

# Caracterización de un aislado de *Bacillus simplex* nativo de residuos industriales contaminados con cromo hexavalente

Hugo Iván Arrieta Oliva,<sup>1</sup> Manuel de Jesús Aguilar Casas,<sup>1</sup> Alma Rosa Corrales Escobosa,<sup>2</sup> Pamela Romo Rodríguez,<sup>1</sup> Gloria Alicia Figueroa Aguilar,<sup>3</sup> Irving Eduardo Jácome Galarza<sup>3</sup> y Félix Gutiérrez Corona<sup>1\*</sup>

---

## RESUMEN

Los compuestos de Cr se encuentran como contaminantes en suelos, aguas y efluentes industriales, debido a su amplio uso en diferentes procesos industriales. Una bacteria aislada de residuos industriales que contienen Cr(VI) y otros metales se caracterizó e identificó como una cepa de *Bacillus simplex* por análisis de ADN<sub>r</sub> 16S. En comparación con la cepa silvestre 168 de *Bacillus subtilis*, la cepa de *B. simplex* mostró mayor tolerancia a Cr(VI) y alta eficacia para reducir sus niveles en medio LB (Luria Bertani). Los resultados mostraron que la cepa de *B. simplex* redujo 25 µg/mL de Cr(VI) después de 6 horas, 50 µg/mL en 18-24 horas y casi 100 µg/mL en 48 horas. Además, esta cepa de *B. simplex* muestra resistencia a cefalosporinas y es un organismo moderadamente halotolerante. Su alta eficiencia de biotransformación de Cr(VI) aunado a otras características fisiológicas, indican su potencial en la biotecnología ambiental para la limpieza de desechos industriales.

*Palabras clave:* Cr(VI), *Bacillus simplex*, environmental biotechnology.

---

1 Departamento de Biología y 2 Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato. Guanajuato, Gto. Noria Alta s/n, C.P. 36000

3 Laboratorio Estatal de Salud Pública de Michoacán, Secretaría de Salud, Morelia, Mich., C.P.58000

\*Autor para correspondencia. Tel. (473) 732 0006 Ext. 8148 Fax: Ext. 8153 xilefegu@gmail.com

## 1. INTRODUCCIÓN

El cromo es un elemento natural que se encuentra en rocas, plantas, animales, etcétera. Se le puede encontrar en la naturaleza en forma sólida, líquida y gaseosa. Los estados de oxidación más estables del cromo son el trivalente y el hexavalente. El Cr(VI) se asocia con el oxígeno para formar cromatos ( $\text{CrO}_4^{-2}$ ) o dicromatos ( $\text{Cr}_2\text{O}_7^{-2}$ ). Dicho ion es un oxidante fuerte que en presencia de materia orgánica y pH ácido se reduce a Cr(III) (McGrath, 1990; Katz, 1993). Este último se encuentra presente en aguas naturales en forma de iones libres [ $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_6^{+3}$ ], hidroxicomplejos, complejos mono y polinucleares, así como especies aniónicas ( $\text{CrO}^{-2}$ ,  $\text{CrO}_3^{-3}$ ); éste puede ser oxidado a Cr(VI) en presencia de exceso de oxígeno y pH básico. El Cr(VI) es altamente tóxico y provoca serios problemas a la salud, puesto que diversos estudios han demostrado que es genotóxico y carcinogénico, además de inhibir también enzimas y la síntesis del DNA (ATSDR, 2008; Losi, 1994; Gunaratnam, 2008). Una razón adicional para la toxicidad del Cr(VI) es que puede ser incorporado de manera activa a las células por el transportador de sulfato (Markovich y James, 1998). El Cr(III), por su parte, es menos tóxico que el Cr(VI) debido a que es poco soluble a pH fisiológicos y a que no es transportado activamente al interior de las células (Ehrlich, 2002).

Los efectos negativos del cromo hexavalente en organismos vivos están bien documentados (Gruber y Jennette, 1978; Cervantes, 1992). Debido a la alta toxicidad del Cr(VI), la contaminación por este ión debería remediarse tan pronto como fuera detectado. En el proceso de curtiduría se utilizan sales de Cr(III), sin embargo, bajo ciertas condiciones, éste es oxidado a la especie cancerígena Cr(VI) (Richard y Bourg, 1991).

La contribución del Cr(VI) al medio ambiente depende de diversas fuentes, entre ellas las actividades antropogénicas, las cuales han ocasionado desequilibrios en las concentraciones de metales pesados existentes de manera normal en la naturaleza, provocando problemas de contaminación.

Los compuestos de cromo pueden estar presentes como contaminantes ambientales en agua, tierra y efluentes industriales debido a su amplio uso industrial (Papp, 1985).

La tradición artesanal en la elaboración de productos de piel, junto con la disponibilidad de materias primas y mano de obra, han favorecido el desarrollo de la industria de la curtiduría en nuestro país. Actualmente, México se encuentra ubicado entre los diez mayores productores de pieles a nivel internacional, pues genera aproximadamente el 4% de la producción mundial. El estado de Guanajuato es el mayor productor a nivel nacional, ya que genera alrededor del 65% del curtido y acabado de cuero. En la ciudad de León existen más de 500 tenerías y, hasta hace poco, la curtiduría ha constituido la principal actividad económica (INE, 2007).

Relacionadas con esta intensa actividad industrial se han desarrollado otras industrias, como la química de suministros, en particular de sales de cromo, utilizadas en fases específicas del tratamiento de pieles.

En la ciudad de León, Guanajuato, varios reportes han indicado contaminación de aguas subterráneas con cromo, tanto trivalente como hexavalente; las fuentes de esta contaminación incluyen los suelos ultramáficos, efluentes de curtidurías, así como una fábrica de suministros de sales de cromo asentada en la ciudad (Armienta y col., 1993; Armienta y Rodríguez, 1995; Robles-Camacho y Armienta, 2000).

Tradicionalmente se han utilizado diferentes métodos para remover el cromo hexavalente de efluentes industriales y sitios contaminados: intercambio iónico, recuperación por evaporación, precipitación con compuestos de bario, precipitación con pepitas de fierro. El procedimiento más utilizado en México involucra la reducción del cromo para llevarlo a su forma trivalente y su subsecuente precipitación con álcali. Los métodos de reducción de cromo varían en función de cada sistema de tratamiento y comúnmente los agentes reductores

empleados son bióxido de azufre, bisulfito, metabisulfito o hidrosulfito de sodio y sulfato ferroso (Watson, 1973); sin embargo, estos métodos de tratamiento presentan ciertas deficiencias tales como: alto costo, requerimiento de manejo cuidadoso de reactivos (bióxido de azufre, ácido sulfúrico), generación excesiva de lodos, baja eficiencia, etcétera.

La factibilidad de procesos de biorrestauración o biotratamiento en la contaminación con cromo es reciente; en ellos se propone aprovechar el potencial genético y metabólico de agentes biológicos, principalmente microorganismos (Cervantes y col., 2001; Gutiérrez-Corona y Cervantes, 2008) y plantas (Gardea-Torresdey y col., 2004, 2005) para remover el Cr(VI) desde el ambiente (cuerpos de agua o suelos contaminados) o para prevenir la contaminación por medio del tratamiento de los residuos industriales.

En estudios previos se han reportado microorganismos (bacterias y hongos) aislados de sitios contaminados con cromo en el estado de Guanajuato (Campos y col., 1995; Ramírez-Ramírez y col., 2004; Acevedo-Aguilar y col., 2006, 2008; Coreño-Alonso y col., 2009). En años recientes, como parte de un proyecto de colaboración internacional (“Bioprospección de microorganismos a partir de residuos industriales y aplicación biotecnológica”, Ref. 95887, apoyado por el Fondo de Cooperación Internacional de Ciencia y Tecnología Unión Europea-México en el periodo 2009-2011), se realizaron estudios de metagenómica que indicaron el tipo de comunidades bacterianas presentes en los residuos de la empresa Química Central de México, S.A. de C.V., ubicada en las afueras de la ciudad de León, Guanajuato (Piñón-Castillo y col., 2010; Brito y col., 2013).

El objetivo de este estudio fue aislar y caracterizar microorganismos cultivables a partir de residuos industriales que contienen cromo, y con cepas seleccionadas, llevar a cabo su identificación por procedimientos moleculares.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 *Microorganismos*

Se utilizaron la cepa C20 de *B. simplex*, aislada en este trabajo (ver más adelante), y la cepa silvestre 168 de *B. subtilis*.

### 2.2 *Medios de cultivo*

Se utilizaron los medios de cultivo complejos YPG y LB, que contienen YPG (10 g extracto de levadura, 20 g peptona y 20 g glucosa), LB (5 g extracto de levadura, 5 g NaCl y 10 g peptona) en g/L.

### 2.3 *Aislamiento de microorganismos de residuos industriales*

Una muestra de 1 g de residuo sólido de la empresa Química Central, S.A. de C.V., se suspendió en 10 mL de agua estéril y se incubó en agitación por 6 h. Se realizaron diluciones del sobrenadante, que se utilizaron para determinar la concentración de Cr(VI) por el método de la difenilcarbazida y para inocular al medio YPG, conteniendo una concentración final de 50  $\mu\text{g/mL}$  de Cr(VI). Las colonias microbianas obtenidas se pasaron al medio YPG sólido, aislando colonias mediante inoculación por estriado; las colonias aisladas se volvieron a pasar al mismo medio conteniendo 100  $\mu\text{g/mL}$  de Cr(VI) mediante inoculación por estriado; este procedimiento se repitió dos veces más.

### 2.4 *Antibiograma*

Se determinó la resistencia de la cepa C20 a los antibióticos nitrofurantoína, cloranfenicol, ampicilina, gentamicina, trimetropin/sulfametoxazol, netilmicina, levofloxacina, ceftriaxona, cefotaxima, cefalotina, cefepime por medio de un antibiograma en un equipo automatizado de la marca bioMérieux.

### 2.5 *Morfología celular*

Se realizó el crecimiento de la cepa C20 en medio de esporulación de Schaeffer o NSM (Schae-

ffer, 1965) para esporulación; se usó como control la cepa silvestre de referencia 168 de *B. subtilis*.

#### 2.6 Evaluación del crecimiento en medio salino

Se determinó la sensibilidad de la cepa C20 para crecer en medio mínimo M9 y M9 adicionado con extracto de levadura (1 g/L), usando concentraciones 0.5 y 1.0 M de cloruro de sodio (NaCl).

#### 2.7 Evaluación de la sensibilidad a Cr (VI) en medio complejo

Se evaluó la sensibilidad de las cepas C20 de *B. simplex* y 168 de *B. subtilis* por cultivo en medio sólido y líquido Luria Bertani (LB) usando 0, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300 y 400  $\mu\text{g/mL}$  de Cr(VI).

#### 2.8 Determinación de la reducción de Cr(VI) en medio complejo

Para valorar la reducción de Cr(VI) se realizó una cinética de crecimiento de las cepas C20 de *B. simplex* y 168 de *B. subtilis* cultivadas en medio LB, conteniendo 0, 10, 25, 50, 100 y 200  $\mu\text{g/mL}$  del metal. El Cr(VI) remanente en el medio de cultivo se determinó por el método de la difenilcarbazida (NMX-AA-044-SCFI-2001) y el cromo total por espectrometría de absorción atómica (NMX-AA-051-SCFI-2001).

#### 2.9 Aislamiento de ADN genómico

Para la identificación molecular del aislamiento bacteriano, del crecimiento en LB se extrajo el ADN genómico de la cepa C20 de *B. simplex* mediante el procedimiento descrito por McClelland (2001).

#### 2.10 Amplificación del gen rDNA 16S por PCR

A partir del ADN genómico extraído de la cepa C20 de *B. simplex* se realizó la amplificación del gen rDNA 16S de la cepa usando los oligonucleótidos iniciadores 27F (5'-AGAGTTAGAGTTT-GATCMTGGCTCAG-3') y 907R (5'-CCGTCA-ATTCMTTTGAGTTT-3') (Lane y col., 1991) durante 35 ciclos, para obtener una banda esperada

de 880 pb. Cada ciclo constó de 30 seg a 95 °C de desnaturalización, 30 seg a 55 °C para alineamiento y 150 seg a 72 °C de extensión, seguido de una extensión final durante 10 min a 72 °C (modelo T100TM ThermalCycler Bio-Rad). El producto amplificado fue purificado para su posterior clonación mediante el uso del kit GeneJET Gel Extraction de la marca Thermo Scientific.

#### 2.11 Clonación y secuenciación del gen rDNA 16S

A partir del rDNA 16S amplificado, se efectuó la clonación del fragmento del gen en el vector comercial pJET 1.2 de la marca Thermo Scientific, y posteriormente se transformaron bacterias de *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes, seleccionándose las colonias transformantes en placas de medio LB adicionado con ampicilina (100  $\mu\text{g/mL}$ ). La recuperación de los plásmidos se realizó con el kit GeneJET Plasmid Miniprep de la marca Thermo Scientific.

La secuencia del fragmento determinada por la empresa ElimBiopharmaceutical Inc., fue analizada en el servidor del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) mediante el uso de la herramienta BLAST(n).

#### 2.12 Identificación de posibles factores de resistencia presentes en plásmidos.

Con la finalidad de identificar algún potencial gen de origen plasmídico usado por la *B. simplex* como factor de resistencia a Cr(VI) y/o a antibióticos del tipo de las cefalosporinas, se usaron diferentes metodologías para aislamiento de plásmidos y el posterior análisis por electroforesis en geles de agarosa. Se emplearon las metodologías descritas Kado (1981) y Russel (2001), además del kit GeneJET Plasmid Miniprep de la marca Thermo Scientific para aislamiento de plásmidos, con la finalidad de extraerlos en caso de que estuvieran presentes.

#### 2.13 Análisis estadístico

En las gráficas con datos cuantitativos, los valores mostrados representan la media de tres expe-



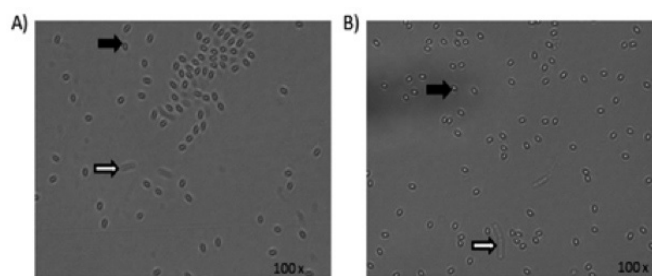
rimentos independientes por duplicado; las barras indican la desviación estándar.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La determinación del contenido de Cr(VI) en la muestra de residuo sólido industrial indicó una concentración de alrededor de 1200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Las diluciones de este residuo inoculadas en medio YPG sólido, conteniendo 50 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Cr(VI), produjeron colonias de hongos y de bacterias. De estas últimas, la resiembra repetida para aislar colonias en el mismo medio con la concentración indicada de Cr(VI), condujo a la obtención de aislados de origen independiente que mostraban crecimiento vigoroso. Uno de los aislamientos bacterianos se denominó C20 y se seleccionó para estudios adicionales. Se evaluaron diferentes características fenotípicas de la cepa C20, tales como morfología de las células, sensibilidad a antibióticos, crecimiento en medio salino, sensibilidad a Cr(VI), así como la capacidad de reducción de los niveles de este oxianión en el medio de cultivo.

Para lograrlo, primeramente se evaluó la sensibilidad a un espectro de diversos antibióticos, obteniéndose que la cepa C20 presenta sensibilidad a: nitrofurantoína, cloranfenicol, ampicilina, gentamicina, trimetropin-sulfametoaxol y netilmicina, además de sensibilidad intermedia a levofloxacina. Por otra parte, el aislamiento C20 mostró resistencia frente a los antibióticos de tipo cefalosporina ceftriaxona, cefotaxima, cefalotina y cefepime.

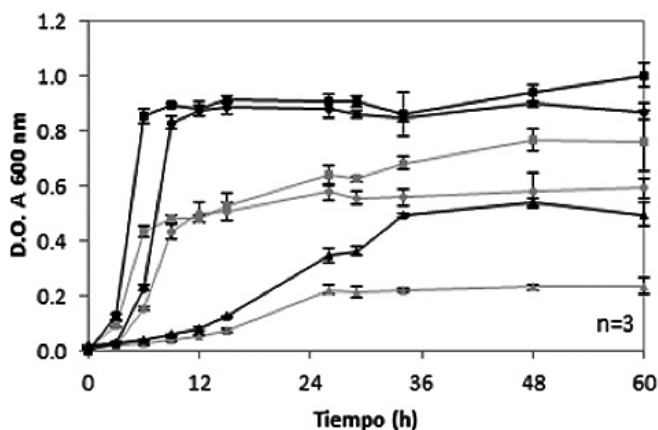
Se realizó también el crecimiento de la cepa C20 así como de la cepa de referencia de *B. subtilis* 168, usada como control, en medio NSM, el cual permite la formación de esporas. La figura 1 ilustra la morfología celular del aislamiento C20 y de la cepa 168 de *B. subtilis*; donde puede apreciarse que el aislamiento C20 presenta una morfología bacilar, al igual que la cepa 168 de *B. subtilis*, además de poseer la capacidad para formar esporas.



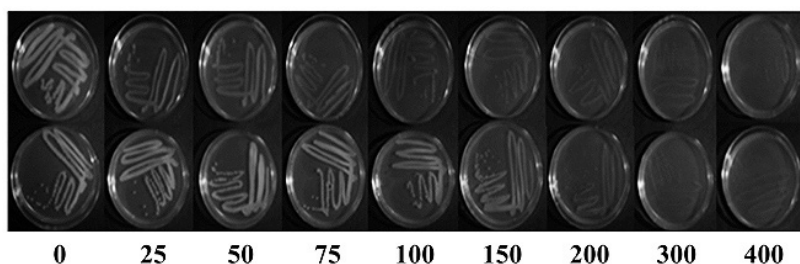
**Figura 1.** Morfología celular del aislamiento C20 y de la cepa 168 de *B. subtilis*. A) Se observan esporas de la cepa de referencia 168 de *B. subtilis* (flecha negra) y células vegetativas (flecha blanca); B) se observan esporas del aislamiento C20 (flecha negra) y células vegetativas (flecha blanca).

Como parte de la evaluación de la sensibilidad del aislamiento C20 a crecer en medio salino, se realizó el crecimiento del aislado en medio M9, solo o adicionado con extracto de levadura 0.1%, conteniendo o no NaCl en concentraciones 0.5 y 1 M (figura 2). Según la clasificación de Kushner y Kamekura (1988), el aislamiento C20 puede ser clasificado como un organismo halófilo moderado con crecimiento óptimo en concentraciones entre 3 y 15 % NaCl (p/v). Dicha tolerancia podría explicarse por el hecho de que los residuos industriales de los que fue aislado C20 son hipersalinos (Brito y col., 2013). Para evaluar la sensibilidad del aislamiento C20 a Cr(VI) se determinó su crecimiento en medio sólido LB. La Fig. 3 ilustra la sensibilidad al Cr(VI) del aislamiento C20 y de la cepa 168 de *B. subtilis*. En dicha figura puede apreciarse que, a partir de una concentración de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , que es la más baja proporción de Cr(VI) probada, es aparente que el aislamiento C20 presenta una mayor resistencia en comparación con *B. subtilis* y, conforme aumenta la concentración del Cr(VI), la resistencia por parte del aislamiento C20 se hace más notoria. En el medio probado (medio complejo LB), el aislado C20 mostró la capacidad de crecer en presencia de hasta 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Cr(VI).

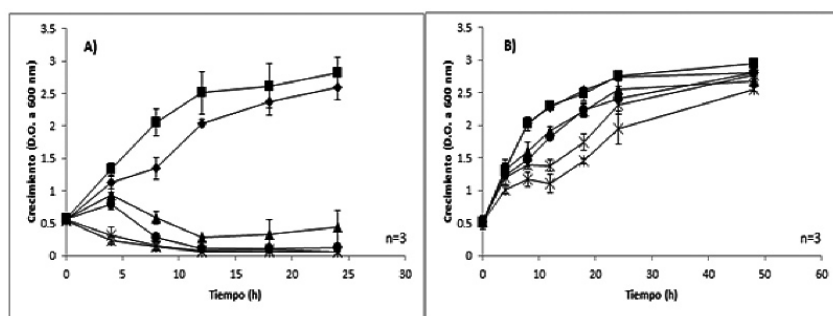
Para evaluar de otra manera la diferencia en sensibilidad a Cr(VI) del aislamiento C20 y de la cepa 168 de *B. subtilis*, se realizó el crecimiento de ambas en medio líquido LB, conteniendo diferen-



**Figura 2.** Crecimiento en medio salino. Crecimiento del aislamiento C20 en medio M9 (■), M9 con NaCl 0.5 M (●), M9 con NaCl 1 M (▲), M9 adicionado con extracto de levadura (■), M9 adicionado con extracto de levadura y NaCl 0.5 M (●) y M9 adicionado con extracto de levadura y NaCl 1 M (▲).



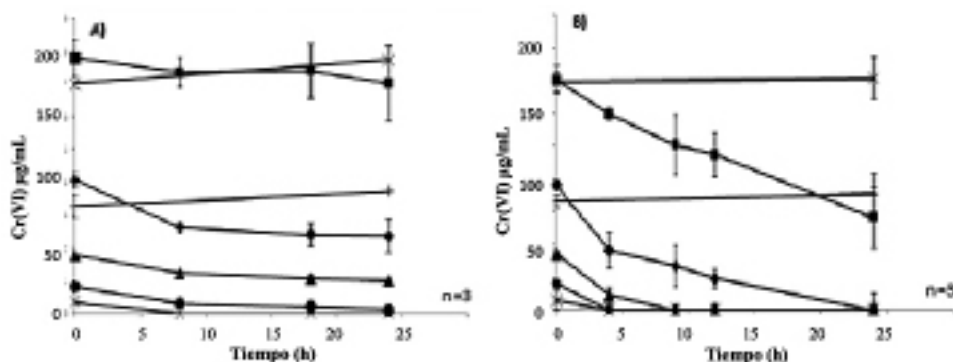
**Figura 3.** Crecimiento en medio sólido Luria Bertani (LB) de la cepa 168 de *B. subtilis* (superior) y el aislamiento C20 (inferior) en un gradiente de 0 a 400 µg/mL de Cr(VI).



**Figura 4.** Efecto del Cr(VI) en el crecimiento en medio LB líquido, de las cepas 168 de *B. subtilis* (A) y C20 de *B. simplex* (B). Las concentraciones de Cr(VI) probadas fueron: 0 µg/mL (○), 10 µg/mL (◐), 25 µg/mL (◑), 50 µg/mL (◒), 100 µg/mL (◓) y 200 µg/mL (◔).

tes concentraciones de Cr(VI) (figura 4). En este medio, el aislamiento C20 mostró crecimiento en presencia de hasta 200 µg/mL de Cr(VI), mientras que la cepa 168 de *B. subtilis* presentó crecimiento apreciable únicamente a la concentración de 10 µg/mL de Cr(VI), ya que a concentraciones mayores del ion ocurrió disminución de la absorbancia en los cultivos, probablemente debido a lisis celular. Dado que en los cultivos del aislamiento C20 incubados en presencia de 200 µg/mL o menos no ocurrió disminución de la absorbancia, se puede interpretar que en este caso no ocurrió lisis celular, posiblemente como consecuencia de la expresión de algún mecanismo de detoxificación del Cr(VI).

Al evaluar la reducción de Cr(VI) por el aislamiento C20 y la cepa 168 de *B. subtilis* en medio líquido LB, se observó que C20 tiene la capacidad de reducir el Cr(VI) hasta en un 100% si en el medio se adicionan concentraciones de 50 y 100 µg/mL, y lo realiza dentro de un periodo de 18 y 48 h, respectivamente, sin existir una modificación de la concentración del cromo total en el medio (figura 5). En el caso de los cultivos con la cepa 168 de *B. subtilis*, se observó una menor disminución del Cr(VI), ya que sólo se observó una reducción parcial del mismo en los medios con hasta 100 µg/mL; es probable que esta disminución del Cr(VI) se deba a una reducción realizada por metabolitos intracelulares, que se liberan al medio por la lisis de las células. Estas observaciones sugieren que en el aislamiento C20 existe un mecanismo de reduc-



**Figura 5.** Reducción de Cr(VI) en medio LB por las cepas 168 de *B. subtilis* (A) y C20 de *B. simplex* (B). Las concentraciones iniciales de Cr(VI) fueron: 10 µg/mL ( ), 25 µg/mL ( ), 50 µg/mL ( ), 100 µg/mL ( ) y 200 µg/mL ( ). Se muestra la determinación del cromo total en los cultivos con 200 µg/mL ( ) y 100 µg/mL ( ) de Cr(VI).

ción de Cr(VI) en el medio extracelular, de acuerdo a lo reportado por Bander y col. (1995).

El aislamiento C20 presenta características de reducción de Cr(VI) muy similares a las descritas para la cepa bacteriana descrita por Masood y Malik (2011), perteneciente al género de *Bacillus spp.*, que tiene la capacidad de reducir hasta 100 µg/mL del Cr(VI) presente en el medio, en un periodo mayor a 50 horas; aunque, en este caso, el mecanismo por el cual se realiza la disminución de Cr(VI) no se conoce, ya que la concentración de cromo total en el medio no se determinó.

Por su parte, Shakoory y Makhdoom (2000) reportaron una cepa bacteriana con la capacidad de reducir hasta el 90% el Cr(VI) del medio, usando una concentración de 80 µg/mL; adicionalmente, ellos observaron que mientras mayor era la concentración del Cr(VI) adicionado, mayor era la reducción del ión. Sin embargo, los autores no reportaron si la reducción era debida a mecanismos intrínsecos de la cepa, o si ocurría por metabolitos intracelulares que conllevaban la lisis celular.

La secuenciación del fragmento del gen rDNA 16S mediante el uso de iniciadores universales, y el análisis y comparación de la secuencia contra la bases de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), indicó que la cepa C20 corresponde a la bacteria *Bacillus simplex* (número de acceso

NR\_042136), con una identidad del 99%.

Para la identificación de posibles factores de resistencia presentes en plásmidos de la cepa C20 de *B. simplex*, se usaron diferentes metodologías sugeridas para el aislamiento de plásmidos, pero no se logró detectar el aislamiento de ninguno (datos no mostrados).

#### 4. CONCLUSIONES

Los datos obtenidos indican que el aislamiento C20 es una cepa de *B. simplex*, la cual es tolerante a Cr(VI) y posee un mecanismo de reducción del ion en el medio extracelular. Por estas características, la cepa puede ser considerada como un prospecto con potencial para ser usado en procesos biotecnológicos de remoción de Cr(VI).

#### AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue realizado con apoyo de la Dirección de Apoyo a la Investigación y Posgrado (DAIP) de la Universidad de Guanajuato y del proyecto Biometal (ANR-Conacyt C0011-FR12-01 n. 188775). La empresa Química Central de México, S.A. de C.V., proporcionó facilidades para la toma de muestras de sus residuos.

#### REFERENCIAS

- Acevedo Aguilar, F. J., Wrobel, K., Lokits, K., Caruso, J. A., Coreño Alonso, A., Gutiérrez-Corona, J. F. y Wrobel, K. (2008). Analytical speciation of chromium in in-vitro cultures of chromate-resistant filamentous fungi. *Anal Bioanal Chem*, 392, 269-276.
- Acevedo-Aguilar, F. J., Espino-Saldaña, A. E., León-Rodríguez, I. L., Rivera-Cano, M. E., Ávila-Rodríguez, M., Wrobel, K., Lappe, P., Ulloa, M. y Gutiérrez-Corona, J. F. (2006). Hexavalent chromium removal in vitro and

- from industrial wastes using chromate-resistant strains of filamentous fungi indigenous from contaminated wastes. *Can J Microbiol*, 52, 809-815.
- Armienta, M. A., Rodríguez, R., Quere, A., Juárez, F., Cenicerros, N. y Aguayo, A. (1993). Groundwater pollution with chromium in Leon Valley, Mexico. *Int J Environ Anal Chem*, 54, 1-13.
- Armienta-Hernández, M.A. y Rodríguez-Castillo, R. (1995). Environmental exposure to chromium compounds in the valley of León, México. *Environ Health Perspect*, 1, 47-51.
- ATSDR (2008). Toxicological profile for chromium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry, U. S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA.
- Bander, J., Lee, R. F. y Philips, P. (1995). Uptake and transformation of metals and metalloids by microbial mats and their use in bioremediation. *Ind Microbiol*, 14, 113-118.
- Brito, E. M., Piñón-Castillo, H. A., Guyoneaud, R., Caretta, C. A., Gutiérrez-Corona J. F., Durán, R., Reyna-López, G. E., Nevárez-Moorillón, G. V., Fahy, A., y Goñi-Urriza, M. (2013). Bacterial biodiversity from anthropogenic extreme environments: a hyper-alkaline and hyper-saline industrial residue contaminated by chromium and iron. *Appl Microbiol Biotechnol*, 97, 369-378.
- Campos, J., Martínez-Pacheco, M. y Cervantes, C. (1995). Hexavalent chromium reduction by a chromate-resistant *Bacillus* sp. strain. *Antonie van Leeuwenhoek*, 68, 203-208.
- Cervantes, C. y Silver, S. (1992). Plasmid chromate resistance and chromate reduction. *Plasmid*, 27, 65-71.
- Cervantes, C., Campos-García, J., Devars, S., Gutiérrez-Corona, F., Loza Tavera, H., Torres-Guzmán, J. C. y Moreno-Sánchez, R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol Rev*, 25, 335-347.
- Coreño-Alonso, A., Acevedo-Aguilar, F. J., Reyna-López, G. E., Tomasini-Campocoso, A., Fernandez-Perrino, F. J., Wrobel, K., Wrobel, K. y Gutiérrez-Corona, J. F. (2009). Cr(VI) reduction by an *Aspergillus tubingensis* strain: role of carboxylic acids and implications for natural attenuation and biotreatment of Cr(VI) contamination. *Chemosphere*, 76, 43-47.
- Ehrlich, H. L. (2002). How microbes mobilize metals in ores: a view of current understandings and proposals for further research. *Miner Metall Proces*, 19, 220-224.
- Gardea-Torresdey, J., Peralta-Videa, J., Montes, M., De La Rosa, G. y Corral-Díaz, B. (2004). Bioaccumulation of cadmium, chromium and copper by *Convolvulus arvensis* L.: impact on plant growth and uptake of nutritional elements. *Bioresour Technol*, 92, 229-235.
- Gardea-Torresdey, J. L., de la Rosa, G., Peralta-Videa, J. R., Montes, M., Cruz-Jiménez, G. y Cano-Aguilera, I. (2005). Differential uptake and transport of trivalent and hexavalent chromium by tumbleweed (*Salsola kali*). *Arch Environ Contam Toxicol*, 48, 225-232.
- Gruber, J. E. y Jennette, K. W. (1978). Metabolism of the carcinogen chromate by rat liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun*, 82, 700-706.
- Gunaratnam, M. y Grant, M. H. (2008). Cr(VI) inhibits DNA, RNA and protein syntheses in hepatocytes: involvement of glutathione reductase, reduced glutathione and DT-diaphorase. *Toxicol in Vitro*, 22, 879-886.
- Gutiérrez Corona, J. F. y Cervantes Vega, C. (2008). Interacciones microbianas con el cromo: mecanismos y potencial biotecnológico. *Ide@sConcyteg*, 37, 21-36.
- Instituto Nacional de Ecología, INE <http://www.ine.gob.mx/publicaciones/libros/122/int.html>. 2007
- Kado, S. I., y Liu, S. T. (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J. Bacteriol*, 145, 1365-1373.
- Katz, S. A. y Salem, H. (1993). The toxicology of



- chromium with respect to its chemical speciation: a review. *J. Appl Toxicol*, 13, 217-224.
- Kushner, D., y Kamekura, M. (1988). Physiology of halophilic eubacteria. En F. Rodríguez (ed.). *Halophilic bacteria*, vol. 1 (pp. 109-138). Boca Ratón: CRC.
- Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. En Stackebrandt, E. y Goodfellow, M. (eds.). *Nucleic acid techniques in bacterial systematics* (pp. 115-175). New York: John Wiley and Sons.
- Losi, M. E., Amrhein, C. and Frankenberger, W. T. J. (1994). Environmental biochemistry of chromium. *Rev Environ Contam Toxicol*, 136, 91-131.
- Maila, P. M., y Cloete, T. E. (2004). Bioremediation of petroleum hydrocarbons through landfarming: are simplicity and cost-effectiveness the only advantages? *Rev Environ Sci Biotechnol*, 3, 349-360.
- Markovich, D., y James, K. M. (1999). Heavy metals mercury, cadmium, and chromium inhibit the activity of the mammalian liver and kidney sulfate transporter sat-1. *Toxicol Appl Pharmacol*, 154, 181-187.
- McClelland, R. (2001). Gram's stain: the key to microbiology. *Med Lab Observer*, 33, 20-28.
- McGrath, S. P. y Smith, S. (1990). Chromium and nickel, heavy metals in soils. B. J. Alloway (ed.). *Heavy metals in soils* (pp. 125-150). Wiley: New York.
- Masood, F., Malik, A. (2011). Hexavalent chromium reduction by *Bacillus sp.* strain FM1 isolated from heavy-metal contaminated soil. *Bull Environ Contam Toxicol*, 86, 114-119.
- NMX-AA-044-SCFI-2001 Análisis de aguas. Determinación de cromo hexavalente en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas. Método de prueba.
- NMX-AA-051-SCFI-2001 Análisis de agua. Determinación de metales por absorción atómica en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas. Método de prueba.
- Papp, J. F. (1985). Chromium. En *Bulletin 675*, Mineral Facts and Problems, Washington DC: Bureau of Mines, US Department of the Interior, 139-155.
- Piñón-Castillo, H. A., Brito E. M. S., Goñi-Urriaza, M., Guyoneaud, R., Duran, R., Nevarez-Moorillon, G. V., Gutiérrez-Corona, J. F., Caretta, C. A. y Reyna-López, G. E. (2010). Hexavalent chromium reduction by bacterial consortia and pure strains from an alkaline industrial effluent. *J Appl Microbiol*, 109, 2173-2182.
- Ramírez-Ramírez, R., Calvo-Méndez, C., Ávila-Rodríguez, M., Lappe, P., Ulloa, M., Vázquez-Juárez, R. y Gutiérrez-Corona, F. (2004). Cr (VI) reduction in a chromate-resistant strain of *Candida maltosa* isolated from the leather industry. *Antonie van Leeuwenhoek*, 85, 63-68.
- Richard, F. L., y Bourg, A. C. M. (1991). Aqueous geochemistry of chromium: a review. *Water Res*, 25, 807-826.
- Robles-Camacho, J. y Armienta, M. A. (2000). Natural chromium contamination of groundwater at León Valley, México. *J Geochem Explor*, 68-3, 167-181.
- Russell W., y Sambrook, J. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schaeffer, P., Millet J., Aubert, J. P. (1965). Catabolic repression of bacterial sporulation. *Proc Natl Acad Sci*, 54, 704-711.
- Shakoori, A. R., Makhdoom, M., y Haq, R. U. (2000). Hexavalent chromium reduction by a dichromate-resistant gram-positive bacterium isolated from effluents of tanneries. *Appl Microbiol Biotechnol*, 53, 348-351.
- Watson, R. M. (1973). *Pollution control in metal finishing*. Park Ridge, NJ: Noyes Data Corp. [Serie: Pollution Technology Review No. 5].