



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología**

**Reducción del colorante azo anaranjado de metilo y el  
colorante tipo antraquinona azul brillante de remazol  
R por *Shewanella xiamenensis* LC6 en presencia de  
iones de aluminio ( $Al^{3+}$ )**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

Para optar el Grado Académico de Bachiller en Microbiología y  
Parasitología

**AUTOR**

Jaime Aldo ANTEZANA MEJIA

**ASESOR**

Dr. Pablo Sergio RAMÍREZ ROCA

Lima, Perú

2022



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Antezana, J. (2022). *Reducción del colorante azo anaranjado de metilo y el colorante tipo antraquinona azul brillante de remazol R por Shewanella xiamenensis LC6 en presencia de iones de aluminio ( $Al^{3+}$ )*. [Trabajo de investigación de bachiller, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

---

## METADATOS COMPLEMENTARIOS

<b>Datos de autor</b>	
<b>Nombres y Apellidos</b>	Jaime Aldo Antezana Mejia
<b>Tipo de Documento de Identidad</b>	DNI
<b>Número de Documento de Identidad</b>	71466884
<b>URL de ORCID</b>	<a href="https://orcid.org/0000-0002-5189-277X">https://orcid.org/0000-0002-5189-277X</a>
<b>Datos de asesor</b>	
<b>Nombres y Apellidos</b>	Pablo Sergio Ramírez Roca
<b>Tipo de Documento de Identidad</b>	DNI
<b>Número de Documento de Identidad</b>	06183797
<b>URL de ORCID</b>	<a href="https://orcid.org/0000-0001-9309-7021">https://orcid.org/0000-0001-9309-7021</a>
<b>Datos del jurado</b>	
<b>Presidente del jurado</b>	
<b>Nombres y Apellidos</b>	Tito Libio Sanchez Rojas
<b>Tipo de Documento de Identidad</b>	DNI
<b>Número de Documento de Identidad</b>	08550935
<b>Miembro del jurado 1</b>	
<b>Nombres y Apellidos</b>	Marcos Alejandro Sulca Lopez
<b>Tipo de Documento de Identidad</b>	DNI
<b>Número de Documento de Identidad</b>	41283664
<b>Miembro del jurado 2</b>	
<b>Nombres y Apellidos</b>	Susana Mónica Gutierrez Moreno
<b>Tipo de Documento de Identidad</b>	DNI
<b>Número de Documento de Identidad</b>	08060631
<b>Datos de investigación</b>	
<b>Línea de investigación</b>	Biorremediación y Bioconversión
<b>Grupo de investigación</b>	Genómica Funcional de Microorganismos y Biorremediación – MICROGEN
<b>Agencia de financiamiento</b>	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Promoción de trabajo de Investigación para optar el grado de Bachiller. B20100080a
<b>Ubicación geográfica de la investigación</b>	Universidad Nacional Mayor de San Marcos (12.06°S, 77.08°W)
<b>Año o rango de años en que se realizó la investigación</b>	Julio 2020 -Julio 2021

**URL de disciplinas OCDE**

Biología

<https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.00>



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
(Universidad del Perú, Decana de América)

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO DE  
BACHILLER EN MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA  
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN)**

Siendo las 18:06 horas del 26 de julio de 2022, en el Salón de Grados Virtual de la Facultad de Ciencias Biológicas cuya dirección electrónica fue <https://meet.google.com/jdr-mprg-wca>, y en presencia del Jurado formado por los profesores que suscriben, se inició la sesión para optar al **Grado Académico de Bachiller en Microbiología y Parasitología (Modalidad: Trabajo de Investigación)** de **JAIME ALDO ANTEZANA MEJIA**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° UNMSM-20220018629, el graduando expuso su Trabajo de Investigación: **“REDUCCIÓN DEL COLORANTE AZO ANARANJADO DE METILO Y EL COLORANTE TIPO ANTRAQUINONA AZUL BRILLANTE DE REMAZOL R POR *Shewanella xiamenensis* LC6 EN PRESENCIA DE IONES DE ALUMINIO ( $Al^{3+}$ )”**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota **18**, calificativo: **APROBADO CON MENCIÓN HONROSA**.

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Grado Académico de Bachiller en Microbiología y Parasitología (Modalidad: Trabajo de Investigación)** a **JAIME ALDO ANTEZANA MEJIA** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo grado, conforme a ley.

Siendo las 19:55 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 26 de julio de 2022.

**Dr. TITO SANCHEZ ROJAS**  
(PRESIDENTE)

**Dr. PABLO RAMÍREZ ROCA**  
(ASESOR)

**Dr. MARCOS SULCA LOPEZ**  
(MIEMBRO)



Firmado digitalmente por GUTIERREZ  
MORENO Susana Monica FAU  
20148092202 soft  
Motivo: Soy el autor del documento  
Fecha: 26.07.2022 21:01:57 -05:00

**Dra. SUSANA GUTIERREZ MORENO**  
(MIEMBRO)



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Vicerrectorado de Investigación y Posgrado



## CERTIFICADO DE SIMILITUD

Yo, Pablo Sergio Ramírez Roca en mi condición de asesor de la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología -Facultad de Ciencias Biológicas; de **Trabajo de Investigación** cuyo título es *“Reducción del colorante azo Anaranjado de metilo y el colorante tipo antraquinona Azul Brillante de Remazol R por Shewanella xiamenensis LC6 en presencia de iones de aluminio (Al<sup>3+</sup>)”* presentado por el (a) egresado Jaime Aldo Antezana Mejía para optar el Grado de Bachiller en Microbiología y Parasitología.

CERTIFICO: que se ha cumplido con lo establecido en la Directiva de Originalidad y de Similitud de Trabajos Académicos, de Investigación y Producción Intelectual. Según la revisión, análisis y evaluación mediante el software de similitud textual, el documento evaluado cuenta con el porcentaje de 3 % de similitud, nivel **PERMITIDO** para continuar con los trámites correspondientes y para su publicación en el repositorio institucional.

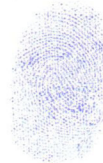
Se emite el presente certificado en cumplimiento de lo establecido en las normas vigentes, como uno de los requisitos para la obtención del grado/ título/ especialidad correspondiente.

Firma del Asesor

Nombres y apellidos:

**Pablo Sergio Ramírez Roca**

DNI:06183797



Huella  
digital

## **AGRADECIMIENTOS**

Este Trabajo de Investigación fue financiado parcialmente por PROCENCIA, con el proyecto titulado: “GENÓMICA Y TRANSCRIPTÓMICA DE AISLADOS DE *Shewanella* SPP. CON CAPACIDAD DE DEGRADACIÓN DE COLORANTES AZOICOS PARA LA REMEDIACION DE EFLUENTES DE LA INDUSTRIA TEXTIL” en el marco del Convenio N° 156-2017-FONDECYT.

Agradezco al programa de “Promoción de trabajo de Investigación para optar el grado de Bachiller”, organizado por el Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos en el 2020 con Resolución Rectoral N.° 015156-R-20, por el apoyo financiero brindado mediante el proyecto B20100080a para el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Agradezco a mi asesor, el Dr. Pablo Ramírez Roca, por su orientación y apoyo durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

Agradezco a mis padres, Ana y Jaime, y a mi hermano, Jesús, por todo el apoyo emocional y el esfuerzo brindados durante mis estudios de pregrado, así como por motivarme en mi deseo de seguir la carrera de Microbiología y Parasitología.

Agradezco también a mis amigos y compañeros del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología: Wendy, Gustavo, María, Mario, Hederson, Wilma, Danayra, Jefferson, Janeth, Julio, José María, Alexandra, Asami y Damaris, por su apoyo, recomendaciones y consejos que me permitieron desarrollar mi trabajo de investigación y mejorar académica y personalmente.



# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	7
<b>I. Introducción</b> .....	9
1.1 Delimitación del problema .....	9
1.2 Pregunta del problema .....	11
1.3 Justificación de la investigación.....	11
<b>II. Estado del conocimiento</b> .....	12
2.1 El género <i>Shewanella</i> en la reducción de colorantes azoicos y de tipo antraquinona.....	12
2.2 Efecto de los iones metálicos en la reducción de colorantes por <i>Shewanella</i> spp.....	14
2.3 Interacciones entre el aluminio y las bacterias.....	16
<b>III. Objetivos</b> .....	19
3.1 Objetivo general .....	19
3.2 Objetivos específicos .....	20
<b>IV. Hipótesis</b> .....	20
4.1 Hipótesis nula ( $H_0$ ) .....	20
4.2 Hipótesis alternativa ( $H_1$ ).....	20
<b>V. Materiales y métodos</b> .....	20
5.1 Medios de cultivo .....	20
5.2 Reactivación de la cepa .....	21
5.3 Cuantificación del crecimiento de <i>S. xiamenensis</i> LC6.....	21
5.4 Evaluación de la degradación de Anaranjado de metilo en presencia de aluminio ( $Al^{3+}$ ).....	22
5.5 Evaluación de la degradación de Azul brillante de remazol Ren presencia de aluminio ( $Al^{3+}$ ).....	23
<b>VI. Resultados</b> .....	24
6.1 Cuantificación del crecimiento de <i>S. xiamenensis</i> LC6.....	24
6.2 Evaluación de la degradación de Anaranjado de metilo en presencia de aluminio ( $Al^{3+}$ ).....	24
6.3 Evaluación de la degradación de Azul brillante de remazol R en presencia de aluminio ( $Al^{3+}$ ).....	26
<b>VII. Discusión de resultados</b> .....	27
7.1 Cuantificación del crecimiento de <i>S. xiamenensis</i> LC6.....	27
7.2 Evaluación de la degradación en presencia de aluminio ( $Al^{3+}$ ) .....	29
<b>VII. Bibliografía</b> .....	32

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pag.</b>
<b>Tabla 1.</b> Composición de la solución A en concentración 10X del caldo ZZ.....	21
<b>Tabla 2.</b> Composición de la solución B en concentración 1X del caldo ZZ.....	21

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pag.</b>
<b>Figura 1.</b> Estructura molecular del Anaranjado de metilo.	10
<b>Figura 2.</b> Estructura molecular del azul brillante de remazol R.	10
<b>Figura 3.</b> Cuantificación del crecimiento de <i>Shewanella xiamenensis</i> LC6.	24
<b>Figura 4.</b> Evaluación de la degradación de Anaranjado de metilo por <i>Shewanella xiamenensis</i> LC6 en presencia de aluminio.	25
<b>Figura 5.</b> Evaluación de la degradación de Azul Brillante de Remazol por <i>Shewanella xiamenensis</i> LC6 en presencia de aluminio.	27

## LISTA DE ABREVIATURAS

- Al:** Aluminio
- Al<sup>3+</sup>:** catión trivalente de aluminio
- Al(OH)<sub>3</sub>:** Hidróxido de aluminio
- ANOVA:** Análisis de Varianza
- ATP:** Adenosín Trifosfato
- Ca:** Calcio
- Ca<sup>2+</sup>:** catión divalente de calcio
- DPPH:** 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo
- ZZ:** medio según Zhou-Zimmermann (1993)
- cAMP:** Adenosín monofosfato cíclico
- Co<sup>2+</sup>:** catión divalente de cobalto
- Cr<sup>2+</sup>:** catión divalente de cromo
- Cu<sup>2+</sup>:** catión divalente de cobre
- Fe<sup>3+</sup>:** catión trivalente de hierro
- Fe<sup>2+</sup>:** catión divalente de hierro
- Ga<sup>3+</sup>:** Cation trivalente de Galio
- Mg:** Magnesio
- Mg<sup>2+</sup>:** catión divalente de magnesio
- Mn<sup>2+</sup>:** catión divalente de manganeso
- NAD<sup>+</sup>:** nicotinamida adenina dinucleótido
- NADP<sup>+</sup>:** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- Ni<sup>2+</sup>:** catión divalente de níquel
- P. fluorescens:*** *Pseudomonas fluorescens*
- Pb<sup>2+</sup>:** catión divalente de plomo
- PBS:** *Buffer* fosfato salino
- S. decolorationis:*** *Shewanella decolorationis*
- S. loihica:*** *Shewanella loihica*
- S. xiamenensis:*** *Shewanella xiamenensis*
- v/v:** volumen sobre volumen
- Zn<sup>2+</sup>:** catión divalente de zinc

## RESUMEN

La industria textil utiliza colorantes azoicos y de tipo antraquinona en los procesos de tinción de telas, por lo que estos se encuentran presentes en grandes volúmenes de efluentes textiles que son liberados al medio ambiente. Debido a sus propiedades químicas, tanto los colorantes azoicos como los de tipo antraquinona son difíciles de degradar biológicamente. Asimismo, los efluentes textiles pueden contener contaminantes acompañantes que afectarían su biorremediación. La presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de los iones aluminio ( $Al^{3+}$ ) en la reducción del colorante azoico Anaranjado de Metilo y el colorante tipo antraquinona Azul Brillante de Remazol R por la bacteria *Shewanella xiamenensis* LC6. Se realizó la cuantificación del crecimiento microbiano en presencia de iones de aluminio para conocer el efecto de dicho metal sobre el crecimiento bacteriano, y ensayos para la evaluación de la degradación, con el fin de medir el efecto de los iones sobre la reducción del colorante. En todos los ensayos se utilizó tres condiciones distintas: ausencia de iones de aluminio, 10 ppm de  $Al^{3+}$  y 20 ppm de  $Al^{3+}$ . Como resultado se obtuvo que los iones de aluminio tuvieron un efecto negativo sobre el crecimiento de *Shewanella xiamenensis* LC6, pero a una concentración de 10 ppm incrementó la degradación, favoreciendo la decoloración del Anaranjado de Metilo hasta en un 12.14%, y la del Azul Brillante de Remazol R en un 12.44%, con respecto a lo obtenido en ausencia del metal. Los mecanismos por los cuales los iones de aluminio afectarían el crecimiento bacteriano e incrementarían la degradación de ambos colorantes son discutidos. La presente investigación muestra la importancia de explorar el efecto de iones metálicos en la degradación por parte de bacterias con dicha capacidad, para su posterior uso y optimización en procesos de biorremediación.

**Palabras clave:** *Shewanella*, degradación, colorante azo, antraquinona, aluminio.

## ABSTRACT

The textile industry uses azo and anthraquinone-type dyes in fabric dyeing processes. Due to this, these are present in large volumes of textile effluents that are released into the environment. Due to their chemical properties, both azo and anthraquinone-type dyes are difficult to biologically degrade. Likewise, textile effluents may contain accompanying contaminants that would affect their bioremediation. The objective of this research was to evaluate the effect of aluminum ions ( $\text{Al}^{3+}$ ) on the reduction of the azo dye Methyl Orange and Remazol Brilliant Blue anthraquinone-type dye by the bacterium *Shewanella xiamenensis* LC6. Quantification of microbial growth in the presence of aluminum ions was performed to determine the effect of said metal on bacterial growth, and tests for the evaluation of decolorization were carried out to measure the effect of the ions on the reduction of the dye. In all the tests, three different conditions were evaluated: absence of aluminum ions, 10 ppm of  $\text{Al}^{3+}$  and 20 ppm of  $\text{Al}^{3+}$ . As a result, it was obtained that aluminum ions had a negative effect on the growth of *Shewanella xiamenensis* LC6 but increased the percentage of degradation at a concentration of 10 ppm, which favored the decolorization of Methyl Orange by up to 12,14%, and that of Remazol Brilliant Blue by 12.44%, with respect to the percentage obtained in the absence of the metal. The mechanisms by which aluminum ions would affect bacterial growth and increase both dyes decolorization are discussed. This research shows the importance of exploring the effect of metal ions on dye degradation by bacteria with this capacity, for their subsequent use and optimization in bioremediation processes.

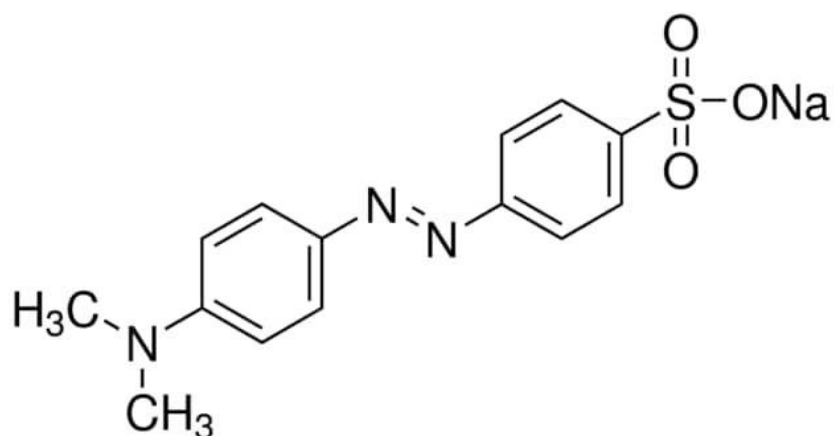
**Keywords:** *Shewanella*, decolorization, azo dyes, aluminum.

## I. Introducción

### 1.1 Delimitación del problema

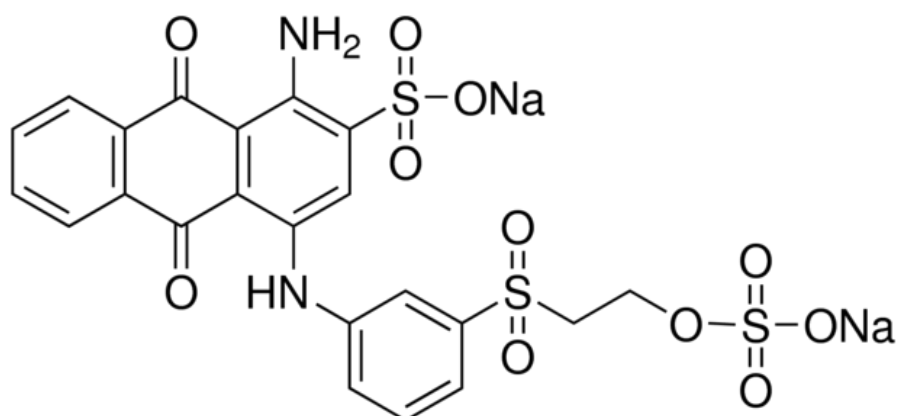
La industria textil es, después de la industria del petróleo, la segunda que más contaminación genera en el medio ambiente (Sánchez, M. & Uribe, C. 2018). En las últimas dos décadas, la contaminación por colorantes textiles en los cuerpos de agua se ha incrementado, debido principalmente al proceso de industrialización (Phugare *et al.*, 2011) y a las grandes cantidades de agua necesarias en el proceso de teñido: hasta 150 litros por kilogramo de algodón (Hai *et al.*, 2006). A nivel mundial, se sugiere que los volúmenes de los efluentes textiles se duplicarán para el 2025, año en el que un total de 1800 millones de personas vivirían con una grave escasez de agua. En el Perú, el volumen real de aguas residuales producidas por industrias formales e informales no es conocido con exactitud (Sánchez, M. & Uribe, C. 2018).

Dentro de los colorantes utilizados en la industria textil se encuentran los de tipo azoico, siendo la clase más importante y numerosa en cuanto a aplicaciones comerciales (Singh *et al.*, 2015), constituyendo el 60% de los colorantes sintéticos utilizados industrialmente (Routoula & Patwardhan, 2020). Se trata de compuestos aromáticos con uno o más grupos azo ( $R-N=N-R'$ ) en su estructura (Suzuki H., 2019). Estos colorantes son recalcitrantes en la naturaleza y se estima que al año se descargan  $2.8 \times 10^5$  toneladas en los efluentes industriales en todo el mundo (Jin *et al.* 2007). Su presencia y persistencia en el ecosistema alteran los ciclos biogeoquímicos debido a su color, aumentan el pH del medio e incrementan la demanda de oxígeno (Sudha *et al.*, 2014). Se ha estudiado la carcinogenicidad de los colorantes azoicos, principalmente de los productos de su descomposición (Jadhav *et al.*, 2010). Entre ellos, la bencidina, puede inducir diversos tumores en humanos y animales, mientras que la p-fenilendiamina actúa como un alérgeno de contacto (Chung, K. 2016). A esta clase de colorantes pertenece el anaranjado de metilo, cuya estructura puede ser vista en la Figura 1.



**Figura 1.** Estructura molecular del colorante azo Anaranjado de metilo.

Por otro lado, en los efluentes textiles es posible encontrar también colorantes de tipo antraquinona, cuya estructura consiste en tres anillos de benceno fusionados, estructura conocida como antraceno, con dos grupos carbonilo en el anillo central. Esta clase de colorantes constituyen el 15% de los utilizados industrialmente (Routoula & Patwardhan, 2020) y al igual que los colorantes azoicos, son compuestos aromáticos con estructuras complejas y estables, lo que hace difícil su degradación. El colorante de tipo antraquinona utilizado en el presente trabajo de investigación es el azul brillante de remazol R (Figura 2).



**Figura 2.** Estructura molecular del colorante Azul brillante de remazol R.

Así mismo, los efluentes textiles suelen contener otros contaminantes, tales como metales, pentaclorofenol, blanqueadores, formaldehído, sustancias biocidas y suavizantes (Correia *et al.*, 1994). La presencia de estos colorantes y los contaminantes acompañantes tiene implicaciones en la salud de los



humanos, y pueden afectar el crecimiento de plantas, algas, bacterias y protozoarios (Sponza D. 2002).

Actualmente, existen varios métodos para tratar los efluentes textiles, entre los que destacan métodos fisicoquímicos como la filtración, uso del carbón activado, la coagulación y la floculación química (Singh *et al.*, 2015). Sin embargo, a pesar de su efectividad, éstos son por lo general caros e implican la formación de lodos concentrados, los cuales deben ser nuevamente eliminados mediante otros métodos (Gogate & Pandit, 2004).

El uso de bacterias para reducir colorantes textiles es considerado una alternativa más económica y con un menor impacto medioambiental (Jadhav *et al.*, 2010). Debido a la naturaleza ubicua de los microorganismos, es posible encontrar bacterias con la capacidad de degradar colorantes en los propios efluentes textiles (Olukanni *et al.*, 2006), y pueden utilizarse tanto en cultivos puros como en consorcios (Pearce *et al.* 2003). Sin embargo, el proceso de reducción de colorantes debe ser debidamente caracterizado y optimizado, lo cual puede verse complicado por la gran variedad de compuestos presentes en los efluentes textiles (Correia *et al.*, 1994).

## 1.2 Pregunta del problema

¿Los iones de aluminio ( $Al^{3+}$ ) mejoran el proceso de reducción de colorantes azoicos y del tipo antraquinona, realizado por la bacteria *Shewanella xiamenensis* LC6?

## 1.3 Justificación de la investigación

En la actualidad, existen distintos métodos físicos, químicos o biológicos para la remediación de efluentes textiles. Los métodos fisicoquímicos suelen ser costosos y producen concentrados perjudiciales para los ecosistemas. Ante ello, se buscan alternativas como el uso de microorganismos, principalmente hongos y bacterias, para la degradación de estas sustancias que se han convertido en uno de los contaminantes más comunes en cuerpos de agua (Sánchez, M. & Uribe, C. 2018). Uno de los géneros bacterianos más estudiados con esta finalidad es *Shewanella*, cuyas especies son capaces de degradar la mayoría de

los tintes textiles, usándolos como aceptores de electrones, reduciéndolos y degradándolos en aminas incoloras (Hong & Gu, 2010) que también pueden ser metabolizadas (Yang *et al.*, 2011).

Para la utilización efectiva de los microorganismos en biorremediación de colorantes se debe evaluar y conocer las mejores condiciones de crecimiento y biodegradación *in vitro*, así como explorar elementos optimizadores de este proceso. De la amplia gama de iones metálicos, se ha explorado y documentado muy poco, pese a que muchos de estos se encuentran en los mismos efluentes textiles interaccionando con los microorganismos (Correia *et al.*, 1994; Jadhav *et al.*, 2010). Se ha documentado que los iones de  $Fe^{3+}$ , en concentraciones bajas, pueden mejorar la reducción de colorantes azoicos por *Shewanella decolorationis* (Chen *et al.*, 2010), mientras que la presencia de iones de mercurio afecta la degradación del colorante tipo antraquinona azul reactivo brillante KGR por parte de *S. decolorationis* (Xu *et al.*, 2005). El presente trabajo busca evaluar el efecto de los iones de  $Al^{3+}$  en la reducción de colorantes azoicos y de tipo antraquinona, siendo este el metal más abundante en la corteza terrestre y un competidor de los iones  $Fe^{3+}$  y  $Mg^{2+}$ , debido a su semejanza en cuanto a radio iónico (Hu & Boyer, 1996; Piña & Cervantes, 1996).

## II. Estado del conocimiento

### 2.1 El género *Shewanella* en la reducción de colorantes azoicos y de tipo antraquinona

*Shewanella* es un género bacteriano de la clase *Gammaproteobacteria*, perteneciente al orden *Alteromonadales* y familia *Shewanellaceae* que actualmente agrupa a más de 60 especies. Se trata de bacilos Gram-negativos, flagelados, de un tamaño de 1-3  $\mu m$ , y de metabolismo anaerobio facultativo (Yousfi *et al.*, 2017).

El género de bacterias *Shewanella* ha sido extensamente estudiado en la biorremediación de colorantes textiles. Se trata de uno de los grupos bacterianos más versátiles y adaptables, con resistencia a alta salinidad y metales pesados (Tiedje JM. 2002). Muchos de los sustratos utilizados como aceptores de electrones por *Shewanella* son elementos tóxicos y metales insolubles (Hau & Gralnick, 2007). La mayoría de los miembros del género tienen el potencial de biorremediar contaminantes orgánicos halogenados y reducir metales pesados,

siendo un género ampliamente interesante para estudios genómicos y aplicaciones biotecnológicas en biorremediación (Xu *et al.*, 2005).

*Shewanella* agrupa a bacterias heterótrofas anaerobias facultativas que en ausencia de oxígeno tienen, en su mayoría, la capacidad de usar una gran variedad de aceptores de electrones, tales como metales pesados (Manganeso, Cromo, Uranio, Hierro, etc.), tiosulfato, sulfito, colorantes, compuestos nitrogenados, entre otros (Ng *et al.* 2014). Las especies de este género están ampliamente distribuidas en sedimentos o agua de mar, habitando en las profundidades y a bajas temperaturas. A pesar de esta versatilidad y su ubicuidad, la mayoría de los estudios se han centrado solo en las especies *Shewanella decolorationis* y *Shewanella oneidensis* (Gorby *et al.*, 2006). Acerca de *Shewanella xiamenensis*, se cuenta con menos estudios sobre su uso potencial en biorremediación, a pesar de que se ha demostrado su capacidad de reducir colorantes tales como Rojo Congo (Ng, *et al.*, 2014).

Cuando *S. oneidensis* y *S. decolorationis* usan a los colorantes textiles tipo azo como aceptores de electrones se termina por romper el enlace azo de la estructura del colorante, lo que provoca la escisión de la molécula y la pérdida del color en el medio tras la formación de aminas incoloras (Yang *et al.*, 2011). Las especies de *Shewanella* tienen esta capacidad gracias a la producción de enzimas azo-reductasas, las cuales pueden contener o no flavina; y utilizan el nicotinamida adenina dinucleótido (NAD<sup>+</sup>) o nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP<sup>+</sup>) como equivalentes de reducción. Estas están principalmente involucradas en la biotransformación y desintoxicación de colorantes azoicos, nitro-aromáticos y fármacos azoicos (Misal & Gawai, 2018).

Con respecto a los colorantes de tipo antraquinona, se ha reportado que algunas especies del género *Shewanella* son capaces de reducirlos, tales como *S. decolorationis* (Xu *et al.*, 2006), *S. xiamenensis* (Lizárraga W., 2019) y *S. algae* (Lizárraga *et al.*, 2022). En el caso de este tipo de colorantes, el aceptor de los electrones es el grupo carbonilo presente en la molécula del colorante, el cual es reducido por la donación de electrones. Sin embargo, debido a efectos de resonancia y estructura, la degradación de colorantes tipo antraquinona resulta más difícil en comparación con los colorantes azoicos (Routoula & Patwardhan, 2020).

## 2.2 Efecto de los iones metálicos en la reducción de colorantes por *Shewanella* spp.

Los iones metálicos desempeñan un papel importante en las reacciones de óxido-reducción en los seres vivos, acelerando la transferencia de electrones al unirse a los aceptores (Fukuzumi & Ohkubo, 2010). Debido a la presencia de iones metálicos en los efluentes textiles (Xu *et al.*, 2005), es importante evaluar el efecto de su presencia en la aplicación de la degradación de colorantes textiles por bacterias u hongos.

Se han realizado estudios en el que se evalúan los efectos de los iones metálicos en la degradación de distintas moléculas. Nakanishi *et al.* (2016) reportaron que la presencia de  $Al^{3+}$  aceleró la eliminación del radical 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) mediante la transferencia de electrones por parte de hidroquinona y sus derivados metilhidroquinona ( $MeQH_2$ ), 2,6-dimetilhidroquinona ( $Me_2QH_2$ ), trimetilhidroquinona ( $Me_3QH_2$ ) y tetrametilhidroquinona ( $Me_4QH_2$ ), esto gracias a que los iones  $Al^{3+}$  mejoraron la capacidad de aceptación de electrones del DPPH e incrementaron la constante de velocidad de la reacción. Asimismo, Nakamura *et al.* (2013) describieron que la transferencia de electrones de *S. loihica* PV-4 se incrementa en presencia de nanocoloides de óxido de hierro ( $Fe^{3+}$ ), gracias a que se genera un circuito por el cual pueden desplazarse electrones a mayores distancias debido a la propiedad semiconductor de estas nanopartículas (Nakamura *et al.*, 2009). En cuanto a la reducción de colorantes textiles, la mayoría de los estudios han sido dirigidos a evaluar el efecto de iones metálicos en la reducción de colorantes azoicos, mientras que los que utilizan colorantes de tipo antraquinona son escasos.

En el caso de *Shewanella*, Imran *et al.* (2015) estudiaron el efecto de diversos iones metálicos en la decoloración del colorante azoico Reactive black-5, la actividad azorreductasa y el crecimiento de *Shewanella* sp. cepa IFN4. Los resultados indicaron que los iones  $Cr^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  no inhibieron ninguna de las tres variables evaluadas, mientras que los metales  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  y  $Co^{2+}$  sí retrasaron el proceso de degradación y el crecimiento bacteriano. Por el contrario, el  $Cd^{2+}$  inhibió por completo el proceso de degradación. Por otra parte, Xu *et al.* (2015), evaluaron el efecto de 0 a 10 ppm de  $HgCl_2$  en la degradación del colorante tipo antraquinona azul brillante reactivo K-GR por parte de *S. decolorationis* S12, se encontró que, a mayor presencia de esta sal en el medio, la reducción del colorante era menor.

Por otra parte, Xu *et al.* (2007) evaluaron el efecto de los iones de hierro  $Fe^{3+}$  en la degradación por *S. decolorationis* S12. En este estudio, se halló que el ion férrico es capaz de mejorar la eficiencia de reducción de Rojo de metilo, a medida que su concentración aumentaba de 0 a 6 mM, llegando a una eficiencia máxima de 90.1% en 7 horas. Resultados similares obtenidos por Fang *et al.*, (2015) fueron reportados al evaluar el efecto del  $Fe^0$  en la decoloración por *S. decolorationis* S12, hallándose que el hierro elemental también potenciaría la reducción al ser agregado en concentraciones pequeñas mediante la estimulación del crecimiento y actividad microbiana. Por otra parte, también se ha evaluado el efecto del ion divalente  $Fe^{2+}$ , el cual no mejoraría la eficiencia de degradación (Xu *et al.*, 2007). Por el contrario, Chen *et al.*, (2010) determinaron que ambos iones de hierro,  $Fe^{3+}$  y el  $Fe^{2+}$ , en concentraciones de hasta 0.4 mM, incrementan la degradación por *S. decolorationis* S12. Imran (2013) reportó un resultado similar: los iones  $Fe^{3+}$  pueden mejorar levemente la decoloración por *Shewanella* sp. IFN4 sin incrementar la actividad enzimática.

Por el momento, no está claro el mecanismo por el cual el hierro potenciaría la reducción de los colorantes. Se ha relacionado la reducción de  $Fe^{3+}$  en la cadena de transporte de electrones que frente a la falta de oxígeno (en condiciones de anaerobiosis o microaerobiosis) usa al hierro como aceptor final de electrones (Woźnica *et al.*, 2003). Sumado a esto, enzimas como deshidrogenasas, citocromos y menaquinonas son componentes esenciales del transporte de electrones para la reducción del grupo azo en *S. decolorationis* S12 (Hong *et al.*, 2006 a, b); y se ha descrito que la inhibición de esta cadena afecta la reducción de  $Fe^{3+}$ , por lo que ambos procesos estarían estrechamente relacionados (Xu *et al.*, 2007). En otro estudio con *S. decolorationis* S12, a pesar de la implicancia de la cadena transportadora de electrones, inhibidores como metirapona, dicumarol y estigmatellina no detuvieron por completo la reducción de los colorantes azoicos, sugiriendo que esta cepa expresaría al menos dos reductasas fisiológicamente distintas que servirían como donantes de electrones a  $Fe^{3+}$  y al enlace azo respectivamente (Xu *et al.*, 2007). Por otra parte, Chen *et al.*, (2010) encontraron que al agregar  $Fe^{3+}$  al medio, disminuye la inhibición de la degradación por dicumarol, un bloqueador del ciclo de quinonas presente en la cadena de transporte de electrones, lo que sugiere que los iones de hierro podrían realizar la función de la menaquinona como intermediarios en la transferencia de electrones hacia el enlace azo de los colorantes.

En cuanto a la expresión de genes relacionados a la reducción de colorantes, se ha reportado que el  $\text{Fe}^{3+}$  puede inducir una mayor expresión de los genes *mtrC*, *mtrB*, *mtrA* y *omcA* en *Shewanella* sp. ANA-3; mientras que, en presencia de citrato de hierro, la expresión de los mismos genes se llegó a cuadruplicar (Reyes et al. 2010). Estos genes conforman el *cluster mtr-omc*, cuya expresión es esencial para la transferencia de electrones extracelular y la reducción de metales (Ghasemi et al. 2020), se encuentra de forma conservada en diversas especies de *Shewanella* (Wang et al. 2008). Asimismo, el *cluster mtr-omc* ha sido relacionado con el proceso de degradación de colorantes azoicos en distintas especies de *Shewanella* (Hong Y-G & Gu J.D., 2010; Mani et al., 2019), tales como en *S. onediensis* (Cai et al. 2012). Estos datos sugieren que la presencia de hierro a ciertas concentraciones podría ser beneficiosa para la reducción de los colorantes tipo azo, sin competir con los mismos por los electrones a transferir. Estos hallazgos podrían ayudar a optimizar el tratamiento de efluentes textiles, en particular si se emplean especies del género *Shewanella*.

Actualmente se tiene muy poca información acerca de la interacción que habría entre *S. xiamenensis* y los iones metálicos (Liu et al., 2011), pese a que esta especie tiene la capacidad de reducir colorantes azoicos (Ng, et al. 2014) y a que los iones metálicos están presentes en los efluentes textiles (Correia et al., 1994). Aún más escasa es la información acerca del efecto del aluminio en el crecimiento y capacidad de degradación de *Shewanella* spp. (Ng et al., 2014).

### **2.3 Interacciones entre el aluminio y las bacterias**

La interacción que tendría el aluminio con las bacterias ha sido muy poco estudiada debido a su baja biodisponibilidad y porque no tiene funciones biológicas definidas (Soni et al., 2001). Sin embargo, se han propuesto diversos mecanismos mediante los cuales los iones de aluminio ( $\text{Al}^{3+}$ ) podrían afectar al crecimiento de células eucariotas y bacterias.

En principio, se ha descrito en células eucariotas que los iones de aluminio afectarían la integridad de las membranas celulares, ya que tienen la capacidad de unirse a los grupos fosfatos de los fosfolípidos, alterando así las interacciones

proteínas-lípidos y el transporte de membrana (Phugare *et al.*, 2011). Además, los iones de aluminio pueden disminuir las cargas negativas de los fosfolípidos o residuos de proteínas cargados negativamente, bloqueando y/o alterando el potencial de superficie (Kinraide *et al.*, 1992). En rizobacterias, se ha propuesto que la carga superficial puede ser un factor importante en la interacción con el aluminio (Flis *et al.*, 1993), en la que se generarían uniones electrostáticas de polímeros de aluminio que afectarían la carga superficial de las bacterias (Wood & Cooper, 1984). En *E. coli*, el aluminio puede quedar asociado en la estructura intracelular y extracelular (Guida *et al.*, 1991).

Por otra parte, se ha documentado que el aluminio interfiere con una variedad de procesos biológicos debido a su capacidad de imitar otros elementos, muchos de ellos esenciales para las células, como el Fe, Ca, P y Mg. Se ha descrito que las vías de señalización mediadas por iones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) son perturbadas por el aluminio (Mundy *et al.*, 1997). Por otro lado, en células eucariotas, el aluminio puede interferir con la función de la quinasa C, incluso a concentraciones traza (Quarles *et al.*, 1994), y con la homeostasis del cAMP (Hartle *et al.*, 1996). El aluminio también interferiría con el metabolismo del fosfato en bacterias, disminuyendo la tasa de crecimiento debido a la disminución de las concentraciones de fosfato disponibles como resultado de la formación de complejos con el aluminio (Flis *et al.*, 1993). La razón por la que el  $\text{Al}^{3+}$  compite con los iones  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  no se conoce completamente, sin embargo, es posible que se deba a la similitud en cuanto a sus radios iónicos, siendo de 0,54 Å, 0,64 Å y 0,72 para el  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , respectivamente (Macdonald & Martin, 1988). De forma similar, los iones  $\text{Ga}^{3+}$  compiten con  $\text{Fe}^{3+}$  en distintos en la captación por sideróforos bacterianos (Kircheva & Dudev, 2020) y en la unión a metaloproteínas (Nikolova *et al.*, 2016), y ambos presentan un radio iónico similar (0,62 Å y 0,64 Å, respectivamente).

Así mismo, el  $\text{Al}^{3+}$  tendría la capacidad de unirse a las cadenas de ADN en bacterias del género *Rhizobium*, tanto en cepas sensibles como tolerantes, mediante la penetración de las envolturas celulares (Johnson, A & Wood, M. 1990). El  $\text{Al}^{3+}$  también podría tener un efecto mutagénico en *Rhizobium* por sus efectos similares a la mitomicina C, un conocido mutágeno, y sobre la viabilidad y morfología celular (Wood, M. 1995). Pese a que el efecto del  $\text{Al}^{3+}$  es generalmente negativo para el crecimiento bacteriano, es capaz de producir un incremento en la síntesis de ADN (Johnson & Wood, 1990), lo cual ha sido

asociado a una respuesta de reparación mutagénica de tipo SOS, descrita en *Escherichia coli* (Walker, G. 1985). Posteriormente, Octive *et al.*, (1991) proporcionaron más pruebas de los posibles efectos mutagénicos del aluminio, al comprobar que este metal inhibía la multiplicación de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii* y *Rhizobium loti*, y provocaba un aumento de la resistencia a la rifampicina en ambas cepas. De acuerdo con estos antecedentes, se hace necesario mayores estudios acerca de los efectos del aluminio sobre el genoma bacteriano.

Otro mecanismo propuesto sobre la toxicidad del aluminio es su capacidad de competir con los cationes de magnesio ( $Mg^{2+}$ ), debido principalmente a la similitud de tamaño entre ambos iones (Piña & Cervantes, 1996). Esto permite que el  $Al^{3+}$  inhiba enzimas dependientes de  $Mg^{2+}$ , uniéndose a los sitios originalmente destinados para este último (Macdonald & Martin, 1988). Algunas de estas enzimas cumplen importantes funciones biológicas, tales como las fosfatasas y las ADN polimerasas. Así mismo, el  $Al^{3+}$  tiene la capacidad de unirse al ATP hasta  $10^7$  veces más fuerte que el  $Mg^{2+}$ , lo cual afectaría a las enzimas que formen complejos iones-ATP-enzima para cumplir sus funciones (Macdonald & Martin, 1988). También se sabe que la estabilización del ATP y la dinámica de la membrana catalizada por el magnesio se ven afectadas por el aluminio (Nayak, P. 2002). Además, se ha descrito *in silico* que los iones de aluminio podrían desencadenar cambios conformacionales y alteración de los estados de protonación de cadenas proteicas (Mujika *et al.* 2014). Si bien esto ha sido estudiado principalmente en células eucariotas, el efecto en células bacterianas podría ser similar.

Todos estos mecanismos tendrían como resultado la inhibición del crecimiento microbiano, lo cual ha sido documentado en algunos estudios, sin embargo, hasta el momento, los mecanismos de unión, transporte y almacenamiento del aluminio en bacterias siguen siendo poco conocidos (Exley & Mold, 2015). Kurniawan *et al.*, (2018), observaron que en cepas de *Vibrio alginolyticus*, *Brochothrix thermosphacta* y *Pseudomonas aeruginosa* aisladas a partir de depósitos de aluminio, el crecimiento microbiano de estas fue inversamente proporcional a la concentración de los iones en el medio, a pesar de ser altamente tolerantes a dicho metal.



Por otra parte, se ha reportado en *E. coli* que los sistemas de transporte de hierro estarían implicados en la adsorción y resistencia al aluminio, así como que este metal induce y forma complejos con sideróforos quelantes de hierro en bacterias alcalófilas (Piña R. 1996). Se conoce que el aluminio compite con el hierro en los sistemas biológicos si ambos elementos están presentes simultáneamente. En *Bacillus megaterium* ATCC 19213, se ha descrito que, a bajas concentraciones de aluminio, la absorción mediada por sideróforos fue el proceso dominante para su acumulación. Por el contrario, a altas concentraciones de aluminio, el transporte pasivo dominó y los sideróforos más bien ralentizaron el transporte pasivo de aluminio a la célula. La producción de sideróforos solo fue afectada por el aluminio en cultivos a concentraciones limitadas de hierro, y esta producción continuó en fase estacionaria (Hu & Boyer, 1996). Esta competencia por los sideróforos e inducción de su síntesis se debería a la similitud en el radio iónico entre  $Al^{3+}$  y  $Fe^{3+}$  (Macdonald & Martin, 1988; Hu & Boyer, 1996), lo que permitiría que el ion de aluminio forme fácilmente estos complejos (Garrison & Crumbliss, 1987) para luego ser transportado a la célula bacteriana. Actualmente, no se sabe el tipo de interacción o mecanismo de captación de aluminio en bacterias del género *Shewanella*.

Otro aspecto estudiado fue el efecto del aluminio en la motilidad bacteriana. Se ha descrito que en *E. coli*, la presencia de aluminio en concentraciones entre 1 a 10 ppm y a pH 5.5, hay una inducción en la expresión del gen *fliC*, el cual codifica la flagelina que constituye los flagelos bacterianos, importantes en la motilidad e invasión del medio (Guzzo *et al.*, 1991). En cuanto al género *Shewanella*, se ha reportado además que en medio sólido suplementado con 1mM de  $Al^{3+}$ , hay un incremento de la motilidad por *swarming* de la cepa S. BC01 y se mantiene la producción de *nanowires*, lo que estaría relacionado con una mayor actividad de los flagelos, un incremento en la capacidad de colonización del medio, la inducción de la producción de ramnolípidos, y la reducción de iones metálicos y colorantes de tipo azo (Ng *et al.* 2015).

### III. Objetivos

#### 3.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de los iones de  $Al^{3+}$  en la reducción del colorante azoico Anaranjado de Metilo y el colorante tipo antraquinona Azul brillante de Remazol R por *Shewanella xiamenensis* LC6.

### 3.2 Objetivos específicos

- Definir el efecto de  $Al^{3+}$  en el crecimiento de *Shewanella xiamenensis* LC6.
- Medir la degradación de Anaranjado de metilo en presencia de distintas concentraciones de  $Al^{3+}$  en un intervalo de tiempo determinado.
- Medir la degradación de Azul Brillante de Remazol R en presencia de distintas concentraciones de  $Al^{3+}$  en un intervalo de tiempo determinado.

## IV. Hipótesis

### 4.1 Hipótesis nula ( $H_0$ )

Los iones de  $Al^{3+}$  no tienen un efecto optimizador en el proceso de reducción de los colorantes Anaranjado de metilo y Azul brillante de Remazol R por *Shewanella xiamenensis* LC6.

### 4.2 Hipótesis alternativa ( $H_1$ )

Los iones de  $Al^{3+}$  tienen un efecto optimizador en la reducción de los colorantes Anaranjado de metilo y Azul brillante de Remazol R por *Shewanella xiamenensis* LC6.

## V. Materiales y métodos

### 5.1 Medios de cultivo

Para la reactivación de *Shewanella xiamenensis* LC6, se utilizó caldo Luria-Bertani (Merck). Para la obtención de colonias aisladas y la verificación de la pureza se utilizó Agar Nutritivo (Merck) y/o Agar CASO (Merck).

En el caso de la evaluación del crecimiento microbiano se utilizó el caldo ZZ (Zhou-Zimmermann, 1993), el cual se elaboró a partir de dos soluciones (Tabla 1 y 2) y se suplementó con 10 y 20 ppm de  $Al^{3+}$ . Para evaluar la degradación de los colorantes se utilizó el caldo ZZ suplementado con 100 ppm de Anaranjado de Metilo y Azul Brillante de Remazol R, y 10 y 20 ppm de  $Al^{3+}$ . La fuente de  $Al^{3+}$  para ambos experimentos fue una solución de agua destilada y sulfato de aluminio hidrato ( $Al_2(SO_4)_3 \cdot H_2O$ ) (Sigma-Aldrich) a una concentración de 1000 ppm del ion  $Al^{3+}$ , preparada utilizando una fiola aforada de 50 mL. Esta solución fue diluida en el caldo ZZ hasta alcanzar las concentraciones de 10 y 20 ppm. Todos los medios de cultivo utilizados fueron ajustados a pH 7 utilizando KOH.

**Tabla 1.** Composición de la solución A en concentración 10X del caldo ZZ.

	<b>g/L</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	26.6
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	45.2

**Tabla 2.** Composición de la solución B en concentración 1X del caldo ZZ.

	<b>g/L</b>
Extracto de levadura granulada	5

## **5.2 Reactivación de la cepa**

El presente trabajo se realizó utilizando la cepa *Shewanella xiamenensis* LC6, proporcionada por el banco de cepas del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM).

Para su reactivación, se extrajo una alícuota del cepario y se sembró en caldo Luria-Bertani (Merck), incubándolo a temperatura ambiente por 14 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó un repique al 1% (v/v) en un matraz con 40 mL de caldo Luria-Bertani (LB), el cual se incubó a 30 °C durante 8 horas sin agitación, de modo que se obtuvo un cultivo fresco para las evaluar el crecimiento microbiano y degradación. Posteriormente, se sembró mediante el método de estriado por agotamiento en agar nutritivo (Merck) o agar CASO (Merck), con el propósito de verificar la pureza de las cepas.

## **5.3 Cuantificación del crecimiento de *S. xiamenensis* LC6**

La cuantificación del crecimiento de *S. xiamenensis* LC6 se realizó por el método de medición de la densidad óptica.

Primero, del reactivado realizado en un matraz de 40 mL de caldo LB al 1% (v/v), se tomó 10 mL del cultivo y se centrifugó a 7500 rpm por 8 minutos. Se retiró el sobrenadante y se realizó un lavado con 5 mL de Buffer fosfato salino (PBS), de esta manera se concentró las bacterias. Dicho proceso se repitió tres veces, realizándose tres lavados en total. Luego, se inoculó al 2.5% (v/v) en tubos con 10 mL de medio ZZ con 0, 10 y 20 ppm de  $Al^{3+}$ . Para las concentraciones de 0 y 10 ppm de  $Al^{3+}$  se tuvo un triplicado, mientras que la condición de 20 ppm de  $Al^{3+}$ , se realizó por duplicado. En todos los casos, se tuvo un control negativo que funcionó también como solución blanco (medio ZZ con la concentración de  $Al^{3+}$  respectiva, sin inocular).

Una vez inoculados, cada uno de los tubos se homogenizó con el uso de un vórtex y se dispensó 200  $\mu$ L a cada uno de los pocillos de una microplaca. Posteriormente, la microplaca fue colocada en el equipo E-poch 2 (Biotek®), el cual fue configurado para realizar una lectura con una longitud de onda de 600 nm, cada 1 hora durante 15 horas, a una temperatura constante de 30 °C, sin agitación.

La gráfica y el análisis estadístico de la data obtenida se realizó con el programa GraphPad Prism 8 (Thanavel *et al.*, 2020). Se utilizó el Análisis de la varianza de dos vías para mediciones repetidas (*Repeated measures Two-way ANOVA*) para analizar las diferencias en el crecimiento de *S. xiamenensis* LC6 en presencia de las tres concentraciones de iones de aluminio.

#### **5.4 Evaluación de la degradación de Anaranjado de metilo en presencia de aluminio ( $Al^{3+}$ )**

Primero, del reactivado realizado en un matraz con 40 ml de caldo LB al 1% (v/v), se recolectó 24 mL del cultivo y se centrifugó a 7500 rpm por 8 minutos. Se retiró el sobrenadante y se realizó un lavado con 12 mL de buffer fosfato salino (PBS), de esta manera se concentró las bacterias. Dicho proceso se repitió tres veces, realizándose tres lavados en total.

Luego, se inoculó al 2.5% (v/v) en matraces con 50 mL de medio ZZ con 100 ppm de Anaranjado de Metilo (Lizárraga W. 2019), y 0 ppm de  $Al^{3+}$ , 10 ppm de  $Al^{3+}$  y 20 ppm de iones de aluminio ( $Al^{3+}$ ). Cada condición se realizó por triplicado

y con un control negativo (medio ZZ, 100 ppm de Anaranjado de Metilo, y la concentración de Al<sup>3+</sup> respectiva, sin inocular). Se homogenizó cada matraz y se dispensó 5 mL en tubos de centrifuga de 15 mL de capacidad. La incubación se realizó a 30 °C, y cada 2 horas se centrifugó 4 cuatro tubos por cada condición (triplicado y control), a 10 °C y 7500 rpm por 8 minutos. El sobrenadante de cada tubo fue dispensado en una microplaca y se realizó la lectura de absorbancia a 420 nm en el equipo E-poch 2 (Biotek®).

El porcentaje de degradación se calculó por medio de la siguiente fórmula (Kurade *et al.*, 2015):

$$\text{Degradación (\%)} = \frac{\text{Absorbancia}_{\text{inicial}} - \text{Absorbancia}_{\text{final}}}{\text{Absorbancia}_{\text{inicial}}} \times 100$$

El análisis de la data obtenida se realizó con el programa GraphPad Prism 8 (Thanavel *et al.*, 2020). Se utilizó el Análisis de la varianza de dos vías (*Two-way ANOVA*) con prueba de Tukey para analizar la significancia de las diferencias en la degradación producida por *S. xiamenensis* LC6 en la presencia de las tres concentraciones de iones de aluminio.

### **5.5 Evaluación de la degradación de Azul brillante de remazol R en presencia de aluminio (Al<sup>3+</sup>)**

Se realizó el mismo procedimiento descrito en el ítem 3.4, con la diferencia que los cultivos de *S. xiamenensis* LC6 en presencia del colorante y los iones fueron dispensados en tubos de centrifuga en el momento de la lectura. La incubación se realizó a 30 °C por 8 horas en total, y cada 1 hora se centrifugó 4 tubos con 5ml del cultivo por cada condición (triplicado y control), a 10 °C y 7500 rpm por 8 minutos. El sobrenadante de cada tubo fue dispensado en una microplaca y se realizó la lectura de absorbancia a 611 nm en el equipo E-poch 2 (Biotek®).

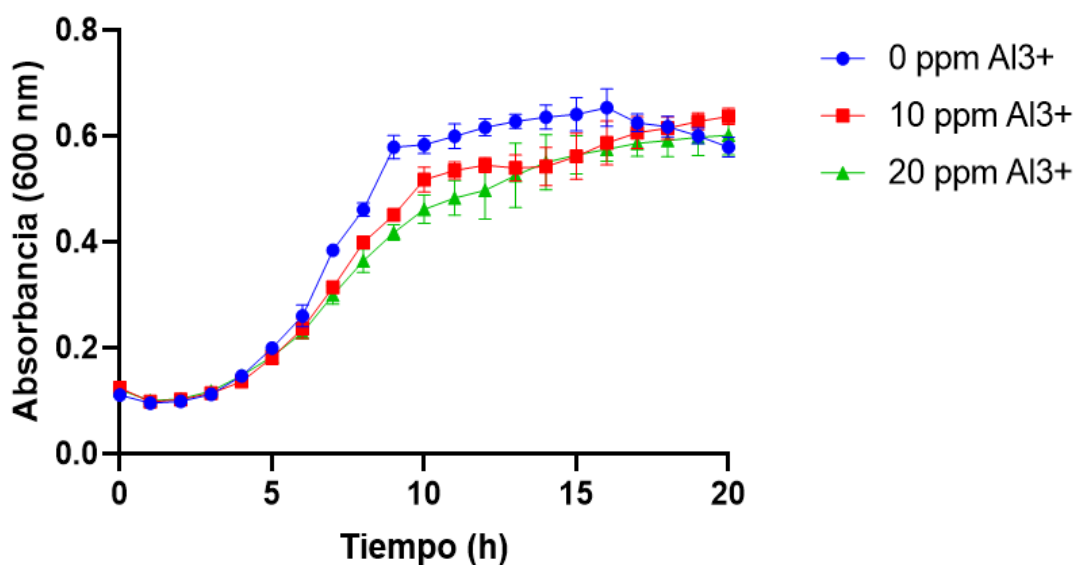
El porcentaje de degradación se calculó con la misma fórmula descrita previamente en el ítem 3.4. Para el análisis estadístico se utilizó el Análisis de la varianza de dos vías (*Two-way ANOVA*) con prueba de Tukey.

## VI. Resultados

### 6.1 Cuantificación del crecimiento de *S. xiamenensis* LC6

La cuantificación del crecimiento microbiano por espectrofotometría de *Shewanella xiamenensis* LC6 se realizó en un intervalo de 20 horas, tomándose la absorbancia cada hora con un haz de luz de 600 nm de longitud de onda.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 3. Se observó que la presencia de iones de aluminio ( $\text{Al}^{3+}$ ), tanto a 10 ppm como a 20 ppm, inhibiría levemente el crecimiento microbiano.



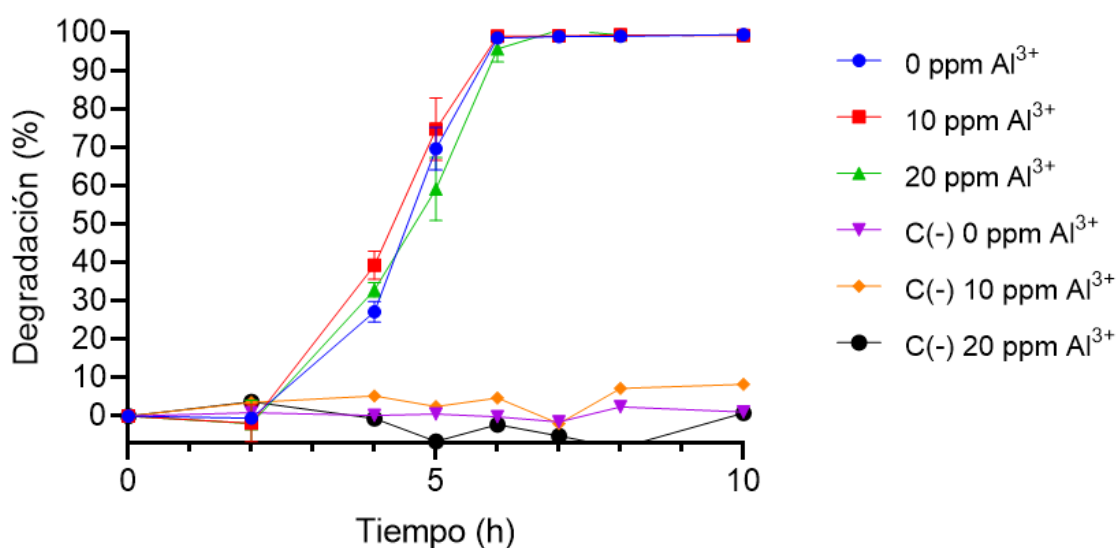
**Figura 3.** Cuantificación del crecimiento de *Shewanella xiamenensis* LC6 en medio ZZ mediante la medición de la densidad óptica a 600 nm. Se trabajó en tres condiciones distintas: ausencia de aluminio (línea azul), 10 ppm de  $\text{Al}^{3+}$  (línea roja), y 20 ppm de  $\text{Al}^{3+}$  (línea verde).

### 6.2 Evaluación de la degradación de Anaranjado de metilo en presencia de aluminio ( $\text{Al}^{3+}$ )

Se halló que la presencia de 10 ppm de iones de aluminio ( $\text{Al}^{3+}$ ) en el medio de cultivo tenía un efecto positivo en la degradación del colorante Anaranjado de Metilo. Tal como se muestra en la Figura 4, a las 4 horas, el porcentaje de degradación en promedio fue de 27.19% en ausencia del aluminio; 39.33%, en presencia de 10 ppm de aluminio; y de 32.91%, en presencia de 20 ppm de

aluminio. Es decir, la presencia de 10 ppm de aluminio habría mejorado en un 12.14% la degradación, mientras que 20 ppm de aluminio favoreció en un 5.72% en comparación al control, sin los iones metálicos. A las 5 horas, el porcentaje de degradación fue de 69.72% en ausencia de aluminio; 74.82%, en presencia de 10 ppm de aluminio; y de 59.19%, con 20 ppm de aluminio en el medio. A las 6 horas, el porcentaje fue similar en las tres condiciones: 98.65% en ausencia de iones de aluminio; 99.03%, en presencia de 10 ppm de aluminio; y 95.76% en presencia de 20 ppm de aluminio.

El aumento del porcentaje de degradación en presencia de 10 ppm en comparación al porcentaje de degradación obtenido en ausencia de  $Al^{3+}$  tras 4 horas de incubación fue significativa, según el análisis estadístico ANOVA de doble vía con prueba de Tukey para mediciones repetidas ( $p < 0.05$ ). Por el contrario, si bien se observa diferencia entre los porcentajes de degradación a las 5 y 6 horas, el análisis estadístico no reveló significancia estadística entre estos. Lo mismo ocurrió con los demás porcentajes a las 7, 8 y 10 horas, en los que los porcentajes eran cercanos al 100%.



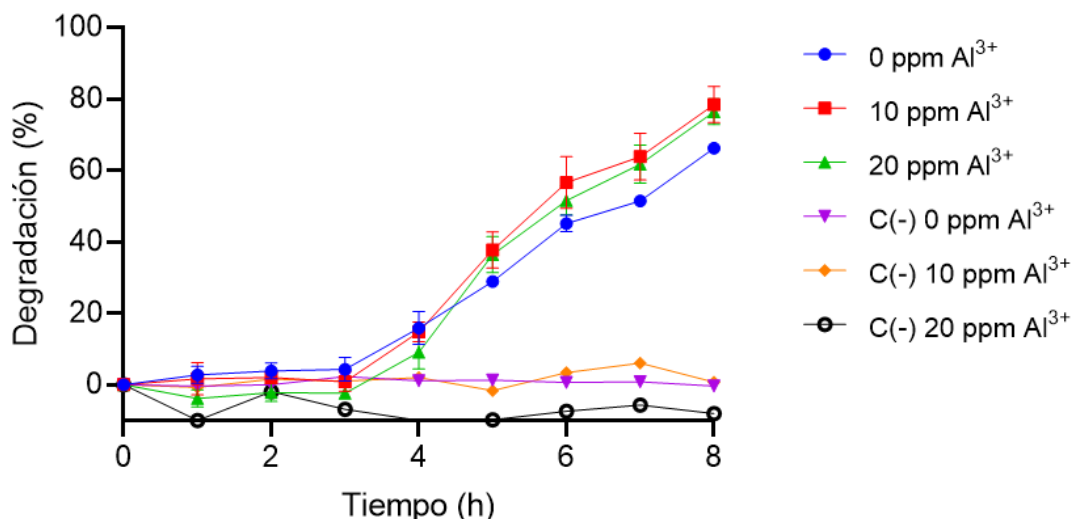
**Figura 4.** Evaluación de la degradación de *Shewanella xiamenensis* LC6 en medio ZZ suplementado con 100 ppm de Anaranjado de Metilo. Las concentraciones de aluminio utilizadas fueron de 10 ppm (línea roja), y 20 ppm (línea verde). También se tuvo una condición en ausencia de aluminio (línea azul). Los controles negativos para las condiciones de 0 ppm, 10 ppm y 20 ppm de  $Al^{3+}$  se representan con las líneas morada, amarilla y negra, respectivamente.

### 6.3 Evaluación de la degradación de Azul brillante de remazol R en presencia de aluminio ( $\text{Al}^{3+}$ )

Se demostró que la presencia de 10 y 20 ppm de iones de aluminio ( $\text{Al}^{3+}$ ) en el medio de cultivo tenía un efecto positivo en la degradación del colorante Azul brillante de remazol R. Como se muestra en la figura 5, a las 6 horas, el porcentaje de degradación fue de 45.16% en ausencia de  $\text{Al}^{3+}$ ; 56.55%, en presencia de 10 ppm de  $\text{Al}^{3+}$ ; y de 51.55%, con 20 ppm de  $\text{Al}^{3+}$  en el medio. Es decir, la presencia de 10 ppm de  $\text{Al}^{3+}$  habría mejorado en un 11.40% la degradación, mientras que 20 ppm de  $\text{Al}^{3+}$  favoreció en un 6.39%. A las 7 horas los porcentajes de degradación continuaron incrementando, siendo de 51.44% en ausencia de  $\text{Al}^{3+}$ ; 63.88%, en presencia de 10 ppm de  $\text{Al}^{3+}$ ; y de 61.70%, con 20 ppm de  $\text{Al}^{3+}$ . En este punto, la presencia de 10 ppm de  $\text{Al}^{3+}$  mejoró en un 12.44% la degradación, mientras que 20 ppm de  $\text{Al}^{3+}$  la favoreció en un 10.26%. Finalmente, a las 8 horas, el porcentaje de degradación fue de 66.24% en ausencia de iones de  $\text{Al}^{3+}$ ; 78.43%, en presencia de 10 ppm de  $\text{Al}^{3+}$ ; y 76.43% en presencia de 20 ppm de  $\text{Al}^{3+}$ .

El aumento del porcentaje de degradación en presencia de 10 ppm en comparación al obtenido en ausencia de  $\text{Al}^{3+}$  fue significativo tras 6, 7 y 8 horas de incubación, según el análisis estadístico ANOVA de doble vía con prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ). En cuanto al aumento de la degradación en presencia de 20 ppm de  $\text{Al}^{3+}$  en comparación al porcentaje en ausencia de los iones, la diferencia fue significativa solo tras 7 y 8 horas de incubación.





**Figura 5.** Evaluación de la degradación de *Shewanella xiamenensis* LC6 en medio ZZ suplementado con 100 ppm de Azul brillante de remazol R. Las concentraciones de aluminio utilizadas fueron de 10 ppm (línea roja), y 20 ppm (línea verde). También se tuvo una condición en ausencia de aluminio (línea azul). Los controles negativos para las condiciones de 0 ppm, 10 ppm y 20 ppm de Al<sup>3+</sup> se representan con las líneas morada, amarilla y negra, respectivamente.

## VII. Discusión de resultados

### 7.1 Cuantificación del crecimiento de *S. xiamenensis* LC6

Tal como se muestra en la Figura 1, la presencia de 10 ppm y 20 ppm de iones aluminio, equivalentes a 0.37 mM y 0.74 mM respectivamente, no favoreció el crecimiento de *Shewanella xiamenensis* LC6. Por el contrario, se observó un efecto inhibitorio al crecimiento de la cepa. Resultados similares obtuvieron Ng *et al.* (2015), quienes observaron una menor producción de biomasa de *Shewanella xiamenensis* BC01 cuando esta cepa, era cultivada en medio LB suplementado con 26.98 ppm de Al<sup>3+</sup>, en comparación al cultivo sin los iones metálicos. De forma general, el aluminio podría estar interfiriendo con una multiplicidad de procesos biológicos de *S. xiamenensis* LC6, inhibiendo su crecimiento: alterando la membrana externa al unirse a los grupos fosfato en los fosfolípidos (Londono *et al.*, 2017), desplazando al Mg<sup>2+</sup> (Macdonald, T. & Martin, R. 1988) y promoviendo la peroxidación de lípidos (Gutteridge *et al.* 1985). La unión a la membrana puede alterar también las interacciones de proteínas

(Zambenedetti *et al.* 1994), promover la agregación de cadenas fosforiladas (Luque *et al.* 2014); alterar el transporte de membrana (Phugare *et al.* 2011), y la carga superficial (Flis *et al.* 1993). Estas interacciones han sido reportadas principalmente en organismos eucariotas, pero también en bacterias como *E. coli*, donde se ha hallado que el aluminio es capaz de asociarse a la membrana bacteriana, causando alteraciones estructurales y funcionales y un incremento del transporte intracelular de otros metales (Zatta *et al.* 2002; Londono *et al.* 2017).

También existe la posibilidad de que el aluminio esté ingresando a *S. xiamenensis* LC6, mediante adsorción pasiva a través de las paredes bacterianas (Ng *et al.*, 2015; Londono *et al.*, 2017) y/o por la captación mediada por sideróforos quelantes de hierro (Hu & Boyer, 1996; Guida *et al.* 1991), la cual ha sido previamente observada en *P. fluorescens* (Apanna *et al.*, 2003), *Rhizobium* (Roy & Chakrabarty, 2000) y *Bacillus megaterium* (Hu & Boyer, 1996). Hasta el momento no se ha reportado lo mismo en *Shewanella* spp., sin embargo, *S. xiamenensis* LC6 presenta algunos genes codificantes de proteínas relacionadas a la captación de complejos sideróforo-hierro, tales como el transductor de energía *TonB*, receptores dependientes de *TonB*, proteínas de interacción con sideróforos, receptores de sideróforos dependientes de *TonB*, entre otros (código: NZ\_CP043902.1). Se tendría que evaluar la producción de sideróforos en ausencia y presencia de  $Al^{3+}$  para comprobar que esta sea una forma de captación de dicho ion.

Por otra parte, el aluminio podría estar interfiriendo con la función de los iones de  $Mg^{2+}$ , siendo este su principal mecanismo citotóxico conocido (Piña & Cervantes, 1996) ya que niveles nanomolares de  $Al^{3+}$  pueden fácilmente competir con concentraciones milimolares de  $Mg^{2+}$  (Macdonald & Martin, 1988). Considerando que, en la cuantificación de crecimiento microbiano se usaron concentraciones de  $Al^{3+}$  de 10 ppm y 20 ppm (equivalentes a 0.37 mM y 0.74 mM, respectivamente), es posible que esta interferencia con el  $Mg^{2+}$  se esté dando en *S. xiamenensis* LC6. También es probable que  $Al^{3+}$  esté afectando el transporte de otros metales de importancia biológica, tales como el hierro, calcio y fósforo (Flis *et al.* 1993).

Con los datos obtenidos en la evaluación del crecimiento microbiano no es posible conocer el mecanismo mediante el cual el aluminio estarían afectando el

crecimiento de *S. xiamenensis* LC6. Es posible que sea la confluencia de varios de los mecanismos anteriormente mencionados. Se tendrían que hacer más estudios para comprobar alguna de las interacciones planteadas.

## 7.2 Evaluación de la degradación en presencia de aluminio ( $\text{Al}^{3+}$ )

Como se observa en la Figura 4 y 5, en presencia de 10 ppm de  $\text{Al}^{3+}$  existe un incremento del 12.14% en la degradación tras 4 horas de crecimiento de *S. xiamenensis* en el medio suplementado con anaranjado de metilo; y un incremento de 12.44% tras 7 horas de incubación en el medio con azul brillante de remazol R. Una explicación a este incremento podría ser la capacidad floculante del sulfato de aluminio en solución acuosa. Se sabe que las sales de aluminio forman hidróxido de aluminio  $\text{Al}(\text{OH})_3$  en soluciones cercanas a la neutralidad, el cual tiene capacidad coagulante (Piña & Cervantes, 1996). Yeheyas et al., (2006) reportaron que el sulfato de aluminio junto a óxido de calcio puede decolorar en un 90% al Marrón Indantreno y al Anaranjado Imperón en 20 minutos, particularmente a pH cercanos a la neutralidad. De igual manera, Prajapati *et al.*, (2016) reportaron la decoloración del Anaranjado G en presencia de sulfato de aluminio cuando esta sal se encontraba en concentraciones mayores a 100 ppm. En ambos trabajos, se concluyó que la decoloración es directamente proporcional a la concentración inicial del sulfato de aluminio utilizada en el medio. Pese a ello, tal como se muestra en la Figura 4 y 5, la degradación en presencia de 20 ppm de  $\text{Al}^{3+}$  no fue mayor que la observada en 10 ppm de  $\text{Al}^{3+}$  en ninguno de los puntos de los ensayos de evaluación de la degradación. Esto podría estar indicando que las concentraciones de sulfato de aluminio utilizadas en el experimento no estarían decolorando por sí solas, ya que, pese a estar a pH neutro, el porcentaje de degradación no incrementó proporcionalmente a la concentración de la sal de aluminio, lo cual podría deberse a las bajas concentraciones utilizadas en el experimento (menores a 150 ppm). Este es un factor que deberá considerarse en posteriores estudios.

Otra explicación es que el  $\text{Al}^{3+}$  esté favoreciendo la degradación por *S. xiamenensis* LC6 mejorando la transferencia de los electrones y la reducción de los colorantes, lo cual se puede dar por diversos mecanismos. Chen et al. (2010) determinaron que el  $\text{Fe}^{3+}$  y el  $\text{Fe}^{2+}$  no solo favorecen la reducción de colorantes por *Shewanella decolorations* S12, sino que también disminuyen la inhibición por dicumarol, el cual bloquea la cadena de transporte de electrones, lo que sugiere

que los iones de hierro podrían realizar la función de la menaquinona en la transferencia de electrones. En dicho estudio, al igual que el aluminio, el  $\text{Fe}^{3+}$  inhibió el crecimiento de *S. decolorationis* S12 y favoreció la reducción de los colorantes azoicos. Un resultado similar fue reportado por Imran M. (2013), quien describió que el  $\text{Fe}^{3+}$  puede mejorar levemente la degradación por *Shewanella* sp. IFN4 sin incrementar la actividad enzimática. Otra posibilidad es que los iones  $\text{Al}^{3+}$  estén facilitando la transferencia de electrones a mayores distancias, tal como se ha reportado que puede suceder con algunas nanopartículas de  $\text{Fe}^{3+}$  (Nakamura et al., 2013). También se ha reportado que los iones  $\text{Al}^{3+}$  pueden incrementar la capacidad de aceptación de electrones de algunas moléculas como el DPPH (Nakanishi et al. 2016). Sin embargo, no hay reportes que los iones de  $\text{Al}^{3+}$  puedan actuar en el transporte de electrones como quinonas en ninguna especie bacteriana ni que el  $\text{Al}^{3+}$  mejore la capacidad de aceptar electrones por parte de los colorantes.

Asimismo, los iones de aluminio podrían estar aumentando la expresión de genes relacionados a la degradación, tales como los del *cluster mtr*, cuya función principal es la de mediar el pase de los electrones desde las proteínas quinonas presentes en el interior de la membrana bacteriana a los minerales presentes en el medio, particularmente aquellos que contengan  $\text{Fe}^{3+}$  (Shi et al., 2012). Estos genes son importantes en la reducción de otros compuestos, entre ellos, los colorantes azoicos, y son conservados dentro del género *Shewanella* (Wang et al. 2008; Hong & Gu, 2010; Mani et al., 2019). Previamente, Reyes et al. (2010) reportaron que en presencia de  $\text{Fe}^{3+}$  proveniente del óxido de hierro, la cepa *Shewanella* sp. ANA-3 presentó una mayor expresión de los genes *mtrC*, *mtrB*, *mtrA* y *omcA*; mientras que en presencia de  $\text{Fe}^{3+}$  proveniente de citrato de hierro, la misma cepa llegó a duplicar y/o cuadruplicar la expresión. Ya que se ha reportado que iones como el  $\text{Zn}^{2+}$  (Huyer & Page, 1988) y el  $\text{Al}^{3+}$  son capaces de inducir la expresión de sideróforos quelantes de hierro en *Rhizobium* (Roy & Chakrabarty, 2000) y en *Bacillus megaterium* (Hu & Boyer, 1996), posiblemente debido a su semejanza con el radio iónico del  $\text{Fe}^{3+}$ , es posible hipotetizar que el  $\text{Al}^{3+}$  también podría inducir la expresión de genes relacionados a la reducción o captación del  $\text{Fe}^{3+}$ , entre ellos, los genes del *cluster mtr*. Estos genes sí se encuentran presentes en el genoma de *shewanella xiamenensis* LC6, el cual fue ensamblado y anotado previamente por Lizárraga (2019), y se encuentra disponible en la base de datos del NCBI (NZ\_CP043902.1). Sin embargo, no se tiene registro de que el aluminio induzca la expresión del *cluster mtr* en ninguna

especie de *Shewanella*. Se tendrían que hacer estudios de la expresión a nivel transcriptómico para saber el efecto del aluminio sobre la expresión de estos genes.

Debido a que el mecanismo molecular implicado en la degradación de colorantes textiles no ha sido elucidado por completo aún, se señala que además de las azorreductasas (Chengalroyen & Dabbs, 2013), también podrían actuar otras enzimas tales como las peroxidasas, oxidorreductasaslacasas (Mahmood et al., 2016). Se ha reportado que el aluminio puede inducir una mayor actividad de peroxidasas, en especies vegetales como la *Hordeum vulgare* L. (cebada) (Tamás et al., 2002) y *Oryza sativa* (arroz) (Meriga et al., 2004) debido a la producción de radicales libres de oxígeno. Sin embargo, no se tiene registro de que el aluminio induzca la expresión de las azorreductasas o de peroxidasas y lacasas en ninguna especie de *Shewanella*.

Se ha reportado además que el  $Al^{3+}$  puede incrementar la motilidad de *Shewanella xiamenensis* BC01 en medios sólidos, lo cual podría estar relacionado a una mayor capacidad de colonización del medio, un incremento en la actividad flagelar y posiblemente una mayor producción de ramnolípidos (Ng et al. 2015). Por otra parte, en *E. coli* se ha descrito que el aluminio en concentraciones entre 1 a 10 ppm y a pH 5.5 puede inducir la expresión del gen *fliC*, el cual codifica la proteína flagelina que conforma los flagelos bacterianos (Guzzo et al. 1991). De igual manera, *S. xiamenensis* mantiene la producción de *nanowires* en presencia de aluminio (Ng et al. 2015), los cuales pueden favorecer la reducción de metales y colorantes azoicos (Li et al. 2014; Ng et al. 2014). De ello podría desprenderse otra hipótesis: la presencia de los iones de aluminio podría haber favorecido la colonización del medio líquido por *S. xiamenensis* LC6, lo que habría tenido un efecto positivo en la degradación del Anaranjado de Metilo y el Azul brillante de Remazol R. Harían falta realizar otros experimentos para comprobar que dicho efecto del aluminio se esté dando en *S. xiamenensis* LC6.

## VI. Conclusiones

- Los iones de aluminio ( $Al^{3+}$ ) inhiben ligeramente el crecimiento de *Shewanella xiamenensis* LC6 en comparación, al crecimiento en ausencia de este metal. El mecanismo de citotoxicidad por el cual el aluminio afectaría el

crecimiento microbiano de *S. xiamenensis* LC6 es desconocido hasta el momento.

- La degradación del anaranjado de metilo en presencia de 10 ppm de iones de aluminio es mayor en un 12.14% que en ausencia de dicho metal tras 4 horas de incubación.
- La presencia de 10 ppm de iones de aluminio favorece hasta en un 12.44% la degradación del Azul brillante de remazol R después de 7 horas de incubación en comparación al cultivo carente de  $Al^{3+}$ .
- Hacen falta más estudios para conocer el mecanismo por el cual 10 ppm de  $Al^{3+}$  estaría favoreciendo la reducción del Anaranjado de Metilo y el Azul brillante de remazol R por *S. xiamenensis* LC6; y el efecto que estos iones tendrían en la degradación de otros colorantes.

## VII. Bibliografía

- Appanna, V. D., & Hamel, R. (1996). Aluminum detoxification mechanism in *Pseudomonas fluorescens* is dependent on iron. *FEMS microbiology letters*, 143(2-3), 223-228.
- Appanna, V. D., Hamel, R. D., & Lévasseur, R. (2003). The metabolism of aluminum citrate and biosynthesis of oxalic acid in *Pseudomonas fluorescens*. *Current microbiology*, 47(1), 0032-0039.
- Cai, P. J., Xiao, X., He, Y. R., Li, W. W., Chu, J., Wu, C., ... & Yu, H. Q. (2012). Anaerobic biodecolorization mechanism of methyl orange by *Shewanella oneidensis* MR-1. *Applied microbiology and biotechnology*, 93(4), 1769-1776.
- Chen, X., Sun, G., & Xu, M. (2010). Role of iron in azoreduction by resting cells of *Shewanella decolorationis* S12. *Journal of applied microbiology*, 110(2), 580-586
- Chengalroyen, M. D., & Dabbs, E. R. (2013). The microbial degradation of azo dyes: minireview. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(3), 389-399.
- Chung, K. T. (2016). Azo dyes and human health: a review. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 34(4), 233-261.

- Exley, C., & Mold, M. J. (2015). The binding, transport and fate of aluminium in biological cells. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 30, 90–95. doi:10.1016/j.jtemb.2014.11.002
- Fang, Y., Xu, M., Wu, W. M., Chen, X., Sun, G., Guo, J., & Liu, X. (2015). Characterization of the enhancement of zero valent iron on microbial azo reduction. *BMC microbiology*, 15(1), 1-9.
- Flis, S. E., Glenn, A. R., & Dilworth, M. J. (1993). The interaction between aluminium and root nodule bacteria. *Soil Biology and Biochemistry*, 25(4), 403–417.
- Fukuzumi, S., & Ohkubo, K. (2010). Metal ion-coupled and decoupled electron transfer. *Coordination Chemistry Reviews*, 254(3-4), 372–385. doi:10.1016/j.ccr.2009.10.020
- Garrison, J. M., and A. L. Crumbliss. (1987) Kinetics and mechanism of aluminum (III)/siderophore ligand exchange: mono (deferriferrioxamine B) aluminum (III) formation and dissociation in aqueous acid solution. *Inorg. Chim. Acta* 138:61–65.
- Ghasemi, R., Fatemi, F., Mir-Derikvand, M., & Zarei, M. (2020). Evaluation of mtr cluster expression in *Shewanella* RCRI7 during uranium removal. *Archives of Microbiology*, 202(10), 2711-2726.
- Gogate.P.R., and Pandit.A.B.(2004). A review of imperative technologies for wastewater treatment II: Hybrid Methods. *Adv.Environ.Res.*, 8: 553-597
- Gorby, Y. A., Yanina, S., McLean, J. S., Rosso, K. M., Moyles, D., Dohnalkova, A., & Culley, D. E. (2006). Electrically conductive bacterial nanowires produced by *Shewanella oneidensis* strain MR-1 and other microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(30), 11358-11363.
- Guida L., Saidi Z., Hughes M. N. and Poole R. K. (1991) Aluminium toxicity and binding to *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology* 156, 507-512
- Gutteridge, J. M., Quinlan, G. J., Clark, I., & Halliwell, B. (1985). Aluminium salts accelerate peroxidation of membrane lipids stimulated by iron salts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 835(3), 441-447.
- Guzzo, A., Diorio, C., & DuBow, M. S. (1991). Transcription of the *Escherichia coli* fliC gene is regulated by metal ions. *Applied and environmental microbiology*, 57(8), 2255-2259.
- Hai, F. I., Yamamoto, K., & Fukushi, K. (2006). Development of a submerged membrane fungi reactor for textile wastewater treatment. *Desalination*, 192(1-3), 315-322.

- Hartle, J.E., 2nd, Prpic, V., Siddhanti, S.R., Spurney, R.F., and Quarles, L.D. (1996) Differential regulation of receptor-stimulated cyclic adenosine monophosphate production by polyvalent cations in MC3T3-E1 osteoblasts. *J Bone Miner Res* 11: 789–799
- Hau, H. H., & Gralnick, J. A. (2007). Ecology and biotechnology of the genus *Shewanella*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 61, 237-258.
- Hong Y, Chen X, Guo J, Xu Z, Xu M, Sun G (2006b) Effects of electron donors and acceptors on anaerobic reduction of azo dyes by *Shewanella decolorationis* S12. *Appl Microbiol Biotechnol.*
- Hong Y-G & Gu JD (2010) Physiology and biochemistry of reduction of azo compounds by *Shewanella* strains relevant to electron transport chain. *Appl Microbiol Biotechnol.* 88:837-843
- Hong Y, Xu M, Guo J, Xu Z, Chen X, Sun G (2006a) Respiration and growth of *Shewanella decolorationis* S12 with azo compound as sole electron acceptor. *Appl Environ Microbiol.*
- Hu, X., & Boyer, G. L. (1996). Siderophore-mediated aluminum uptake by *Bacillus megaterium* ATCC 19213. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(11), 4044-4048.
- Huyer, M., and W. J. Page (1988) Zn<sup>2+</sup> increases siderophore production in *Azotobacter vinelandii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2625–2631.
- Imran, M. (2013). Biodegradation of azo dyes by bacterial cells and azoreductase (Doctoral dissertation, UNIVERSITY OF AGRICULTURE FAISALABAD, PAKISTAN).
- Imran, M., Arshad, M., Khalid, A., Hussain, S., Mumtaz, M. W., & Crowley, D. E. (2015). Decolorization of Reactive Black-5 by *Shewanella* sp. in the Presence of Metal Ions and Salts. *Water Environment Research*, 87(7), 579–586.
- Jadhav, J. P., Kalyani, D. C., Telke, A. A., Phugare, S. S., & Govindwar, S. P. (2010). Evaluation of the efficacy of a bacterial consortium for the removal of color, reduction of heavy metals, and toxicity from textile dye effluent. *Bioresource Technology*, 101(1), 165–173.
- Jin, X., Liu, G., Xu, Z., Yao, W. (2007). Decolorization of a dye industry effluent by *Aspergillus fumigatus* XC6. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 74, 239e243
- Johnson, A. C., & Wood, M. (1990). DNA, a possible site of action of aluminum in *Rhizobium* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(12), 3629-3633.
- Kinraide, T. B., Ryan, P. R., & Kochian, L. V. (1992). Interactive effects of Al<sup>3+</sup>, H<sup>+</sup>, and other cations on root elongation considered in terms of cell-surface electrical potential. *Plant Physiology*, 99(4), 1461-1468.



- Kircheva, N., & Dudev, T. (2020). Gallium as an Antibacterial Agent: A DFT/SMD Study of the Ga<sup>3+</sup>/Fe<sup>3+</sup> Competition for Binding Bacterial Siderophores. *Inorganic chemistry*, 59(9), 6242-6254.
- Li, Y., Ng, I. S., Zhang, X., & Wang, N. (2014). Draft genome sequence of the dye-decolorizing and nanowire-producing bacterium *Shewanella xiamenensis* BC01. *Genome announcements*, 2(4), e00721-14.
- Liu, G., Zhou, J., Wang, J., Wang, X., Jin, R., & Lv, H. (2011). Decolorization of azo dyes by *Shewanella oneidensis* MR-1 in the presence of humic acids. *Applied microbiology and biotechnology*, 91(2), 417-424.
- Lizárraga, W. C., Mormontoy, C. G., Calla, H., Castañeda, M., Taira, M., Garcia, R., ... & Ramirez, P. (2022). Complete genome sequence of *Shewanella* algae strain 2NE11, a decolorizing bacterium isolated from industrial effluent in Peru. *Biotechnology Reports*, 33, e00704.
- Lizárraga Olivares, W. C. (2019). Caracterización fenotípica y análisis genómico de dos cepas de *Shewanella* sp. nativas con capacidad de degradar colorantes azoicos.
- Londono, S. C., Hartnett, H. E., & Williams, L. B. (2017). Antibacterial activity of aluminum in clay from the Colombian Amazon. *Environmental Science & Technology*, 51(4), 2401-2408.
- Luque, N. B.; Mujika, J. I.; Rezabal, E.; Ugalde, J. M.; Lopez, X. (2014) Mapping the affinity of aluminum (III) for biophosphates: interaction mode and binding affinity in 1:1 complexes. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16 (37), 20107–20119.
- Macdonald T.L. & Martin R.B. (1988) Aluminium ion in biological systems. *Trends Biochem Sci* 13, 15 19
- Mahmood, S., Khalid, A., Arshad, M., Mahmood, T., & Crowley, D. E. (2016). Detoxification of azo dyes by bacterial oxidoreductase enzymes. *Critical reviews in biotechnology*, 36(4), 639-651.
- Maier J, Kandelbauer A, Erlacher A, Cavaco-Paulo A, Gübitz GM (2004) A new alkali-thermostable azoreductase from *Bacillus* sp. strain SF. *Appl Environ Microbiol* 70:837–844
- Mani, P., Fidal, V. T., Bowman, K., Breheny, M., Chandra, T. S., Keshavarz, T., & Kyazze, G. (2019). Degradation of azo dye (acid orange 7) in a Microbial fuel cell: comparison between anodic microbial-mediated reduction and cathodic laccase-mediated oxidation. *Frontiers in Energy Research*, 7, 101.
- Meriga, B., Reddy, B. K., Rao, K. R., Reddy, L. A., & Kishor, P. K. (2004). Aluminium-induced production of oxygen radicals, lipid peroxidation and DNA

- damage in seedlings of rice (*Oryza sativa*). *Journal of plant physiology*, 161(1), 63-68.
- Misal, S. A., & Gawai, K. R. (2018). Azoreductase: a key player of xenobiotic metabolism. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1), 1-9.
  - Mujika, J. I., Rezabal, E., Mercero, J. M., Ruipérez, F., Costa, D., Ugalde, J. M., & Lopez, X. (2014). Aluminium in biological environments: a computational approach. *Computational and structural biotechnology journal*, 9(15), e201403002.
  - Mundy, W.R., Freudenrich, T.M., and Kodavanti, P.R. (1997) Aluminum potentiates glutamate-induced calcium accumulation and iron-induced oxygen free radical formation in primary neuronal cultures. *Mol Chem Neuropathol* 32:41–57
  - Nakanishi, I., Ohkubo, K., Ogawa, Y., Matsumoto, K. I., Ozawa, T., & Fukuzumi, S. (2016). Aluminium ion-promoted radical-scavenging reaction of methylated hydroquinone derivatives. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 14(33), 7956-7961.
  - Nakamura, R., Kai, F., Okamoto, A., Newton, G. J., & Hashimoto, K. (2009). Self-constructed electrically conductive bacterial networks. *Angewandte Chemie*, 121(3), 516-519.
  - Nakamura, R., Kai, F., Okamoto, A., & Hashimoto, K. (2013). Mechanisms of long-distance extracellular electron transfer of metal-reducing bacteria mediated by nanocolloidal semiconductive iron oxides. *Journal of Materials Chemistry A*, 1(16), 5148-5157.
  - Nayak, P. (2002) Aluminum: impacts and disease. *EnvironRes* 89: 101–115.
  - Nikolova, V., Angelova, S., Markova, N., & Dudev, T. (2016). Gallium as a Therapeutic Agent: A Thermodynamic Evaluation of the Competition between Ga<sup>3+</sup> and Fe<sup>3+</sup> Ions in Metalloproteins. *The Journal of Physical Chemistry B*, 120(9), 2241–2248. doi:10.1021/acs.jpccb.6b01135
  - Ng, I.-S., Chen, T., Lin, R., Zhang, X., Ni, C., & Sun, D. (2014). Decolorization of textile azo dye and Congo red by an isolated strain of the dissimilatory manganese-reducing bacterium *Shewanella xiamenensis* BC01. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(5), 2297–2308.
  - Ng, I. S., Ndivo, C. I., Zhou, Y., & Wu, X. (2015). Cultural optimization and metal effects of *Shewanella xiamenensis* BC01 growth and swarming motility. *Bioresources and Bioprocessing*, 2(1), 1-10.
  - Oclave J.C., Wood M. and Johnson A.C. (1991) Mutagenic effects of aluminium *Mutat. Res.* 264, 135-137.

- Olukanni, O. D., Osuntoki, A. A., & Gbenle, G. O. (2006). Textile effluent biodegradation potentials of textile effluent-adapted and non-adapted bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 5(20).
- Oteiza, P. I., & Verstraeten, S. V. (2006). Interactions of Al and related metals with membrane phospholipids: Consequences on membrane physical properties. *Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes*, 4, 79-106.
- Pearce, C. I., Lloyd, J. R., & Guthrie, J. T. (2003). The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. *Dyes and pigments*, 58(3), 179-196.
- Phugare, S. S., Kalyani, D. C., Patil, A. V., & Jadhav, J. P. (2011). Textile dye degradation by bacterial consortium and subsequent toxicological analysis of dye and dye metabolites using cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress studies. *Journal of Hazardous Materials*, 186(1), 713–723.
- Piña, R. G., & Cervantes, C. (1996). Microbial interactions with aluminium. *Biometals*, 9(3), 311-316.
- Prajapati, K., Sorokhaibam, L. G., Bhandari, V. M., Killedar, D. J., & Ranade, V. V. (2016). Differentiating Process Performance of Various Coagulants in Removal of Congo red and Orange G Dyes. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 14(1).
- Quarles, L.D., Hartle, J.E., 2nd, Middleton, J.P., Zhang, J., Arthur, J.M., and Raymond, J.R. (1994) Aluminum-induced DNA synthesis in osteoblasts: mediation by a G-protein Metabolic reprogramming and aluminium stress coupled cation sensing mechanism. *J Cell Biochem* 56: 106–117
- Reyes, C., Murphy, J. N., & Saltikov, C. W. (2010). Mutational and gene expression analysis of *mtrDEF*, *omcA* and *mtrCAB* during arsenate and iron reduction in *Shewanella* sp. ANA-3. *Environmental Microbiology*, 12(7), 1878–1888.
- Routoula, E., & Patwardhan, S. V. (2020). Degradation of Anthraquinone Dyes from Effluents: A Review Focusing on Enzymatic Dye Degradation with Industrial Potential. *Environmental Science & Technology*. doi:10.1021/acs.est.9b03737
- Roy, N., & Chakrabarty, P. K. (2000). Effect of aluminum on the production of siderophore by *Rhizobium* sp. (*Cicer arietinum*). *Current microbiology*, 41(1), 5-10.
- Sánchez, M. B., & Uribe, C. (2018). Contaminación de los ambientes acuáticos generados por la industria textil. *Revista Campus*, 23(26).

- Shi, L., Rosso, K. M., Zachara, J. M., & Fredrickson, J. K. (2012). Mtr extracellular electron-transfer pathways in Fe (III)-reducing or Fe (II)-oxidizing bacteria: a genomic perspective.
- Singh, R. L., Singh, P. K., & Singh, R. P. (2015). Enzymatic decolorization and degradation of azo dyes—A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 104, 21-31.
- Soni, M.G., White, S.M., Flamm, W.G., and Burdock, G.A. (2001) Safety evaluation of dietary aluminum. *Regul Toxicol Pharmacol* 33: 66–79.
- Sponza, D. T. (2002). Necessity of toxicity assessment in Turkish industrial discharges (examples from metal and textile industry effluents). *Environmental monitoring and assessment*, 73(1), 41-66.
- Sudha, M., Saranya, A., Selvakumar, G., & Sivakumar, N. (2014). Microbial degradation of azo dyes: a review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 3(2), 670-690.
- Suzuki, H. (2019). Remarkable diversification of bacterial azoreductases: primary sequences, structures, substrates, physiological roles, and biotechnological applications. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(10), 3965-3978.
- Tamás, L., Huttová, J., & Mistrík, I. (2002). Effect of aluminium on peroxidase activity in roots of Al-sensitive and Al-resistant barley cultivars. *Rostlinná výroba*, 48, 76-79.
- Thanavel, M., Bankole, P. O., Selvam, R., Govindwar, S. P., & Sadasivam, S. K. (2020). Synergistic effect of biological and advanced oxidation process treatment in the biodegradation of Remazol yellow RR dye. *Scientific reports*, 10(1), 1-9.
- Tiedje, J. M. (2002). *Shewanella*—the environmentally versatile genome. *Nature biotechnology*, 20(11), 1093-1094.
- Walker G C 1985 Inducible DNA repair systems. *Ann. Rev. Biochem.* 54, 425-457.
- Wang, F., Wang, J., Jian, H., Zhang, B., Li, S., Wang, F., ... & Xiao, X. (2008). Environmental adaptation: genomic analysis of the piezotolerant and psychrotolerant deep-sea iron reducing bacterium *Shewanella piezotolerans* WP3. *PLoS One*, 3(4), e1937.
- Wood, M. (1995). A mechanism of aluminium toxicity to soil bacteria and possible ecological implications. *Plant and Soil*, 171(1), 63–69.
- Wood M. and Cooper J. E. (1984) Aluminium toxicity and multiplication of *Rhizobium trifolii* in a defined growth medium. *Soil Biology & Biochemi.yirJ'* 16, 571-576.

- Woźnica A, Dzirba J, Mańka D, Łabużek S (2003) Effects of electron transport inhibitors on iron reduction in *Aeromonas hydrophila* strain KB1. *Anaerobe* 9:125–130
- Xu, H., Heinze, T. M., Chen, S., Cerniglia, C. E., & Chen, H. (2007). Anaerobic metabolism of 1-amino-2-naphthol-based azo dyes (Sudan dyes) by human intestinal microflora. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(23), 7759-7762.
- Xu, M., Guo, J., Kong, X., Chen, X., & Sun, G. (2007). Fe(III)-enhanced Azo Reduction by *Shewanella decolorationis* S12. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(6), 1342–1349
- Xu, M., Guo, J., Zeng, G., Zhong, X., & Sun, G. (2005). Decolorization of anthraquinone dye by *Shewanella decolorationis* S12. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(2), 246–251. doi:10.1007/s00253-005-0144-1
- Yang YY, Du LN, Wang G, Jia XM, Zhao YH (2011) The decolorisation capacity and mechanism of *Shewanella oneidensis* MR-1 for methyl orange and acid yellow 199 under microaerophilic conditions. *Water Sci Technol* 63:956–963
- Yousfi, K., Bekal, S., Usongo, V., & Touati, A. (2017). Current trends of human infections and antibiotic resistance of the genus *Shewanella*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 36(8), 1353-1362.
- Zambenedetti, P., Tisato, F., Corain, B., & Zatta, P. F. (1994). Reactivity of Al (III) with membrane phospholipids: a NMR approach. *Biometals*, 7(3), 244-252.
- Zatta, P., Kiss, T., Suwalsky, M., & Berthon, G. (2002). Aluminium (III) as a promoter of cellular oxidation. *Coordination Chemistry Reviews*, 228(2), 271-284.
- Zhou, W., & Zimmermann, W. (1993). Decolorization of industrial effluents containing reactive dyes by actinomycetes. *FEMS Microbiology Letters*, 107(2-3), 157-161.