



“Caracterización de una cepa de *Bacillus cereus* deficiente en el regulador transcripcional *PlcR* respecto de su interacción con cromo y colorantes azoicos”

Diana Erendira Uribe-Juárez¹, J.Felix Gutierrez-Corona², Héctor Hernandez-Escoto², Fernando Santos-Escobar²

¹Departamento de Biología, Universidad de Guanajuato, Lascuráin de Retana No. 5, Col. Centro C.P. 36000

Guanajuato, Gto., México

²Departamento de Ingenierías, Universidad de Guanajuato, Universidad de Guanajuato, Lascuráin de Retana No. 5,

Col. Centro C.P. 36000 Guanajuato, Gto., México

*Autor de correspondencia: uribe.diana2502@gmail.com

Recibido 15 de agosto de 2020; aceptado 04 de octubre de 2020

RESUMEN

Debido a la importante contaminación en los residuos de industrias, altos costos y baja eficiencia en procesos de descontaminación se comenzó a considerar el empleo de procedimientos biotecnológicos, en base a la utilización de microorganismos, plantas o sus productos.. Se sabe que los aislados de *B. cereus* son frecuentes en los desechos industriales que contienen cromo y son eficientes en la transformación de Cr (VI) en Cr (III). Sin embargo, esta bacteria es un patógeno oportunista, en el que el regulador transcripcional PlcR permite la producción de toxinas dañinas para humanos y animales, En este proyecto se realizó la caracterización bioquímica y molecular de la cepa *B. cereus* FS1, un derivado de la cepa ambiental *B. cereus* AM13 que no produce toxinas. Además se evaluaron condiciones de crecimiento de estas cepas en medios de cultivo económicos r MEF y PEF variando estos en la fuente de carbono, en el que la condición óptima de crecimiento mostro resultados de remoción de más de 95% de Cr(VI) y del colorante azoico Black 2-10 en medio MEF por las cepas *B. cereus* AM13 y FS1, estas observaciones sugieren que la capacidad

de remoción del colorante Black 2-10 y de Cr(VI) no parece ser afectada por la deleción del gen plcR. Mostrando que es factible aplicar esta cepa en el desarrollo de procesos biotecnológicos para la eliminación de los contaminantes antes mencionados aplicando el bioproceso a gran escala representando un menor costo y mayor eficiencia en proceso de remoción de contaminantes.

PALABRAS CLAVE: Cromo, fuente de carbono, colorante azoico, regulador transcripcional, deleción, residuo industrial

ABSTRACT

B. cereus isolates are frequent in industrial wastes containing chromium and are efficient in transforming Cr(VI) into Cr(III). Since this bacterium is an opportunistic pathogen, in which the transcriptional regulator PlcR enables the production of harmful toxins to humans and animals, it is of interest to have a strain of *B. cereus* that does not produce toxins and with that strain study the ability to remove Cr(VI) and azo dyes, in order to generate basic information and also determine the feasibility of applying this strain in the development of biotechnological processes for the elimination of the aforementioned contaminants.

KEY WORDS : Chromium, carbon source , azo dye , transcriptional regulator, deletion and industrial wastes.

INTRODUCCIÓN

En México, como en el resto del mundo, en los últimos dos siglos, pero sobre todo en las últimas cuatro o cinco décadas, la actividad humana se ha convertido en un factor de modificación profunda de la naturaleza y de los procesos ecológicos. La contaminación por las emisiones de procesos industriales está presente en todos los ecosistemas del país y es un importante factor de degradación de suelos, lagunas y corrientes de agua, y daña severamente la flora y fauna terrestres y acuáticas. En el caso de algunos lugares del país los niveles de metales pesados (plomo, cobre y cromo entre otros) se han detectado por encima de la norma aceptada (NMX-AA-003-1980) Esto se ha debido a que gran parte del crecimiento industrial de México se desarrolló en tiempos donde no se consideraban, y muchas veces tampoco se conocían, los efectos que los residuos peligrosos (RP) podrían tener en la biodiversidad, los ecosistemas y la salud humana. La problemática asociada a los RP tiene dos grandes líneas; por un lado, la que se deriva de la presencia de sitios ya contaminados y que requieren su remediación y por el otro, aquella orientada a la prevención de la contaminación proveniente de las fuentes en operación

.Cabe resaltar que la protección de ecosistemas y su biodiversidad contribuye al desarrollo de los países elevando el bienestar de la población en todos sus aspectos (Holzman y col., 2012). Para el presente trabajo son de interés los compuestos de cromo y los colorantes azoicos, los cuales son contaminantes importantes presentes en los residuos de industrias como la como la textil y curtidora, que operan en el Bajío y en otras partes de México. Ambas actividades industriales generan una cantidad considerable de agua residual toxica, la cual contiene diversos contaminantes, como sales, fenoles, compuestos orgánicos (solventes clorados), aniones tóxicos de sulfuro, metales pesados y colorantes sintéticos. Estos últimos, son contaminantes de especial importancia, debido a su difícil degradación y constante persistencia en el agua y suelo (Barrios y col., 2015). Las aguas residuales de las unidades de teñido también contienen metales pesados tóxicos y sales; la concentración de los primeros en el efluente varía según el uso de colorantes sintéticos a complejados a metales, diversas sales que contienen metales y productos químicos utilizados durante el proceso de teñido (Wan y Hanafiah, 2008). Entre los diferentes metales pesados, el cromo hexavalente [Cr(VI)] se usa ampliamente en la

industria textil, no solo como parte de los colorantes sintéticos, sino también en compuestos conteniendo cromo utilizados como mordientes para la fijación del color en la tela (Liu y Col., 2017). Otras actividades industriales en las que se utilizan compuestos de cromo incluyen metalurgia, cromado electrolítico, fabricación de pinturas y pigmentos, curtido de pieles, como catalizadores y conservadores de madera, etc. (Madhavi y col., 2013). Se ha descrito que debido a este intenso uso de los compuestos de cromo y al uso de procedimientos inadecuados de tratamiento y/o de contención de residuos se ha generado contaminación del ambiente por cromo; así, se ha reportado que más de 170,000 toneladas de residuos de cromo son descargados al ambiente anualmente (Kamaludeen y col., 2003). Por otro lado, el efecto de la acumulación de colorantes azoicos en aguas residuales provoca no solo un problema estético, sino que, además, estos interfieren con los procesos fotosintéticos que realizan algunos organismos acuáticos (Copaciu y col., 2016). Los colorantes perdidos o no usados a través de los procesos de la industria textil plantean un problema importante para el manejo de las aguas residuales. Se estima que cada año se expulsan al medio ambiente

mundial alrededor de 200,000 toneladas de colorantes y que la concentración de colorantes azoicos en el efluente de las empresas textiles puede alcanzar los 500 mg/L (Chequer y col., 2013).

El cromo (Cr) es el séptimo elemento más abundante sobre la tierra con estados de oxidación que van desde Cr(II) hasta Cr(VI); la forma trivalente y la hexavalente, son las más estables y abundantes. Este es uno de los metales pesados que ha despertado mayor interés en la actualidad por sus efectos en los seres vivos como mutaciones y enfermedades como cáncer, dicho metal es vertido como desecho de las actividades industriales, por ello se han realizado estudios donde se busca la implementación de microorganismos para tratar la contaminación por este metal, siendo así una alternativa mayormente económica y amigable con el medio ambiente.

A continuación, se hablará acerca de la creación de un medio económico con dos fuentes alternas de carbono (melaza y piloncillo), capaz de crecer células de *Bacillus cereus* y a su vez ser capaz de reducir Cr (VI). AM13 y FA1 (cepas de *B. cereus*) utilizadas en este experimento, con el fin de encontrar las mejores condiciones de crecimiento, mayor eficiencia en la reducción de Cr (VI)

decoloración de Black 2-10.

Objetivo general

Caracterizar la cepa FS1 transformante neoR de *B. cereus* AM13 con respecto a su capacidad para eliminar el Cr (VI) y colorantes azoicos en medios con fuentes de carbono económicas y realizar escalado de biorreactores.

Objetivos específicos

1. Realizar la caracterización bioquímica y molecular la cepa FS1 transformante neoR de *B. cereus* AM13. 2. Estandarizar el medio de cultivo económico usando diferentes fuentes de carbono para el crecimiento, así como para la reducción de Cr(VI) y la decoloración de colorantes azoicos, usando *B. cereus* AM13. 3

MATERIALES Y MÉTODOS

Caracterización bioquímica

Varios estudios de identificación y caracterización de cepas de *B. cereus* s.s. aisladas de alimentos han descrito que, aparte de presentar actividad hemolítica, presentan actividad de lecitinasa y no fermentan manitol (Tallent.,1998). También, se ha descrito que mutantes de *B. cereus* deletados en el gen plcR no poseen actividad hemolítica ni de lecitinasa (Hwang y Park, 2015) . Por ello, fue de interés realizar la prueba de estas

actividades en la cepa FS1, a fin de tener indicios fenotípicos que pudieran indicar su genotipo.

Prueba de actividad hemolítica

Se realizaron pruebas de actividad hemolítica en las que se utilizaron placas de agar sangre, las cuales fueron inoculadas con las cepas *B. cereus* AM13 y FS1 y se incubaron por 24 h a 28°C con la finalidad de observar el fenotipo de hemólisis o su ausencia, según el caso.

Prueba de degradación de lecitina

Se realizaron pruebas de degradación de lecitina en las que se utilizaron placas del medio MYP para observar la actividad lecitinasa y la ausencia de fermentación de manitol después de la inoculación con las cepas AM13 y FS1 y su incubación por 24 h a 28°C. La formación de un precipitado opaco alrededor de las colonias indica la degradación de lecitina y el color rosa en las colonias indica la incapacidad de fermentar el manitol.

Caracterización molecular

Verificación de delección del gen plcR en la cepa FS1 aislada por su resistencia a neomicina)

Para la verificación de la delección del gen plcR en la cepa FS1 se realizó la extracción de DNA genómico de esta cepa y de la cepa AM13. Se preparó una mezcla de reacción para PCR utilizando para las reacciones un par

de oligonucleótidos que alinean en los extremos del marco de lectura abierto del gen *plcR*. Los productos formados en la reacción fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1 %, visualizando las bandas mediante tinción con bromuro de etidido. Donde se predice la producción de una banda amplificada de 851 pb en la cepa silvestre AM13 y una banda de 1528 pb en la cepa transformante FS1 (Figura 1).

La extracción de ADN_g de *B. cereus* se realizó mediante el protocolo reportado por Aljnabani y col., (1997), con la modificación, de realizar la lisis de la pared celular de las células de *B. cereus* mediante un tratamiento con lisozima [30 mg/mL] e incubarlas a 37°C durante 2 h.

Corroboración de la presencia del alelo deletado del gen *plcR* en el locus de dicho gen en la cepa FS1

Se realizan 2 reacciones de PCR, la primera utilizando los oligonucleótidos indicados en la Fig.2 con color rojo, que alinean con regiones de los marcos de lectura *nprB* y *ykW* para amplificar de extremo a extremo la region genómica que en la cepa silvestre AM13 incluye parte de los marcos de lectura *nprB* y *ykoW*, incluido entre ellos el gen *plcR*, lo que genera un fragmento de 2689 pb (Figura 2, parte superior izquierda). Por otra parte, si en la cepa FS1 ocurrió el reemplazo del alelo silvestre *plcR*⁺ por el alelo deletado presente en la construcción *pGCplcR*, utilizada para realizar la transformación, se genera un fragmento de 3833 pb (Figura 2). En la segunda reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos indicados en la Figura 2 con color azul, consistentes de un oligo directo que alinea con el gen de resistencia a neomicina y un oligo reverso que se une a una región genómica adyacente al gen *plcR*, y que dicha región no está en la construcción de delección *pGCplcR*. En este caso se espera un fragmento de 1776 pb en la cepa FS1 y ninguna banda de amplificación en la cepa silvestre AM13.

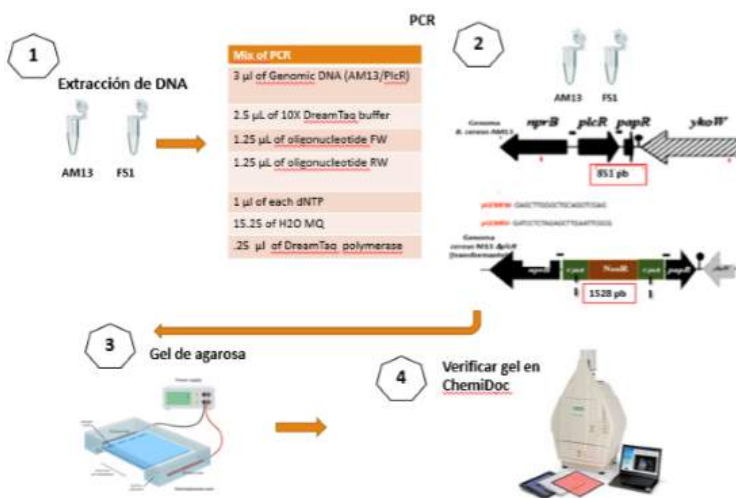


Figura 1. Diagrama de metodología para caracterización molecular

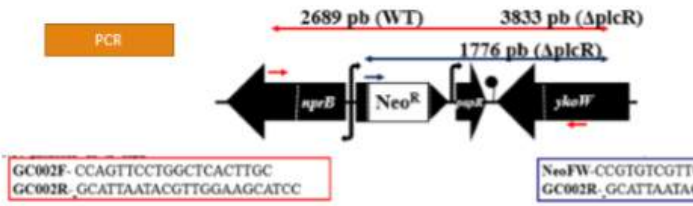


Figura 2. Genoma de *B. cereus* AM13 transformante.

Oligos directo y reverso en rojo para verificación de alelo deletado del gen *plcR* en el locus del genoma de la cepa fs1.

Análisis de variables de composición en medio MEF para crecimiento bacteriano y reducción de Cr(VI)

Para determinar la mejor composición de nutrientes de los medios tanto para crecimiento bacteriano y reducción de Cr(VI), se probó medio de cultivo MEF y PEF con distintas concentraciones de componentes como lo fueron, fuente de carbono (.3, .6 y 1%), extracto de levadura (.5 y 1%) y fertilizante orgánico como fuente de compuestos inorgánicos adicionales. (.035, .05, .1, .3 y .5%). Las combinaciones de mezclas de concentraciones probadas se muestran en la. Las cepas de interés fueron propagadas en medio LB a 37°C y 200 rpm de agitación toda la noche y a partir de este cultivo, se adicionó una alícuota de 0.5 mL a varios matraces Erlenmeyer que contenían 25 mL del Medio MEF con distintas concentraciones de componentes.

Determinación de la Reducción de Cr(VI) en cultivos en medio MEF o PEF líquido

Para determinar la capacidad de reducción de Cr(VI) en las cepas bacterianas de interés, se preparó un pre-inóculo de cada cepa en medio LB con una incubación de 10 a 14 horas a 37 °C con agitación de 200 rpm. Posteriormente, se tomó un volumen de 250 µL del pre-inóculo y fue adicionado a un matraz Erlenmeyer con un volumen de 25 mL de medio MEF o PEF, se incubó a 37 °C con agitación a 200 rpm, hasta alcanzar la densidad óptica de 0.5 a 600 nm. A este tiempo, se adicionó una concentración de 1.92 mM (100 ppm) de Cr(VI). Posteriormente, los matraces se incubaron bajo las condiciones antes mencionadas realizando la determinación de reducción de Cr(VI) por el método de difenilcarbazida (Greenberg y col., 1981) y se midió la densidad óptica a 600 nm a los tiempos de 0,8,16 y 24 h de incubación para determinar el crecimiento de las cepas (Figura 4).

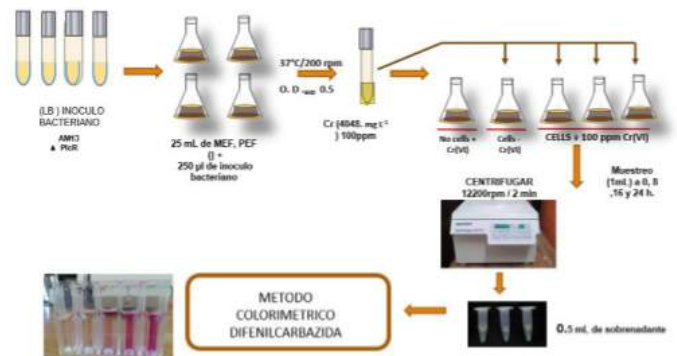


Figura 3. Diagrama de metodología para la determinación de reducción de Cr(VI) en medio MEF y PEF con cepas *B.cereus* AM13 y FS1

Determinación de viabilidad celular de las cepas *B. cereus* AM13 y FS1 incubadas en presencia de Cr(VI)

Para determinar la viabilidad celular de las cepas bacterianas de interés, se preparó un pre-inóculo de cada cepa en medio MEF con una incubación de 10 a 14 horas a 37 °C con agitación de 200 rpm. Posteriormente, se tomó un volumen de 0.600 µL del pre-inóculo y fue adicionado a un matraz Erlenmeyer con un volumen de 60 mL de medio MEF, se incubó a 37 °C con agitación a 200 rpm, hasta alcanzar la densidad óptica de 0.5 a 600 nm. Se dividió el medio de cultivo inoculado con el cultivo bacteriano en 6 partes iguales de 10 mL las cuales fueron agregados a tubos estériles que contenían distintas concentraciones (0 ,50 ,100 ,200 y 400 ppm) de Cr(VI) y se incubaron a 37°C/200 rpm por 3 h. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas, las alícuotas de las mismas fueron plaqueadas en placas de medio LB , se dejaron en crecimiento a 37°C por una

noche y se realizó la cuantificación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) .

Decoloración de colorante triazoico Black 2-10 en cultivos en medio MEF o PEF líquido

Para determinar la capacidad de decoloración de colorante triazoico (Black 2-10) por cepas bacterianas de interés en el medio con la fuente alterna de carbón MEF, se preparó un pre-inóculo de cada cepa en medio LB con una incubación de 10 a 14 horas a 37 °C con agitación de 200 rpm. Posteriormente, se tomó un volumen de 250 µL del preinóculo y fue adicionado a un matraz Erlenmeyer con un volumen de 25 mL de medio MEF o PEF, se incubó a 37 °C con agitación a 200 rpm, hasta alcanzar la densidad óptica de 0.5 a 600 nm. A este tiempo, se adicionaron distintas concentraciones (100 ,200 y 500 ppm) de Black 2-10. Los cultivos se incubaron a 37°C, se tomaron alícuotas de 1 mL de los cultivos a las 0 ,8 ,16 y 24 h, se centrifugaron a 12200 rpm/2 min y se determinó la absorbancia a 480 nm del sobrenadante (Figura 4).

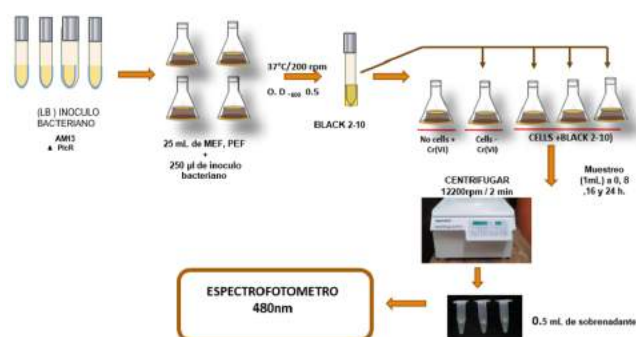


Figura 4. Diagrama de metodología para la determinación de decoloración en medio MEF y PEF con cepas *B.cereus* AM13 y FS1.

Decoloración de Black 2-10 con células de *B. cereus* AM13 y FS1 incubadas en medio MEF inactivadas por calor o con el sobrenadante libre de biomasa de cultivos de las cepas en medio MEF

Para determinar la capacidad de decoloración de colorante triazoico (Black 2-10) por células de las cepas bacterianas *B. cereus* AM13 y FS1 inactivadas por calor incubadas en el medio con la fuente alterna de carbón MEF, se siguió el siguiente procedimiento. Se preparó un pre-inóculo de cada cepa en medio LB con una incubación de 10 a 14 horas a 37 °C con agitación de 200 rpm. Posteriormente, se tomó un volumen de .250 µL del preinóculo y fue adicionado a un matraz Erlenmeyer con un volumen de 25 mL de medio MEF, se incubó a 37 °C con agitación a 200 rpm, hasta alcanzar la densidad óptica de 0.5 a 600 nm, la suspensión de células se sometió a esterilización por calor para producir la muerte celular. A continuación, se suspendió la biomasa inactivada en medio estéril MEF y a este se agregaron 500 ppm de Black 2-10. Se tomo

1mL de muestra al tiempo 0, se centrifugó a 12200 rpm/2 min y se determinó la absorbancia a 480 nm del sobrenadante. El mismo procedimiento fue aplicado cuando se utilizó solo el sobrenadante libre de biomasa para el ensayo de decoloración.

RESULTADOS

Para la caracterización bioquímica de la cepa transformante FS1, se realizaron pruebas de hemólisis y de degradación de lecitina en placa bajo las condiciones ya mencionadas en Materiales y métodos. Se observó que las colonias de la cepa silvestre AM13 poseen capacidad de causar hemólisis, indicado por el halo alrededor de las colonias (Figura 5A) y también de degradación de lecitina, indicado por el halo de color blanco alrededor de las colonias (Figura 7B). En contraste con estas observaciones, la cepa transformante FS1 no mostró halo de hemólisis (Figura 5A) ni de degradación de lecitina (Figura 5B). Cabe mencionar que estas características alteradas han sido descritas en la literatura para cepas de *Bacillus cereus* deletadas en el gen *plcR* (Agaisse y col., 1999; Mignot y col., 2001; Slamti y col., 2004; Easterday y col., 2005)

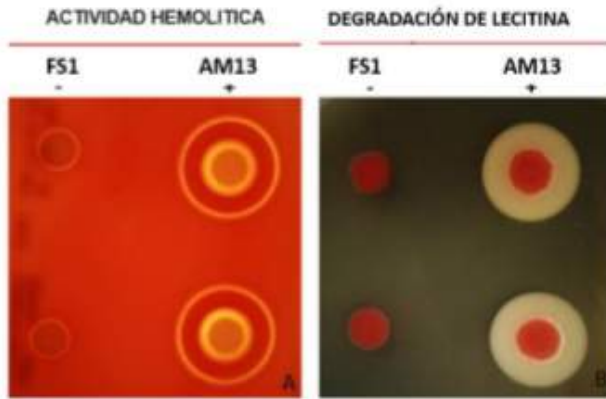


Figura 4. Caracterización bioquímica. A) Ensayo de actividad β -hemolítica y B) Ensayo de degradación de lecitina de cepas de *B. cereus* AM13 Y FS1.

Caracterización molecular

Verificación de la alteración del gen *plcR* en la cepa resistente a neomicina FS1

Como se menciona sección de Materiales y métodos, se aisló DNA genómico de las cepas AM13 y FS1 el cual se utilizó como templado para realizar reacciones de PCR con oligonucleótidos diseñados sobre regiones de los extremos 5' y 3' del marco de lectura abierto del gen *plcR*. En la Figura 5 se puede observar una banda amplificada de 851 pb en la cepa silvestre AM13 y una banda de 1528 pb amplificada en la cepa transformante FS1; en la cepa transformante FS1 este tamaño de banda amplificada es el que se espera si en el genoma de ella se insertó el módulo de delección sustituyendo al alelo

silvestre *plcR*⁺, como lo ilustra el diagrama de la Fig. 1, en la sección de Material y métodos.

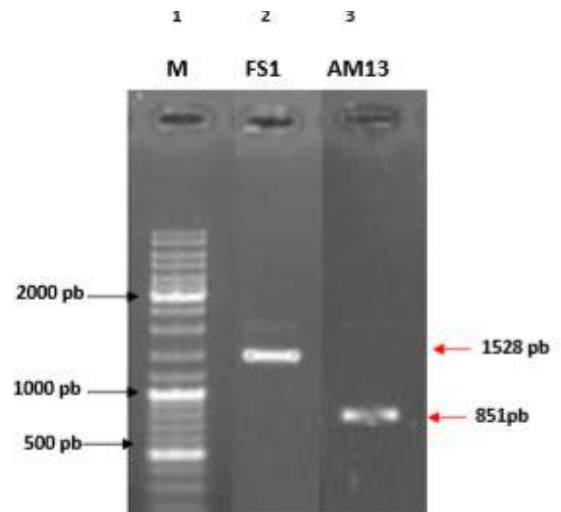


Figura 5. Corroboración molecular de la delección del gen *plcR* en la cepa FS1..

Verificación de la presencia del alelo *plcR* deletado en el locus del gen *plcR* dentro del genoma de la cepa FS1

Como se indicó en Materiales y métodos, utilizando como templado DNA genómico de las cepas AM13 y FS1 se realizaron dos reacciones de PCR para verificar que el alelo deletado del gen *plcR* se encontraba en el locus de dicho gen en el genoma de la cepa FS1. En la primera reacción, con oligonucleotidos diseñados sobre regiones del genoma adyacentes al gen *plcR*, las cuales no contiene la construcción de delección, como muestra el diagrama de la parte superior de la Figura 2 de Material y métodos, para la cepa silvestre AM13 se esperaba observar un

fragmento amplificado de 2689 pb y en la cepa FS1 se esperaba un fragmento de 3833 pb. Como se observa en la Figura 6, en la que se muestra la separación electroforética de los productos amplificados en cada cepa, los tamaños de las bandas amplificadas coinciden con el tamaño esperado. Por otra parte, en la segunda reacción de PCR se utilizó un par de oligonucleótidos de los cuales el oligo directo alinea con una región del gen de resistencia a neomicina y el oligo reverso alinea con una región genómica adyacente al gen *plcR*, la cual no está en la construcción de delección pGC*plcR*. En este caso, de acuerdo con el diagrama de la parte inferior de la Figura 2 de Material y métodos, se espera un fragmento de 1776 pb en la cepa FS1 y ninguna banda amplificada en la cepa silvestre AM13, lo cual fue verificado experimentalmente, al realizar el análisis electroforético de los productos amplificados en las cepas, como se muestra en la Figura 7. En conjunto, los resultados obtenidos indican que en la cepa FS1 el alelo silvestre *plcR*⁺ fue reemplazado por el alelo de este gen deletado por el gen *neoR* presente en la construcción pGC*plcR*, por un evento de doble recombinación homóloga

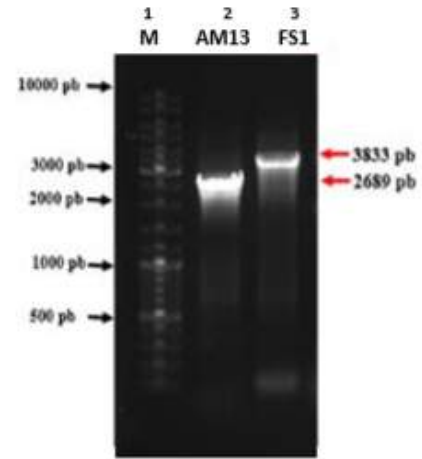


Figura 6. Corroboración molecular de la presencia del alelo deletado del gen *plcR* en el locus de este gen en el genoma de la cepa FS1.

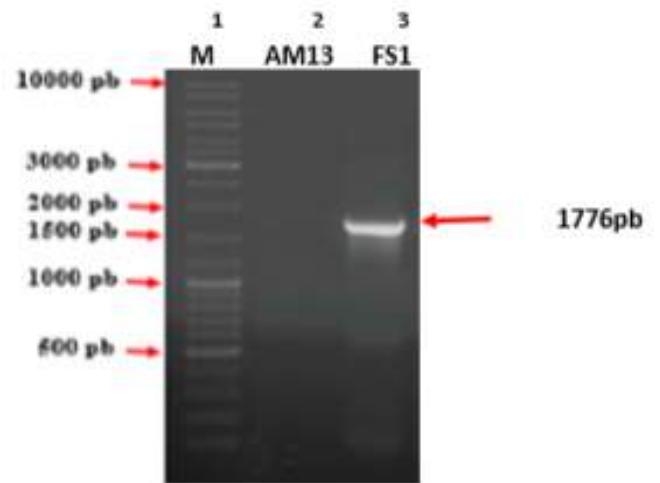


Figura 7. Corroboración de la sustitución del alelo silvestre *plcR*⁺ por el alelo deletado de este gen por el marcador *neoR* en la cepa FS1

Optimización del medio MEF para el crecimiento y reducción de Cr(VI) por la cepa *B. cereus* AM13, en base al contenido de melaza, extracto de levadura y fertilizante .

Como se ha mencionado en la literatura, la melaza presenta ventajas, tanto económicas como nutricionales para el crecimiento bacteriano, favoreciendo el desarrollo de la biomasa debido a los altos contenidos de carbohidratos (sacarosa), proteínas, grasas, calcio, aminoácidos, fosforo y vitaminas que la constituyen. En base a las condiciones para el crecimiento bacteriano y para la reducción de Cr(VI) descritas en Materiales y métodos, se evaluaron distintas concentraciones de melaza, extracto de levadura y fertilizante orgánico como medio de crecimiento para la cepa *B. cereus* AM13. Utilizando medio líquido conteniendo 0.3 o 0.6 % de melaza, 1 % de extracto de levadura y diferentes concentraciones de fertilizante orgánico (0.035, 0.03, 0.1, 0.3 y 0.5 %) no se observó crecimiento de la cepa mencionada; sin embargo, si hubo crecimiento de la cepa cuando la concentración de melaza se incrementó al 1 %, en medio con extracto de levadura al 1 % y con fertilizante orgánico a 0.035, 0.03, 0.1, 0.3 y 0.5%, siendo mayor el crecimiento con fertilizante al 0.3 o 0.5 %. Se analizó el efecto de la concentración de fertilizante orgánico en la reducción de Cr(VI) en medio que contenía melaza al 1% y extracto de levadura al 1% usando una concentración inicial de 100 ppm de Cr(VI)

y 24 h de incubación del cultivo. Como se muestra en la Figura 8, en las concentraciones de fertilizante orgánico de 0.035 % y 0.1 % se aprecia una mayor diferencia entre el cultivo inoculado con la cepa AM13 y el cultivo control no inoculado, siendo mayor la reducción de Cr(VI) en medio con 0.035 % del fertilizante. En medio con fertilizante orgánico al 0.5 % o al 0.05 % no hubo mucha diferencia entre el medio inoculado con la cepa AM13 y el medio control no inoculado, aunque la reducción de Cr(VI) fue más alta en medio con 0.5% del fertilizante orgánico.

También, se probó medio con 0.3 % de fertilizante orgánico, con melaza al 1% y extracto de levadura al 1 % observándose que en medio con 100 ppm de Cr(VI) a las 8 h de incubación en el cultivo inoculado con la cepa AM13 ocurrió una reducción de Cr(VI) de alrededor del 85 % y en el medio control no inoculado la reducción del 45% (Figura 13). Posteriormente se realizan ensayos de reducción de 100 ppm de Cr(VI) a 24 h mostrando los resultados utilizando concentraciones de .035, .05, .1 y .5% de fertilizante orgánico (Figura 8)

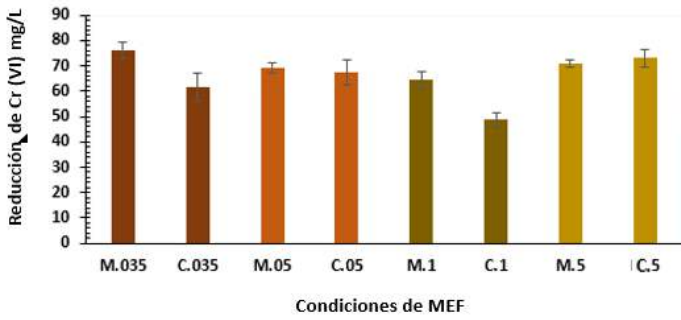


Figura 8. Efecto de la concentración de fertilizante orgánico en la reducción de Cr(VI) por *B.cereus* AM13 incubado en MEF / 24h.

En color café .035% , en anaranjado .05% , en verde .1% y en amarillo .5% de fertilizante orgánico.

Los datos de Cr(VI) reducido a las 24 h en los cultivos inoculados con la bacteria y en los cultivos control no inoculados, fueron expresados como porcentaje respecto del Cr(VI) adicionado a los cultivos al tiempo cero. Los resultados fueron graficados como el promedio de tres experimentos independientes hechos por triplicado ± DE.

Mientras que la concentración de .3% de fertilizante orgánico reduce de manera mas eficiente 100ppm de Cr(VI) a 8h como se muestra en la Figura 9.

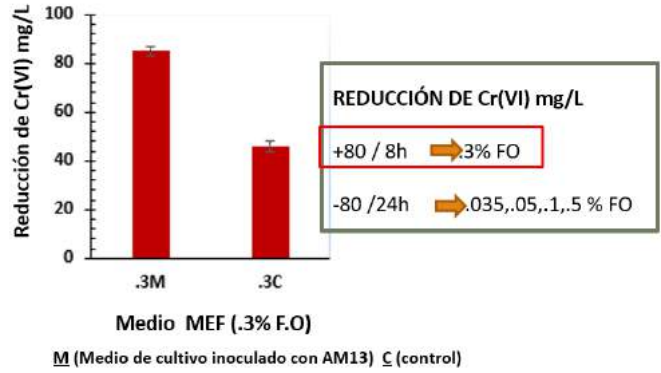


Figura 9. Efecto de 0.3 % de fertilizante orgánico en la reducción de Cr(VI) por *B.cereus* AM13 en medio MEF a las 8 h de incubación.

Se muestra también la comparación en el porcentaje de reducción respecto de condiciones en las que se emplearon otras concentraciones de fertilizante orgánico. Por lo tanto, se decidió utilizar el medio de cultivo MEF con la siguiente composición: melaza 1% , extracto de levadura 1% y micro y macronutrientes (fertilizante orgánico) 0.3%, ya que en el ocurrió una mayor eficiencia de reducción de Cr(VI) en menos tiempo, en comparación con las demás formulas utilizadas para realizar los ensayos.

Comparación de la reducción de Cr(VI) de las cepas AM13 y FS1 cultivadas en medio MEF y PEF líquidos

Debido a lo anteriormente mencionado se decidió utilizar la misma fórmula en cuanto a contenido de extracto de levadura y fertilizante orgánico, pero utilizando otra fuente de carbono económica (1% de piloncillo), para determinar

en cual de ellas ocurre una mayor eficiencia de reducción de Cr(VI) (100 ppm) en cultivos de las cepas AM13 y FS1, así como en el cultivo control no inoculado. La Figura 14 muestra que en medio MEF en los cultivos inoculados con las cepas AM13 y FS1 incubados a tiempo cero y por 8 h, ocurrió mas del 95 % de reducción del Cr(VI) adicionado a los cultivos; en el medio control no inoculado la reducción de Cr(VI) fue de alrededor del 40 % (Fig. 10). Por otra parte, en medio PEF a tiempo cero la reducción en los cultivos con las cepas bacterianas mencionadas y en el control de medio no inoculado, la reducción de Cr(VI) fue también de alrededor del 95 % , mientras que a las 8 h de incubación en cultivos con las dos cepas bacterianas y en el control no inoculado la reducción de Cr(VI) fue de alrededor del 80 %.

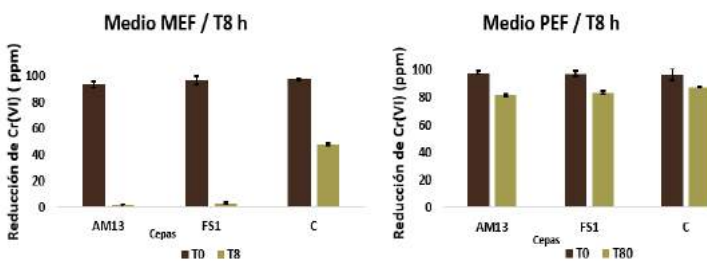


Figura 10. Comparación de reducción de 100 ppm de Cr (VI) / 8h en medios MEF y PEF por cepas *B. cereus* AM13, FS1 y un control no inoculado (c).

Las barras café indican la reducción a tiempo 0, y las verdes a tiempo 8h Los resultados fueron graficados como el promedio de tres experimentos independientes hechos por triplicado \pm DE

Viabilidad celular de las cepas *B. cereus* AM13 y FS1 incubadas en presencia de Cr(VI).

Se realizaron ensayos de viabilidad celular frente a diferentes concentraciones de Cr(VI) para verificar si las cepas AM13 y FS1 tienen una sensibilidad similar o diferente al Cr(VI) y de esta forma determinar si la pérdida de función del regulador PlcR afecta la tolerancia al oxianión en *B. cereus*. Como se muestra en la Figura 11, la viabilidad celular se reduce drásticamente cuando las cepas AM13 y FS1 se exponen a Cr(VI); sin embargo, dado que en ausencia de Cr(VI) la cepa mutante crece mas lento y, por lo tanto, produce menos células, parece ser que al exponer a las cepas a la presencia de Cr(VI) la disminución en la viabilidad de la cepa mutante es menos acusada, lo que sugeriría que la cepa mutante es mas tolerante a Cr(VI) que la cepa silvestre. Este aspecto es de interés y deberá ser abordado con mas detalle en trabajo futuro.

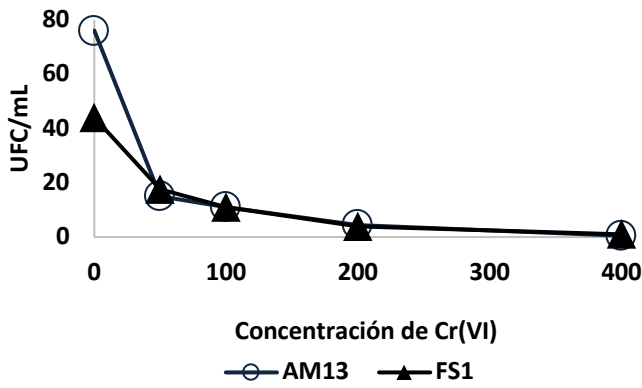


Figura 11. Viabilidad celular de las cepas *B. cereus* AM13 y FS1 incubadas 3h en medio MEF en presencia de distintas concentraciones de Cr(VI) .

Representada AM13 por \circ y FS1 por \blacktriangle a concentraciones de 0,50, 100,200 y 400 ppm de Cr (VI). Los resultados fueron graficados como el promedio de tres experimentos independientes hechos por triplicado +D.E.

Decoloración Remoción del colorante triazoico Black 2-10 en cultivos de las cepas AM13 y FS1 realizados en medio MEF Y PEF de cultivo líquido
Se realizaron ensayos de remoción de diferentes concentraciones del colorante triazoico Black 2-10 con las cepas AM13 y FS1 cultivadas en los medios MEF y PEF, tomando muestras al tiempo 0 y a las 3h de incubación.

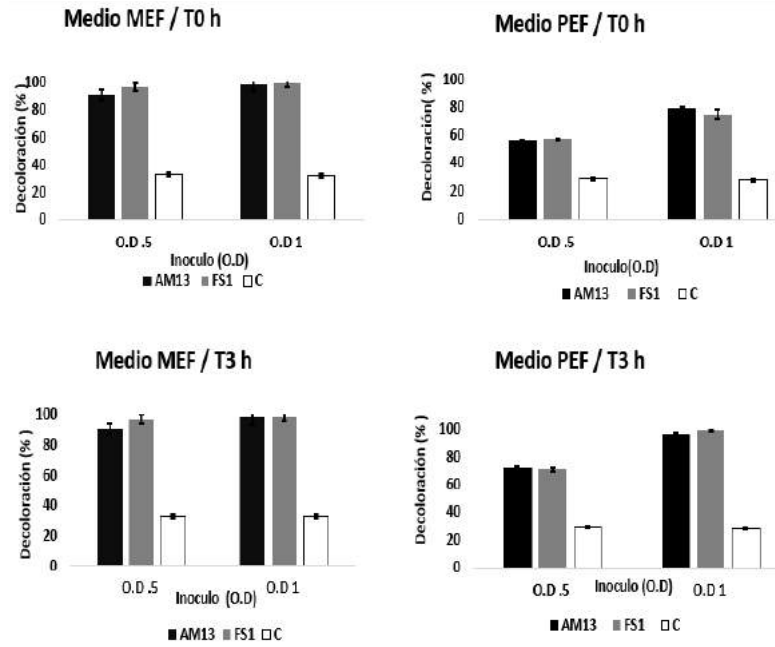


Figura 12. Comparación de reducción de 100 ppm de Cr (VI) / 8h en medios MEF y PEF por cepas *B. cereus* AM13, FS1 y un control no inoculado (c).

Las barras café indican la reducción a tiempo 0, y las verdes a tiempo 8h Los resultados fueron graficados como el promedio de tres experimentos independientes hechos por triplicado \pm DE

La Figura 12 muestra los resultados obtenidos, en los que se observa que en medio MEF la decoloración con las dos cepas bacterinas es similarmente alta ($> 85\%$), tanto a tiempo cero (T0) como a las 3 h de incubación (Fig 13A, A'). También, se puede observar que la decoloración es similar en las dos cepas AM13 y FS1 en distintas concentraciones de inculo bacteriano (D.O (0.5 , 1.0) y que la decoloración en el control de medio no inoculado es de alrededor del 30% en ambos tiempos incubación.

Por otro lado, se puede apreciar que en medio PEF T0 la decoloración es menor que en el medio MEF; sin embargo, a las 3 horas y con un inóculo de una D.O de 1 la decoloración alcanza una capacidad de más del 90% con las dos cepas bacterianas, mientras que el control de medio no inoculado muestra una decoloración similar (alrededor del 30 %) a la del control del medio MEF no inoculado en ambos tiempos de incubación (Fig. 13 B, B').

Al aumentar la concentración de Black 2-10 a 200 ppm en medio MEF la decoloración es ligeramente menor en el T0 (alrededor del 80 %) cuando el inóculo es menor (D.O. 0.5) que cuando este es mayor (D.O. 1.0) (decoloración de alrededor del 95 %) (Fig. 13A). Cuando la incubación es por 3 , la decoloración es alta (alrededor del 95 %) tanto con inóculo bajo (D.O. 0.5) y alto (D.O.1.0) (Fig. 13 A'); en estas condiciones la decoloración en el control de medio no inoculado es alrededor del 20 % (Fig. 13A, A').

Por otra parte, en medio PEF con 200 ppm del colorante Black 2-10 la decoloración a T0 es menor al 60% con inóculo bajo (D.O 0.05), en comparación con el inóculo más alto (D.O. 1.0), en el que la decoloración fue cercana al 80% (Fig. 13B). En la incubación por 3 h la

decoloración fue mas baja con un inóculo bajo (alrededor del 75 %) que con un inóculo alto (alrededor del 90 %) (Fig 13B'). En el control de medio no inoculado la decoloración fué alrededor del 25%. (Fig. 13B, B').

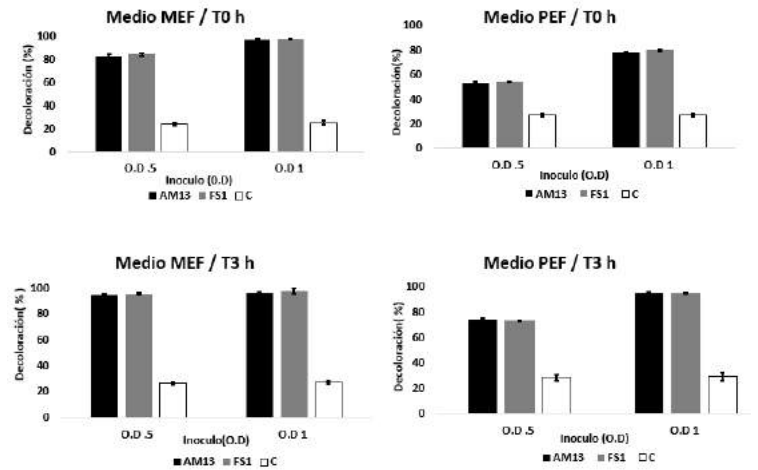


Figura 13 .Decoloración de Black 2-10 (200 ppm) por cepas *B. cereus* AM13 y FS1 incubadas en medios MEF y PEF, en función del inóculo y el tiempo de incubación. Los gráficos representados con letra A y A' se refieren a los ensayos realizados en medio MEF al tiempo 0 y 3h, respectivamente, y los gráficos representados con B y B' se refieren a los ensayos realizados en medio PEF al tiempo 0 y 3h respectivamente. Las barras en color negro indican la decoloración por la cepa AM13, las barras de color gris indican la decoloración por la cepa FS1 y las barras blancas indican la decoloración en el control de medio no inoculado. Los resultados fueron graficados

como el promedio de tres experimentos independientes hechos por triplicado +D.E

Debido a que se observó una buena eficiencia de decoloración en medio MEF que contenía 200 ppm de Black 2-10, se decidió analizar el grado de decoloración en medio con 500 ppm del colorante

Se observó que en medio MEF en el T0 en medio con bajo inóculo (D.O. 0.05) la decoloración fue mas baja (alrededor del 80%) que en medio con alto inóculo (D.O. 1.0), en el que la decoloración fue de alrededor del 95 % (Fig. 14A). En estas condiciones en el control del medio no inoculado se observó una decoloración cercana al 15%. Por otra parte, a las 3h de incubación la decoloración fue cercana al 90 % con los dos tipos de inóculo. En estas condiciones en el control del medio no inoculado se observó una decoloración cercana al 20%.

(Fig. 14A'). Por otro lado en los ensayos en medio PEF en el T0 en medio con bajo inóculo (D.O. 0.5 la decoloración fue más baja (alrededor del 45%) que en medio con alto inóculo (D.O. 1.0), en el que la decoloración fue de alrededor del 75 % (Fig. 14B). En estas condiciones en el control del medio no inoculado se observó una decoloración cercana al 10%. En las incubaciones por 3h la decoloración con el inóculo bajo

fue cercana al 45 %, en tanto que en las condiciones de inóculo alto la decoloración fue cercana al 90. En estas condiciones en el control del medio no inoculado se observó una decoloración cercana al 15%. (Fig. 14B').

Se pudo apreciar que las cepas AM13 y FS1 la decoloración del compuesto Black 2-10 fue similar en los medios MEF y PEF, lo que indica que la mutación de delección del gen *plcR* presente en la cepa FS1 no afecta la capacidad de remoción del colorante mencionado. El hecho de que a tiempo cero ocurra una alta remoción del colorante sugiere la posibilidad de que parte del mecanismo de remoción involucre la bioadsorción.

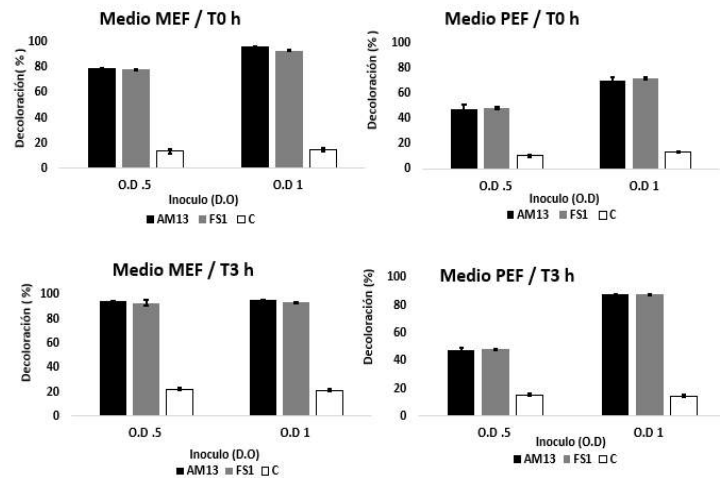


Figura 14 . Decoloración de Black 2-10 (500 ppm) por cepas *B. cereus* AM13 y FS1 incubadas en medios MEF y PEF, en función del inóculo y el tiempo de incubación.

Los gráficos representados con letra A y A' se refieren a los ensayos realizados en medio MEF al tiempo 0 y 3h respectivamente y los gráficos representados con B y B' se refieren a los ensayos realizados en medio PEF al tiempo 0 y 3h respectivamente.

En base a los resultados anteriores, se realizó la comparación de la capacidad óptima de remoción del colorante Black 2-10 por las cepas AM13 y FS1 incubadas en los medios MEF y PEF. Las condiciones para la manifestación de capacidades óptimas de decoloración incluyen la mayor concentración de colorante (500 ppm), el inóculo más alto (1%) y el tiempo de incubación (T0). Los resultados de la comparación referida se muestran en la Fig. 15. Se observa que las dos cepas tienen una decoloración similar en medio MEF a tiempo 0, llegando casi al 97% de decoloración, mientras que en medio PEF la decoloración máxima es menor al 80% con ambas cepas. En el control de medio no inoculado la remoción del colorante en ambos medios es baja, de alrededor del 15%

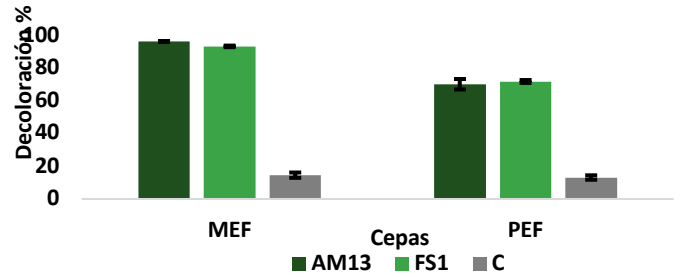


Figura 15. Comparación de la capacidad óptima de remoción del colorante Black 2-10 (500 ppm) de las cepas *B. cereus* AM13 y FS1, incubadas en los medios de cultivo MEF o PEF.

Decoloración de Black 2-10 con células de *B. cereus* AM13 y FS1 inactivadas por calor y sobrenadante de medio MEF.

Debido al alto % de decoloración en T0 y a que la pastilla bacteriana adquiere un color negro, se presume que podía ser un fenómeno de biosorción por lo cual se realiza el ensayo de decoloración con biomasa inactivada por calor de las cepas de *B. cereus* AM13 Y FS1 y otro de decoloración con el sobrenadante del medio, presumiéndose entonces que este pudiera ser un proceso biotico-abiotico (Figura 16).

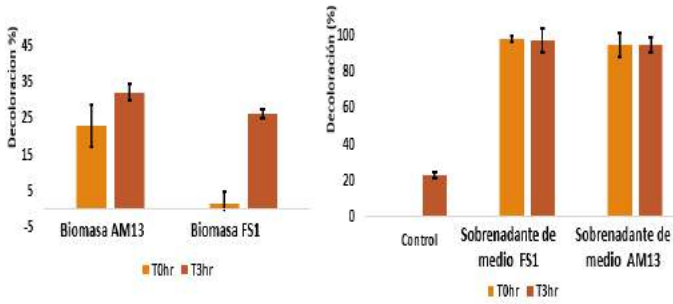


Figura 15. Ensayo de decoloración con biomasa inactivada por calor de las cepas de *B.cereus* AM13 y FS1 y otro de decoloración con el sobrenadante del medio en tiempo de incubación de 3h . En color anaranjado el tiempo 0 y en color café el tiempo a las 3h de incubación de ambas cepas.

En el resultado anterior se puede observar que la biomasa de las dos cepas de *B. cereus* AM13 y FS1 es capaz de bioabsorber un porcentaje de colorante Black 2-10 siendo más eficiente en desde tiempo 0 la cepa AM13 y FS1 aumentando su eficiencia de biosorción a las 3h alrededor de un 20%. Por otra parte, en los ensayos con sobrenadante recuperado del cultivo celular de ambas cepas, se puede observar que el control a las 3h decolora menos del 30%, mientras que ambos sobrenadantes de cultivo celular de AM13 y FS1 son capaces de decolorar más del 95% desde T0 manteniendo esta decoloración a las 3h.

De manera adicional se realiza un análisis de costo 1 L de medio de cultivo en donde como resultado obtenemos que el medio de cultivo que representa mayor eficiencia para ensayos de biorremediación también es el más barato. (No por mucho dinero, pero a gran escala este si representa un valor más grande) (Tabla 1)

Tabla 1. Análisis de costo de 1L de medio de cultivo económico MEF y PEF

Costo de medio de cultivo (1L)	
MEF	PEF
\$9.42	\$9.67

CONCLUSIONES

La cepa FS1 resistente a neomicina esta deletada en el gen *plcR*. Esta alteración en la cepa le confiere a la cepa un crecimiento ligeramente más lento y resistencia parcial a Cr(VI)

El proceso de reducción de Cr(VI) por la cepa AM13 es un proceso biótico-abiótico el cual ocurre de manera mas eficiente en medio MEF el cual esta constituido por 1% de fuente de carbono, 1% de extracto de levadura y 0.3% de fertilizante.

De las fuentes de carbono económicas probadas, la melaza presenta una mayor eficiencia reducción de Cr(VI) y colorante triazoico Black 2-10 por las cepas *B. cereus* AM13 y FS1, en comparación con el piloncillo como fuente de carbono; aparentemente, esto se debe a que el crecimiento es mejor en presencia de melaza y podría ser que se estén produciendo metabolitos en el medio que ayuden a la remoción de los contaminantes anteriormente mencionados.

Las cepas AM13 y FSI muestran una capacidad similar para eliminar Cr (VI) y el colorante triazoico Black 2-10, lo que indica que la eliminación del gen *plcR* no afecta estas capacidades.

El costo de 1 L de medio de cultivo es ligeramente menor en el medio MEF en comparación con el medio PEF.

BIBLIOGRAFÍA

Ackerley, D. F.; Barak, Y.; Lynch, S. V.; Curtin, J.,
Matin, A. (2006). Effect of Chromate Stress on
Escherichia coli K-12. *Journal of*
bacteriology. 188 (9): 3371-3381.

Agaisse, H., Gominet, M., Økstad, O. A., Kolstø, A. B.,
Lereclus, D. (1999). *PlcR* is a pleiotropic
regulator of extracellular virulence factor gene

expression in *Bacillus thuringiensis*. *Molecular*
microbiology. 32(5): 1043-1053.

Aguilar, C., Aislamiento y caracterización de hongos
resistentes a cromo(VI) con capacidades de
remoción en solución acuosa. . *Tesis de*
licenciatura. Ingeniería Bioquímica. Instituto
Tecnológico de Durango. México 2011.

Aguilar, J., Espinoza, M., Cabanillas, J., Ávila, I., García,
A., Julca, J., Linares, G. (2015). Evaluación de la
cinética de crecimiento de *saccharomyces*
cerevisiae utilizando un medio de cultivo a base de
melaza de caña y suero lácteo. *Agroindustrial*
Science. 5(1): 37-47.

Aljamali N. M. (2015). Review in azo compounds and its
biological activity. *Biochem Anal Biochem*, 4(2):
pp. 1-4.

Álvarez, N., Wong, A., Muñiz, D., Aguilar, P. (2019).
Análisis Nutricional del Piloncillo de caña de
azúcar elaborado en el Instituto Tecnológico de
Ciudad Valles, *Revista Teczapic*. 5(2):12- 16.

Anderson RA. 1989. Essentiality of chromium in
humans. *Sci Total Environ*, 86 (1-2), 75 81.

ATSDR, Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro
de Enfermedades. (2013)

- Barrios, L., Gaviria, L., Agudelo, A., Cardona, S.A (2015). Technologies for the removal of dyes and pigments present in wastewater. *DYNA*. 82:118-126.
- Belay A. (2010). Impacts of chromium from tannery effluent and evaluation of alternative treatment options. *Journal of Environmental Protection* 1:53-58.
- Borst-Pauwels, G. W. F. H. (1981), Ion Transport in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*. 650 (2-3): 88-127.
- Brown, S.,Thompson, M., VerBerkmoes, N., Chourey, K., Shah, M., Zhou, J.,Hettich, R., Thompson, D. (2006). Molecular Dynamics of the *Shewanella oneidensis* Response to Chromate Stress. *Molecular & Cellular Proteomics*.5 (6):1054-1071.
- Camargo FA, Okeke BC, Bento FM, y Frankenberger WT. 2004. Hexavalent chromium reduction by immobilized cells and the cell-free extract of *Bacillus* sp. ES 29. *Bioremed J*, 8(1-2):23-30.
- Cervantes, C., Campos, J., Devars, S., Gutierrez, F., Loza, H., Torres, J., Moreno, R.(2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS microbiology reviews*. 25 (3): 335-47.
- Cervantes, C., Silver, S. (1992). Plasmid chromate resistance and chromate reduction. *Plasmid*. 27 (1): 65-71.
- Çetin, D., Dönmez, S., Dönmez, G. (2008). The treatment of textile wastewater including chromium(VI) and reactive dye by sulfate-reducing bacterial enrichment. *Journal of Environmental Management*. 88 (1): 76-82.
- Chandhuru, J., Harshitha, S., Sujitha, K.,Kumar, D. M. (2012). Isolation of chromium resistant *Bacillus* sp. MRKV and reduction of hexavalent chromium potassium dichromate. *J Acad Indus Res*. 1 (6): 317-319.
- Chavez Elias, (2015). Caracterización de cepas bacterianas nativas de residuos industriales con alto contenido de metales. Universidad de Guanajuato, Gto.
- Chequer, F., Rodriguez, G., Anastácio, E., Carvalho, J., Boldrin, M. Palma, D. (2013). Textile Dyes: Dyeing Process and Environmental Impact. *In: Eco-Friendly Textile Dyeing and Finishing*. Ed. Melih Gunay Intech, Rijeka, Croatia, 151-176.

- 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): 8-1.
- Copaciu F., Opreș O., Niinemets Ü., y Copolovici L. (2016). Toxic influence of key organic soil pollutants on the total flavonoid content in wheat leaves. *Water, Air, & Soil Pollution*, 227(6):pp. 196.
- Coreño, A. (2009). Caracterización del sistema de reducción de Cr(VI) de la cepa Ed8 de *Aspergillus niger* resistente a cromato. Tesis de Doctorado. Posgrado en Biología Experimental, Universidad de Guanajuato.
- De la Broise , D., Dauer, G., Gildber, A., Guerard, F. (1988). Evidence of positive effect of peptone hydrolysis rate on *Escherichia coli* culture kinetics. *Journal of Marine Biotechnology*. 6:111-115.
- De Lima R., Bazo A., Salvadori D., Rech C., de Palma Oliveira D., & de Aragão Umbuzeiro G. (2007). Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing plant effluent that impacts a drinking water source. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 626(1):pp.53-60.
- Donati, E., Oliver, C., Curutchet, G. (2003). Reduction of chromium (VI) by the indirect action of *Thiobacillus thioparus*. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 20 (1): 69-73.
- Drobniewski, F. A. (1993). *Bacillus cereus* and related species. *Clin. Microbiol. Rev.*6:324–338.
- Easterday WR, VanErt M.N, Simonson TS, Wagner DM., Kenefic LJ y col. 2005. Use of single nucleotide polymorphisms in the *plcR* gene for specific identification of *Bacillus anthracis*. *J Clin Microbiol*, 43, 1995–1997.
- Ehrlich, P. R., Ehrlich, A. H.,(1990) The population explosion. Simon and Schuster New York
- Ercal, N., Gurer-Orhan, H., Aykin-Burns, N. (2001). Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage. *Current topics in medicinal chemistry*. 1(6): 529-39.
- Estrada, A. (2017). Estudio del Escalamiento de un Proceso Biotecnológico para la Reducción de Cr(VI) a Cr(III) en Efluentes Industriales. Tesis de

- Licenciatura, carrera de Ingeniería Química, DCNE, Universidad de Guanajuato
- Fajardo, C., Sarmiento, F. (2007). *Evaluación de la melaza de caña como sustrato para la producción de Saccharomyces cerevisiae*. Facultad de ciencias, Universidad Javeriana.
- Farag, S., Zaki, S. (2010), Identification of bacterial strains from tannery effluent and reduction of hexavalent chromium.
- Gohar, M., Faegri, K., Perchat, S., Ravnum, S., Økstad, O. A., Gominet, M., Lereclus, D. (2008). The PlcR virulence regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS one*. 3(7): e2793.
- He M, Li X, Guo L, Miller S, Rensing C y col. 2010. Characterization and genomic analysis of chromate resistant and reducing *Bacillus cereus* strain SJ1. *BMC Microbiol*, 10: 221.
- Holzman, D.C. (2012). Accounting for Nature's Benefits: The Dollar Value of Ecosystem Services. *Environmental Health Perspectives* 120:152-a157.
- Honing, P. (1974) Principios de la tecnología azucarera. *Compañía Editorial México*. (2): 23-54.
- Hwang J, y Park J. 2015. Characteristics of enterotoxin distribution, hemolysis, lecithinase, and starch hydrolysis of *Bacillus cereus* isolated from infant formulas and ready-to-eat foods. *J Dairy Sci*, 98:1652–1660
- ICONTEC, C. T. (1994). Norma Técnica Colombiana número 813 de 1994. *Normas Oficiales para la Calidad de Agua potable, por el cual se establecen los requisitos físicos, químicos y microbiológicos que debe cumplir el agua potable*. Bogotá DC: ICONTEC.
- Kamaludeen S., Megharaj M., Juhasz A, Sethunathan N, y Naidu R. 2003. Chromium microorganism interactions in soils: remediation implications. *Rev Environ Contam Toxicol*, 178: 93-164
- Khan, R., Bhawana, P., & Fulekar, M. H. (2013). Microbial decolorization and degradation of synthetic dyes: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 12(1):pp. 75-97.
- Ksheminska H, Fedorovych D, Babyak L, Yanovych D, Kaszycki P, y Koloczek H. 2005. Chromium(III) and (VI) tolerance and bioaccumulation in yeast: a survey of cellular chromium content in selected strains of representative genera. *Process Biochem*,

- 40 (5), 1565-1572.
- Liu, W., Liu, C., Liu, L., You, Y., Jiang, J., Zhou, Z., Dong, Z. (2017). Simultaneous decolorization of sulfonated azo dyes and reduction of hexavalent chromium under high salt condition by a newly isolated salt-tolerant strain *Bacillus circulans* BWL1061. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 141:9-16.
- Longoria Vázquez Fernando Daniel. 2018. Cepas bacterianas tolerantes a cromo aisladas de residuos industriales: identificación y caracterización respecto de la presencia de plásmidos y de determinantes de resistencia a Cr (VI). Tesis de licenciatura. Biología Experimental. Universidad de Guanajuato. México
- López C., Moreira M., Feijoo G. & Lema J. (2006). Tecnologías para el tratamiento de efluentes de industrias textiles. *Afinidad*. 64: pp. 561-573.
- Losi, M. E., Amrhein, C., Frankenberger, W., Jr. (1994), Environmental biochemistry of chromium. *Reviews of environmental contamination and toxicology*. 136: 91-121.
- Mabbett, A., Lloyd, J., Macaskie, L. (2002). Effect of complexing agents on reduction of Cr(VI) by *Desulfovibrio vulgaris* ATCC29579. *Biotechnology and Bioengineering*. 79: 389–397.
- Madhavi, V., Reddy, A., Reddy, K., Madhavi, G., Prasad, T. 2013. *Research Journal of Recent Sciences* 2277, 2502
- Mignot T, Mock M, Robichon D, Landier A, Lereclus D, Fouet A. 2001. The incompatibility between the PlcR- and AtxA- controlled regulons may have selected a non sense mutation in *Bacillus anthracis*. *Mol Microbiol*, 42, 1189– 1198
- Ngwenya N, y Chirwa E. 2011. Biological removal of cationic fission products from nuclear wastewater. *Water Sci Technol*, 63 (1), 124
- NMX-AA-003-1980 Aguas residuales.- Muestreo. Declaratoria de vigencia publicada en el Diario Oficial de la Federación en 25 de marzo de 1980.
- Opperman, D., van Heerden, E. (2008). A membrane-associated protein with Cr(VI)-reducing activity from *Thermus scotoductus* SA-01. *FEMS microbiology letters*. 280 (2): 210-8.
- Ossa, J., Vanegas, M., Badillo, Á. (2010). Evaluación de la melaza de caña como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum*.

- Okeke BC, Bento FM y Frankenberger WT. 2003. In vitro reduction of hexavalent chromium by a cell-free extract of *Bacillus* sp. ES 29 stimulated by Cu^{2+} . *Appl Microbiol Biotechnol*, 62(5-6): 569-73.
- Ramírez, M., Díaz, C., Vargas, E., Riveros, H., Campos, J., Cervantes, C. (2008). Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals*. 21 (3): 321-332.
- Ramírez, A. (2011). Evaluación de la capacidad de reducción de cromo (VI) por *Bacillus cereus*, aislado de aguas residuales de una curtiembre. Trabajo de pregrado no publicado. *Universidad del Valle, Cali, Colombia*.
- Schoeni, J., Lee Wong, A. (2005). *Bacillus cereus* Food Poisoning and Its Toxins. *Journal of Food Protection*. 68:636–648.
- Sezonov G, Joseleau-Petit D., Dari, R. (2007). *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of Bacteriology*. 189:8746-8749.
- Shi X., 2001. In Vivo reduction of chromium (VI) and its related free radical generation. *Mol Cell Biochem*, 222: 41-47.
- Slamti L, Perchat S, Gominet M, Vilas-Bôas G, Fouet A, Mock M, Sanchis V, Chaufaux J, Gohar M y Lereclus D. 2004. Distinct mutations in *PlcR* explain why some strains of *Bacillus cereus* group are non-hemolytic. *J Bacteriol*, 186: 3531–3538.
- Somasundaram, V., Philip, L., Bhallamudi, S. (2009), Experimental and mathematical modeling studies on Cr(VI) reduction by CRB, SRB and IRB, individually and in combination. *Journal of hazardous materials*. 172 (2-3):606-17.
- Srinath T, Verma T, Ramteke PW, Garg SK. 2002. Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. *Chemosphere*. 48 (4), 427-35
- Swan, H., Karalazos, A. (1990). Las melazas y sus derivados. España. *Revista Tecnológica Geplacea*. (19):78-82
- Tahri, N., Bahafid, W., Sayel, H., Ananou, S., El Ghachtouli, N. (2014), Hexavalent chromium removal by a novel *Serratia proteamaculans* isolated from the bank of Sebou River (Morocco). *Environ Sci Pollut Res* 21 (4), 3060-307
- Tallent S., Rhodehamel J, Harmon M., Bennett R., 1998. BAM: *Bacillus cereus*. Bacteriological Analytical

Manual. 8th ed. Silver Spring: *US Food and Drug Administration*.

and Soil 2003, 249 (1), 139-156.

Tripathi, M.; Garg, S. K., Co-remediation of pentachlorophenol and Cr⁶⁺ by free and immobilized cells of native *Bacillus cereus* isolate: Spectrometric characterization of PCP dechlorination products, bioreactor trial and chromate reductase activity. *Process Biochemistry* 2013, 48 (3), 496-509.

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

Volesky, B., May-Phillips, H. (1995). Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied microbiology and biotechnology*. 42 (5): 797-806.

Wan, W., Hanafiah, M. (2008). Removal of heavy metal ions from wastewater by chemically modified plant wastes as adsorbents: a review. *Bioresource Technology*. 99:3935–3948.

Zayed, A.; Terry, N., Chromium in the environment: factors affecting biological remediation. *Plant*