



Universidad Nacional Autónoma de México

---

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

**Potencial de *Synechocystis* sp. para la biorremoción  
del colorante Rojo Congo**

**TESIS**

**Que para obtener el título de  
Químico Farmacéutico Biólogo**

**P R E S E N T A**

**Verónica Lorena Cano García**

**Director de Tesis**

**Dra. Rosa Olivia Cañizares**

**Asesor interno**

**Dra. Gilda Flores Rosales**

**Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN



**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO  
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ  
Jefa del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **TESIS**

---

**Potencial de Synechocystis sp. Para la biorremoción del colorante Rojo Congo**

---

Que presenta la pasante: **Verónica Lorena Cano García**

Con número de cuenta: **30480589-9** para obtener el Título de: **Química Farmacéutica Bióloga**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

**ATENTAMENTE**

**“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 18 de febrero de 2013.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	<b>NOMBRE</b>	<b>FIRMA</b>
<b>PRESIDENTE</b>	Dra. Gilda Flores Rosales	
<b>VOCAL</b>	Dr. Arturo Aguirre Gómez	
<b>SECRETARIO</b>	Q. Arcadia Hernández Beltrán	
<b>1er SUPLENTE</b>	QFB. Gabriela Escalante Reynoso	
<b>2do SUPLENTE</b>	M. C. Ana Laura Vázquez Martínez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).  
HHA/pm

El trabajo de esta Tesis se realizó en el laboratorio de Biotecnología de Microalgas del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de la Dra. Rosa Olivia Cañizares Villanueva

## Dedicatorias

A la Dra. Gilda Flores Rosales

Por ser mi inspiración para querer ser investigadora. Por ser mi sensei y apoyarme cada vez que iba por buen camino y regañarme cada vez que me salía de él.

A la Dra. Rosa Olivia Cañizares Villanueva

Por darme la oportunidad de trabajar en su Laboratorio, por aceptarme, por su apoyo y su paciencia en la realización de esta Tesis.

A las ratas y ratones

Que durante mi carrera sufrieron miedo, dolor y muerte, sin voz ni derechos y que no pude salvar.

A mis padres

María Elena García Gallo y Alejandro Cano Rodríguez por su apoyo incondicional, sus platicas motivacionales, y sobre todo por su paciencia y por abrir las puertas de su casa a todas esas ratas y ratones que sí pude salvar, Lester, Remi, mis 4 machos, mis 5 hembras, mis 6 chiquitos, mi rata bebé, mis 12 ratones y mis 3 princesas.

A mi hermano

Daniel Alejandro Cano García por estar ahí cuando te necesito (¡molestándome!, pero estas ahí).

A mis gatos

Por ser los únicos que estuvieron conmigo a las 3 de la mañana mientras yo tenía que hacer tarea, estudiar para un examen o corregir esta Tesis, Katrisha, Pheobe, Zelda, Magik, Pulga, Xadow, Tommy, Manchas, Keo, Ginger, Spit Spot, Haley, Bagheera, Mikey, Cometa y Óreo.

A las Princess

Gris, Norma, Edtna, Moni, Lulú, Aris, Melody, Jessy y Sandra, tan diferentes, tan únicas, las amo gracias por entrar en mi vida.

A Jorge Dávila Méndez

Por acompañarme durante casi toda mi carrera, por que te encontré, por inspirarme, te amo muñequi.

## Agradecimientos

A la Dra. Gilda Flores Rosales

Por mandarme a hacer el servicio social y tesis fuera de mi facultad y permitirme conocer el mundo de la investigación en el CINVESTAV.

A la Dra. Rosa Olivia Cañizares Villanueva

Por aceptarme en su laboratorio, por su apoyo, e instrucción en la realización de esta Tesis.

A la M. en B. Miriam Hernández Zamora

Por ser mi guía y maestra y por enseñarme todo lo necesario para la elaboración de esta Tesis, por explicarme lo mismo una y otra vez sin desesperarte ni regañarme.

Al Dr. Dr. Hugo V. Perales Vela

Del Laboratorio de Bioquímica de la Unidad de Morfología y Función, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, por donarme a *Synechocystis* sp. y por su apoyo y asesoría con todo lo referente a fluorescencia.

Al Dr. Cesar Mateo Flores Ortiz

Coordinador de la Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, por su apoyo brindado con todo lo referente a la técnica de HPLC.

Al M. en C. Víctor Hugo Rosales G.

De la Unidad de Citometría de Flujo del Laboratorio Central del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional por su apoyo y asesoría en el uso del citómetro de flujo.

Al M. en C. Alfredo Martínez Roldan

Por explicarme y apoyarme en todo lo que no entendía de las técnicas o de mis resultados y por ser mi amigo.

A mi *Synechi*

Por aguantar y vivir en un medio con colorante y sobre todo por limpiar el agua y ayudarme a decidir que limpiar el agua es lo que quiero hacer el resto de mi vida.

## Índice

Índice de figuras	8
Índice de tablas	9
1. Introducción	10
2. Antecedentes	12
2.1 Color	12
2.2 Tipos de colorantes	14
2.3 Colorantes azoicos	15
2.4 Rojo Congo	16
2.5 Legislación ambiental	18
2.6 Tratamiento de aguas residuales de la industria textil	18
2.6.1 Métodos fisicoquímicos	19
2.6.2 Métodos biológicos	19
2.7 Mecanismo de remoción de colorantes azo por microalgas	20
2.8 Microalgas	21
2.9 Cianobacterias	22
2.10 <i>Synechocystis</i> sp.	23
3. Hipótesis	27
4. Justificación	28
5. Objetivos	29
5.1 Objetivo General	29
5.2 Objetivos particulares	29
6. Protocolo Experimental	30
6.1 Material biológico	30
6.2 Medio de Cultivo	30
6.3 Metodología	30
6.3.1 Etapa 1. Efecto del Rojo Congo sobre el crecimiento de <i>Synechocystis</i> sp.	31
6.3.1.1 Peso seco	31
6.3.1.2 Crecimiento	31
6.3.1.3 Número de células por mililitro	31
6.3.1.4 Determinación del contenido de clorofila <i>a</i>	31

6.3.1.5	Determinación de la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) y el tiempo de duplicación celular ( $t_d$ ) de <i>Synechocystis</i> sp.	32
6.3.2	Etapa 2. Efecto del Rojo Congo sobre el metabolismo fotosintético de <i>Synechocystis</i> sp.	32
6.3.2.1	Determinación de la actividad fotosintética por emisión de fluorescencia.	32
6.3.3	Etapa 3. Determinación de la capacidad de biorremoción del Rojo Congo por <i>Synechocystis</i> sp.	33
6.3.3.1	Capacidad de biorremoción	33
6.3.3.2	HPLC	34
6.3.3.3	Biosorción	34
7.	Resultados	35
7.1	Peso seco	35
7.2	Crecimiento	36
7.3	Número de células por mililitro	37
7.4	Determinación de clorofila <i>a</i>	38
7.5	Determinación de la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) y el tiempo de duplicación celular ( $t_d$ ) de <i>Synechocystis</i> sp. a diferentes concentraciones de Rojo Congo	39
7.6	Actividad fotosintética por emisión de fluorescencia	39
7.7	Capacidad de biorremoción	42
7.8	HPLC	44
7.9	Biosorción del Rojo Congo con células muertas	45
8.	Discusión	46
9.	Conclusiones	50
10.	Referencias	51
	Anexo 1	58
	Anexo 2	59
	Anexo 3	64



## Índice de figuras

Figura 1. Espectro electromagnético	12
Figura 2. Efecto batocrómico.	14
Figura 3. a) Estructura general de los colorantes azo	16
Figura 4. a) Estructura del colorante Rojo Congo	17
Figura 5. Ruta propuesta para degradar colorantes azo por microalgas	21
Figura 6. a) Cianobacteria <i>Synechocystis</i> sp.	24
Figura 7. Cinética de emisión de fluorescencia de la clorofila a del fotosistema II	25
Figura 8. Determinación del peso seco de <i>Synechocystis</i> sp. a diferentes concentraciones de Rojo Congo al inicio (0h) y al final (96h) de la cinética.	35
Figura 9. Determinación del crecimiento de <i>Synechocystis</i> sp. a diferentes concentraciones de Rojo Congo.	36
Figura 10. Determinación del número de células por mililitro de <i>Synechocystis</i> sp.	37
Figura 11. Efecto del Rojo Congo sobre el contenido de clorofila a de <i>Synechocystis</i> sp. a diferentes concentraciones a las 96 h.	38
Figura 12. Efecto del Rojo Congo sobre la emisión de fluorescencia de la clorofila a del PSII de <i>Synechocystis</i> sp.	39
Figura 13. Fluorescencia variable relativa de <i>Synechocystis</i> sp. a diferentes concentraciones de Rojo Congo.	40
Figura 14. Espectro de absorción del colorante Rojo Congo en solución acuosa.	42
Figura 15. Espectro de absorción del colorante Rojo Congo a diferentes concentraciones, al inicio (0 h) y al final (96 h) de la cinética.	43
Figura 16. Estudio de biosorción del Rojo Congo	45
Figura 17. Cromatograma para la concentración de 5 mg/L a las 0 h y a las 96 h.	59
Figura 18. Cromatograma para la concentración de 10 mg/L a las 0 h y a las 96 h.	60
Figura 19. Cromatograma para la concentración de 15 mg/L a las 0 h y a las 96 h.	61
Figura 20. Cromatograma para la concentración de 20 mg/L a las 0 h y a las 96 h.	62
Figura 21. Cromatograma para la concentración de 25 mg/L a las 0 h y a las 96 h.	63
Figura 22. Curva de calibración del Rojo Congo.	64

## Índice de tablas

Tabla 1. Radiación absorbida y color observado a diferentes longitudes de onda	13
Tabla 2. Ventajas y desventajas de los métodos fisicoquímicos	19
Tabla 3. Parámetros cinéticos de la prueba OJIP	33
Tabla 4. Parámetros cinéticos de la fase rápida para cada una de las muestras a diferentes concentraciones de Rojo Congo.	41
Tabla 5. Porcentaje de biorremoción del colorante Rojo Congo por <i>Synechocystis</i> sp. a las 96 horas.	44
Tabla 6. Áreas obtenidas de los cromatogramas de los diferentes tratamientos.	44
Tabla 7. Componentes del medio BG11	58
Tabla 8. Parámetros cromatográfico para la concentración de 5 mg/L a las 0h	59
Tabla 9. Parámetros cromatográfico para la concentración de 5 mg/L a las 96 h	59
Tabla 10. Parámetros cromatográficos para la concentración de 10 mg/L a las 0 h	60
Tabla 11. Parámetros cromatográfico para la concentración de 10 mg/L a las 96 h	60
Tabla 12. Parámetros cromatográficos para la concentración de 15 mg/L a las 0 h	61
Tabla 13. Parámetros cromatográfico para la concentración de 15 mg/L a las 96 h	61
Tabla 14. Parámetros cromatográficos para la concentración de 20 mg/L a las 0 h	62
Tabla 15. Parámetros cromatográfico para la concentración de 20 mg/L a las 96 h	62
Tabla 16. Parámetros cromatográficos para la concentración de 25 mg/L a las 0 h	63
Tabla 17. Parámetros cromatográfico para la concentración de 25 mg/L a las 96 h	63

## 1. Introducción

### Contaminación del agua

La contaminación se define como la introducción de agentes biológicos, químicos o físicos a un medio al que no pertenecen, los cuales conllevan a una modificación no deseable de la composición natural de este medio (Peña *et al.*, 2005).

La contaminación ambiental se revela con la alteración del medio natural y con el aumento de las concentraciones de algunos de sus componentes naturales, estas alteraciones pueden tener efectos adversos para la salud y el equilibrio ecológico, a corto o largo plazo (Albert *et al.*, 1995).

La concentración de la población humana y el resultado del desarrollo de las actividades asociadas a ésta, dan origen a la contaminación antropogénica. Existen cuatro focos principales de este tipo de contaminación: la industria, las descargas de desechos humanos, la agricultura y la ganadería.

Uno de los tipos de contaminación que produce mayor impacto es de origen industrial, por la gran variedad de materiales que puede aportar al agua: materia orgánica, incremento de pH y temperatura, radioactividad, aceites, grasas, etc.

De acuerdo con el Plan Nacional de Desarrollo 2007-2012 ([http://pnd.calderon.presidencia.gob.mx/pdf/Eje4\\_Sustentabilidad\\_Ambiental/4\\_1\\_Agua.pdf](http://pnd.calderon.presidencia.gob.mx/pdf/Eje4_Sustentabilidad_Ambiental/4_1_Agua.pdf)) se generan 178 m<sup>3</sup>/s de aguas residuales industriales, de los cuales únicamente se trata el 15% en cerca de 1,800 plantas de tratamiento, mientras que los 151 m<sup>3</sup>/s restantes son descargados a cuerpos receptores sin ningún tratamiento.

Entre las industrias más contaminantes se encuentran: la petroquímica, la láctea, la agroalimentaria, la energética (térmica, nuclear, hidráulica, etc.), la papelera, la siderúrgica, la alimentaria, la textil y la minera (Peña *et al.*, 2005).

En los procesos productivos de la industria textil se consumen grandes cantidades de agua y debido a las sustancias químicas que se usan en el proceso, las aguas residuales que se generan son difíciles de tratar. De acuerdo con la Comisión Nacional del Agua, la industria contribuye con 3% de las descargas industriales de agua en México. De esta forma los efluentes provocan diferentes impactos sobre el medio ambiente, encontrando así variaciones en las aguas en cuanto a sólidos suspendidos, carga iónica, toxicidad, concentración de oxígeno disuelto y color.

El color pocas veces es considerado un contaminante, pese a que puede estar asociado con la presencia de compuestos tóxicos y grupos cromóforos o polímeros de alto peso molecular como la lignina (Rodríguez *et al.*, 2003). Estos

efluentes coloridos poseen moléculas, las cuales presentan una alta capacidad de bioacumulación y una baja velocidad de despolimerización, permitiendo que a largo plazo el color se acumule en lugares como lagos y bahías, provocando una disminución del poder absorbente del agua y por ende una disminución en la actividad fotosintética de los organismos presentes en dichos ecosistemas, ocasionando la disminución del oxígeno disuelto (DO) en el agua (Rodríguez *et al.*, 2006) así mismo estas moléculas pueden producir una acumulación en los tejidos de los organismos acuáticos, que a largo plazo llegan a ser tóxicos. Las descargas de estos efluentes también pueden aumentar la población de peces y algas debido a su alto contenido de nitrógeno, y contribuir al agotamiento del oxígeno disuelto en el agua (Mancilla *et al.*, 2001).

## 2. Antecedentes

### 2.1 Color

Los compuestos que presentan coloración son capaces de absorber y reflejar radiación en el rango visible (rango de longitudes de onda de 380-750 nm) (Fig. 1).

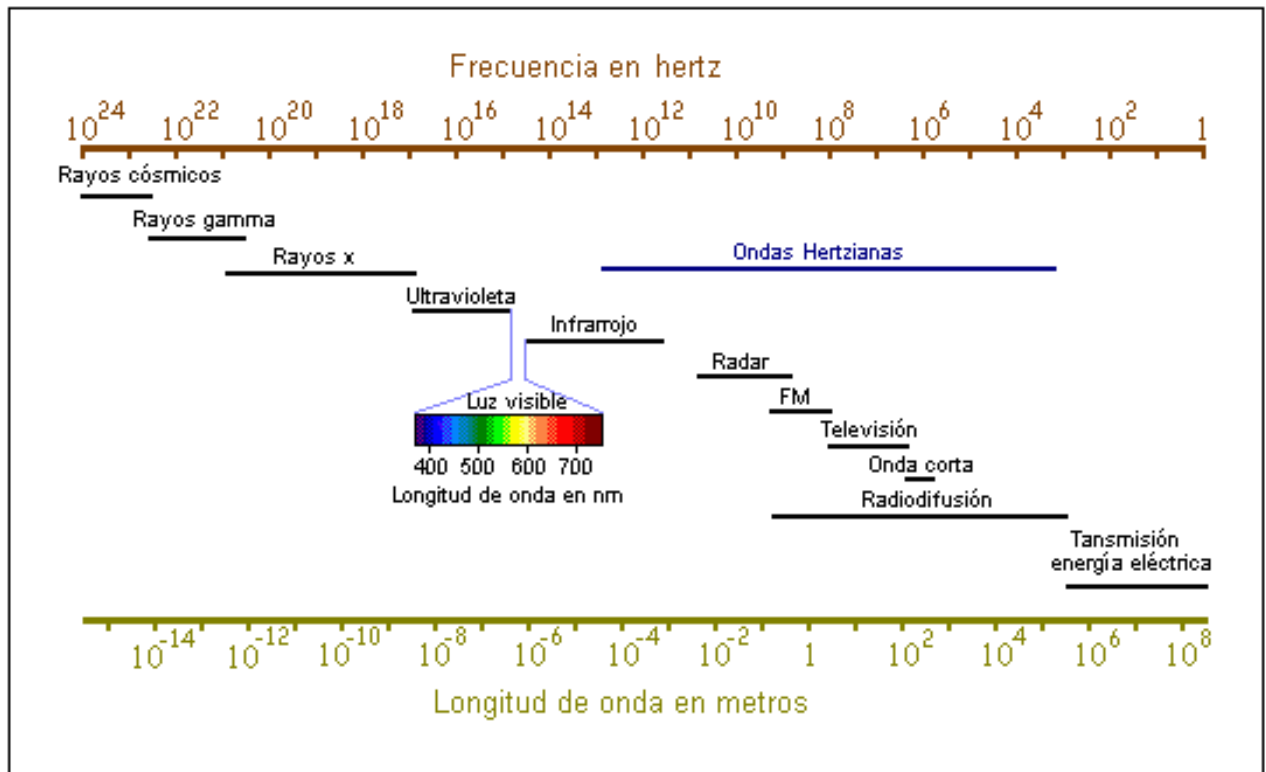


Figura 1. Espectro electromagnético ([edison.upc/curs/llum/luz/luz.html](http://edison.upc/curs/llum/luz/luz.html))

El color que presenta una sustancia es realmente el complementario de la radiación que absorbe ya que corresponde a la radiación que refleja (Tabla1).

Tabla 1. Radiación absorbida y color observado a diferentes longitudes de onda

Intervalo de longitudes de onda (nm)	Color absorbido	Color observado
100-190	ultravioleta del vacío	ninguno
190-380	ultravioleta cercano	ninguno
380-435	violeta	amarillo-verde
435-480	azul	amarillo
480-500	verde-azul	naranja-rojo
500-560	verde	púrpura
560-580	amarillo-verde	violeta
580-595	amarillo	azul
595-650	naranja	verde-azul
650-780	rojo	azul-verde

(edison.upc/curs/llum/luz/luz.html)

### Relación entre color y estructura

Gräbe y Liebermann (1868) observaron que los colorantes orgánicos podían reducirse, dando compuestos incoloros, y cuando los átomos de hidrógeno (adicionados por reducción) se eliminaban por oxidación, se regeneraba el color original. Sin embargo, Witt (1876) fue el primero en observar que el color aparecía generalmente en un compuesto orgánico cuando dicho compuesto contenía determinados grupos químicos no saturados.

Witt (1876) designó a estos grupos con el nombre de cromóforos, algunos de los más importantes son los siguientes: nitroso (-N=O-), azo (-N=N-), carbonilo (-C=O-), azoamino (-N=N-NH-), tiocarbonilo (-C=S-).

Al compuesto que contiene el grupo cromóforo le dio Witt el nombre de cromógeno. Así mismo hizo ver que la presencia de determinados grupos en el cromógeno intensifica el color, aunque estos grupos no sean cromóforos. A aquellos los llamó auxocromos, por ejemplo ácidos (fenólicos) o básicos, siendo los más importantes: -OH, -NH<sub>2</sub>, -NH-R, y -NR<sub>2</sub>. El cromóforo es un grupo con enlaces múltiples. El auxocromo es un grupo que intensifica el color cuando están presentes grupos cromóforos. Los auxocromos se clasifican en tres clases, aquellos que son fuentes de electrones, los que son sustractores de electrones y los que pueden actuar como ambos. Los radicales que producen una

intensificación del color se conocen como grupos batocrómicos (Fig. 2), y los que producen el efecto opuesto, grupos hipocrómicos.

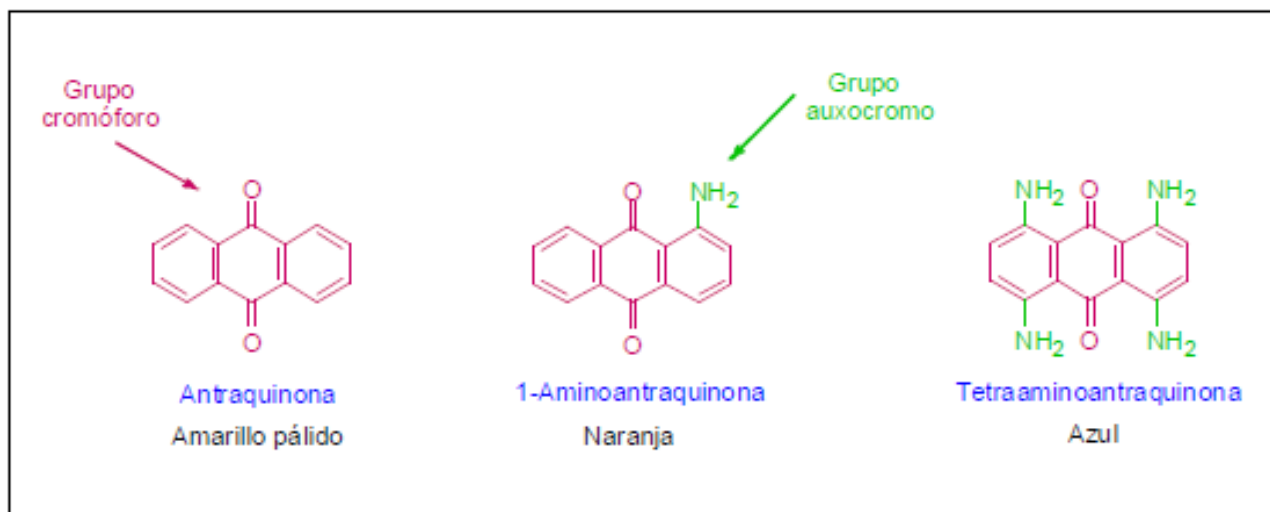


Figura 2. Efecto batocrómico por el grupo amino en derivados de la antraquinona (Modificado de Witt, 1876).

## 2.2 Tipos de colorantes

Los colorantes se clasifican de acuerdo con su constitución química o por su aplicación a la fibra textil.

### Clasificación química (Finar, 1960)

- 1) Nitro-colorantes
- 2) Nitroso-colorantes
- 3) Colorantes azo
- 4) Colorantes de difenilmetano
- 5) Colorantes de trifenilmetanol
- 6) Colorantes de xanteno
- 7) Colorantes de difenilamina:
  - a. Indaminas
  - b. Indofenoles
- 8) Colorantes heterocíclicos
  - a. Grupo de la acridina
  - b. Grupo de la quinoleína
  - c. Grupo de la azina
  - d. Grupo de la tiazina
  - e. Grupo de la oxazina
- 9) Colorantes a la tina
  - a. Grupo del índigo

- b. Grupo de la antraquinona
- 10) Colorantes antraquinónicos
  - 11) Colorantes de azufre
  - 12) Colorantes de ftalocianina.

### **Clasificación según su aplicación (Finar, 1960)**

- 1) Colorantes ácidos: son las sales sódicas de ácidos sulfónicos y nitrofenoles. Tiñen directamente las fibras animales, pero no las vegetales; en su mayoría, se aplican a la lana y a la seda.
- 2) Colorantes básicos: son en su mayoría las sales de las bases coloreadas con ácido clorhídrico o cloruro de zinc. Tiñen directamente las fibras animales y las fibras vegetales que hayan sido mordientadas con taninos. Los colorantes básicos se aplican al algodón y a la seda.
- 3) Colorantes directos: tiñen directamente las fibras animales y vegetales.
- 4) Colorantes con mordiente: para que puedan teñir las fibras animales y vegetales es imprescindible el uso de un mordiente, ya que no las tiñen directamente.
- 5) Colorantes a la tina: indicados para fibras sintéticas, son insolubles en agua, pero se reducen por el hiposulfito sódico alcalino, dando compuestos solubles en álcali que se oxidan con facilidad, dando de nuevo el colorante.
- 6) Colorantes de azufre: son colorantes que contienen azufre y son solubles en sulfuro sódico acuoso. Se utilizan exclusivamente para fibras vegetales.
- 7) Colorantes para rayón. Son aquellos utilizados para el teñido de la seda y rayón al acetato.

### **2.3 Colorantes azoicos**

Los colorantes azo forman parte de una familia de sustancias químicas orgánicas caracterizadas por la presencia de un grupo peculiar que contiene nitrógeno unido a anillos aromáticos (Fig. 3a). Los colorantes azoicos constituyen el grupo más extenso de todos los colorantes orgánicos disponibles en el mercado (40-50% del total) y se conocen varios miles. Esta superioridad se debe a varias razones, poseen un fuerte carácter hipercrómico, y en comparación con otros colorantes, son fácilmente asequibles a partir de materias primas baratas, cubren toda la gama de colores del amarillo al negro, y presentan una fijación aceptable en la fibra (Finar, 1960). En la figura 3b se presenta la estructura química de algunos colorantes, la cual se caracteriza por la presencia del grupo azo ( $-N=N-$ ) como cromóforo, asociados a grupos auxocromo de tipo amino o hidroxilo ( $-NH_2$ ,  $-NR_2$  y  $-OH$ ). En este tipo de compuestos, los átomos de nitrógeno del grupo azo presentan hibridación  $sp^2$  y los ángulos de enlace son de  $120^\circ$ , por lo que existen en una configuración planar.

Existen algunos colorantes azo que presentan distintos colores en función del pH, por ello muchos indicadores ácido-base son de tipo azoico.



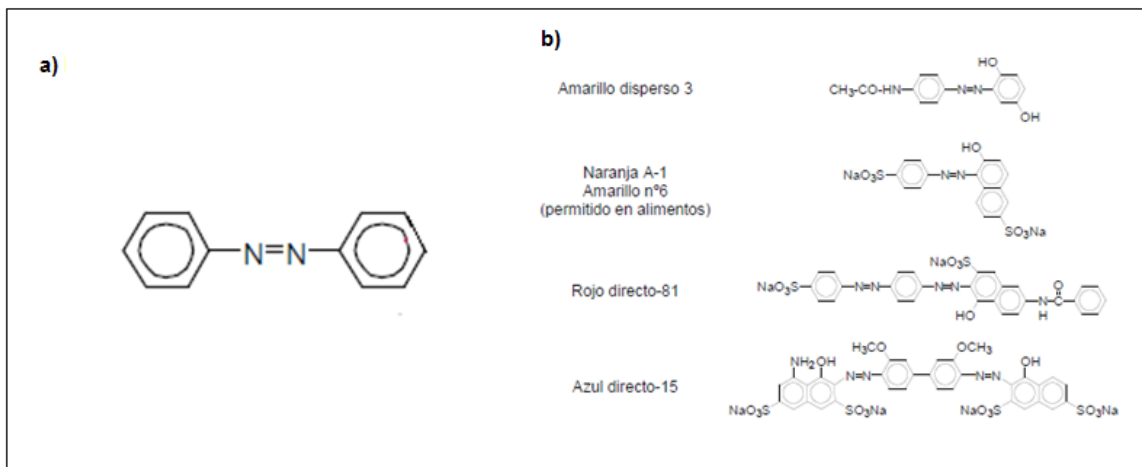


Figura 3. a) Estructura general de los colorantes azo donde se observa el grupo azo (-N=N-) unido a anillos aromáticos. b) Ejemplo de colorantes azo (Modificado de Finar, 1960).

## 2.4 Rojo Congo

El Rojo Congo es un colorante azo directo que se prepara por copulación de la bencidina tertazotada (495 nm) con dos moléculas del ácido 1-naftilamin-4-sulfónico (321 nm) (Böttiger, 1884). El Rojo Congo fue el primer colorante sintético obtenido capaz de teñir directamente el algodón. En solución alcalina es rojo y su sal sódica tiñe el algodón de color rojo fuerte. Es muy sensible a los ácidos inorgánicos, cambiando de rojo a azul. Este oscurecimiento del color puede atribuirse a la formación de nuevas estructuras análogas a las del aminoazobenceno (Finar, 1960).

### Características fisicoquímicas (Sladewski *et al.*, 2006)

Algunas características importantes del Rojo Congo son:

- Peso molecular 696.68 g/mol
- Fórmula molecular  $C_{32}H_{22}N_6Na_2O_6S_2$
- Índice de color 22.120
- $\lambda_{max}$  490 nm
- Ancho 2.62 nm
- Profundidad 0.74 nm
- Espesor 0.43 nm
- pKa 5.5 (sin contar los iones de  $Na^+$ ) (Lorenc-Grabowska *et al.*, 2007)
- A pH 4.2 presenta un color azul oscuro, a pH 12 presenta un color rojo. Sin embargo, la intensidad del color rojo es diferente al original a pH 10-12 (Acemioglu, 2004)
- Compuesto polar

## Estructura

Este colorante tiene dos grupos sulfonato que en solución acuosa le confieren una carga negativa (Fig. 4a) (Binupriya *et al.*, 2007). Presenta estructuras diferentes al variar el pH (Fig. 4b) (Purkait *et al.*, 2007).

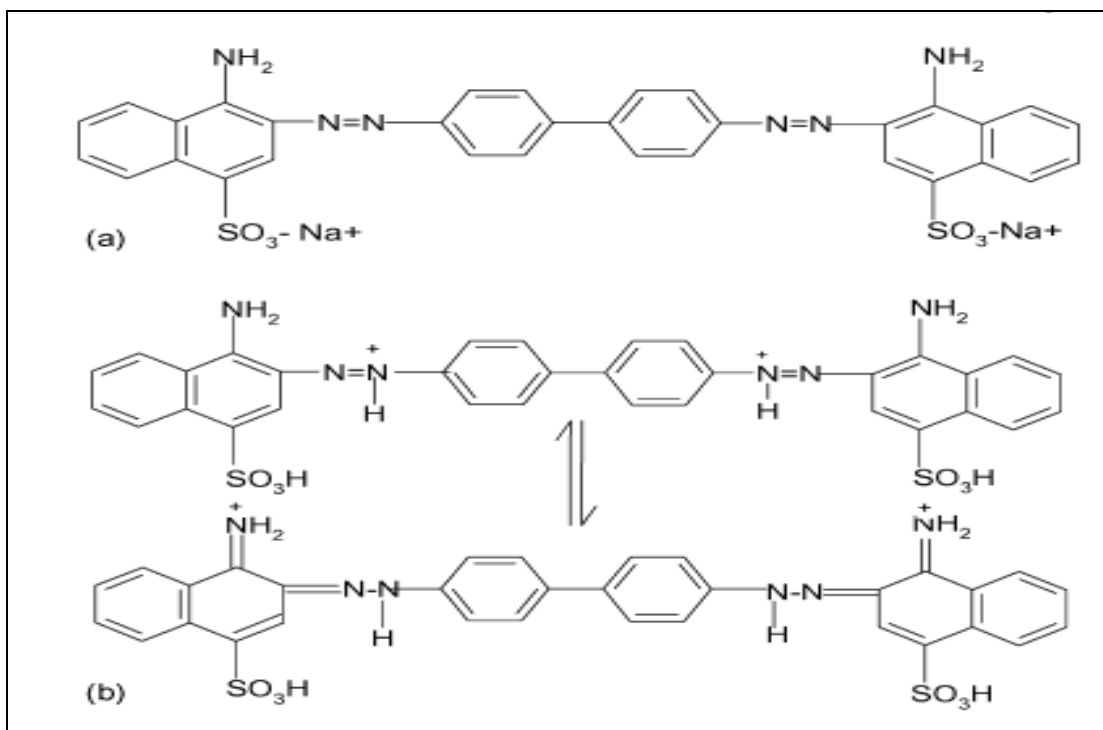


Figura 4. a) Estructura del colorante Rojo Congo en solución acuosa b) Equilibrio a pH < 5.5 (Purkait *et al.*, 2007)

- Es una molécula plana (Chatterjee *et al.*, 2009).
- En agua forma estructuras miceliales con forma de listón (Piekarska *et al.*, 1996).
- Los efluentes que contienen Rojo Congo son producidos en la industria textil, papelera, de la imprenta y de plásticos (Vimonses *et al.*, 2009).
- Puede ser metabolizado a bencidina que es un carcinógeno (Mall *et al.*, 2005).
- El sistema cromóforo del Rojo Congo consiste esencialmente del grupo azo (-N=N-) en asociación con un sistema aromático (Lorimer *et al.*, 2001) y su grupo auxocromo es el grupo -NH<sub>2</sub> el cual actúa como fuente de electrones y cuando los electrones se conjugan, dan lugar a la producción de color visible (Allinger, 1972).

## Toxicología

Se ha demostrado que los colorantes azoicos derivados de la bencidina, pueden ser metabolizados con liberación de bencidina *in vivo* (Lynn *et al.*, 1980). El hígado, gracias a la enzima azo reductasa y a las bacterias intestinales puede reducir los derivados azoicos procedentes de la bencidina, de la 3,3'-dimetilbencidina y de la 3,3'-dimetoxibencidina, con liberación de la amina correspondiente (Cerniglia *et al.*, 1986).

## **2.5 Legislación ambiental**

Debido a las consecuencias medio ambientales mencionadas anteriormente, que se han presentado por el vertimiento de residuos tóxicos en cuerpos de agua, la legislación ambiental ha tenido una mayor importancia a nivel latinoamericano, en especial a partir de la Convención de Estocolmo de 1972, donde se promulgaron principios entre los cuales se postula que debe ponerse fin a las descargas tóxicas o de otras materias, así como la liberación de calor, en cantidades o concentraciones tales que el medio no pueda neutralizarlas, para que no se causen daños irreparables a los ecosistemas. De acuerdo con esto, los Estados Unidos Mexicanos han determinado que: *El agua es un bien de dominio público federal, vital, vulnerable y finito, con valor social, económico y ambiental, cuya preservación en cantidad y calidad y sustentabilidad es tarea fundamental del Estado y de la Sociedad, así como prioridad y asunto de seguridad nacional* (Art.14 I Título tercero, de la Ley de Aguas Nacionales Mexicanas, 1992) por lo cual han establecido en dicha Ley, su protección, mejoramiento y buen uso.

La Norma Oficial Mexicana NOM-065-ECOL-1994, establece los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales de las industrias de pigmentos y colorantes a cuerpos receptores. En ella se estipulan que los valores máximos permisibles para el vertimiento de aguas serán: pH 6-9 (unidades de pH), DQO 300 (mg/L), grasa y aceites 40 (mg/L), sólidos sedimentables 1.0 (mg/L), sólidos suspendidos totales 200 (mg/L). En cuanto a la concentración de color, conductividad eléctrica, demanda bioquímica de oxígeno, fósforo total, metales pesados, nitrógeno total, sustancias activas al azul de metileno, temperatura y tóxicos orgánicos, la autoridad competente deberá establecer los valores máximos permisibles de ser necesario.

## **2.6 Tratamiento de aguas residuales de la industria textil**

Los tratamientos a los que se deben someter los efluentes tienen que garantizar la eliminación o recuperación del compuesto orgánico en el grado requerido por la legislación que regula el vertido del efluente o para garantizar las condiciones mínimas del proceso en el caso de reutilización o recirculación de la corriente para uso interno.

De acuerdo con CONAGUA en México se cuenta con aproximadamente 2,186 plantas de tratamientos de aguas residuales industriales, las cuales de los 6.01km<sup>3</sup>/año (190.4 m<sup>3</sup>/s) de aguas residuales que se producen sólo se tratan 1.16 km<sup>3</sup>/año (36.7 m<sup>3</sup>/s).

### 2.6.1 Métodos fisicoquímicos

Tabla 2. Ventajas y desventajas de los métodos fisicoquímicos

Métodos fisicoquímicos	Ventajas	Desventajas	Referencia
Coagulación y Floculación	Alta disponibilidad Bajo costo Flexibilidad de uso en diferentes tipos de agua	Generación de lodos	Salas, 2003.
Ósmosis inversa	Elimina óxido y residuos microscópicos así como minerales perjudiciales	Proceso muy caro, acidifica el agua	Manahan, 2007.
Intercambio iónico	Las resinas tienen alta capacidad de intercambio y son químicamente estables	Proceso muy caro	Pasto, 1981.
Ozonización	Produce una decoloración en el efluente	Genera compuestos secundarios tóxicos	Robinson <i>et al.</i> , 2001.

### 2.6.2 Métodos biológicos

La biorremediación se refiere a cualquier método que usa plantas y microorganismos para degradar y reciclar materiales orgánicos y separar iones inorgánicos presentes en las aguas residuales. Tiene ventajas sobre otras técnicas, como son los tratamientos fisicoquímicos, debido a que siendo un proceso biológico, los productos formados son generalmente inocuos y la relación costo/efectividad es menor comparada con otras tecnologías y puede ser ejecutada *in situ* (Castillo y Roldan, 2005).

#### Tratamientos con bacterias

La decoloración de los colorantes azo por bacterias se inicia por la reducción del grupo azo catalizada por la enzima azo reductasa, los procesos de tratamiento de aguas residuales convencionales usualmente no pueden remover eficientemente el color azo debido a que estos compuestos son aeróbicamente recalcitrantes, pero si el microorganismo aerobio es sujeto a condiciones microaerofílicas, entonces aumenta la tasa de decoloración (Padamavathy *et al.*, 2003).

## Tratamientos con hongos

La capacidad que poseen los hongos para degradar compuestos aromáticos complejos como parte de su metabolismo natural, ha permitido que sean usados en la degradación de diversos compuestos, incluyendo los colorantes sintéticos (Garzón, 2009), por ejemplo *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. oryzae*, *Penicillium chrysogenum*, *Cladosporium rubrum* y *Pleurotus ostreatus* son capaces de degradar al Rojo Congo (Bhattacharya *et al.*, 2011).

## Tratamientos con microalgas

Una gran cantidad de especies de microalgas son cada vez más empleadas como fuente de productos biotecnológicos, aplicables fundamentalmente en las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica. Además, el desarrollo de tecnologías que emplean microalgas, para la biorremediación de ambientes contaminados recibe cada vez más interés (López, 2005).

## Tratamientos con cianobacterias

Se ha reportado que las cianobacterias pueden degradar compuestos como la ampicilina (Prabaharan *et al.*, 1994), fenoles (Shashirekha *et al.*, 1997), plaguicidas organofosforados (Swaminathan *et al.*, 2009), melanoidina (Kalavathi *et al.*, 2001), la lignina (Saha *et al.*, 2010), detergentes que contienen dodecilsulfato sódico (SDS) (Uma *et al.*, 2009) y compuestos azo (Priya, 2009).

Otros investigadores han reportado que *Oscillatoria curviceps* es capaz de degradar el colorante azo C.I. Negro ácido 1 y usarlo como fuente de nitrógeno (Priya *et al.*, 2011), que *Spirulina platensis* es capaz de degradar el colorante Rojo 40 (Dotto *et al.*, 2012), que *Phormidium* sp. y *Synechococcus* sp. son capaces de bioacumular el Rojo Reactivo RB, Azul Remazol y Negro Reactivo B (Sadettin y Donmes, 2006) y que *Lyngbya lagerlerimi*, *Nostoc linckia* y *Oscillatoria rubescens* son capaces de degradar los colorantes Rojo de Metilo, Naranja II, Rojo G y Fucsina Básica (Mostafa *et al.*, 2009).

### 2.7 Mecanismo de remoción de colorantes azo por microalgas

La enzima azo reductasa reduce la unión azo (-N=N-) de los colorantes azoicos para producir aminas incoloras (Stolz, 2001). La clasificación de las azo reductasas se da en función de su aminoácido primario, aunque es difícil debido a su baja homología. Sin embargo, Abraham y John (2007) han basado dicha clasificación en el aminoácido secundario y terciario. Con base en su función, se clasifican como azo reductasas dependientes de flavina (Chen *et al.*, 2005) o azo reductasas flavina independientes (Blumel *et al.*, 2002).

Las azo reductasas flavina dependientes están organizadas en tres grupos: NADH o NADPH (Chen *et al.*, 2005) o ambas (Wang *et al.*, 2007) ya que estas coenzimas

sirven como donantes de electrones. Jinqi y Houtian (1991) propusieron la siguiente ruta para degradar colorantes azo por microalgas mediante la acción de la azo reductasa ya sea dependiente de NADH o NADPH ya que para ambos casos es la misma ruta (Fig. 5).

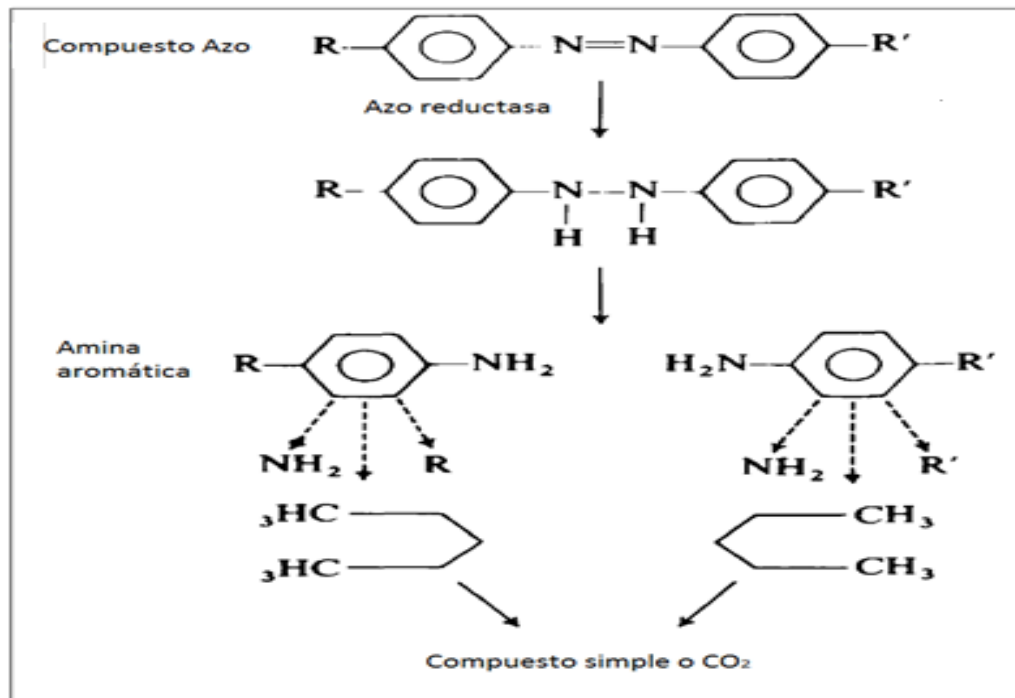


Figura 5. Ruta propuesta para degradar colorantes azo por microalgas (Modificado de Jinqi y Houtian, 1991).

## 2.8 Microalgas

Las microalgas son un grupo de organismos fotosintéticos que se pueden localizar en el medio marino salobre, en agua dulce y en el suelo. Son un grupo extremadamente heterogéneo de organismos unicelulares que pueden ser procariontas o eucariotas. A pesar de las grandes diferencias estructurales, fisiológicamente ambos tipos de microalgas, procariontas y eucariotas, son similares entre ellas y poseen un metabolismo fotosintético similar al de las plantas superiores. Según sus características nutricionales se les clasifica como autotróficas o heterotróficas, aunque algunas pueden comportarse como mixotróficas. Entre sus propiedades ecológicas se destacan las de ser los eslabones primarios en la mayor parte de las cadenas tróficas. También son las responsables de los episodios de *floreCIMIENTO*, fenómeno con impactos sanitarios y económicos negativos (Barsanti y Gualtieri, 2006).

## **Clasificación de las microalgas (Graham y Wilcox, 2002)**

### Procariotas

- *Cyanophyta*
- *Prochlorophyta*

### Eucariotas

- *Chlorophyta*
- *Euglenophyta*
- *Dynophyta*
- *Cryptophyta*
- *Heterokontophyta*
- *Prymnesiophyta*
- *Raphidophyta*

## **2.9Cianobacterias**

Las cianobacterias constituyen un grupo de eubacterias capaces de desarrollar fotosíntesis oxigénica similar a la de las plantas superiores, poseen clorofilas en sus centros de reacción, aunque la captación de luz se realiza fundamentalmente mediante los ficobilisomas, que contienen ficobiliproteínas, pigmentos de origen proteico y proteínas de anclaje. Las ficobiliproteínas transfieren la energía fundamentalmente al fotosistema II y constituyen hasta el 50% de las proteínas celulares (López, 2005).

Las cianobacterias son un grupo morfológicamente muy diverso. Atendiendo a la envoltura celular se les considera Gram (-) debido a la presencia de una membrana externa y una capa de peptidoglicano, aunque su pared celular posee también características de las paredes típicamente Gram (+) (López, 2005).

La clasificación más aceptada de las cianobacterias las divide en 5 secciones atendiendo a criterios morfológicos y a como se realice la división celular. Las secciones I y II engloban a las cianobacterias unicelulares que se dividen por fisión simple o gemación (sección I), o por fisión múltiple (sección II). Las secciones III, IV y V engloban a las cianobacterias filamentosas no formadoras de heterocitos (sección III), filamentosas formadoras de heterocitos que se dividen en un solo plano (sección IV) o formadoras de heterocitos que se dividen en más de un plano (sección V) (López, 2005).

Las cianobacterias poseen muchas ventajas sobre otros microorganismos aislados del suelo las cuales se mencionan a continuación:

- Son fotoautótrofos.

- La naturaleza y capacidad de algunas especies para fijar el nitrógeno atmosférico les permite ser los productores a diferencia de los consumidores, haciendo que su crecimiento y mantenimiento sean económicos.
- Habitan diversos ambientes acuáticos, especialmente los contaminados.
- Tienen una distribución mundial.
- Han demostrado ser eficaces en la acumulación y degradación de diferentes tipos de contaminantes, incluidos los plaguicidas (Megharaj *et al.*, 1993), el petróleo crudo (Sokhoh *et al.*, 1992), naftaleno (Cerniglia 1992), fenantreno (Narro *et al.*, 1992), fenol y catecol (Ellis, 1977; Shashirekha *et al.*, 1997) y xenobióticos (Megharaj *et al.*, 1987).
- Han sido utilizadas alrededor del mundo como un método eficiente y de bajo costo para la remediación de aguas residuales mediante la conversión de nutrientes disueltos en biomasa (Lincoln *et al.*, 1996) y de tratamiento biológico (eliminación) de los nutrientes inorgánicos disueltos de las piscifactorías (Duma *et al.*, 1998).
- La capacidad de biodegradación de las cianobacterias puede ser mejorada a través de la ingeniería genética.
- Tienen un mucílago de mayor volumen que el de otros procariontes con alta afinidad de unión (Gupta y Rastogi, 2008).

## 2.10 *Synechocystis* sp.

Es una cianobacteria unicelular cuyas células se pueden encontrar aisladas o aglomeradas, envueltas en mucílago, son de forma esférica o ligeramente ovalada (Fig. 6a y 6b). Con un contenido homogéneo de gránulos en el citoplasma, a veces con un cromatoplasma visible, verde azulado, verde oliva, verde claro o rosado. Su división celular se lleva a cabo por fisión binaria formando dos células hijas morfológicamente iguales, las cuales en las generaciones sucesivas se dividen siempre en dos planos perpendiculares (Sauvageau, 1892).

Se clasifica de la siguiente manera:

Reino Bacteria  
 Phylum Cyanophyceae  
 Orden Chroococcales  
 Familia Merismopediaceae  
 Subfamilia Merismopedioideae  
 Género *Synechocystis*



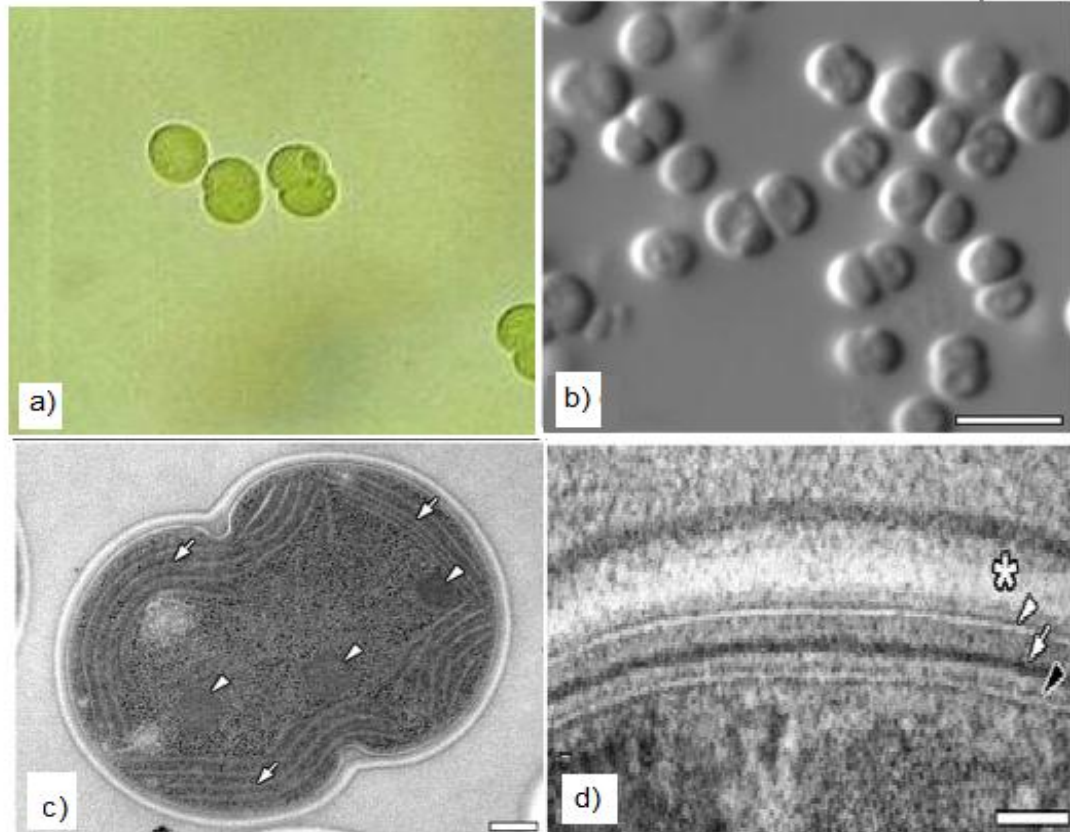


Figura 6. a) Cianobacteria *Synechocystis* sp. (<http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/index.html>). b) Microscopía óptica c) Microscopía electrónica de transmisión a 200 nm las flechas muestran las membranas tilacoidales y las cabezas de flecha los carboxisomas d) a 50 nm el asterisco muestra el glicocalix, la cabeza de flecha la membrana externa, las flechas el péptidoglicano y la cabeza de flecha negra las membrana citoplasmática (Modificado de Mohamed *et al.*, 2005).

Varias especies de *Synechocystis* sp. son planctónicas cuando están presentes en los embalses de agua dulce, en agua salada, otras crecen en los pantanos, en piscinas, en aguas termales y minerales o en los páramos (Komárek, 2003). Es una cianobacteria que no fija nitrógeno, pertenece a la sección I de la clasificación antes mencionada. Fue el primer organismo fotosintético cuyo genoma fue secuenciado en 1996. Se sabe que tiene un cromosoma circular y 4 plásmidos circulares (pSYSA, pSYSG, pSYSM y pSYSX) (Kaneko *et al.*, 1996). Es una cianobacteria de agua dulce, capaz de crecer fototróficamente tanto por la fotosíntesis oxigénica en la luz del sol, como heterotróficamente por la fosforilación oxidativa y la glucólisis durante los períodos de oscuridad. Las transiciones de fases de luz y oscuridad son anticipadas de manera efectiva por un reloj circadiano (López, 2005). Sus pigmentos fotosintéticos son clorofila *a*, ficobilinas,  $\beta$ -caroteno, mixoxantina y zeaxantina. Sus productos de reserva son cianoficina (polímeros de arginina y asparagina) y almidón cianoficeo ( $\alpha$ -4,4- glucano).

La cianobacteria *Synechocystis* sp. tiene unos complejos antena llamados ficobilisomas, formados principalmente por las ficobilinas: C-ficocianina (absorción máxima a 620-630 nm y emisión máxima a 640-650 nm) aloficocianina (absorción máxima a 650 nm y emisión máxima a 650-665 nm) y ficoeritrina (absorción máxima a 500-565 nm y emisión máxima a 585-620 nm).

Por otra parte se ha demostrado que la membrana fotosintética (Fig. 6c) contiene altos niveles de glicerolípidos poliinsaturados, por lo tanto, las temperaturas de transición de fases de estas membranas deben estar muy por debajo de la temperatura ambiente. El contenido de proteína de la membrana fotosintética es considerablemente mayor que en las membranas no fotosintéticas (Omata y Murata, 1983). En su membrana externa (Fig. 6d) contiene equinenona, zeaxantina, mixoxantofila, dos carotenoides glicosilados (Jürgen y Mintele, 1985) y un carotenoide polar synechoxantina (Graham, 2008).

Crece con relativa rapidez y se ha utilizado como un sistema modelo para el estudio de la fotosíntesis durante décadas (Burrows *et al.*, 2008) debido a que en algunos estudios se ha mencionado que contiene un aparato fotosintético completo, incluidos los fotosistemas I y II (PSI y PSII). El funcionamiento del PSII se puede estudiar mediante la prueba OJIP (Fig. 7) la cual provee información acerca de la magnitud de los efectos del estrés sobre la función del PSII y su relación con las reacciones en la cadena transportadora de electrones (Strasser *et al.*, 2000; González *et al.*, 2008).

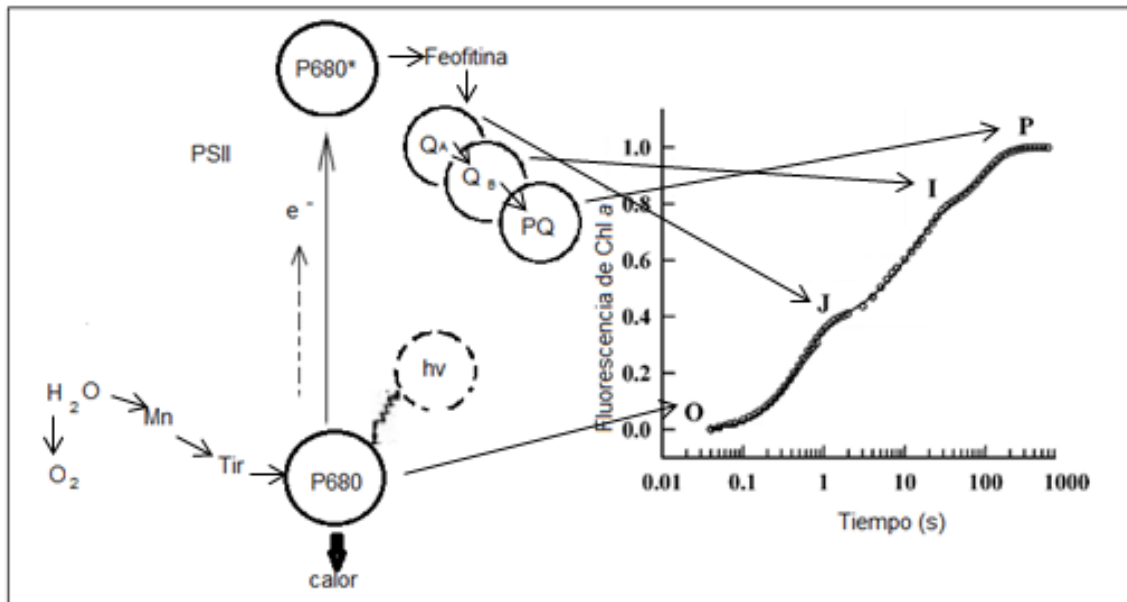


Figura 7. Cinética de emisión de fluorescencia de la clorofila a del fotosistema II en la fase rápida y su relación con las reacciones de la cadena transportadora de electrones (Modificado de González *et al.*, 2008).

## **Proteína ArsH**

La cianobacteria *Synechocystis* sp. posee el Operon *arsBHC* de resistencia a arsénico que codifica, entre otros, para ArsH que es un flavin mononucleótido (FMN), miembro de la familia de reductasas FMN dependiente de NADPH, es una proteína cuya función principal es proporcionar a *Synechocystis* sp. resistencia al arsénico (Hervás *et al.*, 2012), también se han hecho estudios donde se demuestra que actúa como azo reductasa (Ye *et al.*, 2007).

### **3. Hipótesis**

La cianobacteria *Synechocystis* sp. será capaz de biorremover el colorante Rojo Congo a diferentes concentraciones sin afectar su crecimiento ni su metabolismo fotosintético

#### **4. Justificación**

Los colorantes azo utilizados y liberados por la industria textil como el Rojo Congo, son difíciles de degradar, ya que son fisicoquímicamente estables gracias a sus complejas estructuras aromáticas, por lo que ocasionan un grave impacto ambiental. Existen diferentes tipos de procesos físicos y químicos para la remoción de colorantes, pero presentan la desventaja de tener altos costos y de generar nuevos residuos, por lo que en el presente trabajo se propuso determinar el potencial de la cianobacteria *Synechocystis* sp. para la biorremoción del colorante azoico Rojo Congo.

## **5. Objetivos**

### **5.1 Objetivo General**

Evaluar el potencial de *Synechocystis* sp. para biorremover el colorante Rojo Congo a diferentes concentraciones.

### **5.2 Objetivos particulares**

- Analizar el efecto del Rojo Congo sobre el crecimiento de *Synechocystis* sp.
- Caracterizar el efecto del colorante Rojo Congo sobre el metabolismo fotosintético de *Synechocystis* sp.
- Determinar la biorremoción del Rojo Congo utilizando *Synechocystis* sp.

## **6. Protocolo Experimental**

### **6.1 Material biológico**

Se utilizó la cianobacteria *Synechocystis* sp. donada por el Dr. Hugo V. Perales Vela del Laboratorio de Bioquímica de la Unidad de Morfología y Función, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, aislada de la Presa Madín, Atizapán, Estado de México. La cepa ha sido identificada como *Synechocystis* sp. con base en su morfología (Sauvageau, 1892).

### **6.2 Medio de Cultivo**

El mantenimiento de los microorganismos (cultivos semilla), así como los tratamientos experimentales se llevaron a cabo en medio mineral BG11 (Anexo 1) (Rippka, *et al.*, 1979). Las células se mantuvieron en un régimen de cultivo en lote en las siguientes condiciones de crecimiento: temperatura (20-25°C), iluminación (200  $\mu\text{moles/m}^2/\text{s}$ ), fotoperiodo (14h/10h luz/oscuridad), y flujo de aire (1.1 vvm = 1.1 mL aire/mL de medio/min). Se utilizaron como unidades experimentales de cultivo, matraces Erlenmeyer de 500 mL (Kimax Kimble®) con una trayectoria de luz de 7.5 cm y un volumen de trabajo de 400 mL. Para todos los experimentos se utilizaron inóculos sincronizados en la mitad de la fase exponencial, con células de 13 días de edad.

### **6.3 Metodología**

El efecto del Rojo Congo sobre el crecimiento y el metabolismo fotosintético de *Synechocystis* sp. así como la capacidad de biorremoción se estudió de acuerdo con los lineamientos de la Guía 201 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD) para la prueba de sustancias químicas en algas y cianobacterias (OECD, 2004). Las unidades experimentales se inocularon al 5% con un inóculo de 960 mg/L de peso seco ó 2.85 de absorbancia a 750 nm. En las condiciones de cultivo antes mencionadas, las células fueron expuestas a las siguientes concentraciones de Rojo Congo (Sigma ®): 0 (testigo), 5, 10, 15, 20 y 25 mg/L. Con un pH de 9-10. Los cultivos fueron expuestos al colorante por 96 horas, cada 24 horas se tomaron alícuotas y se llevaron a cabo determinaciones de peso seco (PS), absorbancia a 750 nm, contenido de clorofila *a*, actividad fotosintética y la capacidad de biorremoción. Para llevar a cabo el análisis estadístico de los resultados se utilizó el modelo de ANOVA de una vía y la prueba de Tukey utilizando el programa Sigma Plot 12.

### **6.3.1 Etapa 1. Efecto del Rojo Congo sobre el crecimiento de *Synechocystis* sp.**

#### **6.3.1.1 Peso seco**

Se tomaron alícuotas de 5.0 mL de cada tratamiento al inicio (0 h) y al final (96 h) de la cinética y se filtraron al vacío en membranas de nitrocelulosa de 5.0 µm de diámetro de poro (Millipore ®). Previamente, las membranas se llevaron a peso constante manteniéndolas a 70°C por 24 h. Una vez filtradas las muestras, se secaron en horno a 70°C por 24 h, y se determinó el PS de la biomasa.

#### **6.3.1.2 Crecimiento**

El crecimiento se determinó diariamente por determinación de la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm en un espectrofotómetro Genesys 10uv Thermo Electron Corporation ®.

#### **6.3.1.3 Número de células por mililitro**

El número de células se determinó utilizando un citómetro de flujo (Becton Dickinson CK ®). Para hacer la curva de calibración se tomó un alícuota de 15.0 mL de la muestra que presentó mayor crecimiento (0 mg/L) y se centrifugó a 3,500 rpm durante 10 min, se decantó el sobrenadante y la pastilla se aforó a 1.0 mL con medio líquido BG11 posteriormente se tomaron 400 µL de este volumen, se le adicionaron 400 µL de agua destilada y se realizaron diluciones seriadas con un factor de dilución de 5 es decir 1/5, 1/10, 1/15, 1/20, 1/25, 1/30, 1/35, 1/40, 1/45, 1/50 y 1/55. Posteriormente se tomaron 400 µL de cada una de las muestras, se hizo una dilución 1:2 y se realizó el conteo en el citómetro de flujo.

#### **6.3.1.4 Determinación del contenido de clorofila a**

Para determinar el contenido específico de pigmentos fotosintéticos con base en la biomasa seca se tomaron alícuotas de 5 mL de cada tratamiento, se centrifugaron a 3,500 rpm por 10 min a temperatura ambiente y la pastilla se resuspendió en 5 mL de metanol al 90%. La mezcla metanólica se incubó en baño maría durante 10 min a 60°C y posteriormente se refrigeraron por 24 h. Transcurrido este tiempo, las muestras se centrifugaron a 3,500 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Se determinó la absorbancia a 665 y 750 nm de longitud de onda. La concentración de clorofila a se determinó según la técnica de Azov (1982) y bajo la siguiente formula reportada por Talling (1969):

$$\text{Chl } a = 13.9 (A_{665} - A_{750}) U/V$$

Donde

U: volumen de metanol

V: volumen de la muestra



### 6.3.1.5 Determinación de la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) y el tiempo de duplicación celular ( $t_d$ ) de *Synechocystis* sp.

La velocidad de crecimiento ( $\mu$ ), y la tasa de duplicación ( $t_d$ ), se calcularon con base en la absorbancia de cada tratamiento. De acuerdo con la siguiente fórmula:

Velocidad de crecimiento:

$$\mu = \frac{(\ln X_t) - (\ln X_0)}{t}$$

Donde:

$\ln X_t$  = logaritmo natural del crecimiento en el tiempo

$\ln X_0$  = logaritmo natural del crecimiento en el tiempo inicial

t = tiempo en días

Tasa de duplicación:

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

Donde:

$\mu$  = velocidad de crecimiento

### 6.3.2 Etapa 2. Efecto del Rojo Congo sobre el metabolismo fotosintético de *Synechocystis* sp.

#### 6.3.2.1 Determinación de la actividad fotosintética por emisión de fluorescencia.

La emisión polifásica de la fluorescencia de la clorofila *a* en el fotosistema II en muestras acondicionadas a la oscuridad se midió utilizando un fluorómetro portátil marca HANDY-PEA (Hansatech, UK), acoplado a la cámara para fase líquida HPEA/LPA (Hansatech, UK). Se tomaron muestras de 2.0 mL de cada tratamiento y se incubaron a la oscuridad por 10 min a temperatura ambiente (25°C), para después ser irradiadas con una luz roja (660 nm) saturante (3,000  $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}$ ). La emisión de fluorescencia fue registrada por un detector con filtro de corte para emisión a 685 nm. Los valores de la fluorescencia mínima,  $F_0$  a los 50  $\mu\text{s}$ , la fluorescencia máxima,  $F_m$  a los 200 ms y la fluorescencia variable ( $F_v = F_m - F_0$ ) fueron registradas automáticamente por el equipo. La interpretación de los datos se realizó con el programa Handy-PEA desarrollado por la misma Compañía

(Hansatech, U.K.) y el programa Biolizer-HP3, diseñado en el Laboratorio de Bioenergética de la Universidad de Ginebra, Suiza. Los parámetros medidos (Tabla 3) y la interpretación de los mismos se realizaron según el análisis de la prueba de OJIP (van Heerden *et al.*, 2004).

Tabla 3. Parámetros cinéticos de la prueba OJIP

<b>Parámetros técnicos</b>		
Fluorescencia a 50 $\mu$ s	F <sub>o</sub>	
Fluorescencia máxima	F <sub>m</sub>	
Fluorescencia variable	F <sub>v</sub>	= F <sub>M</sub> -F <sub>O</sub>
<b>Productos (o relaciones de flujo)</b>		
Producto cuántico máximo de la fotoquímica primaria	$\phi P_o$	= TR <sub>o</sub> /ABS = (F <sub>M</sub> -F <sub>O</sub> )/F <sub>M</sub>
Producto cuántico máximo para el transporte de electrones en PSII	$\phi E_o$	= $\phi P_o \cdot \Psi_o$ = (TR <sub>o</sub> /ABS)/(ET <sub>o</sub> /TR <sub>o</sub> ) = ET <sub>o</sub> /ABS = (1-F <sub>o</sub> /F <sub>M</sub> )(1-V <sub>j</sub> )
<b>Índices vitales</b>		
Índice de performance	PI <sub>ABS</sub>	= [RC/ABS][ $\phi P_o$ / (1 - $\phi P_o$ ) ][ $\Psi_o$ / (1 - $\Psi_o$ ) ]

(van Heerden *et al.*, 2004).

### 6.3.3 Etapa 3. Determinación de la capacidad de biorremoción del Rojo Congo por *Synechocystis* sp.

#### 6.3.3.1 Capacidad de biorremoción

El estudio de biorremoción se llevó a cabo con cada una de las muestras al inicio de la cinética (0 h) y al término de la misma (96 h), utilizando el espectrofotómetro (Genesys 10uv Thermo Electron Corporation®) midiendo el espectro de absorción del colorante en un intervalo de longitud de onda de 250 nm a 650 nm. Se realizó por separado el espectro de absorción del colorante Rojo Congo en solución acuosa, para determinar la longitud de onda máxima

### **6.3.3.2 HPLC**

Se realizó un estudio de HPLC, el cual se llevó a cabo en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México, para corroborar la biorremoción del colorante, evaluando la concentración de cada una de las muestras al inicio (0h) y al final (96h) de la cinética. El estudio se realizó con una columna C18 Discovery (4.6 mm×250 mm), empleando un detector UV/Vis a 496 nm. La fase móvil que se utilizó fue una mezcla 70:30 de acetonitrilo:agua aplicada con un caudal de 0.75 mL/min. El volumen de inyección de las muestras fue de 100 µL (Acuner y Dilek, 2004). Se evaluó el tiempo de retención para cada concentración de colorante.

### **6.3.3.3 Biosorción**

El control de biosorción se llevó a cabo con células muertas, bajo las siguientes condiciones: Las células se mantuvieron en un régimen de cultivo en lote en las siguientes condiciones de crecimiento: temperatura (20-25°C), iluminación (200 µmoles/m<sup>2</sup>/s), fotoperiodo (14/10 luz/oscuridad), y flujo de aire (1.1 vvm). Se utilizaron como unidades experimentales de cultivo, matraces Erlenmeyer de 500 mL (Kimax Kimble®) con una trayectoria de luz de 7.5 cm y un volumen de trabajo de 400 mL. Para todos los experimentos se utilizaron inóculos sincronizados en la mitad de la fase exponencial, con células de 13 días de edad. A los 13 días las células se esterilizaron en el autoclave, bajo las condiciones de cultivo antes mencionadas, posteriormente las células fueron expuestas a las siguientes concentraciones de Rojo Congo (Sigma ®): 0 (testigo), 5, 10, 15, 20 y 25 mg/L. Los cultivos fueron expuestos al colorante durante 96 h, se tomaron muestras a los 0, 15, 30, 45, 60 y 120 min, posteriormente a las 24, 48, 72 y 96 h, y se midió la absorbancia utilizando un espectrofotómetro Genesys 10uv Thermo Electron Corporation ®, a una longitud de onda de 490-500 nm.

## 7. Resultados

### 7.1 Peso seco

Los datos experimentales (Fig. 8) muestran que la biomasa aumentó en cada uno de los diferentes tratamientos a las 96 h, con respecto a las 0 h, lo que indica que el colorante no afectó la producción de biomasa de la cianobacteria *Synechocystis* sp. en ninguna de las concentraciones de colorante ensayadas. Según la OECD (2004), medir el peso seco es difícil, debido a que es una técnica sumamente sensible a condiciones de laboratorio, lo que podría explicar el por qué a las 0h en los tratamientos de 10 y 15 mg/L los valores son muy altos, comparados con los otros. Es importante mencionar que esta prueba se realizó una sola vez por lo que no se cuenta con la estadística que permita interpretar los datos y explicar el comportamiento, pero nos da una idea de como afecta la presencia del Rojo Congo en la producción de biomasa, por lo que fue necesario llevar a cabo las otras pruebas.

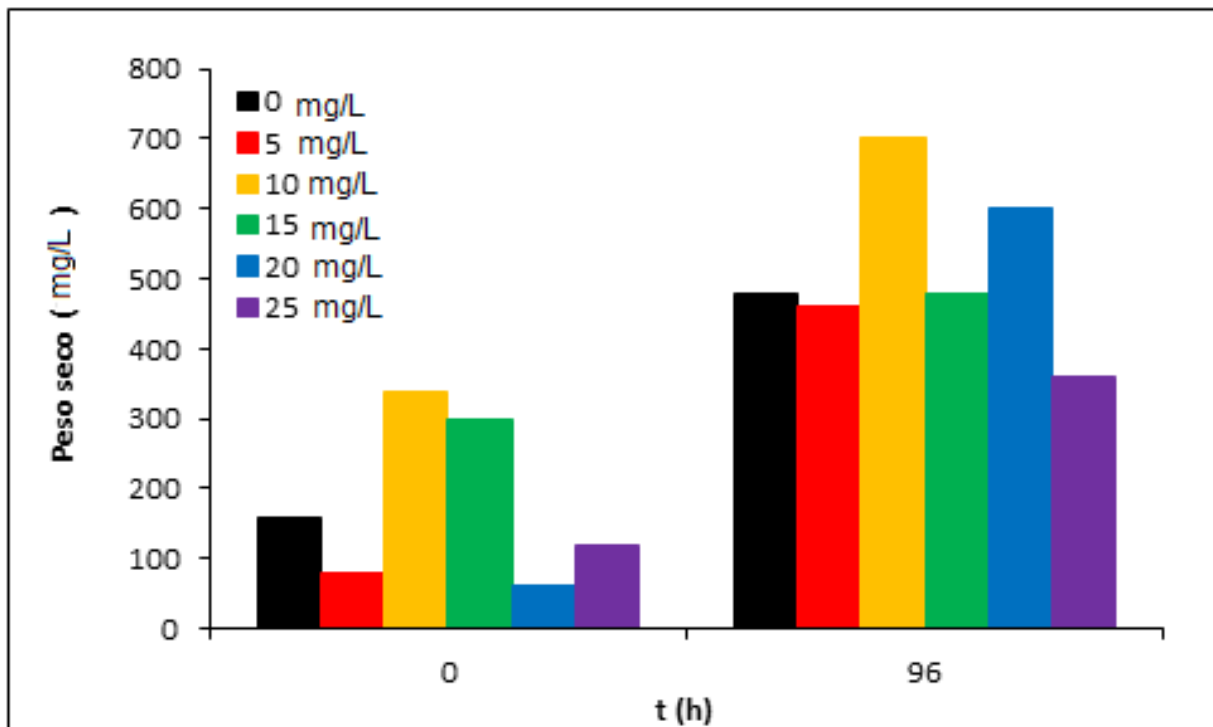


Figura 8. Determinación del peso seco de *Synechocystis* sp. a diferentes concentraciones de Rojo Congo al inicio (0h) y al final (96h) de la cinética. Se tomaron alícuotas de 5.0 mL de cada tratamiento al inicio (0 h) y al final (96 h) de la cinética y se filtraron al vacío en membranas de nitrocelulosa de 5.0  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (Millipore®). Se realizó una sola vez, por lo que no presenta barras de error.

## 7.2 Crecimiento

Como se observa en la figura 9, todos los tratamientos presentan la misma tendencia que el control. El crecimiento a las 96 horas fue de 0.738, 0.675, 0.621, 0.608, 0.627 y 0.698 para las concentraciones de 0, 5, 10, 15, 20 y 25 mg/L, respectivamente. El porcentaje de afectación del crecimiento a las 96 h comparado con el control fue del 8.5, 15.8, 17.6, 15 y 5.4% para las concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 25 mg/L, respectivamente, por lo tanto se puede decir que el crecimiento de *Synechocystis* sp. no se vió afectado por la presencia del colorante Rojo Congo.

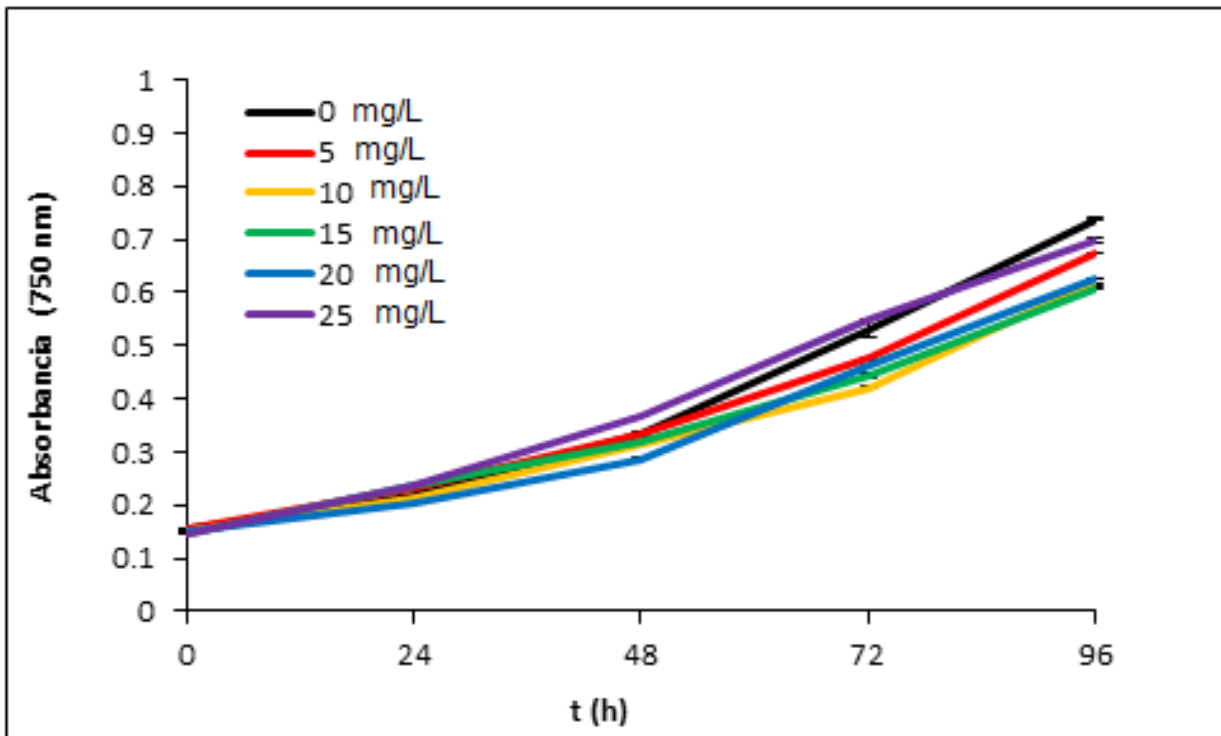


Figura 9. Determinación del crecimiento de *Synechocystis* sp. a diferentes concentraciones de Rojo Congo. El crecimiento se determinó por triplicado midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm en un espectrofotómetro Genesys 10uv Thermo Electron Corporation ®.

### 7.3 Número de células por mililitro

En la figura 10 se observa que el número de células por mililitro se encuentra similar en cada uno de los tratamientos. El número de células presentes a las 96 horas fue de  $2.2 \times 10^5$ ,  $2.1 \times 10^5$ ,  $2.0 \times 10^5$ ,  $1.9 \times 10^5$ ,  $2.0 \times 10^5$  y  $2.3 \times 10^5$  para las concentraciones de 0, 5, 10, 15, 20 y 25 mg/L respectivamente. El porcentaje de afectación en el número de células expuestas al colorante a las 96 h, comparado con el control, fue del 2, 9.3, 12.11, 8.17, 5.7% para las concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 25 mg/L, respectivamente, por lo que se puede decir que no hubo afectación.

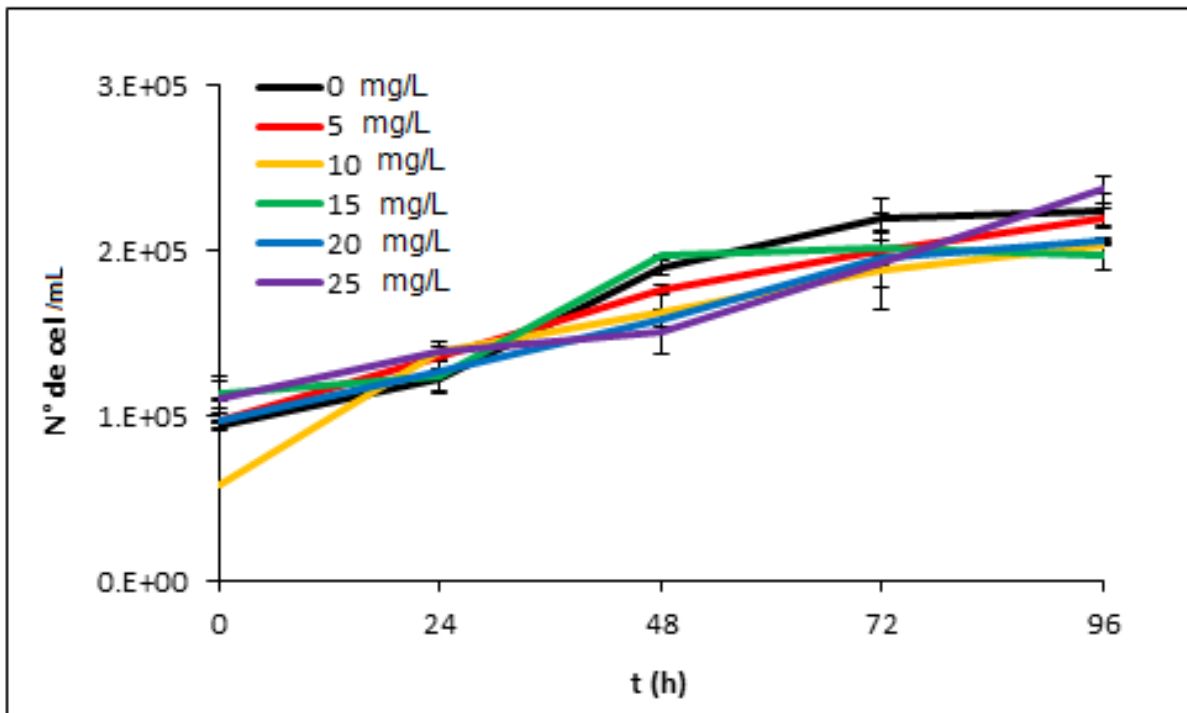


Figura 10. Determinación del número de células por mililitro de *Synechocystis* sp. a diferentes concentraciones de Rojo Congo. El número de células se determinó por triplicado utilizando un citómetro de flujo (Becton Dickinson CK®).

#### 7.4 Determinación de clorofila a

En la figura 11 se observa que el contenido de clorofila a no se vio afectado por la presencia del colorante en ninguno de los tratamientos a las 96 h de la cinética. También se observa que el contenido de clorofila a incrementó en un 40, 46, 38, 29 y 45 % con respecto al control para las concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 25 mg/L, respectivamente. Por ello, se puede decir que el colorante no afectó el contenido de pigmentos fotosintéticos de la cianobacteria *Synechocystis* sp.

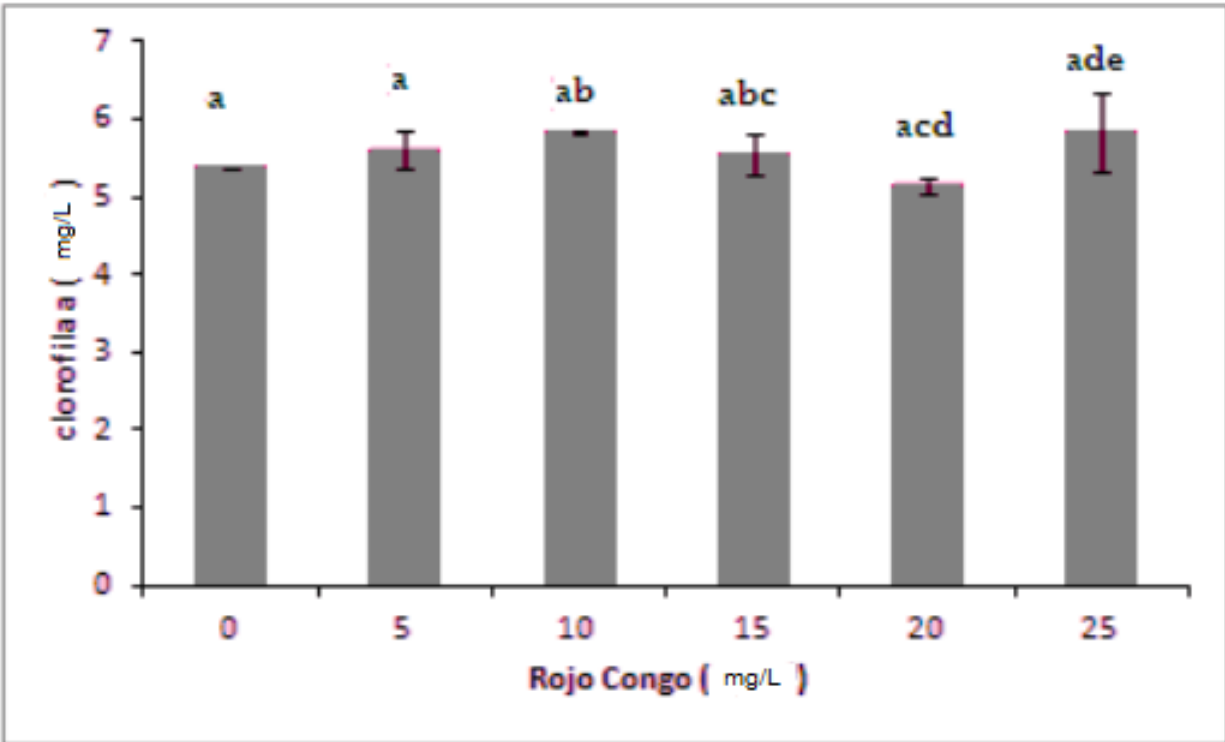


Figura 11. Efecto del Rojo Congo sobre el contenido de clorofila a de *Synechocystis* sp. a diferentes concentraciones a las 96 h. Se determinó por triplicado el contenido específico de pigmentos fotosintéticos con base en la biomasa seca, se midió la absorbancia a 665 y 750 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro Genesys 10uv Thermo Electron Corporation ® y la concentración de clorofila a se determinó según la técnica de Azov (1982) y utilizando la formula reportada por Talling (1969).

### 7.5 Determinación de la velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) y el tiempo de duplicación celular ( $t_d$ ) de *Synechocystis* sp. a diferentes concentraciones de Rojo Congo

La velocidad de crecimiento de las diferentes tratamientos durante esta cinética fue en promedio de 0.0125/d en un intervalo de entre 0.0115 y 0.0145/d y el tiempo de duplicación fue en promedio de 55.5485 en un intervalo de entre 47.6148 y 60.1534

### 7.6 Actividad fotosintética por emisión de fluorescencia

En la figura 12 se observa el efecto de la concentración del rojo Congo sobre la cinética polifásica (OJIP) de los diferentes tratamientos y de la muestra control, cuando se gráfica el tiempo en forma logarítmica. La letra "O" encima de la gráfica corresponde al valor mínimo de la fluorescencia ( $F_o$ ), momento en el cual todos los centros de reacción están oxidados, la letra "J" corresponde a la reducción parcial de  $Q_A$ , la letra "I" está relacionada con la reducción parcial de  $Q_A$  y  $Q_B$  y la letra "P" corresponde al valor máximo de la fluorescencia ( $F_m$ ), momento en el que todos los centros de reacción están reducidos. De manera general en la figura 13 se aprecia que la fluorescencia mínima "O" y la fluorescencia máxima "P" se incrementan significativamente, respecto al control (0 mg/L), en todos los tratamientos esto indica que el colorante no inhibe ni afecta la actividad fotosintética de *Synechocystis* sp.

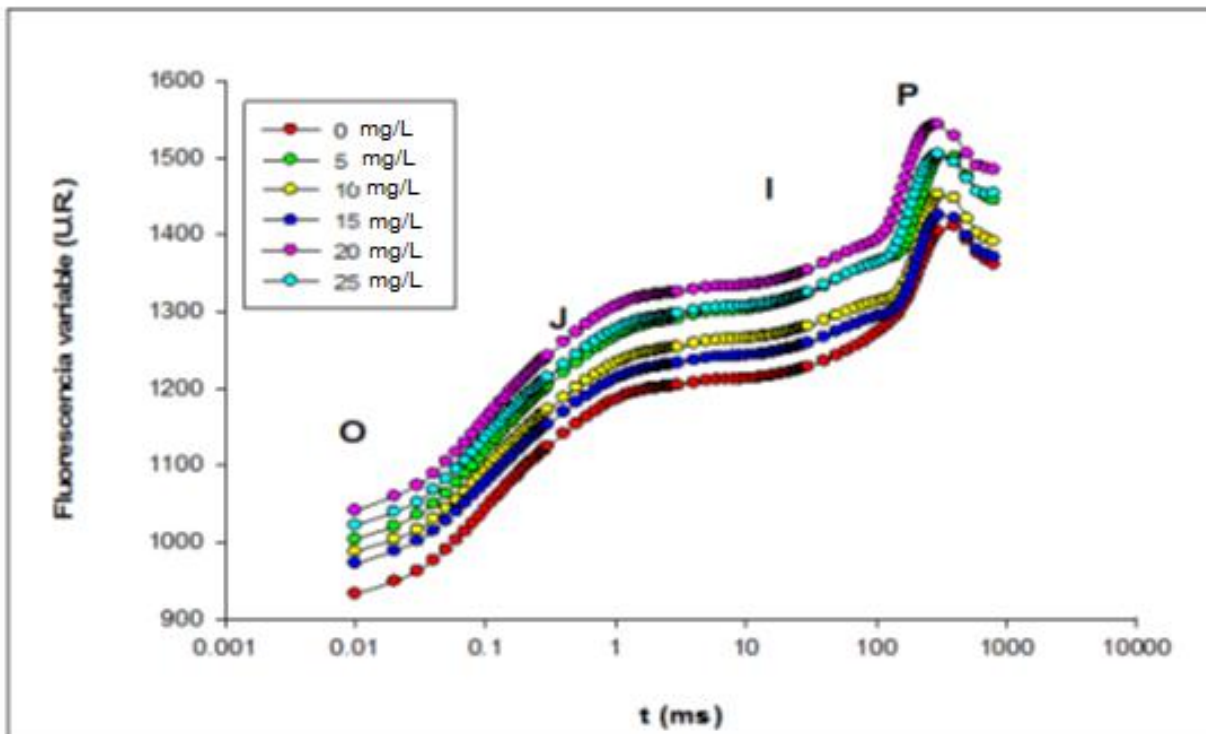


Figura 12. Efecto de la concentración del Rojo Congo sobre la emisión de fluorescencia de la clorofila a del PSII de *Synechocystis* sp.



Con el propósito de examinar la dinámica de reducción de la  $Q_A$ , se graficaron los valores de la fluorescencia variable en el tiempo de inducción según la siguiente fórmula:  $V_t = (F_t - F_o) / (F_m - F_o)$ . La figura 13 muestra que la dinámica de reducción de la  $Q_A$  es similar entre la muestra control y las experimentales, ya que no se presenta ningún cambio entre las inflexiones O y J que corresponden a la fase de separación de carga, dicha fase también se conoce como la fase luminosa del lado donador del PSII. Esta fase comprende el movimiento de electrones desde el complejo liberador de oxígeno, pasando por el centro de reacción del PSII, la feofitina, hasta la quinona A ( $CLO-P_{680}-Feo-Q_A$ ).

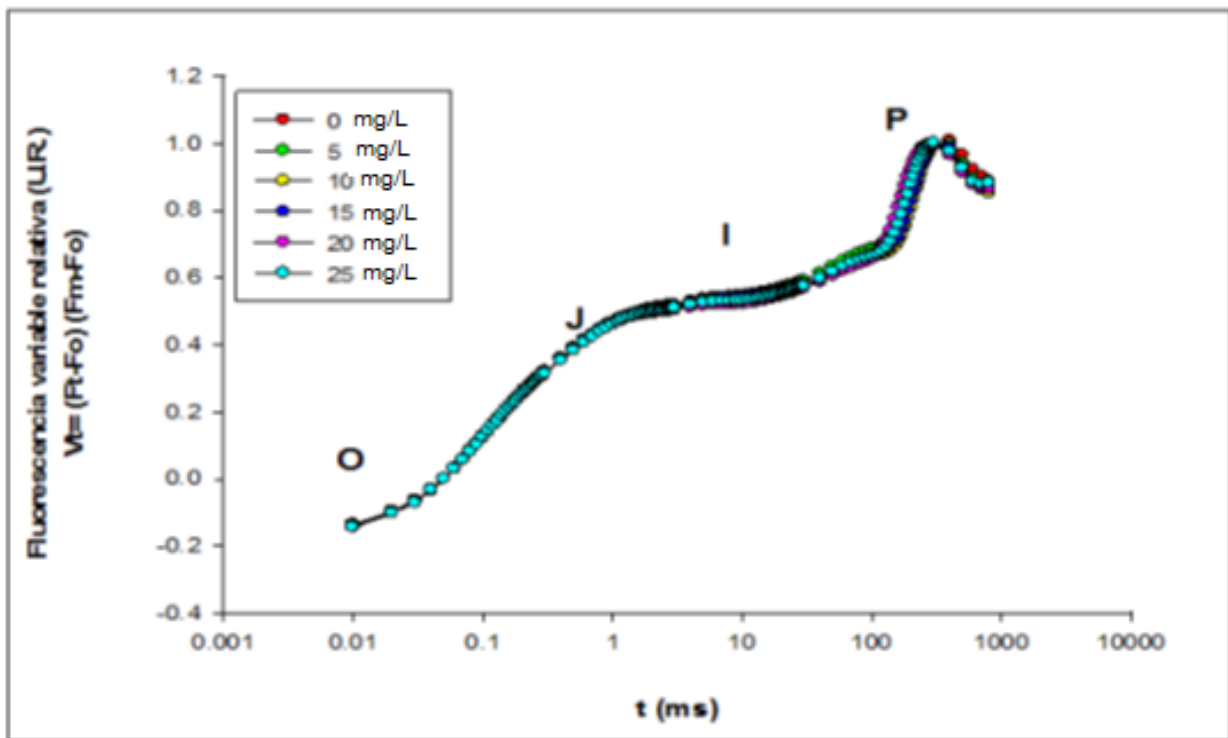


Figura 13. Fluorescencia variable relativa de *Synechocystis* sp. a diferentes concentraciones de Rojo Congo.

Los resultados de la prueba OJIP se muestran en la Tabla 4, donde se puede observar el efecto del colorante Rojo Congo sobre el fotosistema II a diferentes concentraciones con respecto al control. La fase rápida (OJIP) refleja el estado de la  $Q_A$ , la  $Q_B$  y la PQ, de esta forma se pueden obtener diferentes parámetros. El parámetro  $F_v/F_m$  nos permite evaluar el rendimiento cuántico máximo para la fotoquímica primaria, es decir cuando todos los centros de reacción del PSII están oxidados, el valor de  $F_v/F_m$  varió en un 6 % aproximadamente, por lo que se puede decir que la presencia del colorante no afecta los centros de reacción en ninguno de los tratamientos debido a que estos permanecen oxidados. El parámetro  $\phi E_o$  nos permite conocer la probabilidad de que un fotón absorbido

mueva un electrón en la cadena transportadora de electrones o bien conocer el rendimiento cuántico de transporte de electrones, comparándolo con el control disminuye en un 6%.

El parámetro Fo (fluorescencia mínima) representa la emisión de las moléculas de clorofila *a* en la antena del PSII. El valor de Fo se observa cuando el primer aceptor de electrones QA se encuentra completamente oxidado. Este valor varía en un 19% aproximadamente con respecto al control. La fluorescencia máxima (Fm) se obtiene con intensidad lumínica continua y el aceptor de electrones QA se encuentra completamente reducido. La Fm de los diferentes tratamientos varía en un 22% con respecto al control. La fluorescencia variable (Fv) está relacionada con la máxima capacidad de desactivación fotoquímica, es decir cualquier proceso que produzca una disminución en la intensidad de la fluorescencia emitida. La Fv varía en un 25% con respecto al control y finalmente el índice de rendimiento (performance Index PI) indica la vitalidad de la cianobacteria ya que combina criterios estructurales y funcionales del PSII. En la tabla se puede apreciar que éste índice varía en un 8% aproximadamente con respecto al control

Tabla 4. Parámetros cinéticos de la fase rápida para cada una de las muestras a diferentes concentraciones de Rojo Congo.

<b>Rojo Congo (mg/L)</b>	<b>Fo</b>	<b>Fm</b>	<b>Fv=Fm-Fo</b>	<b>Fv/Fm</b>	<b>φEo</b>	<b>PI</b>
<b>0</b>	237.69 SD 3.247	351.66 SD 4.789	113.97 SD 1.699	0.32 SD 0.002	0.15 SD 0.001	0.55 SD 0.004
<b>5</b>	182.35 SD 1.613	267.47 SD 2.940	85.12 SD 1.476	0.32 SD 0.002	0.14 SD 0.001	0.53 SD 0.007
<b>10</b>	172.53 SD 0.852	249.01 SD 1.276	76.49 SD 0.464	0.31 SD 0.001	0.14 SD 0.002	0.49 SD 0.009
<b>15</b>	179.05 SD 2.609	257.35 SD 3.552	78.31 SD 0.971	0.30 SD 0.001	0.14 SD 0.001	0.48 SD 0.005
<b>20</b>	206.33 SD 3.803	299.36 SD 5.685	93.03 SD 1.999	0.31 SD 0.002	0.14 SD 0.002	0.52 SD 0.016
<b>25</b>	179.21 SD 1.142	258.24 SD 1.700	79.03 SD 0.584	0.31 SD 0.001	0.14 SD 0.001	0.49 SD 0.004

Nota: (SD) desviación estándar; (Fo) Fluorescencia mínima; (Fm) Fluorescencia máxima; (Fv) Fluorescencia variable; (Fv/Fm) rendimiento cuántico máximo; (φEo) rendimiento cuántico; (PI) Índice de rendimiento.

## 7.7 Capacidad de biorremoción

En el espectro de absorción del rojo congo obtenido en este trabajo (Fig. 14) se pueden apreciar dos picos del colorante, uno a 340 nm y el pico más alto a una longitud de onda máxima de 494 nm.

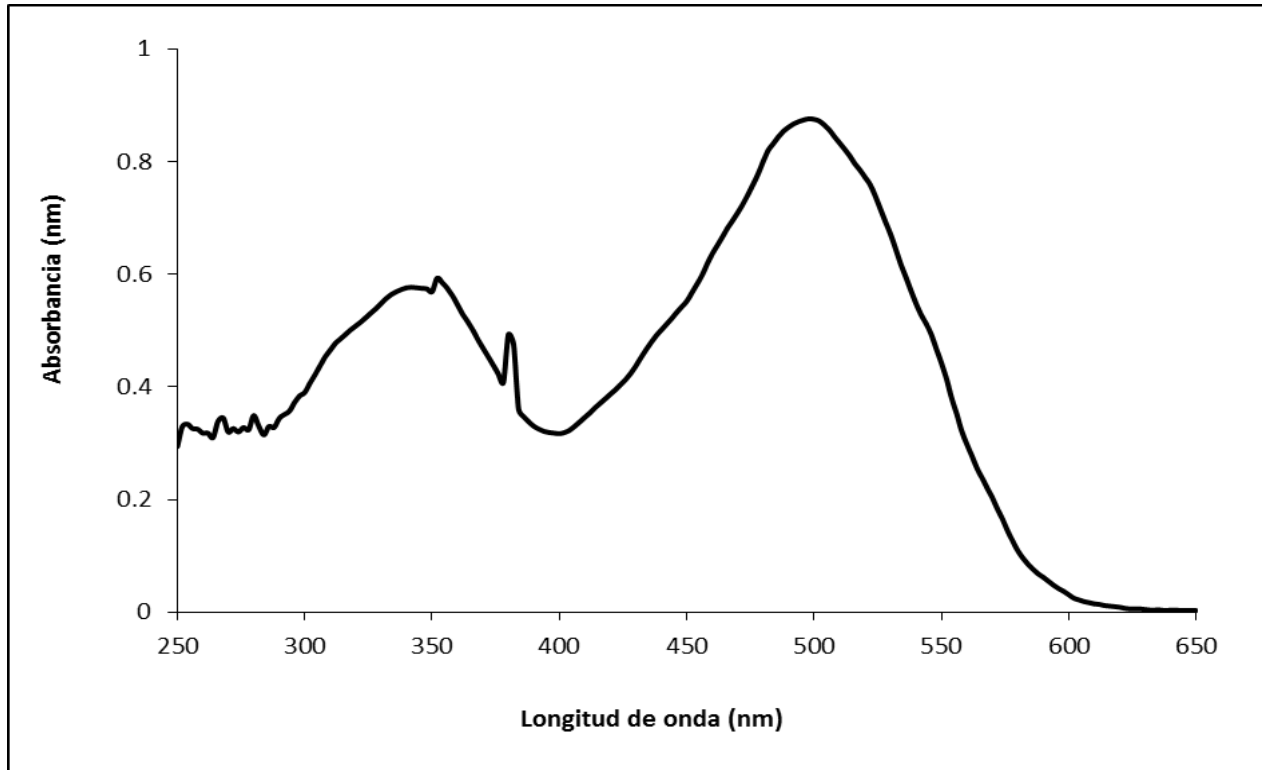


Figura 14. Espectro de absorción del colorante Rojo Congo en solución acuosa. Se utilizó el espectrofotómetro (Genesys 10uv Thermo Electron Corporation®) para medir el espectro de absorción del colorante en un intervalo de longitud de onda de 250 nm a 650 nm.

La longitud de onda máxima teórica del Rojo Congo es de 498 nm (Steensma, 2001) aunque en diferentes estudios realizados con el colorante Rojo Congo las longitudes de onda máxima reportadas son 490 nm (Sladewski, *et al.*, 2006), 497 nm (Benditt, *et al.*, 1970), y para este caso fue de 494 nm, esto puede deberse a que se utilizan diferentes espectrofotómetros en los diferentes estudios, por lo que los valores no son iguales, pero se puede decir que la longitud de onda máxima para el Rojo Congo ocurre entre 490 y 500 nm.

En la figura 15 se pueden observar los espectros de absorción del colorante Rojo Congo en los diferentes tratamientos de la cinética de biorremoción al inicio (0 h) y al final (96 h) obtenidos en este estudio. El espectro de absorción del Rojo Congo en la región visible muestra un pico de máxima longitud a los 494 nm. Este pico, a las 96 h, desaparece por completo con respecto al pico de las 0 h en las concentraciones de 5, 10 y 15 mg/L lo cual indica que el colorante está siendo

bioremovido por *Synechocystis* sp. así mismo se puede apreciar que el pico en las concentraciones de 20 y 25 mg/L decrece en un 96% con respecto al pico de las 0 h.

Además se puede observar que los picos a la longitud de onda de 310 nm disminuyen en un 50.6, 38.7, 33.6, 34.8 y 33.6% en las concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 25 mg/L, respectivamente.

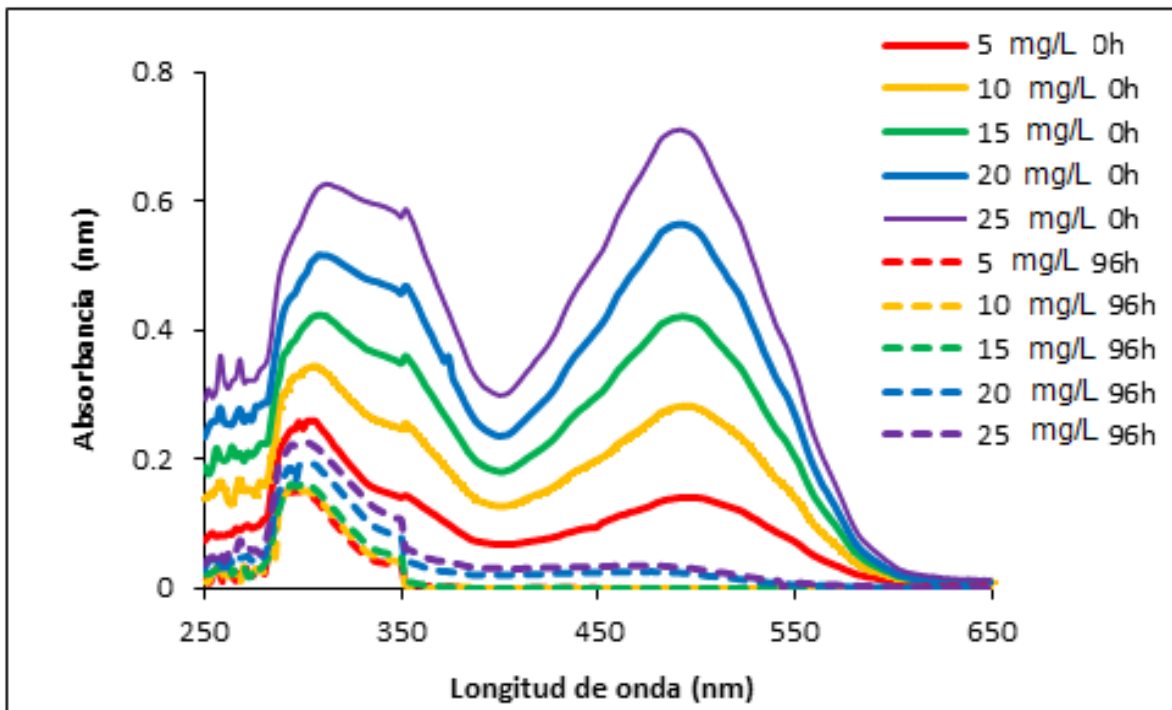


Figura 15. Espectro de absorción del colorante Rojo Congo a diferentes concentraciones, al inicio (0 h) y al final (96 h) de la cinética. Se utilizó el espectrofotómetro (Genesys 10uv Thermo Electron Corporation®) para medir el espectro de absorción del colorante en un intervalo de longitud de onda de 250 nm a 650 nm.

En la Tabla 5 se puede observar el porcentaje de biorremoción del colorante Rojo Congo por *Synechocystis* sp. Para cada una de las muestras se aprecia que la remoción fue del 100% para las concentraciones de 5, 10 y 15 mg/L y para la concentraciones de 20 y 25 mg/L se tuvo una biorremoción del 96% aproximadamente.

Tabla 5. Porcentaje de biorremoción del colorante Rojo Congo por *Synechocystis* sp. a las 96 horas.

<b>Rojo Congo (mg/L)</b>	<b>(%) Biorremoción</b>
5	100
10	100
15	100
20	95.90
25	95.61

## 7.8HPLC

En el anexo 2 se pueden observar los cromatogramas correspondientes para las diferentes concentraciones de Rojo Congo empleadas al inicio y al final de la cinética. Con los tiempos de retención se identificaron las áreas (Tabla 6) y se calculó el porcentaje de remoción.

Tabla 6. Áreas obtenidas de los cromatogramas de los diferentes tratamientos.

<b>Rojo Congo (mg/L)</b>	<b>Área inicial</b>	<b>Área final</b>	<b>(%) Biorremoción</b>
<b>5</b>	Nd	nd	nd
<b>10</b>	75.2	0	100
<b>15</b>	158	0	100
<b>20</b>	239.5	0	100
<b>25</b>	407.5	0	100

(ver Anexo 2) nd =no detectable

## 7.9 Biosorción del Rojo Congo con células muertas

En la figura 16 se puede observar que la absorbancia en cada uno de los diferentes tratamientos disminuye a lo largo de la cinética. El porcentaje de retención fue del 25, 23, 29, 35 y 58%, respectivamente, para las concentraciones de 5, 10, 15, 20 y 25 mg/L. Como se puede observar a mayor concentración de colorante menor absorbancia y por lo tanto mayor porcentaje de biosorción.

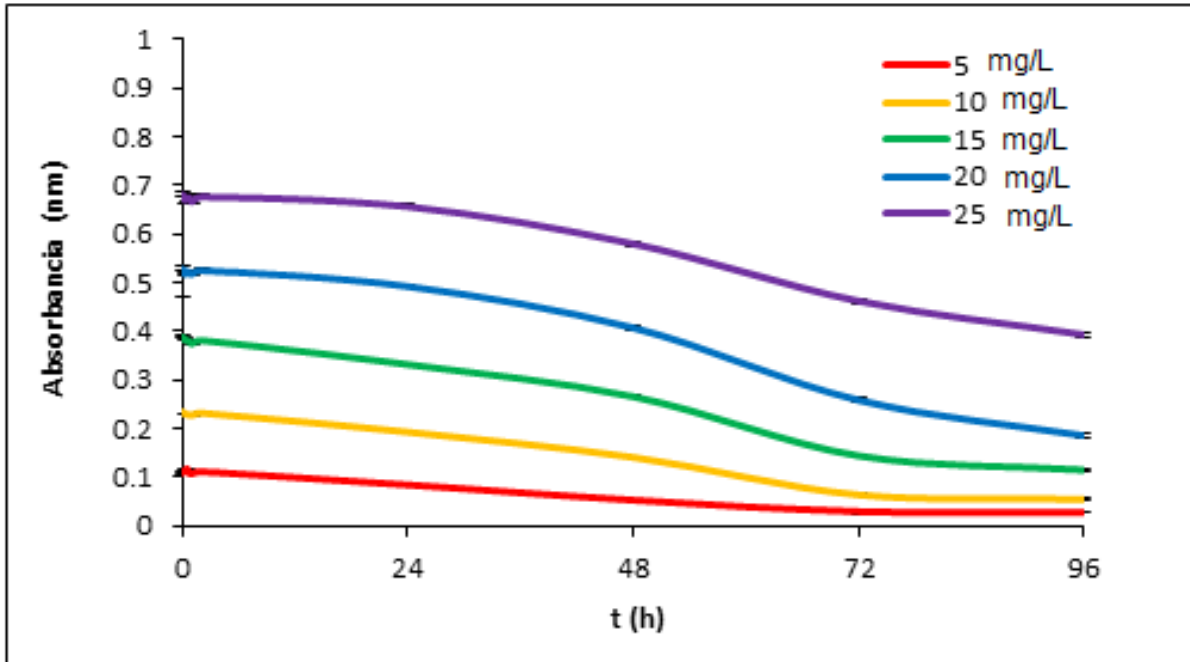


Figura 16. Estudio de biosorción del Rojo Congo. Se utilizó el espectrofotómetro (Genesys 10uv Thermo Electron Corporation®) para medir el espectro de absorción del colorante en un intervalo de longitud de onda de 250 nm a 650 nm.

## 8. Discusión

En este estudio se decidió utilizar a la cianobacteria *Synechocystis* sp. debido a que no existe información con respecto a su capacidad para biorremover el colorante Rojo Congo. Para llevar a cabo este estudio se evaluó el efecto del colorante sobre el crecimiento y metabolismo de *Synechocystis* sp.

El crecimiento, el peso seco, el número de células y la determinación de clorofila *a* no se vieron afectados por la presencia del colorante. Se cree que esto puede deberse a que *Synechocystis* sp. llevó a cabo una biotransformación del colorante, sin embargo, en este estudio no se llevaron a cabo pruebas para comprobarlo.

Por otro lado el colorante puede actuar como filtro para la radiación lumínica. Walstad, (2003) menciona que cuando *Synechocystis* sp. crece en luz verde, produce pigmentos fotosintéticos no clorofílicos en una proporción de 2:2:1 para rojo, azul y azul-gris, respectivamente. Cuando la misma microalga crece con luz roja, produce muchos menos pigmentos rojos, y la proporción de pigmentos cambia a 0.4:2:1. Por lo tanto el crecimiento (Fig. 9) no se ve afectado debido a que *Synechocystis* sp. presenta adaptación cromática.

La actividad fotosintética de *Synechocystis* sp. (Fig. 12) la cual es muy parecida a la de las plantas superiores, no se vio afectada por el colorante, esto se pudo estudiar gracias a la prueba OJIP (Strasser *et al.*, 2000). La curva de inducción de fluorescencia, muestra una fase de incremento rápido de fluorescencia en el primer segundo de iluminación seguida de una fase lenta de declive de la fluorescencia durante varios minutos (González *et al.*, 2008). La “fase rápida” OJIP, está relacionada principalmente con eventos primarios del PSII.

Como se mencionó anteriormente, la cinética de emisión de fluorescencia de la clorofila *a* del fotosistema II en la fase rápida provee información acerca de la magnitud de los efectos del estrés sobre la función del PSII y su relación con las reacciones en la cadena transportadora de electrones. La fluorescencia mínima  $F_0$  se observa cuando el primer aceptor de electrones  $Q_A$  se encuentra completamente oxidado. La fluorescencia máxima ( $F_m$ ) se obtiene cuando la intensidad lumínica satura a la cianobacteria y el aceptor de electrones  $Q_A$  se encuentra completamente reducido. La fluorescencia variable ( $F_v$ ) está relacionada con la máxima capacidad de desactivación fotoquímica. Es decir cualquier proceso que produzca una disminución en la intensidad de la fluorescencia emitida.

El parámetro  $F_v/F_m$  que se muestra en la Tabla 4 nos permite evaluar el rendimiento cuántico máximo para la fotoquímica primaria, es decir cuando todos los centros de reacción del PSII están oxidados. El parámetro  $\phi E_0$  (Tabla 4) nos permite conocer la probabilidad de que un fotón absorbido mueva un electrón en la cadena transportadora de electrones o bien conocer el rendimiento cuántico de transporte de electrones. El índice de rendimiento (PI) indica la vitalidad de la cianobacteria ya que combina criterios estructurales y funcionales del PSII, es

decir nos muestra el funcionamiento desde la aceptación de la energía, la transferencia de electrones y la liberación de los electrones que se utilizarán en el ciclo de Calvin.

La fotosíntesis se lleva a cabo en la membrana de los tilacoides, mientras que la respiración se lleva a cabo en las membranas tilacoidal y citoplásmica (Gantt, 1994). *Synechocystis* sp. utiliza diferentes componentes redox en los tilacoides para la fotosíntesis y la respiración, como la plastoquinona (PQ), el complejo citocromo *b<sub>6</sub>f* y los acarreadores electrónicos como la plastocianina y el citocromo C6. Por lo tanto se puede decir que *Synechocystis* sp. utiliza los mismos componentes para llevar a cabo dos rutas metabólicas opuestas simultáneamente, por lo tanto la inflexión O y la inflexión J, sí se presentan, porque estos componentes no participan en la respiración, en cambio la inflexión I, que corresponde a Q<sub>B</sub>, no se presenta, debido a que Q<sub>B</sub> participa en el flujo de electrones de las dos rutas (fotosíntesis y respiración) por lo que se puede ver afectada la reducción de Q<sub>B</sub> (Vermaas, 2001).

En un estudio realizado por Karacakaya *et al.* (2009) *Synechocystis* sp. fue capaz de remover los colorantes rojo reactivo, azul remazol y negro reactivo B con una concentración de 25 mg/L cada uno, en un 29.9, 0 y 9.7%, respectivamente, sin embargo aún no se conoce el mecanismo por el cual remueve el colorante, es decir, no se sabe si la cianobacteria lo biodegrada, lo biotransforma o simplemente lo almacena dentro de la célula. En un estudio realizado por Telke *et al.* (2010) se evaluó la capacidad de remoción de *Pseudomonas* sp. SU-EBT con un porcentaje del 90 al 97% gracias a la actividad de la Lacasa y al final del tratamiento se observaron tres picos nuevos en el cromatograma por lo que se caracterizaron 3 diferentes metabolitos menos tóxicos que las aminas aromáticas como la p-dihidroxibifenilo, el ácido 8-amino naftol 3-sulfónico y el 3-hidroperoxi-8-nitronaftol. Con los datos obtenidos del HPLC se puede observar que el porcentaje de remoción fue del 100% (Tabla 6 y el Anexo 2) y como no se observa la presencia de ningún otro pico al final de la cinética, se puede decir que no hay producción de metabolitos nuevos.

La remoción del color puede deberse a que la enzima ArsH pudo haber roto uno de los dobles enlaces del grupo Azo (-N=N-) con lo que se interrumpe la conjugación y por lo tanto desaparece el color. Sin embargo es recomendable realizar más estudios para caracterizar los productos finales, ya que no se sabe exactamente si es el mismo compuesto sin el doble enlace o si *Synechocystis* sp. lo transformó en otro compuesto diferente. De acuerdo con la literatura previa, la desaparición del color en los experimentos se debe principalmente a la ausencia del grupo cromóforo. Esta ausencia del grupo cromóforo se debe a la ruptura del grupo azo que es característico en estos colorantes, debido a la acción de diferentes enzimas (Jinqi y Houtian, 1991).

Existen diferentes enzimas como la lignina peroxidasa, la manganeso peroxidasa, la azo reductasa y la lacasa, las cuales se cree juegan un papel importante para la degradación de colorantes azoicos (Kalyani *et al.*, 2011). Sin embargo según



Palanisami y Saha (2010) no existen reportes de la actividad ligninolítica de la lacasa o de las peroxidasa en cianobacterias filamentosas no fijadoras de nitrógeno. Como no existen reportes sobre la actividad enzimática de *Synechocystis* sp., se realizó una investigación bibliográfica en su genoma (Kaneko *et al.*, 1996, Cyanobase) para ver la existencia de los genes que codifican para alguna de estas enzimas y se encontró la presencia del gen *arsH* (ORF slr0945), que codifica para ArsH, por lo tanto de acuerdo con la literatura revisada, se podría suponer que la biorremoción del colorante Rojo Congo se estaría llevando a cabo por la enzima arsénico reductasa.

El operon *ars* en *Synechocystis* sp. está constituido por tres genes: *arsB*, *arsH*, y *arsC*, de aproximadamente 2,700 nucleótidos. En un estudio realizado por López-Maury, *et al.*, (2003) se demostró que las proteínas ArsB y ArsC participan en la resistencia al arsénico, mientras que la proteína ArsH no es requerida. Se sabe que la proteína ArsH es una proteína de la membrana (Vorontsov *et al.*, 2007), y al parecer no existe información con respecto a su función, ni a las rutas donde participa, ni a su sustrato, ni a su producto, ni a sus cofactores, etc. no obstante, gracias a los datos experimentales obtenidos en este trabajo se puede suponer que sí tiene actividad, ya que se logró remover el colorante sin que éste afectara el crecimiento, ni el metabolismo de *Synechocystis* sp., aunque se recomienda llevar a cabo las pruebas correspondientes para verificar si la enzima ArsH tiene actividad azo reductasa.

En un estudio (Bhattacharya *et al.*, 2011), se evaluó la capacidad de remoción del Rojo Congo por diferentes hongos filamentosos como son *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. oryzae*, *Penicillium chrysogenum*, *Cladosporium rubrum* y *Pleurotus ostreatus*. Este estudio se llevó a cabo, con y sin agitación bajo diferentes condiciones de temperatura y pH, y se determinó que a 30°C el porcentaje de remoción aumentó de un 55.34% a un 79.58% y con agitación aumentó de un 38.17% a un 98.85%. Con respecto al pH se determinó que el pH neutro fue el óptimo para remover el colorante. Cada microorganismo así como cada enzima tiene un pH óptimo, por lo que se recomienda realizar otros estudios variando el pH, así como la temperatura para determinar las condiciones óptimas de biorremoción.

En el estudio de biosorción (Fig. 16) la cianobacteria *Synechocystis* sp. fue capaz de adsorber el colorante en su pared celular, gracias a los grupos funcionales de la misma. De acuerdo con los resultados obtenidos, se observa que el porcentaje de retención se fue incrementando conforme aumentaba la concentración del colorante. Ergene, *et al.* (2009) mencionan en su estudio de biosorción con la microalga *Scenedesmus quadricauda* que la pared celular de las microalgas contiene diferentes grupos funcionales como los grupos amino, carboxilo, hidroxilo, fosfato y otros grupos con carga, con los cuales los colorantes se unen. La pared celular de la cianobacteria *Synechocystis* sp. contiene azúcares neutros como glucosa, manosa, galactosa y fructosa en un 33.8%, amino azúcares como ManN y GalN, que forman parte del complejo peptidoglicano/polisacárido de la pared celular, proteínas en un 12.2% y ácidos grasos en un 4.1% (Jürgens y

Weckesser, 1986). Por lo tanto se podría decir que el colorante se une a los diferentes grupos funcionales de la pared celular de *Synechocystis* sp.

La temperatura a la cual se someten las células en el autoclave, rompe la pared celular, lo que da como resultado nuevos sitios de unión con el colorante. Por otro lado se sabe que el pH afecta la capacidad de biosorción del colorante; el Rojo Congo en solución acuosa presenta carga negativa gracias a los grupos sulfonatos (Binupriya *et al.*, 2007), pero si el pH disminuye por debajo de 5.5, presenta carga positiva (Purkait *et al.*, 2007). En este caso, el medio BG11, presentó un pH de 6.7, por lo tanto la carga del colorante es negativa y la carga de los componentes de la pared también es negativa, ya que existe una desprotonación de los grupos carboxilos, fosfatos, hidroxilos o de otros grupos funcionales (Yee *et al.*, 2002), por lo que el porcentaje de retención es bajo.

Según un estudio realizado por Gupta (2000), existe una diferencia significativa para los sitios de unión entre bacterias Gram negativas y Gram positivas, siendo mejor las Gram positivas, esto es debido a que la pared celular de las Gram positivas consiste en una matriz amorfa de cadenas de peptidoglicano y ácido teicoico. Los peptidoglicanos contienen carboxilatos y el ácido teicoico contiene fosfatos y según un estudio de Doyle (1989) los sitios catiónicos de unión se encuentran concentrados en la cara exterior de la pared celular. Como se mencionó anteriormente, las cianobacterias presentan en su pared características de las bacterias Gram negativas y Gram positivas, por lo que sería necesario continuar con otros estudios a diferentes valores de pH para determinar si la capacidad de biosorción se ve aumentada, debido a que por un lado, cada grupo funcional de la pared celular cambia a diferentes valores de pH, y por otro lado, dado que se cree que con un pH menor a 5.5 o bien a un pH ácido el aumento de iones  $H^+$  se unirían a la pared reduciendo así los sitios disponibles de unión (Guibal y Roulph, 1991).

La capa de peptidoglicanos en las bacterias Gram negativas no se encuentra expuesta, sino recubierta por una membrana celular externa. La cual está formada por lipopolisacáridos, fosfolípidos y proteínas, con lo cual Gourdon *et al.* (1990) observaron que las glicoproteínas presentes en el lado externo de la pared de las Gram positivas tienen mayor potencial de sitios de unión que los fosfolípidos y lipopolisacáridos de las Gram negativas. La cianobacteria *Synechocystis* sp. presenta características de las Gram negativas (membrana externa compuesta por lipopolisacáridos, lípidos, proteínas y carotenoides), así como de las Gram positivas (gruesa capa de peptidoglicano con polisacáridos unidos covalentemente) (Jürgens y Weckesser, 1986), por lo que eso puede afectar de manera positiva la biosorción, ya que el colorante se puede unir a los polisacáridos.

## 9. Conclusiones

- La cianobacteria *Synechocystis* sp. logró eliminar completamente el color del medio de cultivo sin embargo, la remoción del colorante fue parcial.
- La biosorción resultó ser directamente proporcional a la concentración del colorante en el medio de cultivo.
- Las concentraciones de Rojo Congo estudiadas no afectaron el metabolismo fotosintético ni el crecimiento de *Synechocystis* sp.
- En la prueba OJIP se pudo observar que el comportamiento de la cinética de fluorescencia de *Synechocystis* sp. fue diferente al de las microalgas y plantas superiores, debido a que la fotosíntesis y la respiración en *Synechocystis* sp. se llevan a cabo en el mismo sitio la membrana tilacoidal.
- *Synechocystis* sp. presenta adaptación cromática, debido a que el colorante actúa como un filtro para la irradiación luminosa y no afecta su crecimiento.

## 10. Referencias

- Abraham, K.J. y John, G.H. (2007). Development of a Classification Scheme using a secondary and tertiary amino analysis of Azoreductase Gene. *S.J.I.* **1**(1): 1-5.
- Acemioglu, B. (2004). Adsorption of Congo red from aqueous solution onto calcium-rich fly ash. *J. Colloid Interface Sci.* **274**(2): 371-379.
- Acuner, E. y Dilek, F.B. (2004). Treatment of tectilon yellow 2G by *Chlorella vulgaris*. *Process Biochem.* **39**: 623-631.
- Albert, L., López-Moreno, S. y Flores, J. (1995). Diccionario de la contaminación, Centro de Ecología y Desarrollo, A.C. México.
- Allinger, N.L. (1972). "Química Orgánica". Editorial Reverté S.A., Barcelona, España.
- Azov, Y. (1982). Effect of pH on Inorganic Carbon Uptake in Algal Cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **43**(6): 1300-1306.
- Barsanti, L. y Gualtieri, P. (2006). "Algae, Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology". Editorial Taylor and Francis Group, Nueva York.
- Benditt, E.P., Eriksen, N. y Berglund, C. (1970). Congo red Dichroism with Dispersed Amyloid Fibrils, an Extrinsic Cotton Effect. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **66**(4): 1044-1051.
- Bhattacharya, S., Das, A., Mangai, G., Vignesh, K. y Sangeetha, J. (2011). Mycoremediation of Congo Red dye by filamentous fungi. *Braz. J. Microbiol.* **42**: 1526-1536.
- Binupriya, A.R., Sathishkumar, M., Kavitha, D., Swaminathan, K., Yun, S.E. y Mun, S.P. (2007). Experimental and isothermal studies on sorption of Congo red by modified mycelial biomass of wood-rotting fungus. *Clean.* **35**: 143-150.
- Blumel, S., Knackmuss, H. J. y Stolz, A. (2002). Molecular cloning and characterization of the gene coding for the aerobic azoreductase from *Xenophilus azovorans* KF46F. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3948-3955.
- Böttiger, P. (1884). Deutsches Reichs Patent. [German Imperial Patent] 28753.
- Burrows, G.E., Hornby, S.K., Waters, D.A., Bellairs, S.M., Prior, L.D. y Bowman, D.M.J.S. (2008). Leaf axil anatomy and bud reserves in 21 Myrtaceae species from northern Australia. *Int. J. Plant Sci.* **169**: 1174-1186.
- Castillo, F. y Roldan, M.D., (2005). "Biotecnología ambiental". Editorial Tebar, Madrid, España.
- Cerniglia, C.E., Freeman, J.P., Franklin, W. y Pack, L.D. (1986). Mutagenic activation of the benzidine-based dye Direct Black 38 by human intestinal microflora. *Mutation Res.* **175**: 11-16.
- Cerniglia, C. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation.* **3**: 351-368.

- Chatterjee, S., Lee, D.S., Lee, M.W. y Woo, S.H. (2009). Enhanced adsorption of congo red from aqueous solutions by chitosan hydrogel beads impregnated with cetyl trimethyl ammonium bromide. *Bioresour. Technol.* **100**: 2803-2809.
- Chen, H., Hopper, S. L. y Cerniglia, C. E. (2005). Biochemical and molecular characterization of an azoreductase from *Staphylococcus aureus*, a tetrameric NADPH-dependent flavoprotein. *Microbiology.* **151**: 1433-1441.
- Comisión Nacional del Agua. Diagnóstico de saneamiento a nivel nacional: Informe Final, CNA, Subdirección General de Infraestructura Hidráulica Urbana Industrial, Gerencia de Potabilización y Tratamiento de Aguas, México, 1994.
- Dotto, G.L., Lima, E.C. y Pinto, L.A.A. (2012). Biosorption of food dyes onto *Spirulina platensis* nanoparticles: Equilibrium isotherm and thermodynamic analysis. *Bioresour. Technol.* **103**(1): 123-130.
- Doyle, R.J. (1989). "Metal Ions and Bacteria". John Wiley and sons, New York.
- Duma, A., Lalibertk, G., Lessard P. y de la Noiea V.J. (1998). Biotreatment of fish farm effluents using the cyanobacterium *Phormidium bohneri*. *Aquacult. Eng.* **17**: 57-68.
- Ellis, B.E. (1997). Degradation of phenol compounds by freshwater algae. *Plant Sci. Lett.* **8**: 213-216.
- Ergene, A., Ada, K., Tan, S. y Katircioglu, H. (2009). Removal of Remazol Brilliant Blue R dye from aqueous solutions by adsorption onto immobilized *Scenedesmus quadricauda*: Equilibrium and kinetic modeling studies. *Desalination.* **249**: 1308-1314.
- Finar, I.L., (1960). "Química Orgánica. Principios Fundamentales." Ed. Alhambra, Madrid, España.
- Gantt, E. (1994). "The Molecular Biology of Cyanobacteria", Dordrecht: Kluwer Academic Publisher.
- Garzón, J. (2009). Cinética de degradación de colorantes textiles de diferentes clases químicas por hongos y bacterias inmovilizados sobre fibra de agave Tequiliana webber Var Azul. Pontificia Universidad Javeriana y el Instituto Politécnico Nacional. 19-20 pp.
- González, S., Perales, H. y Salcedo, M.O. (2008). La fluorescencia de la clorofila a como herramienta en la investigación de efectos tóxicos en el aparato fotosintético de plantas y algas. *REB.* **27**(4): 119-129.
- Gourdon, R., Bhende, S., Rus, E. y Sofer S.S. (1990). Comparison of cadmium biosorption by Gram-positive and Gram-negative bacteria from activated sludge. *Biotechnol. Lett.* **12**(1): 839-842.
- Gräbe, C. y Liebermann, C. (1868). "Ueber Alizarin und Anthracen". *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft.* **1**(1): 41-56 doi:10.1002/cber.18680010142
- Graham, L.E., Graham, J.M. y Wilcox, L.W. (2002). "Plant Biology". Prentice Hall. Upper Sadle River, NJ.

- Guía 201 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD) para la prueba de sustancias químicas en algas y cianobacterias (OECD, 2004).
- Guibal, E. y Roulph, C. (1991). Fixation de l'uranium par un champignon filamenteux: Application au traitement des effluents faiblement chargés. *J. Fr. Hydrol.* **21**(2): 229-240.
- Gupta, R.S. (2000). The natural evolutionary relationships among prokaryotes. *Crit. Rev. Microbiol.* **26**: 111–131.
- Gupta, V.K. y Rastogi, A. (2008). Sorption and desorption studies of chromium (VI) from nonviable cyanobacterium *Nostoc muscorum* biomass. *J. Hazard. Mater.* **154**(1-3): 347-354.
- Hervás, M., López-Maury, L., León, P., Sánchez-Riego, A.M., Florencio, F.J. y Navarro J.A., (2012). ArsH from the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 Is an Efficient NADPH-Dependent Quinone Reductase. *Biochemistry.* **51**: 1178-1187.
- Jinqi, L. y Houtian, L. (1991). Degradation of azo dyes by algae. *Environ. Pollut.* **75**: 273-278.
- Jürgen, U. y Mintele, W. (1985). Orientation of carotenoides in the outer membrane of *Synechocystis* PCC 6741. *Biochem. Biophys. Acta.* **106**: 7208-212.
- Jürgens, U.J. y Weckesser J. (1986). Polysaccharide Covalently linked to the Peptidoglycan of the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC6714. *J. Bacteriol.* **168**(2): 568-573.
- Kalavathi, D.F., Uma, L. y Subramanian, G. (2001). Degradation and metabolization of the pigment-melanoidin in distillery effluent by the marine cyanobacterium *Oscillatoria boryana* BDU 92181. *Enzyme Microbiol. Tech.* **29** (4/5): 246-251.
- Kalyani, D.C., Phugare, S.S., Shedbalkar, U.U. y Jadhav, J.P. (2011). Purification and characterization of a bacterial peroxidase from the isolated strain *Pseudomonas* sp. SUK1 and its application for textile dye decolorization. *Ann. Microbiol.* **61**: 483-491.
- Kaneko, T., Sato, S., Kotani, H., Tanaka, A., Asamizu, E., Nakamura, Y., Miyajima, N., Hirosawa, M., Sugiura, M., Sasamoto, S., Kimura, T., Hosouchi, T., Matsuno, A., Muraki, A., Nakazaki, N., Naruo, K., Okumura, S., Shimpo, S., Takeuchi, C., Wada, T., Watanabe, A., Yamada, M., Yasuda, M. y Tabata, S. (1996). Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* **3**(3): 109-36.
- Karacakaya, P., Kilic, N.K., Duygu, E. y Dönmez, G. (2009). Stimulation of reactive dye removal by cyanobacteria in media containing triacontanol hormone. *J. Hazard. Mater.* **172**: 1635-1639.
- Komárek, J. (2003). "Freshwater Algae of North America. Ecology and Classification". Academic Press, París, Francia.
- Lincoln, E.P., Wilkie, A.C. y French, B.T. (1996). Cyanobacterial process for renovating dairy wastewater. *Bioengineering.* **10**: 63-68.

- López, L. (2005). Resistencia a metales en la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803. Universidad de Sevilla, Sevilla, España.
- López–Maury, L., Florencio, J. y Reyes, J.C. (2003). Arsenic Sensing and Resistance System in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC6803. *J. Bacteriol.* **185**(18): 5363-5371.
- Lorenc-Grabowska, E. y Gryglewicz, G. (2007). Adsorption characteristics of congo red on coal-based mesoporous activated carbón. *Dyes Pigments.* **74**: 34–40.
- Lorimer, J.P., Mason, T.J., Plattes, M., Phull, S.S. y Walton, D.J., (2001). Degradation of dye effluent. *Pure Appl. Chem.* **73**(12): 1957-1968.
- Lynn, R.K., Donielson, D.W., Ilias, A.M., Kennis, J.M., Wong, K. y Matthews, H.B. (1980). Metabolism of bisazobiphenyl dyes derived from benzidine, 3,3´-dimethylbenzidine or 3,3´-dimethoxybenzidine to carcinogenic aromatic amines in the dog and rat. *Toxicol. Appl. Pharm.* **56**: 248-258.
- Mall, I.D., Srivastava, V.C., Agarwal, N.K. y Mishra, I.M. (2005). Removal of Congo red from aqueous solution by bagasse fly ash and activated carbon: Kinetic study and equilibrium isotherm analyses. *Chemosphere.* **61**: 492-501.
- Manahan, S.E. (2007). “Introducción a la Química Ambiental”. Editorial Reverté, México D.F.
- Mancilla, H., Lizama, C., Gutarra, A. y Rodríguez, J. (2001). Tratamiento de residuos líquidos de la industria de celulosa y textil. [www.cnea.gov.ar/xxi/ambiental/CYTED/20cap13.pdf](http://www.cnea.gov.ar/xxi/ambiental/CYTED/20cap13.pdf)
- Martínez, E. y López, G. (2001). Tratamiento químico de contaminantes orgánicos. El proceso Fenton. *Ingeniería Química.* **375**: 149-153.
- Megharaj, M., Pearson, H.W. y Venkateswarlu, K. (1993). Toxicity of carbofuran to soil isolates of *Chlorella vulgaris*, *Nostoc linckia* and *N. muscorum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39**: 644-648.
- Megharaj, M., Venkateswarlu, K. y Rao, A.S. (1987). Metabolism of monocrotophos and quinalphos by algae isolated from soil. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **39**: 251-256.
- Mohamed, H.E., van de Meene, A.M.L., Roberson, R.W. y Vermaas W.F.J. (2005). Myxoxanthophyll is Required for Normal Cell Wall Structure and Thylakoid Organization in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC6803. *J. Bacteriol.* **187**(20): 6883.
- Mostafa, M., El-Sheekh, M.M., Gharieb, G.W. y Abou, E. (2009). Biodegradation of dyes by some green algae and cyanobacteria. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **63**(6): 699-704.
- Narro, M.L., Cerniglia, C.E., Van, B.C. y Gibson, D.T. (1992). Metabolism of phenanthrene by the Marine cyanobacterium *Agmenellum quadruplicate* PR-6. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1351-1359.
- Omata, T. y Murata, N. (1983). Isolation and characterization of the cytoplasmic membranes from the blue-green alga (cyanobacterium) *Anacystis nidulans*. *Plant Cell Physiol.* **24**: 111-1112.

- Padamavathy, S., Sandhya, S., Swaminathan, K., Subrahmanyam, Y.V. y Kaul, S.N. (2003). Comparison of decolorization of reactive azo dyes by microorganisms isolated from various sources. *Environ. Sci.* **15**(5): 628-632.
- Palanisami, S. y Saha, S.K. (2010). Laccase and polyphenol oxidase activities of marine cyanobacteria: a study with Poly R-478 decolourization. *J. Microbiol. Technol.* **26**: 63-69.
- Pasto, D.J, (1981). "Determinación de estructuras orgánicas". Reverté, España.
- Peña, E.J., Palacios, M.L. y Ospina, N., (2005). "Algas como indicadores de contaminación". Universidad del Valle; Colombia..
- Piekarska, M., Skowronek, J., Rybarska, B., Stopa, I., Roterman, L. y Konieczn, F. (1996). Congo red-stabilized intermediates in the k light chain transition from native to molten state. *Biochemistry.* **78**(3): 183-189.
- Plan Nacional de Desarrollo 2007-2012. Agua, de los Estados Unidos Mexicanos.
- Prabaharan, D., Sumathi, M. y Subramanian, G. (1994). Ability to use ampicillin as a nitrogen source by the marine cyanobacterium *Phormidium valderianum* BDU. *Curr. Microbiol.* **6**(6): 315-320.
- Priya, B. (2009). Marine Cyanobacteria: a plausible candidate for biodecolourization of textile dye: with emphasis on AOS. En: *Ph.D Dissertation*. Bharathidasan University, Tiruchirappalli, India.
- Priya, B., Uma, L., Ahamed, A.K., Subramanian, G. y Prabaharan, D. (2011). Ability to use the diazo dye, C.I. Acid Black 1 as a nitrogen source by the marine cyanobacterium *Oscillatoria curviceps* BDU92191. *Bioresour. Technol.* **102**(14):7 218-7223.
- Purkait, M.K., Maiti, A., DasGupta, S. y De, S. (2007). Removal of congo red using activated carbon and its regeneration. *J. Hazard. Mater.* **145**: 287-295.
- Rippka, R., Deruelles, J. y Waterbury, J. (1979). Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **11**: 11-61.
- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R. y Nigman, P. (2001). Remediation of Dyes in Textil Effluent: A critical Review on Current Treatment Technologies with a Proposed Alternative. *Bioresour. Technol.* **77**: 247-255.
- Rodríguez, S., Fernández, M., Bermúdez, R. y Morris, H. (2003). Tratamiento de Efluentes Industriales Coloreados con *Pleurotus* sp. *Rev. Iberoam. de Micología.* **20**: 164-168.
- Rodríguez, S., Bermúdez, R., Serrat, M. y Korouma, A. (2006). Selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* para la decoloración de Efluentes Industriales, *Revista Mexicana de Micología.* **23**: 9-15
- Sadettin, S. y Donmez, G. (2006). Simultaneous bioaccumulation of reactive dye and chromium (VI) by using thermophilic *Phormidium* sp. *Enzyme Microb. Technol.* **41**: 175-180.
- Saha, S.K., Swaminathan, P., Raghavan, C., Uma, L. y Subramanian, G. (2010). Ligninolytic and antioxidative enzymes of a marine cyanobacterium *Oscillatoria willei* BDU130511 during Poly R-478 decolourization. *Bioresour. Technol.* **101**(9): 3076-3084.



- Salas, G. (2003). Tratamiento físico-químico de aguas residuales de la industria textil. *Revista Peruana de Ingeniería Química*. **5**(2): 73-80.
- Sauvageau, C. (1892). Sur les algues d'eau douce recoltées en Algérie pendant le session de la Societé Botanique en 1892. *Bull. Soc. Bot. France* **39**: 104-128.
- Graham, J.E. (2008). Carotenoid biosynthesis in *Synechococcus* sp. PCC7002, Identifiacion of the enzymes and carotenoides. Pennsylvania State University.
- CONAGUA, Subdirección General de Agua Potable, Drenaje y Saneamiento. México 2011.
- Shashirekha, S., Uma, L. y Subramanian, G. (1997). Phenol degradation by a marine cyanobacterium *Phormidium valderianum*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **19**: 130–133.
- Sladewski, T.E., Shafer, A.M. y Hoag, C.M. (2006). The effect of ionic strength on the UV-vis spectrum of Congo red in aqueous solution. *Spectrochim. Acta Part A* **65**: 985-987.
- Sokhoh, N.A., Al-Hasan, R.H., Radwan, S.S. y Hopner, T. (1992). Self-cleaning of the Gulf. *Nature*. **359**: 109. doi:10.1038/359109a0
- Stolz, A. (2001). Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**: 69-80.
- Strasser, R.J., Srivastava, A. y Tsimilli-Michael, M. (2000). "Probing Photosynthesis: Mechanism, Regulation and Adaptation". Taylor and Francis, London.
- Swaminathan, P., Prabakaran, D. y Uma, L. (2009). Fate of few pesticide-metabolizing enzymes in the marine cyanobacterium *Phormidium valderianum* BDU20041. *Pestic. Biochem. Physiol.* **94**(2-3).
- Talling, J.F. (1969). "Primary production in aquatic environments". F.A. Davis Co., Philadelphia, 22-25 pp.
- Telke, AA., Joshi, S.M., Jadhav, S.U., Tamboli, D.P. y Govindwar, S.P. (2010). Decolorization and detoxification of Congo Red and textile industry effluent by an isolated bacterium *Pseudomonas* sp. Su-EBT. *Biodegradation*. **21**: 283-296.
- Uma, L., Prabakaran, D., Priya, B. y Subramanian, G. (2009). "Algal biology and biotechnology" I.K. International Publishing.
- Van Heerden, P.D.R., Strasser, R.J. y Krüger, G.H.J. (2004). Reduction of dark chilling stress in N<sub>2</sub>-fixing soybean by nitrate as indicated by chlorophyll a fluorescence kinetics. *Physiol. Plant.* **121**: 239-249.
- Vermaas, W.F.J. (2001). "Encyclopedia of Life Sciences". Nature Publishing Group, London, 245-251 pp.
- Vimonses, V., Lei S., Jin B., Chow C.W.K. y Saint C. (2009). Adsorption of Congo red by three Australian kaolins. *Appl. Clay Sci.* **43**(3-4): 465-472.
- Vorontsov, I.I., Minasov, G., Brunzelle, J.S., Shuvalova, L., Kiryukhina, O., Collart, F.R. y Andeson, W.F. (2007). Crystal structure of an apo from *Shigella flexneri* ArsH protein with an NADPH-dependent FMN reductase activity. *J. protein Sci.* **16**: 2483-2490.

- Walstad, D.L. (2003). " Ecology of the planted aquarium: a practical manual and scientific treatise for the home aquarist". Echinodorus Pub
- Wang, C. J., Hagemeyer, C., Rahman, N., Lowe, E., Noble, M., Coughtrie, M., Sim, E., y Westwood, I. (2007). Molecular cloning, characterization and ligand-bound structure of an azoreductase from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Mol. Biol. **37**: 31213-1228.
- Witt, O.N. (1876). Zur Kenntniss des Baues und der Bildung färbender Kohlenstoffverbindungen. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft. **9**: 522.
- Ye, J., Yang, H.C., Rosen, B.P. y Bhattacharjee, H., (2007). Crystal structure of the flavoprotein ArsH from *Sinorhizobium meliloti*. FEBS Lett. **581**: 3996-4000.
- Yee, N., Fein, J.B. y Daughney, C.J. (2002). Experimental study of the pH, ionic strength, and reversibility behavior of bacteri-mineral adsorption. Geochim. Cosmochim. Ac. **64**(4): 609-617.

#### **Páginas de internet consultadas**

- edison.upc/curs/llum/luz/luz.html
- <http://www-cyanosite.bio.purdue.edu/index.html>
- [http://pnd.calderon.presidencia.gob.mx/pdf/Eje4\\_Sustentabilidad\\_Ambiental/4\\_1\\_Agua.pdf](http://pnd.calderon.presidencia.gob.mx/pdf/Eje4_Sustentabilidad_Ambiental/4_1_Agua.pdf)
- <http://genome.microbedb.jp/cyanobase/Synechocystis>

## Anexo 1

### Preparación del medio BG11

Tabla 7. Componentes del medio BG11

Reactivo	mg/L
Na NO <sub>3</sub>	75
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	3.75
CaCl <sub>2</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1.8
Ácido cítrico	0.3
Citrato férrico	0.3
EDTA	0.05
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O	2
<b>Metales Traza</b>	
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	1.43
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.905
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.111
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.195
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.0395
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.0247

(Rippka *et al.*, 1979).

Pesar los componentes y agregarlos en el orden de la tabla para evitar que precipiten. Prepara los metales traza por separado y agregar la mezcla al final.

## Anexo 2

Cromatogramas de los diferentes tratamientos al inicio y al final de la cinética de remoción por la cianobacteria *Synechocystis* sp.

### 5 mg/L tiempo inicial y final

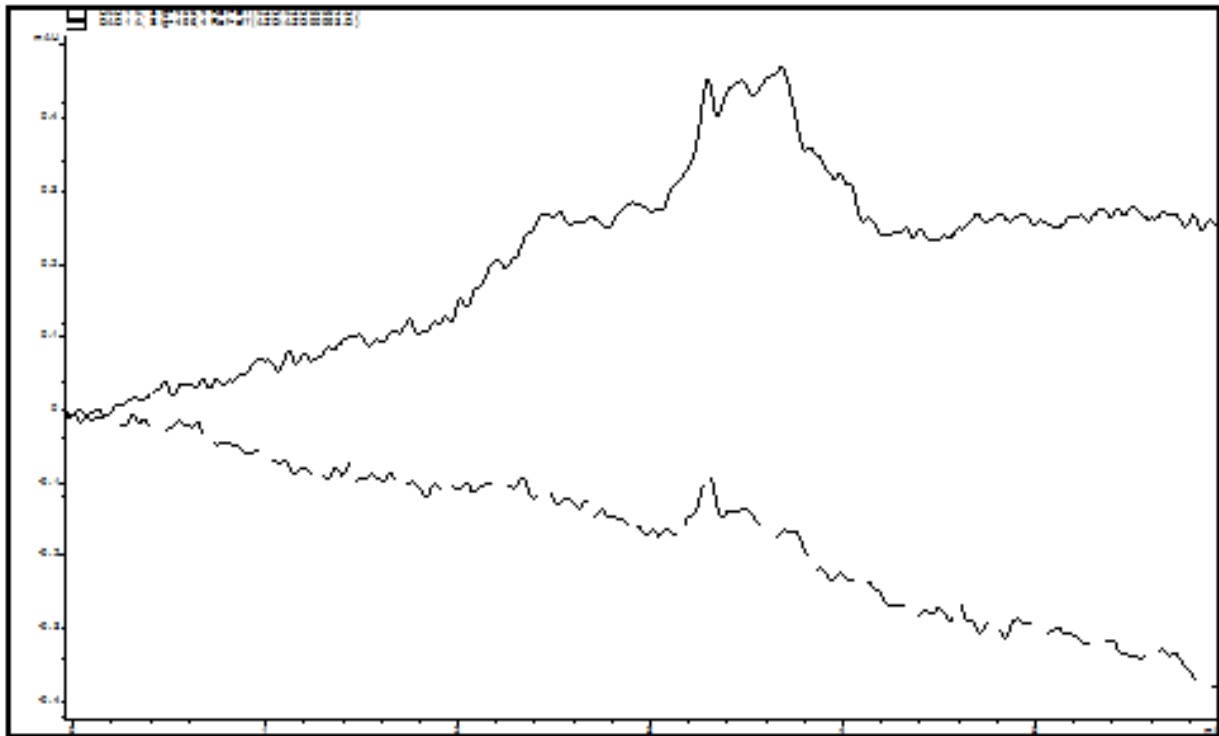


Figura 17. Cromatograma para la concentración de 5 mg/L a las 0 h (línea sólida) y a las 96 h (línea punteada).

Tabla 8. Parámetros cromatográfico para la concentración de 5 mg/L a las 0h

#	Tiempo	Área	Altura	Ancho	Simetría
Nd	nd	nd	Nd	nd	nd

Tabla 9. Parámetros cromatográfico para la concentración de 5 mg/L a las 96 h

#	Tiempo	Área	Altura	Ancho	Simetría
Nd	nd	nd	Nd	nd	nd

### 10 mg/L tiempo inicial y final

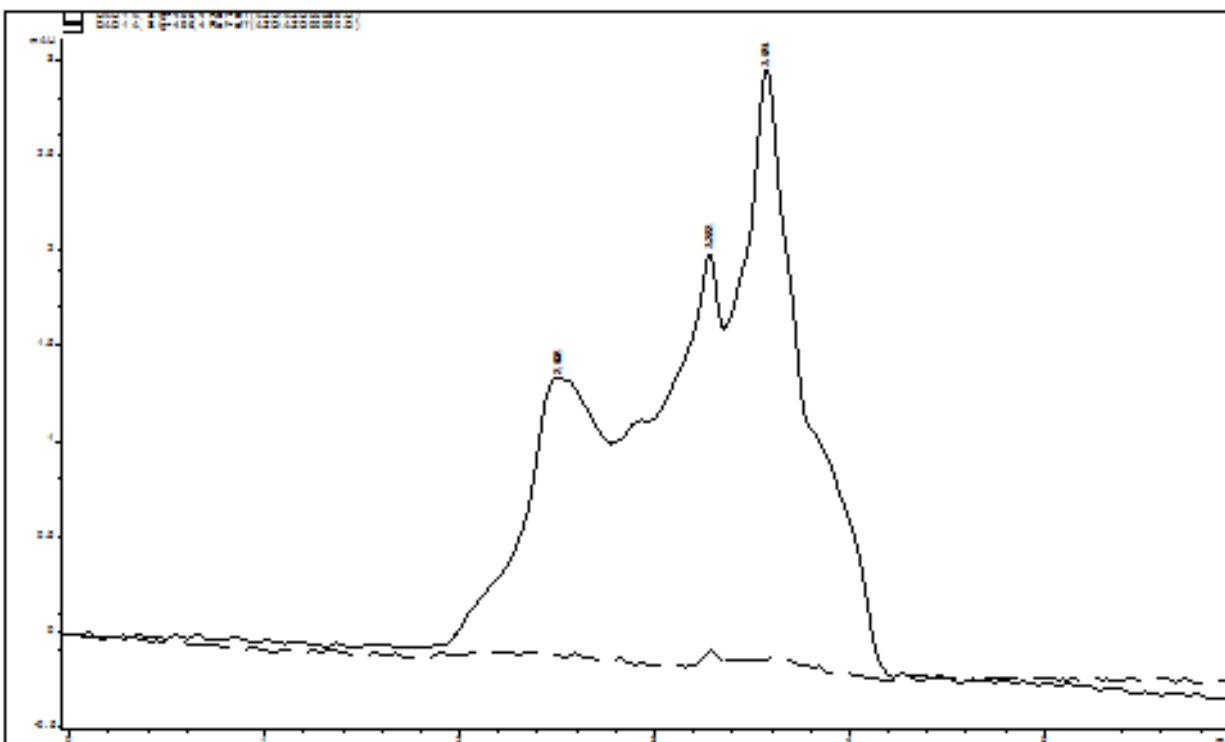


Figura 18. Cromatograma para la concentración de 10 mg/L a las 0 h (línea sólida) y a las 96 h (línea punteada).

Tabla 10. Parámetros cromatográficos para la concentración de 10 mg/L a las 0 h

#	Tiempo	Área	Altura	Ancho	Simetría
1	2.502	40.1	1.5	0.3554	0.904
2	3.282	52.7	2.2	0.3057	5.385
3	3.574	75.2	3.1	0.3098	0.626

Tabla 11. Parámetros cromatográfico para la concentración de 10 mg/L a las 96 h

#	Tiempo	Área	Altura	Ancho	Simetría
Nd	nd	nd	nd	nd	Nd

## 15 mg/L tiempo inicial y final

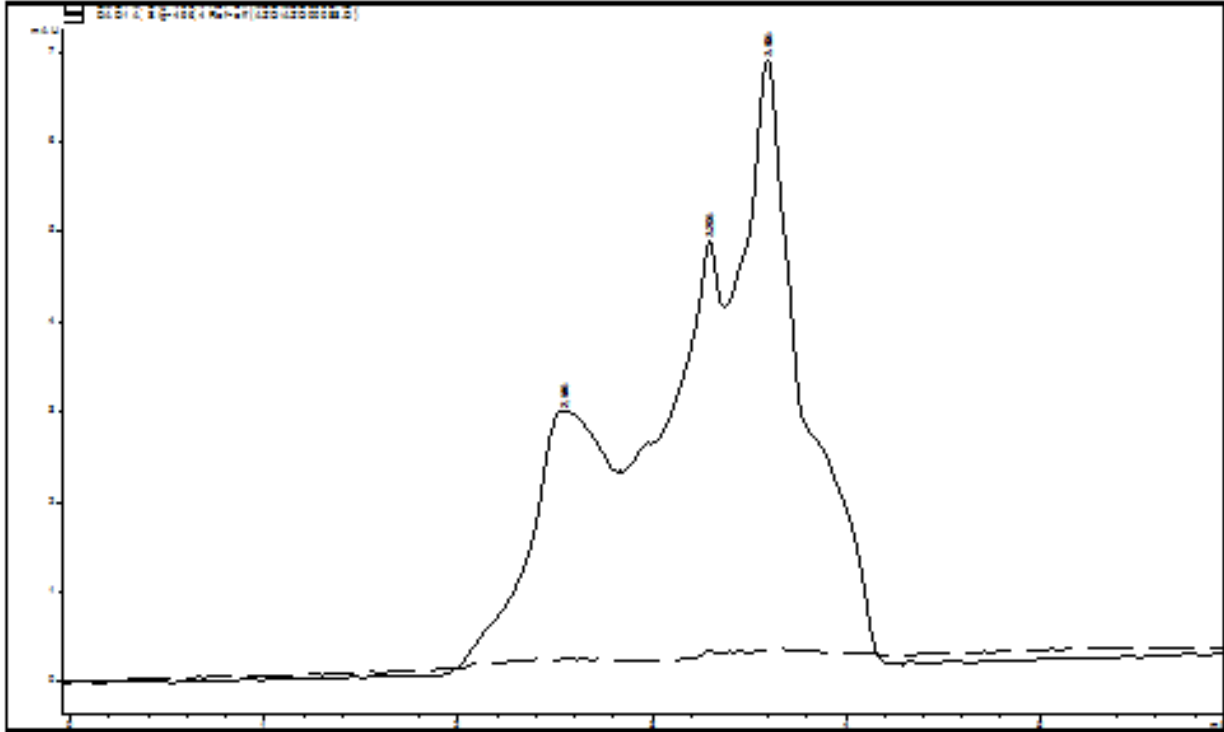


Figura 19. Cromatograma para la concentración de 15 mg/L a las 0 h (línea sólida) y a las 96 h (línea punteada).

Tabla 12. Parámetros cromatográficos para la concentración de 15 mg/L a las 0 h

#	Tiempo	Área	Altura	Ancho	Simetría
1	2.546	83	2.9	0.4152	0.932
2	3.296	103	4.7	0.2715	4.372
3	3.595	158	6.7	0.3032	0.696

Tabla 13. Parámetros cromatográfico para la concentración de 15 mg/L a las 96 h

#	Tiempo	Área	Altura	Ancho	Simetría
Nd	nd	nd	Nd	Nd	Nd

## 20 mg/L tiempo inicial y final

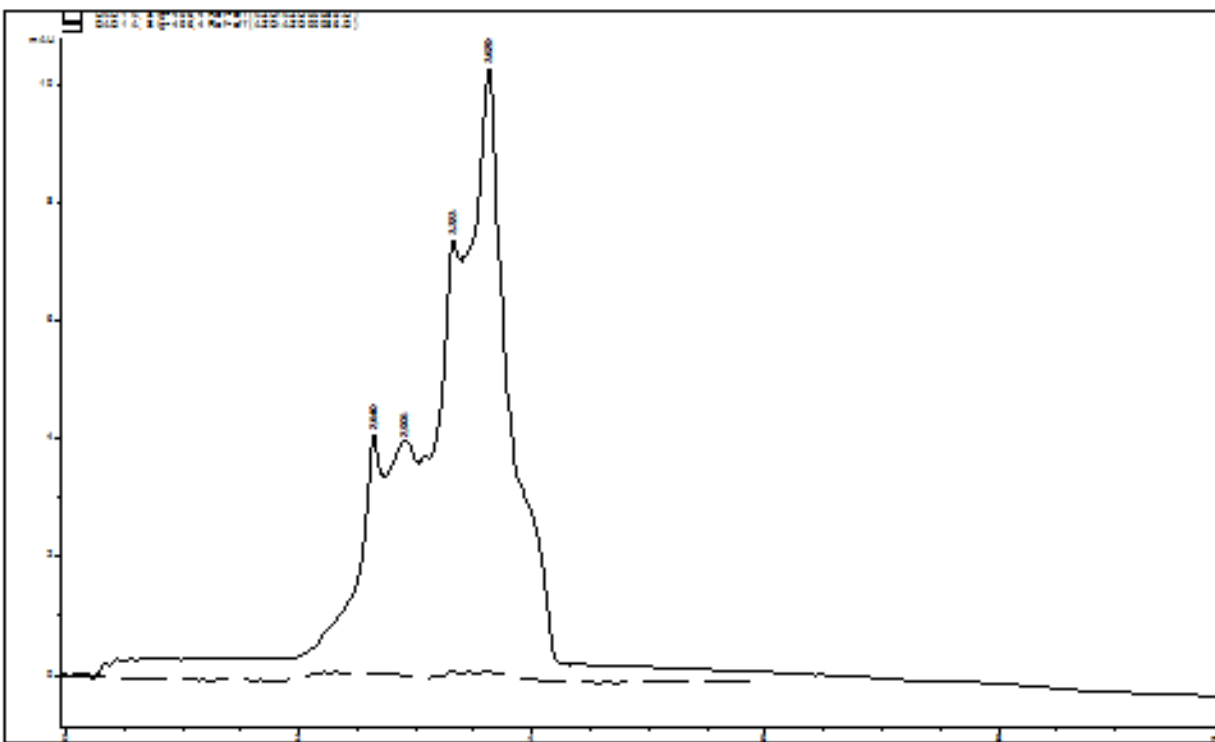


Figura 20. Cromatograma para la concentración de 20 mg/L a las 0 h (línea sólida) y a las 96 h (línea punteada).

Tabla 14. Parámetros cromatográficos para la concentración de 20 mg/L a las 0 h

#	Tiempo	Área	Altura	Ancho	Simetría
1	2.64	54.7	3.8	0.1864	2.152
2	2.906	61.4	3.7	0.2354	1.466
3	3.323	107.6	7.2	0.1954	2.94
4	3.629	239.5	10.1	0.3093	0.833

Tabla 15. Parámetros cromatográfico para la concentración de 20 mg/L a las 96 h

#	Tiempo	Área	Altura	Ancho	Simetría
Nd	nd	nd	Nd	nd	Nd

## 25 mg/L tiempo inicial y final

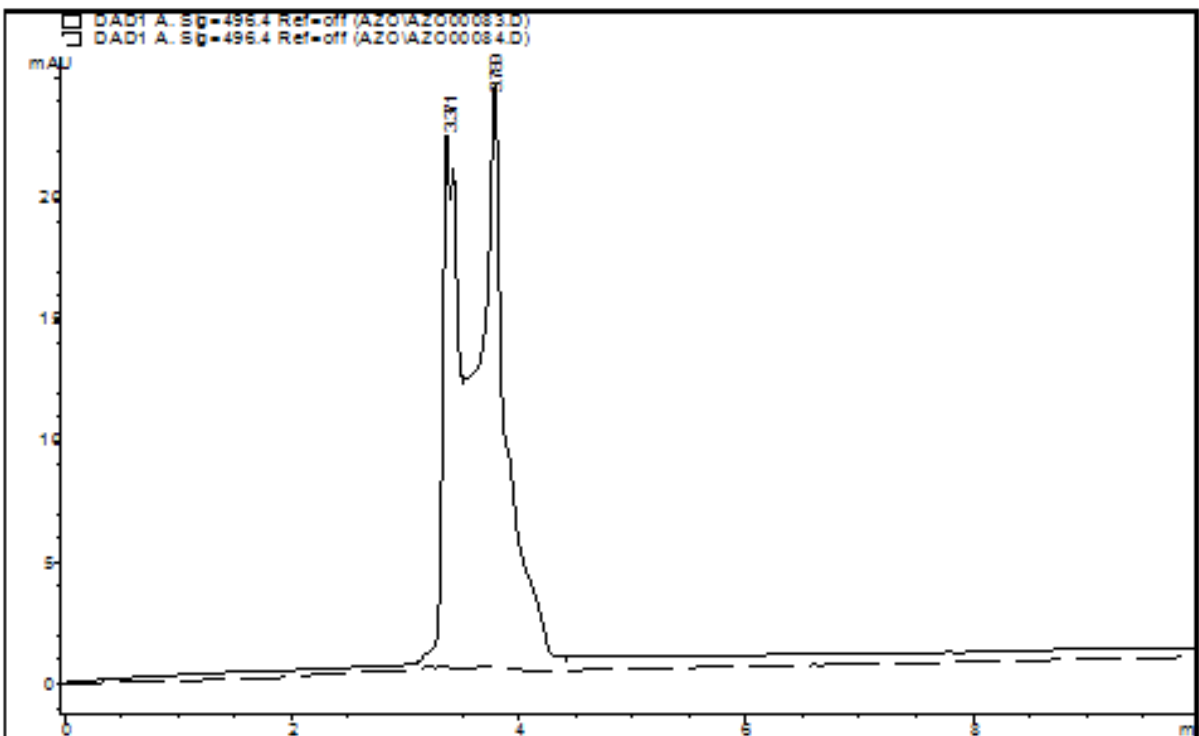


Figura 21. Cromatograma para la concentración de 25 mg/L a las 0 h (línea sólida) y a las 96 h (línea punteada).

Tabla 16. Parámetros cromatográficos para la concentración de 25 mg/L a las 0 h

#	Tiempo	Área	Altura	Ancho	Simetría
1	3.371	209	21.6	0.1269	0.402
2	3.789	407.5	23.7	0.2183	1.186

Tabla 17. Parámetros cromatográfico para la concentración de 25 mg/L a las 96 h

#	Tiempo	Área	Altura	Ancho	Simetría
Nd	nd	nd	Nd	Nd	Nd



### Anexo 3

Curva de calibración del Rojo Congo:

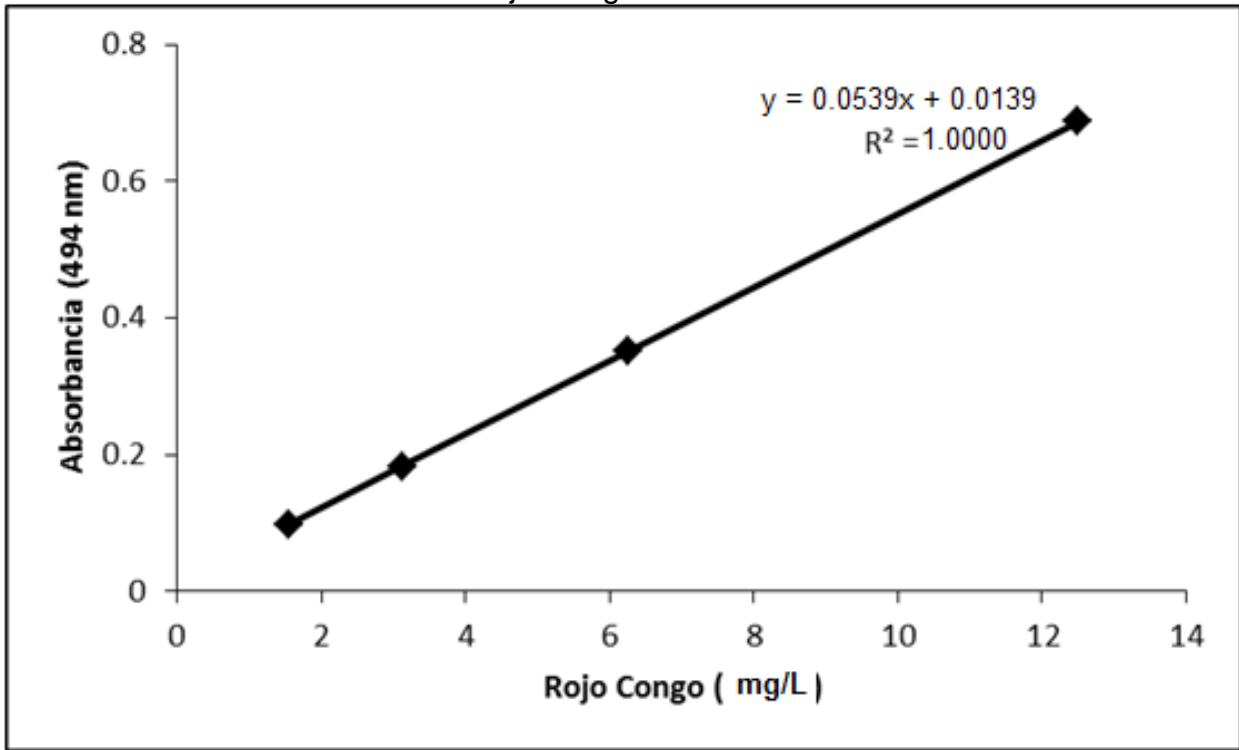


Figura 22. Curva de calibración del Rojo Congo. Se utilizó el espectrofotómetro (Genesys 10uv Thermo Electron Corporation®) a una longitud de onda de 494nm.