

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN/RESEARCH ARTICLE

AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS ELECTROGÉNICOS CON POTENCIAL PARA REDUCIR CROMO HEXAVALENTE

Isolation of Electrogenic Microorganisms with Potential to Reduce Hexavalent Chromium

Alexander MORA COLLAZOS¹, Enrique BRAVO MONTAÑO¹.

¹ Grupo de investigación en Biología de Plantas y Microorganismos, Departamento de Biología, Universidad del Valle. Ciudad Universitaria Meléndez, Calle 13 n°. 100-00. Cali, Colombia.

For correspondence. alexander.mora.collazos@gmail.com

Received: 28th April 2016, **Returned for revision:** 9th August 2016, **Accepted:** 16th September 2016.

Associate Editor: Juan F. González.

Citation/Citar este artículo como: Mora Collazos A, Bravo Montaña E. Aislamiento de microorganismos electrogénicos con potencial para reducir cromo hexavalente. Acta biol. Colomb. 2017;22(1):27-36. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v22n1.57189>

RESUMEN

Se realizó el aislamiento de microorganismos cultivables a partir de la biopelícula formada sobre el ánodo de una celda de combustible microbiana puesta en operación durante 30 días; los microorganismos aislados fueron evaluados en su capacidad de producir energía en celdas de combustible microbianas y de reducir el cromo hexavalente, Cr (VI). Se aislaron cinco microorganismos, los cuales fueron caracterizados mediante análisis del gen del ARNr 16S, el cual ubicó a los microorganismos en cuatro géneros bacterianos: *Exiguobacterium* (CrMFC1), *Acinetobacter* (CrMFC2), *Aeromonas* (CrMFC3 y CrMFC5), y *Serratia* (CrMFC4). Todas las cepas aisladas mostraron actividad electrogénica y capacidad para reducir cromo hexavalente; la cepa de *Acinetobacter* CrMFC2 mostró el mejor desempeño electroquímico al registrar una densidad de potencia máxima de 18,61 mW/m²; las demás cepas mostraron valores de densidad de potencia máxima entre 4,6 mW/m² y 7,1 mW/m². Las cepas de *Aeromonas* CrMFC5 y *Exiguobacterium* CrMFC1 mostraron las mejores tasas de reducción de cromo al ser capaces de reducir el 100% del Cr (VI) en menos de 24 horas, destacándose la cepa de *Aeromonas* CrMFC5 la cual redujo el 100 % de Cr (VI) en 10 horas; las demás cepas redujeron el 100 % del contaminante al cabo de 28 a 30 horas. Los microorganismos aislados en este estudio son escasamente conocidos por su capacidad electrogénica y de reducir el Cr (VI); no obstante, se muestran promisorios para su utilización en sistemas mixtos que involucren la producción de energía acoplada a sistema de biorremediación de aguas contaminadas con cromo.

Palabras clave: ARNr 16S, biorremediación, celda de combustible microbiana, reducción de cromo.

ABSTRACT

Isolation of cultivable microorganisms was made from the biofilm formed on the anode of a microbial fuel cell put into operation for 30 days; isolated microorganisms were evaluated for their ability to produce energy and reduce the hexavalent chromium Cr (VI). Five microorganisms were isolated, which were characterized by analysis of 16S rRNA gene, placing them in four bacterial genera: *Exiguobacterium* (CrMFC1), *Acinetobacter* (CrMFC2), *Aeromonas* (CrMFC3 and CrMFC5) and *Serratia* (CrMFC4). All isolates showed electrogenic activity and ability to reduce hexavalent chromium; the *Acinetobacter* CrMFC1 strain showed the best electrochemical performance registering a maximum power density of 18.61 mW/m²; the other strains showed values of maximum power density between 4.6 mW/m² and 7.1 mW/m². Strains *Aeromonas* CrMFC5 and *Exiguobacterium* CrMFC1 showed the best rates of chromium reduction being able to reduce 100 % of the Cr (VI) in less than 24 hours, the *Aeromonas* CrMFC5 strain was the most efficient, reducing 100 % of Cr (VI) in 10 hours; the other strains reduced 100% of the contaminant after 28 to 30 hours. The microorganisms isolated in this study are hardly known for their electrogenic capacity and for reducing Cr (VI); however, show promise for their use in combined systems involving energy production system coupled to bioremediation of chromium contaminated water.

Keywords: 16S rRNA, bioremediation, microbial fuel cell, chromium reduction.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas ha venido creciendo el interés por las llamadas celdas de combustible microbianas (MFC, por sus siglas en inglés: *microbial fuel cell*) debido a sus múltiples aplicaciones potenciales, que no solo incluyen la producción sostenible de energía eléctrica a partir de compuestos biodegradables, sino también la generación de otros beneficios como la biosíntesis de compuestos de interés industrial a bajo costo (Logan y Rabaey, 2012) y la descontaminación de aguas residuales y de otros sustratos complejos en procesos de biorremediación (Du *et al.*, 2007; Ahn y Logan, 2010; Zhou *et al.*, 2013; Chabert *et al.*, 2015). Las MFC son sistemas bioelectroquímicos que convierten la energía química disponible en sustratos orgánicos o inorgánicos directamente en electricidad a través de la actividad metabólica de los microorganismos (Pant *et al.*, 2010).

Una MFC típica consta de dos tipos de electrodos (ánodo y cátodo), en los cuales, dependiendo del diseño y de las condiciones operativas, se forman biopelículas microbianas, en uno u otro o en ambos electrodos. Por ejemplo, los microorganismos presentes en la biopelícula anódica oxidan catalíticamente los sustratos presentes, que en el caso de que sean compuestos orgánicos, generan protones, CO₂, y electrones, que son transferidos directa o indirectamente al ánodo; éstos son llevados hasta el cátodo a través de un circuito externo donde participan en la reducción del oxígeno junto a los protones que fueron liberados en el ánodo, formando agua (Du *et al.*, 2007; ElMekawy *et al.*, 2014).

Los estudios sobre esta biotecnología, indican que la densidad de potencia generada por una MFC no podría llegar a ser igual o mejor que la de una pila de combustible químico (Zhou *et al.*, 2013). Sin embargo, la posibilidad de descontaminar cuerpos de agua o degradar compuestos de desecho a bajo costo con la posibilidad de producir energía eléctrica en el proceso sin la generación de nuevos contaminantes representa un costo-beneficio importante (Zhou *et al.*, 2013).

El desarrollo de MFC eficientes requiere de la contribución de diferentes disciplinas científicas y técnicas como la microbiología, la electroquímica y la ingeniería. Desde el enfoque microbiológico, no solo se requiere la identificación y caracterización de microorganismos con características electrogénicas, que sean capaces de transferir electrones al sistema mientras metabolizan sustratos presentes en él, sino también el estudio de la ecología de las comunidades microbianas en el entorno de la MFC (Ahn y Logan, 2010), la estratificación de la biopelícula (Wang *et al.*, 2015) y los organismos asociados.

El cromo tiene multitud de aplicaciones industriales y ha sido objeto de estudio en los últimos años por la problemática ambiental y de salud ocupacional que genera. El metal puede presentarse en diversos compuestos con estados de oxidación de II a VI. Los estados de valencia de

interés industrial son el cromo hexavalente y en menor grado el cromo trivalente (Vullo, 2003; Loayza, 2006; Mancera-Rodríguez y Álvarez-León, 2006). El Cr (VI), aunque es poco estable es muy soluble, con una alta movilidad entre sustratos, siendo un contaminante ambiental tóxico y cancerígeno (Cervantes *et al.*, 2001; Cuberos *et al.*, 2009; Gutiérrez *et al.*, 2010), de allí el interés por encontrar tecnologías adecuadas orientadas a la biorremediación del cromo hexavalente. Las MFC podrían constituir una opción biotecnológica promisoría en esta dirección.

El presente trabajo tuvo como objetivo contribuir a la identificación y caracterización de microorganismos electrogénicos con la capacidad de reducir Cr (VI), presentes en la biopelícula anódica de una MFC alimentada con sustratos ambientales provenientes de agua lénticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de las biopelículas

Se construyó una celda de combustible microbiana sedimentaria utilizando un recipiente de 500 mL y barras de grafito como electrodos; la MFC fue alimentada e inoculada con sustratos ambientales (lodos y agua) provenientes del lago de la estación experimental del Departamento de Biología de la Universidad del Valle. El lago se encuentra ubicado en las coordenadas: 3°22' N 76°32' W; se registraron valores promedio de 2,5 mg/L de oxígeno disuelto, 7,8 de pH y 104 µS de conductividad eléctrica durante el montaje experimental. Las MFC se mantuvieron en funcionamiento durante 30 días, tiempo en el cual se garantizó la formación de biopelícula. Pasado este tiempo los ánodos fueron retirados y se tomaron muestras que fueron destinadas para el cultivo de los microorganismos.

Aislamiento de los microorganismos cultivables

Se realizó el cultivo y aislamiento de bacterias provenientes de la biopelícula formada sobre el ánodo de las MFC. Los ánodos se lavaron con agua destilada estéril y se raspó la superficie de éstos con un escarpelo estéril, el raspado se utilizó para inocular medio líquido, basándose en la composición de agua residual artificial (ARA) (Lee *et al.*, 2003) agregando un suplemento de glucosa (20 mM). Los cultivos fueron incubados durante 24 horas, posteriormente se realizaron siembras en superficie en placas de ARA solidificadas con agar-agar, donde se seleccionaron colonias bacterianas con características morfológicas distintivas.

Caracterización morfológica y bioquímica de los microorganismos aislados

Se realizó la caracterización morfológica de los microorganismos aislados mediante observaciones macroscópicas (Microscopio estereoscópico Leica EZ4 HD) y mediante microscopía óptica (Microscopio óptico Leica DM1000); la caracterización bioquímica se realizó utilizando el kit comercial *BBL™ Crystal™ Enteric/Nonfermenter ID Kit*.

Caracterización molecular

Se realizó la extracción de ADN genómico a los microorganismos aislados, utilizando el kit comercial *Ultra Clean Microbial DNA Isolation kit* (MOBIO LAB) para obtener un producto libre de inhibidores y de buena calidad para la PCR. El ADN extraído se amplificó enzimáticamente utilizando los cebadores universales: 27F 5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3' y 1492R 5' TACGGYTACCTTGTTACGACTT3'; el coctel de la PCR se preparó con base en las siguientes concentraciones finales: buffer (1X), MgCl₂ (1,75 μM), dNTP's (5 μM cada uno), cebadores (4 μM cada uno), Taq polimerasa (1 unidad). El programa utilizado para la amplificación consistió en un ciclo de desnaturalización a 94 °C durante cinco minutos, una fase de amplificación de 35 ciclos, con una desnaturalización a 94 °C durante un minuto, hibridación a 54 °C durante 45 segundos y extensión a 72 °C durante 40 segundos; seguido de una última fase de un ciclo con una extensión final a 72 °C durante diez minutos. Se determinaron las secuencias mediante procedimientos estándares del servicio suministrado por la compañía Macrogen (USA).

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

Caracterización electroquímica de los microorganismos aislados

Los microorganismos aislados fueron ensayados de forma individual en su capacidad de generar energía. Se construyeron MFC de una cámara utilizando recipientes de 100 mL. Los electrodos se construyeron utilizando piezas cilíndricas de grafito con un área superficial de 11,3 cm²; para el caso del cátodo, el electrodo fue recubierto con catalizador de platino-carbono (0,1 mg/cm²) preparada en una solución de Nafion al 5 %. El sustrato energético utilizado, consistió en caldo nutritivo (peptona 0,5 %; extracto de carne 0,3 %; NaCl 0,5 %), suplementado con glucosa al 20 mM; cada MFC se inoculó con un cultivo (10 % v/v) de cada uno de los aislados microbianos seleccionados. Las MFC se mantuvieron en funcionamiento durante 16 días, tiempo en el cual se monitoreó el desempeño

electroquímico de cada microorganismo mediante colecta de curvas de densidad de potencia.

Bioensayo exploratorio de remoción de cromo hexavalente

Se evaluó el potencial de los microorganismos aislados en su capacidad para reducir Cr (VI). En los experimentos se usaron inóculos de los aislados a una concentración de 10 % v/v partiendo de un cultivo microbiano concentrado; los ensayos de reducción se llevaron a cabo a una concentración de 10 mg/L de Cr (VI) en medio LB; estos fueron incubados a 30 °C durante 30 horas, tiempo en el cual se evaluó la remoción biológica de Cr (VI) estimada mediante la determinación del cromo hexavalente residual; para esto, se tomó una alícuota de 500 μL a la cual se le agregó 40 μL de H₂SO₄ al 5 M y 200 μL de una solución concentrada de difenilcarbazida; la mezcla se aforó a 10 mL con agua destilada y se dejó reaccionar durante cinco minutos. La determinación de Cr (VI) residual se estimó en medio ácido por la formación de un complejo violeta con difenilcarbazida, por espectrofotometría a una longitud de onda de 540 nm (Greenberg *et al.*, 1992).

RESULTADOS

Aislamiento y caracterización de microorganismos

Se logró el aislamiento de cinco microorganismos con características morfológicas distintivas (tabla 1), provenientes de la biopelícula anódica de la MFC; en la tabla 2 se registran los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas a los microorganismos aislados.

Las secuencias obtenidas a partir de los aislados bacterianos fueron depositadas en la base de datos del *Genbank*, con números de acceso: KU724074-KU724078. La herramienta *naïve Bayesian classifier* fue utilizada para comparar las secuencias obtenidas con las depositadas en la bases de datos del *Ribosomal Database Project*, indicando que los cinco microorganismos aislados pertenecen a cuatro géneros diferentes: *Exiguobacterium*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* y *Serratia*. Utilizando como base los resultados de la herramienta *naïve Bayesian classifier*, se realizó la inferencia de la historia filogenética de las secuencias obtenidas con secuencias de las diferentes especies de los géneros *Exiguobacterium*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* y *Serratia*; se generó un árbol por el método de máxima verosimilitud (Fig. 1); el modelo de sustitución nucleotídica utilizado fue GTR+I+G con 0,3350 como parámetro alfa de la distribución gamma, 0,44 como la proporción de sitios invariantes, las frecuencias nucleotídicas fueron T=0,2053, C=0,2327, A=0,2420 y G=0,3.

La reconstrucción filogenética, identificó al aislado CrMFC1 como *Exiguobacterium acetylicum*; al aislado CrMFC2 como *Acinetobacter bereziniae*; a los aislados CrMFC3 y CrMFC5 como *Aeromonas jandaei* y *Aeromonas hydrophila*

respectivamente; el aislado CrMFC4 aparece relacionado con secuencias de *Serratia marcescens* (Fig. 1).

Caracterización electroquímica

La actividad electrogénica de cada aislado fue evaluada en MFC durante 16 días (Fig. 2); todos los aislados mostraron actividad electrogénica. El mayor valor de densidad de potencia fue de 18,61 mW/m², registrado por la cepa de

A. bereziniae CrMFC2; seguido en eficiencia por las cepas de *E. acetylicum* CrMFC1 y *A. hydrophila* CrMFC5, las cuales mostraron valores de densidad de potencia máximos de 6,9 mW/m² y 7,1 mW/m² respectivamente; los valores de densidad de potencia más bajos se observaron en las cepas de *A. jandaei* CrMFC3 y *S. marcescens* CrMFC4 mostrando valores de densidad de potencia máxima en el día 16 de 4,6 mW/m² y 3,07 mW/m² respectivamente.

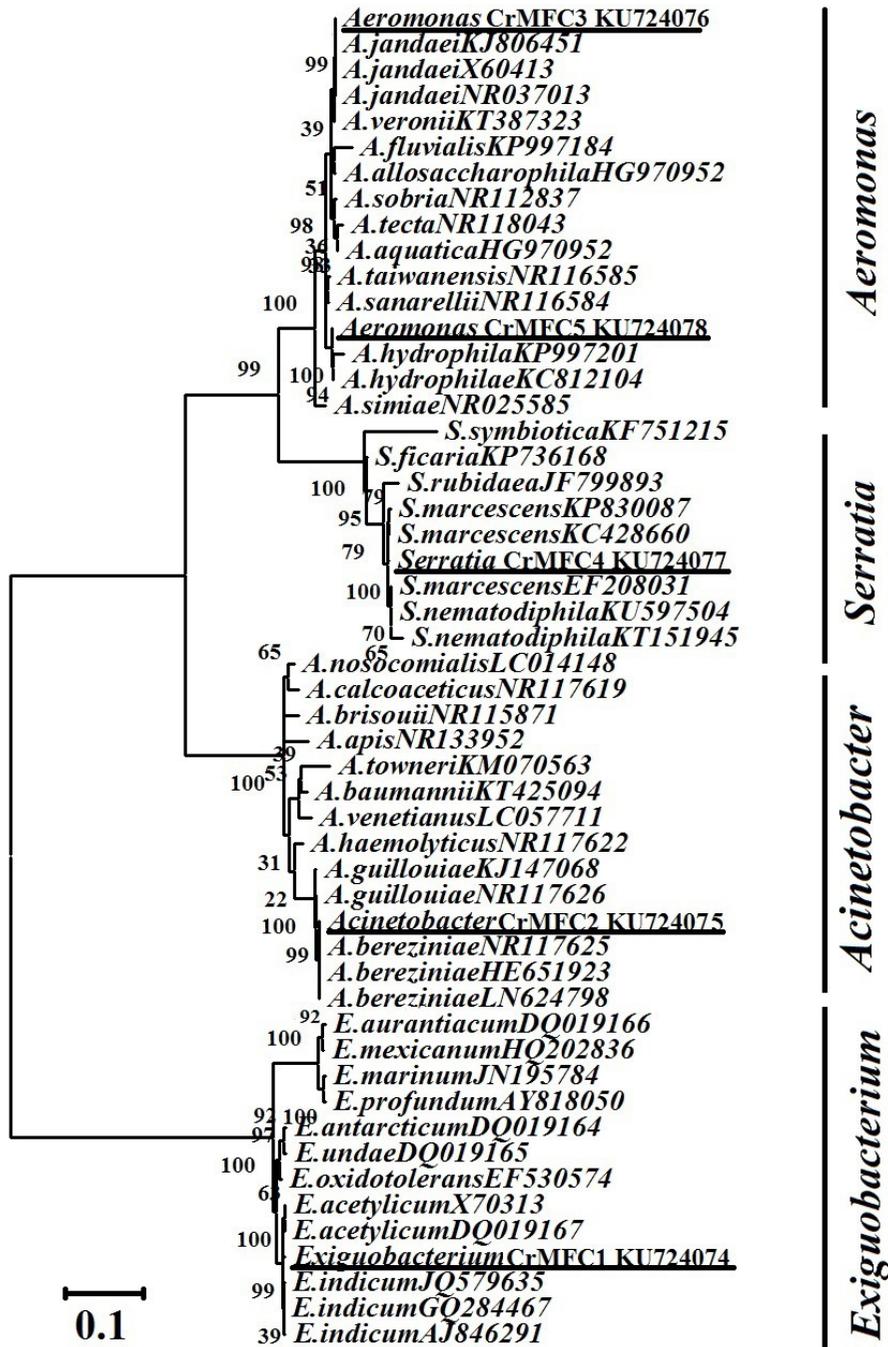


Figura 1. Inferencia filogenética de las secuencias de los aislados obtenidos con secuencias de las diferentes especies de los géneros mostrando relación al utilizar la herramienta naïve Bayesian classifier.

Bioensayos de reducción de cromo

Los resultados de remoción de Cr (VI) para cada uno de los microorganismos evaluados se muestran en la figura 3. De los cinco microorganismos evaluados, la cepa de *A. hydrophila* CrMFC5 y *E. acetylicum* CrMFC1 mostraron las mejores tasas de reducción al ser capaces de reducir el 100 % del Cr (VI) en menos de 24 horas, destacándose la cepa de *A. hydrophila* CrMFC5 la cual redujo el 100 % de Cr (VI) en diez horas; seguido en eficiencia por las cepas de *S. marcescens* CrMFC4, *A. jandaei* CrMFC3 y *A. bereziniae* CrMFC2 que redujeron el 100 % de Cr (VI) al cabo de 28 a 30 horas. Todas las cepas evaluadas se mostraron promisorias en la reducción de cromo hexavalente.

DISCUSIÓN

En este trabajo se describen cinco aislados microbianos electrogénicos con la capacidad de reducir Cr (VI), promisorios para la implementación en sistemas electrogénicos mixtos que acoplen la biorremediación de aguas contaminadas con Cr (VI).

El género *Exiguobacterium* morfológicamente se caracteriza por presentar colonias pigmentadas con tonalidades naranja a amarillo; todos los representantes del género son catalasa negativos, producen ácido a partir de la sacarosa y son incapaces de utilizar como fuente de carbono el adanitol, inositol y sorbitol (Vos *et al.*, 2009); características morfológicas y bioquímicas (Tabla 1 y 2) que concuerdan con lo observado en el aislado CrMFC1, datos que respaldan el resultado obtenido mediante la inferencia filogenética (Fig. 1).

El aislado CrMFC1 se encuentra agrupado en el mismo clado que *E. acetylicum* y *E. indicum*; no obstante, el aislado CrMFC1 se muestra más relacionado con organismos de la especie de *E. acetylicum*. Los resultados de la prueba bioquímica (Tabla 2) contrastados con referentes bibliográficos, indican que para las pruebas de galactosa, malonato, manitol, manosa, melobiosa, sorbitol, ramnosa, glicina, lisina y arginina concuerdan con los resultados reportados para *E. acetylicum*; a la vez que difieren de los

resultados que se reportan para *E. indicum* (Chaturvedi y Shivaji, 2006; Vos *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2013).

El género *Aeromonas* se caracteriza por ser cocobacilos a bacilos Gram negativos, son anaerobios facultativos, generalmente oxidasa y catalasa positivos; los resultados de la pruebas bioquímicas reportados para este género (adonitol, galactosa, inositol, malonato, manitol, manosa, melobiosa, sacarosa, sorbitol, ramnosa, esculina, urea, lisina y arginina) concuerdan con los resultados reportados tanto para el aislado CrMFC3 identificado como *A. jandaei* y el aislado CrMFC5 identificado como *A. hydrophila* (Brenner *et al.*, 2005). Datos que confirman la clasificación obtenida mediante la inferencia filogenética (Fig. 1).

En el caso del aislado CrMFC3 se reporta una incoherencia según lo reportado por Brenner *et al.* (2005) en la prueba de citrato; no obstante, Abbott *et al.* (2003) indican que las características bioquímicas del género *Aeromonas* pueden presentar variaciones entre individuos de la misma especie, siendo el citrato uno de los parámetro variables.

Los organismos del género *Acinetobacter* son Gram negativos; las células comúnmente se organizan en pares; son oxidasa negativos y catalasa positivos (Brenner *et al.*, 2005); los resultados de la prueba para la hidrólisis de esculina; utilización de urea, malonato, arginina y lisina concuerdan con los resultados reportados para el aislado CrMFC2 identificado como *A. bereziniae* (Nemec *et al.*, 2010). Los resultados de las pruebas bioquímicas para el aislado de CrMFC4 concuerdan con lo reportado para la especie de *S. marcescens* (Brenner *et al.*, 2005).

El análisis de inferencia filogenética a partir del gen del ARNr 16S, la cual esta soportada por valores de *bootstrap* que superan el 90 % en todos los casos (Fig. 1), las características morfológicas de los aislados y los datos bioquímicos permitieron clasificar con alto grado de confiabilidad al aislado CrMFC1 como *Exiguobacterium acetylicum*; al aislado CrMFC2 como *Acinetobacter bereziniae*; a los aislados CrMFC3 y CrMFC5 como *Aeromonas jandaei* y *Aeromonas hydrophila* respetivamente y al aislado CrMFC4 como *Serratia marcescens*.

Tabla 1. Descripción morfológica de los aislados bacterianos.

Aislado	Descripción morfológica
CrMFC1	Bacilo Gram positivo; sus características morfológicas macroscópicas fueron: colonia circular; borde entero; color naranja; elevación plana; brillante; no translúcida; textura lisa; apariencia cremosa
CrMFC2	Se observó al microscopio como coco o diplococo Gram negativo; sus características morfológicas macroscópicas fueron: colonia puntiforme; borde entero; color crema; iridiscente a la luz; elevación plana; brillante; translúcida; textura lisa; apariencia cremosa.
CrMFC3	Se observó al microscopio como bacilo Gram negativo; sus características morfológicas macroscópicas fueron: colonia circular; borde entero; color crema; elevación plana; brillante; no translúcida; textura lisa; apariencia cremosa.
CrMFC4	El aislado se observó al microscopio como bacilo Gram negativo; sus características morfológicas macroscópicas fueron: colonia irregular; color rojo; elevación plana; brillante; no translúcida; textura lisa; apariencia cremosa.
CrMFC5	El aislado se observó al microscopio como bacilo Gram negativo; sus características morfológicas macroscópicas fueron: colonia circular; borde entero; color crema; elevación convexa; colonia brillante; no translúcida; textura lisa; apariencia cremosa.

Tabla 2. Caracterización bioquímica de los microorganismos aislados.

Prueba	<i>E. acetylicum</i> CrMFC1	<i>A. bereziniae</i> CrMFC2	<i>A. jandaei</i> CrMFC3	<i>S. marcescens</i> CrMFC4	<i>A. hydrophila</i> CrMFC5
Arabinosa	+	-	-	+	+
Manosa	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	-	-	+	+
Melobiosa	-	+	-	-	-
Ramnosa	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	+	-
Manitol	+	-	+	+	+
Adonitol	-	-	-	+	-
Galactosa	-	+	+	+	+
Inositol	-	-	-	-	-
p-n-p-fosfato	+	-	+	+	+
p-n-p a-β-glucósido	-	-	+	+	+
p-n-p-β-galactósido	-	-	+	+	+
Prolina nitroanilida	-	-	+	+	+
p-n-p bis-fosfato	-	-	-	+	+
p-n-p-xilósido	-	-	-	-	-
p-n-p-a-arabinósido	-	-	+	-	+
p-n-p-fosforilcolina	-	-	-	-	-
p-n-p-β-glucurónido	-	-	-	-	-
p-n-p-N-acetil glucosamidina	-	-	-	+	+
γ-L-glutamil p-nitroanilida	-	-	-	+	+
Esculina	-	-	-	+	+
p-nitro-DL-fenilalanina	-	-	-	-	-
Urea	-	-	-	-	-
Glicina	-	-	-	-	-
Citrato	-	-	-	+	-
Malonato	-	-	-	-	-
Cloruro de trifenil tetrazolio	-	+	-	+	-
Arginina	-	-	+	+	-
Lisina	-	-	+	+	+
Oxidasa	-	-	+	+	+
Catalasa	+	+	+	+	+

Los valores de densidad de potencia registrados en la figura 2 se muestran bajos en comparación con otros autores (Liu *et al.*, 2004; Kiely *et al.*, 2011; Logan y Rabaey, 2012; Chabert *et al.*, 2015); no obstante, los bajos valores registrados son producto de los materiales utilizados en la construcción de los electrodos y la poca área superficial disponible para la formación de biopelícula; los resultados obtenidos permiten inferir que las cinco cepas aisladas son microorganismos electrogénicos con un potencial más elevado del mostrado en el presente trabajo.

En la figura 2 se observa el comportamiento electrogénico de los aislados microbianos; todos los microorganismos mostraron actividad electrogénica, destacándose la cepa de *A. bereziniae* CrMFC2 al generar una densidad de potencia máxima de 18,61 mW/m², valor que corresponde entre 2,6 a seis veces más que los de los demás aislados bacterianos. El género *Acinetobacter* es raramente conocido por su capacidad electrogénica; individuos de este género han sido detectados en electrodos de MFC mediante técnicas moleculares (Guo *et al.*, 2016; Miran *et al.*, 2016).

Se reporta la capacidad electrogénica de un individuo del género *Acinetobacter*, considerando a la cepa de *A. bereziniae* CrMFC2 como un microorganismo con alta capacidad electrogénica y promisorio para ser usada en MFC con un potencial aun por explorar.

La actividad electrogénica del género *Exiguobacterium* es poco conocida; se tienen reportes de la presencia de estos microorganismos en biopelículas anódicas de MFC detectados por medio de DGGE (Rezaei *et al.*, 2009; Ozkaya *et al.*, 2012). La densidad de potencia generada en la MFC (Fig. 2) por la cepa *E. acetylicum* CrMFC1, indicaría que existen representantes del género *Exiguobacterium* con capacidades electrogénicas. La actividad electrogénica de los géneros de *Aeromonas* y *Serratia* han sido reportados por otros autores, quienes los consideran microorganismos eficientes en la producción de energía (Pham *et al.*, 2003; Saranya *et al.*, 2014).

Representantes del género *Exiguobacterium* se han encontrado en reactores anaerobios contaminados con metales pesados (Sahinkaya *et al.* 2013); Durai *et al.* (2011) y Sarangi y Krishnan (2008) reportan a representantes del género *Exiguobacterium*, con la capacidad de tolerar altas concentraciones de Cr (VI) al aislar microorganismos en tanques de agua residual de curtiembres y en suelos altamente contaminados; por otro lado, se ha demostrado que representantes del género *Exiguobacterium* pueden reducir altas concentraciones de Cr (VI) de manera eficiente (Okeke, 2008; Sarangi y Krishnan, 2008), datos que

apoyarían la capacidad de reducir Cr (VI) mostrada por la cepa *E. acetylicum* CrMFC1 (Fig. 3).

Srivastava y Thakur (2007) y Pei *et al.* (2009) reportaron microorganismos del género *Acinetobacter* con la capacidad de tolerar 100 mg/L de Cr (VI). Srivastava y Thakur (2007) consideran al género *Acinetobacter* promisorio para la reducción de cromo en efluentes industriales (curtiembres) al reportar un 75 % de remoción del contaminante en tres días; por otro lado, Tripathi y Garg (2013) reportan una capacidad de reducir cromo en agua residual industrial del 89 % en siete días partiendo de un bioensayo a 500 mg/L. La cepa *A. bereziniae* CrMFC2 no mostró las mejores tasas de remoción de cromo (Fig. 3), aun así no se descarta su potencial en tratamientos de aguas residual contaminada con Cr (VI); esta cepa sería promisorio al utilizarse en dispositivos mixtos, que puedan verse favorecidos por la elevada densidad de potencia generada por este microorganismo con el doble beneficio de reducción de cromo.

Se ha demostrado la capacidad de reducir Cr (VI) de manera eficiente en representantes del género *Serratia* (Mondaca *et al.*, 2002); además de mostrarse promisorios al poseer mecanismos de tolerancia a cromo; Zhang y Li (2011) reportan que su aislado bacteriano, perteneciente al género *Serratia* tiene la capacidad de tolerar 1.500 mg/L Cr (VI).

El potencial de reducción de Cr (VI) en organismos del género *Aeromonas* es poco conocido. Existen pocos reportes en donde se asocia a individuos de este género con la capacidad de tolerar metales (Ni, Cu, Zn, Cd y Cr) así como

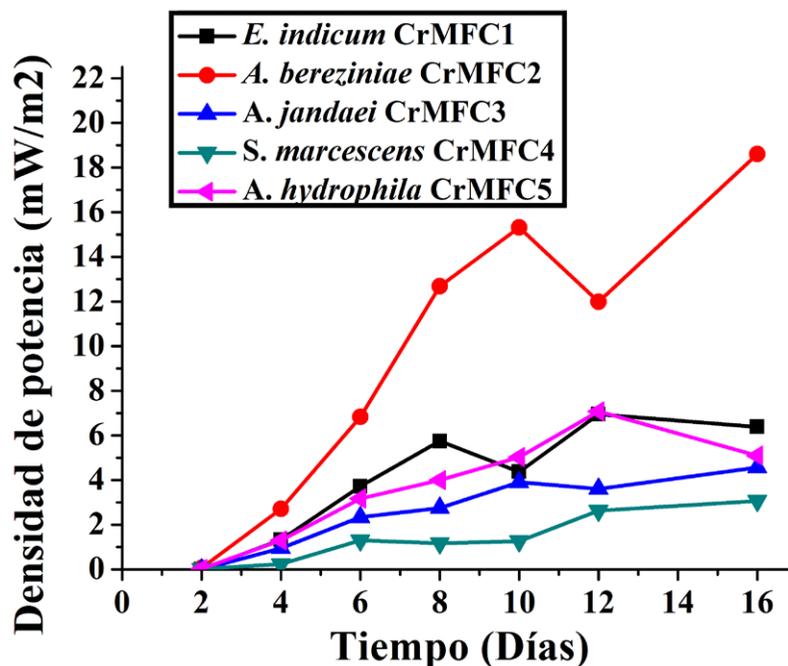


Figura 2. Caracterización electroquímica de los microorganismos aislados, expresado en densidad de potencia a través del tiempo.

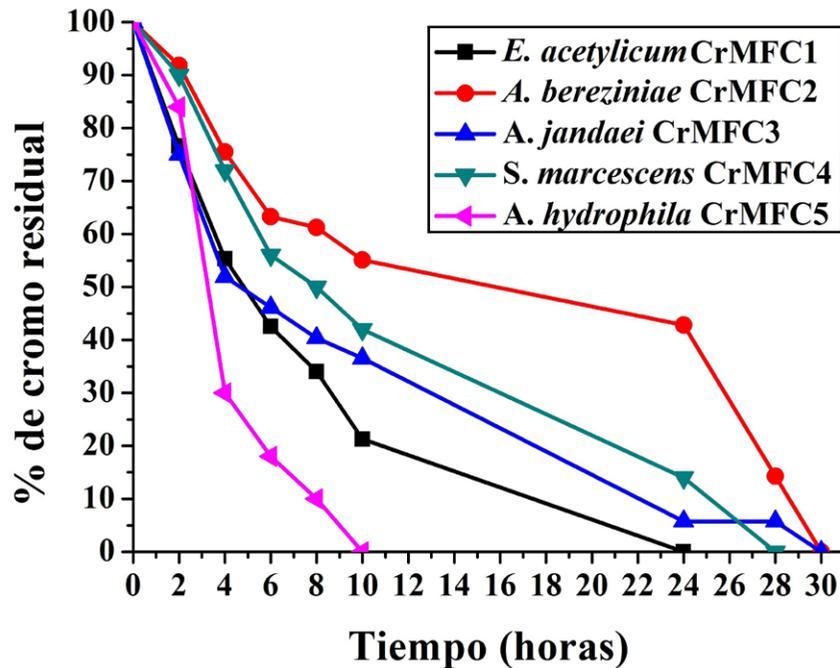


Figura 3. Bioensayo exploratorio de reducción de cromo hexavalente.

su capacidad para reducir Cr (VI) de forma eficiente (Alam y Ahmad, 2011). Se reporta la capacidad de reducir cromo en las cepas de *A. jandaei* CrMFC3 y *A. hydrophila* CrMFC5 al ser capaces de reducir el 100 % de una solución de Cr (VI) a 10 mg/L al cabo de 30 y diez horas respectivamente (Fig. 2).

La Resolución 0631 de mayo 17 de 2015 del Ministerio de Ambiente Colombiano, reglamenta los valores límites máximos permisibles en vertimientos en cuerpos de agua; la norma indica que para el caso puntual de cromo se permite un vertimiento máximo de 0,5 mg/L tanto para aguas domésticas como industriales; los microorganismos presentados en este estudio demostraron tener la capacidad de reducir valores superiores a los permitidos por la norma, con el potencial de reducir el Cr (VI) en su totalidad.

Microorganismos electrogénicos con la capacidad de reducir Cr (VI) permiten la construcción de MFC con la capacidad de recuperar parte de la energía en forma de electricidad además de reducir Cr (VI) (Tandukar *et al.*, 2009, Xafenias *et al.*, 2014). Biopelículas asociadas a los electrodos de las MFC actúan como catalizadores en la producción de energía y en la biodegradación de compuestos (Huang *et al.*, 2011). La búsqueda de microorganismos eficientes, la capacidad de diseñar y manipular consorcios microbianos son aspectos clave, que permite mejoras en los procesos de biorremediación como sería el caso del Cr (VI) (Pinon-Castillo *et al.*, 2010) y la obtención de agrupaciones microbianas las cuales sean más resistentes y eficientes al trabajar en ambientes contaminados (Brune y Bayer, 2012).

CONCLUSIONES

En la actualidad, la microbiología juega un papel clave en la búsqueda de soluciones y alternativas amigables con el medio ambiente. La búsqueda y estudio de microorganismos particulares con capacidades excepcionales, brinda la posibilidad de pensar en la construcción de sistemas de tratamiento integrales con múltiples beneficios. Los microorganismos aislados en el presente trabajo, son escasamente conocidos por su capacidad electrogénica y capacidad para reducir Cr (VI); no obstante, se presentan como microorganismos promisorios, abriendo la posibilidad de construir e implementar dispositivos electrogénicos que aprovechen la capacidad de reducción de Cr (VI), haciendo rentable y eficiente la tecnología de las MFC, no solo en la producción limpia de energía sino además en la biorremediación de fuentes de agua contaminadas con Cr (VI).

AGRADECIMIENTOS

Al grupo de Investigación de Biología de Plantas y Microorganismos y al Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas del Departamento de Biología de la Universidad del Valle. Equipos requeridos para la medición de parámetros electroquímicos fueron donados por la organización Idea Wild (USA).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCIAS

- Abbott SL, Cheung WKW, Janda JM. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes. *J Clin Microbiol*. 2003;41(6):2348-2357. Doi:10.1128/JCM.41.6.2348-2357.2003
- Ahn Y, Logan B E. Effectiveness of domestic wastewater treatment using microbial fuel cells at ambient and mesophilic temperatures. *Bioresour Technol*. 2010;101(2):469-475. Doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.07.039
- Alam M Z, Ahmad S. Toxic chromate reduction by resistant and sensitive bacteria isolated from tannery effluent contaminated soil. *Ann Microbiol*. 2011;62(1):113-121. Doi:10.1007/s13213-011-0235-4
- Brenner DJ, Krieg N, Staley J, editors. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume 2 The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria*. New Delhi, India: Springer US; 2005. p. 425; 556-561; 799; 808-809.
- Brune KD, Bayer TS. Engineering microbial consortia to enhance biomining and bioremediation. *Front Microbiol*. 2012;3(1):203. Doi:10.3389/fmicb.2012.00203
- Cervantes C, Campos-García J, Devars S, Gutiérrez-Corona F, Loza-Tavera H, Torres-Guzmán JC, Moreno-Sánchez R. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol Rev*. 2001;25(3):335-347. Doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0168-6445(01)00057-2
- Chabert N, Amin Ali O, Achouak W. All ecosystems potentially host electrogenic bacteria. *Bioelectrochemistry*. 2015;106:88-96. Doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bioelechem.2015.07.004
- Chaturvedi P, Shivaji S. *Exiguobacterium indicum* sp. nov., a psychrophilic bacterium from the Hamta glacier of the Himalayan mountain ranges of India. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2006;56(12):2765-2770. Doi:10.1099/ijs.0.64508-0
- Cuberos E, Rodríguez A, Prieto E. Niveles de cromo y alteraciones de salud en una población expuesta a las actividades de curtiembres en Bogotá, Colombia. *Rev Salud Pública*. 2009;2(11):278-289.
- Darriba D, Taboada G L, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods*. 2012;9(8):772. Doi:10.1038/nmeth.2109
- Du Z, Li H, Gu T. A state of the art review on microbial fuel cells: a promising technology for wastewater treatment and bioenergy. *Biotechnol Adv*. 2007;25(5):464-482. Doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.05.004
- Durai G, Rajasimman M, Rajamohan N. Aerobic digestion of tannery wastewater in a sequential batch reactor by salt-tolerant bacterial strains. *Appl Water Sci*. 2011;1(1):35-40. Doi:10.1007/s13201-011-0006-1
- ElMekawy A, Hegab HM, Vanbroekhoven K, Pant D. Techno-productive potential of photosynthetic microbial fuel cells through different configurations. *Renew Sust Energ Rev*. 2014;39:617-627. Doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.116
- Greenberg AE, Clesceri LS, Eaton AD. Standard methods for the examination of water and wastewater, 18th ed. Washington. D.C: American Public Health Association; 1992. p58-60.
- Guo X, Zhan Y, Chen C, Cai B, Wang Y, Guo S. Influence of packing material characteristics on the performance of microbial fuel cells using petroleum refinery wastewater as fuel. *Renew Energy*. 2016;87:437-444. Doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2015.10.041
- Gutiérrez JF, Espino AE, Coreño A, Acevedo FJ, Reyna G, Fernández FJ, *et al*. Mecanismos de interacción con cromo y aplicaciones biotecnológicas en hongos. *Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal*. 2010;1(1):47-63.
- Hall T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser*. 1999;41:95-98.
- Huang L, Chai X, Chen G, Logan BE. Effect of set potential on hexavalent chromium reduction and electricity generation from biocathode microbial fuel cells. *Environ Sci Technol*. 2011;45(11):5025-5031. Doi:10.1021/es103875d
- Kiely PD, Cusick R, Call DF, Selembo PA, Regan JM, Logan BE. Anode microbial communities produced by changing from microbial fuel cell to microbial electrolysis cell operation using two different wastewaters. *Bioresour Technol*. 2011;102(1):388-394. Doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2010.05.019
- Lee J, Phung NT, Chang IS, Kim BH, Sung HC. Use of acetate for enrichment of electrochemically active microorganisms and their 16S rDNA analyses. *FEMS Microbiol Lett*. 2003;223(2):185-191. Doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00356-2
- Liu H, Cheng S, Logan BE. Production of electricity from acetate or butyrate using a single-chamber microbial fuel cell. *Environ Sci Technol*. 2004;39(2):658-662. Doi: 10.1021/es048927c
- Loayza JE. Estudio de Investigación: Gestión integral de residuos peligrosos. *Boletín electrónico informativo sobre productos y residuos químicos*. 2006;2(13):1-4.
- Logan BE, Rabaey K. Conversion of wastes into bioelectricity and chemicals by using microbial electrochemical technologies. *Science*. 2012;337(6095):686-690. Doi: 10.1126/science.1217412
- Mancera-Rodríguez N J, Álvarez-León R. Estado del conocimiento de las concentraciones de mercurio y otros metales pesados en peces dulceacuicolas de Colombia. *Acta biol Colomb*. 2006;11:3-23.
- Miran W, Nawaz M, Jang J, Lee DS. Conversion of orange peel waste biomass to bioelectricity using a mediator-less microbial fuel cell. *Sci Total Environ*. 2016;547:197-205. Doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.004

- Mondaca M, Campos V, Moraga R, Zaror CA. Chromate reduction in *Serratia marcescens* isolated from tannery effluent and potential application for bioremediation of chromate pollution. *Scientific World Journal*. 2002;2:972-977. Doi:10.1100/tsw.2002.154
- Nemec A, Musilek M, Sedo O, De Baere T, Maixnerova M, van der Reijden T, *et al.* *Acinetobacter bereziniae* sp. nov. and *Acinetobacter guillouiae* sp. nov., to accommodate *Acinetobacter* genomic species 10 and 11, respectively. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2010;60(4):896-903. Doi: 10.1099/ijs.0.013656-0
- Okeke BC. Bioremoval of hexavalent chromium from water by a salt tolerant bacterium, *Exiguobacterium* sp. GS1. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2008;35(12):1571-1579. Doi: 10.1007/s10295-008-0399-5
- Ozkaya B, Akoglu B, Karadag D, Aci G, Taskan E, Hasar H. Bioelectricity production using a new electrode in a microbial fuel cell. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2012;35(7):1219-1227. Doi:10.1007/s00449-012-0709-1
- Pant D, Van-Bogaert G, Diels L, Vanbroekhoven K. A review of the substrates used in microbial fuel cells (MFCs) for sustainable energy production. *Bioresour Technol*. 2010;101(6):1533-1543. Doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.10.017
- Pei QH, Shahir S, Santhana-Raj AS, Zakaria ZA, Ahmad WA. Chromium(VI) resistance and removal by *Acinetobacter haemolyticus*. *World J Microbiol Biotechnol*. 2009;25(6):1085-1093. Doi:10.1007/s11274-009-9989-2
- Pinon-Castillo H, Brito E, Goni-Urriza M, Guyoneaud R, Duran R, Nevarez-Moorillon GV, *et al.* Hexavalent chromium reduction by bacterial consortia and pure strains from an alkaline industrial effluent. *J Appl Microbiol*. 2010;109(6):2173-2182. Doi:10.1111/j.1365-2672.2010.04849.x
- Pham CA, Jung SJ, Phung NT, Lee J, Chang IS, Kim BH, *et al.* A novel electrochemically active and Fe(III)-reducing bacterium phylogenetically related to *Aeromonas hydrophila*, isolated from a microbial fuel cell. *FEMS Microbiol Lett*. 2003;223(1):129-134. Doi:http://dx.doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00354-9
- Rezaei F, Xing D, Wagner R, Regan JM, Richard TL, Logan BE. Simultaneous cellulose degradation and electricity production by *Enterobacter cloacae* in a microbial fuel cell. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75(11):3673-3678. Doi:10.1128/aem.02600-08
- Sahinkaya E, Kilic A, Calimlioglu B, Toker Y. Simultaneous bioreduction of nitrate and chromate using sulfur-based mixotrophic denitrification process. *J Hazard Mater*. 2013;262:234-239. Doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.08.050
- Sarangji A, Krishnan C. Comparison of in vitro Cr(VI) reduction by CFEs of chromate resistant bacteria isolated from chromate contaminated soil. *Bioresour Technol*. 2008;99(10):4130-4137. Doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.08.059
- Saranya S, Lavanya V, Jasmine M, Priya R. Bioelectricity production from microbial fuel cell using *Serratia marcescens*. *Int J Adv Interdiscip Res*. 2014;1(6):27-30.
- Srivastava S, Thakur IS. Evaluation of biosorption potency of *Acinetobacter* sp. for removal of hexavalent chromium from tannery effluent. *Biodegradation*. 2007;18(5):637-646. Doi:10.1007/s10532-006-9096-0
- Tandukar M, Huber SJ, Onodera T, Pavlostathis SG. Biological chromium(VI) reduction in the cathode of a microbial fuel cell. *Environ Sci Technol*. 2009;43(21):8159-8165. Doi: 10.1021/es9014184
- Tripathi M, Garg SK. 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 Biochem*. 2013;48(3):496-509. Doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2013.02.009
- Vos P, Garrity G, Jones D; Krieg N, Ludwig W, Rainey F, Schleifer KH, Whitman W, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 3: The Firmicutes*. New Delhi: Springer-Verlag New York; 2009. p. 460-463.
- Vullo DL. Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. *Revista Química Viva*. 2003;2(3):93-104.
- Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(16):5261-5267. Doi:10.1128/AEM.00062-07
- Wang N, Chen Z, Li HB, Su JQ, Zhao F, Zhu YG. Bacterial community composition at anodes of microbial fuel cells for paddy soils: the effects of soil properties. *J Soils Sediments*. 2015;15(4):926-936. Doi:10.1007/s11368-014-1056-4
- Xafenias N, Zhang Y, Banks CJ. Evaluating hexavalent chromium reduction and electricity production in microbial fuel cells with alkaline cathodes. *Int J Environ Sci Technol*. 2014;12(8): 2435-2446. Doi:10.1007/s13762-014-0651-7
- Zhang K, Li F. Isolation and characterization of a chromium-resistant bacterium *Serratia* sp. Cr-10 from a chromate-contaminated site. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;90(3):1163-1169. Doi:10.1007/s00253-011-3120-y
- Zhou M, Wang H, Hassett DJ, Gu T. Recent advances in microbial fuel cells (MFCs) and microbial electrolysis cells (MECs) for wastewater treatment, bioenergy and bioproducts. *J Chem Technol Biotechnol*. 2013;88(4):508-518. Doi:10.1002/jctb.4004
- Zhu W, Lan Y, Lou X, Han N, Ran T, Xu L, *et al.* Isolation of proteorhodopsin-bearing bacterium JL-3 from fresh water and characterization of the proteorhodopsin. *FEMS Microbiol Lett*. 2013;344(1):10-17. Doi:http://dx.doi.org/10.1111/1574-6968.12144