

UNIENDO LAS FUERZAS CONTRA EL CROMO: LA ACCIÓN SINÉRGICA ENTRE DOS CONSORCIOS BACTERIANOS

Sara Lucía Toscano-Alaniz^{a*}, Mónica Jaquelina Martínez-Ramírez^a, Paola A. Martínez-Aldape^{a,b}, Sandra Ixmucamé Concha Guerrero^c, Ramon E. Martínez-Ramírez^a, César Augusto Caretta^d, Remy Guyoneaud^b, Erasmo Orrantia Borunda^e, Elcia Margareth Souza Brito^a

^a Dept Ing. Civil y Ambiental, DI, Campus Guanajuato, U. Guanajuato, Guanajuato, Gto., 36050, MÉXICO. sl.toscanoalaniz@ugto.mx; ^b Equipe Environnement et Microbiologie, UMR5254 –IBEAS, U. Pau et des Pays de L'Adour, PAU cedex, FRANCIA; ^c Dept. Ingeniería. U. Iberoamericana León, León, MÉXICO ^d Dept Astronomía. DCNE, Campus Guanajuato, U. Guanajuato, Guanajuato, Gto., 36050, MÉXICO. ^e Centro de Inv. Materiales Avanzados, CIMAV, Depto. de Medio Ambiente y Energía, Chihuahua, MÉXICO

Resumen (250 palabras máximo)

En la bioprospección bacteriana de los residuos industriales de una empresa procesadora de cromina se logró obtener dos consorcios bacterianos, los cuales fueron nombrados C33 y C55, con resistencia al cromo hexavalente [Cr (VI)] hasta 400 y 800 mg.L⁻¹, respectivamente. Se determinó para estos consorcios las condiciones optimizadas de crecimiento y sus habilidades para disminuir el ion cromato del medio; el C55 resultó ser mucho más eficiente que el C33, logrando disminuir el Cr (VI) hasta 400 mg.L⁻¹. Por otro lado, el C33 crece en biopelículas, una característica óptima para cuando se desea trabajar en un reactor de lecho fijo. En el intento de mejorar la eficiencia en disminuir el Cr (VI) del medio del consorcio C55, se mezclaron estos dos consorcios en diferentes proporciones (1:1 y 2:1 y 1:2) y se expusieron a diferentes concentraciones del Cr (VI). Se observó que: (a) la mezcla con mejores resultados era aquella con una mayor proporción del consorcio C55; (b) a 50 mg.L⁻¹ la disminución del Cr (VI) es muy similar entre los consorcios y sus mezclas; (c) a concentraciones mayores [100 y 200 mg.L⁻¹ Cr (VI)] el C55 logra reducir el Cr (VI) más eficientemente, seguido por la mezcla 2:1 (55:33); (d) el C33 no reduce el Cr (VI) a concentraciones muy elevadas (300 mg.L⁻¹). Probablemente el aumento de la habilidad en disminuir el Cr (VI) del medio observado en las mezclas fue debido a una acción sinérgica entre los microorganismos de los consorcios C33 y C55.

Introducción

Aparentemente la vida es omnipresente en el planeta Tierra y, aún bajo condiciones muy extremas, es posible encontrar una variedad de microorganismos activos metabólicamente. En México, se puede citar como ejemplo de ambientes extremos los lagos halo-alcalófilos [1], los sitios geotermales [2, 3], los estromatolitos [1], los varios sitios contaminados por metales y metaloides [4, 5, 6], entre otros. Las condiciones ambientales extremas encontradas en estos sitios posibilitan la selección natural de poblaciones bacterianas con características fisiológicas y metabólicas que las posibilitan sobrevivir bajo el estrés ambiental del sitio en que se encuentran. Así que, en los últimos años, ha aumentado el interés en la bioprospección de estos sitios en la búsqueda de dichos microorganismos extremófilos [7]. Una posible aplicación biotecnológica de estos microorganismos es en la mitigación de ambientes contaminados por metales pesados (MP).

MP es un término genérico que engloba varios elementos con densidad específica mayor que 5 g/cm³, aunque existan diversas excepciones a esta regla [8]. Pueden existir en varios estados de oxidación, en diferentes grados de reactividad, de carga iónica y solubilidad. En el presente trabajo damos destaque entre los MP al Cromo, el cual es un metal de transición que pertenece al grupo VIB de la tabla periódica. Tiene varios estados de oxidación que van del -II al +VI, de los cuales, las formas trivalente y hexavalente [Cr (III) y Cr (VI)] son las más importantes debido sus amplias aplicaciones en la industria

y debido a la toxicidad. Por ejemplo, el Cr (VI) es un fuerte oxidante, es muy soluble en agua y permeable a membranas celulares, características que lo torna muy tóxico y mutagénico. En México, el Cr (VI) es considerado un residuo peligroso por la Norma Oficial Mexicana [9] y, aunque haya varias técnicas para tratar estos residuos, suelen ser procesos caros y no consiguen reducir la concentración de los MP a los límites inferiores permitidos por la legislación. Mucha atención ha sido dada a las biotecnologías emergentes consideradas como “limpias” y amigables con el medio ambiente.

En la búsqueda de un posible bioproceso para la mitigación del Cr (VI) estuvimos prospectando los residuos industriales de una empresa procesadora del mineral cromita, ubicada en el Estado de Guanajuato [4, 5]. Varias bacterias y consorcios bacterianos fueron obtenidos, entre los cuales se destacaron los consorcios C33 y el C55 por su elevada resistencia al ion cromato. Aquí estamos trabajando bajo la hipótesis de que la mezcla de estos dos consorcios puede formar un nuevo consorcio cuyas habilidades de disminuir el Cr (VI) del medio serían mejoradas. Así que, el principal objetivo de este trabajo es probar diferentes mezclas de los consorcios C55 y C33 y verificar el comportamiento de estas mezclas en disminuir el Cr (VI) del medio comparando con los consorcios originales.

Metodología

Obtención de los inóculos: Los inóculos de los consorcios originales (C33 y C55) fueron obtenidos desde los residuos industriales de la empresa QCM por Sandoval-Vergara [10], quien también obtuvo las condiciones óptimas de crecimiento para estos. Estos cultivos fueron recuperados en medio LB-modificado (LB-M): el C55 con pH 8 y 2% NaCl y el C33 con pH 7 y 4% NaCl. Una vez con la biomasa, se centrifugó (8000 rpm/5 min.) y se contaron las células en cámara de Neubauer. Estos cultivos fueron observados en microscopio óptico de campo claro (MOCC, Zeiss Primo Star), tanto a fresco como en tinción. También se tomaron alícuotas para su observación por microscopía electrónica de barrido (MEB).

Habilidad en formar biofilm: La primera etapa en la formación de un biofilm es la adhesión de las células a una superficie, así que se verificó la habilidad de las células de los consorcios en adherirse a las placas *microtiter* (de poliestireno de 96 pocillos, *Micro Test™ Thermo Scientific Nunclon Delta Surface*). Se adicionó a cada pocillo 200 μL de Medio LB-M inoculado con 10^9 células. mL^{-1} , y con diferentes concentraciones de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (cero, 50, 100, 200 o 400 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Se incubaron las placas en condiciones estáticas a 37°C durante 4 horas. Después de la incubación, los medios de cultivo fueron aspirados, los pocillos lavados con agua destilada estéril, se añadió 100 μL de metanol (99%) y se guardó 15 minutos, para fijar el biofilm. A continuación, se añadieron 100 μL de cristal violeta (0.5%) y se dejó incubando durante 30 min. Luego, se lavó la placa con agua corriente para retirar el exceso de colorante, y se le adicionó 150 μL de ácido acético (33%). Finalmente, se midió la densidad óptica de cada pocillo a una λ 630 nm (DO_{630}) utilizando una microplaca Elisa (*Microplate Reader*, HBS-1101). Todos los ensayos fueron realizados por triplicado.

Preparación de muestras biológicas para MEB: Cultivos frescos de los consorcios fueron centrifugados (3000 rpm por 5 min) y lavados con buffer de fosfatos Millonig pH 7.3. Tras eliminar el sobrenadante, se suspendieron las células en el mismo buffer conteniendo 3% de glutaraldehído, y se mantuvieron a 4°C por 24 h para la fijación de las células. A seguir, estas fueron filtradas en membranas de policarbonato (0.22 μm , Millipore®) y deshidratadas en etanol (30, 50, 70, 90 y 100%) por 5 min. Después de la deshidratación, las muestras se colocaron sobre un soporte metálico y se recubrieron de

un baño con oro (*Denton Vacuum Desk II*) y se observaron en MEB (JEOL JSM7401F operado a 5 kV con un detector de electrones secundarios).

Preparación sistemas en Bach: Sistemas en *bach* conteniendo 5 mL de LB-M fueron inoculados con 10^8 células.mL⁻¹ en las siguientes mezclas: 1:0, 0:1, 1:1, 2:1 y 1:2 (C55:C33). Inmediatamente tras la adición de los inóculos se les adicionaba la solución de K₂Cr₂O₇ estéril. Estos sistemas se realizaron en triplicado y las concentraciones de Cr (VI) probadas fueron de 50, 100, 200 y 300 mg.L⁻¹. Se acompañó el crecimiento bacteriano por medio del aumento de la turbiedad del medio de cultivo (DO₆₃₀) utilizando un espectrofotómetro (UNICO mod 1100). En el tiempo cero y a cada 24 h, de cada sistema, se tomaban alícuotas de 100 µL (en triplicado) para la determinación del Cr (VI) por medio de la técnica de la difenil-carbazida [11]. Adicionalmente se verificó el desarrollo de biopelículas con cultivos de estas mezclas en microplacas.

Determinación del Cr (VI): La determinación del Cr (VI) se basó en la técnica sugerida por la normatividad mexicana [11], que se describe con brevedad a seguir: La reacción se realiza en tubos de vidrio previamente lavados con agua regia. Primeramente, se les adiciona 4.950 µL de agua destilada, enseguida 1 mL de H₂SO₄ 1M, y después se les adiciona los 100 µL de la muestra. A seguir, se les añade 50 µL de solución de 1,5-difenilcarbazida 0.02M (esta es preparada disuelta en acetona). Se incuba bajo obscuridad, por lo menos, 15 min., y se lee la intensidad del color a una longitud de onda λ540 nm. Para el blanco se utiliza agua destilada, y la cuantificación se infiere por medio de una curva patrón.

Resultados

Las colonias observadas en medio LB-sólido presentaban morfologías distintas entre los dos consorcios, pero similares dentro del mismo consorcio (Fig. 1). En el C55 las colonias tenían una forma circular con borde ondulado, con un color entre el naranja y beige, opaco y sin brillo, la textura lisa, con elevación umbilicada y consistencia suave (Fig 1AB). Las colonias del consorcio C33 tenían la forma circular, con borde rizado, color beige con brillo, de textura lisa, elevación convexa y consistencia suave (Fig 1D). Al observar estos consorcios por MOCC ambos presentaban morfología celular de bacilos (Fig 1C y F), pero al exponerlos al Cr (VI) aparecían las morfologías de coco-bacilos, coccus y diplo-coccus. La observación de estos consorcios en MEB pudo confirmar estas variedades de formas (Fig 1 F, G, H). Con la finalidad de conocer la biodiversidad de estos consorcios, los microorganismos fueron separados e identificados. Así que el consorcio C33 está compuesto por, a lo menos, 4 especies bacterianas (*Oceanobacillus profundus*, *Alkalihalobacillus clausii*, *Staphylococcus equorum* y *Staphylococcus saprophyticus*) y el C55 por 2 especies (*Cellulosimicrobium aquatile* y *Oceanobacillus profundus*).

Respecto a la interacción con el Cr (VI), el consorcio C55 mostró resistencia hasta 800 mg.L⁻¹ y el consorcio C33 hasta los 300 mg.L⁻¹, pero con tasas de crecimiento muy bajas en esas concentraciones extremas. La habilidad en crecer formando biopelículas fue inicialmente verificada por medio de la tinción de las células adheridas a microplaca con cristal violeta. Para los cultivos del C33 se coloreó en violeta los pocillos sin cromo, con 50, 100 y 200 mg.L⁻¹, en concentraciones arriba de este valor las bacterias no crecieron en cantidad suficiente para que pudieran adherirse. El C55 el color formado fue similar al control, sugiriendo que este consorcio no posee esta habilidad; sin embargo, como se puede observar en las micrografías de MEB, el C55 forma algo de biopelículas, pero muy poco comparando con el C33 o la mezcla 2:1.

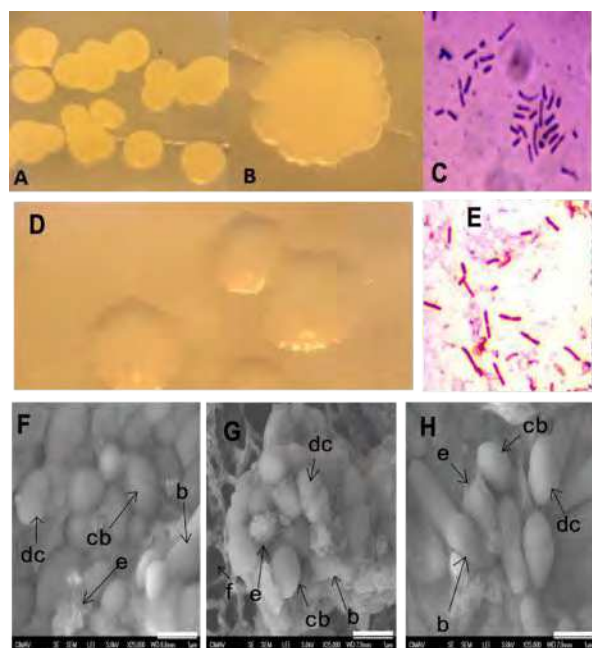


Figura 1.- Morfología de los microorganismos. Primera línea es del consorcio C55: (A) y (B), colonia y (C) tinción gram. Línea central es del consorcio C33: (D), colonia y (E), tinción gram. Línea inferior: MEB del consorcio (F) C55, (G) C33 y (H) 2:1, donde (dc) diblo-cocos, (b) bacilo, (cb) coco-bacilos, (e) exopolisacáridos, (f) detalle del filtro. La barra es de 1 μm y el aumento de 25000X

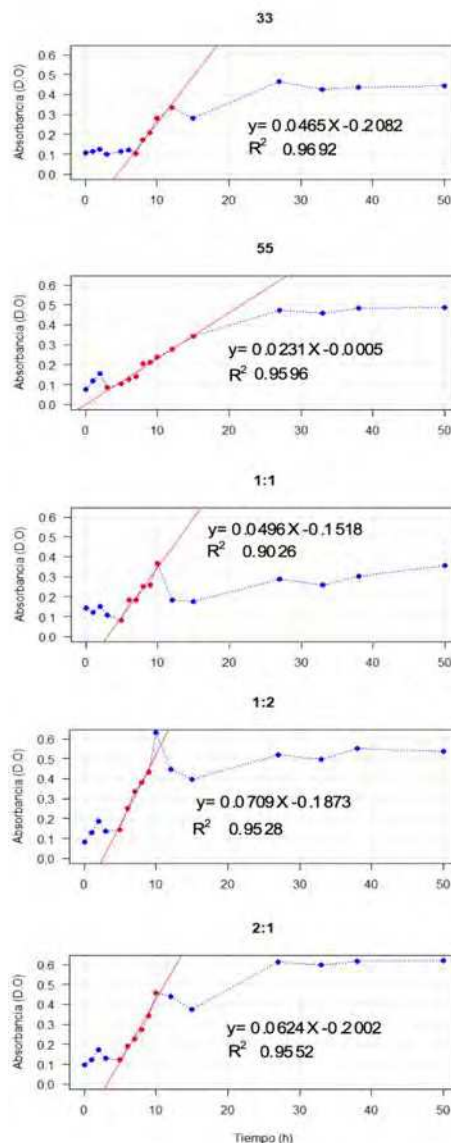


Figura 2. Curva de crecimiento bacteriano

El crecimiento bacteriano de los consorcios en ausencia de Cr (VI) presentó mayor tasa en las mezclas 1:2 y 2:1 (Fig2). El inicio de la fase exponencial del C55 fue a las 5h, pero con crecimiento relativamente lento (con tasa de 2%). El C33 inició la fase exponencial a las 8h, pero con una tasa de crecimiento de 4%. Para las mezclas la fase exponencial se inició también a las 5h llegando rápidamente al máximo a las 10h, con tasas que variaron de 5 a 7%. Este comportamiento sugiere que esté ocurriendo algún tipo de sinergismo positivo entre las poblaciones de los consorcios C33 y C55 favoreciendo al crecimiento de este nuevo consorcio. Posiblemente la habilidad de producir EPS del C33 está ayudando al desarrollo del C55, tanto que en la micrografía de MEB de la mezcla no se observa el predominio de una u otra morfología celular, sugiriendo una relación positiva en dicho consorcio.

A continuación, se adicionó el Cr (VI) a estos cultivos a diferentes concentraciones con el objetivo de verificar si había alguna mejoría en la disminución del ion del medio comparando a los respectivos consorcios (Fig 3).

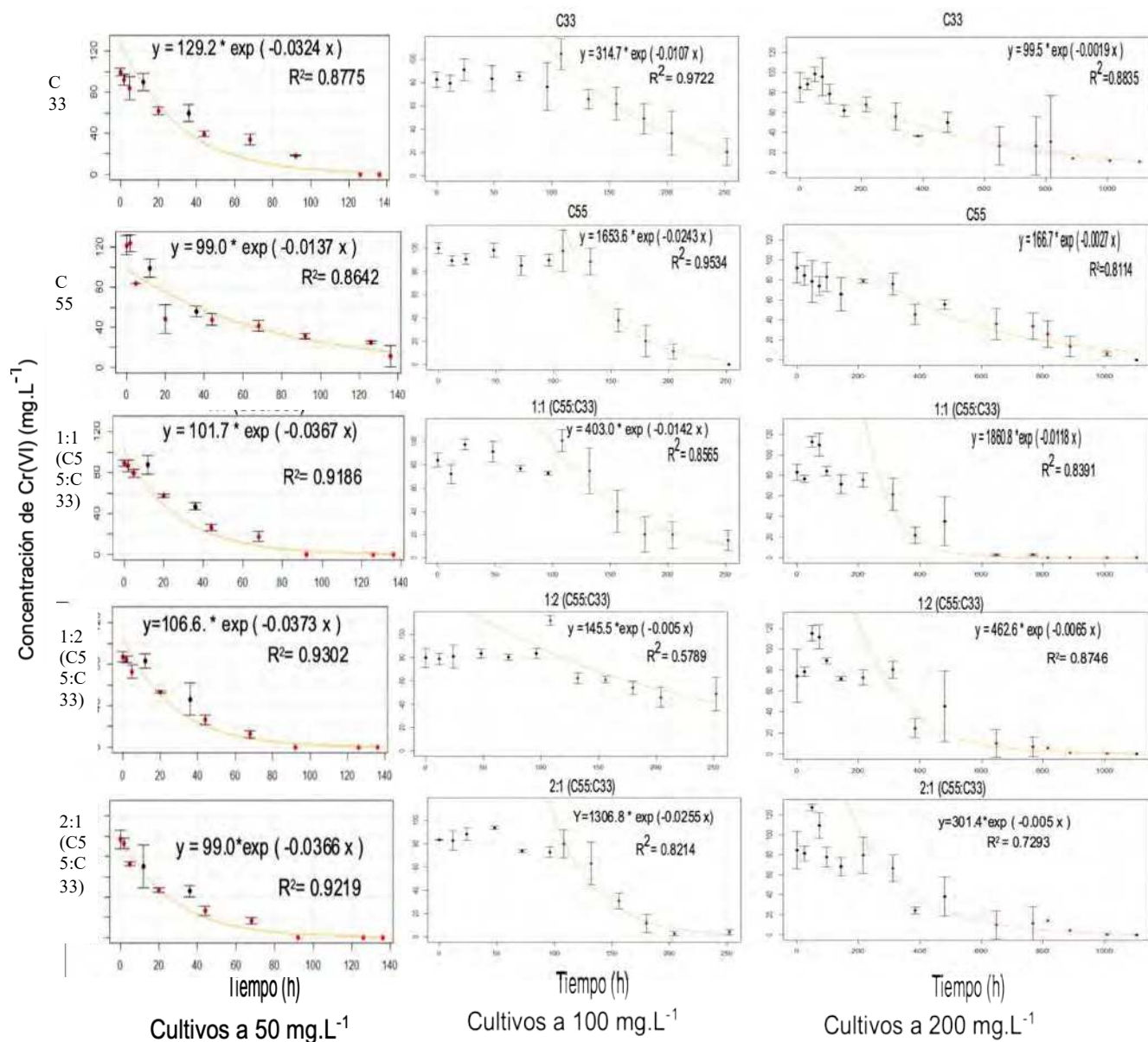


Figura 3: Comportamiento de la disminución del Cr en diferentes concentraciones del Cr(VI) en los diferentes sistemas con el consorcio C33 puro y C55 puro y, sus respectivas mezclas 2:1 y 1:2 (C33:C55)

A la concentración de 50 mg.L⁻¹ tanto los consorcios puros como sus mezclas presentaron desempeños similares en la disminución del Cr (VI) del medio. Entre estos, el C55 fue el de menor eficiencia. Aumentando la concentración a 100 mg.L⁻¹ se observa una disminución del desempeño de C33, mientras mejora la eficiencia del C55. En estos cultivos (a 100 mg.L⁻¹) la disminución del Cr (VI) se inició prácticamente a las 96 h de incubación, siendo notorio que el C55 y la mezcla 2:1 presentaron la mejor eficacia en la disminución del ion del medio. En los cultivos con 200 mg.L⁻¹ de Cr (VI) la disminución del ion del medio se inició a partir de 348h, excepto para el C33 que fue a las 480h. En estos también los mejores desempeños fueron observados para las mezclas, posiblemente como respuesta de un efecto de proto-cooperación entre las poblaciones de los dos consorcios C33 y C55.

Adicionalmente, se observó que cuanto más del consorcio C33 se adiciona más aumenta la presencia de biofilms en los cultivos, incluso se observó que el cultivo únicamente con el C55 no presentaba formación dichos biofilms, pero si en las mezclas. Probablemente el C33, al producir el biofilm, mejora las condiciones para el desarrollo de las poblaciones del C55 y, por consecuencia, el aumento de la cantidad de las poblaciones de ese consorcio, las cuales poseen mayor resistencia y habilidad en disminuir el Cr (VI) del medio. Como los cultivos no fueron inoculados con microorganismos previamente aclimatados, se observa un periodo inicial en que prácticamente no ocurre disminución del ion, o es muy tenue. Este comportamiento es más evidente a concentraciones más elevadas. Como perspectiva de este trabajo, a continuación, se estudiará si la disminución del ion del medio es resultado de una absorción o por transformación extracelular. También se pretende verificar si, a largo plazo, la interacción entre los microorganismos del consorcio C33 con los del C55 continúa siendo benéfica para ambas poblaciones, y cuánto tiempo esta relación perdura.

Conclusiones

La principal conclusión de este trabajo es el resultado sinérgico positivo de la interacción entre las poblaciones de los consorcios C33 y C55: mientras las poblaciones del C33 estimulan la producción de biofilms, que posibilita al mejor desarrollo de las poblaciones del consorcio C55, las poblaciones del C55, estando en mayor proporción, disminuyen más eficientemente el Cr (VI) del medio, mejorando las condiciones del entorno para el desarrollo de ambas comunidades.

Referencias

1. Pérez-Bernal MF, Brito EM, Bartoli M, et al. *Desulfobotulus mexicanus* sp. nov., a novel sulfate-reducing bacterium isolated from the sediment of an alkaline crater lake in Mexico. *Int J Sys Evol Microbiol*, 70(5), 3219-3225, 2020. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004159>
2. Brito EMS, Romero-Núñez VM, Caretta CA et al. The bacterial diversity on steam vents from Parícutín and Sapichu volcanoes. *Extremophiles*, 23(2), 249-263, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00792-019-01078-8>
3. Brito EMS, Rodríguez-Galván M, Hernández-Espino LG et al. Prospecting bacterial consortia from a geothermal site for metals biotransformation. *Biodegradation*, 31(4), 235-247, 2020. <https://doi.org/10.1007/s10532-020-09906-x>
4. Piñón-Castillo HA, Brito EMS, Goñi-Urriza M et al. Hexavalent chromium reduction by bacterial consortia and pure strains from an alkaline industrial effluent. *J Appl Microbiol*, 109(6), 2173-2182, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04849.x>
5. Brito EMS, Piñón-Castillo HA, Guyoneaud R et al. Bacterial biodiversity from anthropogenic extreme environments: a hyper-alkaline and hyper-saline industrial residue contaminated by chromium and iron. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97(1), 369-378, 2013. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-3923-5>
6. Brito EMS, De la Cruz Barrón M, Caretta CA et al. Impact of hydrocarbons, PCBs and heavy metals on bacterial communities in Lerma River, Salamanca, Mexico: investigation of hydrocarbon degradation potential. *Sci Tot Environ*, 521, 1-10, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.098>
7. Brito EMS, Andrade LH, Caretta CA, Duran R. Microorganisms bioprospection: A new tendency in microbial ecology. In *Leading-Edge Environmental Biodegradation Research*. L.E. Pawley eds. Nova Sci Publish, NY, USA, Chapter 6: 167-199, 2007.
8. Duffus JH. Heavy metals a meaningless term? (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem*, 74(5), 793-807, 2002. <https://doi.org/10.1351/pac200274050793>
9. NOM-052-SEMARNAT-2005.
10. Sandoval-Vergara M. Capacidad de una cepa bacteriana aislada de un residuo industrial contaminado por metales pesados para disminuir la concentración de Cr(VI) del medio. Tesis de Maestría en Ciencia del Agua, UGto., (2020). 86pp
11. Norma Mexicana NMX-AA-044-SCFI-2014.