



TOLERANCIA Y REDUCCIÓN DE CROMO (VI) POR *Bacillus cereus* B₁, AISLADO DE AGUAS RESIDUALES DE UNA CURTIEMBRE

Alexander Ramírez Ramírez

Neyla Benítez-Campo

Universidad del Valle

Recibido: agosto 30, 2013

Aceptado: diciembre 20, 2013

Págs. 51-63

Resumen

El cromo es un metal pesado ampliamente empleado en la industria, que suele ser vertido al ambiente produciendo efectos tóxicos en la biota y en los humanos. En este trabajo se evaluó el potencial de microorganismos nativos para transformar el Cr⁺⁶ a formas menos tóxicas, verificando su eficiencia biorreductora. Para este propósito, se aislaron microorganismos a partir de aguas residuales de una curtiembre y se seleccionaron utilizando el método de concentración mínima inhibitoria (CMI), entre 5-8000 ppm de Cr⁺⁶. Se realizaron ensayos de biorreducción con la cepa más tolerante, en medio LB a 10, 30, 50 y 100 ppm de Cr⁺⁶; dicha cepa fue identificada como *Bacillus cereus* B₁, con capacidad de tolerar hasta 8000 ppm y remover el 100% del contaminante al cabo de 9, 34, 50 y 96 horas, cuando la concentración inicial de cromo fue de 10, 30, 50 y 100 ppm respectivamente. Estos resultados indican que *Bacillus cereus* B₁ tiene la capacidad de reducir eficientemente el cromo hexavalente en solución y resistir altas concentraciones del metal.

Palabras clave: *Bacillus cereus*, biorreducción, metales pesados, cromo (VI), curtiembres

Abstract

Chromium is a heavy metal widely used at the industrial level, which is usually discharged into the environment by producing toxic effects on biota and human health. In this work we evaluated the potential of indigenous microorganisms to transform the Cr⁺⁶ to less toxic forms, verifying its bioreductive efficiency. For this purpose, microorganisms were isolated from tannery wastewater and selected using the method of minimum inhibitory concentration (MIC), between 5-8000 ppm of Cr⁺⁶. Bioreduction assays with a more tolerant strain were performed in LB medium at 10, 30, 50 and 100 ppm of Cr⁺⁶; this strain was identified as *Bacillus cereus* B₁, able to tolerate up to 8000 ppm and remove 100% of the contaminant after 9, 34, 50 and 96 hours when the initial concentration of chromium was 10, 30, 50 and 100 ppm respectively. These results show that *Bacillus cereus* B₁ is able to efficiently remove hexavalent chromium in solution and resist high concentrations of the metal.

Keywords: *Bacillus cereus*, bioreduction, heavy metals, chromium (VI), tanneries.

1 Introducción

Las actividades industriales han venido generando contaminación ambiental a gran escala con metales pesados, afectando una amplia gama de ecosistemas tanto por la toxicidad en la biota como por su acumulación [28]. Los metales pesados llegan al

medio ambiente al ser vertidos en los efluentes de diversas actividades industriales. Una vez vertidos en los efluentes, estos metales, cuya naturaleza atómica los hace no biodegradables, solo pueden distribuirse entre los sustratos acuíferos, edáficos y aéreos, ya sea cambiando su estado de oxidación o incorporándose en el componente biótico y distribuyéndose en muchos casos a través de las diferentes cadenas tróficas.

Sus propiedades de adsorción y su capacidad de formar complejos organometálicos poco solubles son responsables de que la mayor parte de las trazas de metales pesados acumulen en los sólidos en suspensión, concentrándose rápidamente en los sedimentos, los cuales se presentan la mayor proporción de estos contaminantes [16].

Uno de los metales pesados que ha sido objeto de estudio en los últimos años es el cromo, elemento que puede estar presente en los cuerpos de agua como Cr (III) (poco soluble y muy estable) y como Cr (VI) (menos estable, pero más soluble, con una alta movilidad entre sustratos). En este estado, es un contaminante tóxico y cancerígeno a muy bajas concentraciones sobre un amplio espectro de la biota y en los seres humanos, en quienes ocasiona enfermedades respiratorias y cutáneas, siendo considerado mutagénico y cancerígeno [10, 26].

Las principales fuentes de contaminación por cromo provienen de su uso industrial en curtiembres, pigmentos y conservantes textiles, aleaciones, pinturas, catalizadores, agentes anticorrosivos, lodos de perforación, baterías de alta temperatura, fungicidas, conservantes de madera y electrogalvanizados, entre otros [15, 25, 26].

Particularmente en la industria del cuero, el cromo es utilizado en la etapa de curtido de la piel y generalmente es vertido al alcantarillado o a los cuerpos de agua en conjunto con la alta carga de materia orgánica y demás desechos que producen las curtiembres. Para resolver esta forma de contaminación, se han hecho muchos esfuerzos para tratar el cromo por medio de métodos fisicoquímicos, entre los que se incluyen los tratamientos químicos tradicionales con agentes reductores [14], la electrocinética [22], la síntesis de arcillas aniónicas [11] y la fotocatalisis [25], cuyos resultados se ven limitados por las inversiones económicas, el consumo de energía o la producción de otros contaminantes, haciendo improcedentes y poco aplicables los procesos de descontaminación a gran escala.

Por eso, en las últimas décadas, se han desarrollado métodos alternativos fundamentados en procesos biológicos para el tratamiento de contaminantes como el cromo en los que se utilizan plantas o microorganismos que han desarrollado estrategias para tolerar o detoxificar dichas sustancias, convirtiéndolas en especies menos peligrosas para el medio ambiente y los seres vivos [17].

Si bien es cierto que se han efectuado estudios que involucran procesos de biorreducción o biorrecuperación de Cr (VI) con múltiples organismos, entre los que se encuentran plantas terrestres [21], algas [8, 15, 20], hongos [2, 13] y bacterias [6, 9, 19, 23, 29, 30], es importante enfatizar en los estudios que involucran bacterias nativas de sitios contaminados con este metal, dada la mayor probabilidad de encontrar cepas que desarrollan diversas estrategias de supervivencia, que además de permitirles resistir a la

contaminación con cromo, contribuyen a la detoxificación del sustrato o entorno con el cual coexisten.

El objetivo de este trabajo fue seleccionar bacterias tolerantes al cromo provenientes de aguas de una curtiembre con capacidad de reducir el Cr (VI), a varias concentraciones, en condiciones controladas de laboratorio.

2 Materiales y métodos

2.1 Muestreo

Se tomaron muestras de agua residual del proceso de curtido de una curtiembre situada en el municipio de El Cerrito, Valle del Cauca, Colombia, ubicado a 3°40'56.89" longitud N y 76°18'39.40" latitud W. Las muestras para el aislamiento de los microorganismos se recogieron en frascos de vidrio previamente esterilizados en autoclave y se mantuvieron refrigeradas a 4°C hasta el procesamiento y siembra en el laboratorio de Microbiología Industrial y Ambiental (MIA) del Departamento de Biología de la Universidad del Valle. El pH y la temperatura se midieron en el sitio de muestreo al momento de tomar las muestras. Simultáneamente, se tomaron muestras para el análisis de la demanda biológica de oxígeno (DBO₅), demanda química de oxígeno (DQO), cromo total y cromo hexavalente, cuyo recipiente fue previamente acidificado con HNO₃ concentrado hasta su posterior análisis.

2.2 Siembra y aislamiento de microorganismos

Las muestras para la siembra de los microorganismos fueron concentradas a través de un filtro Sartorius Stedium Biotech de nitrocelulosa con poro de 0.45µm. Dicho filtro fue colocado dentro de un erlenmeyer de 500 ml que contenía 100 ml de medio LB [3] (10g triptona (Oxoid), 10g de NaCl (Carlo Erba) y 5g de extracto de levadura (Scharlau) por litro). Posteriormente se incubaron a 30°C (incubadora Binder) por 24-48 horas, bajo agitación constante a 130 rpm (Shaker Heidol phunimax 1010 DT).

El aislamiento de los microorganismos se realizó a partir de los cultivos anteriores sembrando por estrías en medio LB solidificado al 1.5% con agar bacteriológico (Scharlau). Posteriormente, los microorganismos aislados fueron cultivados en medio LB con Cr⁺⁶, a concentraciones que oscilaron entre 5 y 100 ppm, con el propósito de realizar una selección progresiva y a la vez adaptativa de las cepas más resistentes. Las soluciones stock de Cr⁺⁶, preparadas a partir de K₂Cr₂O₇ (Merck), fueron esterilizadas a través de un filtro de membrana de 0.22µm y guardadas en frascos ámbar previamente esterilizados en autoclave. Aquellas cepas aisladas en cultivos puros fueron conservadas a 20°C en glicerol al 20% para posteriores ensayos.

2.3 Selección del microorganismo más tolerante al Cr (VI)

Se emplearon tres cepas bacterianas y una levadura, aisladas del agua residual de la curtiembre. La selección se hizo por determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), por el método de dilución en caldo, con un volumen total de 5 ml

por tubo de ensayo, cuyas concentraciones de Cr^{+6} fueron de 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1280, 2000, 4000, 6000 y 8000 ppm. Las concentraciones entre 5 y 1280 ppm se prepararon a partir de una solución madre de Cr^{+6} de 5000 ppm, mientras que para las concentraciones entre 2000 y 8000 ppm se pesó la cantidad requerida de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ para obtener la concentración deseada.

Los resultados de la CMI se interpretaron preliminarmente por verificación de turbidez a las 24 horas de incubación a 30°C , siendo confirmados aquellos tubos que no mostraron una turbidez notoria mediante siembra en superficie de 0.1 ml en agar LB. Estos ensayos permitieron seleccionar una sola cepa bacteriana caracterizada por su gran capacidad de resistir al contaminante. A esta cepa se le realizó una curva de crecimiento por recuento en cámara de Neubauer (Boeco) con el propósito de establecer el tiempo de incubación necesario para alcanzar la fase exponencial tardía, garantizando así que el inóculo para los ensayos de biorreducción estuviera en su mayor capacidad de crecimiento.

2.4 Identificación del microorganismo seleccionado

La bacteria seleccionada fue sometida a pruebas morfológicas e identificada con el kit BD BBL CRYSTAL GP y complementada por amplificación (PCR) de la región del gen del ARNr 16S, a partir de colonia bacteriana en medio sólido LB. Cebadores utilizados: 16S-F (5'-AGAGTTTGATCTGGCTCAG-3') y 16S-R (5'GGCTACCTTGTTACGACTT-3') [28]. Los cocteles de PCR se sometieron a un perfil térmico tipo "touch-down" [7]. Los productos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5% con buffer TBE y teñido con SYBR®Safe (Invitrogen). El proceso de secuenciación se realizó en MACROGEN, <http://www.macrogen.com>, (Korea). La secuencia de genes de rRNA 16S fue comparada con secuencias conocidas en la base de datos del GenBank para identificar la secuencia de mayor similitud.

2.5 Ensayos de biorreducción

Se utilizaron como biorreactores erlenmeyers de 500 ml, con 80 ml de medio LB, 10 ml de inóculo bacteriano (tomado a partir de un cultivo de 8 horas, tiempo requerido para alcanzar la fase exponencial tardía, con una concentración de 7.5×10^8 células/ml) y 10 ml de solución stock de Cr^{+6} esterilizado por filtración por membrana, cuya concentración era 10 veces mayor a la concentración final necesaria para cada tratamiento (10, 30, 50 y 100 ppm).

Los controles se prepararon con 90 ml de medio LB; para el control positivo se adicionaron 10 ml de inóculo bacteriano y, para el control negativo, se agregaron 10 ml de stock de Cr^{+6} en ausencia de bacterias. Con el propósito de determinar si había efecto del medio LB en el comportamiento del cromo, se preparó un reactor con agua destilada y cromo. Cada ensayo se realizó por triplicado, con incubación a 30°C bajo agitación constante a 130 rpm.

Los datos obtenidos fueron analizados con el programa Statistica, mediante el cual se realizó una Anova de medidas repetidas y una prueba de Tukey para comprobar las diferencias entre los tratamientos aplicados.

2.6 Determinación de cromo

El Cr⁺⁶ se determinó por el método de la 1,5 difenilcarbazida [1] y se midió su absorbancia a 540 nm en un equipo HACH DR890. Previamente se tomaron muestras de 0.5 ml de cada biorreactor y se centrifugaron (centrífuga Hettich Universal 32R) a 8000 rpm y 22°C durante 5 min. Las mediciones se hicieron con un intervalo de 2 horas para 10 ppm, 4 horas para 30 ppm, 6 horas para 50 ppm y 12 horas para 100 ppm.

El cromo total en solución se determinó al final de cada experimento (5 días). Para este propósito, se centrifugaron 50 ml de muestra por 5 minutos a 5000 rpm y 22°C en tubos de polipropileno (Brand) de fondo cónico. A partir de esta muestra, se tomaron 5 ml del sobrenadante y se sometieron a un proceso de oxidación, siguiendo el protocolo estandarizado para el análisis de cromo total en aguas residuales. Finalmente, el cromo total se midió en forma de Cr⁺⁶ por la técnica colorimétrica anteriormente descrita [1].

2.7 Estimación del crecimiento bacteriano y medición del pH

El crecimiento bacteriano fue monitoreado cada seis horas mediante el método de recuento estándar en placa por siembra en superficie en agar LB [1]. Las cajas se incubaron por 24 horas a 30°C. Con el propósito de verificar el cambio de pH durante todo el periodo de incubación, este parámetro se midió al principio y final de cada experimento con un pH-metro digital (Termo Scientific Orion 3 star).

3 Resultados y discusión

3.1 Caracterización fisicoquímica del agua residual de la curtiembre

Los resultados de los parámetros fisicoquímicos del agua residual del proceso de curtido en la curtiembre se resumen en la tabla 1. Estos parámetros indican una alta contaminación según los valores de DBO₅, DQO y altos niveles de cromo encontrados, características propias de efluentes de curtiembres por la carga orgánica y proceso de curtido con cromo.

Tabla 1. *Parámetros fisicoquímicos del agua residual de la curtiembre*

Parámetro	Resultado	VLMP*
Temperatura (°C)	24.7	<30
pH (Unidades)	5.5	5-9
DBO ₅ (mg/l)	478.0	200
DQO (mg/l)	4443.0	400
SST (mg/l)	104.0	200
Cr total (mg/l)	3084.0	0.5
Cr ⁺⁶ (mg/l)	1.0	0.2

*Valor Límite Máximo Permisible para vertimientos de aguas residuales no domésticas a aguas continentales superficiales, Según norma colombiana.

3.2 Microorganismos aislados

A pesar de los altos niveles de contaminación del agua donde se colectaron las muestras, se aislaron tres bacterias Gram positivas denominadas B₁, B₂ y B₃ y una levadura denominada L1. El microorganismo de mayor resistencia al Cr (VI) fue la bacteria B₁, que soportó una concentración hasta de 8000 ppm del contaminante, por lo cual fue identificada y seleccionada para realizar los ensayos de biorreducción.

Según los resultados obtenidos con el kit BBL Crystal™ para bacterias Gram positivas, la caracterización morfológica y los resultados del análisis molecular, la cepa nativa B₁ fue identificada como *Bacillus cereus*.

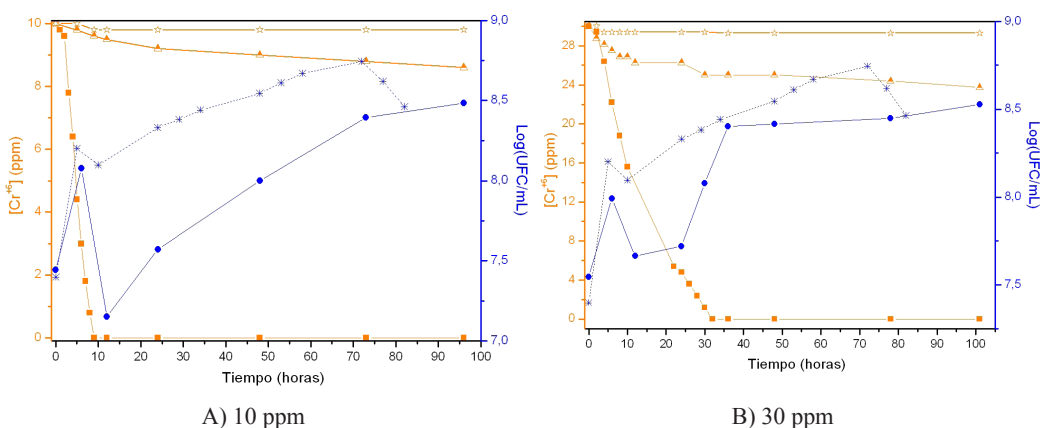
En otras investigaciones se ha reportado la capacidad de *B. cereus* para reducir el cromo hexavalente [3, 9, 31] a concentraciones menores, pero en este estudio se reporta su excelente tolerancia al metal pesado y su alta capacidad de remoción, características que pueden ser aprovechadas para el desarrollo de alternativas de biorremediación de sitios contaminados con cromo.

Esta tolerancia debe ser consecuencia de la exposición permanente del microorganismo al metal pesado, lo que favorece la expresión de genes de resistencia [10, 17], aunada a la conocida capacidad de este género de formar esporas bajo condiciones estresantes, que le permiten entrar en estado de latencia hasta encontrar condiciones favorables que garanticen su crecimiento.

3.3 Biorreducción del Cr (VI)

En la Figura 1, se muestra el cambio en la concentración del Cr⁺⁶ y el crecimiento poblacional durante el tiempo de incubación, observándose que la reducción del contaminante requirió 9, 34 50 y 96 horas, para 10, 30, 50 y 100 ppm de Cr⁺⁶ respectivamente.

Estos resultados permitieron comprobar que la presencia del microorganismo acelera el proceso de reducción del Cr⁺⁶ frente al fenómeno químico experimentado por el blanco sin inóculo bacteriano en el rango de concentraciones empleado (10–100 ppm). El análisis de Tukey (p=0,00) demostró que hubo diferencias significativas entre todos los tratamientos aplicados.



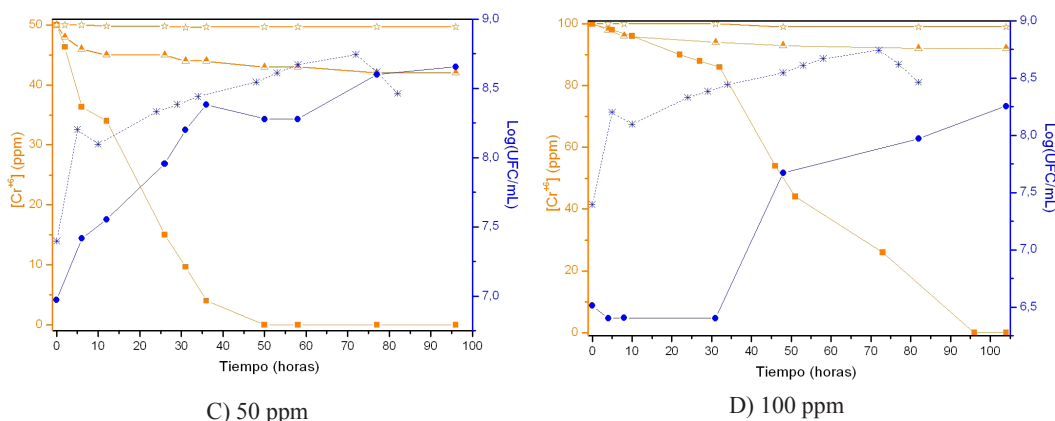


Figura 1. Curvas de reducción de Cr^{+6} y de crecimiento poblacional de *Bacillus cereus* B₁ respecto al tiempo. Cr^{+6} en el tratamiento (—■—), Cr^{+6} en LB, (—▲—), Cr^{+6} en agua destilada (—☆—), Crecimiento bacteriano en el tratamiento (—●—), crecimiento bacteriano sin cromo (---*---).

Según los resultados obtenidos, es interesante considerar la capacidad de reducción de *B. cereus* B₁ ligada al crecimiento bacteriano. En la figura 1, se observa que a bajas concentraciones de Cr^{+6} (10 y 30 ppm), la población presentó un primer pico máximo de crecimiento alrededor de las 8 horas, el cual disminuyó en las 6 horas siguientes y luego volvió a recuperarse. Este comportamiento coincide con un ligero cambio en la pendiente de reducción del Cr^{+6} , la cual se ve más pronunciada en la fase de crecimiento exponencial, fenómeno que permite identificar que el cambio en el estado de oxidación del contaminante está estrechamente relacionado con el crecimiento del microorganismo.

Para el tratamiento a 50 ppm, fue necesario un mayor tiempo para alcanzar su máximo crecimiento, fenómeno que se intensifica en el tratamiento a 100 ppm, donde adicionalmente se observa una inhibición del crecimiento durante las primeras 30 horas. Este hecho pone en evidencia el efecto tóxico del Cr^{+6} sobre el microorganismo a dichas concentraciones, pero lo interesante, es que la bacteria logra sobreponerse a la toxicidad aumentando su población, de tal manera que en la fase exponencial se acelera considerablemente el proceso de reducción de Cr^{+6} , hasta alcanzar el 100% de reducción.

Las observaciones anteriores ponen en evidencia la existencia de dos tipos de respuesta del microorganismo frente al agente tóxico. Una respuesta donde las bacterias bajo condiciones de estrés inducido por la alta concentración del contaminante experimentan una etapa conservativa, donde el proceso de reducción puede estar asociado a fenómenos químicos y mecanismos de absorción-expulsión [10, 12], de tal forma que el microorganismo invierte gran cantidad de energía en el proceso de transporte activo para controlar la entrada masiva del catión altamente tóxico, frenándose considerablemente los procesos de división celular, al punto que la población viable permanece en un estado de equilibrio (figura 1D, etapa inicial).

El otro tipo de respuesta se da cuando las concentraciones de Cr^{+6} no son lo suficientemente tóxicas para el microorganismo, permitiendo que se lleven a cabo procesos metabólicos que incrementan exponencialmente la población bacteriana y que a su vez participan directamente en la reducción del Cr^{+6} aumentando la velocidad

de transformación hasta alcanzar el 100% de reducción del contaminante en todas las concentraciones evaluadas. Este hecho sugiere que el fenómeno ocurre por un mecanismo de reducción ligado al crecimiento celular. Existen estudios previos [4, 9, 10, 12, 24] que permiten sugerir la participación de un sistema enzimático de tipo cromotorreductasas, en el proceso de reducción del Cr^{+6} , el cual opera bajo condiciones aeróbicas con NADPH o NADH como cofactores. Dada la ausencia de sulfatos en el medio, se descarta una vía de remoción donde se involucren mecanismos sulfato-reductores.

Es evidente la participación del microorganismo en el proceso de reducción, si se compara con el comportamiento de los controles. La reducción del Cr^{+6} en agua destilada fue prácticamente despreciable, mientras que en medio LB sin inóculo bacteriano, se observó una ligera disminución del contaminante. Esta reducción que puede explicarse por los componentes del medio de cultivo, según Murugavelh y Mohamty [18], el extracto de levadura al 0.5% presente en el LB, participa en la reducción del Cr^{+6} gracias al aporte de aminoácidos libres, los cuales fueron los donadores de electrones para la reducción del cromo hexavalente en ensayos realizados con *B. cereus*. Sin embargo, la participación de los componentes del medio LB es poco relevante en este estudio ya que no es lo suficientemente efectiva para llevar a cabo la reducción total del Cr^{+6} . Adicionalmente, el análisis estadístico permitió comprobar que hubo diferencias significativas entre los tratamientos y los controles sin microorganismos (figura 2).

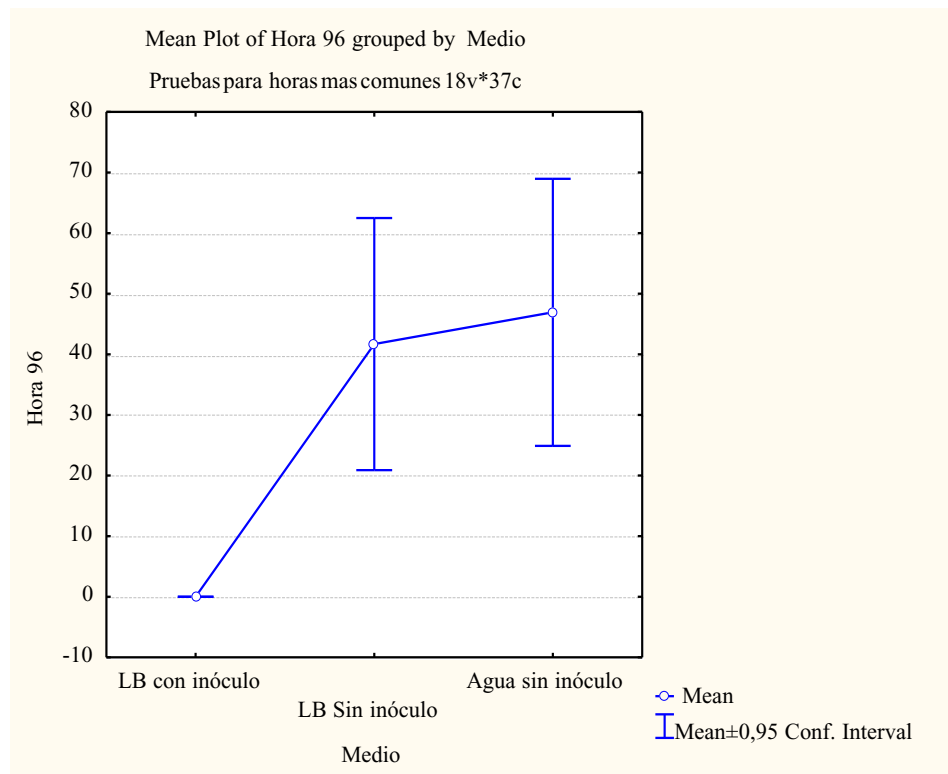


Figura2. Diferencias entre los tratamientos para la disminución de la concentración de cromo hexavalente.

A pesar de esto, el medio LB fue adecuado para los ensayos por su capacidad amortiguadora a pH neutro al compararlo con los resultados obtenidos en agua destilada, donde el pH inicial se tornó ácido a medida que se incrementó la concentración inicial de Cr⁺⁶ (tabla 2).

Tabla 2. Valores de pH y cromo total en medio LB y agua destilada estéril, después de 103 horas de incubación.

Cr ⁺⁶ inicial (ppm)	Tratamiento en LB					LB* sin inóculo			Agua destilada estéril*		
	Cr total final en solución (ppm)	Remoción Cr total (%)	pH inicial	pH final	Cambio pH	pH inicial	pH final	Cambio pH	pH inicial	pH final	Cambio pH
0			6.94	8.32	1.38						
10	2.08	79.2	6.94	8.60	1.66	6.97	7.01	0.04	6.11	6.22	0.11
30	8.81	70.63	6.88	8.40	1.52	6.94	7.04	0.10	5.51	5.90	0.39
50	19.42	61.16	6.83	8.41	1.58	6.88	6.95	0.07	5.31	5.37	0.06
100	71.67	28.33	6.72	7.61	0.89	6.75	6.88	0.13	5.18	5.31	0.13

*No hubo remoción de cromo total en ninguna de las concentraciones.

Por otro lado, los resultados del cromo total en solución (tabla 2) indican que el remanente está principalmente en forma de Cr⁺³, lo cual permite afirmar que hubo un proceso de reducción. Sin embargo, no todo el cromo permanece en forma soluble, situación que puede explicarse debido a la presencia de metabolitos de tipo básico y en algunos casos con propiedades quelantes, así como la proliferación de iones hidroxilo por el incremento del pH observado en presencia del microorganismo los cuales pueden formar complejos menos solubles, factor que disminuye la cantidad de Cr (III) en el sobrenadante, al cual se le determinó el contenido de cromo total. El ligero aumento de pH favorece la estabilidad del cromo en forma trivalente [5], condición deseada en este tipo de ensayos.

La disminución del cromo total en el sobrenadante puede deberse también a fenómenos biológicos como la biosorción [2], proceso de captación pasiva del metal en células muertas que ocurre gracias a las características de las paredes celulares de bacterias y hongos que acumulan el metal [27], situación que puede estar ocurriendo si se considera que todos los tratamientos se prolongaron por un tiempo cercano a las 100 horas. Es de esperar que el cromo (III) soluble obtenido al final del experimento en el tratamiento a 10 ppm sea mucho menor, ya que estuvo mayor tiempo expuesto a los detritos acumulados por la muerte celular. En consecuencia, esto puede ocurrir dado que a menor concentración de Cr (VI), hubo un mayor crecimiento celular que tiende a decaer más rápidamente por agotamiento de nutrientes y cambios en el medio de cultivo sin presencia de un agente tensor que, de alguna manera, regule la sobrepoblación. De esta manera, se observa que los porcentajes de remoción de cromo total en solución, al final de cada experimento disminuyen en la medida que la concentración inicial de Cr (VI) es mayor (tabla 2).

4 Conclusiones

En la presente investigación se reporta la alta tolerancia (8000 ppm) de la cepa nativa B₁ de *Bacillus cereus* (secuenciada por MACROGEN), aislada de aguas residuales de curtiembres, la cual presentó una alta capacidad biotransformadora de Cr (VI) en medio LB, bajo condiciones aeróbicas y cercanas a la neutralidad.

La capacidad de reducción del contaminante, así como el comportamiento del crecimiento bacteriano, permiten proponer a *Bacillus cereus* B₁ como microorganismo promisorio para la biorremediación de sitios contaminados con Cr (VI) a escala real. Además, su capacidad de esporular bajo condiciones adversas plantea una perspectiva prometedora en términos de resistencia del microorganismo a la variabilidad de las condiciones que pueden presentarse en el medio contaminado a biorremediar, de tal forma que la población pueda autorrecuperarse cuando las condiciones sean mucho más favorables para sus procesos metabólicos.

Queda demostrada la influencia de la concentración del Cr (VI) en el proceso de biorreducción efectuado por *Bacillus cereus* B₁, el cual requirió más tiempo de exposición al contaminante a medida que su concentración fue mayor.

Agradecimientos

A la Universidad del Valle por la financiación otorgada mediante la convocatoria interna 2010-2011, bajo el número CI:7823, y por las facilidades brindadas para la realización de esta investigación.

Referencias bibliográficas

- [1] APHA-AWWA-WEF (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington D.C.
- [2] Aksu, Z. & Balibek, E. (2007). Chromium(VI) biosorption by dried *Rhizopus arrhizus*: Effect of salt (NaCl) concentration on equilibrium and kinetic parameters. *Journal Hazard. Materials*. 145, 210 – 220.
- [3] Camargo, F. A. O., Okeke, B. C., Bento, F. M & Frankenberger, W.T. (2004). Hexavalent Chromium Reduction by Immobilized Cells and the Cell-Free Extract of *Bacillus* sp. *ES 29. Bioremediation Journal*. 8(1–2), 23–30.
- [4] Campos, J., Martínez-Pacheco, M. & Cervantes, C. (1995). Hexavalent-chromium reduction by a chromate-resistant *Bacillus* sp. Strain. *Antonie Leeuwenhoek*. 68, 203–208.
- [5] Cotton, F. A., Wilkinson, G., Murillo, C. A. & Bochmann, M. (1999). *Advanced inorganic chemistry*. 6ta Ed. Estados Unidos. Jhon Wiley & Sons. 1355p.

- [6] Daulton, T. L., Little, B. J., Jones-Meehan, J., Blom, D. A. & Allard, L. F. (2007). Microbial reduction of chromium from the hexavalent to divalent state. *Geochemical Cosmochim.* 71, 556–565.
- [7] Don, R. H., Cox, P. T., Wainwright, B. J., Baker, K. & Mattick. J. S. (1991). “Touchdown” PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. *Nucleic Acids Resarch.* 19:4008.
- [8] Doshi, H., Seth, C., Ray, A. & Kothari, I. L. (2008). Bioaccumulation of Heavy Metals by Green Algae. *Current Microbiology.* 56, 246–255.
- [9] Elangovan, R., Abhipsa, S., Rohit, B., Ligy, B., & Chandraraj, K. (2006). Reduction of Cr(VI) by a *Bacillus* sp. *Biotechnology Letters.* 28, 247–252.
- [10] Geets, J., Vangronsveld, J., Diels, L., Taghavi, S. & Van der Lelie, D. (2008). Microbial activities, monitoring and application as part of a management strategy for heavy metal-contaminated soil and ground water. En: *Developments in Soil Science*,. (Ravendra Naidu, Ed.) Vol. 21, pp. 523-531.
- [11] Gil, E. (1998). Síntesis de arcilla aniónica a partir de ceniza volante y su aplicación en la remoción de cromo VI. *Revista Universidad Eafit.* Octubre – Diciembre. 73–80.
- [12] Gutiérrez, J. F. & Cervantes, C. (2008). Interacciones microbianas con el cromo: mecanismos y potencial biotecnológico. *Ideas CONCYTEG.* 3 (37), 21–36.
- [13] Gutiérrez, J. F., Espino, A. E., Coreño, A., Acevedo, F. J., Reyna, G., Fernández, F.J., *et. ál.* (2010). Mecanismos de interacción con cromo y aplicaciones biotecnológicas en hongos. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental Algal.* 1, 47-63.
- [14] Higgins, T. E., Halloran, A. R. & Petura, J. C. (1997). Traditional and innovative treatment methods for Cr(VI) in soil. *J. Soil Contamination.* 6, 767–797.
- [15] Higuera; O. F., Escalante, H. & Laverde, D. (2005). Reducción del cromo contenido en efluentes líquidos de la industria del cuero, mediante un proceso adsorción – desorción con algas marinas. *Scientia et Technica,* 11, (29), 115-120.
- [16] Mancera-Rodríguez, N. J. & Álvarez R. (2006). Estado del conocimiento de las concentraciones de mercurio y otros metales pesados en peces dulceacuícolas de Colombia. *Acta Biológica Colombiana.* 11(1), 3-23.
- [17] Marrero-Coto, J; Díaz-Valdivia, A & Coto-Pérez, O. (2010) Mecanismos moleculares de resistencia a metales pesados en las bacterias y sus aplicaciones en la biorremediación. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas [en línea]* vol. 41 [citado 2012-08-15]. Disponible en Internet: <http://www.redalyc.org/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=181221644010>. ISSN 0258-6002.

- [18] Murugavelh, S. & Mohanty, K. (2013). Isolation, identification and characterization of Cr(VI) reducing *Bacillus cereus* from chromium contaminated soil. *Chemical Engineering Journal* 230: 1–9.
- [19] Okeke, B. C. (2008). Biorremoval of hexavalent chromium from water by a salt tolerant bacterium, *Exiguobacterium* sp. GS1. *Journal Industrial Microbiol Biotechnology*. 35, 1571–1579.
- [20] Ozturk, S., Aslim, B. & Suludere, Z. (2009). Evaluation of chromium(VI) removal behaviour by two isolates of *Synechocystis* sp. in terms of exopolysaccharide (EPS) production and monomer composition. *Bioresource. Technology*. 100, 5588–5593.
- [21] Prasad, M. N. & Freitas, H. (2006). Metal-Tolerant Plants: Biodiversity Prospecting for Phytoremediation Technology. En *Trace elements in the environment: Biogeochemistry, Biotechnology, and Bioremediation*. 25, 483–506.
- [22] Reddy, K. R.; Parupudi, U. S.; Devulapalli, S. N. & Xu, C. Y. (1997). Effects of soil composition on the removal of chromium by electrokinetics. *Journal Hazard. Materials*. 55, 135–158.
- [23] Rengifo-Gallego, A. L., Peña-Salamanca, E. & Benitez-Campo, N. (2012) Efecto de la asociación alga-bacteria *Bostrychia calliptera* (Rhodomelaceae) en el porcentaje de remoción de cromo en laboratorio. *Revista Biología Tropical. (International Journal Tropical Biology. ISSN-0034-7744)*. 60 (3): 1055-1064.
- [24] Suzuki, T., Miyata, N., Horitsu, H., Kawai, K., Takamizawa, K. Tai, y. & Okazaki, M. (1992). NAD(P)H-Dependent Chromium(VI) Reductase of *Pseudomonas ambigua* G-1: a Cr(V) Intermediate is Formed during the Reduction of Cr(VI) to Cr(III). *Journal Bacteriology*. 174(16), 5340-5345.
- [25] Tapia, J., Freer, J., Mansilla, H., Villaseñor, J., Bruhn, C. & Basualto, S. (2002). Estudio de reducción fotocatalizada de cromo hexavalente. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*. 47(4).
- [26] Téllez J., Carvajal R. M., & Gaitán A. M. (2004). Aspectos toxicológicos relacionados con la utilización del cromo en el proceso productivo de curtiembres. *Revista Facultad de Medicina Universidad Nacional de Colombia*, 52, (1). 50-61.
- [27] Vijayaraghavan, K., & Yun, Y-S. (2008). Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology Advances*. 26, 266–291.
- [28] Vullo, D. L. (2003). Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Revista Química Viva*. 2(3).
- [29] Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., & Lane D. J. (1991). 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal Bacteriology*. p. 697-703.

- [30] Zahoor, A., & Rehman, (2009). A. Isolation of Cr(VI) reducing bacteria from industrial effluents and their potential use in bioremediation of chromium containing wastewater. *Journal Environmental Science*. 21, 814–820.
- [31] Zhao C, Yang Q, Chen W. & Teng B. (2012). Removal of hexavalent chromium in tannery wastewater by *Bacillus cereus*. *Canadian Journal Microbiology*. Jan; 58(1):23-8.

Dirección de los autores

Alexander Ramírez Ramírez
Departamento de Biología, Universidad del Valle, Cali - Colombia
alexirez@gmail.com

Neyla Benítez-Campo
Departamento de Biología, Universidad del Valle, Cali - Colombia
neyla.benitez@correounivalle.edu.co