

Revista Electrónica Nova Scientia

*Bacillus sp. G3 un microorganismo promisorio
en la biorremediación de aguas industriales
contaminadas con cromo hexavalente*
*Bacillus sp. G3 a promissory microorganism in
bioremediation of industrial wastewater
contaminated with hexavalent chromium*

Alexander Mora Collazos

Grupo de Investigación en Biología de Plantas y Microorganismos,
Departamento de Biología, Universidad del Valle, Cali

Colombia

Resumen

Introducción: El presente trabajo tuvo como objetivo identificar y caracterizar microorganismos provenientes de un agua residual industrial potencialmente útiles en biorremediación de aguas contaminadas con cromo hexavalente.

Metodología: Se realizó el aislamiento de tres microorganismos partiendo de un agua residual industrial proveniente de una empresa de galvanoplastia. Se evaluó el potencial de los microorganismos aislados en su capacidad para reducir cromo hexavalente; escogiéndose al aislado bacteriano G3 por mostrarse potencialmente útiles en biorremediación de cromo hexavalente. Se realizó la caracterización morfológica, bioquímica e inferencias filogenéticas basadas en el gen del ARNr 16S del aislado seleccionado; se evaluó el potencial de reducción de cromo hexavalente asociado a la actividad microbiana y la actividad enzimática utilizando un extracto libre de células; de forma adicional, se realizaron bioensayos de reducción de cromo evaluando la acción conjunta de los 3 microorganismos.

Resultados: Los datos moleculares y pruebas bioquímicas sugieren que el aislado bacteriano G3 pertenece al grupo de *Bacillus cereus sensu lato*. Los bioensayos de reducción de cromo hexavalente (10 mg/L) realizados con *Bacillus* sp. G3 mostraron una reducción química del 100% del contaminante al cabo de diez horas en medio LB y de 34 horas en agua residual industrial. El extracto libre de células obtenido a partir del aislado bacteriano G3 mostró actividad de cromato reductasa al reducir el cromo hexavalente a su forma trivalente, mostrando valores óptimos de actividad relativa a 28°C y 6.5 de pH. La acción conjunta de los microorganismos sobre la reducción de cromo se mostró cinco veces menos eficiente que los ensayos realizados solo con la cepa G3.

Discusión o conclusión: Los resultados sugieren, que el aislado bacteriano G3 se muestra como un microorganismo con buen potencial para utilizarse en procesos de biorremediación de aguas contaminadas con cromo hexavalente, en particular en aguas industriales.

Palabras Clave: Agua residual industrial, *Bacillus*, Cromo hexavalente, extracto libre de células

Recepción: 27-07-2016

Aceptación: 10-11-2016

Abstract

Introduction: The current study aimed to identify and characterize promissory microorganisms in bioremediation of waters contaminated with hexavalent chromium.

Method: The isolation and purification of three bacterial isolates from a electroplating was achieved, of the three microorganisms isolated was chosen the bacterial isolated G3 for showed a good potential in bioremediation of hexavalent chromium. The morphological and biochemical characterization and phylogenetic inferences based in the gene of the rRNA 16S of isolated selected was performed; current study evaluated the potential for the reduction of hexavalent chromium associated to biological activity and enzyme activity of chromate reductases using cell-free extract. Additionally, bioassays of reduction of hexavalent chromium with the three microorganisms isolated was performed.

Results: Biochemical tests and analysis of the 16S rRNA gene suggest that the bacterial isolated G3 belongs to *Bacillus cereus sensu lato* group. The 100% of reduction of hexavalent chromium in bioassays for 10 mg/L was reached at 10 hour in LB medium and 34 hours in industrial wastewater. The cell-free extract showed chromium reduction activity with optimum values at the temperature of 28°C and pH 6.5. The assay realized with the three microorganisms together on the reduction of chromium is showed five times less efficient than the assays realized only with the strain G3.

Discussion or Conclusion: The results suggest that *Bacillus* sp. G3 is a promissory microorganism with good potential for bioremediation processes of water contaminated with hexavalent chromium, in particular concerning detoxification of industrial wastewater.

Keyword: *Bacillus*, cell-free extract, hexavalent chromium, industrial wastewater

Introducción

El cromo es un importante metal pesado ampliamente usado en la industria. Este metal es liberado al ambiente derivado de la operación de un gran número de industrias: metalizado, galvanoplastias, industrias textiles, refinerías de petróleo, preparación de maderas, entre otras (Ezaka, 2011). El cromo es un metal de transición con múltiples estados de oxidación que van desde -II hasta +VI, siendo el cromo trivalente, Cr(III) y Cromo hexavalente, Cr(VI) los estados de oxidación más comunes y estables en medios naturales (Fendorf, 1995); los diferentes estados de oxidación, le confieren diferentes propiedades químicas, grados de toxicidad, y grados de movilidad en ambientes naturales (Rai *et al.*, 1989).

El Cr(III) es estable en ambientes naturales, presenta baja solubilidad a través de las membranas biológicas, se precipita rápidamente siendo adsorbido en partículas en suspensión y sedimentos del fondo (Dhal *et al.*, 2013); en contraste, el Cr(VI) se encuentra principalmente en forma soluble en ambientes acuáticos, es extremadamente tóxico para los seres vivos causando alergias, irritaciones de las vías respiratorias, además de ser considerado un agente mutagénico, carcinogénico (Cervantes *et al.*, 2001) y teratogénico (Asmatullah *et al.*, 1998); la toxicidad del Cr(VI) se debe a su alta difusión a través de membranas biológicas, su subsecuente reducción genera radicales libres, los cuales ocasionan daños en el ADN y alteraciones en las funciones biológicas (Kadiiska *et al.*, 1994; Cheung y Gu, 2007; Dhal *et al.*, 2013).

Una gran variedad de bacterias resistentes al cromo han sido reportada en su capacidad de reducir Cr(VI) a Cr(III) (Dhal *et al.*, 2013; Ge *et al.*, 2013; Thatoi *et al.*, 2014); se ha demostrado, que los procariotas poseen mecanismo que les confieren mayor resistencia a los efectos tóxicos del Cr(VI) que los eucariotas (Kamaludeen *et al.*, 2003); se considera que la aplicación de bacterias resistentes a cromo en la detoxificación de Cr(VI) es un método económico, efectivo, seguro en comparación con métodos físicos y químicos (Kamaludeen *et al.*, 2003; Pinon-Castillo *et al.*, 2010).

El presente trabajo microbiológico se enfoca específicamente en la búsqueda y caracterización de microorganismos aislados de un agua residual industrial obtenida a partir de una industria galvanoplastia; identificando microorganismos potencialmente útiles biorremediación de aguas

Bacillus sp. G3 un microorganismo promisorio en la biorremediación de aguas industriales contaminadas con cromo hexavalente

contaminadas con cromo hexavalente, generando conocimientos los cual permitan generar estrategias de mitigación ambiental a mediano plazo.

Metodología

Aislamiento de los microorganismos cultivables

Se tomaron muestras de agua residual industrial (ARI) proveniente de una industria de metalizado, una galvanoplastia; las muestras de ARI se tomaron después de pasar por tanques de retención y antes de ser vertidas como desecho. El agua residual tenía un pH de 5.5 y contenía zinc (0.67 mg/L), cromo (10.45 mg/L) y níquel (14.11 mg/L). La muestra de agua fue concentrada y sembrada en medio líquido, basándose en la composición de agua residual artificial (ARA) (Lee *et al.*, 2003). Los cultivos se incubaron durante 24 horas, posteriormente se realizaron siembras en superficie en placas de ARA solidificadas con agar-agar, donde se seleccionaron microorganismos con características morfológicas distintivas.

Bioensayos de reducción de cromo hexavalente

Inicialmente se realizó un ensayo exploratorio de la capacidad de reducción de Cr(VI) para cada microorganismo aislado; los ensayos se realizaron en medio Luria Bertani (LB) a una concentración de Cr(VI) de 10 mg/L. El ensayo exploratorio permitió la selección del aislado bacteriano G3; microorganismo que fue caracterizado y utilizado de base en los siguientes ensayos.

Se evaluó el potencial de reducción de Cr(VI) y la cinética de crecimiento microbiano del aislado bacteriano G3; así como, el efecto sobre la reducción de Cr(VI) al realizar bioensayos donde se evaluó la acción conjunta de los diferentes microorganismos aislados, al ser adicionados juntos a un mismo bioensayo. Los bioensayos de reducción de Cr(VI) se llevaron a cabo en caldo LB con 10 mg/L de Cr(VI) y en ARI suplementada con glucosa al 0.5 mM y esterilizada por filtración. La cinética de crecimiento se estimó mediante densidad óptica (D.O) a 550 nm; La concentración de Cr(VI) se determinó en medio ácido por la formación de un complejo violeta con difenilcarbazida (DPC) por espectrofotometría a una longitud de onda de 540 nm (Greenberg *et al.*, 1992).

Caracterización morfológica y bioquímica de los microorganismos aislados

Se realizó la caracterización morfológica y bioquímica del aislado bacteriano G3 mediante observaciones macroscópicas y mediante microscopía óptica; la caracterización bioquímica se realizó utilizando el *BBL™ Crystal™ Gram positive ID Kit*.

Caracterización molecular mediante análisis del gen del ARNr 16S

Se realizó la extracción de ADN genómico a partir del cultivo puro del aislado bacteriano G3, utilizando el *Ultra Clean Microbial DNA Isolation kit* (MOBIO LAB); el ADN extraído se amplificó enzimáticamente utilizando los cebadores universales: 27F 5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3' y 1492R 5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT3. Se determinaron las secuencias mediante procedimientos estándares del servicio suministrado por la compañía Macrogen (USA). La secuencia obtenida fue depositada en la base de datos del *GenBank* con número de accesión: KU724079.

La secuencia obtenida fue comparada directamente con las bases de datos del *GenBank* y del *Ribosomal Database Project*; las herramientas de búsqueda de alineación local básica (Blast-N) y la herramienta de clasificación *naïve Bayesian classifier* (Wang *et al.*, 2007) se utilizaron para la clasificación y asignación de taxones jerárquicos. Se recolectaron secuencias de las bases de datos de las diferentes especies del género *Bacillus*; las secuencias fueron alineadas con el programa *Bioedit Sequence Alignment Editor* (Hall, 1999) y se utilizaron en la construcción de un árbol de máxima verosimilitud utilizando el software PAUP versión 4.0b10, el modelo de sustitución nucleotídica fue seleccionado por el criterio de Akaike en *ModelTest* versión 2.1.3 (Darriba *et al.*, 2012); el soporte estadístico fue evaluado mediante el bootstrap de máxima verosimilitud (ML) con 1000 repeticiones.

Obtención del extracto libre de células

El aislado bacteriano se cultivó previamente durante 12 horas en medio LB el cual contenía una concentración de 20 mg/L de Cr(VI); el cultivo fue centrifugado a 4000 r.p.m durante 10 min a 4°C, se realizaron dos lavados en buffer fosfato de potasio 0,1 M a pH 6.5; las células fueron resuspendidas en el mismo buffer en un volumen equivalente al 10% del cultivo original. La ruptura celular se realizó en un equipo *Vibra Cell Ultrasonic Processor VCX-750* (Sonics) realizando

Bacillus sp. G3 un microorganismo promisorio en la biorremediación de aguas industriales contaminadas con cromo hexavalente

cinco ciclos de 59 segundos con 59 segundos de intervalo entre ciclos a una potencia de 130 Watts; el producto celular se centrifugo a 12.000 g durante 10 min a 4°C; el sobrenadante el cual contenía el extracto libre de células (ELC) fue colectado (Sau *et al.*, 2010; Focardi *et al.*, 2012).

Ensayo de cromato reductasa

La actividad de las enzimas con acción de cromato reductasa presente en el extracto libre de células, se estimó basándose en los procedimientos utilizados por Park *et al.*, (2000) y Focardi *et al.*, (2012). La mezcla de la reacción (1 mL) contenía 5 mg/L de Cr(VI), 0.1 mM de NADH como donador de electrones en 800 µL de buffer fosfato de potasio 0.1 M pH 6.5 y 200 µL del ELC. Una mezcla con similar composición pero sin agregar la enzima fue utilizada como muestra testigo. La reducción de Cr(VI) se determinó por el decrecimiento de Cr(VI) en la mezcla de reacción después de 30 minutos de incubación por el método de la DPC.

Efecto del pH y temperatura sobre la actividad de la cromato reductasa

El efecto del pH y temperatura sobre la actividad de las enzimas con acción de cromato reductasa presentes en el ELC fue determinada mediante la incubación de la mezcla de reacción a diferentes valores de temperatura (26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40 °C) y diferentes valores de pH (5.5, 6.0, 6.5, 7.0 y 7.5). La actividad enzimática se determinó después de 30 minutos de incubación por el método de la DPC. Actividad relativa del ELC se expresó como porcentaje de la actividad máxima.

Resultados

Ensayo exploratorio de remoción de Cr(VI).

Se logró el aislamiento de tres microorganismos a partir de la muestra de ARI; las cepas bacterianas G1, G2 y G3 fueron evaluadas en su capacidad de reducción de Cr(VI) en medio LB ajustando la concentración de cromo a 10 mg/L. La cepa bacteriana G3 mostró la mejor tasa de reducción de Cr(VI) al reducir el 100% del contaminante al cabo de 10 horas; en contraste, las cepas bacterianas G1 y G2 aunque poseen mecanismos que les permiten reducir cromo, no se muestran como microorganismos eficientes, al reducir el 100% y 96% del contaminante al cabo de 48 horas, respectivamente.

De los tres microorganismos evaluados, se seleccionó el aislado bacteriano G3 al mostrarse potencialmente útil en el tratamiento de aguas residuales contaminadas con Cr(VI). La reducción biológica de Cr(VI) y la cinética de crecimiento del aislado bacteriano G3 en medio LB y en ARI se muestra en la Figura 1.

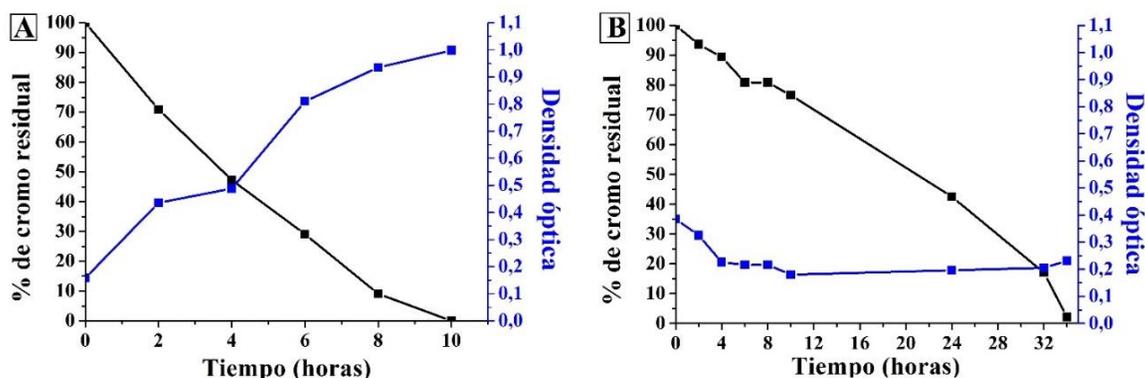


Figura 1. Reducción de cromo y cinética de crecimiento bacteriano del aislado G3. A) en medio Luria Bertani. B) en agua residual industrial.

En medio LB se registró una reducción del 100% de Cr(VI) al cabo de 10 horas con una tasa promedio de reducción de 1 mg/L por hora; El crecimiento bacteriano en medio LB se mantuvo en constante aumento, mostrando su máximo valor de absorbancia (0.998) al finalizar el ensayo. En contraste, en el agua residual industrial el aislado bacteriano G3 alcanzó la reducción del 100% del contaminante a las 34 horas con una tasa de reducción promedio de 0.28 mg/L lo cual indica una disminución de la tasa promedio de reducción de Cr(VI) en 72% al ser comparada con lo observado en el medio LB; La cinética de crecimiento en el ARI fue muy diferente a la observada en el medio LB, mostrando una disminución de la densidad óptica con referente al inoculo inicial, la cual disminuyo hasta estabilizarse a partir de la cuarta hora hasta el final del ensayo; mostrando una densidad óptica promedio de 0.21.

Acción conjunta de microorganismos sobre la reducción de Cr(VI)

Se evaluó la acción conjunta de los microorganismos aislados, en bioensayos de reducción de Cr(VI) a 10 mg/L tanto en medio LB como en ARI (Figura 2). La Figura 2A muestra la reducción de cromo del aislado bacteriano G3 y el efecto sobre la reducción al ensayar los microorganismo G1 con G3 y G1, G2 y G3. El ensayo realizado solo con el asilado G3 en LB mostró una reducción del

Bacillus sp. G3 un microorganismo promisorio en la biorremediación de aguas industriales contaminadas con cromo hexavalente

100% del contaminante al cabo de 10 horas; en contraste, a las 10 horas los ensayos realizados con los aislados G1 y G3; G1, G2 y G3 mostraron una eficiencia del 91.3% y 86% respectivamente, con respecto a los resultados obtenidos solo con la cepa G3. Las mediciones de densidad óptica en los ensayos combinados mostraron valores de 0.975 y 1.001 a las 10 horas; valores semejantes a los observados al ensayar solo la cepa G3.

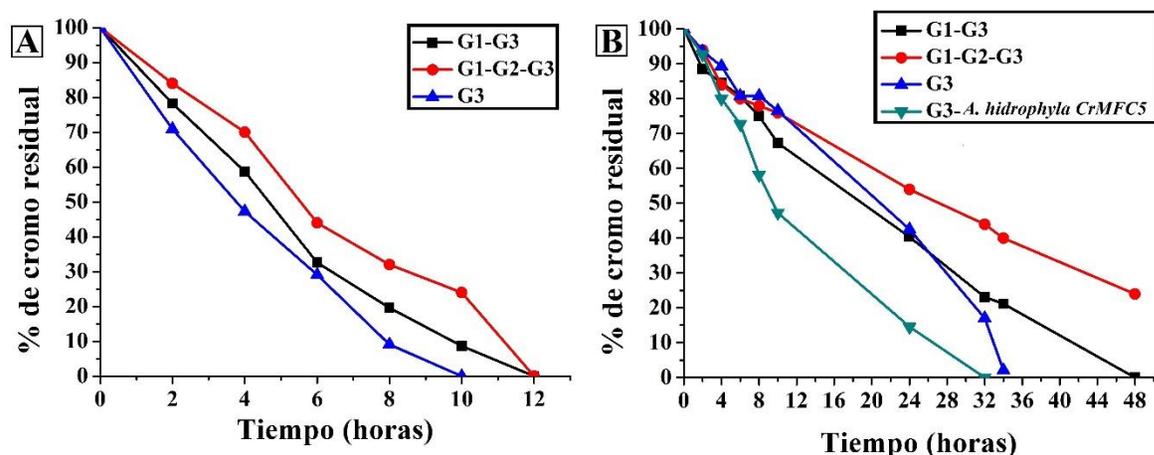


Figura 2. Evaluación de la acción conjunta de los microorganismos y su efecto en la reducción de Cr(VI). A) en medio Luria Bertani. B) en agua residual industrial.

Ensayos realizados en el agua residual industrial mostraron similar comportamiento a lo observado en el medio LB; el aislado bacteriano G3 mostró la mejor velocidad de reducción al ser ensayado de forma individual al reducir el 100% del contaminante a las 34 horas, que al ser combinado con los aislados G1 y G2 los cuales a las 48 horas mostraron una reducción del 100% en el caso de la mezcla G1 y G3 y de 85% en el ensayo donde operaron los tres microorganismos. Los resultados de este trabajo muestran que a medida que se agregaron microorganismos al bioensayo, el proceso de reducción de Cr(VI) se vuelve menos eficiente.

De forma adicional se realizó un ensayo combinado el aislado bacteriano G3 con la cepa de *A. hydrophila* CrMFC5 (Figura. 2B). La cepa *A. hydrophila* CrMFC5 fue aislada en anteriores trabajos de investigación; esta cepa al igual que el aislado G3 mostró una reducción del 100% de Cr(VI) al cabo de 10 horas en medio LB (datos no reportados). El ensayo combinado de las dos cepas representó una mejora en la eficiencia de reducción de Cr(VI).

Caracterización molecular y asignación de taxa jerárquica del aislado G3

La herramienta *naïve Bayesian classifier* fue utilizada para comparar la secuencia obtenida a partir del aislado bacteriana G3, con las depositadas en la bases de datos del *Ribosomal Database Project*, indicando que la secuencia pertenece al género *Bacillus*; utilizando esto como base, se realizó la inferencia de la historia filogenética de la secuencia obtenida, con secuencias de las diferentes especies del género *Bacillus* en base al mejor árbol generado por el método de máxima verosimilitud (Figura. 3.); el modelo de sustitución nucleotídica utilizado fue GTR+I+G con 0.4840 como parámetro alfa de la distribución gamma, 0.4750 como la proporción de sitios invariantes, las frecuencias nucleotídica fueron T= 0.2026, C= 0.2292, A= 0.2458 y G= 0.3225. La reconstrucción filogenética ubicó la secuencia en el clado conformado por las especies de *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis* y *B. mycoides*.

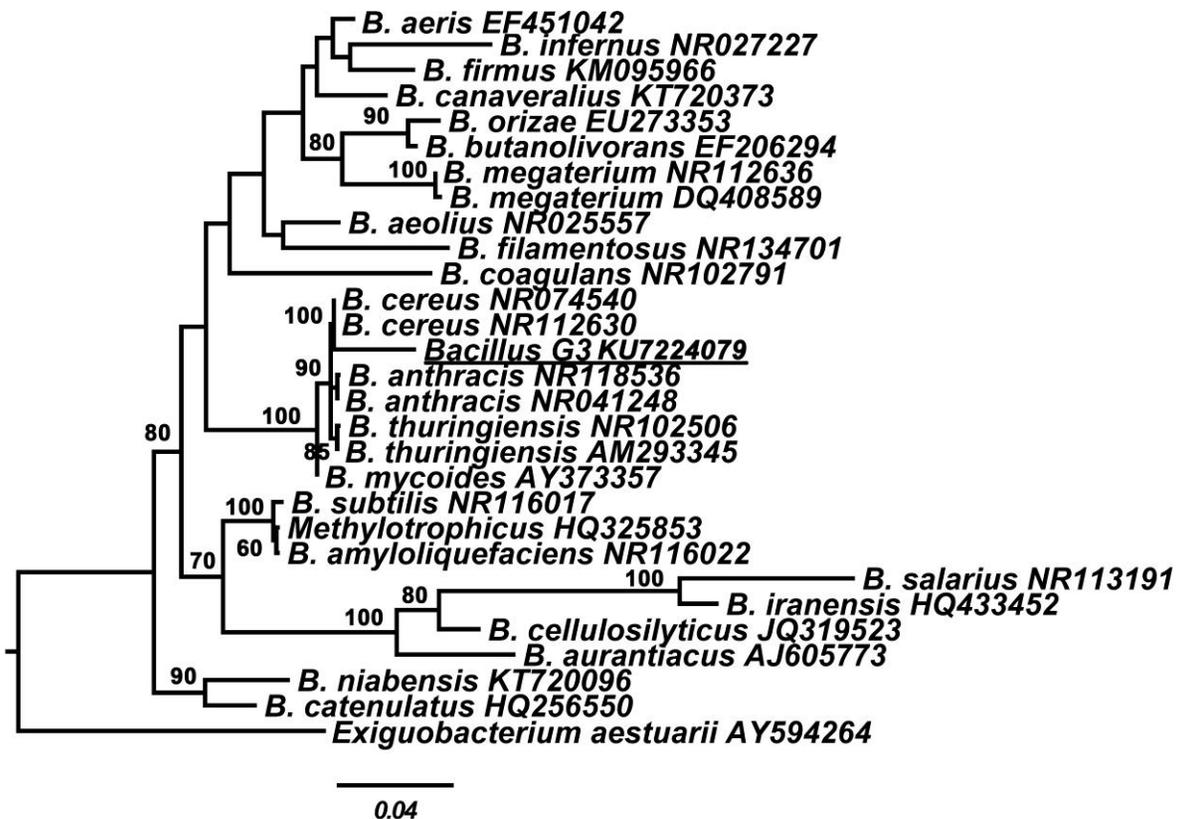


Figura 3. Inferencia filogenética por el método de máxima verosimilitud de la secuencia de *Bacillus* sp. G3 con secuencias de las diferentes especies del género *Bacillus*. Números en los nodos representan el valor de bootstrap de máxima verosimilitud.

Caracterización bioquímica del aislado *Bacillus sp.* G3

El resultado de la prueba bioquímica de *Bacillus sp.* G3 al utilizar el *BBL™ Crystal™ Gram positive ID Kit* se muestra en la Tabla 1. Basándose en los resultados obtenidos por El-Banna y Qaddoumi (2016), los resultados muestran una coincidencia del 90% para la especie de *Bacillus cereus*.

Tabla 1. Resultado de la prueba bioquímica de *Bacillus sp.* G3 al utilizar el *BBL™ Crystal™ Gram positive ID Kit*.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
4	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	FCT*	FPH	FTR	FHO	TRE	SUC	ARA	BGL	PHO	URE
2	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+
	FGC	FGS**	FAR	FGN	LAC	MNT	GLR	PCE	PAM**	ESC
1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	FVA	FPY	FGA	FIS	MAB	MTT**	FRU	PLN	PGO	ARG

*(4A) control negativo fluorescencia; ** resultados no coincidentes con El-Banna y Qaddoumi (2016)

Actividad de la cromato reductasa presente en el extracto libre de células

El ELC de *Bacillus sp.* G3 mostró actividad de reducción de cromo. La actividad máxima se observó a los 28°C (Figura 4A); a medida que se aumentó la temperatura se observó disminución de la actividad relativa del ELC alcanzando un valor mínimo de actividad (13.3%) a una temperatura de 40°C.

Se registró la actividad máxima del ELC en el pH 6.5; en contraste, los ensayos realizados en los pH 6.0 y 7.0 mostraron actividades de 86% y 71% respectivamente, con respecto a la actividad óptima (Figura 4B).

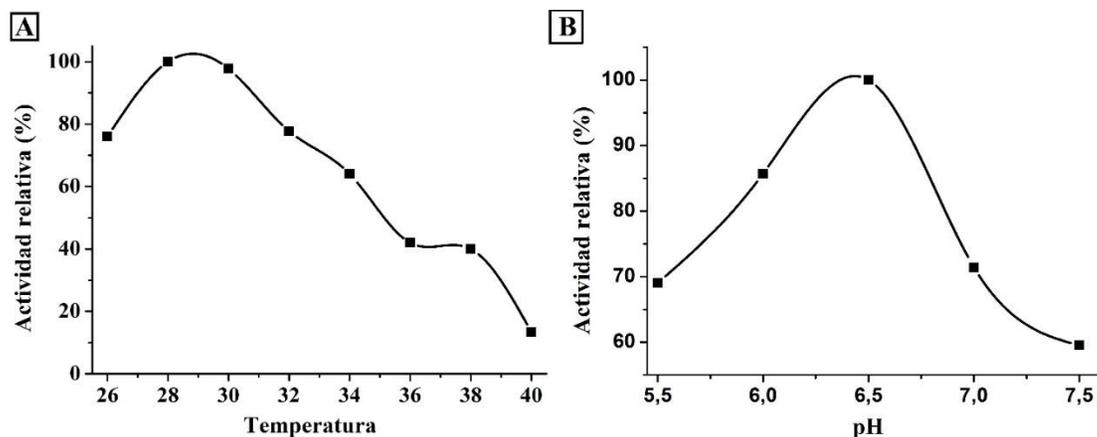


Figura 4. Efecto de la temperatura (A) y el pH (B) sobre la reducción de Cr(VI) por el ELC de la cepa bacteriana *Bacillus* sp. G3.

Discusión

Se logró el aislamiento de tres microorganismos provenientes del ARI de una galvanoplastia. Los ensayos exploratorios de reducción de Cr(VI) indicaron que aunque las cepas G1 y G2 tienen la capacidad de tolerar cromo y crecer en ARI; éstas mostraron una velocidad de reducción de Cr(VI) cinco veces inferior a la observada en el aislado G3. Microorganismos promisorios para usos en biorremediación de Cr(VI), además de poseer mecanismos de tolerancia deben ser eficientes en la reducción de los contaminantes (Thatoi et al., 2014).

El resultado de las pruebas bioquímicas sugiere que el aislado G3 está relacionado con el género *Bacillus*; afirmación que fue soportada por la inferencia filogenética la cual ubicó al aislado G3 en un clado conformado por las especies de *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis* y *B. mycoides* indicando que el aislado G3 pertenece al grupo denominado *Bacillus cereus sensu lato* (Zwick et al., 2012; Okinaka y Keim, 2016).

Representantes del género *Bacillus* han sido aislados tanto en ambientes naturales contaminados con Cr(VI) (Kafilzadeh y Saberifard, 2016), tanques de curtiembres (Sandana Mala et al., 2015) y en el caso del presente documento en aguas residuales industriales provenientes de una galvanoplastia.

Bacillus sp. G3 un microorganismo promisorio en la biorremediación de aguas industriales contaminadas con cromo hexavalente

Los bioensayos de reducción de cromo realizados con la cepa *Bacillus sp. G3*, indican que este microorganismo tiene la capacidad de reducir una concentración de 10 mg/L de Cr(VI) en diez horas en medio LB y de 34 horas en el agua residual industrial. La cinética de crecimiento de *Bacillus sp. G3* en los bioensayos de reducción de Cr(VI), presentó diferencias entre los medios; en medio LB, mostró un incremento constante de la densidad óptica hasta llegar a un máximo de 0.998; en contraste, en los ensayos realizados en el ARI se observó una fase de crecimiento estacionaria a partir de las diez horas hasta el final del ensayo, con una D.O promedio de 0.21. La notable disminución de crecimiento *Bacillus sp. G3* en el agua industrial puede verse relacionada con los valores de pH y la baja disponibilidad de fuentes de carbono (Kafilzadeh y Saberifard, 2016). La capacidad de *Bacillus sp. G3* para reducir Cr(VI) en aguas industriales, lo muestra como un microorganismo potencialmente útil en la biorremediación de aguas contaminadas con este metal.

La reducción conjunta de Cr(VI) de los microorganismos aislados del agua ARI se muestra en la Figura 2. El aislado bacteriano G3 redujo el 100% del Cr(VI) en 34 horas en ARI; no obstante, los ensayos conjuntos de los tres microorganismos mostraron 85% de reducción Cr(VI) a las 48 horas. Pinon-Castillo *et al.*, (2010) llegaron a la conclusión, que la conformación de consorcios bacterianos obtenidos a partir de aguas residuales se muestran como una alternativa de biorremediación eficiente que permitiría la rápida reducción de contaminantes como el Cr(VI) en aguas de origen industrial. No obstante, los datos obtenidos sugieren que la conformación de un consorcio bacteriano con las tres cepas aisladas resultaría menos eficiente en términos de eficiencia de remoción de Cr(VI). La D.O del ensayo conjunto de los tres microorganismos fue de 0.214, valor similar a lo observado en el ensayo realizado solo con el aislado de *Bacillus sp. G3*; la disminución en la velocidad de remoción puede verse afectada en el ensayo debido a la competencia de recursos entre los microorganismos y diferentes distribuciones de crecimiento entre la cepa eficiente *Bacillus sp. G3* y las no tan eficientes G1 y G2.

Adicionalmente se realizó un ensayo en ARI que involucraba la acción conjunta del aislado bacteriano *Bacillus sp. G3* con la cepa de *Aeromonas hydrophila* CrMFC5 (aislada previamente de la biopelícula anódica de celdas de combustible microbianas sedimentarias), la cual registró una tasa de reducción de Cr(VI) similar a la del aislado G3; la acción conjunta de los dos

microorganismos mostró una mejora en la eficiencia de reducción al reducir el 100% del contaminante antes de las 32 horas. Brune y Bayer, (2012) argumentaron que la capacidad de diseñar y manipular consorcios microbianos permite mejoras en los procesos de biorremediación, además de brindar la posibilidad de construir agrupaciones de microorganismos los cuales sean más resistentes y eficientes al trabajar en ambientes contaminados.

Los datos obtenidos al realizar los bioensayos de reducción de cromo en medio LB (Figura 1 y Figura 2); permiten la rápida determinación de la posible presencia de mecanismos de reducción de Cr(VI); no obstante, las diferencias observadas en cuanto a la cinética de crecimiento y de reducción de cromo entre los diferentes bioensayos (Figura 2) sugiere que en medios enriquecidos no es posible realizar inferencias reales sobre el potencial de biorremediación que podría tener un microorganismo.

Este trabajo confirma la presencia de enzimas con actividad de cromo reductasa en el aislado bacteriano *Bacillus* sp. G3. En los ensayos realizados con el ELC fue utilizado NADH como donador de electrones, ya que en reportes anteriores se indica aumento significativo de la actividad enzimática y gran especificidad en presencia del NADH (Shen y Wang, 1993; Sau *et al.*, 2010; Focardi *et al.*, 2012). La reducción de cromo por el ELC presentó valores máximos de eficiencia a pH 6.5 a 28°C (Figura 4). Los resultados observados en el presente documento presentaron los mismos puntos de eficiencia registrado para la cepa de *Halomonas* sp. TA-04 (Focardi *et al.*, 2012). No obstante, los resultados observados por el aislado G3 varían según los observados en otros reportes como es el caso de *Arthrobacter rhombi* el cual mostró actividad máxima a 30°C y pH de 5.5 (Elangovan *et al.*, 2009); al igual que la cepa de *Bacillus firmus* KUCr1 con 5.5 de pH y temperatura de 70°C (Sau *et al.*, 2010). El estudio realizado por Sau *et al.*, (2010) en otra especie del género *Bacillus* muestra incremento progresivo en la eficiencia de las enzimas cromato reductasa presentes en el ELC desde 20°C hasta llegar a un máximo valor 70°C; resultados que difieren de lo observado en el presente trabajo, donde al aumentar la temperatura la eficiencia de la reacción enzimática disminuyó.

La biotransformación del cromo hexavalente a cromo trivalente mediante la actividad bacteriana ofrece una forma de biorremediación económica y amigable con el medio ambiente (Ruggaber y

Bacillus sp. G3 un microorganismo promisorio en la biorremediación de aguas industriales contaminadas con cromo hexavalente

Talley, 2006; Dey *et al.*, 2014; Thatoi *et al.*, 2014). No obstante, los microorganismos pueden verse afectados por múltiples factores ambientales (Kafilzadeh y Saberifard, 2016) incluidos otros contaminantes (Thatoi *et al.*, 2014) los cuales pueden disminuir las tasas de reducción haciendo que el proceso de biorremediación se vean limitados (Whiteley y Lee, 2006); teniendo en cuentas estos parámetros, el uso de enzimas aisladas podría representar ventajas operacionales (Sutherland *et al.*, 2004). En el caso particular de la actividad de la cromato reductasa presente en el extracto libre de células a pH 5.5 (pH del ARI) se evidencia una actividad relativa del 70% indicando que el uso de enzima sobre estos sustratos podría llegar a ser una alternativa viable. Los resultados de Sandana Mala *et al.*, (2015) refuerzan la anterior afirmación al demostrar que la aplicación de un extracto enzimático en efluentes industriales de una curtiembre permitió la reducción 91% de Cr(VI) en 48 horas.

Conclusiones

El aislado G3 perteneciente al grupo *Bacillus cereus sensu lato* tiene la capacidad de reducir Cr(VI) en ARI; el ELC obtenido a partir del microorganismo mostro actividad de cromato reductasa . El estudio de ELC podría representar a futuro una estrategia de reducción alternativa cuando las condiciones de operación sean desfavorables para los microorganismos. Se sugiere la exploración del potencial de organismos pertenecientes al género *Bacillus* y el uso del aislado bacteriano *Bacillus sp.* G3 en procesos de biorremediación de Cr(VI). Actualmente se sabe que los consorcios microbianos ofrecen múltiples ventajas al ser comparados con cultivos puros; se propone la búsqueda y caracterización de cepas microbianas provenientes de diferentes ambientes y la subsecuente consolidación en consorcios microbianos artificiales; los cuales podrían representar una alternativa de biorremediación eficiente.

Agradecimientos

Al grupo de Investigación de Biología de Plantas y Microorganismos y al Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas del Departamento de Biología de la Universidad del Valle; al laboratorio de Biocombustibles de la Escuela de Ingeniería Química de la Universidad del Valle y a la empresa BYCSA S.A.

Referencias

- Asmatullah, Qureshi, S. N., Shakoori, A. R. (1998). Hexavalent chromium-induced congenital abnormalities in chick embryos. *J Appl Toxicol*, 18(3), 167-171.
- Brune, K. D., Bayer, T. S. (2012). Engineering microbial consortia to enhance biomining and bioremediation. *Frontiers in Microbiology*, 3, 203. doi:10.3389/fmicb.2012.00203
- Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzmán, J. C., Moreno-Sánchez, R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(3), 335-347. doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0168-6445(01)00057-2
- Cheung, K. H., Gu, J.-D. (2007). Mechanism of hexavalent chromium detoxification by microorganisms and bioremediation application potential: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59(1), 8-15. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2006.05.002
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing *Nat Methods* (Vol. 9, pp. 772). United States.
- Dey, S., Pandit, B., Paul, A. K. (2014). Reduction of Hexavalent Chromium by Viable Cells of Chromium Resistant Bacteria Isolated from Chromite Mining Environment. *Journal of Mining*, 2014, 8. doi:10.1155/2014/941341
- Dhal, B., Thatoi, H. N., Das, N. N., Pandey, B. D. (2013). Chemical and microbial remediation of hexavalent chromium from contaminated soil and mining/metallurgical solid waste: A review. *Journal of Hazardous Materials*, 250–251(0), 272-291. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.01.048
- Elangovan, R., Philip, L., Chandraraj, K. (2009). Hexavalent Chromium Reduction by Free and Immobilized Cell-free Extract of *Arthrobacter rhombi*-RE. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(1), 81-97. doi:10.1007/s12010-008-8515-6
- El-Banna, N., Qaddoumi, SS. (2016) Antimicrobial activity of *Bacillus cereus*: Isolation, identification and the effect of carbon and nitrogen source on its antagonistic activity. *J Microbiol Antimicrob*, 8(2):7-13. DOI: 10.5897/JMA2015.0340
- Ezaka, E., Anyanwu, CU. (2011) Chromium (VI) tolerance of bacterial strains isolated from sewage oxidation ditch. *Int J Environ Sci*, 1(7):1725–34.
- Fendorf, S. E. (1995). Surface reactions of chromium in soils and waters. *Geoderma*, 67(1–2), 55-71. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0016-7061(94)00062-F
- Focardi, S., Pepi, M., Landi, G., Gasperini, S., Ruta, M., Di Biasio, P., Focardi, S. E. (2012). Hexavalent chromium reduction by whole cells and cell free extract of the moderate halophilic bacterial strain *Halomonas* sp. TA-04. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 66(1), 63-70. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2011.11.003

Ge, S., Dong, X., Zhou, J., Ge, S. (2013). Comparative evaluations on bio-treatment of hexavalent chromate by resting cells of *Pseudochrobactrum* sp. and *Proteus* sp. in wastewater. *Journal of Environmental Management*, 126, 7-12. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.04.011>

Greenberg AE, Clesceri LS, Eaton AD. Standard methods for the examination of water and wastewater, 18a ed. Washington, D.C : American Public Health Association; 1992.

Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95-98.

Kadiiska, M. B., Xiang, Q. H., Mason, R. P. (1994). In vivo free radical generation by chromium(VI): an electron spin resonance spin-trapping investigation. *Chem Res Toxicol*, 7(6), 800-805.

Kafilzadeh, F., Saberifard, S. (2016). Isolation and Identification of Chromium (VI)-Resistant Bacteria From Soltan Abad River Sediments (Shiraz-Iran). *Jundishapur J Health Sci*, 8(1).

Kamaludeen, S. P. B., Megharaj, M., Juhasz, A. L., Sethunathan, N., Naidu, R. (2003). Chromium-Microorganism Interactions in Soils: Remediation Implications. In G. W. Ware (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (pp. 93-164). New York, NY: Springer New York.

Lee, J., Phung, N. T., Chang, I. S., Kim, B. H., & Sung, H. C. (2003). Use of acetate for enrichment of electrochemically active microorganisms and their 16S rDNA analyses. *FEMS Microbiology Letters*, 223(2), 185-191. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00356-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00356-2)

Park, C. H., Keyhan, M., Wielinga, B., Fendorf, S., Matin, A. (2000). Purification to homogeneity and characterization of a novel *Pseudomonas putida* chromate reductase. *Appl Environ Microbiol*, 66(5), 1788-1795.

Pinon-Castillo, H. A., Brito, E. M., Goni-Urriza, M., Guyoneaud, R., Duran, R., Nevarez-Moorillon, G. V., . . . Reyna-Lopez, G. E. (2010). Hexavalent chromium reduction by bacterial consortia and pure strains from an alkaline industrial effluent. *J Appl Microbiol*, 109(6), 2173-2182. doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04849.x

Rai, D., Eary, L. E., Zachara, J. M. (1989). The Chromium Paradox in Modern Life Environmental chemistry of chromium. *Science of The Total Environment*, 86(1), 15-23. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0048-9697\(89\)90189-7](http://dx.doi.org/10.1016/0048-9697(89)90189-7)

Ruggaber, T., Talley, J. (2006). Enhancing Bioremediation with Enzymatic Processes: A Review. *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management*, 10(2), 73-85. doi:10.1061/(ASCE)1090-025X(2006)10:2(73)

Sandana Mala, J. G., Sujatha, D., Rose, C. (2015). Inducible chromate reductase exhibiting extracellular activity in *Bacillus methylotrophicus* for chromium bioremediation. *Microbiological Research*, 170, 235-241. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2014.06.001>

Sau, G. B., Chatterjee, S., Mukherjee, S. K. (2010). Chromate reduction by cell-free extract of *Bacillus firmus* KUCr1. *Pol J Microbiol*, 59(3), 185-190.

Shen, H., Wang, Y. T. (1993). Characterization of enzymatic reduction of hexavalent chromium by *Escherichia coli* ATCC 33456. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(11), 3771-3777.

Sutherland, T. D., Horne, I., Weir, K. M., Coppin, C. W., Williams, M. R., Selleck, M., . . . Oakeshott, J. G. (2004). Enzymatic bioremediation: from enzyme discovery to applications *Clin Exp Pharmacol Physiol* (Vol. 31, pp. 817-821). Australia.

Thatoi, H., Das, S., Mishra, J., Rath, B. P., Das, N. (2014). Bacterial chromate reductase, a potential enzyme for bioremediation of hexavalent chromium: A review. *Journal of Environmental Management*, 146, 383-399. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2014.07.014>

Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., Cole, J. R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and environmental microbiology*, 73(16), 5261-5267.

Whiteley, C. G., Lee, D. J. (2006). Enzyme technology and biological remediation. *Enzyme and Microbial Technology*, 38(3-4), 291-316. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.10.010>.

