



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**INSTITUTO DE CIENCIAS**

**POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**



*“La Tierra no es de nosotros, nosotros somos de la Tierra”*

**DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE REMOCIÓN DE  
LOS CONSORCIOS PATÓGENOS DE *E.COLI* ANTE LA  
PRESENCIA DE UN COLORANTE AZO**

TESIS

Para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

Presenta

**ITZEL NIXACHE VÁZQUEZ CABRERA**

Director de tesis:

**Dra. Edith Chávez Bravo**

Co-Director de tesis:

**Dr. Alejandro Isaías Augusto Alonso Calderón**

Noviembre 2018



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**INSTITUTO DE CIENCIAS**

**POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**



*“La Tierra no es de nosotros, nosotros somos de la Tierra”*

**DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE REMOCIÓN DE  
LOS CONSORCIOS PATÓGENOS DE *E.COLI* ANTE LA  
PRESENCIA DE UN COLORANTE AZO**

TESIS

Para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

Presenta

**ITZEL NIXACHE VÁZQUEZ CABRERA**

Comité tutorial:

Director	Dra. Edith Chávez Bravo
Co-Director:	Dr. Alejandro Isaías Augusto Alonso Calderón
Integrante Comité Tutorial	Dra. Alia Méndez Albores
Integrante Comité Tutorial	Dra. Sonia Silva Gómez

Noviembre 2018



**BUAP**

**C. ITZEL NIXACHE VÁZQUEZ CABRERA**

Por este conducto me permito comunicarle que los miembros del jurado integrado por:

<i>Dr. Fernando Saitillo Piscil</i>	<i>Presidente</i>
<i>Dra. Fabiola Avelino Flores</i>	<i>Secretario</i>
<i>Dra. Norma Elena Rojas Ruiz</i>	<i>1er. Vocal</i>
<i>Dra. Alia Méndez Albores</i>	<i>2do. Vocal</i>
<i>Dra. Anabella Handal Silva</i>	<i>Suplente</i>

Designado para la defensa de su tesis "Determinación de la capacidad de remoción de los consorcios patógenos de E. coli ante la presencia de un colorante azo" han manifestado mediante su voto que ésta cumple con los méritos suficientes para ser defendida como tesis de grado de Maestría en Ciencias Ambientales, por lo que este Posgrado le autoriza la impresión de la misma.

Sin otro asunto en lo particular, quedo de usted.

ATENTAMENTE

"PENSAR BIEN, PARA VIVIR MEJOR"

H. PUEBLA DE Z., OCTUBRE 22 DE 2018

**DR. EDUARDO TORRES RAMÍREZ**

**COORDINADOR**



ETR/app  
c.c.p. Archivo  
c.c.p. Minutario

Posgrado en Ciencias Ambientales  
Instituto de Ciencias (ICUAP)

Edificio IC6,  
Ciudad Universitaria,  
Col. San Manuel, Puebla, Pue. C.P. 72570  
01 (222) 229 55 00 Ext. 7056

La realización de esta tesis no hubiera sido posible sin la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT con No. de CVU 763980.

La conclusión de esta tesis fue gracias al apoyo de la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado VIEP, dentro del programa IV de Investigación y Posgrado. Aseguramiento de la calidad en el Posgrado. Indicador establecido en el Plan de Desarrollo Institucional, con No. de oficio DG-ICUAP.1414/2018.

Agradezco...

Al Instituto de Ciencias ICUAP, por el apoyo brindado en la impresión de la presente tesis.

Al comité que me acompañó a lo largo en la realización de este trabajo y que, debido a su extensa experiencia en este posgrado, me apoyaron con comentarios y observaciones oportunas en cada momento.

Sin duda alguna, agradezco al honorable jurado por sus sugerencias para hacer posible la culminación de esta de tesis.

Al Dr. Alejandro, por su amabilidad y ayuda en cada parte de este proyecto.

Por último, y no por menos importante, agradezco a la Dra. Edith Chávez Bravo por haber permitido ser parte de su grupo de investigación, en particular agradezco por su comprensión y apoyo en los momentos que más necesité, pero sobre todo por su tolerancia a mis insolencias.

*A mí adorable y entrañable esposo...*

*Más allá de nosotros,  
en las fronteras del ser y el estar,  
una vida más vida nos reclama...*

*A mi pequeña compañera y encantadora cómplice...*

*Nombras el árbol, niña.  
Y el árbol crece, lento y pleno,  
anegando los aires,  
verde deslumbramiento,  
hasta volvernos verde la mirada.*

*Nombras el agua, niña.  
Y el agua brota, no sé dónde,  
baña la tierra negra,  
reverdece la flor, brilla en las hojas  
y en húmedos vapores nos convierte.*

*No dices nada, niña.  
Y nace del silencio la vida en una ola;  
su dorada marea nos alza a plenitudes,  
nos vuelve a ser nosotros, extraviados.*

*Octavio Paz*

Índice	Pág.
Índice de espectros	
Índice de esquemas	
Índice de figuras	
Índice de gráficas	
Índice de tablas	
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>II. MARCO TEÓRICO</b> .....	4
2.1 Importancia de las ciencias ambientales .....	4
2.2 Contaminación .....	5
2.3 Contaminación del agua .....	6
2.3.1 Agua residual .....	7
2.4 Contaminación del agua por microorganismos .....	8
2.5 Importancia de <i>E. coli</i> y la salud .....	10
2.5.1 <i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC) .....	11
2.6 Consorcio bacteriano .....	12
2.7 Contaminación del agua por colorantes textiles .....	12
2.7.1 Colorantes textiles .....	13
2.7.2 Colorantes azo .....	14
2.7.2.1 Colorante textil negro solofenil .....	15
2.8 Remoción de colorantes .....	15
2.8.1 Métodos biológicos en la remoción de colorantes .....	16
2.8.1.1 Uso de bacterias en la remoción de colorantes azo .....	17
2.8.1.2 Uso de <i>E. coli</i> en la remoción de colorantes azo .....	18
2.8.2 Actividad enzimática bacteriana .....	18
<b>III. ANTECEDENTES</b> .....	19
3.1 Cepas <i>E. coli</i> capaces de degradar un colorante azo .....	19
3.2 Consorcios bacterianos en la remoción de colorantes .....	19
<b>IV. JUSTIFICACIÓN</b> .....	21
<b>V. PREGUNTAS DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN</b> .....	22
<b>VI. OBJETIVOS</b> .....	23
6.1 Objetivo general .....	23
6.2 Objetivos particulares .....	23
<b>VII. HIPÓTESIS</b> .....	24
<b>VIII. METODOLOGÍA</b> .....	25
8.1 Muestras microbiológicas .....	25
8.2 Solución del colorante negro solofenil .....	25
8.3 Muestra control .....	25
8.4 Selección de cepas bacterianas para la formación de consorcios .....	26
8.5 Interacción de consorcios bacterianos con el colorante .....	28
8.5.1 Bioensayos con el colorante textil a concentraciones de 100 ppm y 200 ppm .....	28
8.6 Determinación de los porcentajes de remoción del colorante .....	30



8.7	Análisis estadístico .....	30
8.8	Caracterización de posibles metabolitos secundarios .....	31
8.8.1	Cromatografía de capa fina .....	31
8.8.2	Espectroscopía FTIR .....	31
8.8.3	Espectroscopía RMN de <sup>1</sup> H .....	32
<b>IX.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
9.1	Cepas patógenas de <i>E. coli</i> .....	33
9.2	Integración de consorcios bacterianos .....	34
9.3	Interacción de los consorcios bacterianos con el colorante negro solofenil a 100 ppm .....	35
9.3.1	Cambios observados en los bioensayos .....	35
9.3.2	Porcentajes de remoción .....	37
9.4	Interacción de los consorcios bacterianos con el colorante negro solofenil a 200 ppm .....	38
9.4.1	Cambios observados en los bioensayos .....	38
9.4.2	Porcentajes de remoción .....	40
9.5	Caracterización de metabolitos secundarios .....	42
<b>X.</b>	<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b> .....	<b>54</b>
10.1	Implicaciones de <i>E. coli</i> en consorcios para la remoción de colorantes azo .....	54
10.2	Comparación en la remoción de consorcios homogéneos y heterogéneos de <i>E. coli</i> .....	56
10.3	Metabolitos secundarios .....	57
10.4	Implicaciones en la salud y en el ambiente por exposición a colorantes y sus productos generados en la biodegradación.....	59
<b>XI.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>62</b>
<b>XII.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>63</b>
<b>XIII.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>64</b>
<b>XIV.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>71</b>

## Índice de esquemas

<b>Esquema 1.</b>	Procedimiento para la conformación de consorcios bacterianos .....	27
<b>Esquema 2.</b>	Procedimiento para la realización de los bioensayos a diferentes concentraciones del colorante negro solofenil .....	29

## Índice de espectros

<b>Espectro 1.</b>	Espectro de FTIR del colorante textil negro solofenil .....	44
<b>Espectro 2.</b>	Espectro de FTIR del extracto obtenido del ensayo de interacción del <i>Consortio III</i> con el colorante a 100 ppm .....	45
<b>Espectro 3.</b>	Espectro de FTIR del extracto obtenido del ensayo de interacción del <i>Consortio IV</i> con el colorante a 100 ppm .....	46
<b>Espectro 4.</b>	Espectro de FTIR del extracto obtenido del ensayo de interacción del <i>Consortio V</i> con el colorante a 100 ppm .....	47
<b>Espectro 5.</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) del extracto obtenido del ensayo de interacción del <i>Consortio III</i> con el colorante a 100 ppm .....	49
<b>Espectro 6.</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) del extracto obtenido del ensayo de interacción del <i>Consortio IV</i> con el colorante a 100 ppm .....	50
<b>Espectro 7.</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) del extracto obtenido del ensayo de interacción del <i>Consortio V</i> con el colorante a 100 ppm .....	51
<b>Espectro 8.</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ del metabolito secundario propuesto (MS-3) obtenido de SciFinder .....	53

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b>	Ejemplos de colorantes azo .....	14
<b>Figura 2.</b>	Colorante textil negro solofenil .....	15
<b>Figura 3.</b>	Métodos usados en la remoción de colorantes .....	16
<b>Figura 4.</b>	Muestra control a diferentes concentraciones .....	26
<b>Figura 5.</b>	Cromatografía en capa fina de los extractos obtenidos .....	42
<b>Figura 6.</b>	Posibles metabolitos secundarios obtenidos de la reducción del colorante negro solofenil .....	52

## Índice de gráficas

<b>Gráfica 1.</b> Porcentajes de remoción del colorante negro solofenil a 100 ppm obtenidos por cada consorcio .....	37
<b>Gráfica 2.</b> Comparación de los porcentajes de remoción del colorante negro solofenil a 100 ppm a lo largo del bioensayo .....	38
<b>Gráfica 3.</b> Remoción del colorante negro solofenil a 200 ppm obtenidos por cada consorcio.....	40
<b>Gráfica 4.</b> Comparación de porcentajes de remoción del colorante negro solofenil a 200 ppm a lo largo del bioensayo .....	41
<b>Gráfica 5.</b> Comparación entre los porcentajes de remoción a diferentes concentraciones por cada consorcio .....	42

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Clasificación del agua residual .....	7
<b>Tabla 2.</b> Niveles permitidos de <i>E. coli</i> en diferentes tipos de agua (ADEQ, 2010 y EPA, 2009 con modificaciones propias) .....	9
<b>Tabla 3.</b> Tipos de <i>E. coli</i> causantes de enfermedades .....	11
<b>Tabla 4.</b> Empresas que producen colorantes en México .....	13
<b>Tabla 5.</b> Cepas de <i>E. coli</i> .....	27
<b>Tabla 6.</b> Cepas de EPEC seleccionadas para la conformación de consorcios .....	34
<b>Tabla 7.</b> Consorcios de <i>E. coli</i> .....	35
<b>Tabla 8.</b> Bioensayos de interacción de consorcios bacterianos con el colorante a 100 ppm en t (día) = 1, 5, 10 .....	36
<b>Tabla 9.</b> Bioensayos de interacción de consorcios bacterianos con el colorante a 200 ppm en t (día) = 1, 5, 10 .....	39
<b>Tabla 10.</b> Compuestos tóxicos producidos por la reducción del colorante azo .....	60

## RESUMEN

Los colorantes azo son los más utilizados por la industria textil por su adherencia a las fibras y versatilidad en colores, y por lo tanto son los que en mayor medida contaminan. La presencia de los colorantes en los efluentes impide el paso de luz, disminución del oxígeno disuelto y una fuerte influencia sobre las poblaciones microbianas, a través de estrategias de adaptabilidad y capacidad para degradar dichos colorantes. Por otro lado, se ha reportado que el río Alseseca de la ciudad de Puebla se ha contaminado por la descarga de aguas residuales provenientes de las industrias textiles, así como de las descargas de las zonas urbanas aledañas encontrando que, del total de la carga bacteriana el 82% pertenece a *E. coli*, del cual el 62.26% corresponde a *E. coli* enteropatógena (EPEC). Sin embargo, algunos reportes a cerca de enterobacterias han mencionado que estos son agentes capaces de remover y degradar colorantes textiles azo, mediante la escisión del enlace azo resultando en la formación de aminas aromáticas.

La importancia de este trabajo es demostrar el vínculo entre las prácticas humanas, el agua residual y la salud, a través de la determinación de la capacidad de remoción del colorante negro solofenil mediante el uso de consorcios patógenos de *E. coli* formados por cepas silvestres recuperadas de una zona contaminada como el río Alseseca, así como la determinación de posibles metabolitos. Para ello, se realizaron bioensayos por triplicado en aguas simuladas contaminadas con el colorante textil negro solofenil a concentraciones de 100 ppm y 200 ppm en un medio líquido nutritivo. Los consorcios patógenos de *E. coli* demostraron tener la capacidad de remover el colorante a 100 ppm y 200 ppm hasta un 96.6% y 93.5%, respectivamente y a través de técnicas como cromatografía en capa fina, IR y RMN de  $H^1$ , se realizó la determinación de un metabolito de la familia de las bencilaminas, considerado por su naturaleza como un compuesto carcinogénico, capaz de causar problemas en la salud humana a corto o largo plazo, además de ser considerado ecotóxico por provocar un desequilibrio en algunos compartimentos de los ecosistemas.

**Palabras clave:** *E. coli* patógena, consorcios, remoción de colorantes azo, metabolito tóxico.

## Abstract

Azo dyes are the most used by the textile industry for its adherence to fibers and color versatility, and therefore are the ones that pollute the most. The presence of them in the effluents is the first sign of water contamination, causing the impediment of the passage of light, decrease of dissolved oxygen and a strong influence on the microbial populations rendering them resistant through strategies of adaptability and capacity to degrade said dyes. On the other hand, it has been reported that the Alseseca River in the city of Puebla has been contaminated by the discharge of wastewater from the textile industries, as well as the discharges from the surrounding urban areas, finding that, of the total bacterial load 82% belongs to *E. coli*, of which 62.26% corresponds to enteropathogenic *E. coli* (EPEC). However, some reports about enterobacteria have mentioned that these are agents capable of removing and degrading azo textile dyes, by cleaving the azo bond resulting in the formation of aromatic amines.

The importance of this work is to demonstrate the link between human practices, wastewater and health, through the determination of the solofenil black dye removal capacity using pathogenic *E. coli* consortiums formed by recovered wild strains from a contaminated area such as the Alseseca River, as well as the determination of possible metabolites products of said removal. To do this, triplicate bioassays were conducted in simulated waters contaminated with solofenil black textile dye at concentrations of 100 ppm and 200 ppm in a nutrient liquid medium. The pathogenic consortiums of *E. coli* showed the ability to remove the dye at 100 ppm and 200 ppm up to 96.6% and 93.5%, respectively and through techniques such as thin layer chromatography, IR and <sup>1</sup>H NMR, the determination was made of a metabolite of the family of benzylamines, considered by its nature as a carcinogenic compound, capable of causing human health problems in the short or long term, in addition to being considered ecotoxic for causing an imbalance in some compartments of ecosystems.

**Key words:** Pathogenic *E. coli*, consortiums, removal azo dye, toxic metabolite.

## I. INTRODUCCIÓN

Las plantas industriales (entre ellas las relacionadas con industrias de colorantes) emiten químicos hacia todos los medios incluyendo aire (a través de las fugas como de emisiones directas), agua (descargas directas y escapes) y hacia el suelo. Los tipos de contaminantes que una sola planta industrial emite depende de los materiales de carga, procesos de fabricación, equipo en uso y las prácticas de mantenimiento; variando de una hora a otra y de la parte del proceso que se lleve a cabo (EPA, **2015**). En Puebla, como en otros estados que cuentan con industrias productoras de colorantes, así como las textiles son potenciales generadores de aguas residuales emitiendo sustancias contaminantes, al generar desechos con colorantes y otros compuestos químicos. En la mayoría de los casos, los desechos provenientes de las industrias son vertidos de manera clandestina a los cuerpos de agua más cercanos sin un tratamiento previo. Las aguas residuales tienen un gran contenido de sustancias coloridas de composición química variada (metales pesados, disolventes orgánicos, plaguicidas, hidrocarburos, compuestos sulfonados, colorantes, (Paul, **2012**), generando un cambio en las propiedades naturales de los cuerpos de agua y por lo tanto ocasionan contaminación y deterioro ambiental. Aunado a los contaminantes químicos en aguas residuales están los biológicos como los coliformes fecales y patogrupos de *E. coli*; uno de los agentes responsables de enfermedades diarreicas con altos índices de morbilidad y mortalidad infantil, principalmente en niños menores de 5 años en México y otros países en vías de desarrollo (OMS **2017**). En este sentido surge una gran preocupación con los ríos Atoyac y Alseseca que recorren los estados de Puebla y Tlaxcala, contaminados considerablemente desde hace muchos años por las prácticas antropogénicas inadecuadas y legislaciones ambientales no cumplidas. Si bien se sabe que en los cuerpos de agua existen microorganismos de diversos orígenes causantes de enfermedades, también se ha reportado en la bibliografía que una amplia variedad de estos microorganismos (bacterias, hongos, levaduras y algas), son utilizados como agentes biorremediadores (Saratale y col., **2011**), capaces de degradar compuestos químicos sintéticos como los colorantes textiles, y la eficiencia depende del tipo y adaptación de los microorganismos involucrados, ya que utilizan diferentes mecanismos propios de su naturaleza (bioabsorción, bioadsorción y producción enzimática) (Kuhad y col., **2004**). Valencia en **2014**, reportó que el agua del río Alseseca contenía el 82.5% de *E. coli*, de las cuales el 62.26% fueron identificadas como enteropatógenas (EPEC). Algunas de esas cepas de EPEC degradaron un colorante azo, hasta en un 62.66%. Por otro lado, Mathur y col., en **2003** reportó que ciertos metabolitos productos de la degradación de colorantes azo resultaron más tóxicos que la estructura de procedencia, debido a

que estos metabolitos tenían propiedades carcinogénicas y mutagénicas (Ramsay y Nguyen **2002**; Giordano y col., **2005**; Gavril y Hodson **2007**). Con base a lo anterior, surge la necesidad de realizar la presente investigación para determinar la capacidad degradativa del colorante textil negro solofenil mediante consorcios bacterianos patógenos probados en aguas contaminadas artificialmente.

## **II. MARCO TEORICO**

### **2.1 Importancia de las ciencias ambientales.**

El planeta Tierra está integrado por subsistemas como la atmósfera, hidrosfera, litosfera, biosfera y tecnosfera, que interactúan entre ellos de forma dinámica y sobre todo compleja. Estos subsistemas han sido perturbados y las alteraciones provocadas se reflejan en cambios como el clima global, agotamiento del ozono estratosférico, contaminación y disminución de agua para uso humano, pérdidas irreversibles de la biodiversidad, así como cambios en la estructura y funcionamiento de los ecosistemas y la salud humana. Lo anterior se debe principalmente al incremento de la población, prácticas socio económicas como la agricultura, actividades ganaderas, forestales, pesqueras, industriales, de recreación o el comercio internacional, teniendo así un impacto sobre la transformación de las especies terrestres y marítimas, alteraciones en los ciclos biogeoquímicos, adición, modificación o pérdida de especies y poblaciones genéticamente distintas en áreas locales (Lubchenco, **1998**).

Las ciencias ambientales en este entendido pretenden a través de la interdisciplinariedad científica entender el funcionamiento del ambiente biótico y abiótico en relación con el ser humano, a través del estudio de los fenómenos que impactan al medio ambiente con la finalidad de encontrar estrategias que se puedan implementar para enfrentar dichas perturbaciones con la promesa de que la humanidad transite hacia una relación más sostenible en el planeta.

Lo anterior sugiere que un fenómeno o problema que impacta al ambiente debe ser analizado como un sistema complejo y que cada elemento del sistema funciona como un subsistema de este y el propio sistema con un subsistema de orden mayor (Giannuzzo, **2010**). Por ejemplo, el recurso hídrico que representa más del 70% de la superficie en el planeta, se ha contaminado por los

desechos que se han generado a lo largo de los años, teniendo más auge desde la revolución industrial con la invención de tecnologías, procesos y síntesis de compuestos químicos que son desechados a los cuerpos de agua más cercanos sin un tratamiento previo. Aunado a esto, la persistencia de contaminantes como los microorganismos patógenos, genera que el agua se vuelva un reservorio y vía de transmisión hacia la población, reflejado en altos índices de morbilidad y mortalidad a nivel mundial (OMS, **2017**). Encontraremos que, la importancia de las ciencias ambientales en el tema de contaminación del agua, es abordar este problema como un sistema complejo, ya que la contaminación del agua impacta la salud, la economía, los sistemas políticos, recursos científicos, etc., Por lo tanto, se habla del diseño de estrategias para abordar desde el estudio de los factores que intervienen, los que interaccionan y los que se deben considerar para articular los niveles en que se lleva a cabo el sistema complejo, reflejado en un marco conceptual, epistemológico, teórico, metodológico, académico, etc. (Gómez, **2008**), para que, de forma análoga, las ciencias ambientales intervengan de forma responsable con la naturaleza y los recursos en la relación con la sociedad.

## **2.2 Contaminación**

La contaminación se ha definido como todo objeto, sustancia química o biológica que se incorpora a los compartimientos del planeta modificando sus características naturales y alterando su equilibrio (Manahan, **2006**). Sin embargo, la interpretación y los alcances son más complejos que ese concepto. Hoy, el 52 por ciento de la población mundial vive en áreas urbanas. Para el 2050, se espera que esta cifra aumente a 64 -69 por ciento (Naciones Unidas 2012). Para entonces, se espera que el tamaño de las áreas urbanas se haya duplicado o incluso triplicado, dependiendo de la población y la dinámica económica (Angel y col., **2011**, Seto y col., **2014**), lo que influirá en el deterioro ambiental, ya que, los patrones de consumo entre ciudades y ciudadanos de una población cada vez mayor, ocasionan el deterioro de la biodiversidad, los nichos ecológicos, y por lo tanto compromete la salud de todos los ecosistemas, incluido el hombre (Delgado-R, **2015**).



### 2.3 Contaminación del agua

El agua es la sustancia química que se encuentra en el planeta en más del 70% de la superficie y es el recurso vital más importante en la naturaleza, contiene impurezas de varios tipos que pueden ser naturales o provenientes por el hombre. Las impurezas naturales no son esencialmente peligrosas y comprenden gases disueltos (por ejemplo, nitrógeno, dióxido de carbono, sulfuro de hidrógeno, etc.), que pueden recogerse durante la lluvia y minerales disueltos (por ejemplo, sales de calcio, magnesio, sodio, etc.), que son constituyentes naturales del agua después de su contacto con el suelo e impurezas en suspensión (por ejemplo, arcilla, limo, arena y lodo), y microorganismos. Pero las impurezas que provienen del hombre se consideran dañinas y provocan un desequilibrio en el ecosistema (Gambhir y col., **2012**). Cada día el agua para uso humano es más escasa debido al crecimiento demográfico, urbanización e industrialización, debido a esto se ha incrementado la basura, desperdicio orgánico y desechos de todo tipo que resultan en la contaminación no solo del agua subterránea y superficial, si no del aire y suelo (Vörösmarty, **2010**).

La contaminación del agua se ha dado por descontrol del vertido de aguas residuales de origen doméstico e industrial hacia los cuerpos de agua natural, o incluso cuando por lixiviación son arrastrados contaminantes del suelo hacia los mantos acuíferos, todo ello provoca un problema en la salud, ocasionando el surgimiento de brotes infecciosos en la población (Figueres y Tortajada, **2003**; Román **2016**). Los hábitos humanos también son responsables de esta contaminación, ya que los residuos de origen doméstico tienen altos porcentajes de materia orgánica y microorganismos de origen fecal que contaminan el agua y estos son la causa principal de muchas enfermedades.

En 2010, la Asamblea General de las Naciones Unidas reconoció explícitamente el derecho humano al agua y saneamiento en dónde plantea que toda persona tiene derecho al agua y ésta debe ser suficiente, continua, segura, aceptable, accesible y asequible para uso personal y doméstico (WHO, **2017**). Sin embargo, para que eso sea posible es necesario el soporte económico, planeación y que se cumpla con lo establecido por las normas. En ese sentido para llevar a cabo el control de calidad microbiológico de aguas residuales para ser desechadas y tratadas, debería contemplar la determinación no solo de coliformes fecales sino también la determinación de microorganismos patógenos, que son los responsables de gastroenteritis, diarrea, cólera, disentería, hepatitis, salmonella y fiebre tifoidea, agentes considerados con altos índices de morbilidad y mortalidad a nivel mundial (Pulido, **2005**). Sin embargo, no hay una manera fácil de resolver el problema de la contaminación del agua.

### 2.3.1 Agua residual

El agua residual según el Organismo de Evaluación y Fiscalización Ambiental (OEFA), es aquella cuya característica original han sido modificada por actividades antropogénicas y que, por su calidad requiere un tratamiento previo antes de ser reusadas, vertidas a un cuerpo de agua o descargadas a un sistema de alcantarillado, por lo que se han clasificado según su contenido y origen (Tabla 1). En México, de acuerdo con CONAGUA y SEMARNAT (2015), durante el año 2015, las 2 477 plantas en operación a lo largo del país colectaron 212.0 m<sup>3</sup>/s de aguas residuales municipales a través de los sistemas de alcantarillado, de las cuales solo fueron tratadas 120.9 m<sup>3</sup>/s. Mientras que por parte de las industrias autoabastecidas se reportó que de 214.6 m<sup>3</sup>/s aguas residuales generadas, se trataron 70.5 m<sup>3</sup>/s y en su mayoría tratadas o no, se descargan en cuerpos de agua natural.

**Tabla 1.** Clasificación del agua residual (OEFA, con modificaciones propias).

Tipo de agua residual	Origen	Contenido
Industrial	Son aquellas que resultan del desarrollo de un proceso productivo, incluyéndose a las provenientes de la actividad minera, agrícola, energética, agroindustrial, entre otras.	Colorantes, disolventes, ácidos, grasas, sales, pigmentos, metales y diversas sustancias químicas que suelen ser tóxicas para el hombre, la flora y la fauna. Dentro del sectores industriales se generan grandes cantidades y diversos contaminantes que afectan la calidad del agua y son difíciles de erradicar por medio de sistemas de tratamiento convencionales.
Doméstica	Son aquellas de origen residencial y comercial que contienen desechos fisiológicos provenientes de la actividad humana.	Detergentes, insecticidas, jabones, grasas, materias orgánicas, materia fecal con un alto contenido de bacterias, virus y parásitos.
Municipal	Son aquellas provenientes de residuos domésticos que pueden ser mezclados con aguas de drenaje pluvial o residuales de origen industrial previamente tratadas.	Sólidos, metales pesados, microorganismos, compuestos orgánicos,
Urbana	Pueden referirse a la mezcla entre aguas residuales domésticas y municipales, es decir, aquellas que provienen de las viviendas, edificios públicos y de la escorrentía urbana que se colecta en el drenaje	Organismos patógenos, materia orgánica, detergentes, metales pesados, sustancias químicas variadas, compuestos orgánicos, hormonas y productos farmacéuticos y antibióticos.

Agrícola	Son aquellas que por lixiviación son arrastradas a otros cuerpos de agua: también son provenientes de invernaderos, regiones agrícolas, etc.	Fertilizantes, Insecticidas, sales inorgánicas. Minerales, desechos minerales, materia orgánica.
----------	--	--

Si las descargas se hacen en las zonas altas de las cuencas, los ríos y arroyos acarrean agua con contaminantes a largo de todo su recorrido. Existen reportes dónde se demuestra que los canales de agua más pequeños se mueven hacia los campos de cultivo cercanos a las comunidades individuales. El uso de estos canales para irrigar cultivos se vuelven un foco de infección ya que, el agua se almacena en un gran depósito antes de la distribución, mientras que el resto se envía directamente a los campos de cultivo. Si bien las leyes existentes hacen lo necesario para que el agua residual para el riego de cultivos que consumen los humanos cumpla con las normas establecidas, no se remueven en su totalidad los patógenos y sólidos suspendidos, por lo tanto, los cuerpos de agua resultan un reservorio severamente contaminado con una alta posibilidad de exposición ocupacional a través del contacto directo con los campos irrigados. Las familias y comunidades de trabajadores de campo también están potencialmente expuestas a través del arrastre de patógenos por trabajadores de campo en sus ropas o zapatos, a través del contacto con cultivos destinados para el consumo animal, mediante la producción a pequeña escala de cultivos consumidos localmente por humanos o mediante la aerosolización de patógenos de los canales de aguas residuales y las zonas dónde hay cultivos propagando contaminantes presentes (Dickin y col., 2016; Paez y col., 2005).

#### 2.4 Contaminación del agua por microorganismos

Los contaminantes microbiológicos son de naturaleza diversa (bacterias, virus, hongos y parásitos) que pueden estar presentes en determinados nichos, y son capaces de producir efectos adversos, ya sean procesos infecciosos, tóxicos o alérgicos (Albert L., 2004).

La contaminación microbiológica del agua se genera en gran medida cuando los residuos fecales de los animales y de los organismos en putrefacción, son arrastrados por el suelo con la ayuda de la lluvia hacia cuerpos de agua, entonces el exceso de materia fecal como de desechos orgánicos vuelven a esta agua un reservorio para que las poblaciones microbiológicas se desarrollen

continuamente. Pero principalmente se debe por los desechos de las zonas urbanas que son transportados por las tuberías y en gran medida son descargados en los cuerpos de agua sin un previo tratamiento. Se ha asociado a las enfermedades diarreicas con la exposición a aguas residuales, lo que involucra la creciente urbanización y la atención a estos riesgos y al tratamiento de aguas residuales se está volviendo cada vez más importante (Contreras y col., 2017). En la tabla 2 se hace una comparación entre México y E.U de los estándares de calidad del agua considerando a *Escherichia coli* (*E. coli*), como el indicador más confiable de la contaminación bacteriana fecal de las aguas superficiales establecidos por la EPA en los E.U. (Rivera y Rock, 2011), y en México por lo establecido por la NOM-127-SSA1-1994, que establece los límites de contaminantes permisibles para el agua de uso y consumo humano, NOM-001-ECOL-1997, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales en aguas y bienes nacionales, NOM-002-ECOL-1997, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano o municipal y la NOM-003-ECOL-1997, que establece los límites máximos permisibles de contaminantes para las aguas residuales tratadas que se reúsen en servicios al público.

**Tabla 2.** Niveles permitidos de *E. coli* en diferentes tipos de agua (tomado de Rock y Rivera, 2014 con modificaciones propias)

Uso	Límite permisible de <i>E. coli</i>	
	México	E.U
Tipos de agua		
Agua potable	Coliformes totales 2 ufc/100 mL Coliformes fecales Cero	Cero
Aguas superficiales con contacto corporal completo o directo	240 NMP/100 mL	235 cfc/100 mL
Aguas superficiales con contacto corporal parcial, indirecto u ocasional	1,000 NMP/100 mL	575 ufc/100 mL
Aguas residuales de descarga	***	< 2.2 ufc/100 mL
Aguas residuales para riego	***	< 1.0 ufc/100 mL

\*\*\* No establecido en la NOM-127-SSA1-1994, NOM-001, 002 y 003-ECOL-1997.

## 2.5 Importancia de *E. coli* y la salud

*Escherichia coli* (*E. coli*), se describe como un bacilo gram negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae* (Rodríguez, **2002**). Esta bacteria coloniza el intestino del humano a pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas, es decir, causan un daño con diferentes cuadros clínicos con casos aislados o brotes de diarrea, síndrome urémico hemolítico, colitis hemorrágica y cuadros de disentería, principalmente en niños; por esto es necesario identificar qué tipo de bacteria está involucrada y mantener la vigilancia epidemiológica de los pacientes, ya que un mal manejo puede causar deshidratación y hasta la muerte. *E. coli* es casi exclusivamente de origen fecal y se transmite a través de la contaminación fecal de los alimentos y del agua, así como también a través de la contaminación cruzada o por contacto humano directo durante la preparación de los alimentos. Sin embargo, estudios recientes han informado que *E. coli* puede adaptarse en suelos, arena, sedimentos y algas en ambientes tropicales, subtropicales y templados, lo que plantea que *E. coli* puede convertirse en un miembro activo de comunidades microbianas naturales en el medio ambiente, así como el impacto de las poblaciones de *E. coli* ambientalmente "naturalizadas" en la calidad del agua (Ishii y col., **2008**).

Existen diversos agentes etiológicos causantes de cuadros diarreicos pero los patogrupos de *E. coli* son los primeros agentes bacterianos responsables de los índices de morbilidad y mortalidad infantil más altos, principalmente en niños menores de 5 años en países en desarrollo (OMS, **2017**). Como se muestra en la tabla 3, las cepas de *E. coli* causantes de diarreas se clasifican con base al cuadro clínico y su mecanismo de patogenicidad como: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica también conocidas como productoras de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (EHEC o VTEC o STEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y adherencia difusa (DAEC) (Rock y Rivera, **2014**). Las cepas dentro de cada subgrupo ocupan varios nichos ecológicos, y se pueden caracterizar ampliamente por comensalismo o comportamiento patógeno diferente. *E. coli* puede persistir, por períodos de tiempo variables, en dichos hábitats terrestres y acuáticos (Van Elsas y col., **2011**)

**Tabla 3.** Tipos de *E. coli* causante de enfermedades (tomado de Rock y col., 2014).

Cepas de <i>E. coli</i>	Modo de Transmisión	Enfermedad
Enterotoxigénic (ETEC)	Alimentos o ingestión de agua	ETEC provoca diarrea sin fiebre. Es común en los bebés y es a menudo la causa de diarrea de los viajeros.
Enteropatógeno (EPEC)	La ingestión de alimentos o agua, el contacto humano directo e indirecto	EPEC causa diarrea acuosa, a veces con sangre. Es una causa común de diarrea infantil en los países subdesarrollados.
Enterohemorrágico (EHEC)	Alimentos / ingestión, el contacto humano directo o indirecto	Cepas de EHEC causan diarrea con sangre y, a veces pueden dañar los riñones y el progreso al síndrome urémico hemolítico potencialmente fatal (SUH). EHEC ha causado muchas epidemias de origen alimentario en todo el mundo; O157: H7 es la cepa más conocida.
Enteroinvasivo (EIEC)	La ingestión de alimentos o agua	EIEC causa disentería, como la diarrea. La fiebre es un síntoma común.

### 2.5.1 *E. coli* enteropatógena (EPEC)

La mayoría de las bacterias *E. coli* no son patógenas pero un cierto grupo sí causan enfermedades gastrointestinales, y las infecciones entéricas son de las enfermedades más comunes del humano. *E. coli* enteropatógena (EPEC, por sus siglas en inglés) es una bacteria que infecta principalmente a niños menores de cinco años, provocando diarreas de diversos grados. Las cepas de EPEC fueron reconocidas como una causa importante de muerte en brotes epidémicos en guarderías de países como Estados Unidos e Inglaterra desde 1998. La forma de transmisión de la enfermedad es fecal-oral por manos contaminadas de manipuladores de alimentos y otras prácticas diarias. Los reservorios de EPEC pueden ser niños y adultos con o sin síntomas, normalmente se manifiesta con diarrea aguda, la cual puede ser leve o grave, con vómito, fiebre baja y mala absorción de líquidos. En nuestro país las enfermedades infecciosas gastrointestinales ocupan el tercer lugar dentro de las principales veinte causas de mortalidad preescolar y el quinto lugar en mortalidad infantil, hecho que resalta la importancia de este padecimiento. Razón por la cual, la Organización Mundial de la Salud ha estimado que alrededor de dos millones de niños mueren anualmente de enfermedades diarreicas en países en vías de desarrollo y producen además la muerte de un menor cada 15 segundos alrededor del mundo (Alper, 2003). Estudios han reportado que *E. coli* pueden sobrevivir durante largos períodos de tiempo y potencialmente reproducirse en ambientes diferentes, lo que indica que *E. coli* puede integrarse en comunidades microbianas indígenas en el medio ambiente y por tanto logra un mayor impacto en la salud poblacional (Jang y col., 2017)

## **2.6 Consorcio bacteriano.**

Un Consorcio bacteriano es una asociación natural de dos o más poblaciones microbianas, de la misma o diferentes especies, que actúan conjuntamente como una comunidad en un sistema complejo, donde todos se benefician de las actividades de los demás. La asociación refleja estilos de vida sinérgicos o sintróficos (que significa “comiendo juntos”) en el que el crecimiento y el flujo cíclico de nutrientes se conduce más efectiva y eficientemente que en poblaciones individuales (López y col., **2007**).

Un consorcio bacteriano puede desempeñar funciones complicadas que poblaciones individuales no podrían; además, la vida en asociación puede generar mayor resistencia a las fluctuaciones del ambiente y promover la estabilidad de los miembros, en el tiempo. Estos rasgos distintivos dependen de dos características; primero, los miembros de un consorcio se comunican el uno con el otro, ya sea por el intercambio de sustancias o por señales moleculares. Cada población detecta y responde a la presencia de otras dentro del consorcio, ejerciendo sobre ellas un control positivo o negativo en su crecimiento y/o metabolismo y tales tareas son posibles cuando los diferentes pasos se completan mediante especies microbianas especializadas (Brener y col., **2008**).

## **2.7 Contaminación del agua por colorantes textiles**

Se consideran como contaminante químico a todo compuesto sintéticos que, durante la fabricación, manejo, transporte, almacenamiento, uso y desecho, pueden ingresar al organismo o a los diferentes compartimentos del planeta en forma de líquido, sólido, aerosol, gas o vapor, con efectos irritantes, corrosivos, cancerígenos, mutagénicos, teratogénicos, narcóticos, alérgicos o sistémicos, en condiciones que puedan alterar la salud de las personas expuestas (Delgado, **2004**; Manahan, **2006**).

La contaminación del agua es causada por numerosas sustancias sintéticas, muchas de ellas tóxicas, que son vertidas en su mayoría por el sector industrial, en especial el textil que demandan mayores volúmenes de agua (Holkar, **2016**). En términos de su impacto ambiental, se ha estimado que las industrias relacionada al color, son las que consumen más energía, productos químicos y agua para la producción de hilos, telas y prendas de vestir. A nivel mundial casi todas las aguas residuales descargadas de la industria textil están altamente contaminadas con sustancias como colorantes,

sales, ácidos, grasas, metales, agentes dispersantes, peróxidos, surfactantes (Kwon, **2008**; Paul, **2012**). Algunos reportes han mencionado que se usan por día alrededor de 200 L por kg de tela procesada (Wang y col., **2011**; Kant, **2012**). De acuerdo con la estimación del Banco Mundial, se generan alrededor del 17 al 20 por ciento de aguas residuales en el tratamiento de teñidos y acabados textiles (Kant, **2012**), y estos desechos llegan sin un tratamiento adecuado a los efluentes o los cuerpos de agua más cercanos, impidiendo el paso de la luz, alterando los procesos naturales como la fotosíntesis y solubilidad de gases, afectando la vida acuática (Rodríguez T. y col., **2012**; Espinosa y col., **2014**).

### 2.7.1 Colorantes textiles

Los colorantes han sido utilizados desde hace muchos años desde la aparición de las primeras civilizaciones, el claro ejemplo lo encontramos en las invaluable pinturas rupestres. En un principio, los colorantes se obtenían de forma natural a partir de extractos de animales, plantas y algunos minerales hasta 1856 cuando Perkin sintetizó el primer colorante, al que llamó “mauveína” (Nicolaou, **2008**). Desde entonces se han sintetizado un sin fin de colorantes con diversos grupos funcionales cromóforos y auxocromos, lo que deriva una gama de estructuras moleculares grandes, complejas con variedad de tonos de gran utilidad en productos farmacéuticos, alimenticios, cosméticos, de papel, plásticos, etc. La industria textil busca colorantes sintéticos con alta adherencia a las fibras y estabilidad a la luz, para logara esto en la síntesis de colorantes recurren a diferentes sustituciones en el núcleo aromático generando un grupo de compuestos estructuralmente diverso y más versátil que los hace recalcitrantes y xenobióticos (Jain y col., **2012**). En la tabla 4 se muestran algunas empresas en México que producen, importan y exportan diversos colorantes sintéticos y variados usos.

**Tabla 4.** Empresas registradas en la producción de colorantes México.

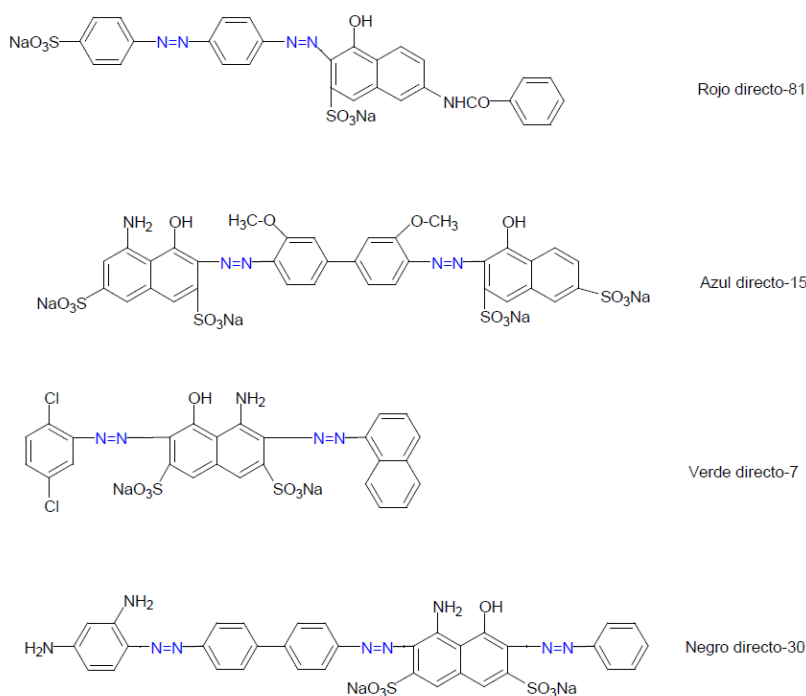
Empresa	Tipo de colorante
Basf Mexicana, S.A de C.V.	Disperso
Bayer de México, S.A de C.V.	Ácido, básico, directo, disperso y otros colorantes
Ciba Especialidades, S.A de C.V.	Ácido, básico, directo y disperso
Clariant de México, S.A de C.V	Otros colorantes
Pyosa, S.A de C.V	Directo, disperso y alimenticios
Warner Jenkenson, S.A de C.V	Alimenticios



La variación en la estructura molecular confiere a los colorantes características físicas y químicas propias que se comportan de diferente manera en presencia de otras sustancias según el proceso de teñido, lavado, tratamiento de degradación, etc., o incluso cuando forman parte de aguas residuales, volviéndose contaminantes del medio ambiente (Robinson, **2001**; Solís, **2012**; Cherquer, **2013**).

### 2.7.2 Colorantes azo

Los colorantes azoicos se caracterizan por tener uno o varios grupos azo  $-N=N-$  y que, a su vez pueden estar unidos a otros grupos funcionales de fenilo o naftaleno, y contener iones como cloruro ( $-Cl$ ), nitro ( $-NO_2$ ), metilo ( $CH_3$ ), amino ( $NH_2$ ), hidroxilo ( $-OH$ ) y carboxilo ( $-COOH$ ). Con frecuencia, se encuentra el grupo sulfónico ( $-SO_3H$ ) caso en el cual los colorantes son llamados colorantes azo sulfonatados (Beyer, **1987**; José, **2015**). Este tipo de colorantes sintéticos son los más utilizados en la industria y se consideran contaminantes relativamente persistentes, además son extremadamente estables cuando se exponen a la luz (Carmen, **2012**). Éstos compuestos sintéticos tienen estructuras variadas y complejas (Fig. 1), y han sido tratados para su remoción del medio ambiente por diversos mecanismos de degradación.



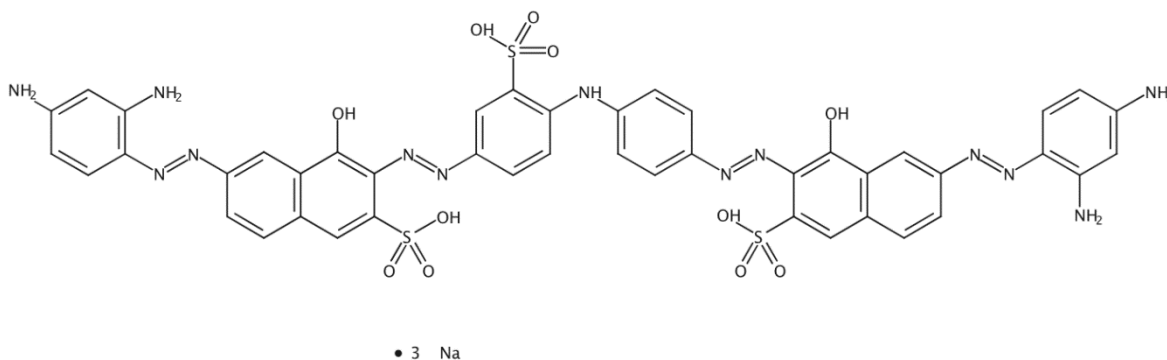
**Figura 1.** Ejemplos de colorantes azo.

### 2.7.2.1 Colorante textil negro solofenil

Los colorantes textiles directos como el caso del negro solofenil, se utiliza para la tinción de fibras de celulosa tales como algodón, rayón, y lino. Es un polvo negro cuyas propiedades físico-químicas confieren una buena solubilidad en el agua, además de que es considerado con una excelente fijación a las fibras y estabilidad a la luz (Carmen, **2012**).

Para la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), el negro solofenil es:

2-ácido naftalensulfónico,6-[2-2(2,4-difenilamino)diacenil]-3-[2-[4-[4-[2-[7-[2-(2,4difenilamino)diacenil]-1-hidroxi-3-sulfo-2-naftalenil]diacenil]fenil]amino]-3-sulfofenil]diacenil]-4-hidroxido de sodio (1:3), cuya formula es  $C_{44} H_{35} N_{13} O_{11} S_3 \cdot 3 Na$  (Fig. 2).

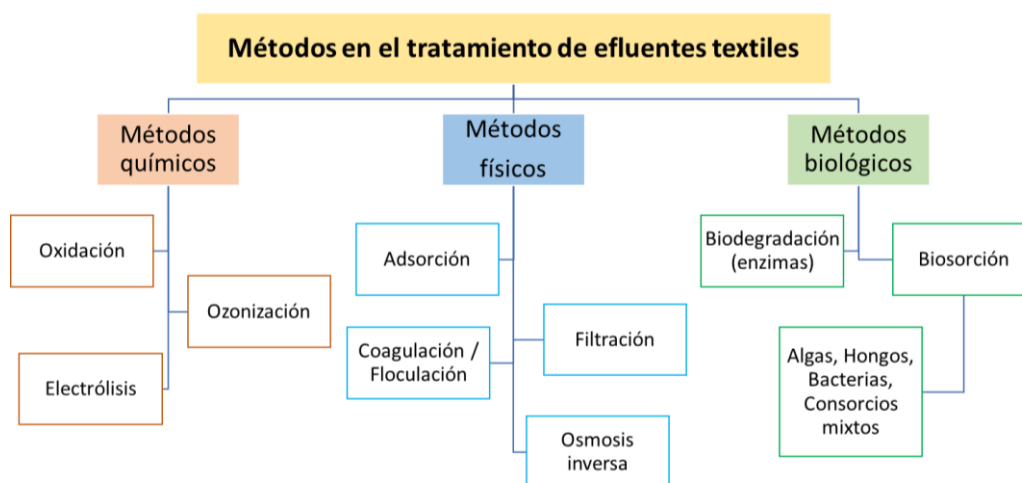


**Figura 2.** Colorante textil negro solofenil (tomado de ScinFinder, **2018**)

### 2.8 Remoción de colorantes

Muchas industrias, como colorantes, textiles, plásticos, papel, alimentos, cosméticos y productos farmacéuticos utilizan una gran cantidad de colorantes y agua (Saratale y col., **2011**). Los residuos generados durante el proceso y la operación de colorantes en la industria comúnmente llegan a cuerpos de agua naturales, ocasionando efectos tóxicos sobre el ecosistema y la biodiversidad, impactando negativamente al medio ambiente. Para quitar los colorantes del agua contaminada existen diversos tratamientos (Fig. 3). Los tratamientos fisicoquímicos, incluidos los procesos de oxidación avanzados (es decir, la aplicación de ozono, peróxido de hidrógeno y luz ultravioleta), los cuales no siempre, eliminan el color y la concentración del compuesto colorante, además implican

altos costos y, por lo tanto, su uso está restringido en la escala de operación y el tipo de efluente. Los tratamientos biológicos son menos intensivos en energía, eficaces y ambientalmente sustentables dado que se genera una bioconversión parcial o completa de los colorantes, ya sea por adsorción en la biomasa o por biodegradación (Hai y col., 2007; Kurade y col., 2012).



**Figura 3.** Métodos usados en la remoción de colorantes (tomado de Saratele y col., 2012 con modificaciones propias).

### 2.8.1 Métodos biológicos en la remoción de colorantes

La utilización de organismos o microorganismos es una técnica clave en la biorremediación que ha tomado más fuerza en la investigación en ciencias ambientales. En donde los microorganismos involucrados se aproximan a los desechos tóxicos y desarrollan nuevas estrategias metabólicas que los vuelven resistentes de forma natural, provocando que biodegradan varios productos químicos tóxicos a formas menos dañinas. Muchas especies bacterianas, fúngicas y de algas tienen la capacidad de adsorber y / o degradar los colorantes azo y su efectividad de la decoloración por parte de las especies depende de la adaptabilidad y la actividad de los microorganismos seleccionados (Srinivasan, 2010; Solís, 2012; Shuda, 2015).

La eficiencia en la eliminación del color está influenciada por la relación del colorante, la carga de microorganismos, pH, temperatura, y concentración de oxígeno en el sistema, para ellos los

métodos biológicos se pueden clasificar en aeróbicos, anaeróbico y anóxico o facultativo o una combinación de estos. Un método aeróbico utiliza presencia de oxígeno, mientras que el método anaeróbico se realiza en ausencia de oxígeno (Holkar, **2016**).

#### **2.8.1.1 Uso de bacterias en la remoción de colorantes azo**

El funcionamiento metabólico de las comunidades microbianas innatas es un enfoque prometedor para la biorremediación del medio ambiente contaminado, el uso de la biomasa tiene sus ventajas, dando lugar a la remoción de colorantes, ya sea por adsorción en la biomasa microbiana o por biodegradación.

La adsorción en este caso se denomina biosorción porque se produce en el biomaterial y puede ocurrir en células microbianas en crecimiento, así como en las células microbianas muertas ocurriendo por intercambio iónico (Robinson y col., **2001**). En el caso de biosorción, la estructura original del colorante permanece intacta, es decir, no se degrada en fragmentos. Por el contrario, en la biodegradación, la estructura original del colorante se destruye, y las células microbianas separan el contaminante en fragmentos, a veces logrando la mineralización completa, es decir, la conversión de xenobióticos en CO<sub>2</sub>, biomasa e inorgánicos (Srinivasan, **2010**).

Se debe considerar que en un proceso de biosorción, no se erradica el problema, ya que el contaminante no se destruye, sino que queda atrapado en la matriz del adsorbente (la biomasa microbiana) porque la composición celulósica de la pared celular microbiana proporciona sitios de unión tales como grupos hidroxilo y carboxilo (Tsai y Chen, **2010**). La eliminación de la biomasa microbiana que contiene los colorantes adsorbidos en sí es un gran obstáculo en el tratamiento de aguas residuales textiles (Kuhad y col., **2004**; Chander y Arora, **2007**). Por lo tanto, la biodegradación es una técnica que podría desempeñar un papel importante en la decoloración y degradación de colorantes, siempre y cuando los productos generados no sean más tóxicos que su estructura de procedencia, es decir, el colorante (Singh, **2015**).

### 2.8.1.2 Uso de *E. coli* en la remoción de colorantes azo

Existen muchos reportes en dónde se han usado cepas de *E. coli* como modelos con el fin de mejorar los rendimientos en la remoción y degradación de colorantes textiles para la expresión de enzimas como el trabajo realizado por Ma X. y col., (2017) quienes lograron la expresión de la lacasa CueO de *E. coli* K12 en *Pichia pastoris* GS115 para la aplicación en la decoloración de colorantes sintéticos. Otro trabajo realizado por Shah y col., (2013), reportan que el clon PET1 de *Escherichia coli* BL21 (DE3) obtuvo el 90% de degradación de un colorante azo en 7 min.

En efecto, el hombre de ciencia siempre sacará provecho de lo que se encuentra a su alrededor para tratar por un lado buscar la mejor solución a un problema ambiental, pero por el otro siempre estará dispuesto a estudiar y entender lo que sucede en los pequeños sistemas complejos cuando de microorganismos se habla. Como el caso de Cerboneschi (2015), quienes realizaron una investigación sobre el modo de acción de la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* para demostrar que la decoloración de los colorantes se producía principalmente a través de tres vías diferentes; precipitación bacteriana inducida, adsorción de pared celular y metabolismo. Otros estudios como el de Thakuria (2015), en dónde a través de la extracción de enzimas de *E. coli*, logra proponer y entender los mecanismos enzimáticos involucrados en la degradación de colorantes.

Saranraj y col., (2010), logra aislar cinco especies bacterianas para probar la capacidad que tienen en la decoloración de varios colorantes azo, reportando que la cepa de *E. coli*, resultó la que mejor removió el colorante Direct Sky Blue-FF con un 65% de decoloración.

### 2.8.2 Actividad enzimática bacteriana

La capacidad de los microorganismos y sus enzimas de degradación del colorante para decolorar y metabolizar los colorantes se conoce desde hace tiempo y ha demostrado ser la mejor opción para la biorremediación. En cuanto a la decoloración y degradación de los colorantes textiles, las enzimas que catalizan la segmentación reductiva de los enlaces azo (-N=N-) para producir productos de amina aromática incolora son las azoreductasas (Chang y col., 2001). Varios estudios han investigado las azoreductasas citoplásmicas bacterianas, y sugirieron que pueden aplicarse en biotecnología ambiental (Maier, 2004; Ramalho, 2002). Sobre la base de sus funciones, las azoreductasas se

clasifican como azoreductasas dependientes de flavina y azoreductasas independientes de flavina. Las azoreductasas dependientes de flavina se organizan adicionalmente sobre la base de su cofactor, solo NADH, solo NADPH o ambos, ya que estas coenzimas sirven como donantes de electrones.

### III. ANTECEDENTES

#### 3.1 Cepas *E.coli* capaces de degradar un colorante azo, aisladas de agua residual

El trabajo de tesis de Valencia (2014) se enfocó al monitoreo del agua residual del río Alseseca y la detección molecular de enterobacterias aisladas, reportando que el 82% de las cepas pertenecieron a *E. coli* y el 62.26% de ellas se caracterizó como *E. coli* enteropatógenas (EPEC), las cuales se sometieron a ensayos de interacción para determinar la capacidad de remoción de un colorante azo a diferentes concentraciones. Los resultados de remoción del colorante fueron clasificados en: bajos, medios y altos tanto en concentraciones de 200 y 300 ppm. Los porcentajes de remoción para 200ppm fueron: de 27% a 41% (considerados bajos), de 42% a 56 % (considerados medios) y de 57% a 70% (considerados altos) y para la remoción del colorante a 300ppm fueron: del 5% al 23% (bajos), del 24% al 42% (medios) y de 43% al 60% (altos). Además, proponen la obtención del metabolito secundario alfa-naftol mediante la utilización de la técnica HPLC (Bravo y col., 2014).

#### 3.2 Consorcios bacterianos en la remoción de colorantes

Se ha observado que los consorcios bacterianos son beneficiosos en la remoción de colorantes, principalmente por que puede llevar a cabo tareas de degradación que en un cultivo de una sola bacteria no puede hacer de manera efectiva (Saroj y col., 2015). Mohana (2008), reportó la utilización de un consorcio bacteriano denominado DMC, el cual pudo remover en condiciones óptimas el colorante negro directo 22 en más del 91%, y removió a 10 diferentes colorantes azo en más del 81%. Otros investigadores como Dafale y col., (2008) reportaron que a partir de cepas

aisladas de lodos contaminados e identificadas como *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus circulans*, y otros aislados de laboratorio no identificados (NAD1 y NAD6) removieron el colorante RB5 y en las primeras 48 h observaron la obtención de metabolitos por medio de HPLC. Por otro lado, el grupo de investigación a cargo de Khehra (2005), reportó la formación de un consorcio formado por cepas bacterianas identificadas como *Bacillus cereus* (BN-7), *Pseudomonas putida* (BN-4), *Pseudomona fluorecence* (BN-5) y *Stenotrophomonas acidaminiphila* (BN-3), aisladas de suelos contaminados con residuos textiles locales. El consorcio denominado HM-4 decoloró el rojo ácido (AR-88) en 24 h, así como otros colorantes azo con porcentajes de remoción del 78% al 99%. Otro reporte por parte de Jain y col., (2012), mencionan haber utilizado consorcios bacterianos formados por las cepas *Bacillus sp.* V1DMK, *Lysinibacillus sp.* V3DMK, *Bacillus sp.* V5DMK, *Bacillus sp.* V7DMK, *Ochrobacterium sp.* V10DMK, *Bacillus sp.* V12DMK en la remoción del colorante RV5. El reporte menciona que los consorcios mixtos decoloraron una amplia gama de colorantes azoicos con una tasa máxima de decoloración observada a 37 ° C y pH 7,0.

#### IV. JUSTIFICACIÓN

Las interacciones naturales de una comunidad bacteriana y su metabolismo siempre son interesantes y su estudio es complejo, sin embargo, deben ser exploradas. En un estudio microbiológico realizado al río Alseseca en la ciudad de Puebla se reportó que, del total de las muestras de agua residual colectadas, el 82% de la carga bacteriana pertenece a *Escherichia coli* (*E. coli*), del cual el 62.26% fueron identificadas como enteropatógenas (EPEC). En un ambiente natural como los cuerpos de agua donde son vertidas tanto aguas residuales urbanas como textiles se genera la interacción de los consorcios de *E. coli* con el colorante textil negro solofenil, provocando su remoción mediante diversos mecanismos bacterianos propios de su naturaleza ya que, el nicho ecológico de las enterobacterias es cambiante frente a otras bacterias de su mismo género o diferente a ellas, así como en presencia de contaminantes como los colorantes azo. Sin embargo, en algunos casos también pueden generarse como producto de esa interacción metabolitos secundarios como aminas aromáticas; por lo que resulta importante determinar la capacidad que tienen los consorcios patógenos de *E. coli* para degradar un colorante azo, lo cual evidenciaría una problemática de salud ambiental ya que la generación de subproductos son considerados carcinogénicos y ecotóxicos por generarse un contaminante aún más dañino que el colorante de procedencia.



## V. PREGUNTAS DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

- ¿Cuál es la respuesta de los consorcios bacterianos patógenos de *E. coli* en aguas contaminadas con el colorante negro solofenil?
- ¿Qué riesgo representan para el ser humano y para el ecosistema la interacción de cepas patógenas de *E. coli* y el xenobiótico como el colorante textil azo?
- ¿Cuál es el problema que se genera en torno a la salud y el ambiente si se generan productos de la degradación del colorante textil azo mediante el uso de consorcios bacterianos patógenos de *E. coli*?

## **VI. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

- Determinar la capacidad de remoción de los consorcios patógenas de *E. coli* ante la presencia de un colorante azo.

### **2.2 Objetivos particulares**

- Identificar cepas de *E. coli* patógenas capaces de remover el colorante para la formación de consorcios.
- Llevar a cabo la interacción de los consorcios bacterianos con el colorante negro solofenil a concentraciones de 100ppm y 200ppm.
- Determinar el porcentaje de remoción del colorante azo mediante espectrofotometría de UV-vis.
- Caracterización de posibles subproductos.

## VII. HIPÓTESIS

***H<sub>0</sub>***: La formación de consorcios bacterianos patógenos de *E. coli* no son capaces de interaccionar con el colorante negro solofenil, por lo tanto, no remueven el colorante ni generan metabolitos secundarios.

***H<sub>i</sub>***: La formación de consorcios bacterianos patógenos de *E. coli* son capaces de remover el colorante negro solofenil, pero no generan metabolitos secundarios.

***H<sub>ii</sub>***: La formación de consorcios bacterianos patógenos de *E. coli* son capaces de remover el colorante negro solofenil, generando a su vez metabolitos secundarios tóxicos.

## VIII. METODOLOGÍA

### 8.1 Muestras microbiológicas

En el estudio previo que se llevó a cabo en el laboratorio de Patogenicidad microbiana del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, reportó que las cepas silvestres de *E. coli* que se manejaron en este trabajo se obtuvieron del monitoreo anual del río Alseseca (Valencia, **2014**). Las cepas aisladas fueron caracterizadas como *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), y fueron mantenidas en ultra congelación a -70°C en medio LB con glicerol al 20%.

### 8.2 Solución del colorante negro solofenil

El colorante textil azo negro solofenil de fue obtenido de Ciba Especialidades S.A de C.V. La solución inicial del colorante textil negro solofenil se preparó a una concentración de 1000 ppm en 200 mL de agua estéril. Para la obtención de las concentraciones de 100 ppm y 200 ppm utilizadas en cada bioensayo, se aplicó la siguiente fórmula:

$$C_1V_1 = V_2C_2 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde:  $C_1$ = concentración inicial (ppm);  $V_1$ = volumen inicial(mL);  $C_2$ = concentración final(ppm);  $V_2$ = volumen final (mL).

### 8.3 Muestra control

Los controles con medio no inoculado a un volumen de 50 mL se preparan como se describe a continuación: para la muestra control con una concentración de 100 ppm del colorante se colocan 45 mL de caldo nutritivo y 5 mL de solución del colorante textil negro solofenil. Para una concentración de 200 ppm del colorante se colocan 40 mL de caldo de nutrientes y 10 mL de solución del colorante textil negro solofenil, usando filtros de 0.45  $\mu$ m para esterilizar por filtrado (Fig. 4)



**Figura 4.** Muestra control a diferentes concentraciones.

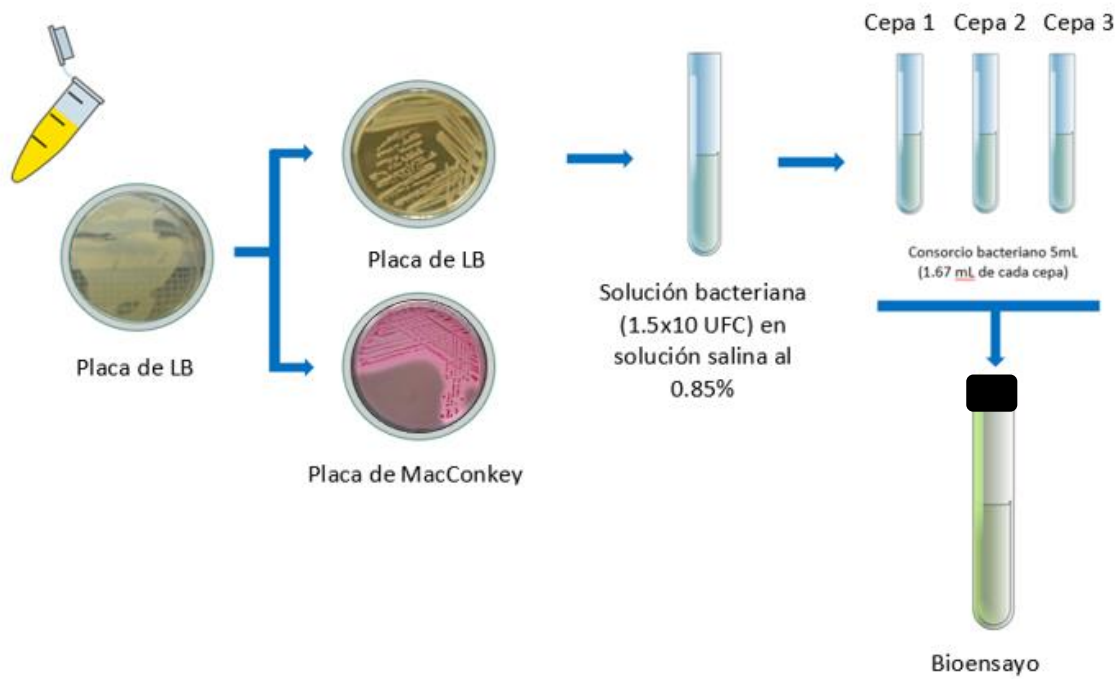
#### **8.4 Selección de cepas bacterianas para la formación de consorcios.**

Para llevar a cabo la formación de los consorcios bacterianos, se tomaron en cuenta las cepas enteropatógenas de *E. coli* (EPEC), aisladas del río Alsesesa, trabajo previo realizado por Valencia (2014). Las cuales fueron clasificadas en tres grupos (altos, medios y bajos), de acuerdo con los porcentajes de remoción del colorante negro solofenil. En la tabla 5 se muestran las cepas de *E. coli* que fueron consideradas en la realización de este estudio.

Cada consorcio se conforma por tres cepas bacterianas. Las cepas seleccionadas para la formación de cada consorcio fueron cultivadas en placas de LB a pH de 7.4, a 37°C; transcurridas 24 h se tomó una asada bacteriana de cada cepa y se sembró por estría cruzada en placas de LB y Macconkey, para su posterior incubación a 37°C; a las 24 h se tomó inóculo de cada cultivo de la placa de LB y se suspendió en solución salina al 0.85%, hasta tener una concentración de  $1.5 \times 10^9$  UFC/mL (equivalente al tubo #5 de la escala de Mc Farland) (Esquema 1).

**Tabla 5.** Cepas de *E. coli*.

Cepas EPEC aisladas del río Alseseca		Cepas patógenas tipo	Cepa No patógena
G8	G120	ETEC (E9034A)	K12
G1	5E'		
GL26	18CA		
J8	11VT		
4RE	G278	EPEC (E2348/69)	
V	3E'		
7Dic	5.1c		
5.4b	5.2c		



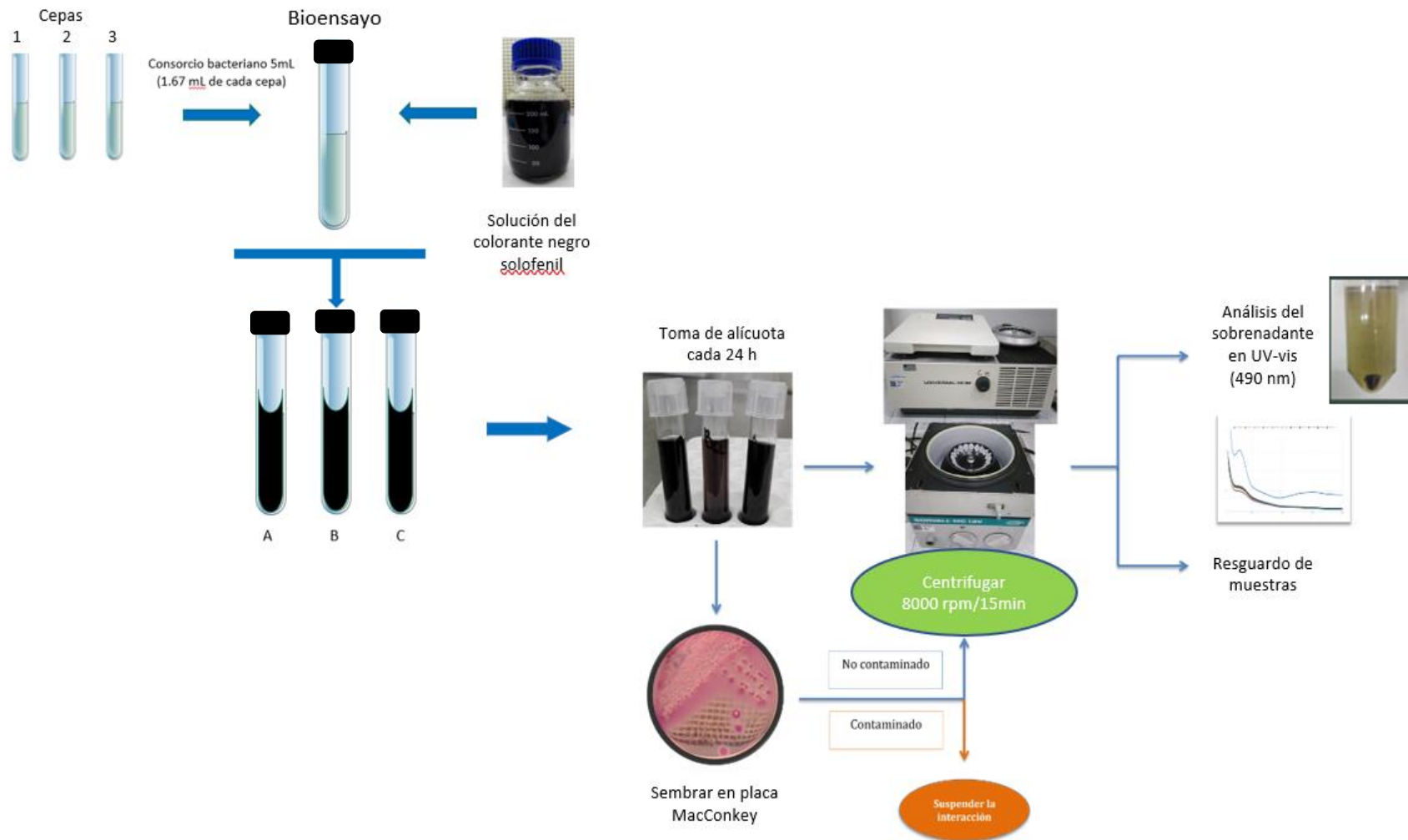
**Esquema 1.** Procedimiento para la conformación de consorcios bacterianos.

## **8.5 Interacción de consorcio bacterianos con el colorante**

### **8.5.1 Bioensayos con el colorante textil a concentraciones de 100 ppm y 200 ppm**

La realización de bioensayos permite ver las respuestas de los organismos seleccionados (cepas de *E. coli*), al exponerlas en presencia de algunas sustancias (colorante textil negro solofenil), además de que es una forma de evaluar experimentalmente el efecto de los agentes contaminantes presentes en una muestra de modo integral sobre algunos organismos. Por lo tanto, a realización periódica de bioensayos permite detectar el aumento, disminución o mantenimiento del nivel de toxicidad de un determinado contaminante presente en el ambiente. En el presente estudio se podrá determinar la capacidad de remoción de los consorcios bacterianos de *E. coli* ante el colorante textil azo a diferentes concentraciones, considerando la metodología reportada por Isik (2003), la cual sugiere las condiciones y tiempo para la realización de un bioensayo. Los ensayos de remoción por triplicado se llevaron a cabo inoculando los consorcios de *E. coli* en tubos de 60 mL, que contenía medio nutritivo en concentraciones conocidas y solución del colorante negro solofenil.

Los tratamientos se realizaron por triplicado en experimentos independientes, descritos a continuación. Para los bioensayos a concentración de 100 ppm del colorante, se inoculan 5mL de consorcio de *E. coli* (1.6mL de cada cepa; 3 cepas) en 40 mL de medio nutritivo a pH de 7.4 y 5 mL de solución de colorante negro solofenil. Para los bioensayos a concentración de 200 ppm del colorante, se inoculan 5mL de consorcio de *E. coli* (1.6mL de cada cepa; 3 cepas) en 35 mL de medio nutritivo a pH de 7.4 y 10 mL de solución de colorante negro solofenil. La incubación de los bioensayos se mantuvo por 10 días a 37 °C. Se tomaron muestras en forma periódica y aséptica con alícuotas de 3 mL, se centrifugaron a 8000 rpm por 15 min para recoger los sobrenadantes y se resguardaron para su posterior análisis. Las alícuotas tomadas antes de centrifugarlas se compararon con las muestras control y se tomó un inóculo que se sembró por estría cruzada en placas de MacConkey (esquema 2).



**Esquema 2.** Procedimiento para la realización de los bioensayos a diferentes concentraciones del colorante negro solofenil.



## 8.6 Determinación de los porcentajes de remoción del colorante

La espectrometría de absorbancia se usa ampliamente en cálculos cualitativos, cuantitativos y estructurales. En este estudio la determinación de la presencia del colorante es muy útil, ya que el color a menudo puede correlacionarse con la presencia y/o la estructura de una sustancia química particular (Manfred, 1999).

Se utilizó un espectrofotómetro de UV-vis a una longitud de onda de 490 para obtener los valores de absorbancia de los sobrenadantes que previamente se centrifugaron a 12000 rpm durante 20 min. Los resultados se procesaron para determinar el porcentaje de remoción del colorante mediante la siguiente fórmula (Saratale, 2011):

$$\text{Porcentaje de remoción} = (D_{i(0t)} - D_{f(t)} / D_{i(0t)}) * 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:  $D_i$  es la absorbancia a tiempo cero;  $D_f$  es la absorbancia después de incubación ( $t = \text{día}$ ).

## 8.7 Análisis estadístico

Los datos experimentales se sometieron a un análisis estadístico descriptivo utilizando el programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS), para observar el comportamiento que presentaron los siete consorcios patógenos de *E. coli* en la remoción del colorante a diferentes concentraciones, a través de la determinación de las medias de los porcentajes de remoción y las variaciones correspondientes, lo que permitirá la comparación entre ellos a través de las gráficas de cajas y alambres. Así como los resultados de las remociones del colorante se evaluaron con la prueba de ANOVA y su prueba múltiple de Tuckey, con una significancia de  $P < 0.05$  (software SPSS versión 2.0).

## **8.8 Caracterización de posibles metabolitos secundarios**

Para el análisis espectrofotométrico de FTIR y RMN de  $^1\text{H}$ , sólo se analizaron las muestras de los consorcios que presentaron mayor porcentaje de remoción del colorante a 100 ppm. A partir de los sobrenadantes obtenidos de cada bioensayo seleccionado y por separado, se realizaron extracciones con disolventes orgánicos (30 mL de éter etílico, 30 mL de acetato y 40 mL de hexano), se concentraron en un rotavapor y procesaron hasta que se eliminó el exceso de agua. Una vez obtenido cada concentrado se analizaron las muestras por las técnicas de cromatografía por capa fina, FTIR y RMN de  $^1\text{H}$ .

### **8.8.1 Cromatografía de capa fina**

La técnica de cromatografía permite la separación de una mezcla de dos o más compuestos por distribución entre dos fases inmiscibles: una fase móvil (disolventes orgánicos), que transporta las sustancias que se separan y que progresa en relación con la otra denominada fase estacionaria (sílica gel).

Las muestras se corrieron en una placa cromatográfica de sílica gel (60F<sub>254</sub> Merck), de 2 cm por 4 cm, utilizando como fase móvil una mezcla de disolventes metanol: éter etílico (7:3).

### **8.8.2 Espectroscopia FTIR**

La técnica de espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) se emplea en la caracterización de diferentes compuestos para identificar los grupos funcionales presentes en las muestras. Esta técnica es sensible a la estructura, ya que reflejan las vibraciones características de los grupos de átomos por lo que se emplean para identificar especialmente los grupos orgánicos.

La espectroscopia de FTIR se llevó a cabo en un equipo Perkin Elmer FT-IR Spectrum One Spectrometer, en la región de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . Después de realizar la línea base, se colocó el plato y la punta correspondiente en el sistema de ART y se procedió al análisis.

### 8.8.3 Espectroscopia RMN de $^1\text{H}$

La espectrometría de resonancia magnética nuclear (RMN), es una técnica que exprese las propiedades magnéticas de ciertos núcleos para identificar grupos funcionales, mediante la comprensión de los diferentes entornos químicos, el desplazamiento químico puede ser utilizado para obtener información estructural sobre el número y tipo de entidades químicas de la molécula en una muestra.

Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  se obtuvieron en un espectrómetro NEOL modelo Oxford de 300 MHz, utilizando como disolvente cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ), para disolver la muestra.

## IX. RESULTADOS

Las malas prácticas de trabajo, así como la regulación de aguas residuales para su descarga tiene un papel importante en los niveles tecnológicos, económicos, éticos, sociales, de salud y ecológicos. Desde el momento en que el agua residual es desechada con altos contenidos de contaminantes biológicos y químicos y no son tratados de forma adecuada, ésta se relaciona con el medio biótico y abiótico, generando interacciones que a mayor o menor medida se vuelven complejas. Desde el punto de vista de salud, la sola presencia de cepas patógenas de *E. coli* como la EPEC en el agua residual, se considera un foco de infección que impacta principalmente tanto a nivel económico, social como político, ya que las enfermedades por algún patogruppo de *E. coli* producen altos índices de mortalidad y morbilidad por causar cuadros diarrogénicos y por si no fuera poco, si a esto le incorporamos un contaminante más como los colorantes textiles azo, el problema ambiental se vuelve más alarmante, ya que es conocida la capacidad de las cepas de *E. coli* por remover y degradar colorantes azo, dando como resultado la generación de metabolitos más tóxicos que el colorante de procedencia, lo que representa un problema de salud ambiental que va más allá de una diarrea, ya que se habla de que los metabolitos son ecotóxicos.

### 9.1 Cepas patógenas de *E. coli*

Para la formación de los consorcios utilizados en el presente trabajo, se partió de un grupos de cepas silvestres EPEC con capacidad de remoción del colorante negro solofenil ,que de acuerdo a sus porcentajes de remoción a diferentes concentraciones del colorante se agruparon en altos (A), medios (M) y bajos (B) (Valencia, **2014**); de las cuales se seleccionaron 9 cepas con porcentajes de remoción bajo, 4 cepas con porcentajes de remoción medio y 7 cepas con porcentajes de remoción alto (Tabla 6).

**Tabla 6.** Cepas EPEC seleccionadas para la conformación de consorcios.

Clasificación	% de remoción a 200 ppm	% de remoción a 300 ppm	Cepas silvestres EPEC
BAJO (B)	27-41%	5-23%	(15; 5 1.c; GL27; 5 2.c; 44; G1; G8; 5 4.b; G120)
MEDIO (M)	42-56%	24-42%	(5E'; GE'; 18CA; GL26)
ALTO (A)	57-70%	43-60%	(V; 3E'; 4RE; 7 Dic; G278; 11VT; J8)

## 9.2 Integración de consorcios bacterianos

En este estudio se formaron siete consorcios, cada uno está integrado por tres cepas de *E. coli* (Tabla 7). Para la formación de consorcios denominados homogéneos se consideraron cepas con los mismos porcentajes de remoción (altos, medio y bajos), los cuales fueron: dos consorcios con porcentajes de remoción alto (consorcio IV y VI), un consorcio con porcentajes de remoción medio (consorcio III), dos consorcios con remoción baja (consorcio II y VII). Para la formación de consorcios denominados heterogéneos se consideraron cepas con diferentes porcentajes de remoción, es decir, una cepa de cada porcentaje alto, medio y bajo, que en este caso fue el consorcio I. También se formó un consorcio con cepas tipo: la E2348/69 (EPEC), la E9034A (ETEC) y la K12 (*E. coli* no patógena) que corresponde al consorcio V.

**Tabla 7.** Consorcios de *E. coli*

	Consortio I	Consortio II	Consortio III	Consortio IV	Consortio V	Consortio VI	Consortio VII
Cepas	5E' (EPEC) (M)	G1 (EPEC) (B)	5E' (EPEC) (M)	4RE (EPEC) (A)	E2348/69 (EPEC)	3E' (EPEC) (A)	5 1.c (EPEC) (B)
	G278 (EPEC) (A)	G8 (EPEC) (B)	18CA (EPEC) (M)	11VT (EPEC) (A)	E9034A (ETEC)	V (EPEC) (A)	5 2.c (EPEC) (B)
	G8 (EPEC) (B)	G120 (EPEC) (B)	GL26 (EPEC) (M)	J8 (EPEC) (A)	K12 (No Patógena)	7 Dic (EPEC) (A)	5 4.b (EPEC) (B)

### 9.3 Interacción de los consorcios bacterianos con el colorante negro solofenil a 100 ppm

#### 9.3.1 Cambios observados en los bioensayos



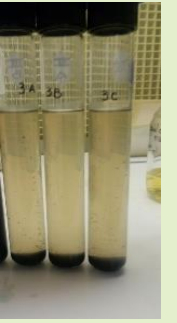








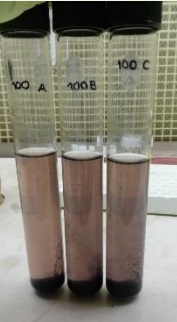

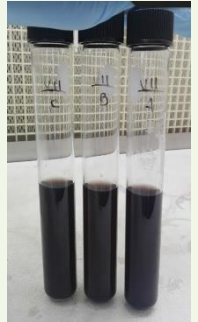
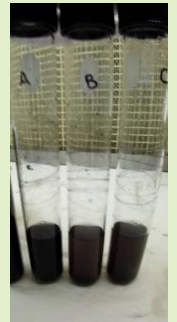




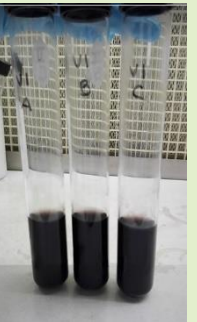

Los cambios observados durante el monitoreo de cada ensayo se reportan en la tabla 8, siendo la decoloración y precipitación los cambios más evidentes al inicio (día 1), mitad (día 5) y final (día 10) de cada bioensayo.

En los ensayos de interacción de los consorcios I, III, IV y V con el colorante, se observó decoloración y presencia de precipitado al transcurrir el primer día, manteniéndose así hasta el tercer día. A partir del quinto día, no se observó decoloración, sin embargo, aún había presencia de precipitado hasta el final del ensayo.

En el ensayo donde se sometió a interacción el consorcio II, se observó decoloración y presencia de precipitado, manteniéndose así hasta la mitad del ensayo. Al final del ensayo no había decoloración ni presencia de precipitación.

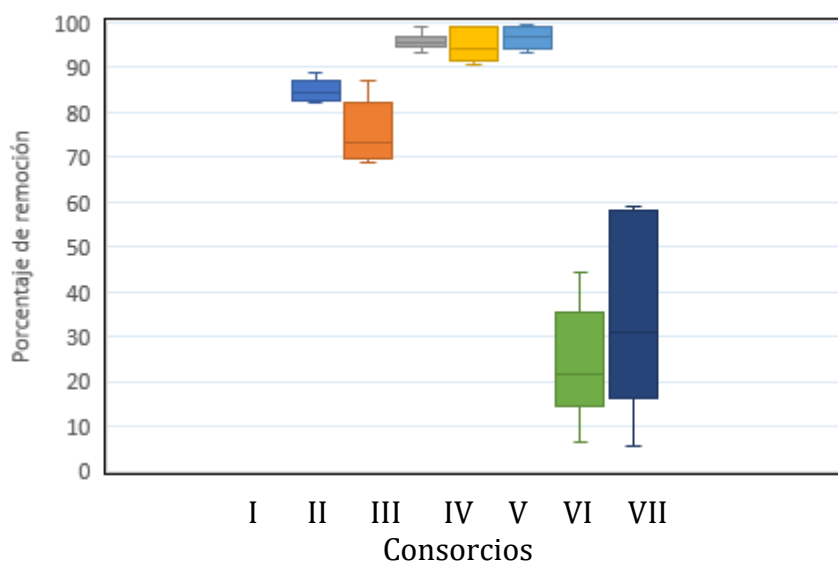
En los ensayos donde se sometieron a interacción los consorcios VI y VII, no se observó decoloración ni precipitación a lo largo de los diez días.

**Tabla 8.** Bioensayos de interacción de consorcios bacterianos con el colorante a 100 ppm en t (día) = 1, 5, 10.

Día	Consortio I	Consortio II	Consortio III	Consortio IV	Consortio V	Consortio VI	Consortio VII
1							
5							
10							

### 9.3.2 Porcentajes de remoción

El porcentaje de remoción más alto obtenido fue por parte de el consorcio V con un promedio del 96.63%, seguido del consorcio III con un 95.84% y el consorcio IV con un 94.71%. Mientras que los consorcios I y II lograron remover el colorante un 84.80% y un 75.59%, respectivamente. Los porcentajes de remoción más bajos se obtuvieron por parte de los consorcios VII y VI, alcanzando solo el 34.22% y 23.80%, respectivamente como se observa en la gráfica 1. Destacando el hecho de que existe una mayor dispersión en los porcentajes de remoción obtenidos parte de los consorcios VI y VII. En cuanto al análisis estadístico, existe una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre las remociones de los consorcios I al V con respecto a los consorcios VI y VII.



**Gráfica 1.** Remoción del colorante negro solofenil a 100 ppm obtenido por cada consorcio.

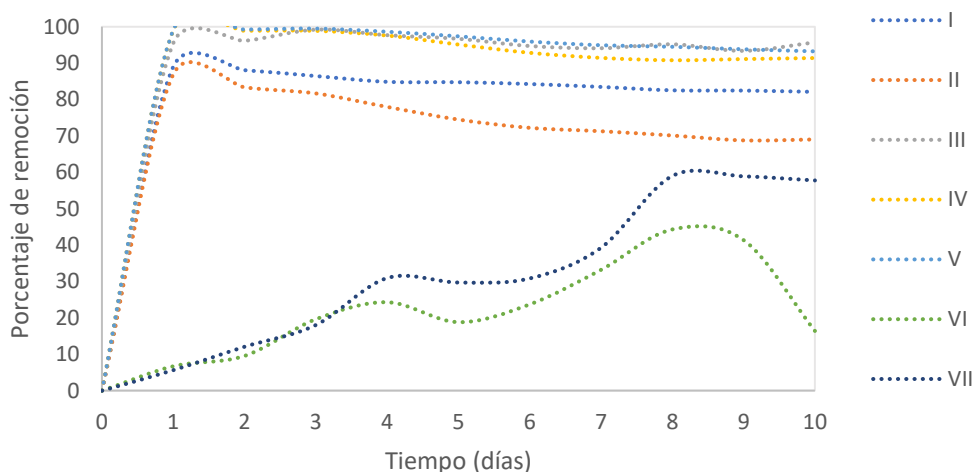
El comportamiento de cada consorcio en la remoción del colorante se representa en la gráfica 2, en la cual se observa que los consorcios del I al V lograron remover al colorante al primer día y se mantuvieron sin cambios considerables, y con variación en el porcentajes de remoción del seis por ciento desde el inicio al final en cada consorcio, a excepción del consorcio II, que presentó una variación del diez en el primer día y del siete por ciento en el último día, con respecto a los demás.

Para el caso del consorcio VI se observa que removió el colorante de forma gradual hasta el cuarto día, después disminuyó el porcentaje de remoción al quinto día y vuelve a aumentar gradualmente a partir



del sexto al octavo día, y decrece el porcentaje de remoción del noveno al décimo día en más del veinte por ciento.

En cuanto al consorcio VII, se observa una remoción constante con dos etapas, la primera ocurre del cuarto al sexto día y la segunda del octavo al décimo día.




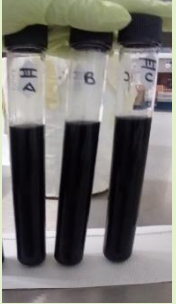
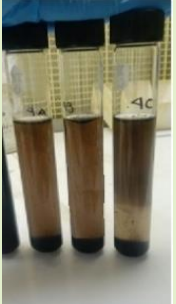
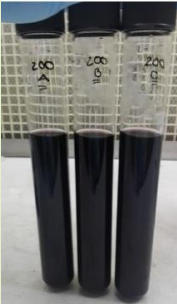

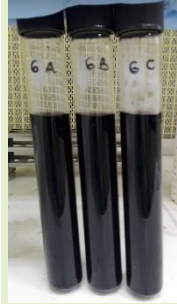

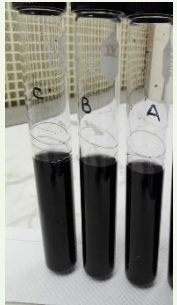
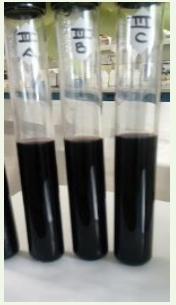


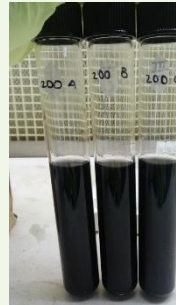
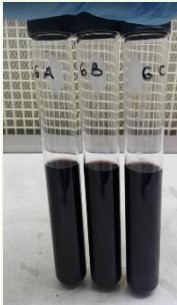
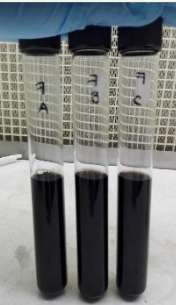
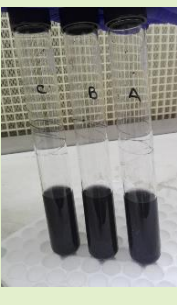


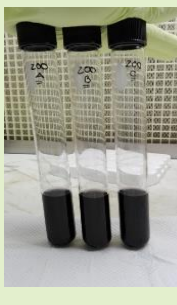
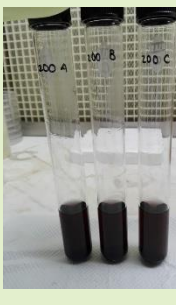
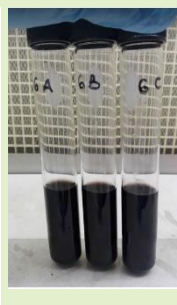
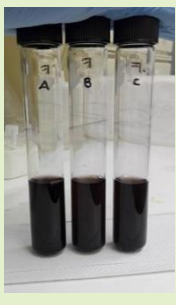
**Gráfica 2.** Comparación de los porcentajes de remoción del colorante negro solofenil a 100 ppm a lo largo de cada bioensayo.

#### 9.4 Interacción de los consorcios bacterianos con el colorante negro solofenil a 200 ppm.

##### 9.4.1 Cambios observados en los bioensayos

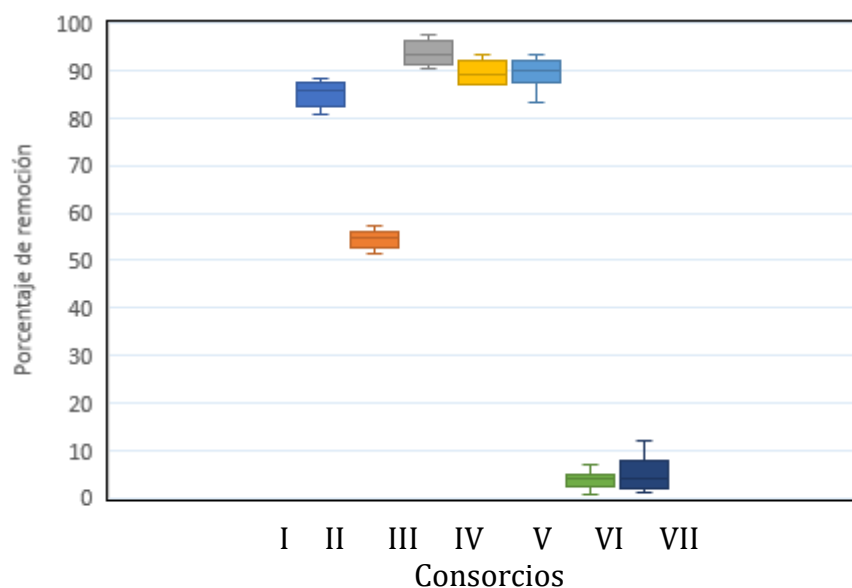
Durante el tiempo de interacción al que se sometió cada consorcio, se observaron cambios con respecto a la muestra control como se reporta en las imágenes de la tabla 9, que corresponden al inicio (día 1), mitad (día 5) y final (día 10) de cada bioensayo. El consorcio III, mostró decoloración en los primeros tres días, así como presencia de precipitación, a partir del quinto día no se observó decoloración ni precipitación, manteniéndose así hasta el final del ensayo. En los demás consorcios no se observó decoloración ni presencia de precipitado a lo largo de los diez días.

**Tabla 9.** Bioensayos de interacción consorcio bacteriano con el colorante a 200 ppm en t (día) = 1, 5, 10.

Día	Consortio I	Consortio II	Consortio III	Consortio IV	Consortio V	Consortio VI	Consortio VII
1							
5							
10							

### 9.4.2 Porcentajes de remoción

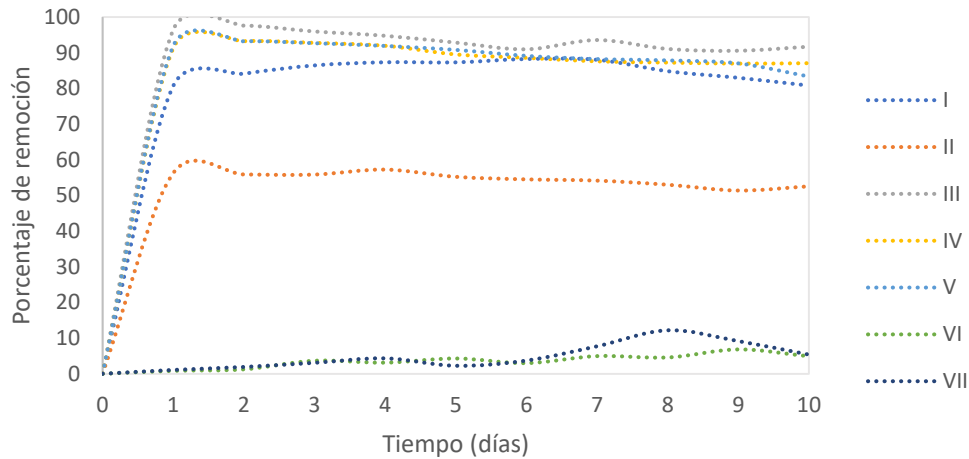
Los porcentajes de remoción más altos se alcanzaron por parte del consorcio III con un promedio del 93.54%, seguido del consorcio IV con un 89.61% y el Consorcio V con un 89.60%. Mientras que los consorcios I y II lograron remover el colorante un 85.07% y un 54.60%, respectivamente. Los porcentajes de remoción más bajos se obtuvieron por parte de los consorcios VII y VI, con el 3.74% y 5.08%, respectivamente, de igual forma se observa que hay poca variación entre los porcentajes de remoción obtenidos en cada consorcio como se observa en la gráfica 3. En cuanto al análisis estadístico, se encontró que existe una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) por parte de los consorcios VI y VII con respecto a los demás consorcios.



**Gráfica 3.** Remoción del colorante negro solofenil a 200ppm obtenido por cada consorcio.

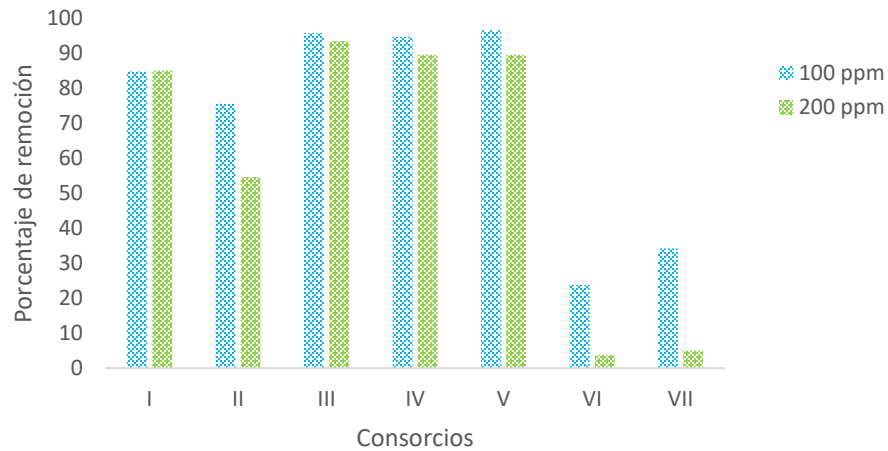
El comportamiento de cada consorcio en los bioensayos con mayor concentración del colorante se observa en la gráfica 4, en donde se aprecia que los siete consorcios se comportaron de forma similar, es decir, a pesar de que los consorcios I, II, III, IV y V removieron al colorante en más del cincuenta por ciento transcurrido el primer día, no se observa cambio significativo en la remoción en los días posteriores, ya que se mantienen estables con un margen de remoción del nueve por ciento desde el primer día hasta el último.

En el caso de los consorcios VI y VII, tuvieron un margen de remoción del seis y once por ciento, respectivamente, a pesar de que no removieron significativamente al colorante el primer día.



**Gráfica 4.** Comparación de porcentajes de remoción del colorante negro solofenil a 200 ppm a lo largo del bioensayo.

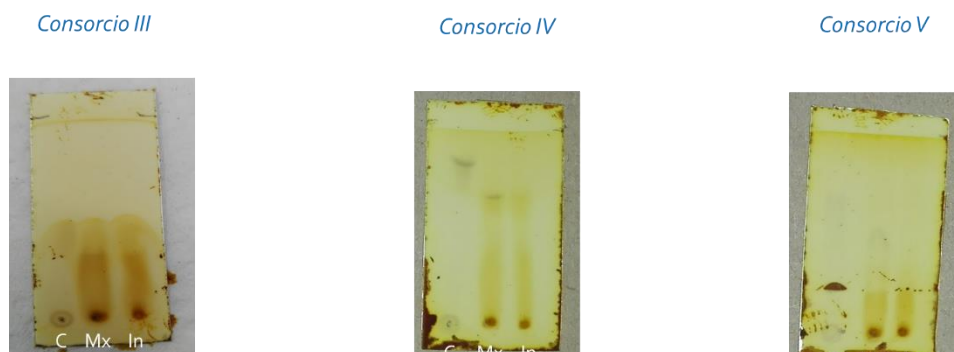
Por último, al considerar los porcentajes de remoción de los siete consorcios en ambas concentraciones del colorante, se observa que los porcentajes de remoción no son los mismo, siendo los consorcios del I al V, los que presentan mejor remoción, mientras que los consorcios VI y VII presentaron menor remoción en ambas concentraciones del colorante, mostrando una diferencia significativa ( $P < 0.05$ ). Destaca el hecho de que, el consorcio II disminuyó más el porcentaje de remoción a 200 ppm con respecto a 100 ppm, mientras que los consorcios III, IV y V fueron los más eficientes en la remoción del colorante en ambas concentraciones (Gráfica 5).



**Gráfica 5.** Comparación entre los porcentajes de remoción a diferentes concentraciones por cada consorcio.

### 9.5 Caracterización de metabolitos secundarios

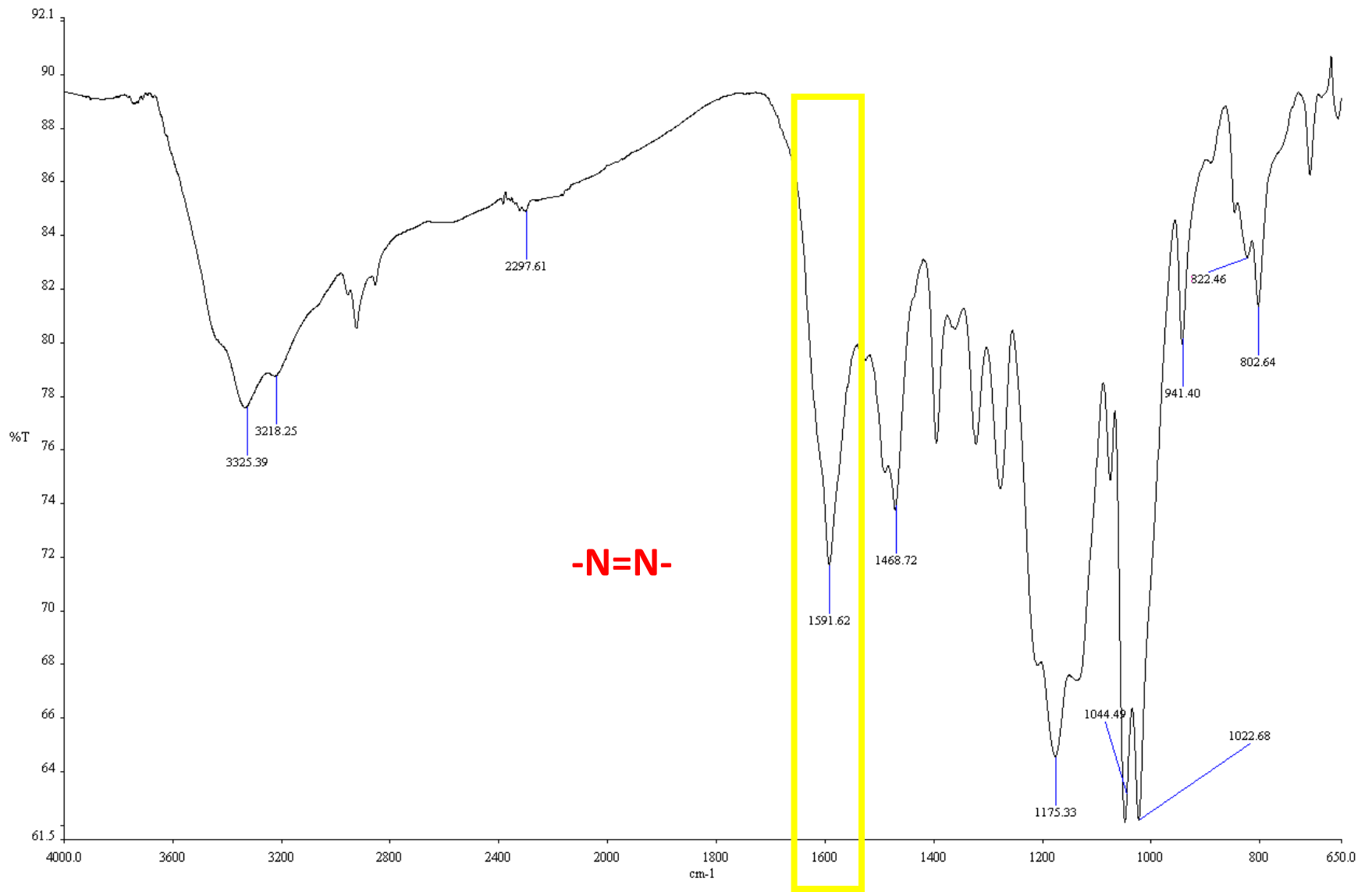
En las placas cromatográficas de capa fina se observa la separación de una serie de compuestos de los concentrados, producto de los extractos de los bioensayos de interacción de los consorcios III, IV y V con el colorante negro solofenil a 100 ppm. Se aislaron parcialmente algunos de esos compuestos y se sometieron a un estudio de IR y RMN de  $^1\text{H}$ .



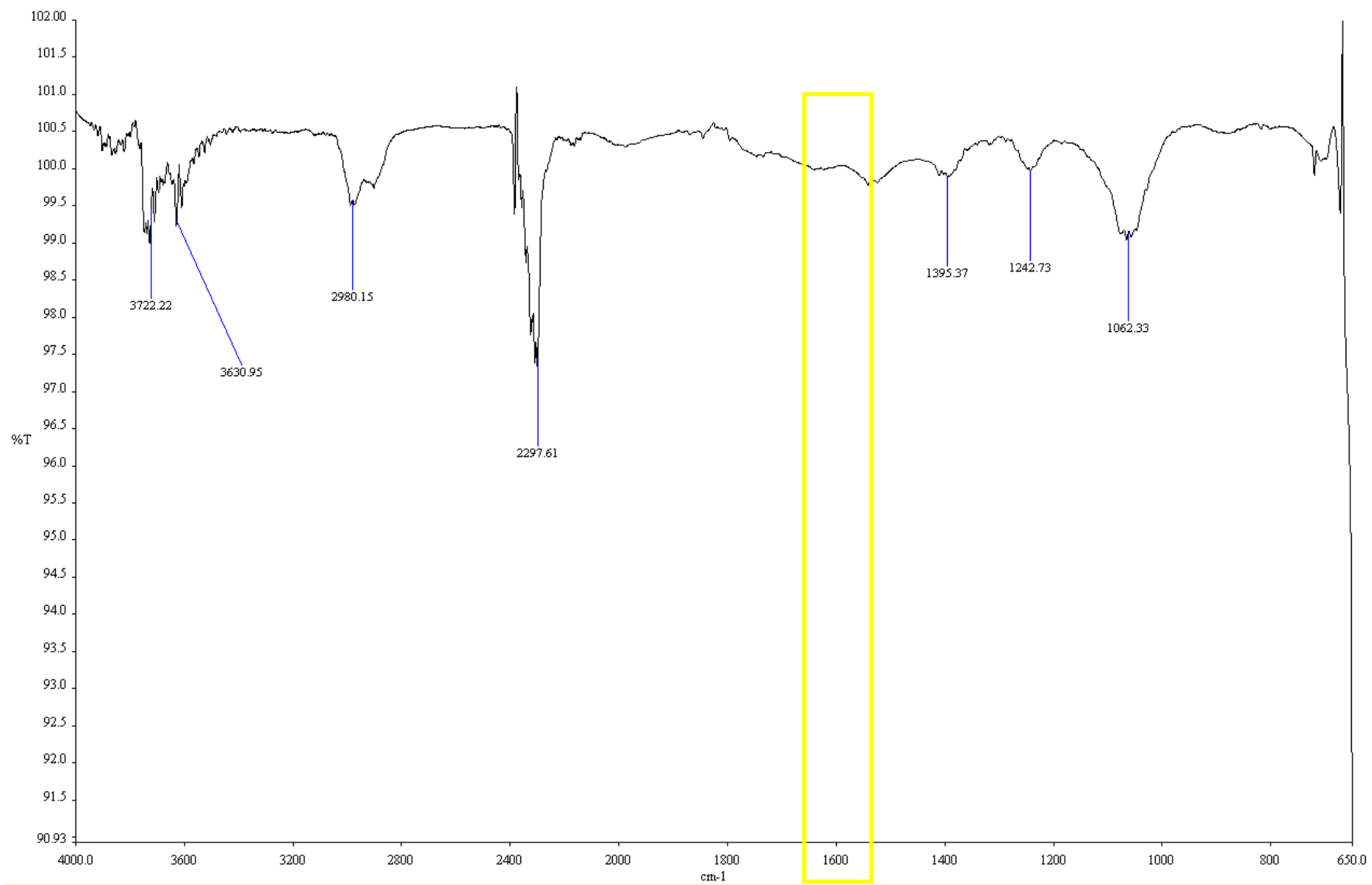
Donde: C = colorante negro solofenil; Mx = colorante + producto de interacción; In = producto de interacción

**Fig. 5.** Cromatografía en capa fina de los extractos obtenidos

En la técnica espectroscópica de infrarrojo (FTIR), se observan señales las señales en  $3000-3500\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a las vibraciones de los enlaces químicos característicos de aminas primarias ( $-\text{NH}_2$ ). Adicionalmente se observan vibraciones en aproximadamente  $1280\text{ cm}^{-1}$  que corresponden a los enlaces C-N, y en la región de  $775\text{ cm}^{-1}$  se observan vibraciones correspondientes a enlaces N-H. Al comparar el espectro 1 que corresponde al colorante negro solofenil con los espectros obtenidos de los bioensayos, se observa la ausencia de la vibración correspondiente al grupo azo ( $-\text{N}=\text{N}-$ ) en aproximadamente  $1591.42\text{ cm}^{-1}$  en los espectros 2, 3 y 4, que corresponden a los extractos donde se utilizaron los consorcios III, IV y V, respectivamente, lo cual es consistente con la reducción del grupo azo a sus correspondientes aminas.

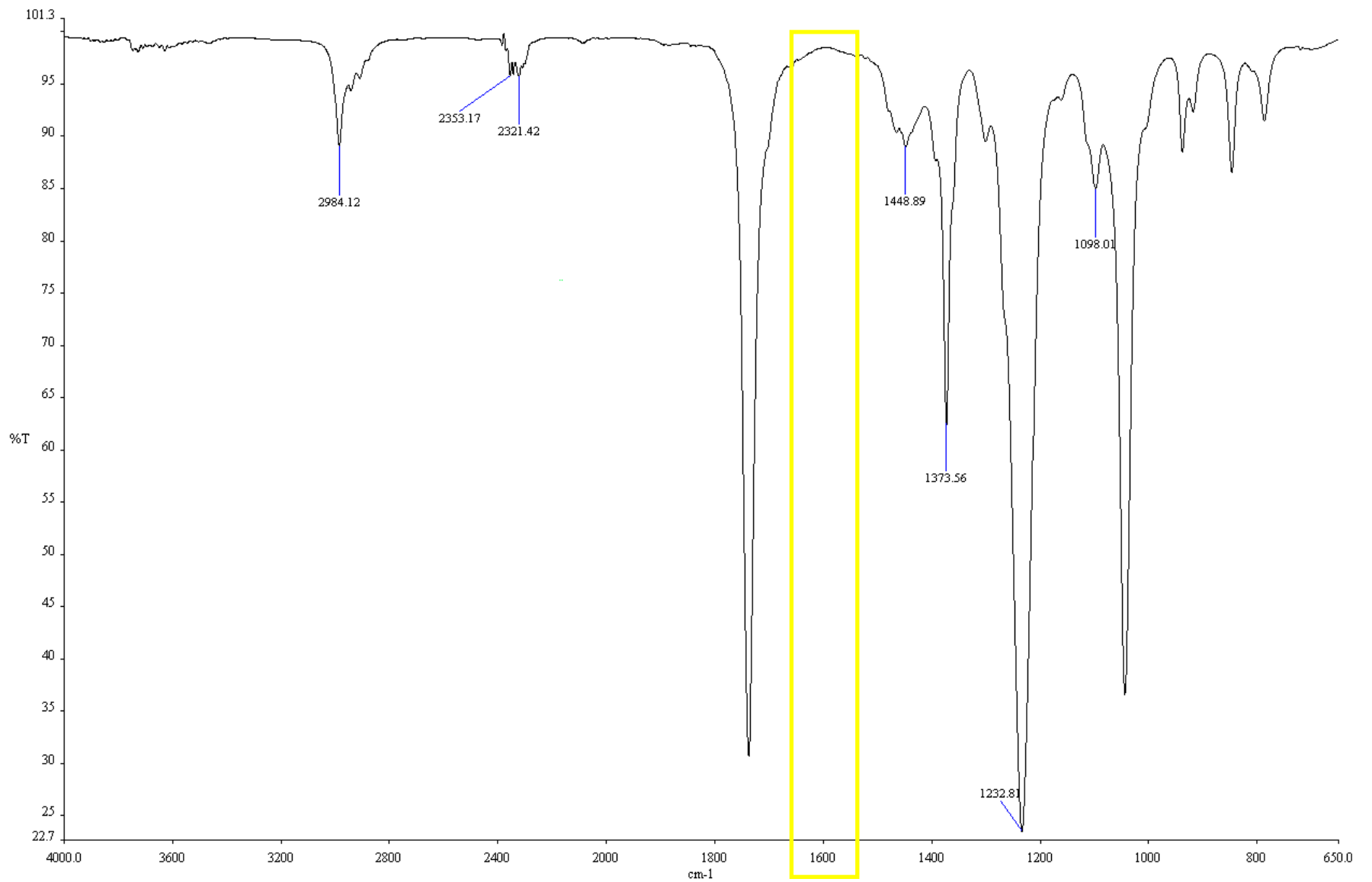


**Espectro 1.** Espectro de FTIR del colorante textil negro solofenil.

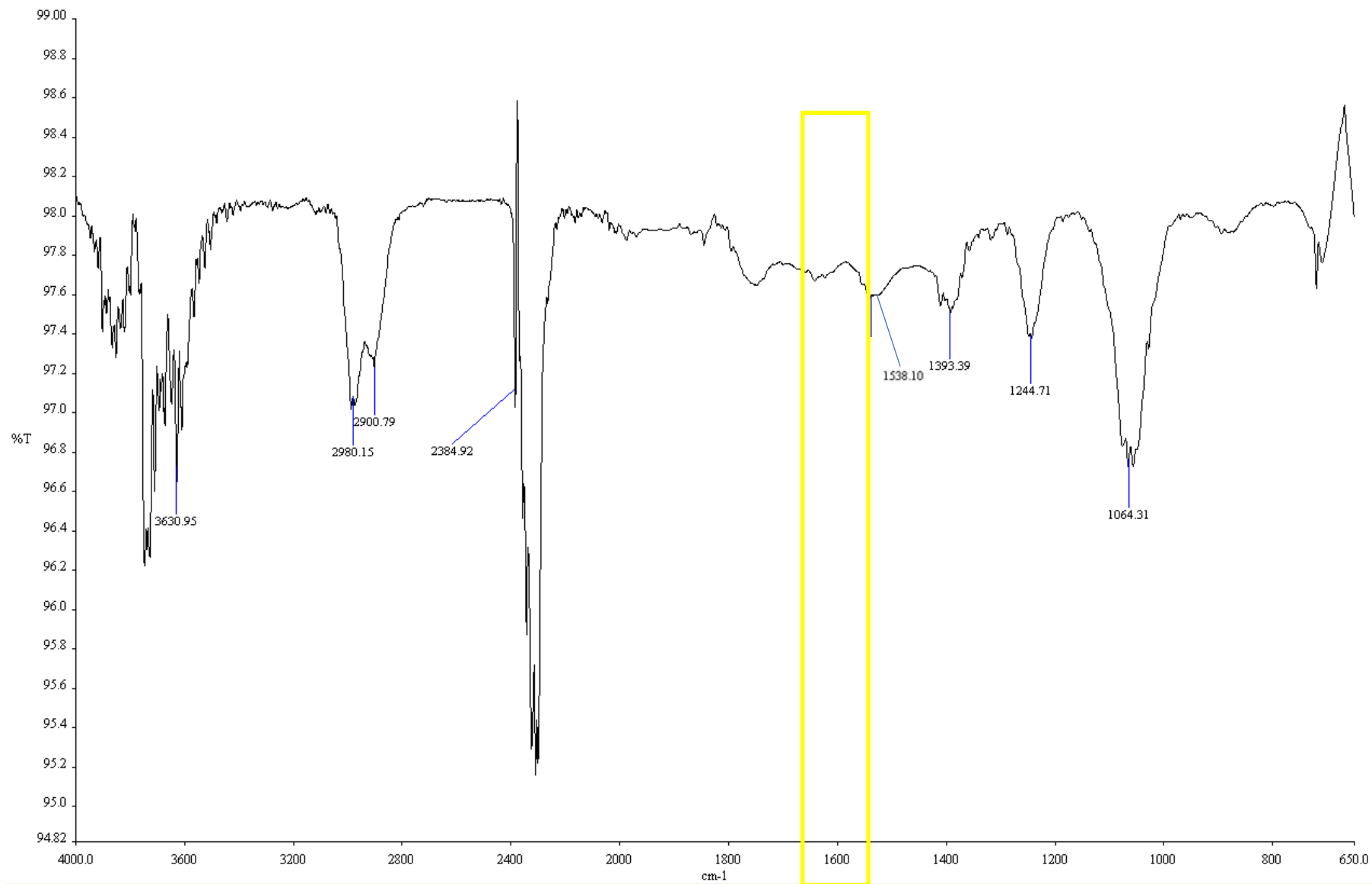


**Espectro 2.** Espectro de FTIR del extracto obtenido del ensayo de interacción consorcio III con el colorante a 100 ppm.





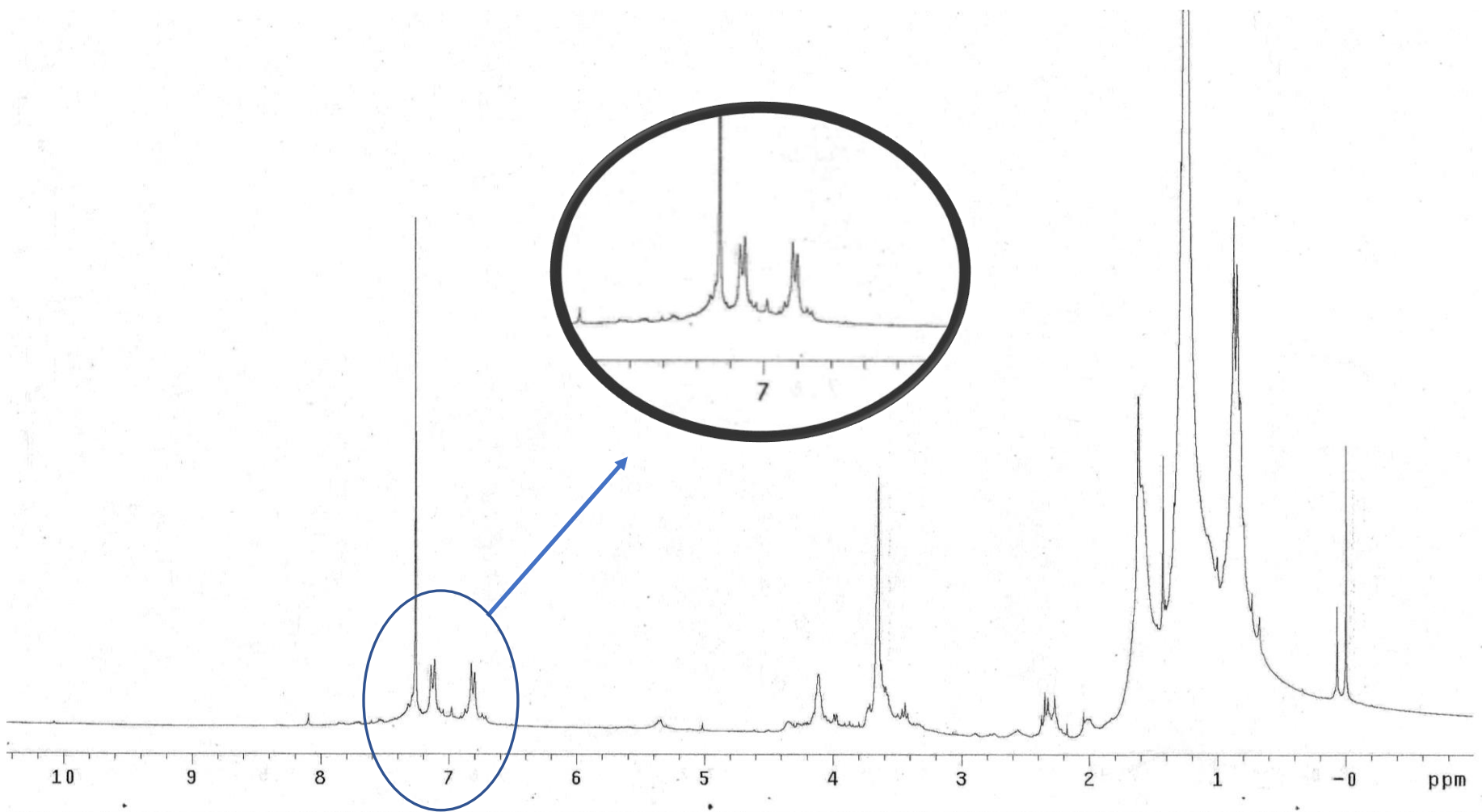
**Espectro 3.** Espectro de FTIR del extracto obtenido del ensayo de interacción consorcio IV con el colorante a 100 ppm.



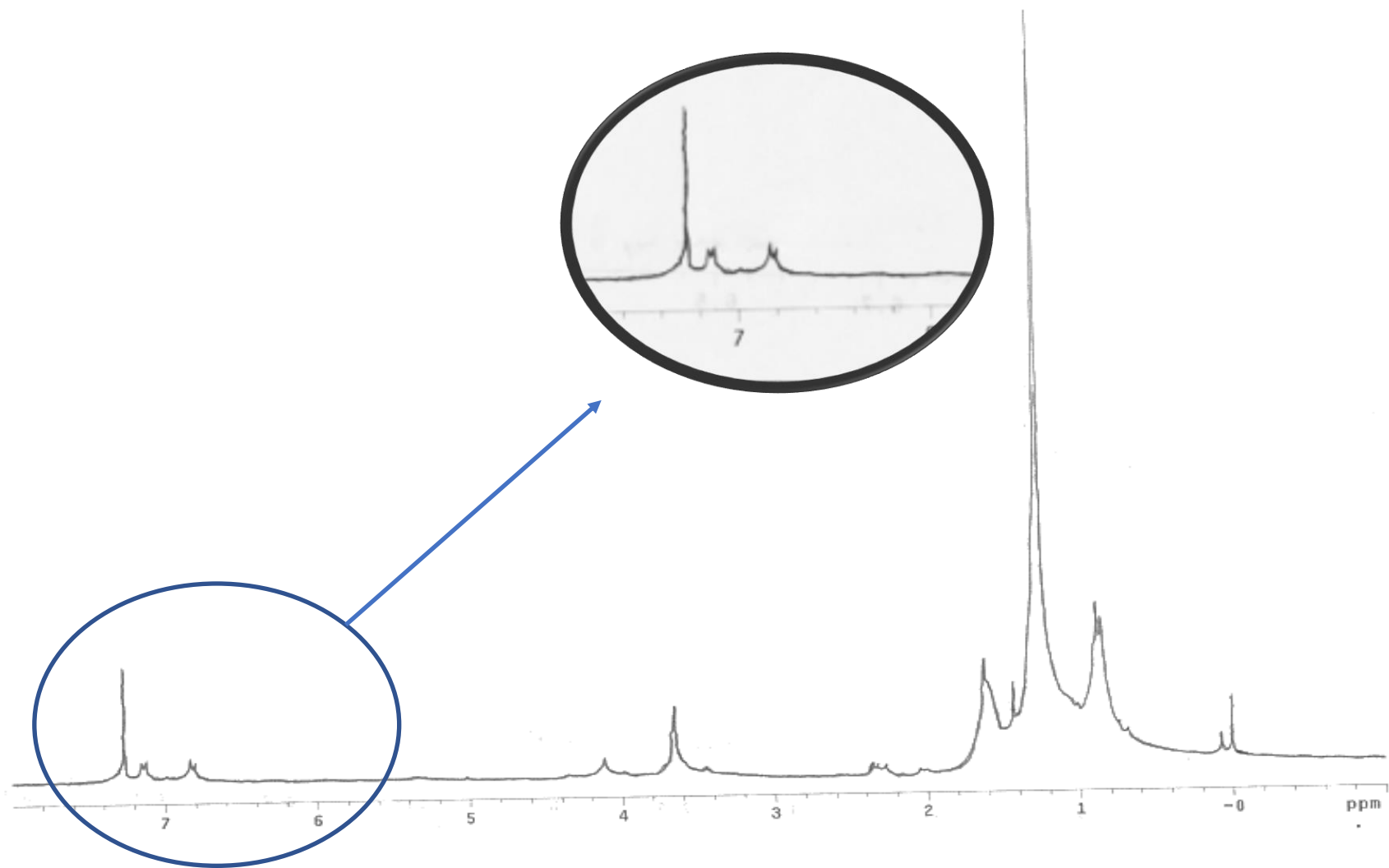
**Espectro 4.** Espectro de FTIR del extracto obtenido del ensayo de interacción consorcio V con el colorante a 100 ppm.

En el análisis de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN de  $^1\text{H}$ ), se pudo observar que en los concentrados de los consorcios III y IV (espectros 5 y 6, respectivamente), presentan señales que aparecen a campos altos que corresponden a contaminantes alifáticos, posiblemente provenientes de los disolventes utilizados en la extracción. Mientras que las señales dobles de dobles que aparecen en la región de 6.8 a 7.2 ppm, son señales características de los sustituyentes 1,4 en los sistemas aromáticos, sugieren que el grupo di azo, se redujo a su correspondiente di amina.

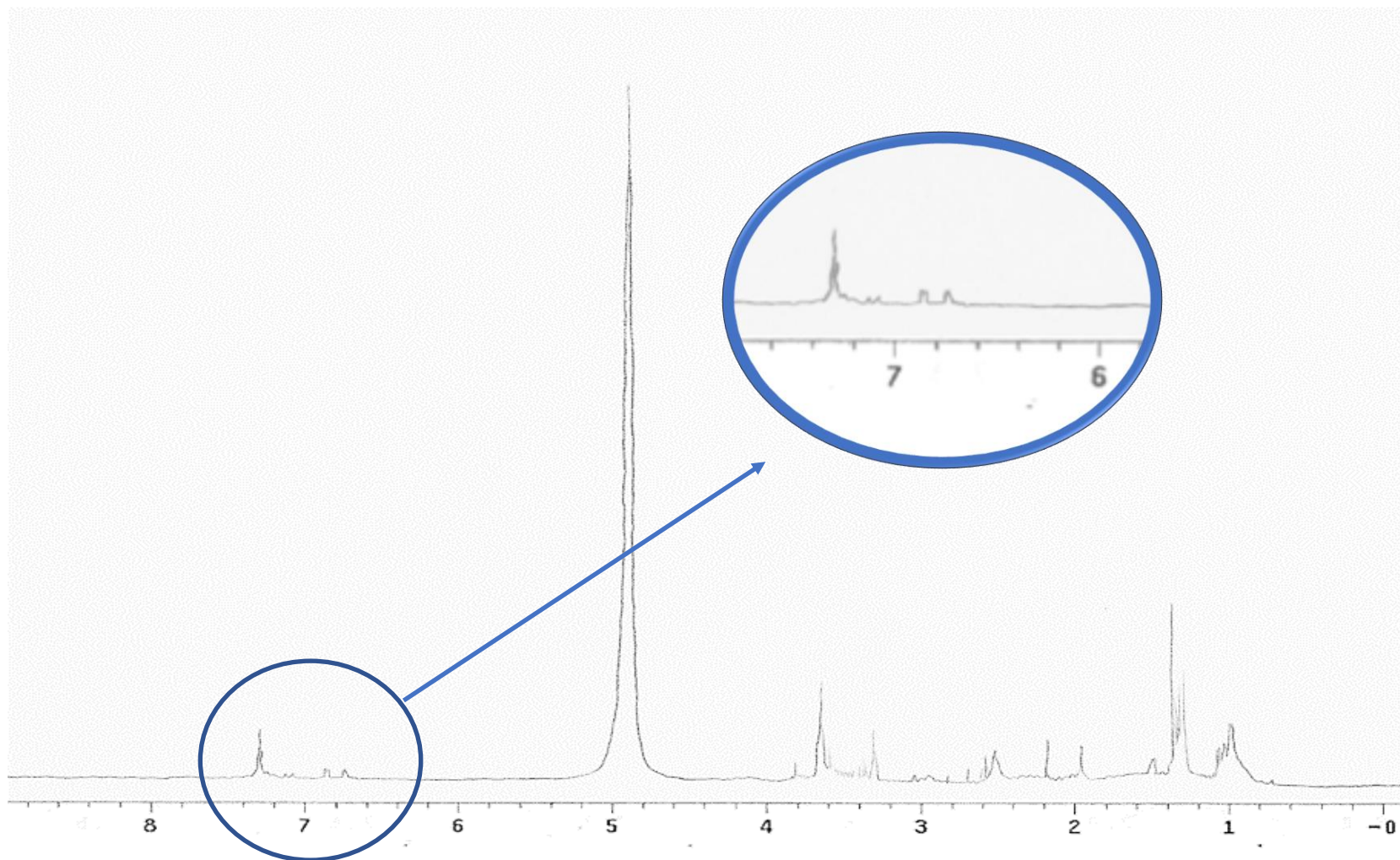
Un resultado similar se encontró en el concentrado del consorcio V (espectro 7). Sin embargo, en este caso se observa una señal intensa en 5 ppm, que corresponde a los hidrógenos del agua, y las demás señales son impurezas que se presentan por parte de los disolventes utilizados en la extracción de la muestra. De igual forma también se observaron señales dobles de dobles en la región de 6.5 a 7 ppm, lo que indican que el sistema aromático cambió su naturaleza electrónica, es decir, los sustituyentes que en el sistema aromático azo ( $-\text{N}=\text{N}-$ ), cambiaron a aminas ( $-\text{NH}_2$ ). Es importante mencionar que un estudio espectroscópico de RMN de  $^1\text{H}$  más detallado fue difícil de realizar por la pequeña cantidad de muestra que se utilizó en los bioensayos.



**Espectro 5.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) del extracto del ensayo de interacción del consorcio III con el colorante a 100 ppm.

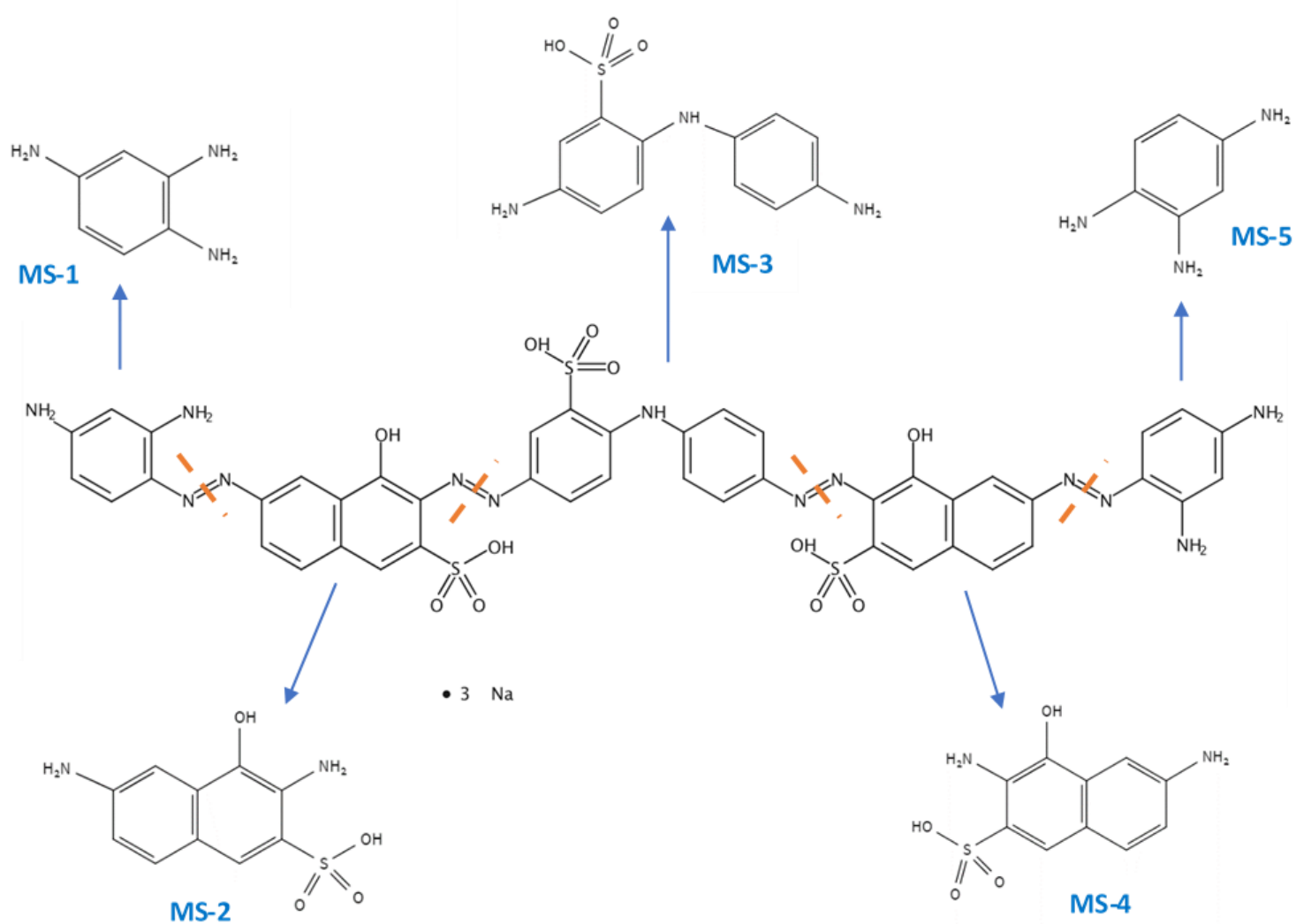


**Espectro 6.** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) del extracto del ensayo de interacción del consorcio IV con el colorante a 100 ppm.



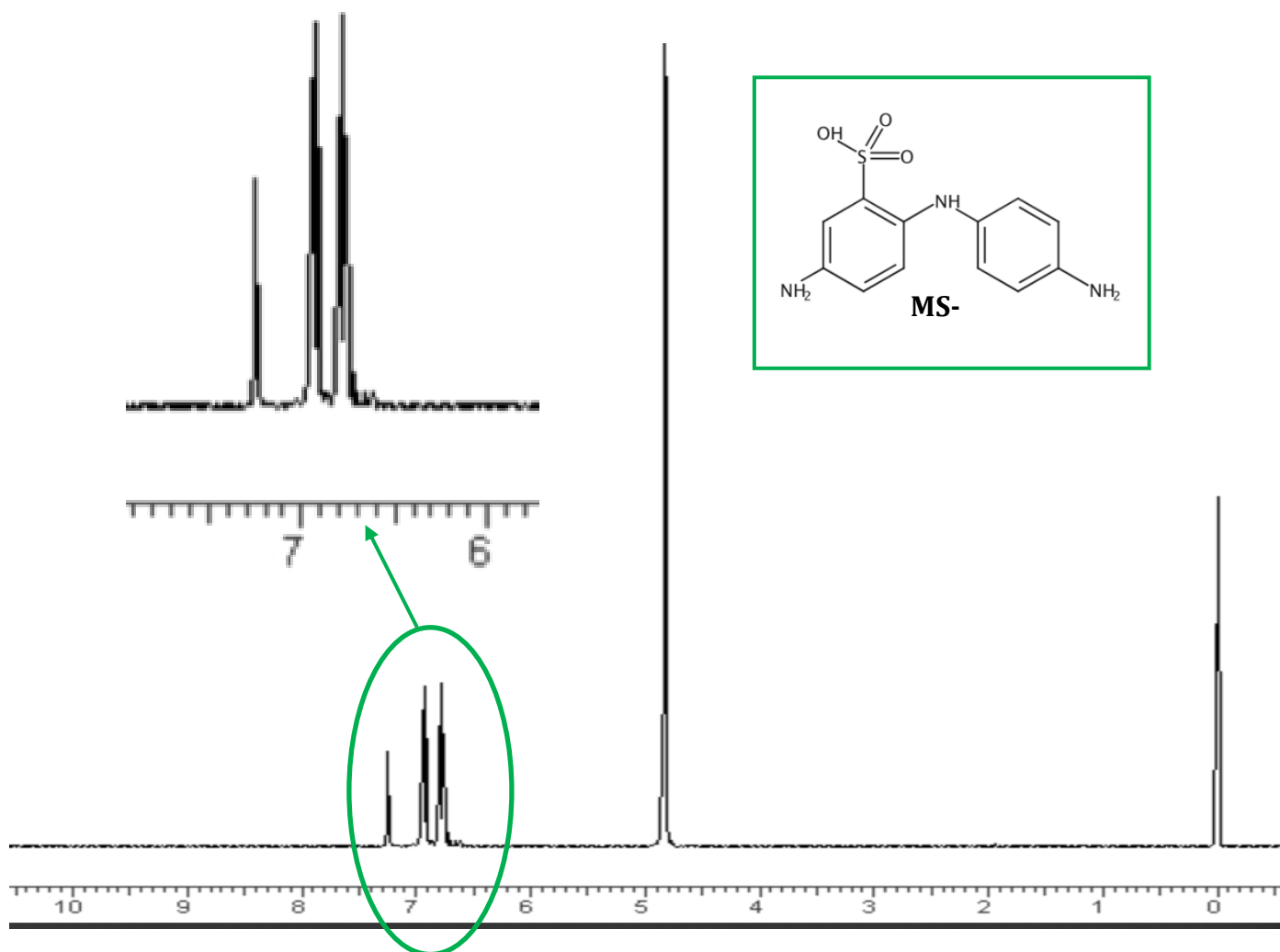
**Espectro 7.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) del extracto del ensayo de interacción del consorcio V con el colorante a 100 ppm.

Los estudios espectroscópicos realizado anteriormente, se realizaron con el fin de saber si al utilizar los consorcios patógenos de *E.coli*, hubo interacción con el colorante y removerlo o incluso degradarlo mediante la reducción de los enlaces azo (-N=N), y de ser así, se propone la obtención de algún metabolito secundario como se muestra en la figura 6.



**Figura 6.** Posibles metabolitos secundarios obtenidos por la reducción del enlace azo del colorante negro solofenil.

Retomando el resultado obtenido en el extracto del bioensayo del consorcio V, en dónde se muestra un desplazamiento en las señales de 6.5 a 7 ppm del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (espectro 7), coincide con el espectro 8 del metabolito propuesto **MS-3** tomado de SciFinder, lo que sugiere que el consorcio V degradó al colorante hasta la obtención de la correspondiente bifenilamina (ácido bencen sulfónico, 5-amino-2-[(4-f



**Espectro 8.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del metabolito secundario propuesto **MS-3** obtenido de SciFinder, 2018.



## X. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

El nicho ecológico de los microorganismos en un determinado medio es influenciado por factores externos como cambios de pH, salinidad, contaminantes químicos, que en la mayoría de los casos son generados por actividades antropogénicas. Sin embargo, se ha visto que los microorganismos aislados de zonas contaminadas con desechos de industrias relacionadas al color muestran mayor potencial en la remoción de colorantes textiles, a través de mecanismos como adsorción, absorción y degradación enzimática (Saratele, **2011**), convirtiéndose en el objeto de investigación más prometedor en biotecnología para tratar aguas residuales, ya que el enfoque ideal es utilizar la capacidad natural de los microorganismos nativos y diversos factores para disminuir los contaminantes a bajos costos y sin generar otros más tóxicos. Sin embargo, la mayoría de los colorantes textiles azo que se involucran en un proceso de biodegradación resultan en la formación de aminas aromáticas, que son más tóxicas que los colorantes de procedencia, incluso se han considerado estas aminas con propiedades carcinogénicas y / o mutagénicas (Ramsay y Nguyen 2002; Giordano y col., 2005; Gavril y Hodson, 2007; Khalid y col., **2009**).

Por otro lado, a pesar de que existen diversos reportes a cerca de la utilización de cepas bacterianas para remover y degradar colorantes y la generación de metabolitos tóxicos, no se ha reportado el papel que desempeñan las cepas patógenas de *E. coli* en la remoción de colorantes ni el riesgo de salud ambiental que representa la presencia de estas cepas EPEC ante un colorante textil tipo azo en aguas contaminadas, ni la generación de metabolitos ecotóxicos.

### 10.1 Implicaciones de *E. coli* en consorcios para la remoción de colorantes azo

El comportamiento de *E. coli* frente a un xenobiótico como el colorante textil azo resulta de gran interés, y se ha tomado como modelo para la realización de muchos estudios por tratarse de una bacteria de fácil crecimiento y manipulación en el laboratorio. En el caso particular de esta investigación, fue de gran interés porque además de lo antes mencionado, se encontró *E. coli* patógena en porcentajes mayores

al 62 % en el agua residual del río Alseseca, lo que sugiere que si son las bacterias con mayor presencia, tienden a tener mayor área de interacción sobre otros microorganismos y tuvieron contacto con colorantes textiles, predisponiéndolas a generar estrategias metabólicas que logren resistencia y por lo tanto aseguren su supervivencia en condiciones extremas. Efectivamente, los consorcios patógenos de *E. coli* removieron al colorante a diferentes concentraciones desde el 3.7 % al 96.6 % en 24 h, mientras que, Valencia y col., (2014) reportaron que los monocultivos de las cepas patógenas de *E. coli* removieron al colorante negro solofenil en porcentajes del 5 % al 70 %. Por lo tanto, queda claro que la eficacia en la remoción de colorantes se vio favorecida no solo al utilizar cepas aisladas del río contaminado con desechos industriales textiles, sino también a la formación de consorcios homogéneos y heterogéneos de la misma especie (*E. coli*). En otros casos la utilización de consorcios heterogéneos de diferentes especies aisladas de lodos activados extraído de una planta de tratamiento de aguas residuales de una industria de teñido favorece la remoción de colorantes como lo reporta Cheriaa y col., (2012), quienes obtuvieron hasta un 99 % de remoción del colorante en 2 h utilizando consorcios heterogéneos de diferentes especies. En este mismo sentido, Ramasany y col., (2012), aislaron diferentes especies para la integración de consorcios heterogéneos combinando hongos y bacterias para el tratamiento de aguas residuales, obteniendo hasta 75 % de remoción de los tres colorantes probados. Otros investigadores como Lalnunhlimi y Krishnaswamy (2016), utilizaron consorcios bacterianos a partir de cepas aisladas de suelos alcalinos, para remover colorantes, obteniendo el 97.57 % en la remoción del colorante azul directo 151 (DB 151), y 92.25 % de remoción del rojo directo 31 (DR 31). Cui y col., (2012), reportan que el consorcio recuperado de lodos contaminados con desechos textiles formado por *Klebsiella*, *Escherichia*, *Bacillus* y *Clostridium* remueve eficazmente seis diferentes colorantes azo con porcentajes que van del 70 al 95 %.

## 10.2 Comparación de porcentajes de remoción de consorcios homogéneos y heterogéneos de *E. coli*

Los microorganismos que se han recuperado de lugares contaminados con desechos industriales textiles y que son utilizados en la remoción de colorantes tienen una gran ventaja, como lo reportado en este trabajo al utilizar consorcios homogéneos y heterogéneos patógenos de *E. coli*, entre ellos y en comparación con sus respectivos mono cultivos. Los casos particulares se dieron en los consorcios homogéneos IV y VI, ambos se conformaron por cepas con porcentajes altos de remoción, pero para el caso del consorcio IV se observó un aumento en la capacidad de remoción. Lo anterior sugiere que alguna de esas cepas posiblemente está ejerciendo un efecto de potencialización sobre las otras cepas, logrando una mejor remoción del colorante a diferentes concentraciones. Como lo reporta Chen y col., (2006), quienes enfocados a estrategias para potencializar la remoción de colorantes emplearon la cepa DH5  $\alpha$  de *E. coli* para ejercer un efecto de estimulación sobre la cepa *P. luteola*, logrando un incremento en la capacidad de remoción del colorante.

Para el caso del consorcio homogéneo VI, hubo un efecto antagonista en la remoción, es decir que las cepas con porcentajes altos (A) que conformaron al consorcio no tuvieron la capacidad de adaptarse en condiciones de laboratorio para remover el colorante.

Otro hallazgo importante ocurrió con el consorcio homogéneo III, formado por cepas con porcentajes de remoción media (M), quienes mostraron un efecto positivo al remover el colorante, incluso por encima del consorcio IV, uno de los consorcios homogéneos que más removi6 el colorante en ambas concentraciones.

La actividad del consorcio homogéneo VII, al constituirse por cepas con porcentajes bajos (B), tuvo un comportamiento antagonista en comparación de sus respectivos monocultivos.

El único consorcio heterogéneo formado fue el consorcio I, el cual a pesar de estar constituido por una cepa de cada porcentaje de remoción (A, M, y B), se obtuvieron resultados prometedores, ya que, tuvo nueve por ciento más de remoción que el consorcio homogéneo II y aproximadamente cincuenta y cinco más que los consorcios

homogéneos VI y VII, pero removió aproximadamente doce por ciento menos que los consorcios III, IV y V en los ensayos a 100 ppm del colorante. Mientras que, en los ensayos a 200 ppm del colorante, el consorcio heterogéneo I removió treinta y un por ciento y ochenta por ciento más que los consorcios II, VI y VII, respectivamente. Pero un quince por ciento menos de remoción en comparación de los demás consorcios.

Por otro lado, el consorcio V, a pesar de que se conformó por cepas tipo de laboratorio de *E. coli*, demostró tener capacidad de remover el colorante a diferentes concentraciones en más del ochenta por ciento, a pesar de que una de las tres cepas era no patógena, fue el único consorcio que generó el metabolito secundario propuesto como **MS-3**.

### 10.3 Metabolitos secundarios

La utilización de bacterias en la remoción de colorantes es amplia y se ha reportado que el aumento de la decoloración se debe principalmente a un proceso de adsorción en la pared celular y acumulación intracelular del colorante, y en los casos más eficientes es seguida de una actividad enzimática logrando la reducción del grupo azo (Saratele, **2011**; Carboneschi, **2015**).

En este estudio, se demostró que el consorcio V al interactuar con el colorante negro solofenil generó el metabolito secundario **MS-3**, ya que en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  se observan señales en la región de 6.5 a 7 ppm, lo que sugiere que el desplazamiento químico a campos más altos es originado por una mayor densidad electrónica presente en el anillo aromático originado por los grupos amino ( $-\text{NH}_2$ ), por lo que, la aparición de estas señales podría ser considerado como una evidencia experimental que solo se pueden explicar por el proceso de reducción del grupo azo, obtenido a lo largo del bioensayo. La presencia de hidrógenos aromáticos de derivados de anilinas, aparecen generalmente en la región de 6.5-7 ppm, estas señales las encontramos en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del metabolito propuesto **MS-3** (Fig. 6 y espectro 9, obtenido de SciFinder, **2018**), son las mismas que se observan en el espectro del producto generado de la interacción del *Consortio V* (Espectro 7). Por otro lado, Bravo y col., (**2014**),

reportan la utilización de cepas patógenas de *E. coli* en la remoción del colorante negro directo 22 a diferentes concentraciones con la obtención de 1-naftol y difenilamina como posibles metabolitos determinados a través de HPLC, lo que sugiere que las cepas patógenas de *E. coli* tienen potencial en degradar un colorante azo. Mohana y col., (2008), utilizan el mismo colorante azo (negro directo 22), para poner a prueba la capacidad de remoción del consorcio denominado DMC; obteniendo los metabolitos 1-naftol y difenilamina, determinados a través de HPTLC. Jain y col., (2012), propusieron la división asimétrica del colorante RV5 al utilizar consorcios bacterianos; tras un análisis de infrarrojo transformado de Fourier (FTIR), RMN y cromatografía de gases con espectrometría de masas (GC-MS), confirmaron la formación de cuatro compuestos intermedios 1-diazo-2-naftol, 4-ácido hydroxybencensulfónico, 2-naftol y ácido bencensulfónico. Otro grupo de investigación a cargo de Mansour y col., (2009), reportaron la descomposición del violeta ácido 7 por *Pseudomonas putida*, generando los metabolitos tóxicos: ácido 4'-aminoacetánido o 5-acetamido-2-amino-1-hidroxi-3,6-naftaleno disulfónico. Por otro lado, Moller y Wallin (2000), encontraron que los colorantes estructuralmente relacionados con el 1-fenilazo-2-hidroxinaftaleno son genotóxicos. Por otro lado, Ekici y col., (2001), reportaron la estabilidad de ocho metabolitos de un colorante azo que son posiblemente expuestos al medio ambiente (o-aminotolueno, 4,4-tiodianilina, 4,4-diaminodifenilmetano, p-cloroanilina, 2,4toluendiamina, p-cresidina, 2,4-diaminoanisol y 2-naftilamina), los resultados muestran que que la degradación en condiciones aeróbicas se produce a través de la oxidación de los sustituyentes en el anillo aromático o en la cadena lateral, mientras que en condiciones anaeróbicas, el enlace azo se reduce, lo que conduce a aminas sustituidas tóxicas y peligrosas para el medio ambiente y salud humana. Si bien, el uso de microorganismos es una herramienta útil en la biorremediación de colorantes, también parece tener una contracara cuando el uso de ciertos microorganismos general metabolitos más tóxicos que el colorante de procedencia.

#### **10.4 Implicaciones en la salud y en el ambiente por exposición a colorantes y sus productos generados en la biodegradación.**

El agua es importante para que se mantengan los ecosistemas en equilibrio y su contaminación genera un impacto contraproducente en una o más especies de acuerdo con el tipo de contaminante que contenga. La presencia de *E. coli* en el agua es un indicativo de una reciente contaminación de aguas residuales urbanas o contaminación de residuos de animales (Rock y Rivera ,**2014**), pero desafortunadamente las normas no establecen la identificación de cepas patógenas como medida en la calidad de agua. Considerando lo anterior debemos tomar en cuenta que no sólo se descargan a los cuerpos de agua desechos urbanos, sino también los desechos industriales como los provenientes de las industrias relacionadas con los colorantes, cuyos procesos de desecho no son debidamente tratados, y contienen colorantes que dañan a las especies acuáticas. La capacidad de un colorante azoico para unirse al ADN de doble cadena se ha relacionado con el potencial de genotoxicidad de estos sustratos, mientras que la mutagenicidad se ha relacionado con la generación de radicales libres (Mansour y col., **2009**; Wang y col., **2011, 2012**). El trabajo realizado por De Oliveira y col., (**2018**), quienes reportan que los colorantes azul reactivo 15 (RB 15) y negro directo 38 (DB 38), causaron toxicidad aguda y genotoxicidad en los organismos acuáticos, siendo el colorante de DB38 más tóxico, debido su toxicidad letal en *Artemia salina* y la capacidad para inducir daños en el ADN en células *Daphnia magna* y células de trucha arcoíris gonad (RTG-2). El agua residual que es vertida a los cuerpos de agua o alcantarillado en ocasiones se han usado en la irrigación de campos agrícolas, generando daños (Paul y col., **2012**), otras investigaciones en relación a ciencias ambientales quienes han demostrado que algunas especies perecen pero otras han desarrollado la capacidad de adaptarse a condiciones adversas (Bae, **2006**), incluso han desarrollado nuevas estrategias que les permite sobrevivir y desempeñar otras funciones, como el caso de las bacterias que se han usado en la remediación de aguas residuales con colorantes de diverso origen sintético, lo que representa un riesgo ambiental, cuando los productos generados son más tóxicos. Como lo que reportó De Campos y col., (**2016**), al realizar un estudio dónde evalúan el aumento potencial citotóxico, genotóxico y mutagénico después y antes de la degradación de colorantes reportando altas tasas de muerte celular

promovido por el colorante y sus metabolitos, lo que concluyen que el proceso de degradación bacteriana no es siempre eficiente y que incluso puede ser más perjudicial para el ambiente al generarse metabolitos tóxicos.

Se ha tomado como uno de los criterios para la clasificación de un colorante como nocivo a los humanos es su capacidad para reducirse y consecuentemente generar aminas aromáticas cuando entran en contacto con el sudor, la saliva o los jugos gástricos (Pielesz y col., **2002**). Algunas de tales aminas aromáticas son carcinogénicas, por ejemplo, las bifenilaminas como la bencidina y la 4-bifenilamina, que pueden estar presentes en el medio ambiente y constituyen una amenaza para la salud humana y los ecosistemas en general (Chung y Cerniglia, **1992**; Chung y col., **2000**). Un estudio más reciente llevado a cabo por Brüscheiler y col., (**2017**), en el que evaluaron la mutagenicidad de los metabolitos de los colorantes azo, indicó que las aminas aromáticas mutagénicas provenientes de los colorantes azo textiles son mucho más preocupantes de lo que se esperaba, lo que implicaría nuevas estrategias y rediseños en la regulación de los colorantes azo en un futuro inmediato.

De acuerdo con la legislación aprobada en la Comunidad Europea, la aplicación de colorantes azo en los textiles está restringida a los colorantes que, en ninguna circunstancia pueden convertirse en los compuestos que se enlistan en la Tabla 10, de acuerdo a Ekici y Parlar, (**2001**). En este mismo sentido, en diversas investigaciones se ha observado que la degradación de colorantes azo produce compuestos tóxicos y esto ocurre básicamente por tres mecanismos: (i) por medio de la oxidación metabólica de aminas aromáticas a especies electrofílicas reactivas que se unen covalentemente al ADN; (ii) por la oxidación metabólica sin la azo reducción de colorantes azoicos con estructuras que contienen aminas aromáticas libres; y (iii) por la oxidación directa del enlace azo a sales de diazonio electrófilicas que son altamente reactivas (Saratele, **2011**). Cada mecanismo puede ser específico según el colorante, y por lo tanto la toxicidad del colorante azo es probablemente causado por más de un mecanismo (Chen, **2006**; Pandey, **2007**; Shing, **2012**).

**Tabla 10.** Compuestos tóxicos producidos por la reducción de colorantes azo.

4-aminodifenilo	3,3'-dimetilbenzidina (o-toluidina)
4-amino-2', 3-dimetilazobenceno (oaminoazo-tolueno)	3,3'-dimetil4,4'-diaminodifenilmetano
4-aminofeniléter (4,4'-oxidianilina)	2-Metoxi-5-metilnilina (p-residina)
4-aminofeniltioethe (4,4'-tiodianilina)	Sulfato de 4-metoxi-1,3-fenilendiamina (2,4-diaminoanisol)
Bencidina; Bis- (4-aminofenil) - metano (4,4'-diaminodifenilmetareno)	4,4'-metileno-bis (2- cloroanilina)
4- cloroanilina (p-cloroanilina)	2-metil-5-nitroanilina (2-amino-4-nitrotolueno)
4-cloro-2-metilnilina (4-cloro-o-toluidina)	2-naftilamina
2,4- Diaminotolueno (2,4-toluilendiamina)	Toluidina
Dihidrocloruro de 3,3'-diclorobenzidina	2,4,5-trimetilnilina
3,3'-Dimetoxibenzidina (o-dianisidina)	



## XI. CONCLUSIONES

- Los consorcios formados por cepas patógenas de *E. coli* recuperadas del río Alseseca mostraron tener la capacidad de remover al colorante negro solofenil a diferentes concentraciones.
- Todos los consorcios patógenos de *E. coli* removieron al colorante negro solofenil en ambas concentraciones desde un 3.7% hasta un 96.6%. Los consorcios que removieron el colorante en más del 84% en ambas concentraciones fueron el I, III, IV y V, mientras que los consorcios que removieron el colorante en menos del 76% en ambas concentraciones fueron el II, VI y VII.
- Los consorcios heterogéneos (I y V) lograron tener mayor capacidad de degradación (96.6% y 85%, respectivamente). En cuanto a los consorcios homogéneos A, sólo el consorcio VI logró un alto porcentaje de remoción (94.7%), en comparación con el VI (23.8%), el consorcio M (III), logró un alto porcentaje de remoción (95.8%) y de los consorcios B, el consorcio II removi6 más que el consorcio VII (75.5% y 34.2%, respectivamente).
- Los consorcios que se mantuvieron eficientes en la remoci6n del colorante con más del 89% en ambas concentraciones fueron el III, IV y V. Sin embargo, de los tres sólo el consorcio V, fue capaz de degradar el colorante, obteniendo el metabolito secundario propuesto **MS-3** (ácido bencensulf6nico, 5-amino-2[(4-fenilamino)amino]-).
- El metabolito encontrado al ser un compuesto de la familia de las bifenilaminas, se considera t6xico. Por lo que el v6nculo que existe entre las practicas humanas, el agua residual contaminada con colorantes azo y microorganismos pat6genos de *E. coli* (EPEC), tienen un impacto negativo en la salud p6blica y en el ecosistema.

## XII. PERSPECTIVAS

I. Los resultados en los estudios espectroscópicos de IR y RMN-<sup>1</sup>H son alentadores al encontrar evidencias de metabolitos productos de la reducción del colorante a través de la interacción con los consorcios bacterianos, sin embargo, se debe llevar a cabo un estudio más exhaustivo en los procesos de extracción y purificación de los productos obtenidos en los bioensayos (consorcio bacteriano con el colorante), así como la búsqueda de los metabolitos generados y la interpretación de dichos resultados.

II. Es indispensable llevar a cabo un estudio molecular enfocado en la búsqueda de enzimas azoreductasas en cepas de *E. coli* patógenas, así como el mecanismo por el cual se lleva a cabo el proceso de reducción del enlace azo.

III. Es conveniente llevar a cabo un estudio toxicológico de los metabolitos generados por la escisión del enlace azo del colorante negro solofenil para determinar si tienen un efecto mutagénico y de ser así considerar los resultados en la lista de compuestos ya reportados (Brüschweiler y Merlot, **2017**; EC, **2009**).

IV. Se sugiere el monitoreo de la carga microbiológica patógena, así como la determinación y cuantificación de colorantes azo descargados en los ríos que recorren la ciudad de Puebla, considerando este trabajo como un precedente de que existe un riesgo inminente cuando las cepas de *E. coli* patógenas y un colorante azo interactúan.

### XIII. BIBLIOGRAFÍA

- Albert L. (2004). Contaminación ambiental. Origen, clases, fuentes y efectos. *En: Toxicología ambiental*, 61-74.
- Alper, J. (2003). Data gaps need bridging to assess infectious gastrointestinal diseases. *ASM News-American Society for Microbiology*, 69(2), 65-68.
- Angel S., J. Parent, D.L. Civco, A. Blei, and D. Potere. 2011. The dimensions of global urban expansion: estimates and projections for all countries, 2000-2050. *Progress in Planning* 75: 53–107
- Bae SJ, Freeman SH, Kim DS. Influences of new azo dyes to the aquatic ecosystem. *Fiber Polymer*. 2006, 7: 3035.
- Beyer, H., & Walter, W. (1987). *Manual de química orgánica*. Reverte.
- Bravo, C. E., Toxqui, G. V., Tapia, J. R., Roldan, E. C., & Calderon, A. A. (2014) Decolorization of Azo Dye by Enteropathogenic Escherichia coli Strains Isolated from Wastewater. *Journal of Pure & Applied Microbiology*, 8(2), 37-42.
- Brenner, K., You, L., & Arnold, F. H. (2008). Engineering microbial consortia: a new frontier in synthetic biology. *Trends in biotechnology*, 26(9), 483-489.
- Brüschweiler, B. J., & Merlot, C. (2017). Azo dyes in clothing textiles can be cleaved into a series of mutagenic aromatic amines which are not regulated yet. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 88, 214-226.
- Carmen, Z., & Daniela, S. (2012). Textile organic dyes—characteristics, polluting effects and separation/elimination procedures from industrial effluents—a critical overview. In *Organic pollutants ten years after the Stockholm convention-environmental and analytical update*. InTech.
- Cerboneschi, M., Corsi, M., Bianchini, R., Bonanni, M., & Tegli, S. (2015). Decolorization of acid and basic dyes: understanding the metabolic degradation and cell-induced adsorption/precipitation by Escherichia coli. *Applied microbiology and biotechnology*, 99(19), 8235-8245.
- Chander, M., & Arora, D. S. (2007). Evaluation of some white-rot fungi for their potential to decolourise industrial dyes. *Dyes and Pigments*, 72(2), 192-198.
- Chang, J. S., Chou, C., Lin, Y. C., Lin, P. J., Ho, J. Y., & Hu, T. L. (2001). Kinetic characteristics of bacterial azo-dye decolorization by Pseudomonas luteola. *Water Research*, 35(12), 2841-2850.
- Chen, B. Y. (2006). Toxicity assessment of aromatic amines to Pseudomonas luteola: Chemostat pulse technique and dose–response analysis. *Process Biochemistry*, 41(7), 1529-1538.
- Chen, B. Y., Chen, S. Y., Lin, M. Y., & Chang, J. S. (2006). Exploring bioaugmentation strategies for azo-dye decolorization using a mixed consortium of Pseudomonas luteola and Escherichia coli. *Process Biochemistry*, 41(7), 1574-1581.
- Chequer, F. M. D., de Oliveira, G. A. R., Ferraz, E. R. A., Cardoso, J. C., Zaroni, M. V. B., & de Oliveira, D. P. (2013). Textile dyes: dyeing process and environmental impact. In *Eco-friendly textile dyeing and finishing*. InTech.
- Cheriaa, J., Khairredine, M., Rouabhia, M., & Bakhrouf, A. (2012). Removal of triphenylmethane dyes by bacterial consortium. *The Scientific World Journal*, 2012.
- Chung, K. T., & Cerniglia, C. E. (1992). Mutagenicity of azo dyes: structure-activity relationships. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 277(3), 201-220.

- Chung, K. T., Hughes, T. J., & Claxton, L. D. (2000). Comparison of the mutagenic specificity induced by four nitro-group-containing aromatic amines in *Salmonella typhimurium* his genes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 465(1), 165-171.
- CONAGUA, SEMARNAT. *Estadísticas del Agua en México. Edición 2013*. México. 2014. En [http://apps1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe\\_resumen14/06\\_agua/6\\_2\\_3.html](http://apps1.semarnat.gob.mx/dgeia/informe_resumen14/06_agua/6_2_3.html)
- CONAGUA, N. M. (2015). Semarnat, Mexico.
- Cui, D., Li, G., Zhao, D., Gu, X., Wang, C., & Zhao, M. (2012). Microbial community structures in mixed bacterial consortia for azo dye treatment under aerobic and anaerobic conditions. *Journal of hazardous materials*, 221, 185-192.
- Dafale, N., Rao, N. N., Meshram, S. U., & Wate, S. R. (2008). Decolorization of azo dyes and simulated dye bath wastewater using acclimatized microbial consortium—biostimulation and halo tolerance. *Bioresource technology*, 99(7), 2552-2558.
- De Campos Ventura-Camargo, B., de Angelis, D. D. F., & Marin-Morales, M. A. (2016). Assessment of the cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of the commercial black dye in *Allium cepa* cells before and after bacterial biodegradation treatment. *Chemosphere*, 161, 325-332.
- De Oliveira, G. A. R., Leme, D. M., de Lapuente, J., Brito, L. B., Porredón, C., de Brito Rodrigues, L., & Cestari, M. M. (2018). A test battery for assessing the ecotoxic effects of textile dyes. *Chemico-Biological Interactions*.
- Delgado, M. N. G., Barrenetxea, C. O., Serrano, A. P., Blanco, J. M. A., & Vidal, F. J. R. (2004). *Contaminación ambiental: una visión desde la química*. Editorial Paraninfo.
- Delgado-Ramos, G. C. (2015). Water and the political ecology of urban metabolism: the case of Mexico City. *Journal of Political Ecology*, 22(1), 98-114.
- Dickin, S. K., Schuster-Wallace, C. J., Qadir, M., & Pizzacalla, K. (2016). A review of health risks and pathways for exposure to wastewater use in agriculture. *Environmental health perspectives*, 124(7), 900.
- Durruty, I., González, J. F., & Wolski, E. A. (2018). Scaling up and kinetic model validation of Direct Black 22 degradation by immobilized *Penicillium chrysogenum*. *Water Science and Technology*, 77(1), 17-26.
- Ekici, P., Leupold, G., & Parlar, H. (2001). Degradability of selected azo dye metabolites in activated sludge systems. *Chemosphere*, 44(4), 721-728.
- EPA (United States Environmental Protection Agency). 2006. Monitoring and assessing water quality. 5.11 Fecal bacteria. <http://www.epa.gov/volunteer/stream/vms511.html>
- EPA (United States Environmental Protection Agency), 2015. <http://www.legislation.gov.uk/ukpga/1990/43/contents>
- Espinosa Rodríguez Pedro F., Tavera Martínez Estefanía, García Morales Sandra S., Chari Shruti Venkata, Valdés Saúl Milam. 2014. Resultados de los estudios Geo-Ambientales en la Cuenca del Alto, Atoyac Tlaxcala, Puebla, México (2013-2014).
- Figuères, C., Rockström, J., & Tortajada, C. (Eds.). (2003). *Rethinking Water Management: innovative approaches to contemporary issues*. Routledge.
- Gambhir, R. S., Kapoor, V., Nirola, A., Sohi, R., & Bansal, V. (2012). Water pollution: Impact of pollutants and new promising techniques in purification process. *Journal of Human Ecology*, 37(2), 103-109.
- Gavril M. & Hodson PV. (2007). Investigation of the Toxicity of the Products of Decoloration of Amaranth by *Trametes versicolor*. *J. Environ. Qual.* 36:1591–1598.

- Giannuzzo, A. N. (2010). Los estudios sobre el ambiente y la ciencia ambiental. *Scientiae Studia*, 8 (1), 129-156.
- Giordano A, Grilli S, De Florio L, Mattioli D. (2005). Effect of selected textile effluents on activated sludge nitrification process. *J. Environ. Sci. Health A. Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* 40:1997-2007. Giordano A, Grilli S, De Florio L, Mattioli D (2005) Effect of selected textile effluents on activated sludge nitrification process. *J. Environ. Sci. Health A. Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* 40:1997-2007.
- Gómez, J. A. C. (2008). La educación ambiental en la investigación educativa: realidades y desafíos de futuro.
- Hai, F. I., Yamamoto, K., & Fukushi, K. (2007). Hybrid treatment systems for dye wastewater. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 37(4), 315-377.
- Halder, J. N., & Islam, M. N. (2015). Water pollution and its impact on the human health. *Journal of environment and human*, 2(1), 36-46.
- Holkar, C. R., Jadhav, A. J., Pinjari, D. V., Mahamuni, N. M., & Pandit, A. B. (2016). A critical review on textile wastewater treatments: possible approaches. *Journal of environmental management*, 182, 351-366.
- Introducción a la química ambiental. Stanley E. Manahan. Ed. Reverté. S.A. 2007.
- Ishii, S., & Sadowsky, M. J. (2008). Escherichia coli in the environment: implications for water quality and human health. *Microbes and Environments*, 23(2), 101-108.
- Işık, M., & Sponza, D. T. (2003). Effect of oxygen on decolorization of azo dyes by Escherichia coli and Pseudomonas sp. and fate of aromatic amines. *Process Biochemistry*, 38(8), 1183-1192.
- Jain, K., Shah, V., Chapla, D., & Madamwar, D. (2012). Decolorization and degradation of azo dye—Reactive Violet 5R by an acclimatized indigenous bacterial mixed cultures—SB4 isolated from anthropogenic dye contaminated soil. *Journal of hazardous materials*, 213, 378-386.
- Jang, J., Hur, H. G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T., & Ishii, S. (2017). Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications—a review. *Journal of applied microbiology*, 123(3), 570-581.
- Jayaswal, K., Sahu, V., & Gurjar, B. R. (2018). Water Pollution, Human Health and Remediation. In *Water Remediation* (pp. 11-27). Springer, Singapore.
- José, C. P. M., Rosa, G. A. M., Mariano, M. M., & Jesús, S. H. (2015). *Química aplicada a la ingeniería*. Editorial UNED.
- Kant, R. (2012). Textile dyeing industry an environmental hazard. *Natural science*, 4(1), 22-26.
- Khalid, A., Arshad, M., & Crowley, D. E. (2009). Biodegradation potential of pure and mixed bacterial cultures for removal of 4-nitroaniline from textile dye wastewater. *Water research*, 43(4), 1110-1116.
- Khan, S., & Malik, A. (2014). Environmental and health effects of textile industry wastewater. In *Environmental deterioration and human health* (pp. 55-71). Springer, Dordrecht.
- Khehra, M. S., Saini, H. S., Sharma, D. K., Chadha, B. S., & Chimni, S. S. (2005). Decolorization of various azo dyes by bacterial consortium. *Dyes and Pigments*, 67(1), 55-61.
- Kuhad, R. C., Sood, N., Tripathi, K. K., Singh, A., & Ward, O. P. (2004). Developments in microbial methods for the treatment of dye effluents. *Advances in applied microbiology*, 56, 185.

- Kurade, M. B., Waghmode, T. R., Kagalkar, A. N., & Govindwar, S. P. (2012). Decolorization of textile industry effluent containing disperse dye Scarlet RR by a newly developed bacterial-yeast consortium BL-GG. *Chemical Engineering Journal*, 184, 33-41.
- Kwon, J. H., Lee, H. K., Kwon, J. W., Kim, K., Park, E., Kang, M. H., & Kim, Y. H. (2008). Mutagenic activity of river water from a river near textile industrial complex in Korea. *Environmental monitoring and assessment*, 142(1-3), 289-296.
- Lalnunhlimi, S., & Krishnaswamy, V. (2016). Decolorization of azo dyes (Direct Blue 151 and Direct Red 31) by moderately alkaliphilic bacterial consortium. *Brazilian journal of microbiology*, 47(1), 39-46.
- Leff, E. (2002). *Saber ambiental: sustentabilidad, racionalidad, complejidad, poder*. Siglo xxi.
- López, T., Dominguez, L., & García, J. (2007). Arreglo estructural de un consorcio microbiano de interés alimentario en la producción del vinagre. In *Trabajo presentado en el octavo Congreso Nacional de Microscopía, Octubre, México*.
- Lubchenco, J. (1998) Entering the century of the environment: a new social contract for science. *Science* 279: 491-497.
- Ma, X., Liu, L., Li, Q., Liu, Y., Yi, L., Ma, L., & Zhai, C. (2017). High-level expression of a bacterial laccase, CueO from *Escherichia coli* K12 in *Pichia pastoris* GS115 and its application on the decolorization of synthetic dyes. *Enzyme and microbial technology*, 103, 34-41.
- Maier, J., Kandelbauer, A., Erlacher, A., Cavaco-Paulo, A., & Gübitz, G. M. (2004). A new alkali-thermostable azoreductase from *Bacillus* sp. strain SF. *Applied and environmental microbiology*, 70(2), 837-844.
- Manahan, S. E. (2006). *Introducción a la química ambiental*. Reverté.
- Manfred, H., Herbert, M., & Bernd, Z. (1999). Métodos espectroscópicos en química orgánica. *Madrid-España. Editorial Síntesis SA*.
- Mansour, H. B., Mosrati, R., Limem, I., Corroler, D., Ghedira, K., Barillier, D., & Chekir-Ghedira, L. (2009). Genotoxic and anticholinesterase activities of acid violet 7 and its biodegradation products. *Drug and chemical toxicology*, 32(3), 230-237.
- Mathur N, Krishnatrey R, Sharma S, Sharma KP. (2003). Toxic effects of textile printing industry effluents on liver and testes of albino rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 71:453–457.
- Mohana, S., Shrivastava, S., Divecha, J., & Madamwar, D. (2008). Response surface methodology for optimization of medium for decolorization of textile dye Direct Black 22 by a novel bacterial consortium. *Bioresource Technology*, 99(3), 562-569.
- Møller, P., & Wallin, H. (2000). Genotoxic hazards of azo pigments and other colorants related to 1-phenylazo-2-hydroxynaphthalene. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, 462(1), 13-30.
- Nicolaou, K. C., & Montagnon, T. (2009). *Molecules that changed the world*. Hong Kong University of Science and Technology.
- OEFA Organismo de Fiscalización y Evaluación Ambiental,. Portal:  
[http://www.oefa.gob.pe/?wpfb\\_dl=7827](http://www.oefa.gob.pe/?wpfb_dl=7827)
- OMS, 2017. Portal: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/es/>
- Paez-Rubio, T., Viau, E., Romero-Hernandez, S., & Peccia, J. (2005). Source bioaerosol concentration and rRNA gene-based identification of microorganisms aerosolized

- at a flood irrigation wastewater reuse site. *Applied and environmental microbiology*, 71(2), 804-810.
- Pandey, A., Singh, P., & Iyengar, L. (2007). Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59(2), 73-84.
- Paul, S. A., Chavan, S. K., & Khambe, S. D. (2012). Studies on characterization of textile industrial waste water in Solapur city. *International Journal of Chemical Sciences*, 10(2), 635-642.
- Paul, J., Kadam, A. A., Govindwar, S. P., Kumar, P., & Varshney, L. (2013). An insight into the influence of low dose irradiation pretreatment on the microbial decolouration and degradation of Reactive Red-120 dye. *Chemosphere*, 90(4), 1348-1358.
- Pielesz, A., Baranowska, I., Rybak, A., & Włochowicz, A. (2002). Detection and determination of aromatic amines as products of reductive splitting from selected azo dyes. *Ecotoxicology and environmental safety*, 53(1), 42-47.
- Pulido, M. D. P. A., Sara Lilia Ávila de Navia, M. S. C., Sandra Mónica Estupiñán Torres, M. S. C., & Prieto, A. C. G. (2005). Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. *NOVA Publicación en Ciencias Biomédicas*, 3(4), 69-79.
- Ramalho, P. A., Scholze, H., Cardoso, M. H., Ramalho, M. T., & Oliveira-Campos, A. M. (2002). Improved conditions for the aerobic reductive decolourisation of azo dyes by *Candida zeylanoides*. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(6), 848-854.
- Ramasany, R., Ahmed, H. A. M., & Karthik, S. S. (2012). Development of microbial consortium for the biodegradation and biodecolorization of textile effluents. *Journal of Urban and Environmental Engineering*, 6(1), 36-41.
- Ramsay, J.A. & Nguyen, T. (2002). Decoloration of textile dyes by *Trametes versicolor* and its effect on dye toxicity. *Biotechnology Letters*. 24:1757.
- Rivera, B., & Rock, C. (2011). Microbial source tracking: Watershed characterization and source identification.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R., & Nigam, P. (2001). Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource technology*, 77(3), 247-255.
- Rock, C., & Rivera, B. (2014). Water Quality, E. coli and Your Health. *Cooperative Ext.*
- Rodríguez-Angeles, G. Diagnosis and main characteristics of *Escherichia coli* pathogenic groups. *Salud Publica Mex.*, 2002, 44:464-475.
- Rodríguez-Tapia, L., Morales Novelo, J. A., & Zavala Vargas, P. (2012). Evaluación socioeconómica de daños ambientales por contaminación del río Atoyac en México. *Tecnología y Ciencias del Agua*, 3.
- Román, J. V. (2016). Cambio climático y Áreas Naturales Protegidas: una mirada desde la Ciencia Social. *Revista Márgenes Espacio Arte y Sociedad*, 13(19), 48-55.
- Saranraj, P., Sumathi, V., Reetha, D., & Stella, D. (2010). Decolourization and degradation of direct azo dyes and biodegradation of textile dye effluent by using bacteria isolated from textile dye effluent. *Journal of Ecobiotechnology*, 2(7), 7-11.
- Saratale, R. G., Saratale, G. D., Chang, J. S., & Govindwar, S. P. (2011). Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: a review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42(1), 138-157.
- Saroj, S., Dubey, S., Agarwal, P., Prasad, R., & Singh, R. P. (2015). Evaluation of the efficacy of a fungal consortium for degradation of azo dyes and simulated textile dye effluents. *Sustainable Water Resources Management*, 1(3), 233-243.
- SciFinder. Copyright © 2018 American Chemical Society. All Rights Reserved.

- SEMARNAT. Informe de la situación del medio ambiente en México. Compendio de estadísticas ambientales, Indicadores clave y de desempeño ambiental, 2012. p. 285.
- Seto K. C., S. Dhakal, A. Bigio, H. Blanco, G.C. Delgado, D. Dewar, L. Huang, A. Inaba, A. Kansal, S. Lwasa, J. E. McMahon, D. B. Müller, J. Murakami, H. Nagendra, and A. Ramaswami. **2014**. Human settlements, infrastructure and spatial planning. In O. Edenhofer, R. Pichs-Madruga, Y. Sokona, E. Farahani, S. Kadner, K. Seyboth, A. Adler, I. Baum, S. Brunner, P. Eickemeier, B. Kriemann, J. Savolainen, S. Schlömer, C. von Stechow, T. Zwickel and J.C. Minx (eds.) *Climate change 2014: mitigation of climate change. Contribution of Working Group III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge: Cambridge University Press
- Shah, V., & Madamwar, D. (**2013**). Community genomics: Isolation, characterization and expression of gene coding for azoreductase. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *79*, 1-8.
- Singh, R. L., Singh, P. K., & Singh, R. P. (**2015**). Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes—A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *104*, 21-31.
- Singh, P., Iyengar, L., & Pandey, A. (**2012**). Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. In *Microbial degradation of xenobiotics* (pp. 101-133). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Solís, M., Solís, A., Pérez, H. I., Manjarrez, N., & Flores, M. (**2012**). Microbial decolouration of azo dyes: a review. *Process Biochemistry*, *47*(12), 1723-1748.
- Srinivasan, A., & Viraraghavan, T. (**2010**). Decolorization of dye wastewaters by biosorbents: a review. *Journal of environmental management*, *91*(10), 1915-1929.
- Sudha, M., Saranya, A., Selvakumar, G., & Sivakumar, N. (**2014**). Microbial degradation of azo dyes: a review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, *3*(2), 670-690.
- Thakuria, B., Jungai, N., & Adhikari, S. (**2015**). Catalytic site prediction of azoreductase enzyme of *E. coli* with potentially important industrial dyes using molecular docking tools. *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, *5*(2), 91.
- Tsai, W. T., & Chen, H. R. (**2010**). Removal of malachite green from aqueous solution using low-cost chlorella-based biomass. *Journal of Hazardous Materials*, *175*(1-3), 844-849.
- Valencia Toxqui Guadalupe. (**2014**) Tesis: Monitoreo y detección molecular de cepas *E. coli* enteropatógenas capaces de degradar un colorante azo, aisladas del agua residual. BUAP.
- Van Elsas, J. D., Semenov, A. V., Costa, R., & Trevors, J. T. (**2011**). Survival of *Escherichia coli* in the environment: fundamental and public health aspects. *The ISME journal*, *5*(2), 173.
- Vitousek, P. M., Mooney, H. A., Lubchenco, J., Melillo, J. M. (**1997**) Human domination of Earth's ecosystems. *Science* *227*: 494-499.
- Vörösmarty, C. J., McIntyre, P. B., Gessner, M. O., Dudgeon, D., Prusevich, A., Green, P., ... & Davies, P. M. (**2010**). Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature*, *467*(7315), 555.
- Wang, J., Liu, G. F., Lu, H., Jin, R. F., Zhou, J. T., & Lei, T. M. (**2012**). Biodegradation of Acid Orange 7 and its auto-oxidative decolorization product in membrane-aerated biofilm reactor. *International biodeterioration & biodegradation*, *67*, 73-77.

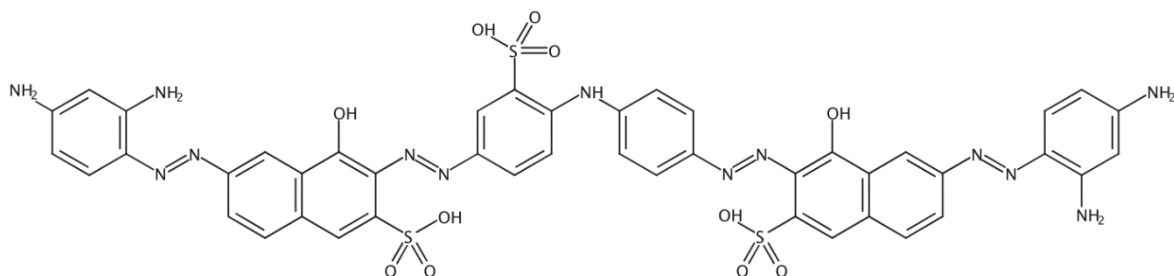


Wang, Z., Xue, M., Huang, K., & Liu, Z. (2011). Textile dyeing wastewater treatment. In *Advances in treating textile effluent*. InTech.

WHO. www.who.int. [Online].; 2017 [cited 2017 December 9]. Available from: HYPERLINK "file:///C:\\Users\\Aisha%20Perveen\\AppData\\Roaming\\Microsoft\\Word\\This%20is%20Google's%20cache%20of%20http:\\\\www.who.int\\water\_sanitation\_health\\publications\\water-pollution-control\\en\\" This is Google's cache of http://www.who.int/water\_sanitation\_health/publications/water-pollution-control/en/.

## XIV. ANEXOS

### 14.1 ANEXO 1. COLORANTE NEGRO SOLOFENIL



• 3 Na

#### Fórmula y nombre

**C<sub>44</sub> H<sub>35</sub> N<sub>13</sub> O<sub>11</sub> S<sub>3</sub> · 3 Na**

2-Naphthalenesulfonic acid, 6-[2-(2,4-diaminophenyl)diazenyl]-3-[2-[4-[[4-[2-[7-[2-(2,4-diaminophenyl)diazenyl]-1-hydroxy-3-sulfo-2-naphthalenyl]diazenyl]phenyl]amino]-3-sulfophenyl]diazenyl]-4-hydroxy-, sodium salt (1:3)

#### Otros nombres

2-Naphthalenesulfonic acid, 6-[(2,4-diaminophenyl)azo]-3-[[4-[[4-[[7-[(2,4-diaminophenyl)azo]-1-hydroxy-3-sulfo-2-naphthalenyl]azo]phenyl]amino]-3-sulfophenyl]azo]-4-hydroxy-, trisodium salt (9CI)

2-Naphthalenesulfonic acid, 6-[(2,4-diaminophenyl)azo]-3-[[4-[p-[[7-[(2,4-diaminophenyl)azo]-1-hydroxy-3-sulfo-2-naphthyl]azo]anilino]-3-sulfophenyl]azo]-4-hydroxy-, trisodium salt (8CI)

Aizen Primula Black ACH

Amanil Fast Black FOR

Artificial Silk Black CA

Atlantic Formaldehyde Black GR

Bali Black A

Belaform Black G

Benzanil Fast Black 2G

Benzo Black A 250

Benzonerol A

Benzonerol AFA extra

Benzonerol Black VS

Benzonerol VS  
Benzonerol VSF  
C.I. 35435  
C.I. Direct Black 22  
Calcoform Black RN  
Carbide Fast Black G  
Carbide Fast Black GA  
Chlorazol Black GF  
Chlorazol Black GFP  
Chrome Leather Black GA  
Cibafix Black E-R  
Cotton Black MA  
Cuprofix Black NF  
Dialuminous Black A  
Diazol Fast Black J  
Diazol Fast Black JN  
Diphenyl Black FG  
Direct Artificial Silk Black CA  
Direct Black 22  
Direct Black CA  
Direct Black GF  
Direct Black NBR  
Direct Black S  
Direct Black VSF 600  
Direct Fast Black B  
Direct Fast Black B 160  
Direct Fast Black C  
Direct Fast Black G  
Direct Fast Black GF  
Direct Fast Black NS  
Direct Fast Blue GF  
Dyrect Black GR  
EMPA 132  
Enianerol CA  
Erie Fast Black G  
Everdirect Black VSF  
Everdirect Fast Black VSF 600  
Everlight Fast Black VSF 600

Fast Black VSF 600  
Fenamin Black VA  
Formal Fast Black B  
Formal Fast Black G  
Formal Fast Black GG  
Formaldehyde Fast Black 2G  
Formaldehyde Fast Black G  
Formaldehyde Fast Black GA  
Formalide Black GR  
Hispamin Fast Dischargeable Black CA  
Interchem Formaldehyde Black GDW  
Kayarus Black B  
Kayarus Black B 160  
Kayarus Black B 300  
Neraldolo DA  
Nyanza Fast Black FAM  
Pharmaform  
Plutoform Black CAD-CF  
Plutoform Black CD  
Pontamine Fast Black PG  
Pontamine Fast Black PGR  
Pyrazol Black G  
Pyrazol Black NF  
Pyrazoline Black  
Solar Black 6NBI  
Sumilight Black A  
Suprazo Black B  
Tertrodirect Black CA  
Tetrazo Black MS  
Tricufix Black RL  
Visco Black NF  
Visco Black NFA  
Viscoform Black G  
Viscose Black CA  
Viscose Black COT  
Vondacel Black A

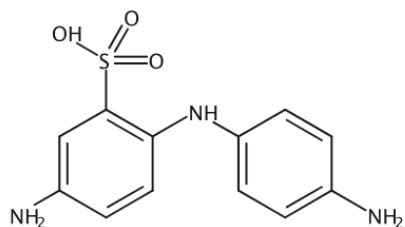
**14.2 ANEXO 2. Tabla de porcentajes de remoción del colorante negro solofenil a 100 ppm a lo largo de diez días.**

días	I	II	III	IV	V	VI	VII
1	89.04454	86.961207	95.510057	99.030172	99.137931	6.70600858	5.63304721
2	88.074713	83.369253	96.156609	98.922414	99.24569	9.54935622	12.0708155
3	86.458333	81.681034	99.20977	98.886494	99.497126	19.6351931	18.0325751
4	84.877874	77.981322	97.701149	97.593391	98.635057	24.3025751	30.9549356
5	84.770115	74.497126	96.695402	95.114943	97.377874	18.8304721	29.72103
6	84.267241	72.234195	94.719828	92.852011	95.941092	23.7124464	30.8476395
7	83.477011	71.300287	94.109195	91.451149	94.935345	33.2081545	39.2703863
8	82.543103	70.114943	95.186782	90.804598	94.50431	44.3133047	59.0128755
9	82.471264	68.78592	93.390805	91.127874	93.821839	41.3626609	58.9055794
10	82.112069	69.037356	95.725575	91.41523	93.247126	16.416309	57.77897
Promedio	<b>84.8096263</b>	<b>75.5962643</b>	<b>95.8405172</b>	<b>94.7198276</b>	<b>96.634339</b>	<b>23.8036481</b>	<b>34.2227854</b>

**14.3 ANEXO 3. Tabla de los porcentajes de remoción del colorante negro solofenil a 200 ppm a lo largo de diez días.**

días	I	II	III	IV	V	VI	VII
1	80.662768	56.237817	96.413255	91.247563	91.851852	0.8329863	1.08288213
2	84.11306	55.88694	97.602339	93.235867	93.216374	1.2494794	1.91586839
3	86.452242	55.847953	95.964912	92.768031	92.670565	3.6651395	3.08204915
4	87.329435	57.251462	94.756335	91.949318	91.910331	3.1236985	4.33152853
5	87.309942	55.224172	92.846004	89.532164	90.79922	4.2898792	2.24906289
6	88.245614	54.502924	90.974659	88.576998	89.122807	2.9987505	3.70678884
7	88.031189	54.152047	93.565302	87.582846	88.226121	4.9562682	7.70512287
8	84.834308	53.001949	91.072125	87.251462	87.85575	4.5814244	12.2032486
9	82.982456	51.384016	90.565302	86.959064	87.017544	6.8304873	9.16284881
10	80.79922	52.553606	91.695906	87.076023	83.333333	4.9146189	5.37276135
Promedio	<b>85.0760234</b>	<b>54.6042886</b>	<b>93.5456139</b>	<b>89.6179336</b>	<b>89.6003897</b>	<b>3.74427322</b>	<b>5.08121616</b>

#### 14.4 ANEXO 4. METABOLITO SECUNDARIO PROPUESTO MS-3



**Formula**

**C<sub>12</sub> H<sub>13</sub> N<sub>3</sub> O<sub>3</sub> S**

**Nombre**

Benzenesulfonic acid, 5-amino-2-[(4-aminophenyl)amino]-

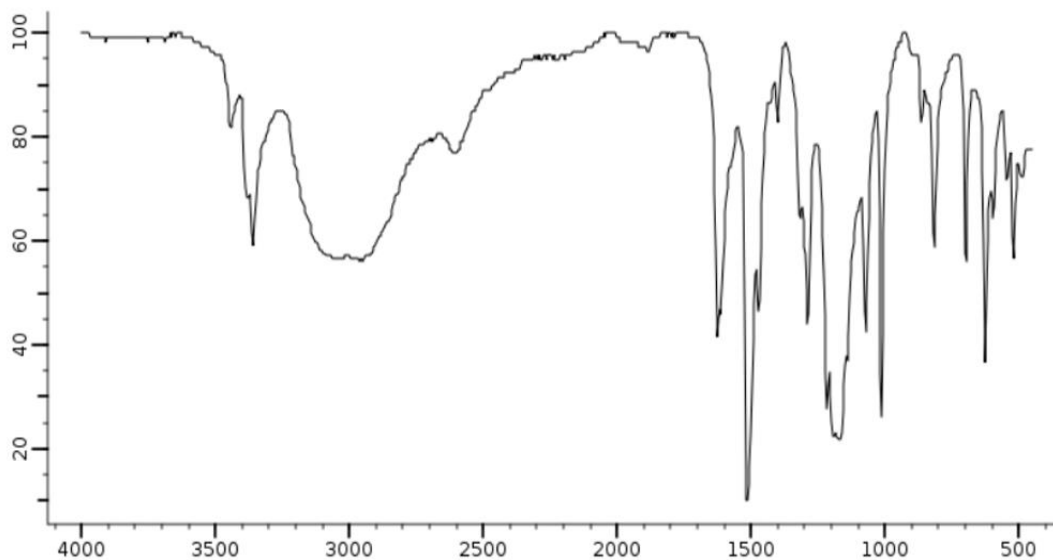
**Peso molecular**

279.31

**Densidad**

Value: 1.527±0.06 g/cm<sup>3</sup> | Condition: Temp: 20 °C Press: 760 Torr

**Espectro de IR**



### Otros nombres

- Benzenesulfonic acid, 5-amino-2-(p-aminoanilino)- (6Cl,7Cl,8Cl)
- 5-Amino-2-[(4-aminophenyl)amino]benzenesulfonic acid
- 4,4'-Diamino-2-sulfodiphenylamine
- 4,4'-Diaminodiphenylamine-2-sulfonic acid
- 4-(p-Aminoanilino)-3-sulfo-1-aminobenzene
- 4-(p-Aminoanilino)-3-sulfoaniline
- 5-Amino-2-(4-aminophenylamino)benzenesulfonic acid
- 5-Amino-2-(p-aminoanilino)benzenesulfonic acid
- 6-(p-Aminoanilino)metanilic acid
- MAC 0021939
- NSC 4706
- NSC 5622