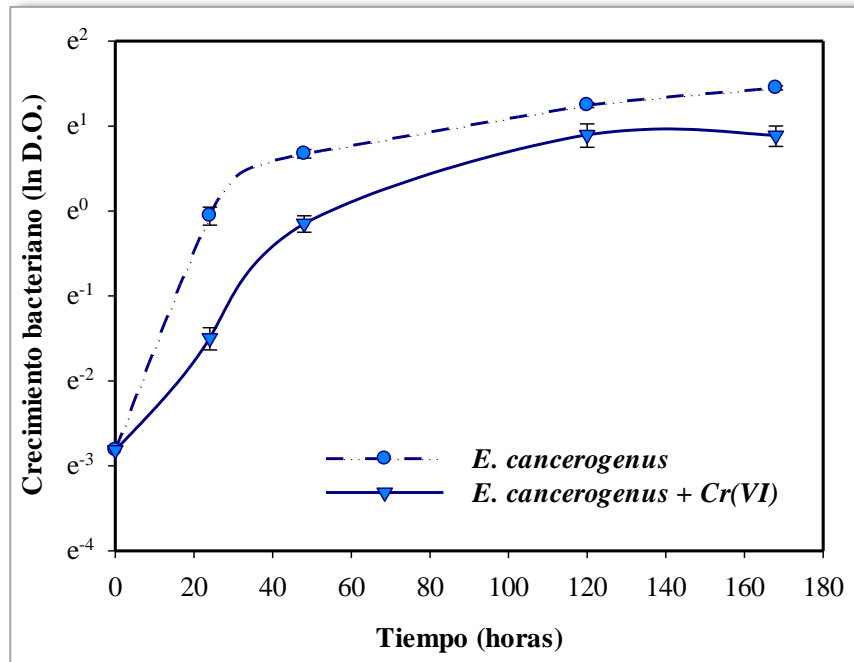


Figura 18. Curva de crecimiento de *E. cancerogenus* sin cromo y en presencia de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr(VI).

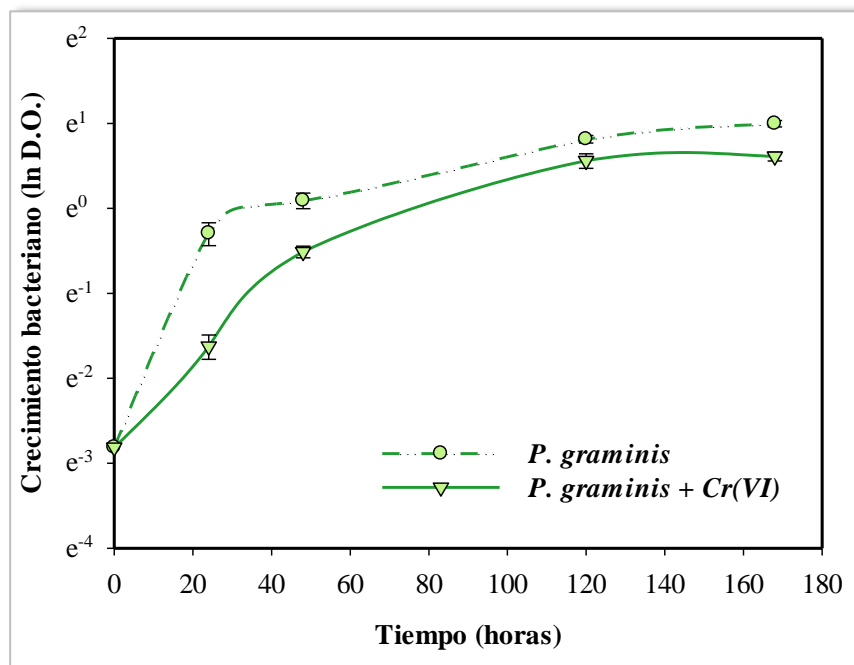
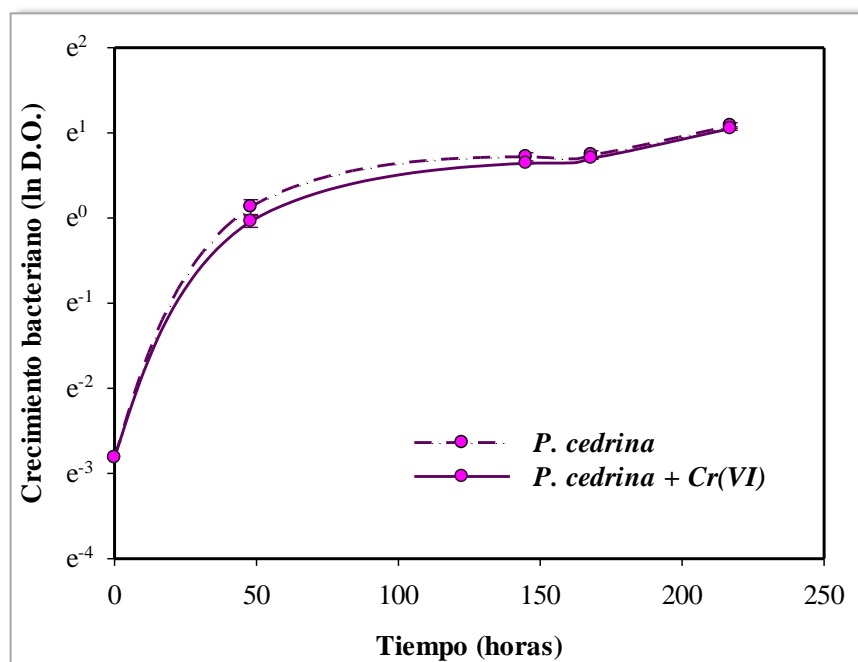


Figura 19. Cinética de crecimiento bacteriano de *P. graminis* sin cromo y en presencia de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr(VI).

A diferencia de las especies *P. graminis* y *E. cancerogenus*, el crecimiento de *Pseudomonas cedrina* no fue afectado por la presencia de Cr(VI), ya que no se observaron diferencias en el crecimiento entre la cepa incubada con Cr(VI) y sin él, sin embargo, a las 168 horas de incubación esta especie presentó menor crecimiento al ser incubada libre de Cr(VI) (Figura 20). Esta cepa mantuvo una fase exponencial de crecimiento las primeras 48 horas de incubación, seguida de una desaceleración en su crecimiento. A las 217 horas de incubación ambas cepas (con Cr(VI) y sin Cr(VI)) presentaron la misma densidad óptica.



**Figura 20.** Curva de crecimiento bacteriano de *P. cedrina* sin cromo y en presencia de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr(VI).

El crecimiento del consorcio bacteriano (Figura 21) formado por *P. graminis*, *P. cedrina* y *E. cancerogenus* fue ligeramente afectado por la presencia de Cr(VI). En el consorcio bacteriano expuesto a Cr(VI) se observó una fase de latencia (fase lag) durante las primeras 24 horas de incubación, lo cual no fue observado con las cepas individuales. El consorcio cultivado sin Cr(VI) mostró una fase exponencial las primeras 32 horas de incubación y posteriormente disminuyó su velocidad de crecimiento, no obstante, a las 168 horas de incubación ambos cultivos (con Cr(VI) y sin Cr(VI)) alcanzaron la misma densidad óptica.

La fase lag corresponde a una fase de adaptación fisiológica de las bacterias a un medio nuevo. Es probable que las cepas individuales y el consorcio sin Cr(VI) presentaran una fase lag durante las primeras 12 horas de incubación, por lo que no fue posible detectarla en esta investigación. Sin embargo la fase lag observada en el consorcio bacteriano con Cr(VI) pudo deberse a una competencia entre especies. Como se mencionó anteriormente, las 3 especies resultaron compatibles para formar un consorcio bacteriano, sin embargo, debido a que el consorcio se formó a partir de las cepas individuales, y cada cepa fue transferida al mismo medio de cultivo con Cr(VI), es probable que las bacterias requirieran de mayor tiempo (24 horas) para adaptarse a vivir en consorcio con las otras especies y además de sobrevivir expuestas al Cr(VI).

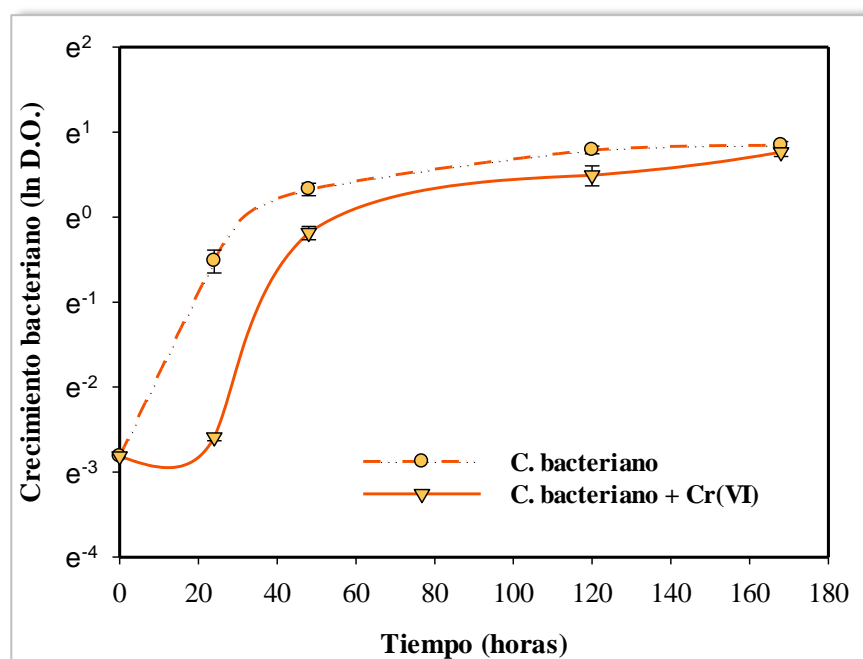


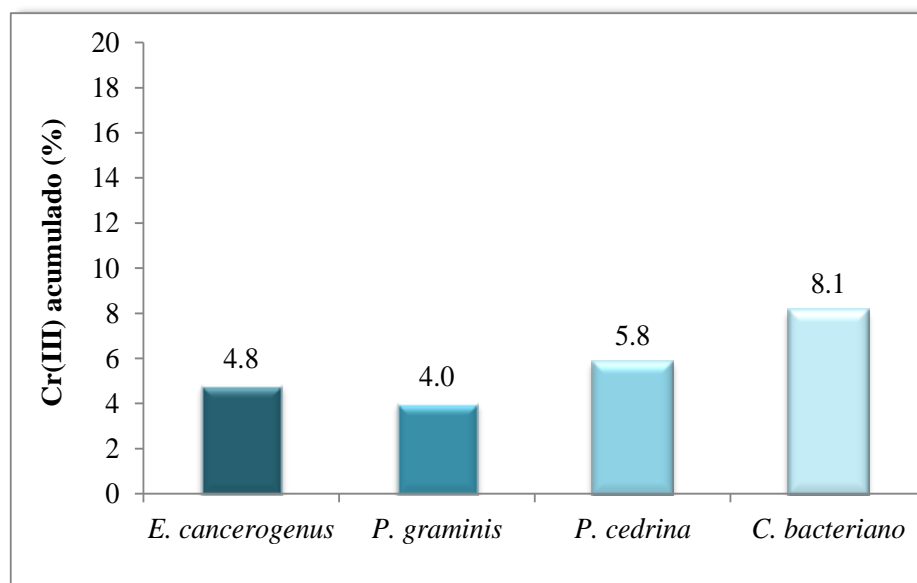
Figura 21. Cinética de crecimiento del consorcio bacteriano sin cromo y en presencia de 50 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI).

Por otra parte, la disminución en la velocidad de crecimiento observada en los tres cultivos con Cr(VI) pudo ser debida a la toxicidad del cromo sobre las bacterias. Se sabe que el Cr(VI) puede reducir el metabolismo del cultivo o interferir con la síntesis de ácidos nucleicos y por ende, con el crecimiento. Esto puede ocurrir aún en cultivos con capacidad biorreductora (Thacker y Madamwar, 2005) pues la resistencia bacteriana al Cr(VI) es un mecanismo de supervivencia que permite a las bacterias disminuir los niveles tóxicos de cromo a los que se encuentran expuestas (Okeke et al. 2008). La disminución de la tasa de

crecimiento bacteriano en especies incubadas con Cr(VI) ha sido reportada por otros autores en diferentes cepas: CMB-Cr1 (Shakoori et al. 2000), *Bravibacterium* sp. (Faisal y Hasnain, 2004), *Ochrobactrum* sp. (Thacker y Madamwar, 2005), *Bacillus* sp. PB2 (Okeke et al. 2008) y *Bacillus* sp. FM1 (Masood y Malik, 2011).

## 5.8 Acumulación de Cr

Se llevaron a cabo pruebas para verificar o descartar el proceso de acumulación celular de Cr en las cepas estudiadas. Las muestras medidas por espectrofotometría de absorción atómica mostraron que las bacterias acumularon Cr(III), ya que por el método de difenilcarbazida no se detectó Cr(VI) en las células. La **Figura 35** muestra el Cr(III) acumulado en las células al final de las cinéticas de biorreducción, *E. cancerogenus* acumuló 4.8% de Cr(III), *P. graminis* acumuló el 4%, *P. cedrina* 5.8% y el consorcio bacteriano fue el que acumuló mayor porcentaje, 8.1% de Cr(III).



**Figura 35.** Acumulación de Cr(III) en las células al final de las cinéticas de biorreducción.

Estos resultados sugieren que el principal mecanismo de las cepas empleadas en esta investigación es la biorreducción del Cr(VI) a Cr(III). A diferencia del estudio realizado por Dönmez y Koçberber (2005) en el que evaluaron la bioacumulación de Cr(VI) de algunos

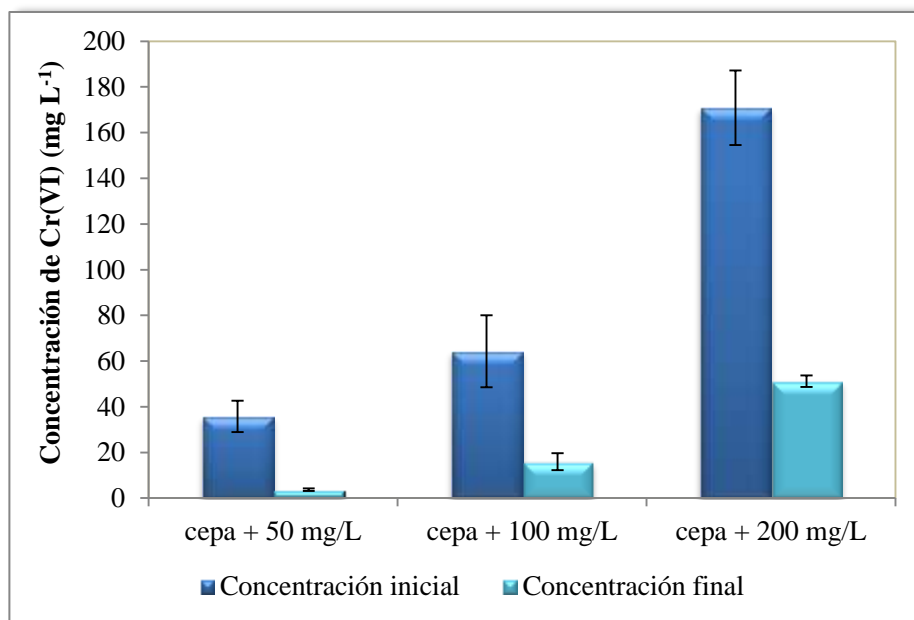
aislados bacterianos y encontraron que dichas bacterias bioacumularon más del 99% cuando la concentración inicial en el medio de cultivo fue de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr(VI).

## 5.9 Cinéticas de biorreducción de Cr(VI) a Cr(III)

Se realizaron pruebas con las 3 cepas que resultaron ser de la especie *Pseudomonas cedrina* (cepas 2a, 7 y 17) con el fin de comparar la eficiencia de reducción de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr(VI) en 217 horas (ANEXO 7). Los porcentajes de reducción fueron muy similares entre sí: cepa 2a redujo el 89%, la cepa 17 redujo el 92.5.5% y la cepa 7 redujo el 93.2%. A pesar de que a las 168 horas de incubación la cepa 17 redujo el 91% del Cr(VI) y la cepa 7 redujo el 89.6%; a las 217 horas de incubación, la cepa 7 logró el mayor porcentaje de reducción (93.2%) y ya que en esta investigación se buscaba reducir la mayor cantidad de Cr(VI), se determinó que la cepa 7 fue la más eficiente y se empleó la misma para todas las pruebas.

Para llevar a cabo las cinéticas de biorreducción se eligió la concentración de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr(VI), ya que según pruebas preliminares con *Pseudomonas cedrina* (Figura 22), esa fue la concentración de Cr(VI) que las bacterias redujeron con mayor eficiencia en 192 horas (8 días). Las barras muestran la concentración de Cr(VI) presente en el medio al inicio del experimento y la concentración final después de 8 días de incubación. Los resultados mostraron que *P. cedrina* con  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr(VI) redujo el 89.7% del Cr(VI), *P. cedrina* con  $100 \text{ mg L}^{-1}$  redujo el 75.12% y *P. cedrina* con  $200 \text{ mg L}^{-1}$  redujo el 70% del Cr(VI). Por esta razón se eligió la concentración de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr(VI). Además, si en el futuro se pretende crear un sistema de flujo continuo con estas cepas es recomendable que el sistema reduzca eficientemente el Cr(VI) sin que esto incremente considerablemente el tiempo de retención hidráulico puesto que la tasa de reducción de Cr(VI) disminuye conforme aumenta la concentración del mismo.

Debido a que las cinéticas se realizaron con medio de cultivo (CTS) y este, al ser una fuente orgánica redujo por sí mismo un 31% del Cr(VI), todos los resultados expuestos a continuación muestran la reducción netamente biológica, puesto que se restó el efecto del CTS.



**Figura 22.** Prueba de biorreducción de 50 mg L<sup>-1</sup>, 100 mg L<sup>-1</sup> y 200 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) con *P. cedrina*. Promedios ± error estándar.

Respecto a las cinéticas de biorreducción, en la Figura 23 se muestra la variación del crecimiento de *E. cancerogenus* durante la reducción de 50 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI). Se observa que las primeras 120 horas de incubación *E. cancerogenus* mantuvo una velocidad constante de biorreducción y posteriormente ocurrió una desaceleración de la misma, esto coincidió con el crecimiento, ya que a partir de las 120 horas inició su fase estacionaria. La biorreducción máxima de Cr(VI) alcanzada por esta cepa fue de 95.7%.

*P. graminis* presentó una tendencia similar a la de *E. cancerogenus* respecto a la biorreducción de Cr(VI). El porcentaje neto de biorreducción del Cr(VI) de esta cepa también fue de 95.7% en 168 horas (Figura 24).

Por otra parte, *P. cedrina* fue la cepa biorreductora menos eficiente ya que redujo el 93.2% de 50 mg L<sup>-1</sup> Cr(VI) en 217 horas (Figura 25), esto a pesar de haber sido la única cepa cuyo crecimiento no fue afectado por la presencia de Cr(VI) en el medio. Se ha sugerido que la resistencia al Cr(VI) y la capacidad para reducirlo son procesos independientes (Pattanapitpaisal et al. 2001).



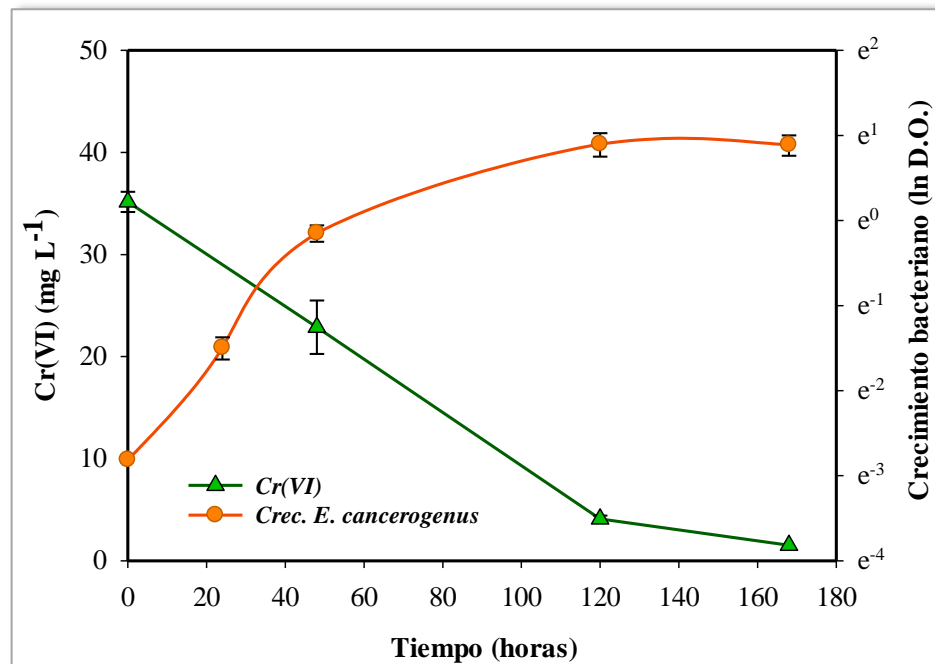


Figura 23. Crecimiento de *E. cancerogenus* durante la biorreducción de Cr(VI) (50 mg L<sup>-1</sup>).

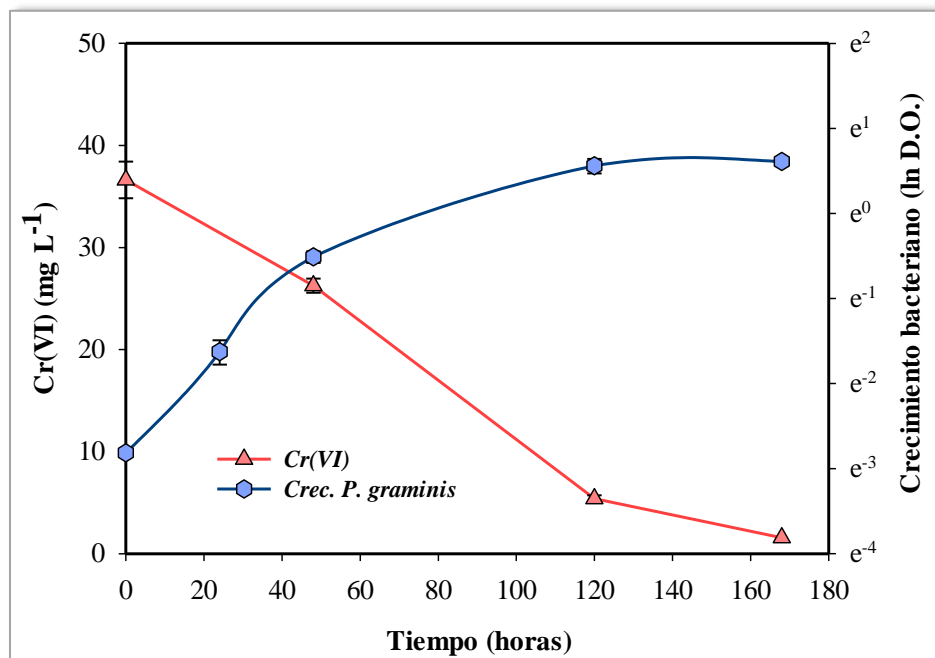


Figura 24. Crecimiento de *P. graminis* durante la biorreducción de Cr(VI) (50 mg L<sup>-1</sup>).

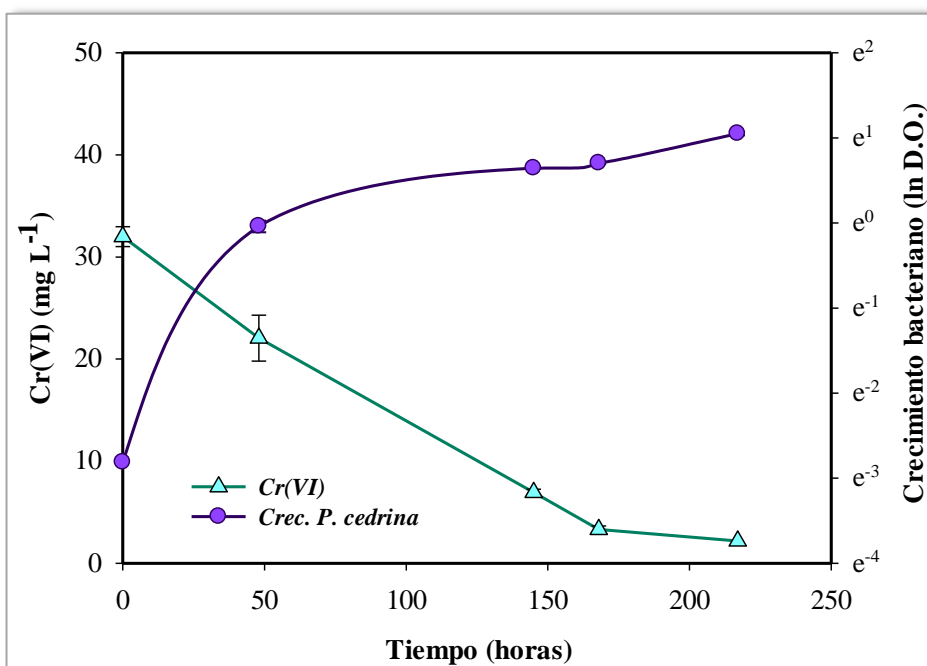


Figura 25. Crecimiento de *P. cedrina* durante la biorreducción de Cr(VI) (50 mg L<sup>-1</sup>).

Aunque el consorcio bacteriano también estuvo conformado por *P. cedrina*, esta cepa no afectó negativamente la eficiencia de reducción del Cr(VI) ya que redujo el 95.7% del mismo en 168 horas. Además, la fase lag que presentó el consorcio bacteriano tampoco afectó la biorreducción de Cr(VI) como se observa en la Figura 26.

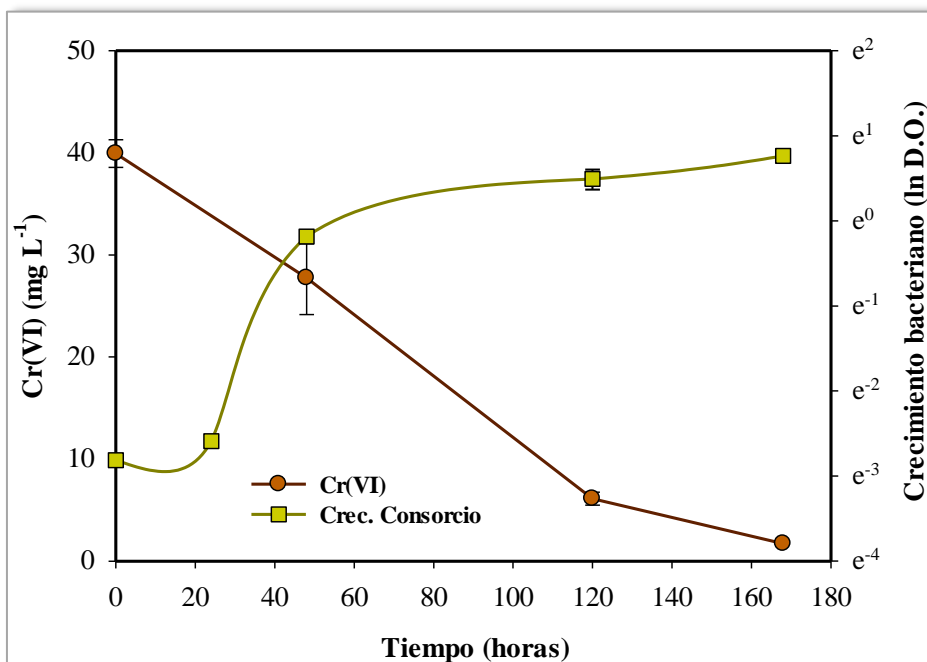
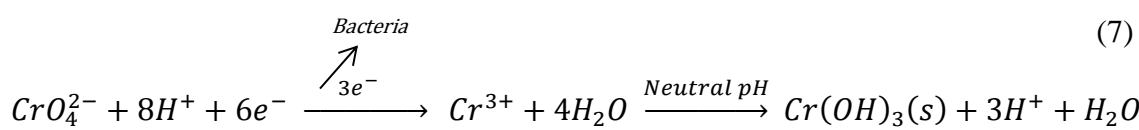


Figura 26. Crecimiento del consorcio bacteriano durante la biorreducción de Cr(VI) (50 mg L<sup>-1</sup>).

En esta investigación *E. cancerogenus* redujo aproximadamente 31 mg L<sup>-1</sup> Cr(VI) en 5 días, mientras que en el trabajo realizado por Rege et al. (1997), *Enterobacter cloacae* HO1 redujo casi en su totalidad 10 mg L<sup>-1</sup> en el mismo lapso de tiempo. Por lo tanto, la cepa de *Enterobacter* utilizada en el presente estudio resultó más eficiente.

En el caso de *Pseudomonas*, se han realizado otros estudios de biorreducción de Cr(VI). McLean y Beveridge (2001) trabajaron con una *Pseudomona* denominada CRB5 que redujo aproximadamente 22 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) en poco más de 160 horas y Dmitrenko et al. (2003) evaluaron la capacidad de biorreducción del Cr(VI) de 14 cepas del género *Pseudomonas*, las más eficientes fueron *Pseudomonas* “*rathonis*” P-17, *P. putida* B-139 y *P. fragi* B-184 que redujeron 30 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) en 25 días. Respecto a otras cepas investigadas, *Streptomyces* sp. CG252 logró reducir en un 90% una concentración de 100 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) en 20 días (Morales et al. 2007) y *E. coli* redujo el 41% de 10 mg L<sup>-1</sup> en 48 horas (Abskharon et al. 2009). Los resultados de biorreducción obtenidos en el presente trabajo demuestran que *P. graminis* y *P. cedrina* fueron más eficientes ya que redujeron ≈31 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) en 120 horas (5 días) y ≈29 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) en 168 horas (7 días) respectivamente.

Por otra parte, respecto al pH de las cinéticas, este mantuvo la misma tendencia en todas ellas, se inició con pH 7 al tiempo cero (t = 0), a las 48 horas de incubación el pH se incrementó a 7.5 y a partir de 120 horas el pH se mantuvo en 8.5 hasta el final de los experimentos (Figura 27). Este incremento de pH ocurre a menudo en sistemas de reducción biológica de Cr(VI) como lo mencionan Chirwa y Molokwane (2011) ya que la reducción de Cr(VI) por microorganismos resulta en el consumo de grandes cantidades de protones como equivalentes reductores que originan una elevación del pH. Además, este incremento en el pH facilita la precipitación del cromo reducido como hidróxido de cromo Cr(OH)<sub>3</sub>(s) como se muestra en la ecuación 7.



Por otra parte, todas las concentraciones de Cr(VI) fueron añadidas a partir de una solución madre preparada con  $K_2Cr_2O_7$  (sección 4.8.1). El hecho de encontrar al inicio de las cinéticas ( $t = 0$ ) una concentración de Cr(VI) menor a la que fue añadida, así como detectar la presencia de Cr(III) en el medio se debe a que el pH inicial en todas las pruebas fue de 7. La distribución de especies de Cr varía con el pH. Dentro del rango de pH con que se trabajó (7 a 8.5), parte del Cr(VI) añadido se disocia en  $CrO_4^{2-}$  y en especies de Cr(III) como el  $Cr_3(OH)_4^{5+}$  y  $Cr(OH)_3$  (Figura 28).

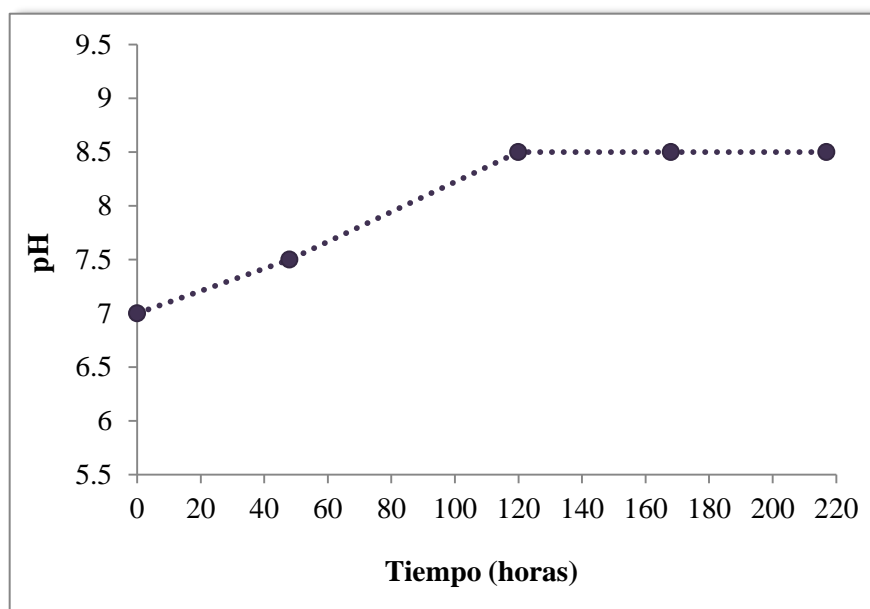
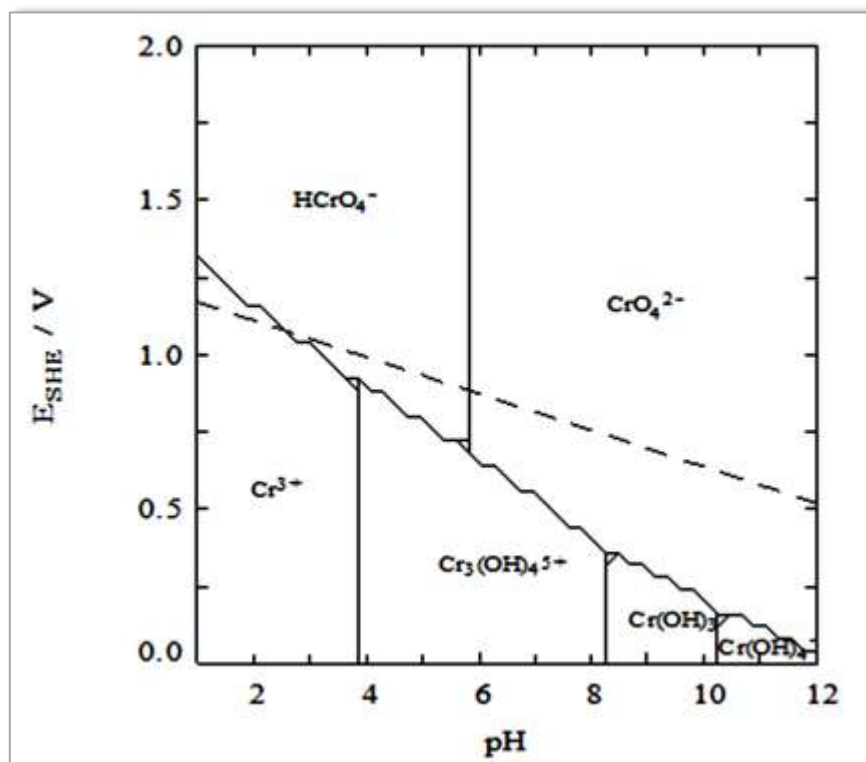


Figura 27. Cambios en el pH durante las cinéticas de biorreducción de Cr(VI).

Para comprobar que las bacterias realmente redujeron el Cr(VI) se determinaron las concentraciones de Cr(III) respecto al tiempo. El Cr(III) se incrementó a la vez que el Cr(VI) fue reducido.

A continuación (Tablas 12 a 15) se muestran los balances de materia de cada cinética de biorreducción, además se incluyeron los porcentajes de Cr(III) acumulado en las bacterias para obtener los porcentajes netos de cromo total.



**Figura 28.** Diagrama pE-pH de la distribución de especies de cromo bajo las condiciones empleadas en esta investigación (50 mg L<sup>-1</sup> Cr(VI)).

En la Tabla 12 se presenta el balance de materia de cromo para *P. cedrina*, se puede ver que al inicio de la cinética de biorreducción había una concentración de 46.83 ± 0.17 mg L<sup>-1</sup> de cromo total y al final de la cinética (217 horas) se detectaron 35.12 ± 0.91 mg L<sup>-1</sup> de cromo total. Esta cepa acumuló intracelularmente 2.74 ± 0.20 mg L<sup>-1</sup> de Cr(III) que sumados al porcentaje de cromo total dan como resultado 37.86 mg L<sup>-1</sup>, lo que equivale al 80.8% del cromo total inicial detectado por absorción atómica.

**Tabla 12.** Balance de materia de la biorreducción de 50 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) y acumulación de Cr(III) por *Pseudomonas cedrina*.

Tiempo (h)	Biorreducción Cr(VI) -> Cr(III)						Acumulación Cr(III)		% Cromo total
	Cr(VI)	%	Cr(III)	%	CrT	%		%	
<b>0</b>	32.00 ± 0.97	<b>68.3</b>	14.84 ± 1.33	<b>31.7</b>	46.83 ± 0.17	<b>100</b>	0 ± 0	<b>0</b>	<b>100</b>
<b>48</b>	22.05 ± 2.25	<b>47.0</b>	23.24 ± 0.63	<b>49.7</b>	45.29 ± 1.66	<b>96.7</b>	1.45 ± 0.61	<b>3.1</b>	<b>99.8</b>
<b>145</b>	6.93 ± 0.32	<b>14.8</b>	31.52 ± 0.81	<b>67.3</b>	38.46 ± 0.78	<b>82.1</b>	2.61 ± 0.20	<b>5.6</b>	<b>87.7</b>
<b>168</b>	3.31 ± 0.35	<b>7.1</b>	31.47 ± 0.91	<b>67.2</b>	34.78 ± 1.08	<b>74.3</b>	2.68 ± 0.56	<b>5.7</b>	<b>80.0</b>
<b>217</b>	2.18 ± 0.00	<b>4.6</b>	32.94 ± 0.91	<b>70.4</b>	35.12 ± 0.91	<b>75.0</b>	2.74 ± 0.20	<b>5.8</b>	<b>80.8</b>

En el caso de *P. graminis*, se determinó una concentración inicial de cromo total de  $50.21 \pm 1.92 \text{ mg L}^{-1}$  y a las 168 horas se encontraron  $41.69 \pm 0.97 \text{ mg L}^{-1}$  del mismo. Con la suma del Cr(III) acumulado por la célula, el cromo total medido fue de  $43.68 \text{ mg L}^{-1}$ , equivalente al 80.8% del cromo total determinado inicialmente (Tabla 13).

**Tabla 13.** Balance de materia de la biorreducción de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr(VI) y acumulación de Cr(III) por *Pseudomonas graminis*.

Biorreducción Cr(VI) -> Cr(III)							Acumulación Cr(III)		
Tiempo (h)	Cr(VI)	%	Cr(III)	%	CrT	%		%	% Cromo total
<b>0</b>	$36.63 \pm 1.79$	<b>73.0</b>	$13.58 \pm 3.14$	<b>27.0</b>	$50.21 \pm 1.92$	<b>100.0</b>	$0 \pm 0$	<b>0</b>	<b>100</b>
<b>48</b>	$26.26 \pm 0.69$	<b>52.3</b>	$23.39 \pm 1.71$	<b>46.6</b>	$49.65 \pm 1.35$	<b>98.9</b>	$0.52 \pm 0.11$	<b>1.0</b>	<b>99.9</b>
<b>120</b>	$5.39 \pm 0.34$	<b>10.7</b>	$36.71 \pm 0.51$	<b>73.0</b>	$42.11 \pm 0.84$	<b>83.7</b>	$1.73 \pm 0.70$	<b>3.4</b>	<b>87.1</b>
<b>168</b>	$1.58 \pm 0.00$	<b>3.0</b>	$40.12 \pm 0.97$	<b>80.0</b>	$41.69 \pm 0.97$	<b>83.0</b>	$1.99 \pm 0.20$	<b>4.0</b>	<b>87</b>

La cinética realizada con *E. cancerogenus* inició con una concentración de  $52.16 \pm 1.82 \text{ mg L}^{-1}$  de cromo total y finalizó con  $42.44 \pm 1.11 \text{ mg L}^{-1}$  del mismo. Se detectó  $1.99 \pm 0.20 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr(III) acumulado por las bacterias, por lo que el cromo total medido al final de las pruebas fue de  $44.95 \text{ mg L}^{-1}$  (86.2%).

**Tabla 14.** Balance de materia de la biorreducción de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr(VI) y acumulación de Cr(III) por *Enterobacter cancerogenus*.

Biorreducción Cr(VI) -> Cr(III)							Acumulación Cr(III)		
Tiempo (h)	Cr(VI)	%	Cr(III)	%	CrT	%		%	% Cromo total
<b>0</b>	$35.16 \pm 0.99$	<b>67.4</b>	$17.00 \pm 2.40$	<b>32.6</b>	$52.16 \pm 1.82$	<b>100.0</b>	$0 \pm 0$	<b>0</b>	<b>100</b>
<b>48</b>	$22.88 \pm 2.63$	<b>43.9</b>	$28.20 \pm 1.50$	<b>54.0</b>	$51.08 \pm 1.23$	<b>97.9</b>	$0.78 \pm 0.10$	<b>1.5</b>	<b>99.4</b>
<b>120</b>	$4.10 \pm 0.33$	<b>7.9</b>	$40.24 \pm 1.17$	<b>77.1</b>	$44.34 \pm 0.82$	<b>85.0</b>	$1.81 \pm 0.54$	<b>3.5</b>	<b>88.5</b>
<b>168</b>	$1.51 \pm 0.00$	<b>2.9</b>	$40.93 \pm 1.11$	<b>78.5</b>	$42.44 \pm 1.11$	<b>81.4</b>	$2.51 \pm 0.33$	<b>4.8</b>	<b>86.2</b>

Algo similar a las cepas individuales ocurrió con el consorcio bacteriano, la medición inicial de cromo total fue de  $48.69 \pm 1.61 \text{ mg L}^{-1}$  y a las 168 horas se detectaron  $41.18 \pm 0.56 \text{ mg L}^{-1}$  de este. El consorcio bacteriano fue el que presentó mayor acumulación celular de Cr(III), siendo de  $3.96 \pm 0.86 \text{ mg L}^{-1}$ . El porcentaje final de cromo total detectado por absorción atómica fue de 86.2% (Tabla 15).

**Tabla 15.** Balance de materia de la biorreducción de 50 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) y acumulación de Cr(III) por el consorcio bacteriano.

Tiempo (h)	Biorreducción Cr(VI) -> Cr(III)						Acumulación Cr(III)		% Cromo total
	Cr(VI)	%	Cr(III)	%	CrT	%		%	
<b>0</b>	39.93 ± 1.36	<b>82.0</b>	8.75 ± 0.34	<b>18.0</b>	48.69 ± 1.61	<b>100.0</b>	0 ± 0	<b>0</b>	<b>100</b>
<b>48</b>	27.76 ± 3.58	<b>57.0</b>	18.50 ± 2.68	<b>38.0</b>	46.26 ± 3.87	<b>95.0</b>	1.98 ± 0.60	<b>4.0</b>	<b>99.0</b>
<b>120</b>	6.12 ± 0.64	<b>12.6</b>	33.76 ± 0.76	<b>69.4</b>	39.88 ± 0.54	<b>82.0</b>	3.67 ± 0.47	<b>7.5</b>	<b>89.5</b>
<b>168</b>	1.72 ± 0.00	<b>3.5</b>	39.46 ± 0.56	<b>81.1</b>	41.18 ± 0.56	<b>84.6</b>	3.96 ± 0.86	<b>8.1</b>	<b>92.7</b>

Como se pudo observar en las Tablas 12 a 15, al final de todos los experimentos se detectó una menor cantidad de cromo total de la que se había determinado inicialmente, esto está relacionado con el pH de todos los experimentos pues a pH 7 a 8.5 se encuentran presentes el  $\text{Cr}_3(\text{OH})_4^{5+}$  y  $\text{Cr}(\text{OH})_3$  que son escasamente insolubles y se precipitan, por lo cual no pueden ser detectados por absorción atómica. Al final de las cinéticas se pudo detectar en los matraces la formación de un precipitado blanco gelatinoso, esto concuerda con lo reportado por UNAC (2010), en donde indica que el precipitado de  $\text{Cr}(\text{OH})_3$  es un precipitado gelatinoso, voluminoso y de estructura amorfa por retener grandes cantidades de agua, por lo que para su separación de la fase acuosa se debe recurrir a periodos de envejecimiento o tratamiento térmico que permitan desarrollar sólidos con estructura cristalina que faciliten procesos de decantación y filtración.

Por otra parte, Moral et al. (2010) reportaron que el Cr(III) forma complejos de coordinación con diferentes compuestos como amoníaco, amins y aminoácidos presentes en altas concentraciones en las aguas residuales. Las proteínas y aminoácidos tienen un efecto secuestrante sobre los iones de Cr(III). Es importante mencionar que las pruebas realizadas en esta investigación fueron hechas con medio de cultivo (CTS) que está conformado (ANEXO 1) principalmente por proteínas (peptonas y caseína), por lo que la fracción de cromo total que no fue detectada al final de las cinéticas pudo estar formando complejos con las proteínas del medio de cultivo. Así pues, como reportaron UNAC (2010) y Moral et al. (2010), para la eficaz eliminación de Cr(III) de las aguas residuales es preciso separar el cromo secuestrado o bien que éste sea eliminado conjuntamente con la materia orgánica secuestrante ya sea por filtración, sedimentación o cualquier otra técnica. Por lo

anterior se realizó una prueba con un par de muestras de las cinéticas, que fueron digeridas con HNO<sub>3</sub> concentrado con el propósito de romper el complejo formado con las proteínas (ANEXO 8). El resultado fue de  $50.52 \pm 1.24 \text{ mg L}^{-1}$  de cromo total, esto comprueba que el cromo faltante se encontraba acomplejado y la digestión con HNO<sub>3</sub> permitió romper el complejo y determinar el cromo total presente en la muestra.

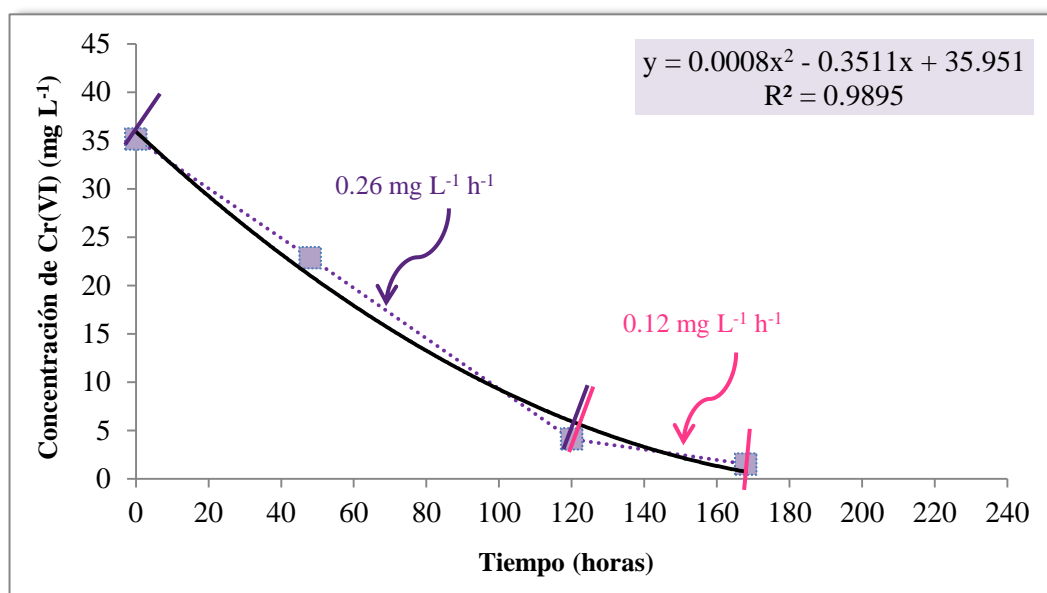
Con respecto a la determinación de los coeficientes cinéticos, todas las cinéticas fueron ajustadas a un modelo polinomial de segundo orden (ANEXO 9). Con base en el ajuste polinomial, las cinéticas se caracterizaron por presentar 2 fases en el proceso de biorreducción. La primera fase correspondió a una biorreducción constante semejante a un modelo lineal, en donde se obtuvo la tasa máxima de utilización del substrato  $k$  que determinó la velocidad con que las bacterias redujeron el Cr(VI) presente en el medio. La segunda fase correspondió a un decremento considerable de la tasa de biorreducción.

Para determinar la primera fase se promedió la velocidad de reducción al tiempo cero y a las 120 horas de incubación para el caso de *P. graminis*, *E. cancerogenus* y el consorcio bacteriano, y de tiempo 0 a 168 horas para el caso de *P. cedrina*. La tasa de reducción de la segunda fase correspondió al promedio de la velocidad de reducción al tiempo final y a las 168 horas para *P. cedrina* y 120 horas para las restantes dos especies y el consorcio. La resolución de las ecuaciones se muestra en el ANEXO 10.

En la Figuras 29 a 32 se muestran las tasas de reducción de Cr(VI) obtenidas con las 3 cepas individuales y con el consorcio bacteriano. En cada figura se señalan las dos fases de biorreducción calculadas.

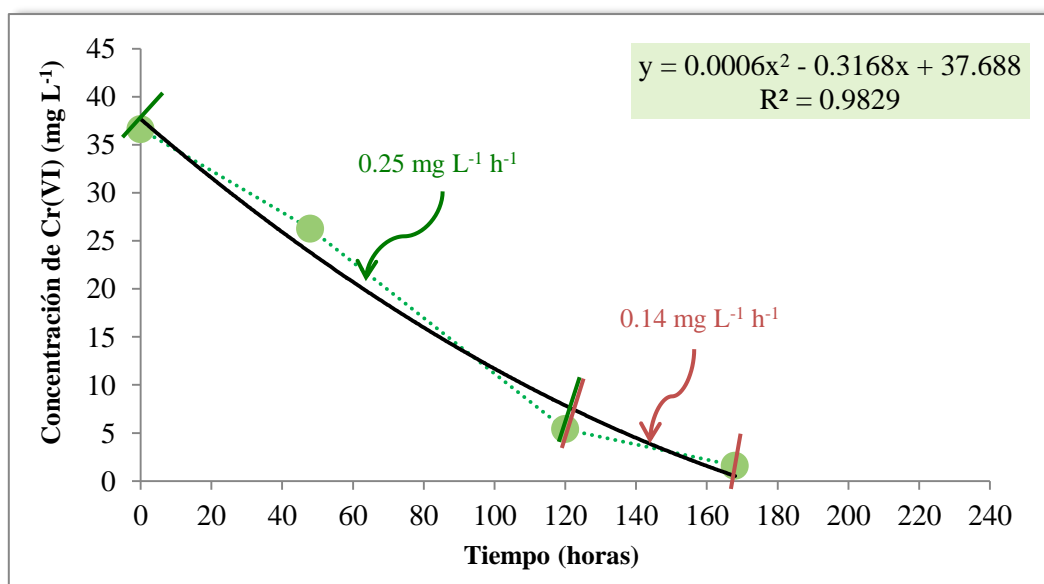
En la Figura 29 se muestra la tasa de biorreducción del Cr(VI) obtenida con *E. cancerogenus*, esta cepa tuvo una tasa máxima de biorreducción ( $k$ ) de  $0.26 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . A partir de las 120 horas de incubación, la tasa promedio de biorreducción fue de  $0.12 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .





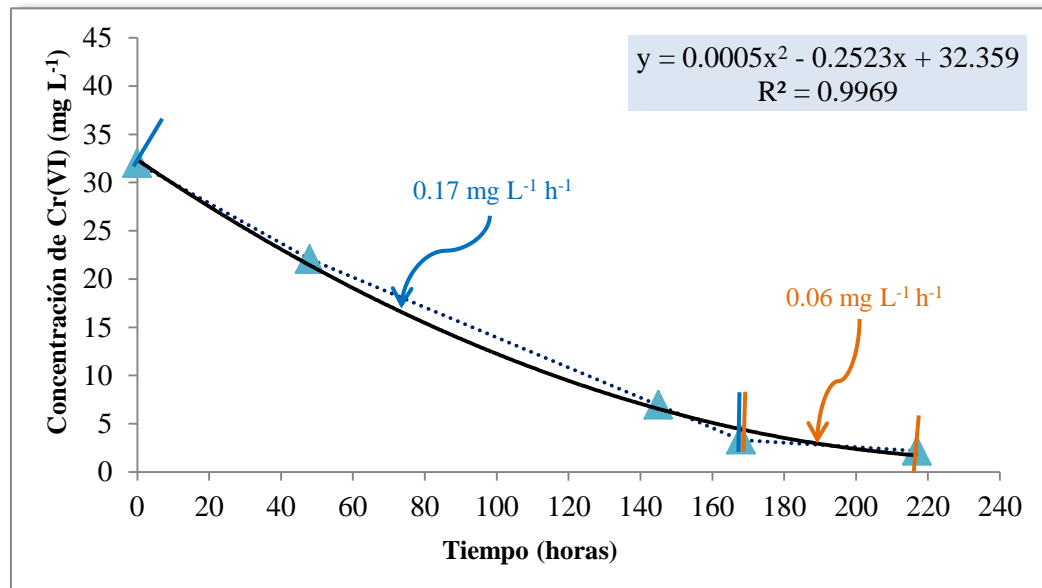
**Figura 29.** Tasa de biorreducción de Cr(VI) por *E. cancerogenus* y obtención de constante cinética  $k$  por ajuste polinomial de segundo orden.  $k = 0.26 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

La constante de la tasa de biorreducción de Cr(VI) de *P. graminis* ( $k = 0.25 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) fue muy similar a la de *E. cancerogenus*, esto concuerda con que ambas especies alcanzaron su fase estacionaria de crecimiento en el mismo periodo de tiempo. La segunda fase de biorreducción tuvo una tasa de  $0.14 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  (Figura 30).



**Figura 30.** Tasa de biorreducción de Cr(VI) por *P. graminis* y obtención de constante cinética  $k$  por regresión lineal.  $k = 0.2855 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

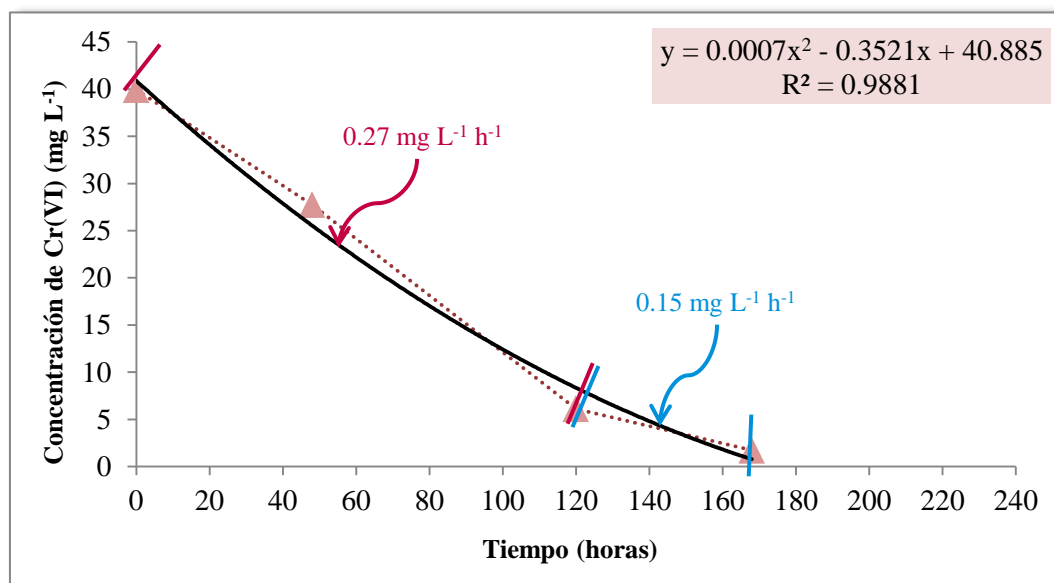
Por otra parte, *P. cedrina* tuvo una menor tasa de biorreducción ( $k = 0.17 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) en comparación con las otras dos cepas individuales (Figura 32). Asimismo, a partir de las 168 horas de incubación la tasa de reducción de esta cepa fue casi nula ( $0.06 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) a pesar de presentar un incremento en su crecimiento en este último periodo de tiempo.



**Figura 31.** . Tasa de biorreducción de Cr(VI) por *P. cedrina* y obtención de constante cinética  $k$  por regresión lineal.  $k = 0.1695 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

Uno de los objetivos de esta investigación fue comparar la reducción de Cr(VI) por cepas individuales y por un consorcio bacteriano, se esperaba que el consorcio mejorara la eficiencia de reducción de Cr(VI). Al final de las cinéticas se determinó que tanto *P. graminis*, *E. cancerogenus* y el consorcio bacteriano redujeron el mismo porcentaje de Cr(VI) (95.7%). Sin embargo, como se observa en la Figura 32, el consorcio bacteriano tuvo una mayor tasa de biorreducción de Cr(VI) en ambas fases. La constante  $k$  del consorcio fue de  $0.27 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  y la tasa de reducción de la segunda fase fue  $0.15 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ . Esto indica que sí hubo una ligera mejora en la velocidad de reducción del Cr(VI) cuando se empleó el consorcio bacteriano, es probable que las características biorreductoras de las cepas *E. cancerogenus* y *P. graminis* fueran predominantes y que al encontrarse viviendo juntas su efecto se potenciara, ya que estas bacterias fueron originalmente aisladas a partir de un consorcio bacteriano. Cuando las bacterias viven en consorcio tienen una

mayor resistencia a los contaminantes pues comparten una amplia gama de vías metabólicas.



**Figura 32.** Tasa de biorreducción de Cr(VI) por el consorcio bacteriano y obtención de su constante cinética  $k$  por regresión lineal.  $k = 0.3082 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

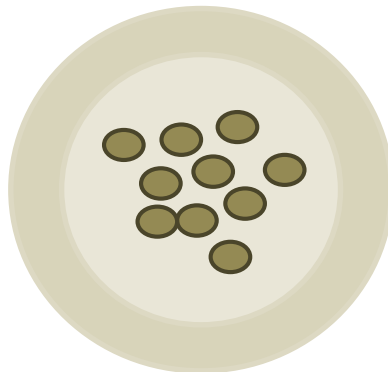
Otros autores han reportado que el empleo de cultivos mixtos mejora la eficiencia de reducción de Cr(VI), tal es el caso de Barrionuevo et al. (2009) quienes obtuvieron un 65.01% de reducción de Cr(VI) con *Klebsiella ornithinolytica* 1P y 44.47% con *Pseudomonas veronii* 2E, sin embargo, al formar un cultivo mixto con ambas especies el porcentaje de reducción de Cr(VI) fue de 72.88. El cultivo mixto mejoró el rendimiento obtenido con los cultivos individuales. Benazir et al. (2010) también reportan una mayor eficiencia de reducción del Cr(VI) así como una reducción considerablemente constante al trabajar con los consorcios de *Saccharomyces cerevisiae* + *Pseudomonas aeruginosa* y con *Saccharomyces cerevisiae* + *Bacillus subtilis*.

Okeke et al. (2008) realizaron un estudio cinético de la biorreducción de Cr(VI) por *Bacillus* sp. PB2, obtuvieron la constante cinética  $k$  a partir de una regresión lineal. El valor de  $k$  fue de  $0.84 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , el cual es casi 3 veces mayor que el obtenido en esta investigación, sin embargo, su concentración inicial fue de  $8 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr(VI). En este trabajo se empleó la concentración de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  de Cr(VI) y es probable que estas bacterias

reduzcan el Cr(VI) con mayor velocidad si se emplea una menor concentración de cromo, pues se ha visto que la velocidad de reducción aumenta cuando la concentración inicial de Cr(VI) es menor.

### **5.10 Biomasa suspendida y biomasa fija**

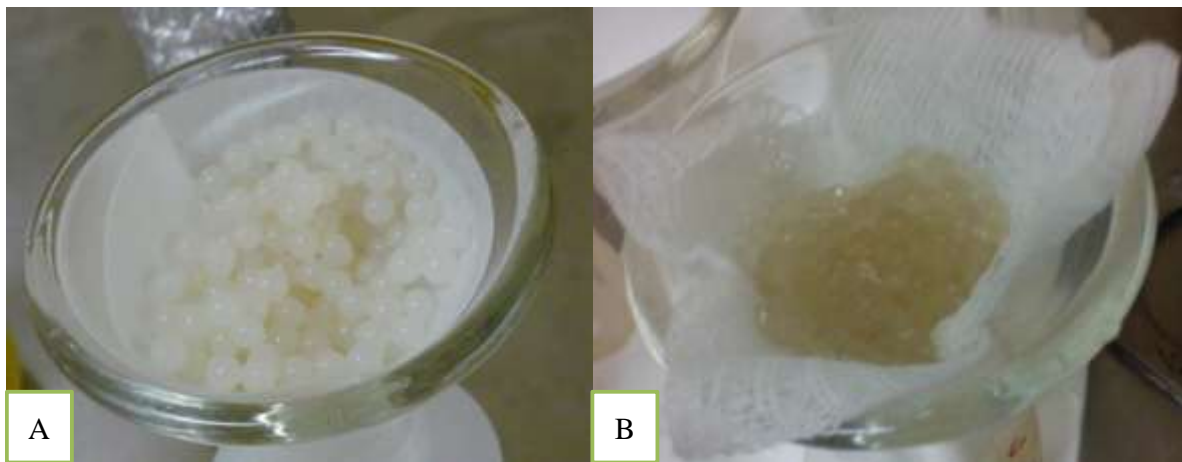
Las pruebas con biomasa fija no mostraron resultados confiables debido a que la técnica empleada para inmovilizar la biomasa no fue adecuada. La biomasa fue inmovilizada en gránulos de alginato de calcio empleando dos técnica, la de Benazir et al. (2010) que consistió en mezclar volúmenes iguales de cultivo y de alginato de sodio 4%, los gránulos formados se dejaron reposando 15 minutos en el CaCl<sub>2</sub>. Se llevó a cabo una prueba siguiendo este procedimiento, sin embargo, después de 24 horas de incubación los gránulos se rompieron y la biomasa quedó libre en el medio de cultivo. Posteriormente se empleó la técnica reportada por Wasi et al. (2011) que consistió en mezclar 1 mL de cultivo con 9 mL de alginato de sodio y los gránulos permanecieron en el CaCl<sub>2</sub> durante 24 horas para asegurar la firmeza de los gránulos. Estos cultivos se dejaron incubando a 60 rpm para evitar la ruptura de los gránulos, sin embargo pasadas las 24 horas, parte de la biomasa quedó libre en el medio de cultivo.



**Figura 33.** Modelo de inmovilización de bacterias en gránulos de alginato de calcio.

Los gránulos de alginato funcionan atrapando en su interior a las bacterias (Figura 33). Y a pesar de que la inmovilización de bacterias en alginato de calcio ha sido reportada por diversos autores: Bandhyopadhyay et al. (1999), Benazir et al. (2010) y Wasi et al. (2011),

en esta investigación no fue un método adecuado, al parecer las cepas empleadas provocaron la ruptura de los gránulos de alginato (por degradación de la pared o por consumo) haciendo que quedara libre la biomasa que contenían. Esto coincide con las observaciones realizadas, ya que los gránulos que se encontraban libres de biomasa se mantenían firmes y en ningún momento se degradaron. En la Figura 34 A) se muestra la comparación de los gránulos de alginato sin biomasa, se observa que están bien formados y firmes, sin embargo, en la Figura 34 B) se aprecia la degradación de los gránulos que contenían biomasa, estos gránulos se volvieron frágiles y se rompieron.



**Figura 34.** A) Gránulos de alginato de calcio sin biomasa. B) Gránulos de alginato de calcio degradados por las bacterias.

Por lo anterior, no fue posible determinar la reducción real realizada por la biomasa fija y esto se vio reflejado en los resultados que fueron muy similares a los obtenidos con la biomasa suspendida (Figura 35). En el caso de las mediciones de Cr(III) se observaron diferencias respecto a la tendencia en el incremento de Cr(III) en el medio (Figura 36), sin embargo, las diferencias no pueden ser atribuidas a la biomasa fija debido a los inconvenientes arriba mencionados.

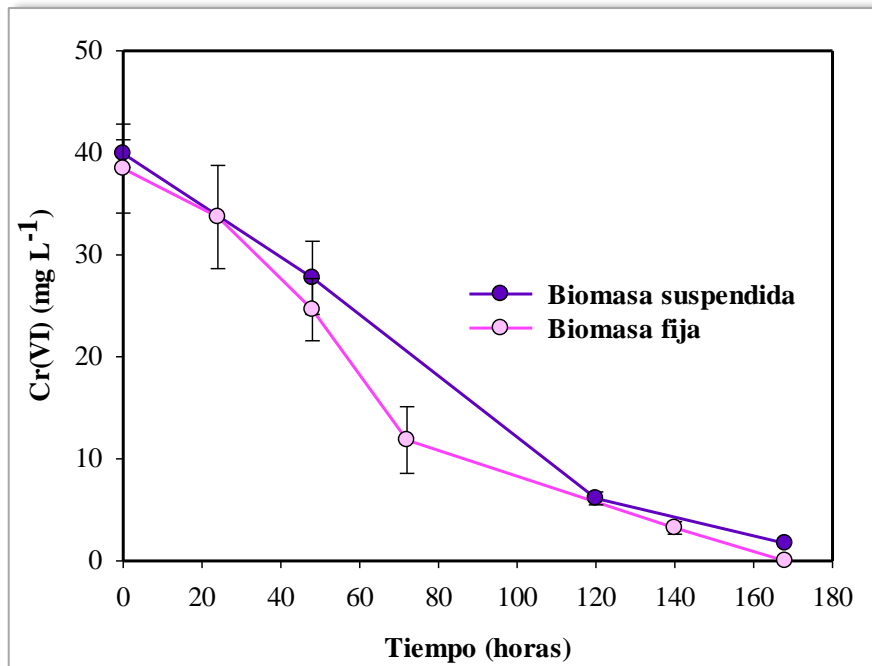


Figura 35. Reducción de Cr(VI) por el consorcio bacteriano con biomasa fija y biomasa suspendida.

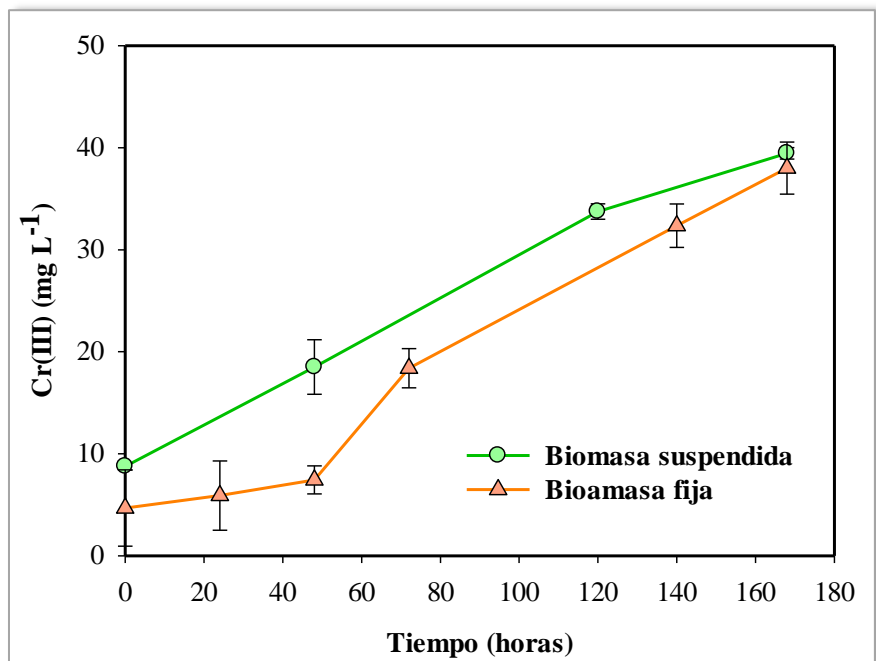


Figura 36. Incremento de Cr(III) por el consorcio bacteriano con biomasa fija y biomasa suspendida.

## CONCLUSIONES

Se actualizó la identificación de las cepas empleadas en este trabajo, tres de las cinco cepas aisladas resultaron ser de la misma especie. Las tres especies fueron identificadas como: *Pseudomonas cedrina* CFML 96-198, *Pseudomonas graminis* DSM 11363 y *Enterobacter cancerogenus* LMG 2693.

Las pruebas para determinar la liberación de sustancias antimicrobianas mostraron que las tres especies pueden coexistir en un consorcio bacteriano.

La CMI fue de 300 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) para las tres especies.

Según el ensayo de toxicidad con Microtox, las concentraciones de 10 y 30 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) resultaron tóxicas, las concentraciones de 50, 60, 100, 150, 200 mg L<sup>-1</sup> a los 5 y 15 minutos de contacto y 300 mg L<sup>-1</sup> a los 5 minutos de contacto fueron muy tóxicas y 300 mg L<sup>-1</sup> a los 15 minutos de contacto fue extremadamente tóxica para *P. phosphoreum*. Las cepas empleadas en este trabajo son altamente resistentes al Cr(VI) con respecto a otros microorganismos.

El Cr(VI) afectó el crecimiento bacteriano de *E. cancerogenus* y *P. graminis* quienes alcanzaron su fase estacionaria de crecimiento a las 120 horas de incubación; el crecimiento de *P. cedrina* no se vio afectado por el Cr(VI); el consorcio bacteriano presentó una fase lag las primeras 24 horas de estar incubado con Cr(VI).

Las cinéticas de biorreducción de 50 mg L<sup>-1</sup> de Cr(VI) mostraron que *E. cancerogenus*, *P. graminis* y el consorcio bacteriano redujeron el 95.7% del Cr(VI) en 168 horas, *P. cedrina* redujo 93.2% en 217 horas.

Las cinéticas de biorreducción se ajustaron a un modelo polinomial de segundo orden. Las constantes *k* (tasa máxima de utilización de sustrato) de las cepas individuales fueron: 0.26

mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para *E. cancerogenus*, 0.25 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para *P. graminis*, 0.17 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> para *P. cedrina*. El consorcio mejoró la eficiencia de biorreducción del Cr(VI), su *k* fue de 0.27 mg L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>.

Se comprobó que las bacterias no acumularon Cr(VI). Se detectó acumulación de Cr(III) en las células. *E. cancerogenus* acumuló 2.74 ± 0.2 mg L<sup>-1</sup> Cr(III), *P. graminis*, 1.99 ± 0.2 mg L<sup>-1</sup> Cr(III), *P. cedrina*, 2.51 ± 0.33 mg L<sup>-1</sup> Cr(III) y el consorcio acumuló 3.96 ± 0.86 mg L<sup>-1</sup> de Cr(III). El principal mecanismo de las bacterias es la biorreducción de Cr(VI) a Cr(III).

La biorreducción de Cr(VI) a Cr(III) generó la precipitación de hidróxido de cromo. Se comprobó que el Cr(III) tiende a formar complejos con los aminoácidos del medio de cultivo.

La técnica empleada para inmovilizar a la biomasa fue inadecuada ya que las bacterias degradaron las paredes de los gránulos de alginato liberando la biomasa en el medio de cultivo. Los resultados de estas pruebas no resultaron concluyentes respecto a la eficiencia de la biomasa fija.



## **RECOMENDACIONES**

- ⊙ Determinar la eficiencia de biorreducción de Cr(VI) de *E. cancerogenus* y *P. graminis* juntas.
  
- ⊙ Evaluar la reducción de Cr(VI) en muestras de agua “real” proveniente de una industria que descargue residuos de cromo hexavalente.
  
- ⊙ Probar un sistema de flujo continuo para reducir el Cr(VI) y acoplarlo con un tratamiento de coagulación-floculación para retirar el Cr(III) del agua.
  
- ⊙ Emplear diferentes técnicas de inmovilización de la biomasa.
  
- ⊙ Evaluar la capacidad de las tres especies para sobrevivir expuestas a otros metales pesados y biorreducirlos.

## CAPÍTULO 7

### REFERENCIAS

- ☑ Abskharon, R. N. N., Gad El-Rab, S. M. F., Hassan, S.H.A. y Shoreit, A. A. M. (2009). Reduction of toxic hexavalent chromium by *E. Coli*. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*. 4(2): 98-103.
  
- ☑ Ackerley, D. F.; González, C. F.; Park, C. H.; Blake, R.; Keyhan, M. y Martin, A. (2004). Chromate-reducing properties of soluble flavoproteins from *Pseudomonas putida* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 20(2): 873-882.
  
- ☑ Albert, L. A. (1997). Toxicología ambiental. Capítulo 14: Cromo. Consultado en red. Disponible en: [www.bvsde.ops-oms.org/bvstox/fulltext/toxico/toxico-03a14.pdf](http://www.bvsde.ops-oms.org/bvstox/fulltext/toxico/toxico-03a14.pdf).
  
- ☑ APHA. American Public Health Association. (1998). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (20a edición). American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environmental Federation. Washington, DC., USA.
  
- ☑ Barrionuevo, M., Daniel, M. A., Garavaglia, L., Méndez, N., Sosa, G., Candal, R., Cerdeira, S., Ceretti, H., Ramírez, S., Reciulschi, E., Zalts, A. y Vullo, D. L. (2009). Tratamiento biológico de efluentes industriales con contenido en metales: factores a tener en cuenta para un diseño eficiente. *Química Viva*. 8: 106-124.
  
- ☑ Becerra, T. S. L.; Rodríguez, V. M. L.; Jaramillo, J. F.; Martínez, S. M. C.; Rodríguez, M. G.; Reyes, R. M. A. y Posadas, R. F. A. (2008). Nefrotoxicidad producida por el cromo y actividad urinaria de la dipeptidilaminopeptidasa IV en ratas. Efecto protector de la Quercetina. *Revista Mexicana de Ciencias*

Farmacéuticas. Consultado en red. Disponible en:  
<http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=57911110002>.

- ☑ Benazir, J. F.; Suganthi, R.; Rajvel, D.; Padmini, M. y Mathithumilan, B. (2010). Bioremediation of chromium in tannery effluent by microbial consortia. *African Journal of Biotechnology*. 9(21): 3140-3143.
- ☑ Bennett, J. y Cabbage, J. (1992). Review and evaluation of Microtox test for freshwater sediments. Washington State Department of Ecology. Olympia, Washington. 28 pp.
- ☑ Bojórquez, A. R. (2010). Aislamiento e identificación de bacterias resistentes a sustancias tóxicas en sedimentos del Río Lerma. Tesis de Maestría. UAEM. Facultad de Ingeniería. Centro Interamericano de Recursos del Agua. 121 pp.
- ☑ Bandhyopadhyay, K., Das, D. y Maiti, B. (1999). Solid matrix characterization of immobilized *Pseudomonas putida* MTCC 1194 used for phenol degradation. *Applied Microbiology Biotechnology*. 51: 891-895.
- ☑ CAM. Comisión Ambiental Metropolitana. (1998). Concepto de manejo de residuos peligrosos e industriales para el giro de la galvanoplastia. Manual de minimización, tratamiento y disposición. México, D.F. 114 pp.
- ☑ 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 Microb. Rev.* 25: 335-347.
- ☑ Cervantes, C. y Campos-García, J. (2007). Reduction and efflux of chromate by bacteria. En: *Molecular microbiology of heavy metals*. Springer-Verlag. Berlin. p. 407-420.
- ☑ Chandrasekaran, S. y Lalithakumari, D. (1998). Maintenance of a *Pseudomonas fluorescens* plasmid in heterologous hosts: metabolic burden as a more reliable

variable to predict plasmid instability. *Indian J Exp Biol.* 36(7): 693-698.

- ☑ Cheung, K. H. y Gu, J. D. (2005). Chromate reduction by *Bacillus megaterium* TKW3 isolated from marine sediments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 21: 213-219.
  
- ☑ Cheung, K. H. y Gu, J. D. (2007). Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review. *International Biodeterioration and Biodegradation.* 59(1): 8-15.
  
- ☑ Chirwa, E. M. N. y Molokwane, P. E. (2011). Biological Cr(VI) reduction: Microbial diversity, kinetics and biotechnological solutions to pollution. Cap. 5. InTech Online Publishers. Reino Unido., p. 75-100. Consultado en red. Disponible en: <http://www.docstoc.com/docs/122385873/Biological-cr-vi-reduction-microbial-diversity-kinetics-and-biotechnological-solutions-to-pollution>.
  
- ☑ Cohen, Y. (2001). Biofiltration - the treatment of fluids by microorganisms immobilized into the filter bedding material: a review. *Bioresource Technology.* 77: 257-274.
  
- ☑ Contreras, E. M., Ferro-Orozco, A. M. y Zaritzky, N. E. (2011). Biological Cr(VI) removal coupled with biomass growth, biomass decay, and multiple substrate limitation. *Water Research.* 45: 3034-3046.
  
- ☑ Córdoba, A., Vargas, P. y Dussan, J. (2008). Chromate reduction by *Arthrobacter* CR47 in biofilm packed bed reactors. *Journal of Hazardous Materials.* 151: 274-279.
  
- ☑ DeLeo, P. C. y Ehrlich, H. L. (1994). Reduction of hexavalent chromium by *Pseudomonas fluorescens* LB300 in batch and continuous cultures. *Appl Microbiol Biotechnol.* 40: 756-759.

- ☑ Dhal, B., Thatoi, H., Dasc, N. y Pandeya, B. D. (2010). Reduction of hexavalent chromium by *Bacillus sp.* isolated from chromite mine soils and characterization of reduced product. *J Chem Technol Biotechno.* 85(11): 1471-1479.
  
- ☑ Dmitrenko, G. N., Konovalova, V. V. y Shum, O. A. (2003). The reduction of Cr(VI) by bacteria of the genus *Pseudomonas*. *Microbiology.* 72(3): 327-330. Traducido de *Mikrobiologiya.* 72(3): 370-373.
  
- ☑ DOF. Diario Oficial de la Federación. (1996a). NOM-001-ECOL-1996. Norma Oficial Mexicana que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas residuales en aguas y bienes nacionales.
  
- ☑ DOF. Diario Oficial de la Federación. (1996b). NOM-002-ECOL-1996. Norma Oficial Mexicana que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal.
  
- ☑ DOF. Diario Oficial de la Federación. (2001). NMX-AA-044-SCFI-2001. Análisis de aguas. Determinación de cromo hexavalente en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas. Método de Prueba.
  
- ☑ 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: 700-705.
  
- ☑ Faisal, M. y Hasnain, S. (2004). Microbial conversion of Cr (VI) in to Cr (III) in industrial effluent. *African Journal of Biotechnology.* 3(11): 610-617.
  
- ☑ Franco-Plata, R. (2008). Concepción e implementación de un módulo hidrogeomático para la evaluación de disponibilidad de recursos hídricos. Tesis de Doctorado. UAEM. Facultad de Ingeniería. Centro Interamericano de Recursos del Agua. 185 pp.

- ☑ Ganguli, A. y Tripathi, A. K. (2002). Bioremediation of toxic chromium from electroplating effluent by chromate-reducing *Pseudomonas aeruginosa* A2Chr in two bioreactors. *Appl Microbiol Biotechnol.* 58: 416-420.
  
- ☑ Garazzino, S.; Aprato, A.; Maiello, A.; Massé, A.; Biasibetti, A.; De Rosa, F. G. y Di Perri, G. (2005). Osteomyelitis caused by *Enterobacter cancerogenus* infection following a traumatic injury: Case report and review of the literature. *J. Clin. Microbiol.* 43(3): 1459-1461.
  
- ☑ Garrity, G. M.; Brenner, D. J.; Krieg, N. R.; Staley, J. T. (Editores) (2008). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* (2a ed.). Vol. 2. Springer. Michigan, USA. 1136 pp.
  
- ☑ Garzón-Jiménez, C. y Barragán-Huerta, B. E. (2008). Inmovilización microbiana: Técnicas y usos en el tratamiento de residuos tóxicos. *Revista Sistemas Ambientales.* 2(1): 23-34.
  
- ☑ Guevara, Z. D. S. (2010). Biorremoción de cromo (cromo total y cromo VI) en agua sintética por dos inóculos bacterianos nativos compuestos, a escala de laboratorio. Tesis de Licenciatura. Escuela Politécnica del Ejército. Sangolquí. pp. 80.
  
- ☑ Gutiérrez, C. J. F. y Cervantes, C. (2008). Interacciones microbianas con el cromo: mecanismos y potencial biotecnológico. *Ide@s CONCYTEG.* 3(37): 21-35.
  
- ☑ INEI. Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas. (2001). Manual de procedimientos para la determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos en bacterias aisladas de humanos. Buenos Aires, Argentina. 69 pp.
  
- ☑ Islas, E. M. y Bojórquez, A. R. (2010). Bacterias reductoras de Cr<sup>6+</sup> y su potencial biotecnológico. Primer Congreso Nacional de Investigación e Innovación Tecnológica Ambiental. Centro Nuclear de México. 1-3 junio de 2010.

- ☑ Islas-Espinoza, M. y Bojórquez-Aguilar, R. (2011). Bacterias reductoras de Cr<sup>+6</sup> y su potencial biotecnológico. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 27(3): 231-239.
  
- ☑ Li, X. y Krumholz, L. R. (2007). Regulation of arsenate resistance in *Desulfovibrio desulfuricans* G20 by an *arsRBCC* Operon and an *arsC* Gene. *Journal of Bacteriology.* 189(10): 3705-3711.
  
- ☑ Lima, M. A. J. (2007). Evaluación bacteriológica de la calidad del agua del Río Lerma, México. Tesis de Licenciatura. UNAM. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. 88 pp.
  
- ☑ Madigan, M. T.; Martinko, J. M. y Parker, J. (2003). Brock: Biología de los microorganismos. (10<sup>a</sup> ed.). Madrid, España: Pearson Prentice Hall.
  
- ☑ Maier, R. M. (2000). Bacterial growth. En: Maier, R. M., Pepper, I. L. y Gerba, C. P. (2000). *Environmental Microbiology.* USA: Academic Press.
  
- ☑ Mantilla, M. G.; Sanvicente, H. S. e Izurieta, J. D. (2000). Identificación de zonas de contaminación de los cuerpos de agua de la cuenca del Río Lerma mediante la interpretación de imágenes de satélite y ubicación de las principales descargas de aguas residuales. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua. Consultado en red. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/saneab/mexicona/R-0166.pdf>.
  
- ☑ Martín, C. E. (2001). Análisis de las variables que afectan el desarrollo de microorganismos filamentosos en sistemas de barros activados para el tratamiento de efluentes de la industria alimenticia. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas. 200 pp.
  
- ☑ Masood, F. y Malik, A. (2011). Hexavalent chromium reduction by *Bacillus* sp. strain FM1 isolated from heavy-metal contaminated soil. *Bull Environ Contam Toxicol.* 86: 114-119.

- ☑ McLean, J. y Beveridge, T. J. (2001). Chromate reduction by a *Pseudomonad* isolated from a site contaminated with chromated copper arsenate. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(3): 1076-1084.
  
- ☑ Moral, R. A.; Tijero, C. A.; Tijero, M. J.; Torres, G. E. y Pérez, O. I. (2010). Depuración de Cromo III en aguas residuales que contienen alta carga proteica. Congreso Nacional del Medio Ambiente. Madrid, España. 22-26 de noviembre de 2010.
  
- ☑ Morales, D. K.; Ocampo, W. y Zambrano, M. M. (2007). Efficient removal of hexavalent chromium by a tolerant *Streptomyces* sp. affected by the toxic effect of metal exposure. *Journal of Applied Microbiology*. 103: 2704-2712.
  
- ☑ Muneer, B.; Rehman, A.; Shakoori, F. R. y Shakoori, A. R. (2009). Evaluation of consortia of microorganisms for efficient removal of hexavalent chromium from industrial wastewater. *Bull Environ Contam Toxicol*. 82: 597–600.
  
- ☑ NTP. Programa Nacional de Toxicología. (2011). Report on Carcinogenesis. Chromium hexavalent compounds., 11ª ed. E.U.A. p. 106-109.
  
- ☑ Neri, R. (1980). En: Albert, L. A. (1997). Toxicología ambiental. Capítulo 14: Cromo. Consultado en red. Disponible en: [www.bvsde.ops-oms.org/bvstox/fulltext/toxico/toxico-03a14.pdf](http://www.bvsde.ops-oms.org/bvstox/fulltext/toxico/toxico-03a14.pdf).
  
- ☑ 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. *Biol Trace Elem Res*. 123: 229-241.
  
- ☑ Oliveira, M. J. (2003). Estudio de la biosorción de cobre Cu(II) por perlas de alginato de calcio. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ingeniería Química. 76 pp. Consultado en red. Disponible en: [http://www.cybertesis.edu.pe/sisbib/2003/oliveira\\_mj/pdf/oliveira\\_mj.pdf](http://www.cybertesis.edu.pe/sisbib/2003/oliveira_mj/pdf/oliveira_mj.pdf).



- ☑ OMS. Organización Mundial de la Salud. 2006. Guías para la calidad del agua potable [recurso electrónico]. 3ª ed. Vol. 1. Consultado en red. Disponible en: [http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/dwq/gdwq3rev/es/index.html](http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3rev/es/index.html).
  
- ☑ Pattanapitpaisal, P.; Brown, N. L. y Macaskie, L. E. (2001). Chromate reduction and 16s rRNA identification of bacteria isolated from a Cr(VI)-contaminated site. *Appl Microbiol Biotechnol.* 57: 257-261.
  
- ☑ Pellerin, C. y Booker, S. M. (2000). Reflections on Hexavalent Chromium. *Environmental Health Perspectives.* 108(9): 402-407.
  
- ☑ Pérez, M. E. (2006). Cromatos de México tumba tóxica. Consultado en red. Disponible en: [http://www.diaav.com.mx/archivo/2006/octubre/htm/cromatos\\_mexico.htm](http://www.diaav.com.mx/archivo/2006/octubre/htm/cromatos_mexico.htm).
  
- ☑ Poustka, A.; Rackwitz, H. R.; Frischauf, A. M.; Hohn, B. y Lehrach, H. (1984). Selective isolation of cosmid clones by homologous recombination in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 4129-4133.
  
- ☑ Ramírez-Díaz, M. I.; Díaz-Pérez, C.; Vargas, E.; Riveros-Rosas, E. Campos-García, J. y Cervantes, C. (2008). Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals.* 21: 321-332.
  
- ☑ Ramírez-Díaz, M. I.; Rivero-Rosas, H.; Campos-García, J. y Cervantes, C. (2009). Reducción bacteriana de cromo hexavalente: Mecanismos y aplicaciones. *Revista de Educación Bioquímica.* 28(3): 73-79.
  
- ☑ Rege, M. A.; Petersen, J. N.; Johnstone, D. L.; Turick, C. E.; Yonge, D. R. y Apel, W. A. (1997). Bacterial reduction of hexavalent chromium by *Enterobacter cloacae* strain HO1 grown on sucrose. *Biotechnology Letters.* 19(7): 691-694.

- ☑ Roane, T. M. y Pepper, I. L. (2000). Microorganisms and metal pollutants. En: Maier, R. M., Pepper, I. L. y Gerba, C. P. (2000). Environmental Microbiology. USA: Academic Press.
  
- ☑ Romanenko, V. I. y Korenkov, V. N. (1977). A pure culture of bacterial cells assimilating chromates and bichromates as hydrogen acceptors when grown under anaerobic conditions. *Mikrobiologiya*. 46: 414–417.
  
- ☑ Romero, M. E.; Ramalho, J. y Ploper, L. D. (2008). Acción inhibitoria de una cepa de *Zymomonas mobilis mobilis* aislada de caña de azúcar sobre *Xanthomonas citri* subsp. *citri*, agente causal de la cancrrosis de los cítricos. *Rev. Ind. y Agric de Tucumán*. 85(1): 17-22.
  
- ☑ Sánchez, L. L. C. y Corrales, R. L. C. (2005). *Nova-Publicación científica*. 3(3): 109-113.
  
- ☑ Shakoory, A.R., Makhdoom, M. y Haq, R.U. (2000). Hexavalent chromium reduction by a dichromate-resistant gram-positive bacterium isolated from effluents of tanneries. *Appl Microbiol Biotechnol*. 53: 348-351.
  
- ☑ Sharma, K. (2002). Microbial Cr(VI) reduction: Role of electron donors, acceptors, and mechanisms, with special emphasis on *Clostridium* spp. Doctoral thesis. University of Florida. pp. 119.
  
- ☑ Singh, V.; Chauhan, P. K.; Kanta, R.; Dhewa, T. y Kumar, V. (2010). Isolation and characterization of *Pseudomonas* resistant to heavy metals contaminants. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. 3(2): 164-167.
  
- ☑ Smith, M. A. y Bidochka, M. J. (1998). Bacterial fitness and plasmid loss: the importance of culture conditions and plasmid size. *Can. J. Microbiol*. 44: 351-355.

- ☑ Srinath, T., Verma, T., Ramteke, P. W. y Garg, S. K. (2002). Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. *Chemosphere*. 48: 427-435.
  
- ☑ Thacker, U. y Madamwar, D. (2005). Reduction of toxic chromium and partial localization of chromium reductase activity in bacterial isolate DM1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 21: 891-899.
  
- ☑ Tsapakos, M. T.; Hampton, T. H. y Wetterhahn, K. E. (1983). Chromium(VI)-induced DNA lesions and chromium distribution in rat kidney, liver and lung. *Cancer Research*. 43:5662-5667.
  
- ☑ UNAC. Universidad Nacional del Callao. (2010). Investigación. Factibilidad técnica para la recuperación del sulfato de cromo III. Consultado en red el 21/10/2012. Disponible en: [www.unac.edu.pe/.../vri/...Investigacion/.../CONTENIDO.pdf](http://www.unac.edu.pe/.../vri/...Investigacion/.../CONTENIDO.pdf).
  
- ☑ Ünaldi, M. N.; Korkmaz, H.; Arıkan, B. y Coral, G. (2005). Plasmid mediated heavy metal resistances in *Enterobacter* spp. isolated from Sofulu landfill, in Adana, Turkey. *Annals of Microbiology*. 55(3): 175-179.
  
- ☑ Vullo, L. D. (2003). Microorganismos y metales pesados: Una interacción en beneficio del medio ambiente. *Química Viva*. 2(3): 93-104.
  
- ☑ Wasi, S.; Shams, T. y Masood, A. (2011). Suitability of immobilized *Pseudomonas fluorescens* SM1 for remediation of phenols, heavy metals, and pesticides from water. *Water Air Soil Pollut*. 220: 89-99.
  
- ☑ Zarazúa, O. G. (2008). Evaluación de las contribuciones naturales y antropogénicas de los metales pesados Cr, Mn, Fe, Cu, Zn y Pb y su distribución en el agua y sedimento en el curso alto del Río Lerma. Tesis de Doctorado. UAEM. Facultad de Ingeniería. Centro Interamericano de Recursos del Agua. pp. 229.

- ☑ Zhu, W., Yang, Z., Ma, Z. y Chai, L. (2008). Reduction of high concentrations of chromate by *Leucobacter sp.* CRB1 isolated from Changsha, China. *World J Microbiol Biotechnol.* 24: 991-996.

# **ANEXO 1**

## **COMPOSICIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO**

**Tabla.** Composición del Agar para Métodos Estándar (AMS)

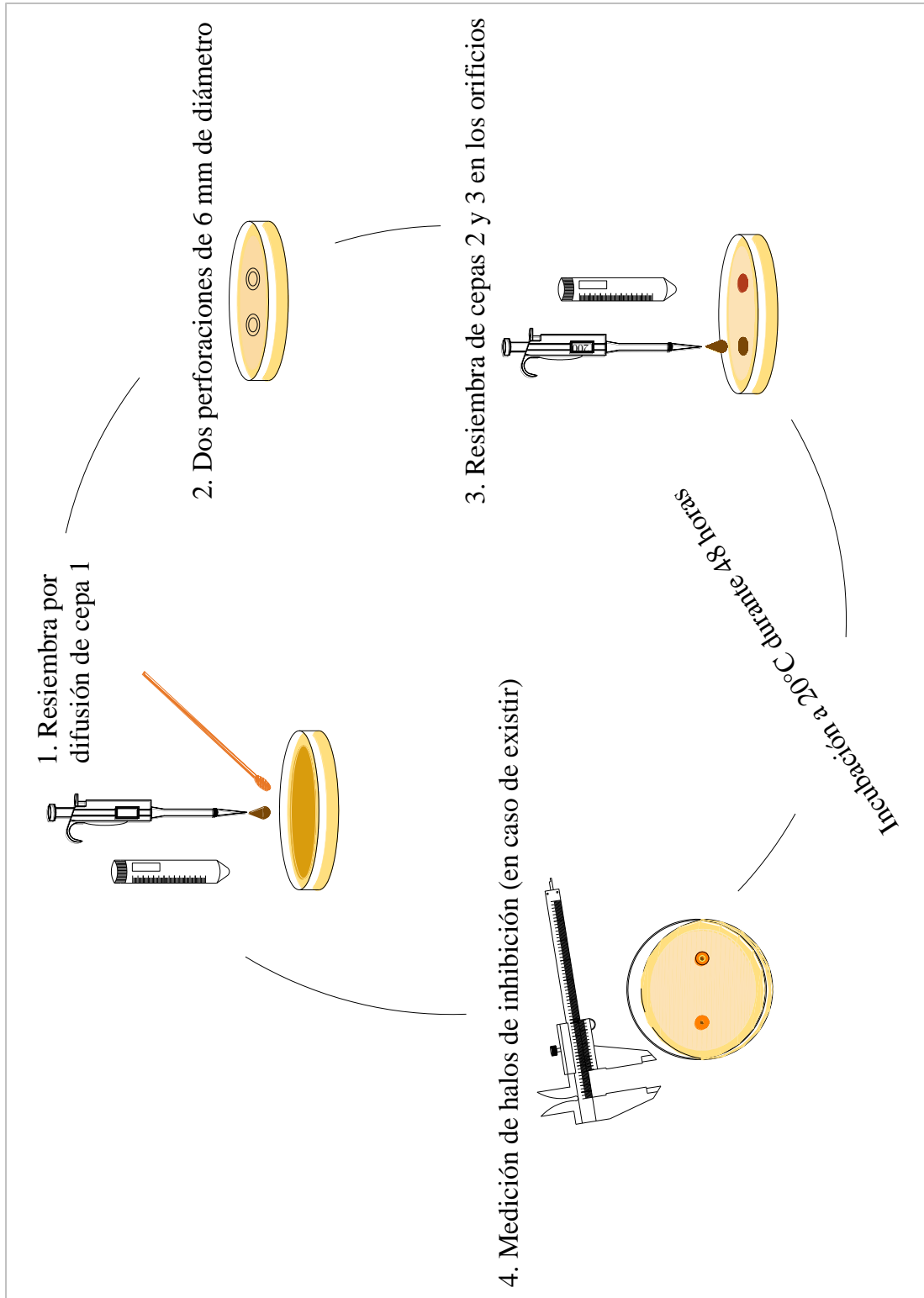
<b>Componentes</b>	<b>g L<sup>-1</sup></b>
Peptona de caseína	5
Extracto de levadura	2.5
Dextrosa	1
Agar	15

**Tabla.** Composición del Caldo Trypticaseína y Soya (CTS)

<b>Componentes</b>	<b>g L<sup>-1</sup></b>
Peptona de caseína	15
Peptona de soya	5
NaCl	5

## **ANEXO 2**

### **PRUEBA DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA**

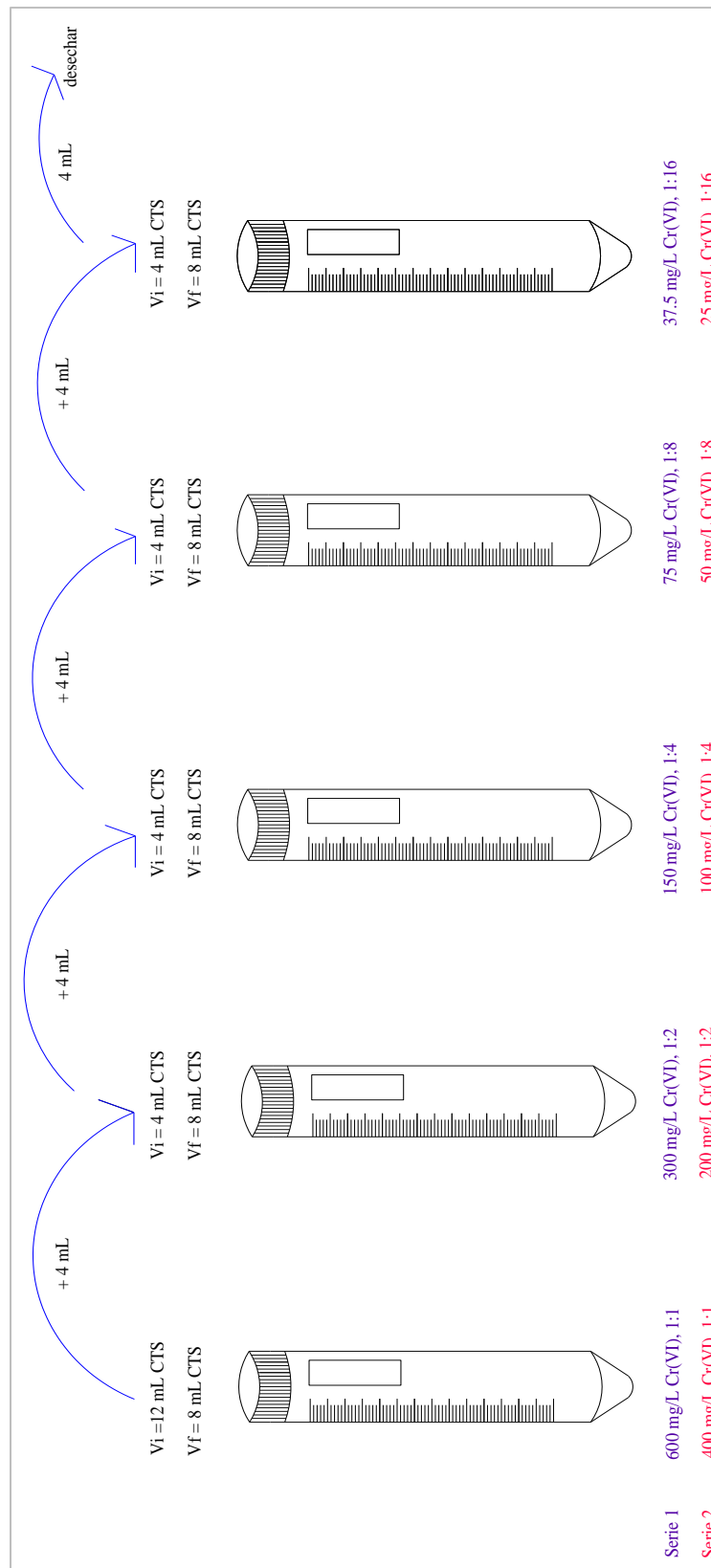


**Figura .** Prueba de actividad antimicrobiana para formación de consorcio bacteriano.



## **ANEXO 3**

### **MÉTODO DE DILUCIÓN EN CALDO PARA DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA**



**Fig.** Método de dilución en caldo para determinación de CMI. Dicho procedimiento se realizó por cada cepa y por triplicado.

## **ANEXO 4**

### **MÉTODO PARA PREPARACIÓN DE INÓCULO BACTERIANO**

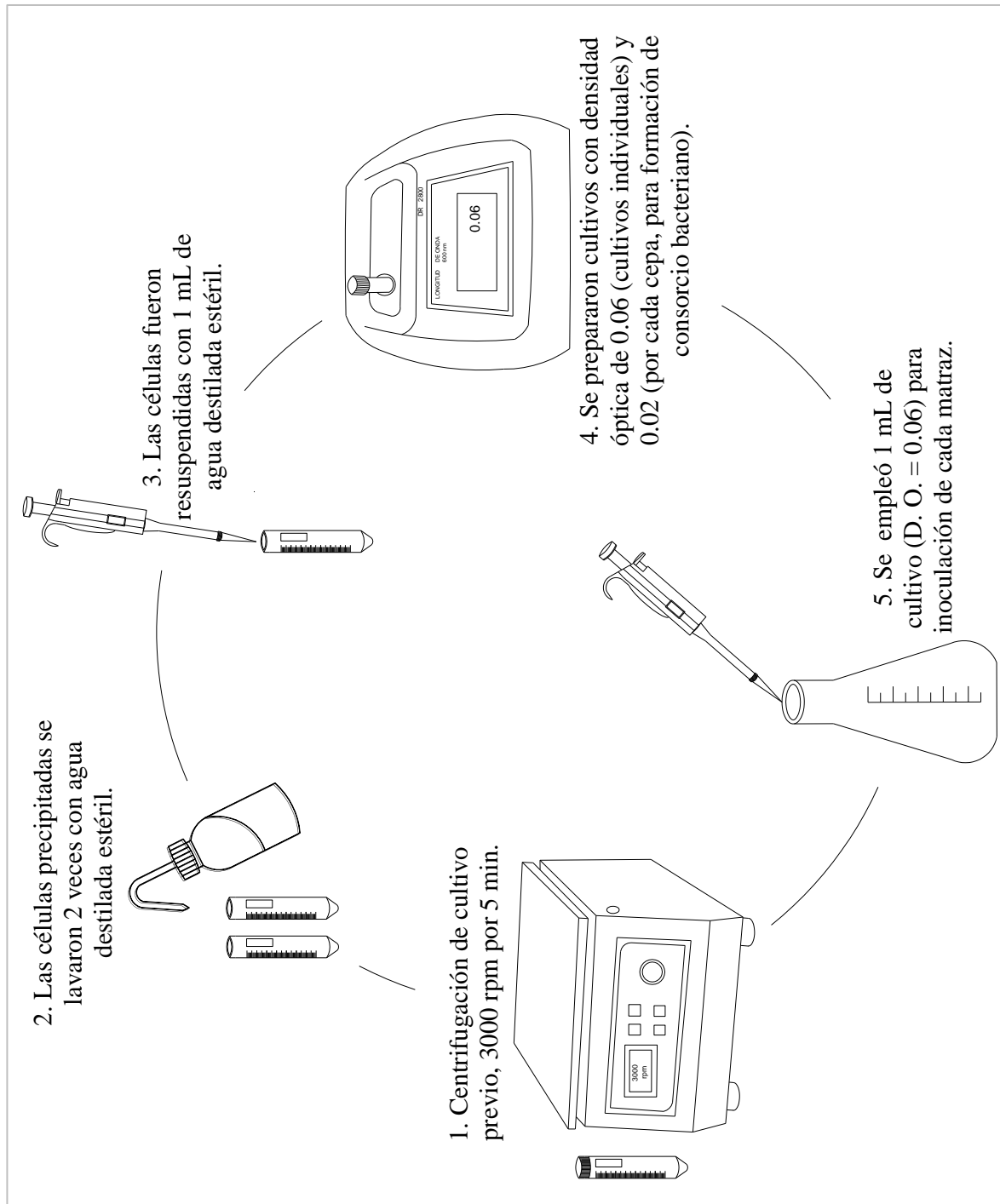


Fig. Método para preparación del inóculo bacteriano empleado en las cinéticas.



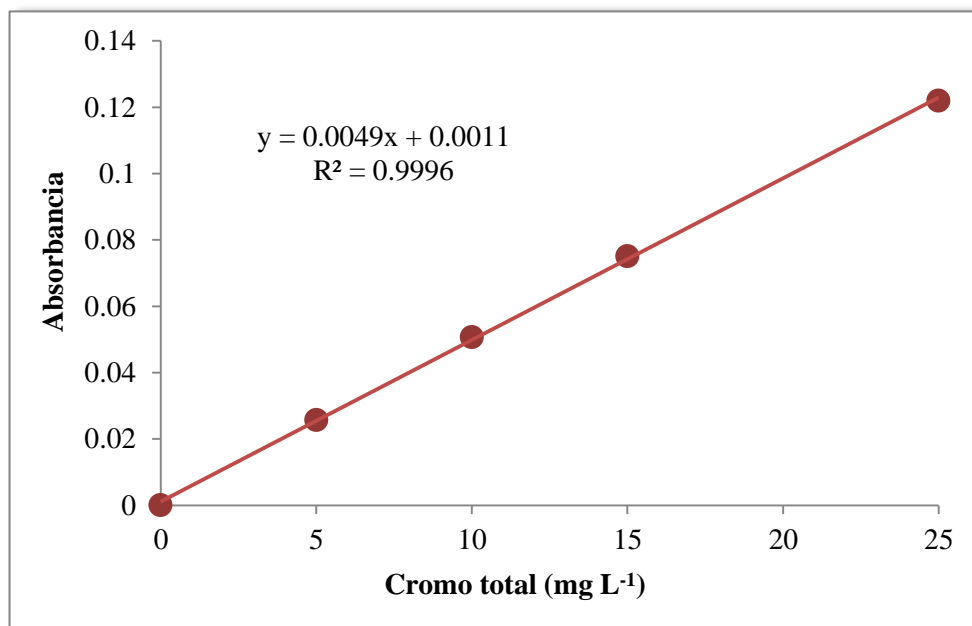


## **ANEXO 4**

### **CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA MEDICIÓN DE CROMO TOTAL**

**Tabla 6.** Concentraciones de cromo total empleadas en las curvas de calibración de las pruebas de biorreducción.

	Concentración de cromo total (mg L <sup>-1</sup> )	Absorbancia
	<b>Curva 1</b>	
	5	
	10	
	15	
	25	
<b>Control</b>	20	
<b>Longitud de onda λ (nm)</b>	425.4	



**Figura .** Curva calibración de cromo total (5-25 mg L<sup>-1</sup>).



	Concentración de cromo total (mg L <sup>-1</sup> )	Absorbancia
	<b>Curva 2</b>	
	10	
	15	
	25	
	30	
<b>Control</b>	20	
<b>Longitud de onda λ (nm)</b>	425.4	

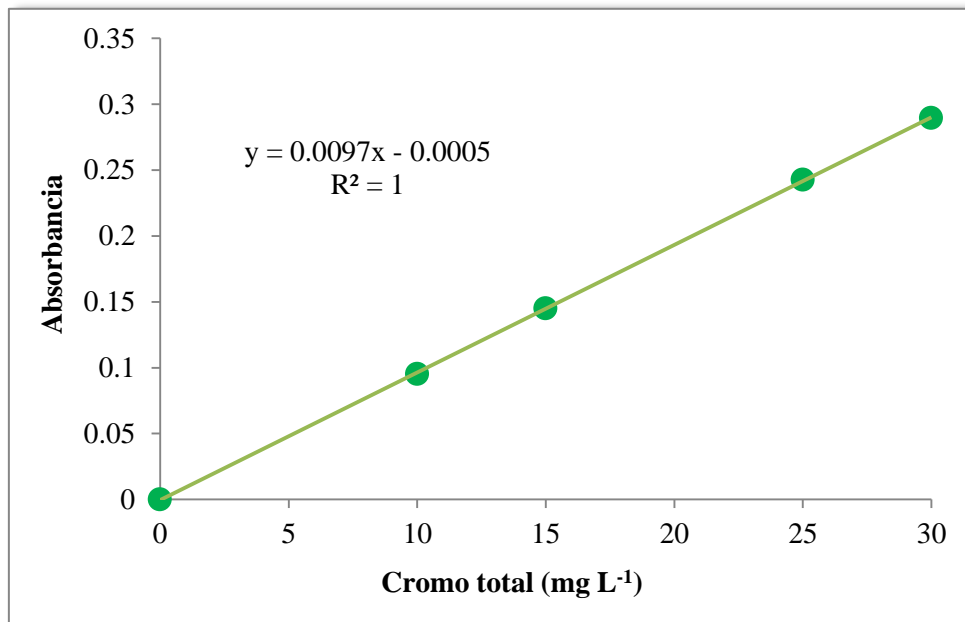


Figura . Curva calibración de cromo total (10-30 mg L<sup>-1</sup>).

	Concentración de cromo total (mg L <sup>-1</sup> )	Absorbancia
	<b>Curva 3</b>	
	2	
	4	
	6	
	8	
<b>Control</b>	5	
<b>Longitud de onda λ (nm)</b>	357.9	

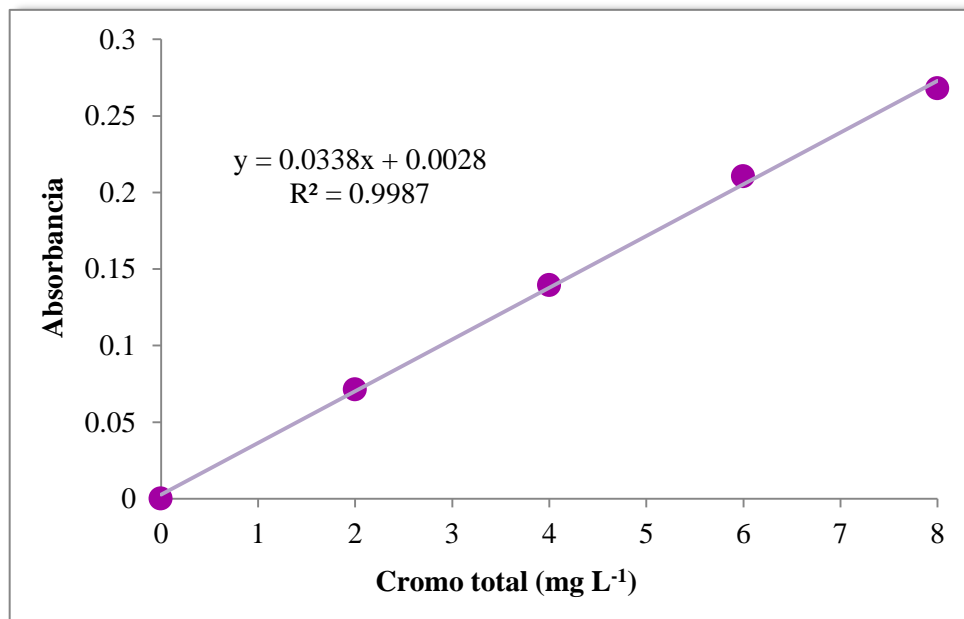
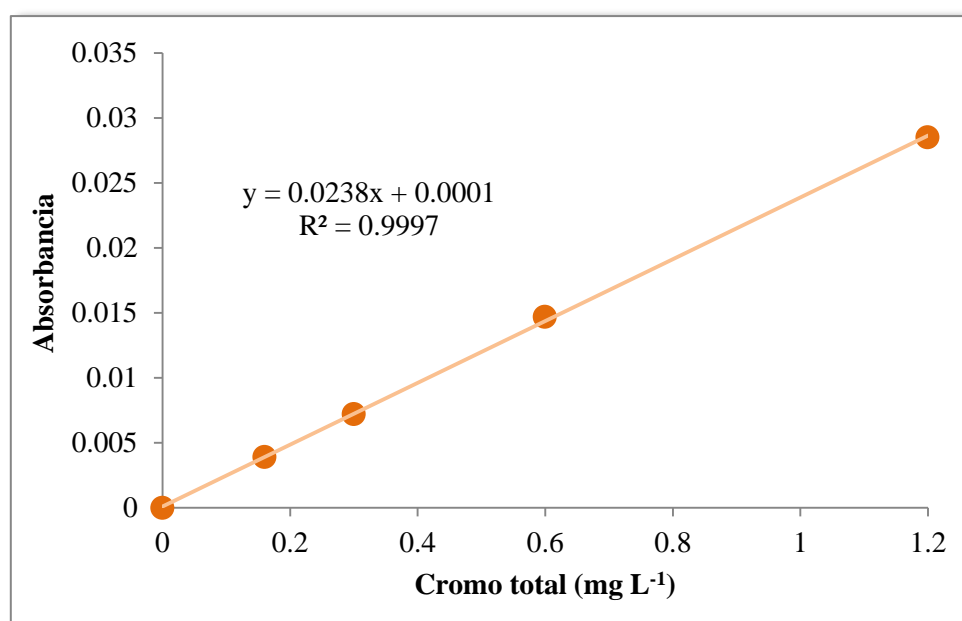


Figura . Curva calibración de cromo total (2-8 mg L<sup>-1</sup>).

**Tabla 7.** Concentraciones de cromo total empleadas en las curvas de calibración en las pruebas de acumulación.

Concentración de cromo total (mg L <sup>-1</sup> )			
	Curva 1	Curva 2	Curva 3
	0.16	0.6	1.2
	0.3	1.2	2
	0.6	2	4
	1.2	5	8
<b>Control</b>	0.5	4	5
<b>Longitud de onda λ (nm)</b>	357.9	357.9	429



**Figura .** Curva calibración de cromo total (0.16-1.2 mg L<sup>-1</sup>).

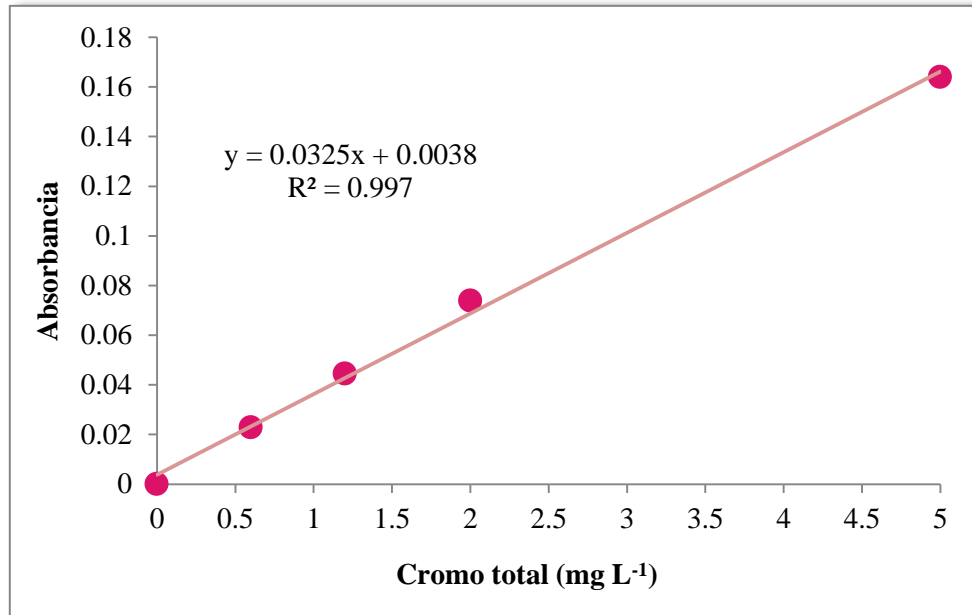


Figura . Curva calibración de cromo total (0.6-5 mg L<sup>-1</sup>).

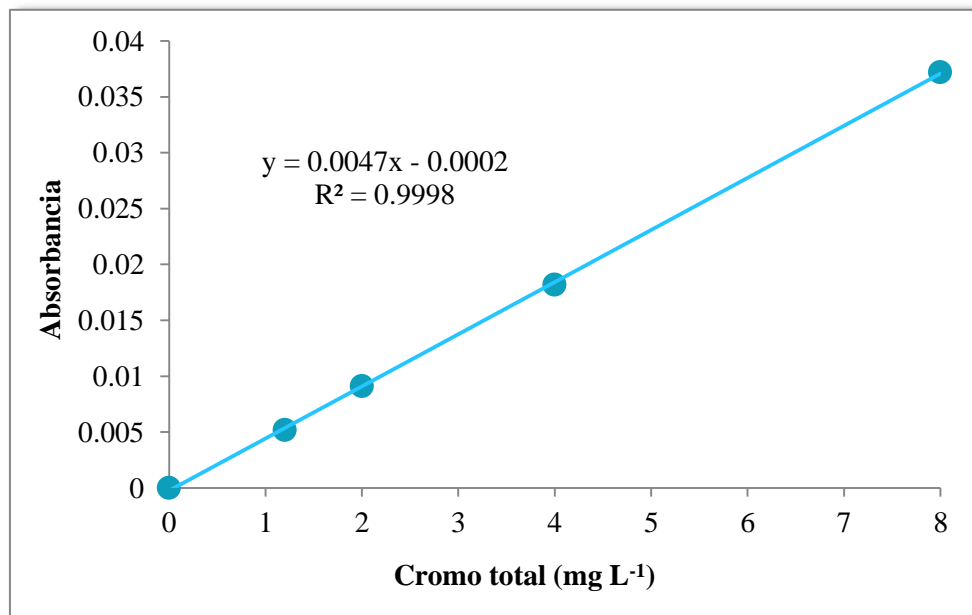


Figura . Curva calibración de cromo total (1.2-8 mg L<sup>-1</sup>).

## **ANEXO 5**

### **CURVA DE CALIBRACIÓN PARA MEDICIÓN DE CROMO HEXAVALENTE**

Concentración de cromo total (mg L <sup>-1</sup> )	Absorbancia
0.01	0.016
0.03	0.034
0.05	0.061
0.07	0.089
0.1	0.127
0.3	0.355
0.5	0.608
0.7	0.851

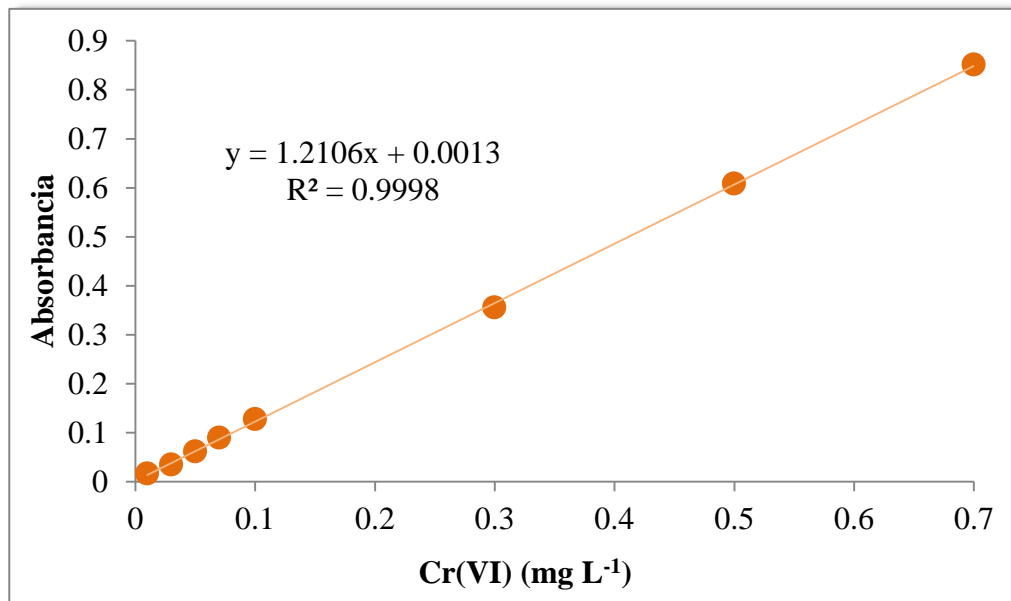


Figura . Curva de calibración de Cr(VI)



## ANEXO 7

