



Biorreducción *in vitro* de cromo hexavalente utilizando consorcios microbianos

Bioreduction *in vitro* of hexavalent chromium using a microbial consortium

Stefany Serna-Toro^{1*}, Fabiana María Lora-Suarez¹, Nelsy Loango-Chamorro¹

Resumen

El constante desarrollo de las industrias, ha incrementado el uso del cromo ocasionando descargas en aguas residuales. Se ha planteado la implementación de biorremediación microbiana como alternativa ecológica, eficiente y económica de utilización de microorganismos para reducir el cromo a una forma menos tóxica. En este sentido, el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad de remoción de Cr (VI) de consorcios microbianos en distintas concentraciones. Para ello, se realizó una activación e identificación de microorganismos provenientes de aguas residuales con cromo, se establecieron siete consorcios microbianos evaluando su sinergia, curvas de crecimiento individuales y en consorcio. Posteriormente, se realizó una adaptación escalonada de los consorcios con ocho concentraciones de Cr (VI), efectuando modelos de regresión recíproca, curvas de crecimiento e identificando el consorcio con mayor remoción. Se encontró sinergia en los consorcios evaluados, evidenciándose curvas de crecimiento con mayor absorbancia en éstos que de forma individual, con mayor absorción en el consorcio *Candida famata-Serratia* sp. Sin embargo, en la adaptación escalonada, se demostró mayor capacidad de reducción de Cr (VI) en *Candida tropicalis-Serratia* sp. con 79,20% en la concentración de 100 ppm y una reducción del cromo total del 31,12%. A su vez, se identificó mayor adaptación de los consorcios en altas concentraciones de Cr (VI). En este estudio, se reporta por primera vez, al consorcio *C. tropicalis-Serratia* sp. con una interacción positiva y mayor capacidad metabólica de reducción, lo cual tendrá un impacto positivo en biorremediación de aguas residuales con cromo.

Palabras clave: biorremediación, consorcio microbiano, cromo hexavalente, cromo total, remoción

Abstract

Constant industrial development has increased the chromium use, resulting in chromium discharge into wastewater. The implementation of microbial bioremediation has been proposed as an ecological, efficient and economical alternative for the implementation of microorganisms to reduce chromium to a less toxic form. Our objective was to evaluate the Cr (VI) removal capacity of microbial consortia at different concentrations. Accordingly, an activation and identification of microorganisms from chromium-containing wastewater was carried out. Seven microbial consortia

¹Universidad del Quindío, Armenia, Quindío, Colombia.

* Autor de correspondencia: ssernat@uqvirtual.edu.co

Recibido: abril 27, 2023; aceptado: octubre 3, 2023; publicado: enero xx, 2024.

were established and their synergy, individual and consortium growth curves were evaluated. Subsequently, a scaled adaptation of the consortia was carried out with eight concentrations of Cr (VI). Reciprocal regression models and growth curves were used to identify the consortium with the highest removal. Synergy was found in the consortia evaluated; growth curves of consortia showed higher absorbance than individually, with higher absorption in the *Candida famata-Serratia* sp. consortium. However, in the scaled adaptation, greater Cr (VI) reduction capacity was demonstrated in *Candida tropicalis-Serratia* sp. with 79.20% at a concentration of 100 ppm with a total chromium reduction of 31.12%. At the same time, a greater adaptation of the consortia to high concentrations of Cr (VI) was identified. This is the first research to report *C. tropicalis-Serratia* sp. microbial consortium with a positive interaction and higher metabolic reduction capacity, which will have a positive impact on bioremediation of chromium-containing wastewater.

Keywords: bioremediation, chromium total, hexavalent chromium, microbial consortium, removal

INTRODUCCIÓN

El cromo (Cr) es el veintinueve elemento más abundante en la corteza terrestre que se encuentra de manera natural en ambientes como formaciones geológicas, especialmente en rocas ultramáficas y basálticas. Además, desempeña un papel fundamental en diversas actividades industriales, como el curtido de cuero, el cromado, la metalurgia, la galvanoplastia, la síntesis de pigmentos, las industrias químicas y la preservación de la madera, entre otros usos (Núñez et al., 2018). Sin embargo, su extenso uso ha generado grandes cantidades de desechos que contienen este elemento, produciendo contaminación en diversos entornos, incluyendo aguas superficiales, aguas subterráneas, suelos y sedimentos acuáticos (Kholisa et al., 2021).

En el medio ambiente, el cromo (Cr) se encuentra principalmente en dos estados de oxidación: Cr (III) y Cr (VI). El estado Cr (III) es uno de los micronutrientes esenciales en las plantas, el cual es moderadamente soluble en aguas subterráneas (He et al., 2019) y representa la configuración más estable del elemento debido a su marcada tendencia a formar complejos hexacoordinados, que son cinéticamente inertes frente al agua, ácidos orgánicos, sulfato, amoníaco, haluros y urea (Qiu et al., 2020). Contrariamente el Cr (VI), plantea un riesgo significativamente mayor debido a su solubilidad, permeabilidad y movilidad. Este estado del cromo es altamente tóxico, cancerígeno y mutagénico para los organismos vivos, incluso cuando se encuentra en concentraciones mínimas en el agua (Liu et al., 2020).

En consecuencia, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA) ha establecido los límites permisibles para el Cr (VI)

en agua doméstica, con un valor de 0,05 mg/L, y para la vida acuática, con un límite de 0,01 mg/L, normativas que también han sido adoptadas en Colombia mediante la Resolución 2115 de 2007. La USEPA, a su vez, ha incluido el cromo en la lista de diecisiete productos químicos que representan riesgos para la salud humana (Tang et al., 2021). Como resultado de estas regulaciones, se han implementado diversas alternativas físico-químicas para mitigar los impactos negativos en entornos contaminados con cromo, como la reducción química, el intercambio iónico, el tratamiento electroquímico y la separación por membrana, entre otros (Kholisa et al., 2021). Sin embargo, la mayoría de estas tecnologías suelen mostrar ineficacia y resultar costosas, especialmente debido a las bajas concentraciones de metales presentes. Además, el uso de reactivos químicos conlleva a la generación de grandes cantidades de lodos peligrosos, que requieren un tratamiento adicional (Mtimunye y Chirwa, 2014).

Dentro de las diversas estrategias innovadoras y económicamente viables, se destaca la biorremediación, que implica el uso de microorganismos o sus enzimas para reducir los niveles de metales pesados. Un enfoque particularmente prometedor es la utilización de microorganismos aislados de áreas contaminadas por cromo, conocido como biorreducción con microorganismos. Este método imita los procesos naturales de detoxificación y se caracteriza por ser poco invasivo, lo que lo convierte en una opción ecológicamente compatible para áreas contaminadas y con un costo reducido (Ma et al., 2019).

Hasta la fecha, la mayoría de los estudios de biorremediación aplicados al tratamiento de aguas



residuales han empleado cultivos individuales que se enfocan en uno o dos contaminantes específicos, principalmente el cromo (Malaviya y Singh, 2016). Sin embargo, dado que las aguas residuales suelen ser de naturaleza compleja y contienen una variedad de metales y sustancias orgánicas contaminantes, resulta evidente que la implementación de sistemas que involucran varios microorganismos en forma de consorcios microbianos es preferible para la biorremediación. Esto se debe a que no es factible encontrar un solo microorganismo capaz de abordar eficazmente una mezcla compleja de contaminantes diversos (Leonard y Mishra, 2022). Además, la utilización de microorganismos autóctonos procedentes de lugares contaminados en la formación de consorcios microbianos podría aumentar la eficacia en el tratamiento de los contaminantes, ya que estos microorganismos se han adaptado a las condiciones específicas de dicho entorno (Kholisa et al., 2021).

De esta manera, la implementación de microorganismos autóctonos representa una tecnología ampliamente aplicada para la gestión y reducción de contaminantes (Su et al., 2022). Estos forman un consorcio microbiano innato que habita en el suelo y en las superficies de los seres vivos, y poseen la capacidad de llevar a cabo procesos de biodegradación, biolixiviación y biocompostaje. Por lo tanto, su uso se presenta como una alternativa intrínsecamente atractiva y eficiente de preservar el medio ambiente (Kholisa et al., 2021). Debido a esta problemática, surge la necesidad de implementar un método de biorremediación microbiana in vitro, con consorcios provenientes de aguas residuales con cromo en el que se implementen microorganismos como *Raoultella* sp., *Serratia* sp., *Candida tropicalis* y *Candida famata* para la reducción de metales pesados como el Cr (VI).

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de los aislados microbianos

Los microorganismos utilizados en el presente estudio fueron recolectados previamente por el grupo de investigación en Enfermedades Cardiovasculares y Metabólicas (GECAVYME) en aguas residuales contaminadas con cromo, provenientes de un sector curtidor. Estos microorganismos fueron posteriormente aislados mediante el método de agotamiento por estría en

agar y conservados a temperatura de -80°C en la colección de microorganismos de la Universidad del Quindío (CMIUQ), bajo la supervisión del grupo de investigaciones en Ciencias Básicas y Educación (GICBE) (López et al., 2017).

Identificación y activación de los aislados microbianos

El proceso de activación se efectuó mediante la combinación de 7 mL de caldo Brain Heart Infusion (BHI) con 200 μL de muestra de los microorganismos aislados. Posteriormente, estos fueron incubados a $37,5^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas en el caso de las bacterias y a 35°C durante 48 horas para favorecer el crecimiento levaduriforme (Argote-Vega et al., 2017). A continuación, se procedió con la etapa de identificación mediante la siembra por agotamiento en placas utilizando diversos medios de cultivo, tales como agar MacConkey, agar con sangre, levadura peptona dextrosa (YPD) y Sabouraud con cloranfenicol (Fontalvo, 2012), incubando durante 24 horas en el caso de las bacterias y 48 horas para las levaduras. Se realizó la obtención de colonias aisladas con características macroscópicas con diferenciación en color y textura (Bou et al., 2011) y microscópicamente, específicamente para las bacterias empleando la técnica de tinción de Gram (Tobón y Hoyos, 2012). En complemento, se realizaron pruebas bioquímicas para las bacterias, tales como la prueba de la catalasa, la prueba de la oxidasa (reactivo de Kovacs), e Indol (Silva y Aguilera, 2020). Para las bacterias Gram-negativas, se empleó el sistema BD BBL Crystal ID (Gashaw et al., 2021).

En el caso de las levaduras, la identificación microscópica se realizó utilizando la técnica de cinta adhesiva con azul de lactofenol (Silva y Aguilera, 2020) y el sistema de pruebas bioquímicas API 20 C AUX (Alfonso et al., 2010). Para diferenciar las especies del género *Candida* spp., se empleó la prueba del tubo germinal (Yazdanpanah y Khaithir, 2013).

Pruebas de sinergia y/o antagonismo

La evaluación in vitro del antagonismo entre los microorganismos, se realizó mediante la determinación de inhibición de crecimiento entre ellos, aplicando pruebas de inhibición simultánea por sensi-discos (Gajic et al., 2022) y difusión en agar (Balouiri et al., 2016). Cada una de estas pruebas

se ejecutó por triplicado para garantizar la precisión de los resultados. Igualmente, se estandarizaron las concentraciones requeridas para cada microorganismo utilizando espectrofotometría. La actividad inhibitoria se evaluó observando la formación de halos de inhibición en las placas de cultivo.

Se realizó la prueba de inhibición simultánea basándose en la prueba de susceptibilidad Kirby-Bauer (Gajic et al., 2022). En este procedimiento, se sembraron de forma masiva cada uno de los microorganismos aislados en medio de agar BHI. Luego, se situaron tres discos de papel filtro de 5 mm de diámetro en la superficie de cada placa de Petri, los cuales se humedecieron con los microorganismos utilizados como antagonistas. Las placas se incubaron a 37,5 °C durante 24 horas. Para la aplicación del método de difusión en agar (Balouiri et al., 2016), se prepararon medios de agar BHI, inoculando individualmente 1 mL de cada uno de los microorganismos de estudio y realizando una siembra masiva. Luego, se agregaron 10 mL de agar BHI a cada placa y se perforaron tres agujeros de 6 a 8 mm de diámetro de manera aséptica con un sacabocados estéril. En estos agujeros, se añadieron 20 µL de cada organismo utilizado como antagonista. Las placas se incubaron a 37,5 °C durante 24 horas (Balouiri et al., 2016). En total se realizaron 24 pruebas de antagonismo por triplicado, es decir, 12 pruebas por inhibición simultánea y 12 pruebas por difusión en agar. En ambas pruebas se evaluó el efecto antagónico de las cuatro especies de microorganismos.

Establecimiento de curvas de crecimiento

El establecimiento de las curvas de crecimiento permitió analizar el crecimiento de los aislados microbianos en un proceso exponencial, donde cada generación representó un ciclo de división celular, y se calculó, graficando el aumento de células en un cultivo por unidad de tiempo. Se analizó el crecimiento de los aislados microbianos *C. famata*, *C. tropicalis*, *Raoultella* y *Serratia* sp. en un tiempo generacional (0-6 horas) detallando sus fases de crecimiento (latencia, exponencial, estacionaria y muerte celular). Posteriormente, se eligieron las combinaciones de consorcios definidos de la siguiente manera: *C. famata*-*Raoultella* sp., *Raoultella* sp.-*Serratia* sp., *C. tropicalis*-*C. famata*, *C. famata*-*Serratia* sp., *C. tropicalis*-*Raoultella* sp. y

C. tropicalis-*Serratia* sp.

El crecimiento de los consorcios se midió mediante la absorbancia por triplicado, a una densidad óptica (D.O.) de 600 nm en el espectrofotómetro Epoch BioTek (Winooski, USA) y en el software Gen 5.06 (Winooski, USA) (Dogan et al., 2011). Las curvas de crecimiento se graficaron en el software OriginPro 8 (Northampton, USA) teniendo en cuenta la media de las absorbancias de los aislados y los consorcios en función del tiempo.

Crecimiento del consorcio microbiano con Cr (VI)

Preparación de solución madre de Cr (VI)

Se preparó una solución madre a una concentración de 1000 mg/L de Cr (VI), empleando 2,829 g de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) por litro de agua destilada. La solución fue esterilizada y aforada en medio BHI, utilizando su máxima concentración para posterior uso de alícuotas pequeñas con mínima dilución del medio de cultivo (Avendaño-Flores, 2012).

Curva de calibración

Para cuantificar la reducción de Cr (VI) de los aislados microbianos y consorcio se realizó una curva de calibración, analizando químicamente siete soluciones patrón (0,15; 0,3; 0,45; 0,6; 0,75; 0,9 y 1,05) con el método 1,5-difenilcarbazida, considerando la adición de 1 mL de la solución madre, 0,5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) al 20%, 1 mL ácido fosfórico (H_3PO_4) al 80% y 1 mL de solución de 1,5-difenilcarbazida al 85% disuelta en acetona. La absorbancia de las soluciones patrones se midió a la longitud de onda de 543 nm, con celdas de 5 cm de paso óptico (Ceballos et al., 2017).

Adaptación de los consorcios microbianos en Cr (VI)

Una vez identificados los microorganismos y evaluada su sinergia, se establecieron siete consorcios microbianos: *Serratia* sp.-*C. tropicalis*, *Serratia* sp.-*C. famata*, *Serratia* spp.-*Raoultella* sp., *Raoultella* spp.-*C. famata*, *Raoultella* sp.-*C. tropicalis*, *C. tropicalis*-*C. famata*, y *Serratia* sp.-*Raoultella* sp.-*C. famata*-*C. tropicalis*. Cada consorcio se sometió a un proceso de adaptación escalonada, inoculando inicialmente 9 mL de



medio de la solución madre en medio de cultivo con Cr (VI) a 0,05 ppm y 1 mL del consorcio microbiano previamente activado en medio BHI (pH 7,4), incubados en un Shaker Thermo Scientific (Waltham, USA) a 100 rpm a 37 °C durante 10 horas.

La adaptación se desarrolló mediante un escalonamiento de ocho concentraciones de Cr (VI), iniciando con 0,5 ppm, una vez crecieron los consorcios a esta concentración, se incrementó a 1,56 ppm; 3,12 ppm; 6,25 ppm; 12,5 ppm; 25 ppm; 50 ppm y 100 ppm de Cr (VI), durante un periodo de 10 horas, distribuidos en rangos de tiempo clasificados del 0 a 5, donde el 0 representa el inicio, y los números 1, 2, 3, 4 y 5 equivalen 2, 4, 6, 8 y 10 horas de adaptación, respectivamente.

Cada adaptación en los consorcios se realizó por triplicado. Los rangos de concentración de Cr (VI) fueron establecidos teniendo en cuenta la normativa para el Cr (VI) en aguas para consumo humano, donde la concentración máxima permitida es de 0,05 mg/L de acuerdo a la resolución 2115 de 2007 de Colombia y la Organización Mundial de la Salud (OMS) (World Health Organization, 2021). Se tomaron las densidades ópticas de cada consorcio bajo las diferentes concentraciones de Cr (VI) y se compararon las curvas de crecimiento. La densidad óptica fue medida en un espectrofotómetro GENESYS 10UV (Waltham, USA) a una longitud de onda de 600 nm, empleando BHI sin cromo como blanco. Las gráficas se realizaron en el programa OriginPro 8 (Northampton, USA).

Además, se realizó un modelo de regresión recíproca ($Y = a + b/X$) que evaluó cómo las tasas de crecimiento varían en relación con la remoción de concentraciones de Cr (VI). Esta regresión analizó la relación entre una variable independiente (X), que representa las curvas de crecimiento de los consorcios microbianos, y una variable dependiente (Y), que refleja la remoción de Cr (VI). El modelo se basa en una función recíproca y busca comprender cómo los cambios en las curvas de crecimiento de los consorcios afectan la remoción de Cr (VI) en diferentes concentraciones (0,5 ppm; 1,56 ppm; 3,12 ppm; 6,25 ppm; 12,5 ppm; 25 ppm; 50 ppm y 100 ppm), considerando que las curvas de crecimiento se encuentran en el denominador de la ecuación. Se calcularon los promedios de los datos triplicados y se evaluaron los valores de $p < 0,05$, coeficiente de determinación (R^2), coeficiente

de correlación y autocorrelación de residuos con un rezago de 1 (lag 1), que midiera la relación temporal de los residuos en el modelo.

Los valores positivos y significativos indican una correlación positiva, lo que podría sugerir falta de consideración de la dependencia temporal. Valores negativos y significativos sugieren una correlación negativa, que podría indicar una sobreestimación de la dependencia temporal o errores sistemáticos. Valores cercanos a cero o no significativos indican una adecuada captura de la estructura temporal en los datos por parte del modelo. Los anteriores análisis se realizaron en el software Statgraphics Centurion XVI (Warrenton, USA).

Evaluación del porcentaje remoción de Cr (VI)

Cada triplicado se centrifugó a 10.000 rpm durante 5 minutos, se tomó el sobrenadante y se determinó por el método colorimétrico con 1,5-difenilcarbazida, específico para el Cr (VI) (American Public Health Association et al., 2012). Se empleó el espectrofotómetro Epoch BioTek (Winooski, USA) y el software Gen5 2.06 (Winooski, USA) medido a una D.O. de 540 nm para realizar las mediciones de Cr (VI). Las concentraciones de Cr (VI) se determinaron a partir de una curva de calibración previamente elaborada (Ceballos et al., 2017). Luego, se llevaron a cabo las curvas de reducción en presencia de 1,5-difenilcarbazida, donde se evaluó y comparó la reducción del cromo. Estas representaciones gráficas se generaron utilizando el programa OriginPro 8 (Northampton, USA).

La cuantificación del cromo total se efectuó utilizando el método de espectrofotometría de absorción atómica (AA). Este proceso incluyó la preparación de soluciones de cromo a una concentración de 100 ppm, así como la creación de soluciones patrón de trabajo con concentraciones de 1, 2, 3 y 5 ppm. Luego, se llevaron a cabo etapas que abarcaron la digestión de la muestra, la filtración, la dilución y la lectura en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 357,9 nm. A partir de los datos obtenidos, se construyó una curva de calibración mediante la correlación de los valores de absorbancia, y mediante la extrapolación de la ecuación obtenida, se determinó la cantidad de cromo total presente. Para calcular el porcentaje de remoción de cromo, se realizó la diferencia entre el porcentaje Cr (VI), menos el porcentaje de Cr total (% remoción Cr = Cromo (VI) - Cromo total)

(Soto-Rueda et al., 2017).

RESULTADOS

Identificación bacteriana y fúngica

Se identificó la bacteria *Serratia* sp., con colonias de forma redonda, color blanco, elevadas con borde entero, superficial y con apariencia cremosa; gram negativa, pruebas catalasa e indol negativas; confirmada por prueba BBL Crystal. Por otro lado, la bacteria *Raoultella* sp., evidenció colonias con morfología puntiforme, superficial, de elevación acuminada, borde entero, color amarillo y apariencia cremosa, gram negativa, prueba indol y catalasa negativos; confirmada por prueba BBL Crystal.

Adicionalmente, los microorganismos levaduriformes *C. famata* y *C. tropicalis* también fueron identificados. *C. famata* con morfología ligeramente abombada de consistencia mantecosa, ausencia de pseudohifas y de blastoconidios. La levadura creció con los sustratos de glucosa, glicerol, 2-ceto-gluconato cálcico, xilosa, adonitol, xilitol, galactosa, sorbitol, glucopiranosida, N-acetil glucosamida, maltosa, sacarosa, trehalosa y melezitosa lo que confirmó su identificación. *C. tropicalis* mostró una morfología ligeramente abombada con consistencia mantecosa; extensión de un filamento denominado pseudohifa, formación de blastoconidios. Por último, la levadura creció posterior a

las 72 horas, en los sustratos bioquímicos glucosa, 2-ceto-gluconato cálcico, xilosa, adonitol, galactosa, sorbitol, metil- glucopiranosida, N-acetil glucosamina, maltosa, sacarosa, trehalosa y melezitosa lo que apoyó su identificación.

Pruebas de antagonismo

Las pruebas de inhibición simultánea y difusión en agar mostraron un crecimiento de las especies con un halo de inhibición de 0 mm. Lo cual demostró un efecto sinérgico entre las especies *C. tropicalis*, *C. famata*, *Serratia* sp. y *Raoultella* sp. indicando interacciones positivas (anexos 1 y 2).

Establecimiento de curvas de crecimiento

En las curvas de crecimiento individuales de los microorganismos, se demostró mayor desempeño en *C. famata* con una absorción de 1,238 (D.O. 600 nm) en su fase exponencial en su tercera hora (figura 1A), seguido de la bacteria *Serratia* sp. con una absorción máxima en su fase exponencial de 1,2035 a la cuarta hora (figura 1A). Con respecto a las curvas de crecimiento de los consorcios mixtos, se encontró la máxima absorción de 1,2940 (D.O. 600 nm) en el consorcio *C. famata*-*Serratia* sp., no evidenciando inhibición o competición en la actividad microbiana durante esta fase (figura 1B). En la fase estacionaria posterior a la tercera hora en todos los consorcios evaluados, permanecieron casi invariables sin aumento en el número de células y con reducción en la actividad metabólica

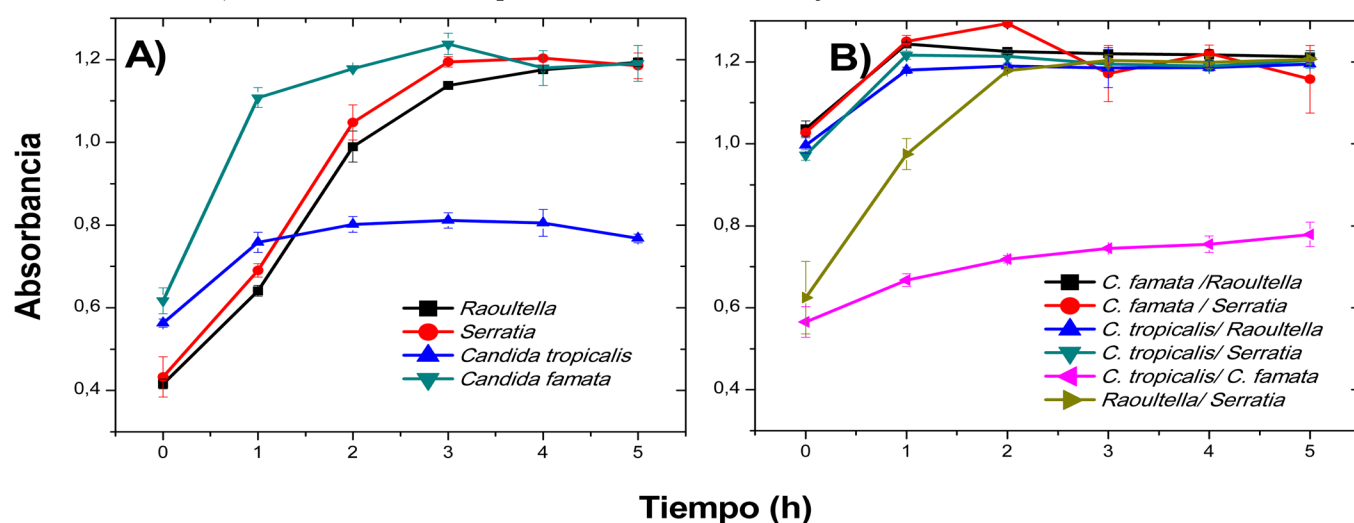


Figura 1. Curvas de crecimiento a una absorbancia de 600 nm de los microorganismos individuales (A): *Raoultella* sp., *Serratia* sp., *C. tropicalis* y *C. famata* y en consorcios mixtos (B) definidos de la siguiente manera: *C. famata*-*Raoultella* sp., *C. famata*-*Serratia* sp., *C. tropicalis*-*Raoultella* sp., *C. tropicalis*-*Serratia* sp., *C. tropicalis*-*C. famata* y *Raoultella* sp.-*Serratia* sp. Los números 0, 1, 2, 3, 4 y 5 equivalen 0, 2, 4, 6, 8 y 10 horas de adaptación, respectivamente.

implicando una posterior fase de muerte celular.

En comparación con el crecimiento individual de los microorganismos y de los consorcios mixtos, se evidenció una mayor velocidad de crecimiento en la mayoría de los consorcios (figura 1). De acuerdo al comportamiento identificado en las curvas, se demostró sinergia entre los microorganismos debido a que en consorcio aumentaron su velocidad de crecimiento y lograron mantenerse en fase estacionaria al mismo tiempo que las curvas de los organismos individuales.

Adaptación y remoción de consorcios para la reducción de Cr (VI)

La curva de calibración relaciona la concentración de Cr (VI) de las siete soluciones patrón en cuanto a la función de la absorbancia medida a una longitud de onda de 543 nm, dichas mediciones fueron realizadas por triplicado y promediadas, considerando como variable dependiente la absorbancia y como variable independiente la concentración de Cr (VI) ($A = 0,0073 + 0,7005*[Cr]$) obteniendo un R^2 del 98,67% (figura 2) evidenciando la linealidad prevista por la ley de

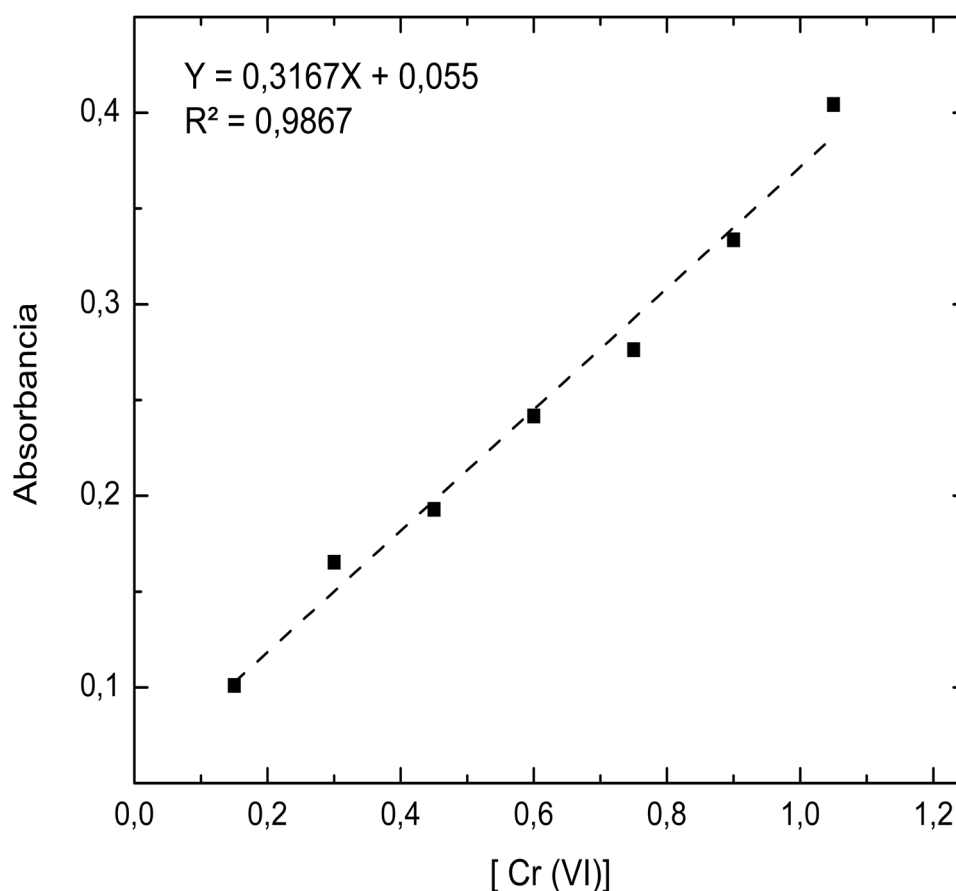


Figura 2. Curva de calibración de la concentración de Cr (VI) mg/mL vs absorbancia por análisis colorimétrico de la 1,5-difenilcarbazona.

Lambert-Beer (Díaz et al., 2010).

Al evaluar la capacidad de adaptación y remoción de los consorcios en ocho concentraciones de Cr (VI), se identificó mayor adaptación en los consorcios de *Serratia* spp.-*C. tropicalis* y *Raoultella* spp.-*C. tropicalis* en los tiempos 4 y 5 que correspondían a las 8 y 10 horas de exposición al Cr (VI), en todas las concentraciones respectivas (anexos 3-6). Adicionalmente, se observó mayor adaptación de los consorcios a partir de la concentración 6,25 ppm de Cr (VI) hasta 100 ppm

de Cr (VI), dado que a medida que aumentaba la concentración de Cr (VI), los consorcios crecieron a mayor absorción. Sin embargo, demoraron más en iniciar su fase exponencial (figura 3).

La mayor adaptación y remoción en los consorcios fue en las concentraciones más altas de Cr (VI) (25, 50 y 100 ppm). De forma específica el consorcio *Serratia* spp.-*C. tropicalis* tuvo los mejores desempeños en remoción y adaptación en cinco de las ocho concentraciones (3,12 ppm, 12,5 ppm, 25 ppm, 50 ppm y 100 ppm) (anexos 3-6).

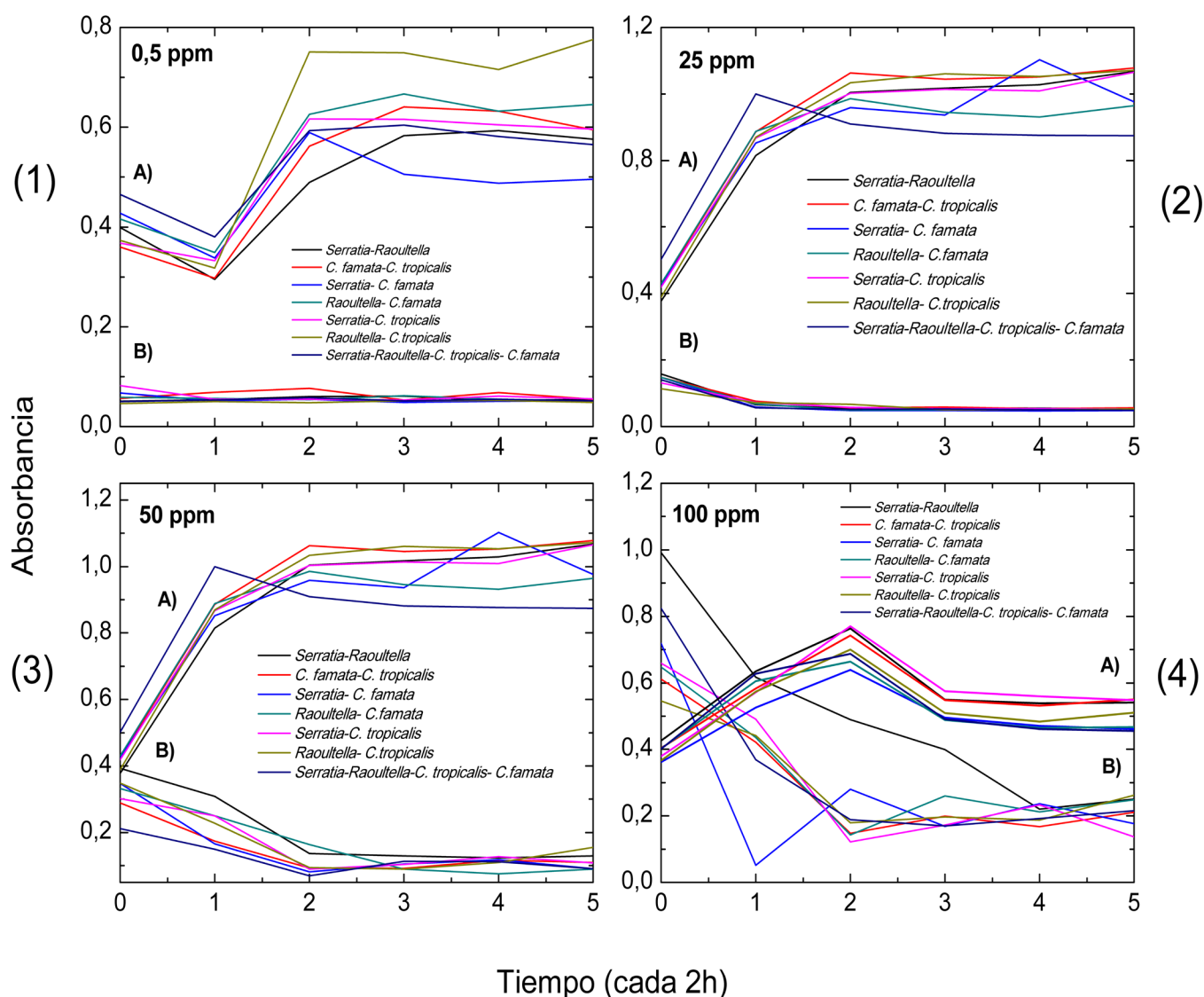


Figura 3. Valores de absorbancia obtenidos para cada uno de los consorcios microbianos establecidos *Serratia* sp.-*Raoultella* sp.; *C. famata*-*C. tropicalis*; *Serratia* sp.-*C. famata*; *Raoultella* sp.-*C. famata*; *Serratia*-*C. tropicalis*; *Raoultella* sp.-*C. tropicalis* y *Serratia* sp.-*Raoultella* sp.-*C. tropicalis*-*C. famata*. A. representa las curvas de crecimiento de cada consorcio. B. representa la adaptación al cromo (VI) en cada consorcio a diferentes concentraciones: 0,5 ppm (1), 25 ppm (2), 50 ppm (3) y 100 ppm (4). Los números 0, 1, 2, 3, 4 y 5 equivalen 0, 2, 4, 6, 8 y 10 horas de adaptación, respectivamente.

Con respecto al modelo de la regresión recíproca, se evidenció significancia en la mayoría de los consorcios evaluados en concentraciones mayores a 12,5 ppm. Los coeficientes de determinación indicaron que la relación de la remoción de Cr (VI) en concentraciones de 25 ppm frente a las curvas de crecimiento de los consorcios *C. tropicalis*-*Serratia* sp., *C. famata*-*Serratia* sp. y *C. tropicalis*-*C. famata*, explicaron en un 97,32%, 97,47% y 98,35% respectivamente los valores. La autocorrelación residual rezagada (LRA) arrojó valores negativos en las concentraciones de Cr (VI) de 0,5 ppm, 1,56

ppm y 3,12 ppm (exceptuando consorcio *Serratia* sp.-*Raoultella* sp.-*C. tropicalis*-*C. famata*), de 6,25 ppm, 12,5 ppm y 25 ppm (exceptuando consorcio *Serratia* sp.-*Raoultella* sp.-*C. tropicalis*-*C. famata*) y de 50 ppm, lo que indicó una correlación negativa y posible sobrestimación en el modelo. No obstante, el valor cercano a 0 en la concentración de 100 ppm en el consorcio *C. tropicalis*-*Serratia* sp. (LRA= 0,27) mostró una adecuada captura de la estructura temporal en los datos por parte del modelo (tabla 1).

Tabla 1. Valores de la regresión recíproca de la relación entre las variables independientes (X): curvas de crecimiento de los consorcios microbianos, y las variables dependientes (Y): remoción de Cr (VI) en diferentes concentraciones

Consortio	Concentraciones de Cr (VI) (ppm)																															
	0,5 ppm				1,56 ppm				3,12 ppm				6,25 ppm				12,5 ppm				25 ppm				50 ppm				100 ppm			
	p-valor	R ²	LRA	p-valor	R ²	LRA	p-valor	R ²	LRA	p-valor	R ²	LRA	p-valor	R ²	LRA	p-valor	R ²	LRA	p-valor	R ²	LRA	p-valor	R ²	LRA	p-valor	R ²	LRA	p-valor	R ²			
<i>C. tropicalis-Serratia</i> sp.	0,356	21,353	-0,409	0,266	29,454	-0,611	0,596	7,655	-0,167	0,061	62,691	-0,268	0,0029*	91,374	-0,625	0,0003*	97,321	-0,555	0,0415*	68,686	-0,323	0,057	63,713	0,278								
<i>C. famata-Serratia</i> sp.	0,810	1,626	-0,190	0,340	22,626	-0,237	0,301	26,013	-0,139	0,822	1,325	-0,507	0,0014*	93,957	-0,144	0,0002*	97,472	-0,201	0,0016*	93,607	-0,451	0,095	54,283	-0,500								
<i>Raoultella</i> sp. - <i>Serratia</i> sp.	0,535	10,288	0,120	0,066	61,322	-0,102	0,059	63,143	-0,188	0,571	8,493	-0,771	0,0003*	97,185	-0,135	0,0029*	91,281	-0,413	0,0225*	76,550	-0,153	0,3825*	19,366	0,570								
<i>C. famata-Raoultella</i> sp.	0,720	3,559	-0,194	0,070	60,045	-0,483	0,710	3,836	-0,511	0,805	1,714	-0,386	0,0001*	0,993	0,284	0,0003*	97,225	-0,566	0,559	64,016	0,345	0,279	0,530	0,509								
<i>C. tropicalis-Raoultella</i> sp.	0,511	11,476	-0,410	0,388	18,948	-0,338	0,470	13,735	-0,176	0,815	1,543	-0,127	0,037*	70,301	-0,280	0,0041*	89,713	-0,253	0,0125*	82,302	-0,180	0,183	39,333	0,454								
<i>C. tropicalis-C. famata</i>	0,823	1,399	-0,440	0,698	4,173	-0,089	0,170	41,093	0,031	0,986	0,009	-0,351	0,0009*	95,104	-0,320	0,0001*	98,359	-0,530	0,0024*	92,135	-0,253	0,0784*	58,012	0,553								
<i>Serratia</i> sp.- <i>Raoultella</i> sp.- <i>C. tropicalis-C. famata</i>	0,552	9,510	-0,380	0,377	19,803	-0,317	0,0112*	82,678	0,161	0,194	37,831	-0,080	0,0255*	75,106	-0,077	0,0034*	90,680	0,001	0,060	62,773	-0,357	0,307	25,536	0,519								

p-valor <0,05; LRA autocorrelación residual rezagada

Evaluación del porcentaje de remoción de Cr (VI) en los consorcios microbianos

La capacidad de reducción de Cr (VI) se comprobó para cada consorcio microbiano a una concentración que oscilaba entre 0,5 ppm a 100 ppm. El consorcio microbiano con mayor reducción de Cr (VI) fue el consorcio 5 (*Serratia* sp.-*C. tropicalis*) a concentraciones de 100 ppm con 79,20% de

reducción, seguido del consorcio 3 (*Serratia* sp.-*C. famata*) con 73,68% en concentraciones de 50 ppm (tabla 2). El consorcio con mejor desempeño en la mayoría de concentraciones (0,5 ppm, 3,12 ppm, 6,25 ppm, 100 ppm) fue el 5 (*Serratia* sp.-*C. tropicalis*) (tabla 2). No obstante, ninguno de los consorcios removió el 100% de Cr (VI) en el periodo de 10 horas.

Tabla 2. Porcentaje de reducción de Cr (VI) en concentraciones de 0,5 ppm a 100 ppm en siete consorcios

Concentración de Cr (VI) (ppm)	Consortio 1	Consortio 2	Consortio 3	Consortio 4	Consortio 5	Consortio 6	Consortio 7
0,5	0,00	2,96	23,38	12,57	31,84	0,00	0,00
1,56	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
3,12	0,00	0,00	0,00	1,36	5,56	0,00	13,94
6,25	4,46	0,00	0,00	1,3	7,47	6,62	0,68
12,5	27,96	26,82	26,67	19,78	25,81	15,66	31,58
25	65,75	62,08	67,42	66,59	59,8	53,96	64,52
50	67,01	61,98	73,68	72,85	63,83	55,35	57,23
100	74,75	65,43	75,46	61,59	79,2	51,93	73,82

consorcio 1: *Serratia* sp.-*Raoultella* sp.; consorcio 2: *C. famata*-*C. tropicalis*; consorcio 3: *Serratia* sp.-*C. famata*; consorcio 4: *Raoultella* sp.-*C. famata*; consorcio 5: *Serratia* sp.-*C. tropicalis*; consorcio 6: *Raoultella* sp.-*C. tropicalis*; consorcio 7: *Serratia* sp.-*Raoultella* sp.-*C. tropicalis*-*C. famata*.

Cuantificación y remoción de cromo total

El consorcio 5 (*Serratia* sp.-*C. tropicalis*) a concentración de 100 ppm se seleccionó para la evaluación de cuantificación de cromo total y remoción, debido a que presentó el mejor desempeño en frente a los demás consorcios y concentraciones evaluadas, así como también por su LRA cercano a 0, que indicó una adecuada representación del modelo en su relación temporal. Por lo anterior, la curva de calibración de los valores de absorbancia mostró un ajuste lineal de $R^2=0,997$ con concentración de cromo total inicial (T0) de 1,07 mg/L a 0,85 mg/L al tiempo T5 evidenciando una reducción en la concentración de cromo total en el tiempo final (figura 4). Además, los datos obtenidos de Cr (VI) y Cr total para determinar el porcentaje de reducción arrojaron una remoción de cromo del 31,12 % para este consorcio. A continuación, se evidencia la muestra del cálculo realizado.

$$\% \text{ remoción Cr} = \frac{\text{Cromo (VI)} - \text{Cromo total}}{\text{Cromo total}} \times 100$$

$$\% \text{ remoción Cr} = \frac{79,20 - 48,079}{48,079} \times 100$$

$$\% \text{ remoción Cr} = 31,12\%$$

DISCUSIÓN

El uso de consorcios microbianos para la remoción del Cr (VI) ha sido poco abordada. No obstante, en el presente estudio, se encontró que los consorcios microbianos pueden ser eficientes para llevar a cabo esta reducción, ya que, se evidenciaron interacciones microbianas de tipo sinérgico en los cinco consorcios utilizados (*Raoultella* sp.-*C. tropicalis*, *Raoultella* sp.-*C. famata*, *Serratia* sp.-*C. tropicalis*, *Serratia* sp.-*C. famata*, *Raoultella* sp.-*Serratia* sp.-*C. tropicalis*-*C. famata*, evidenciándose una mayor sinergia y capacidad de reducción de Cr (VI) en el consorcio *C. tropicalis*-*Serratia* sp., que alcanzó porcentajes de remoción del 79,20% en la concentración de 100 ppm.

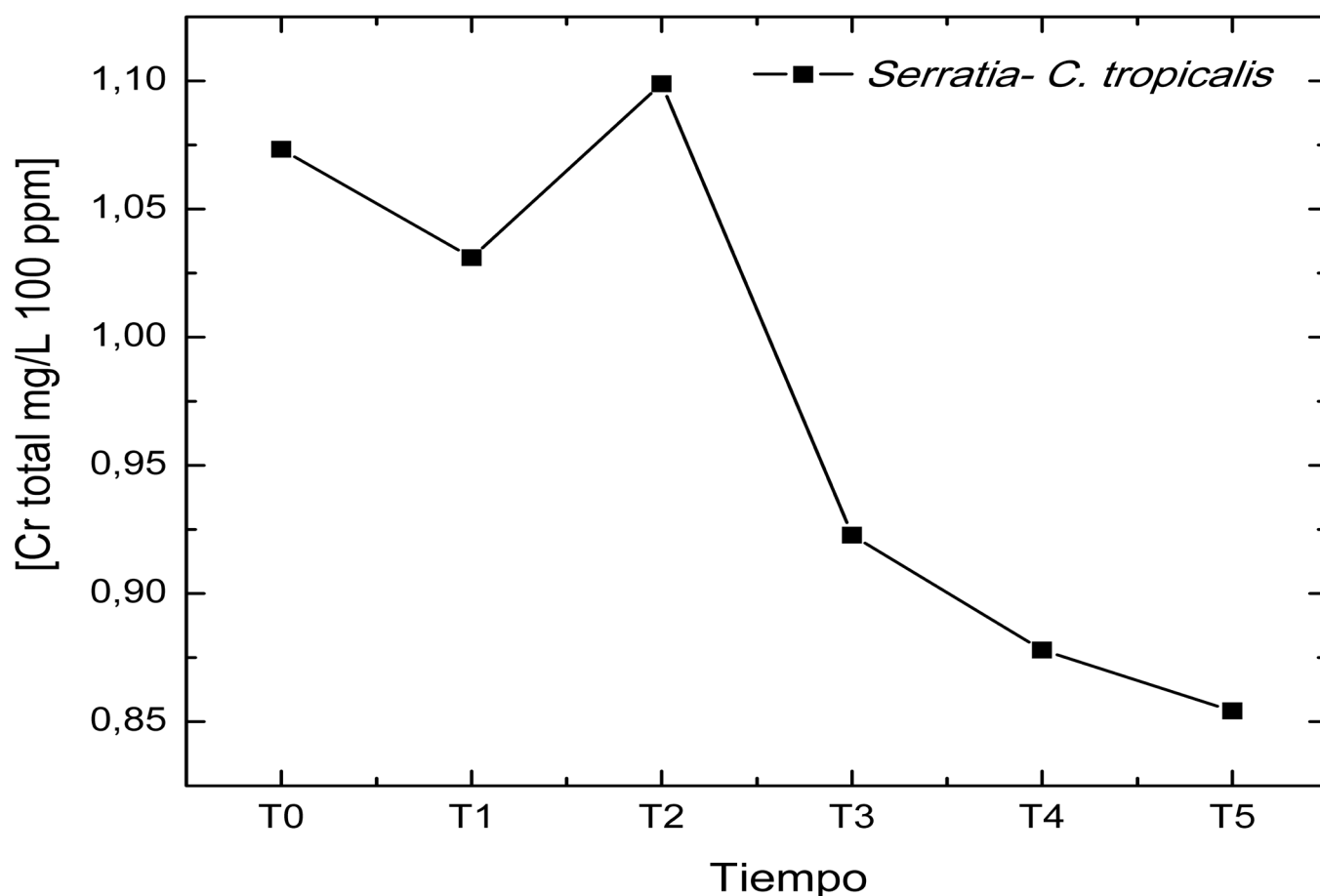


Figura 4. Cuantificación de cromo total (mg/L) a concentración de 100 ppm en el consorcio *Serratia* sp.-*C. tropicalis*. T corresponde al tiempo cada dos horas con un tiempo final (T5) respectivo de 10 horas.

Según Zhang et al. (2018) el comportamiento de remoción de los microorganismos puede deberse a diversos mecanismos de reducción de Cr (VI), que incluyen la reducción por DT-diaforasa, aldehído oxidasa en el citoplasma celular, cromo reductasa, citocromo P450 en la membrana celular y la nitrorreductasa, mecanismos que, según los autores, se activan cuando los microorganismos son inducidos a una fase de adaptación con metales pesados, debido a que en este proceso se suelen generar las respuestas mediante la activación o modificación de algunas vías metabólicas, con el fin de hacer frente a estas sustancias tóxicas.

Así mismo, Singh et al. (2019) exponen que los efectos sinérgicos pueden deberse al aumento de la actividad metabólica de los microorganismos que interactúan como resultado de una asociación positiva entre ellos. Esta sinergia en los consorcios ofrece beneficios como producir metabolitos durante procesos de biodegradación que pueden ser utilizados por otras cepas (Khanpour y Partovinia, 2021). En este sentido, en los cinco consorcios

microbianos (*Raoultella* sp.-*C. tropicalis*, *Raoultella* sp.-*C. famata*, *Serratia* sp.-*C. tropicalis*, *Serratia* sp.-*C. famata*, *Raoultella* sp.-*Serratia* sp.-*C. tropicalis*-*C. famata*) se evidenciaron interacciones microbianas de tipo sinérgico, indicando que no hay efecto de antibiosis, competencia por espacio o por nutrientes, e interacciones directas que impidieron el libre desarrollo de las especies.

En este sentido, se ha reportado el rol de las bacterias y los hongos en la transformación de metales pesados mediante su previa adaptación (Rodríguez y Quezada 2020). En particular, las bacterias realizan un proceso más enzimático, donde la proteína ChrA constituye un determinante de resistencia a Cr (VI) funcionando como una bomba expulsora del ión. La habilidad para la reducción de Cr (VI) a Cr (III) se ha encontrado en muchos géneros de bacterias como *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Achromobacter*, *Microbacterium*, *Corynebacterium* y *Arthrobacter* (Sharma y Adholeya, 2012) y *Serratia* spp. (He et al., 2018). Esta última, fue evaluada por He et

al, (2018) donde informaron que el metabolismo del cromato en *Serratia* sp. presenta un alto potencial para la resistencia y eliminación del Cr (VI) mediante un sistema complejo de genes relacionados ChrA, ChrB, y ChrAB, en donde, las proteínas ChrA y ChrAB expresaron alta resistencia a Cr (VI) mientras que el gen ChrB podría tener un papel regulador positivo.

Por otro lado, los hongos han sido igualmente utilizados en procesos de biorremediación y bioabsorción de metales pesados, como el Cr (VI), realizando un balance entre la incorporación, expulsión y captura del metal (Vélez-Zuluaga, 2018). La captura de cromo en la superficie de hongos filamentosos y de levaduras, se ha descrito como resultado de su unión con los polisacáridos de la pared celular, como glucanos, quitina y quitosano, los cuales pueden estar asociados con proteínas y otros componentes menores como lípidos y melaninas (Vélez-Zuluaga, 2018). Este mecanismo es usado por *C. tropicalis*, la cual se ha reportado con capacidad de biosorción, eliminando eficientemente el 80% de cromo del medio en 12 días de incubación, por la cantidad de sitios de unión de metales pesados en sus paredes celulares, lo que le permite absorber iones metálicos nocivos en el medio y reducirlos a Cr (III) menos dañino e insoluble mediante la enzima cromato reductasa (Elahi et al., 2020).

Los microorganismos *Serratia* sp. y *C. tropicalis* han sido empleados en anteriores estudios, no obstante, ambos microorganismos no han sido anteriormente utilizados en consorcio. Heredia et al, (2022), identificaron un consorcio microbiano compuesto por especies como *Staphylococcus xylosus*, *Saccharomyces cerevisiae* y *C. tropicalis*, capaz de reducir el 98% de cromo (VI) a 10 mg/L y 67% del cromo total, en aguas residuales textiles. Mientras que, *Serratia* spp., se ha utilizado en consorcios bacterianos junto con *Arthrobacter* sp. con una eficiencia de $82,1 \pm 1,22\%$ de remoción de 30 mg/L Cr (VI) (Ge et al., 2021).

Finalmente, se concluye que la asociación positiva y sinergia de los microorganismos evaluados, su crecimiento benéfico y óptimo en medios sólidos, potencializa el crecimiento de los consorcios microbianos establecidos. Estos consorcios, demostraron su resistencia al cromo, con mayor adaptación y remoción en el consorcio *C. tropicalis*-*Serratia* spp. especialmente en concentraciones de

100 ppm de Cr (VI), con una remoción total del 31,12%.

Esto puede deberse por un lado, a que las sustancias bioactivas como las hormonas y las enzimas producidas por las levaduras (Rodríguez y Quezada 2020) como *C. tropicalis* hayan promovido la división activa celular y radical, generando sustratos que fueron utilizados por bacterias (Rodríguez y Quezada 2020) como *Serratia* sp., que pueden potencializar el crecimiento del consorcio. Lo anterior, demuestra que tanto *C. tropicalis* como *Serratia* spp. en consorcio presentan una interacción positiva con mayor capacidad metabólica de reducción con respecto a los demás consorcios evaluados. Por último, se destaca la importancia de esta investigación, por ser el primer estudio en reportar este consorcio microbiano autóctono con alta adaptación y reducción al Cr (VI) y con posibles impactos positivos en futuros estudios de biorremediación de aguas residuales con cromo.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Universidad del Quindío y a la Universidad Politécnica de Sinaloa, por su apoyo administrativo y por propiciar sus instalaciones de instrumentación para este trabajo de investigación

CONTRIBUCIÓN DE AUTORÍA

Fabiana María Lora-Suarez y Nelsy Loango-Chamorro, participaron en la orientación metodológica y dirección estratégica a lo largo de todas las fases del estudio, y en la supervisión global del proceso investigativo. Además, contribuyeron en el análisis crítico de datos y la redacción del manuscrito. Stefany Serna-Toro, participó en el diseño del estudio, la implementación y realización de los experimentos, la adquisición de datos y su posterior análisis y en la escritura del manuscrito. Todas las autoras revisaron y aprobaron la versión final del manuscrito.

CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Alfonso, C., López, M., Arechavala, A., Perrone, M. del

- C., Guelfand, L., & Bianchi, M. (2010). Identificación presuntiva de *Candida* spp. y de otras levaduras de importancia clínica: utilidad de brilliance *Candida* Agar. *Revista Iberoamericana de Micología*, 27(2), 90-93. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2010.01.008>
- American Public Health Association, American Water Works Association, Eugene W. Rice, Laura Bridgewater, Water Environment Federation [Ed.]. (2012). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. Washington D.C., USA: American Public Health Association. [https://www.scrip.org/\(S\(vtj3fa45qm1ean45vvfcz55\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1670401](https://www.scrip.org/(S(vtj3fa45qm1ean45vvfcz55))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1670401)
- Argote-Vega, F. E., Suarez-Montenegro, Z. J., Tobar-Delgado, M. E., Perez-Alvarez, J. A., Hurtado-Benavides, A. M., & Delgado-Ospina, J. (2017). Evaluation of the inability capacity of essential oils in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Revista Unicauca Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 15(2), 52-60. <https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/593>
- Avendaño-Flores, Y. S. (2012, Diciembre 10). *Biorreducción de Cr(VI) a Cr(III) por bacterias resistentes a cromo aisladas del río Lerma* [Tesis de maestría]. Universidad Autónoma del Estado de México, Ciudad de México. <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/80076>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., & Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 29(8), 601-608. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.03.012>
- Ceballos, D., Pinta-Melo, J., Fernández Izquierdo, P., Ibarguen-Mondragon, E., Hidalgo Bonilla, S., & Burbano-Rosero, E. (2017). Efficiency in the reduction of chromium by a wild bacterium in a batch treatment type using residual water substrate from the municipality of Pasto, Colombia. *Universidad y Salud*, 19, 102-115. <https://doi.org/10.22267/rus.171901.74>
- Díaz, N. A., Ruiz, J. A. B., Reyes, E. F., Cejudo, A. G., Novo, J. J., Peinado, J. P., Meléndez-Valdés, F. T., & Fiñana, I. T. (2010). Espectrofotometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. *Universidad de Córdoba*, 1-8.
- Dogan, N. M., Kantar, C., Gulcan, S., Dodge, C. J., Yilmaz, B. C., & Mazmanci, M. A. (2011). Chromium(VI) bioremoval by *Pseudomonas* bacteria: Role of microbial exudates for natural attenuation and biotreatment of Cr(VI) contamination. *Environmental Science & Technology*, 45(6), 2278-2285. <https://doi.org/10.1021/es102095t>
- Elahi, A., Arooj, I., Bukhari, D. A., & Rehman, A. (2020). Successive use of microorganisms to remove chromium from wastewater. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(9), 3729-3743. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10533-y>
- Fontalvo, J. L. (2012). *Manual de prácticas de laboratorio de Microbiología* (1.a ed.). Editorial Unimagdalena. <https://doi.org/10.2307/j.ctt1zk0mfb>
- Gajic, I., Kabic, J., Kekic, D., Jovicevic, M., Milenkovic, M., Mitic Culafic, D., Trudic, A., Ranin, L., & Opavski, N. (2022). Antimicrobial Susceptibility Testing: A Comprehensive Review of Currently Used Methods. *Antibiotics*, 11(4), 427. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040427>
- Gashaw, M., Marame, Z. H., Abera, M., & Ali, S. (2021). Assessment of gut bacteria profile and antibiotic resistance pattern among psychotropic drug users: comparative cross-sectional study. *Infection and Drug Resistance*, 14, 1875-1881. <https://doi.org/10.2147/IDR.S305992>
- Ge, S., Gu, J., Ai, W., & Dong, X. (2021). Biotreatment of pyrene and Cr(VI) combined water pollution by mixed bacteria. *Scientific Reports*, 11(1), 114. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80053-2>
- He, Y., Dong, L., Zhou, S., Jia, Y., Gu, R., Bai, Q., Gao, J., Li, Y., & Xiao, H. (2018). Chromium resistance characteristics of Cr(VI) resistance genes *ChrA* and *ChrB* in *Serratia* sp. S2. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 157, 417-423. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.079>
- He, X., Wu, J., & He, S. (2019). Hydrochemical characteristics and quality evaluation of groundwater in terms of health risks in *Luohe aquifer* in Wuqi County of the Chinese Loess Plateau, northwest China. *Human and Ecological Risk Assessment*, 25, 32-51. <https://doi.org/10.1080/10807039.2018.1531693>
- Heredia, M., Layedra-Almeida, A. P., Torres, Y., & Toulkeridis, T. (2022). Evaluation of a microbial consortium and selection of a support in an anaerobic reactor directed to the bio-treatment of wastewater of the textile industry. *Sustainability*, 14(14), 8889. <https://doi.org/10.3390/su14148889>
- Khanpour, E., & Partovinia, A. (2021). *Synergistic and Antagonistic Effects of Microbial Co-culture on Bioremediation of Polluted Environments* (pp. 229-265). Singapore: Springer Nature. https://doi.org/10.1007/978-981-15-7455-9_10
- Kholisa, B., Matsena, M., & Chirwa, E. M. N. (2021). Evaluation of Cr(VI) reduction using indigenous bacterial consortium isolated from a municipal wastewater sludge: batch and kinetic studies. *Catalysts*, 11(9), 1100. <https://doi.org/10.3390/catal11091100>
- Leonard, J., & Mishra, S. (2022). Optimization of parameters

- for the detoxification of Cr(VI) by the microbial consortium developed from the isolates of chromite mines. *Geomicrobiology Journal*, 39(3-5), 328-340. <https://doi.org/10.1080/01490451.2021.1998257>
- Liu, W., Li, J., Zheng, J., Song, Y., Shi, Z., Lin, Z., & Chai, L. (2020). Different pathways for Cr(III) oxidation: implications for Cr(VI) reoccurrence in reduced chromite ore processing residue. *Environmental Science & Technology*, 54(19), 11971-11979. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c01855>
- López, M. A. H., Suarez, F. L., & Chamorro, N. L. (2017). Identificación de microorganismos aislados a partir de lodos residuales de una planta de tratamiento de un sector curtidor del Quindío. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*, 1(29), 103-118. <https://revistaaccb.org/r/index.php/accb/article/view/148/143>
- Ma, L., Xu, J., Chen, N., Li, M., & Feng, C. (2019). Microbial reduction fate of chromium (Cr) in aqueous solution by mixed bacterial consortium. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 170, 763-770. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.041>
- Malaviya, P., & Singh, A. (2016). Bioremediation of chromium solutions and chromium containing wastewaters. *Critical Reviews in Microbiology*, 40(2), 607-633. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.974501>
- Mtimunye, P. J., & Chirwa, E. M. N. (2014). Finite difference simulation of biological chromium (VI) reduction in aquifer media columns. *Water SA*, 40(2), 359-368. <https://doi.org/10.4314/wsa.v40i2.18>
- Núñez, A. P., Angeles, F. T., Pichihua, P. M., & Acosta, G. Y. (2018). Remoción de cromo de efluentes de la industria curtiembre mediante electrodiálisis. *Industrial Data*, 21(1), 27-34. <https://doi.org/10.15381/idata.v21i1.14908>
- Qiu, Y., Zhang, Q., Gao, B., Li, M., Fan, Z., Sang, W., Hao, H., & Wei, X. (2020). Removal mechanisms of Cr(VI) and Cr(III) by biochar supported nanosized zero-valent iron: synergy of adsorption, reduction and transformation. *Environmental Pollution*, 265, 115018. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115018>
- Rodríguez Yupanqui, M., & Quezada Alvarez, M. A. (2019). Remoción de cromo en efluente de curtiembre por consorcio de levaduras del género *Saccharomyces* y *Pichia*. *UCV-Scientia*, 11(2), 81-91. <https://doi.org/10.18050/ucvs.v11i2.2587>
- Sharma, S., & Adholeya, A. (2012). Hexavalent Chromium Reduction in Tannery Effluent by Bacterial Species Isolated from Tannery Effluent Contaminated Soil. *Journal of Environmental Science and Technology*, 5(3), 142-154. <https://doi.org/10.3923/jest.2012.142.154>
- Silva, H. D. D., & Aguilera, L. A. P. (2020). Identificación molecular de microorganismos aislados de quesera artesanal ubicada en la Libertad-Chontales, Nicaragua. *Revista Ciencia y Tecnología El Higo*, 10(2), 62-78. <https://doi.org/10.5377/elhigo.v10i2.10554>
- Singh, R., Ryu, J., & Kim, S. W. (2019). Microbial consortia including methanotrophs: some benefits of living together. *Journal of Microbiology*, 57(11), 939-952. <https://doi.org/10.1007/s12275-019-9328-8>
- Soto-Rueda, E. M., Landazuri, P., & Loango, N. (2017). Remoción de cromo hexavalente de aguas residuales con microorganismos adaptados a medios ricos en cromo. *Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*, 29, 49-57. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/94110>
- Su, Y., Sun, S., Liu, Q., Zhao, C., Li, L., Chen, S., Chen, H., Wang, Y., & Tang, F. (2022). Characterization of the simultaneous degradation of pyrene and removal of Cr(VI) by a bacteria consortium YH. *Science of The Total Environment*, 853, 158388. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158388>
- Tang, X., Huang, Y., Li, Y., Wang, L., Pei, X., Zhou, D., He, P., & Hughes, S. S. (2021). Study on detoxification and removal mechanisms of hexavalent chromium by microorganisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 208, 111699. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.111699>
- Tobón, G. A. J., & Hoyos, A. V. (2012). Tinción de gram de tejido: alcances y limitaciones. *Medicina y Laboratorio*, 18(11-12), 557-573. <https://medicinaylaboratorio.com/index.php/myl/article/view/313>
- Vélez-Zuluaga, J. A. (2018). *Estrategias biotecnológicas para evaluar la presencia de cromo en la generación de biosólidos seguros: Posibles alternativas de bioremediación* [Tesis de doctorado]. Universidad Nacional de Colombia, Medellín. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/79588>
- World Health Organization (2021). *Guidelines for drinking-water quality, 4th ed., incorporating the 1st addendum* (chapters). [https://www.who.int/publications/m/item/guidelines-for-drinking-water-quality-4th-ed.-incorporating-the-1st-addendum-\(chapters\)](https://www.who.int/publications/m/item/guidelines-for-drinking-water-quality-4th-ed.-incorporating-the-1st-addendum-(chapters))
- Yazdanpanah, A., & Khaithir, T. M. N. (2013). Issues in identifying germ tube positive yeasts by conventional methods. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 28(1), 1-9. <https://doi.org/10.1002/jcla.21635>
- Zhang, S., Merino, N., Okamoto, A., & Gedalanga, P. (2018). Interkingdom microbial consortia mechanisms to guide biotechnological applications. *Microbial Biotechnology*, 11(5), 833-847. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13300>