



UNIVERSIDADE DA CORUÑA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
FUNCIONAL Y CIENCIAS DE LA SALUD

Caracterización dun novo lévedo con capacidade para degradar colorantes

Caracterización de una nueva levadura con capacidad de degradar colorantes

Characterization of a new yeast with ability to degrade dyes

Rubén Simón Cortés

Trabajo Fin de Máster

Vigo, Julio 2015.

Facultad de Ciencias de la Universidad de la Coruña

Trabajo realizado en el Departamento de Biología Funcional
y Ciencias de la Salud de la Universidad de Vigo.

Máster Interuniversitario en Biotecnología Avanzada

2013-2015

**Caracterización dun novo lévedo con capacidade para
degradar colorantes**

**Caracterización de una nueva levadura con capacidad de
degradar colorantes**

**Characterization of a new yeast with ability to degrade
dyes**

Rubén Simón Cortés

La doctora Carmen Sieiro Vázquez y Don Jacobo López
Seijas como tutores de este trabajo, autorizan su
presentación ante el tribunal evaluador

Vigo, julio de 2015

Carmen Sieiro Vázquez



Jacobo López Seijas



Una vez escrito este trabajo y después de la dedicación de tantas horas en su elaboración, solo me queda agradecer a todas aquellas personas que me han apoyado en todos los momentos difíciles durante este periodo.

En primer lugar me gustaría agradecer a todos los miembros de mi familia que me han escuchado muchas veces hablar de este trabajo, contarle mis dudas y alguna explicación de los colorantes, en especial a mi padre por todo su apoyo, gracias a todos por estar ahí.

Entrando en el ámbito académico, tengo que agradecerle a la Doctora Carmen Sieiro Vázquez, la posibilidad que me ha dado de realizar este proyecto en su laboratorio y también por ayudarme en todo lo que le he pedido a lo largo de estos dos años de máster.

Me gustaría agradecer a Jacobo López Seijas, la ayuda recibida, ya que ha estado conmigo a lo largo de la realización del proyecto, dándome explicaciones y dedicando todo su tiempo para que todo lo que se llevara a cabo, saliera bien.

Me gustaría dar las gracias a Manuel Becerra coordinador del máster en la Universidad de la Coruña, por toda la ayuda recibida a lo largo de estos dos años y la resolución de todos los problemas que han surgido, ya que desde la Coruña y yo en Vigo, siempre ha sido capaz de resolverlos. Muchas gracias por todo Manuel.

No me puedo olvidar de las personas maravillosas que he conocido en Lisboa, ni de los momentos vividos allí cuando fui a realizar las prácticas del máster. Gracias a todos por vuestra dedicación, vuestra colaboración en todo momento durante mi estancia y por las explicaciones tanto teóricas como prácticas que he podido aprovechar para mi proyecto fin de máster y para mi formación académica.

Le doy las gracias a todos mis compañeros de laboratorio de la Doctora Carmen Sieiro Vázquez, por ayudarme en todos los momentos requeridos.

Y para terminar los agradecimientos, me gustaría darle las gracias a Paula, esa persona que ha estado conmigo en todos los momentos, ya fueran buenos o malos porque eso no importaba. Muchas gracias por ayudarme a resolver alguna cuestión que no era capaz de hacer, bien porque pienso que a veces tengo poca paciencia o porque definitivamente no me salía. Gracias en general por estar siempre ahí.

ABREVIATURAS

%	tanto por ciento
°C	grados centígrados
µg	microgramo
Abs	absorbancia
Cel	Célula
g	gramo
h	hora
L	litro
mg	miligramos
min	minuto
mL	mililitro
nm	nanómetro
rpm	revoluciones por minuto
YEPD	Yeast Extract Peptone Dextrose
YNBGC	Yeast Nitrogen Base Without Amino Acids, Glucosa y Colorante
YNBG	Yeast Nitrogen Base Without Amino Acids y Glucosa.

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Justificación y objetivos	9
3. Material y métodos	10
3.1 Reactivos.....	10
3.2 Medios de cultivo	10
3.3 Microorganismo	11
3.4 Preparación del preinóculo	11
3.5 Estudio del consumo de los colorantes a lo largo del tiempo y en función de su concentración	12
3.6 Efecto de distintos parámetros sobre el consumo de los colorantes	13
3.7 Estudio de la relación entre la biomasa microbiana y el consumo de colorante.....	13
3.8 Análisis de datos	14
4. Resultados y Discusión	15
4.1 Eliminación de colorantes empleando la cepa MIBM 1-15.....	15
4.2 Estudio del consumo de los colorantes en función del tiempo y su concentración.....	16
4.3 Eliminación de colorantes en ausencia de fuente de Nitrógeno y/o Carbono.....	19
4.4 Evaluación del efecto de los distintos parámetros que pueden afectar a la eliminación del colorante.....	20
4.5 Relación entre la biomasa microbiana y el consumo de colorante.....	26
5. Conclusiones	29
6. Bibliografía	30

1. INTRODUCCIÓN

Los tintes son colorantes que absorben la luz a longitudes de onda en el rango visible 400-700 nm (Ramalho, 2005). Se caracterizan por ser sustancias orgánicas de color intenso que aportan color a una sustancia incolora o a un sustrato, por medio de una absorción selectiva de luz (Garzón, 2009).

Hasta mediados del siglo XX solo se empleaban tintes naturales con propiedades poco apropiadas para la tinción (poca estabilidad, baja resistencia al lavado y a la luz). El objetivo por parte de la industria era mejorar estas propiedades y ofrecer productos mejores y económicos, que proporcionasen por un lado más color y por otro mejor comportamiento térmico. De esta manera, 50 años después del origen de la industria de los tintes, el 90% de los colorantes son sintéticos, mejorando muchas de las condiciones y cumpliendo el objetivo propuesto por la industria (Christie, 2003; López, 2005).

Sus moléculas están constituidas por tres grupos funcionales. Por un lado, el cromóforo, que es el grupo responsable de la absorción de la luz, por otro lado están los auxocromos que intensifican el color y dan afinidad por la fibra y por último, el solubilizador, que le da afinidad a solventes diversos y está caracterizado por la presencia de iones como Na^+ , Cl^- , y/o NH_2^+ (Marcano, 1990; Garzón, 2009).

Como se ha mencionado, los colorantes usados en la industria presentan una estructura química compleja, clasificándose en naturales y sintéticos. Dentro de los sintéticos, podemos tener los grupos, azoico, diazoico, di-trifenilmetano, quinonimina, azufrados, ftaleínicos, indigoides y el grupo de las antraquinonas. También se pueden clasificar según su aplicación en: ácidos, básicos, sulfurosos, dispersos, reactivos y directos (Garzón, 2009).

El principal motivo de su utilización en la industria es la gran variedad de tonos de color, siendo fácil su aplicación y la obtención de una gama de colores que pueden ser empleados de diferentes modos (Pearce *et al.*, 2003; Tan *et al.*, 2013).

Estos colorantes tienen grupos reactivos que constituyen enlaces covalentes con OH, NH o grupos SH en fibras como el algodón o la lana (Lewis y Loan, 2007). Durante los procesos de teñido, aproximadamente el 50% del colorante no llega a reaccionar con las fibras, pudiendo pasar al medio ambiente y causar problemas de contaminación (O'Neill *et al.*, 1999; Pandey *et al.*, 2007).

Introducción

En lo que respecta al grupo azoico, este incluye al menos un grupo azo ($N=N$), tiene doble enlace y suele estar unido a dos radicales de los cuales al menos uno es un grupo aromático (Pérez, 2009).

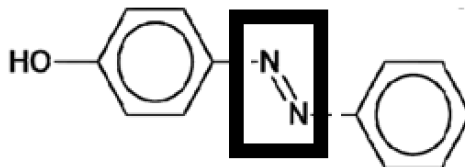


Figura 1: Estructura general de los colorantes azoicos (Wong y Yuen, 1998)

Los colorantes azoicos se clasifican en dos subgrupos conforme al número de su doble enlace: mono-azo o poli-azo, este último con distintas clases (Zollinger, 1987). Son compuestos aromáticos que constituyen la clase más grande de colorantes sintéticos empleados en la industria (70% aproximadamente) (Pérez, 2009; Tan *et al.*, 2014).

En el año 1994 las estimaciones de producción mundial de colorantes fueron de alrededor de 1 millón de toneladas, de las cuales más del 50% han sido de tipo azoico (Stolz, 2001; Pandey *et al.*, 2007).

Se emplean ampliamente en un gran número de industrias, como por ejemplo alimentación, cosmética, impresión de papel, productos de cuero, textiles, etc., siendo este último su principal uso. Dentro de este tipo de colorantes existen varias clases, en función de la cual, su pérdida en aguas residuales puede variar, provocando una contaminación de las aguas superficiales y subterráneas (O'Neill *et al.*, 1999; Pandey *et al.*, 2007).

Otro aspecto importante es la presencia en el medio ambiente de grandes cantidades de colorantes azoicos debido a la ruptura de los enlaces, pudiendo ser estable en condiciones ácidas y alcalinas (Wong y Yuen, 1998).

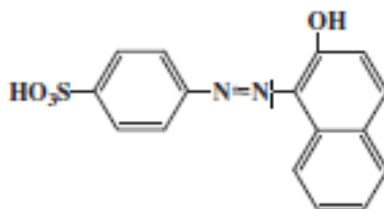


Figura 2: Estructura del Orange II perteneciente al grupo de los colorantes Azo (Wong y Yuen, 1998)

Otro grupo a destacar es el grupo de las antraquinonas (Figura 3A). Estos representan la segunda clase más importante de colorantes textiles. Son compuestos aromáticos polihidroxilados más o menos metilados. Cuando hay suficientes en la posición

C-2 o C-3, el estado de oxidación del átomo de carbono puede variar y ser CH_3 , CH_2 , OH , CHO , COOH o formar grupos más complejos. Tienen una amplia gama de colores y se usan para dar color a la tela celulósica, lana y fibras de poliamida (Baughman y Weber, 1994).

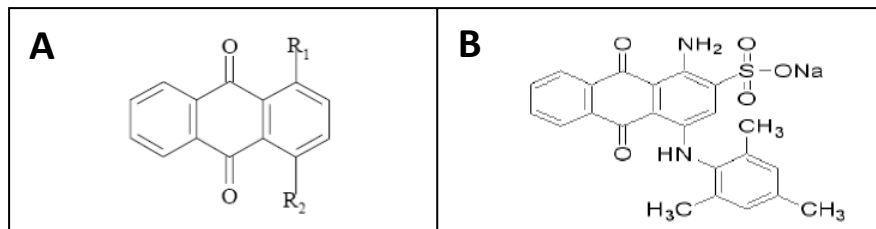


Figura 3: **A:** Estructura general de la antraquinona. **B:** Ejemplo de un colorante perteneciente al grupo de las antraquinonas (Azul Ácido 129) (Garzón, 2009).

Otros grupos de colorantes que podemos destacar son: el grupo diazo (Figura 4A), el grupo trifenilmetano (Figura 4B) y el grupo indigoide (Figura 4C).

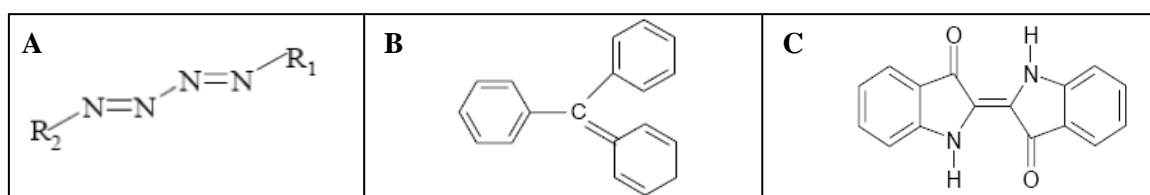


Figura 4: **A:** Estructura general del grupo diazo. **B:** Estructura general del grupo trifenilmetano. **C:** Estructura general del grupo indigoide (Perez, 2009).

Debido a su complejidad estructural, las plantas de tratamiento convencionales presentan un bajo porcentaje del procesado adecuado de los efluentes, por lo tanto muchos son vertidos al medio ambiente de forma inadecuada, lo que provoca una serie de impactos sobre el entorno, encontrando variaciones en las aguas en lo que se refiere a sólidos suspendidos, carga iónica, toxicidad, color y concentración de oxígeno disuelto (Garzón, 2009).

Algunos estudios destacan que los vertidos de las industrias textiles y otras empresas relacionadas con el tinte, producen aguas residuales más contaminadas que otras fábricas dedicadas, por ejemplo, a la alimentación o a la cosmética (Pandey *et al.*, 2007).

Introducción

Numerosos estudios, han demostrado que los colorantes contribuyen a una elevada actividad mutagénica en suelo y en aguas superficiales contaminadas por los efluentes textiles (Rajaguru *et al.*, 2002; Umbuzeiro *et al.*, 2005; Pandey *et al.*, 2007).

Por otro lado, los efluentes tienen una alta capacidad de bioacumulación y una baja velocidad de despolimerización, permitiendo su acumulación en lugares como lagos y bahías. Esto podría causar una disminución del poder absorbente del agua y también afectaría a la actividad fotosintética de los organismos que habitan dichos ecosistemas, ya que disminuiría el oxígeno disuelto en el agua (Rodríguez *et al.*, 2006; Garzón, 2009).

Aproximadamente un 20% de los colorantes azoicos son vertidos al medio mediante efluentes o productos de degradación durante los procesos de fabricación y coloración textil respectivamente, provocando contaminación ambiental. Esto podría afectar por ejemplo a la actividad fotosintética de los hidrófitos, causando una reducción en la penetración de la luz (Ozdemir *et al.*, 2013; Tan *et al.*, 2013; Tan *et al.*, 2014).

Por lo tanto, debido a esta problemática, y con el objetivo de reducir los efectos de contaminación, se han buscado y desarrollado métodos no solo para una eliminación adecuada del color, sino también para la mineralización completa de los colorantes como pueden ser, técnicas de tratamiento físico, químico y biológico (Robinson *et al.*, 2001; dos Santos *et al.*, 2007; Garzón, 2009; Tan *et al.*, 2013).

Las técnicas de tratamiento químico consisten en una oxidación avanzada y en una reducción química. La oxidación incluye procesos como la ozonización y la foto-oxidación catalítica. Los tratamientos químicos contienen reacciones de reducción y sustancias químicas. Estas reacciones permiten convertir las sustancias peligrosas en menos tóxicas o peligrosas tratando de reducir los daños. Otro de los tratamientos es el físico, que incluye la adsorción, el intercambio iónico, filtración de membrana y la electrolisis (Garzón, 2009).

Un último tipo de estos tratamientos es el biológico, que incluye la biodegradación mediante el empleo de bacterias, hongos y levaduras de forma aeróbica o anaeróbica (Pearce *et al.*, 2003; Garzón, 2009; Tan *et al.*, 2013).

Si comparamos todos estos métodos, los químicos presentan la desventaja de tener un elevado coste, pudiendo ser difíciles de aplicar en países en vías de desarrollo (Ozbelge *et al.*, 2002; Pera-Titus *et al.*, 2004). Por otro lado, los tratamientos físicos además del

coste de inversión igual de elevado que en el caso anterior, pueden incluir la generación de lodos peligrosos (Van der Zee, 2002).

Los métodos biológicos, en cambio, son relativamente baratos, siendo más rentables y mucho más respetuosos con el medio ambiente (Pearce *et al.*, 2003). Sin embargo, en algunas ocasiones, la aplicación de los tratamientos biológicos se puede ver limitada por problemas como la disponibilidad de una gran superficie o la toxicidad de algunos productos químicos para las células (Crini, 2006). Se ha descrito el empleo de diferentes tipos de microorganismos en la descontaminación biológica de colorantes bajo determinadas condiciones ambientales (O'Neil *et al.*, 1999; Rai *et al.*, 2005; Pandey *et al.*, 2007). Numerosos estudios han demostrado la posibilidad de la degradación de los colorantes mediante el empleo de especies de hongos, levaduras, bacterias y algas (Saratale *et al.*, 2009; Gomi *et al.*, 2011; Tan *et al.*, 2013).

Los primeros estudios sobre colorantes azoicos sugerían que eran resistentes al ataque bacteriano en condiciones aeróbicas, debiendo degradarlo en dos etapas que implicarían, por un lado la decoloración reductora bajo condiciones anaeróbicas y por otro lado la mineralización de los productos de degradación (aminas aromáticas) bajo condiciones aeróbicas (Lin *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2013). Sin embargo, se ha demostrado que algunas especies bacterianas como *Pseudomonas luteola*, *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus subtilis* o *Proteus mirabilis*, son capaces de realizar la degradación de los colorantes en condiciones anóxicas (Chen *et al.*, 2003; Pandey *et al.*, 2007).

Los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Penicillium* sp. pueden llevar a cabo el consumo de colorante mediante la adsorción y/o degradación (Tan *et al.*, 2014). En cuanto a las cepas de levaduras, *Pichia* sp. y *Candida tropicalis* se han mostrado eficaces para llevar a cabo el proceso de degradación de colorantes (Tan *et al.*, 2014). En lo que respecta a las algas, algunos estudios realizados indican que su aplicación para la decoloración es más limitada probablemente debido al reducido crecimiento de las algas por factores como la intensidad de la luz y la concentración de CO₂ (Tan *et al.*, 2013).

Durante los procesos de decoloración aeróbica, los compuestos podrían ser degradados a través de la catálisis de la monooxigenasa y dioxigenasa pudiendo incluir la incorporación de los átomos de oxígeno en el anillo aromático de los compuestos orgánicos (Tan *et al.*, 2013).

Introducción

En lo que respecta a los hongos, estos degradan muy bien complejos orgánicos mediante el uso de una serie de enzimas (manganeso peroxidasa, lignina peroxidasa y lacasas). Este sistema, se basa fundamentalmente en la producción de radicales libres, permitiendo que las enzimas sean catalíticamente activas sobre diversos sustratos orgánicos. Gracias a la composición de la pared celular de los hongos y la afinidad de algunos componentes de esta con los colorantes, se puede realizar también un proceso de biosorción de los colorantes una vez diluidos (Garzón, 2009; Tan *et al.*, 2013).

Algunos productos intermedios de decoloración como por ejemplo las aminas aromáticas y los compuestos fenólicos poseen mayor toxicidad y baja biodegradabilidad. Numerosos estudios han demostrado que ciertas cepas de hongos como *Thamnidium elegans*, *Zygorhynchus moelleri* y *Yarrowia lipolytica*, presentan una adaptación y capacidad eficiente en la eliminación de estos compuestos fenólicos aromáticos (Tan *et al.*, 2014).

Procesos similares a los fúngicos también se han estudiado en bacterias, ya que estas son capaces de realizar procesos de degradación aeróbica y anaeróbica mediados por algún mecanismo enzimático. Además, pueden ser resistentes a algunas concentraciones de sustancias tóxicas (Garzón, 2009).

Las bacterias han sido utilizadas para la decoloración de colorantes azo debido a su alta actividad, distribución extensa y fuerte adaptabilidad (Pearce *et al.*, 2003; dos Santos *et al.*, 2007; Tan *et al.*, 2014). Sin embargo se sabe que algunas aminas aromáticas podrían inhibir la actividad de ciertas bacterias (Qu *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2014).

Para realizar un tratamiento más eficiente y estable de los efluentes, se han realizado estudios de degradación con alguna cepa de levadura, con el objetivo de investigar capacidades y nuevos mecanismos que mejoren lo expuesto anteriormente. Según algunos de estos estudios, *Candida tropicalis* es capaz de decolorar de manera eficiente y degradar varios ácidos y colorantes azoicos en condiciones aeróbicas (Qu *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2013).

Si comparamos la degradación biológica mediante el uso de bacterias y hongos filamentosos con la que realizan las levaduras, estas últimas presentan numerosas ventajas, entre las que destacan la disponibilidad elevada de biomasa, el bajo coste o su capacidad de

resistir entornos desfavorables, como aquellos que presentan pH ácidos (Das y Charumathi, 2012).

La decoloración llevada a cabo por las levaduras se produce mediante tres mecanismos: biosorción, bioacumulación y biodegradación. La biosorción es la unión de solutos a la biomasa por un proceso en el cual la energía o el transporte metabólico pueden estar o no involucrado, mientras que la bioacumulación, es la acumulación de contaminantes por el metabolismo de las células. La biodegradación, en cambio, es un proceso que depende de la energía y conlleva la separación de los colorantes en varios subproductos mediante la acción de enzimas. Si esta es completa, el proceso recibe el nombre de mineralización (Das y Charumathi, 2012).

El comportamiento de la biosorción depende de la biomasa microbiana al estar ligado principalmente a la pared celular. Este proceso, implica el metabolismo del nitrógeno y están presentes algunos grupos como el peptidoglucano o proteínas que comprenden la biomasa de la levadura. También podemos encontrar grupos activos en la superficie celular tales como: polisacáridos, lípidos, aminoácidos y otros componentes celulares (Aksu, 2005; Das y Charumathi, 2012).

La biosorción depende de parámetros tales como pH, concentración de colorante inicial y temperatura. La carga neta del bioadsorbente depende del pH, porque la superficie de este, tiene polímeros con muchos grupos funcionales diferentes (carboxilo, hidroxilo, amino y fosfato). Si bajamos el pH, la superficie bioadsorbente se protona y adquiere carga neta positiva, aumentando la unión de los colorantes aniónicos a dicha superficie.

Por el contrario si aumentamos el pH, aumenta la carga neta negativa en la superficie conduciendo a una atracción electrostática de los cationes del colorante. La concentración del colorante influye sobre la fuerza motriz que permite superar la resistencia en la transferencia de masa del colorante entre la fase acuosa y la fase sólida. (Aksu, 2005; Das y Charumathi, 2012).

En lo que se refiere a la temperatura, si la aumentamos disminuye la viscosidad de la solución que contiene el colorante, aumentando la velocidad de difusión de las moléculas del colorante a través del límite de la capa externa. Por otro lado, la dosis de biosorbente afecta a su capacidad de absorción. Con el aumento de la dosis, habría más

Introducción

sitios disponibles para la biosorción, pero la capacidad de asimilación bajaría debido a la disminución de la tasa de transferencia de soluto en la superficie del adsorbente (Aksu, 2005; Das y Charumathi, 2012).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Con el paso del tiempo, debido al aumento de la población, hay una gran preocupación social por la eliminación de los vertidos contaminantes al medio. Los métodos para la retirada de los efluentes utilizados en la industria son muy importantes para un respetuoso cuidado con el medio ambiente. De todos los tratamientos existentes, los biológicos son de gran interés para llevar a cabo procesos de degradación de colorantes por sus mínimas consecuencias ya que no deterioran el entorno y si lo hacen, el efecto es mucho menor que el provocado por otros procedimientos por la utilización de reactivos tóxicos.

Por estas razones, es muy importante realizar un correcto tratado de las sustancias contaminantes, buscando nuevos métodos o mejorando los existentes hasta ahora.

El objetivo general de este trabajo es evaluar la capacidad de una nueva cepa de levadura, (MIBM 1-15), para eliminar distintos colorantes del medio en el que se encuentran. Este objetivo general se desarrolló a través de los siguientes objetivos específicos:

1. Determinación de los colorantes que pueden ser eliminados por la levadura estudiada.
2. Efecto de diferentes parámetros físico-químicos y condiciones de cultivo sobre la capacidad de la levadura para consumir los colorantes Nigrosina y Reactive Green.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Reactivos

Los colorantes empleados en el presente estudio han sido:

3.1.1. Nigrosina (Panreac). Es un sólido negro, obtenido mediante la combustión de gas natural, petróleo, alquitrán o aceites grasos en presencia de poco aire, cuyas partículas de carbón puro se depositan en las paredes de unas cámaras. Se podría emplear para la observación de las esporas. Es un colorante reactivo de tipo azoico y soluble en agua.

3.1.2. Reactive Green (Sigma). Es un colorante sólido que se caracteriza por su color verde. Se emplea en la tinción de tejidos y en la industria textil. Es un colorante perteneciente al grupo azoico y soluble en agua.

3.1.3. New Coccine (Sigma). Es un colorante sintético sólido de color rojo intenso. Se obtiene derivado del petróleo. Se emplea en la industria alimentaria en la fabricación de caramelos, yogures, sopas y salsas. Es un colorante estable a la luz y a los ácidos. Este colorante pertenece al grupo de las antraquinonas y se puede disolver en agua.

3.1.4. Orange II (Sigma). Este colorante sólido de color anaranjado y se puede aplicar a todo tipo de fibras naturales como la lana, algodón y seda así como para sintéticos como el acrílico, rayón y poliéster. También se puede usar para pinturas, plásticos y cuero. Pertenece también al grupo de colorantes azoicos y se puede disolver en agua.

3.2. Medios de cultivo

3.2.1. YEPD: Este medio se compone de: peptona 2% (Panreac), glucosa 2% (Merck), extracto de levadura 1% (Panreac). Para cultivo sólido se añadió agar 1,5% (Panreac). Se ha empleado el medio de cultivo sólido para el crecimiento y mantenimiento rutinario de la levadura. Una vez finalizada la preparación del medio de cultivo, se ha llevado a un proceso de autoclavado a 121°C durante 15 min, tras lo cual se procedió a su depósito en placas de Petri para su conservación y posterior utilización.

3.2.2. YNB Glucosa (YNBG): Este medio se compone de: YNB sin aminoácidos 0,167% (Sigma) y Glucosa 0,4% (Merck). Ha sido empleado en la aclimatación y crecimiento de la cepa de levadura elegida. En adelante, este medio será llamado YNBG. Una vez preparado el medio de cultivo antes de la inoculación, se sometió a un proceso de autoclavado a 121°C durante 15 min.

3.2.3. YNB Glucosa Colorante (YNBGC): Este medio de cultivo tiene los mismos componentes que el medio anterior (YNBG) excepto por la adición, en la proporción oportuna, de los respectivos colorante a estudiar (Reactive Green, Nigrosina, New Coccine y Orange II). Una vez preparado el medio de cultivo, se le aplicó un proceso de autoclavado a 115°C durante 15 min. En adelante este medio será llamado YNBGC.

3.3. Microorganismo

La levadura empleada en el presente estudio es una cepa silvestre obtenida tras su aparición como contaminante en un ensayo de degradación de colorantes mediante el empleo de bacterias, y a la que se le dio el nombre de MIBM 1-15. Ésta se seleccionó tras la observación en placa de un destacable efecto sobre el colorante Reactive Green añadido a una placa de TSA.

3.4. Preparación del preinóculo

Una vez determinados los medios de cultivo apropiados se procedió realizar una siembra por estría de la cepa seleccionada en medio YEPD sólido durante 48 horas. Pasado este tiempo, se creció en medio de cultivo líquido (YEPD) durante 24 horas a una temperatura de 25°C y una agitación de 220 rpm. Alcanzada la fase exponencial tardía, se inocularon 750 ml de medio de cultivo YNBG estéril con esta suspensión celular.

Simultáneamente, se preparan los medios de cultivo con los colorantes que fueron alicuotados en matraces de 100 ml, a razón de 50 ml cada uno, tras lo cual fueron autoclavados a 115°C durante 15 min.

El inóculo de 750 ml fue incubado durante 12 horas a una temperatura de 25°C con una agitación de 220 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica de aproximadamente 1.6, medida a 590 nm con la ayuda de un espectrofotómetro (Thermo Scientific Evolution 201). Esta absorbancia se corresponde con una densidad celular de $3,20 \times 10^7$ cel/mL.

Material y métodos

Una vez tenemos la Abs_{590} de 1,6, el volumen total de inóculo fue transferido a cuatro tubos de 250 ml (pesados previamente) y centrifugados a 7500 rpm durante 10 min (Kontron Instruments Centrikon T-124), tras lo cual se determinó el peso húmedo de células en cada uno de ellos.

Se ajustó la densidad celular a 0,33 g/mL y se transfirieron 2 ml de esta suspensión a tubos de 10 ml, que fueron centrifugados de nuevo a 4000 rpm durante 10 min (Microfuge[®] 22R Centrifuge, BeckmanCoulter[™]). El sedimento se resuspendió en 2 ml del medio de cultivo correspondiente a las condiciones en las que se llevaría a cabo el respectivo ensayo. Quinientos microlitros de esta suspensión fueron transferidos a cada uno de los matraces con 50 ml de YNBGC, obteniendo así una densidad celular final de 4 g/L.

En todos los casos, los ensayos se llevaron a cabo por triplicado, empleando como control el mismo medio sin inoculación de células, y como blanco el medio de cultivo YNB.

3.5. Estudio del consumo de los colorantes a lo largo del tiempo y en función de su concentración

En un primer ensayo se trató de determinar las concentraciones óptimas y el tiempo necesario para la eliminación de cada uno de los colorantes (Reactive Green, Nigrosina, Orange II y New Coccine). Para ello, se testaron las siguientes concentraciones: 25 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L, 150 mg/L, 200 mg/L, 350 mg/L, en YNBG. El seguimiento del consumo de colorante se llevó a cabo durante 24 horas, realizando medidas de absorbancia cada 2 horas.

Antes de proceder a medir la absorbancia, se realizó un escaneo entre 400 y 700 nm con el objetivo de verificar la longitud de onda característica a la cual absorben cada uno de los colorantes.

La concentración de los colorantes se analizó en el sobrenadante de cada uno de los ensayos, realizados por triplicado. Para ello, se centrifugó 1 ml de la muestra durante 1 min a 16000 rpm y, posteriormente, las medidas espectrofotométricas se realizaron en una cubeta de cuarzo, a las longitudes de onda mostradas en la Tabla 1.

3.6. Efecto de distintos parámetros sobre el consumo del colorante

Una vez establecidas las concentraciones apropiadas y el tiempo necesario para la decoloración, se emplearon los colorantes Nigrosina y Reactive Green para establecer las condiciones más adecuadas para su degradación, siguiendo el protocolo descrito por Daâssi *et al.* (2013). Se testaron las temperaturas: 20°C, 25°C, 30°C, 35°C y 40°C y los valores de pH inicial: 2, 4, 6, 8, 10. Por otro lado, también se estudiaron varias concentraciones de glucosa (0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, 1% y 1,2%), y el consumo en agitación (120 rpm, 220 rpm) y estático.

El diseño del experimento, así como la estimación de la concentración de colorante, se realizaron de acuerdo con lo indicado anteriormente.

Cuando no se menciona en el respectivo ensayo, las condiciones de cultivo han sido: 25°C, 220 rpm, pH 6, y 4 g/L de glucosa.

A modo de comparación con los estudios llevados a cabo anteriormente, manteniendo las mismas condiciones y concentraciones óptimas de los ensayos anteriores y con el objetivo de minimizar los gastos, se diseñó un ensayo con el fin de determinar si el microorganismo podía emplear al colorante (Nigrosina y/o Reactive Green según el caso) como fuente de carbono o como fuente de carbono y nitrógeno.

3.7. Estudio de la relación entre la biomasa microbiana y el consumo de colorante

Con el objetivo de relacionar la biomasa microbiana con el consumo de colorante, se dispuso un ensayo de consumo de colorante en condiciones óptimas en el que a lo largo de 14 horas, se determinaron simultáneamente el consumo de colorante (según se ha descrito en el apartado 3.6) y la biomasa celular. Para determinar la biomasa se tomaron, cada 2 horas, muestras de 1ml de cultivo que fueron transferidas a un vial Eppendorf, previamente pesado. Los viales se centrifugaron en las condiciones arriba indicadas, se secaron en una estufa a 70°C y se pesaron de nuevo. La biomasa (estimada como peso seco) se determinó mediante la diferencia de peso entre el vial vacío y el vial con las células secas.

Material y métodos

3.8. Análisis de datos

En todos los ensayos, la relación de decoloración se calculó empleando la siguiente ecuación:

$$Decoloración(\%) = \frac{A1 - A0}{A0} \times 100$$

donde A0 y A1 representan la absorbancia inicial y final del colorante respectivamente. De esta manera, podemos saber el porcentaje de consumo de cada colorante durante el tiempo estimado.

Todo el proceso experimental para cada uno de los estudios, se ha realizado por triplicado y los valores medios de las réplicas se han usado para determinar el consumo de colorante por el microorganismo. El error fue calculado como la desviación estándar entre las tres réplicas.

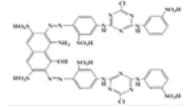
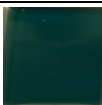



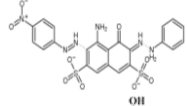
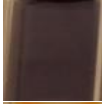

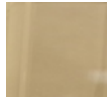
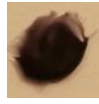
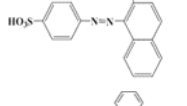



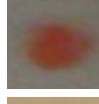
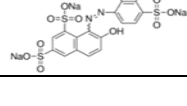


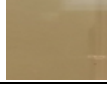

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Eliminación de colorantes empleando la cepa MIBM 1-15

La capacidad de las levaduras y los hongos para eliminar o degradar distintos tipos de colorantes ha sido descrita en diferentes estudios (Zeroual *et al.* (2007) y Tan *et al.* (2014). El presente trabajo se inició probando la capacidad de la cepa de levadura MIBM 1-15 para eliminar del medio diferentes colorantes de tipo azoico y del grupo de las antraquinonas cuyas estructuras químicas se muestran en la Tabla 1. Para ello, se dispuso un ensayo preliminar en el que se comprobó la capacidad de la levadura para consumir Reactive Green, Nigrosina, Orange II y New Coccine a una concentración de 25 mg/L. Los resultados se presentan en la Tabla 1 en la que se puede observar el color de los medios antes y después de la decoloración, confirmando que la levadura eliminó el 100% de todos los colorantes al cabo de 72h.

Zeroual *et al.* (2007) y Tan *et al.* (2014) consiguieron reducir la concentración de colorantes azoicos como el Orange II, Azorrubina, Azul Tripan, en condiciones similares, mediante el empleo de la cepa *Geotrichum* sp.

Tabla 1: Colorantes empleados en el estudio, indicando su nombre, fórmula química y cada una de las imágenes antes y después de la decoloración de los medios utilizados. Se incluye el porcentaje y el tiempo tardado en eliminar dichos colorantes mediante la cepa seleccionada. Por último se menciona la longitud de onda a la que absorben los colorantes.

Nombre	Estructura Química	Antes de la decoloración	Después de la decoloración			Máx. decoloración	Tiempo (h)	ABS (nm)
			Suspensión	Sobrenadante	Precipitado			
Reactive Green						100%	72	628
Nigrosina						100%	72	570
Orange II						100%	72	480
New Coccine						100%	72	505

4.2. Estudio del consumo de los colorantes en función del tiempo y su concentración

Una vez comprobado que la cepa puede consumir los cuatro colorantes mencionados en el apartado anterior, se escogieron dos de ellos, Reactive Green y Nigrosina, para continuar con el estudio. Posteriormente, se ha realizado un seguimiento durante 24 horas del porcentaje de consumo de los colorantes empleando la levadura seleccionada, con el objetivo de determinar el tiempo que necesita la cepa silvestre para eliminar diferentes concentraciones de ambos colorantes. En primer lugar, para el Reactive Green, se probaron las concentraciones de 50, 200 y 350 mg/L, comprobando que las concentraciones de 200 y 350 mg/L no pueden ser decoloradas por la levadura. Por ello, se seleccionaron las concentraciones de 25, 50 y 100 mg/L de ambos colorantes para comprobar su decoloración a lo largo del tiempo por parte de la levadura (Figura 5).

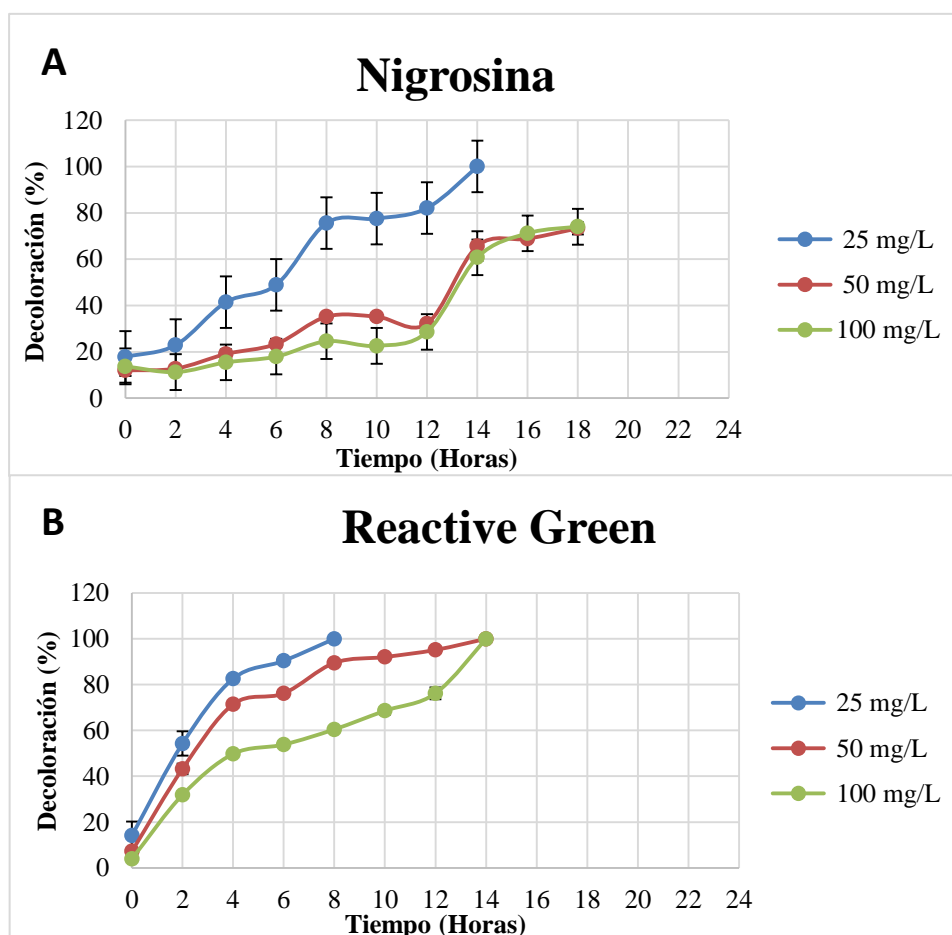


Figura 5: Consumo de los colorantes Nigrosina (A) y Reactive Green (B) durante 24 horas a diferentes concentraciones con las siguientes condiciones de incubación: 25°C, pH 6, 220 rpm y 4 g/L de glucosa. Se muestra la media de 3 réplicas y el error calculado como la desviación estándar entre las mismas.

Para la posible aplicación industrial de los microorganismos que realizan las decoloraciones, es muy importante saber si pueden soportar altas concentraciones de

colorantes, ya que en las fábricas las concentraciones en los residuos o efluentes contaminados oscilan entre 10 y 50 mg/L (Padamavathy *et al.*, 2003).

Estas figuras muestran la eliminación por parte de la levadura de los colorantes a las 3 concentraciones ensayadas. Concretamente, en la Figura 5A, podemos ver que la concentración que permite una mayor decoloración es la de 25 mg/L, consiguiéndose un 100% de consumo de Nigrosina a las 14 horas. Las otras dos concentraciones (50 y 100 mg/L) se decoloran en menor grado hasta que, a partir de las 14 horas, se estabiliza el consumo en un 70-74%.

Estos datos son comparables con los resultados obtenidos por Pearce *et al.* (2003), quienes han obtenido una decoloración del 98% para el colorante Rojo Ácido (50 mg/L) después de 10 horas empleando la cepa de levadura LH-F1. A medida que aumentaba la concentración, el tiempo necesario para la decoloración fue mucho mayor (tiempos superiores a 50 horas) o incluso podría pararse el proceso, de manera similar a lo que sucede con el colorante Nigrosina, como se ha mencionado anteriormente.

Respecto al colorante Reactive Green (Figura 5B), la concentración de 25 mg/L queda totalmente decolorada después de 8 horas, mientras que para las otras dos concentraciones (50 mg/L y 100 mg/L), fueron necesarias 14 horas para alcanzar un consumo del 100%.

La variabilidad, mostrada por los microorganismos, para degradar colorantes en distinta concentración y a diferentes velocidades ha sido atribuida a diferentes razones.

Por un lado, las variaciones en el porcentaje de consumo entre los colorantes empleados se podrían atribuir a las diferencias en la estructura química de los colorantes, número de enlaces, número de grupos químicos funcionales, peso molecular y también podrían influir las funciones metabólicas variables del microorganismo (Banat *et al.*, 1996 y Ramalho *et al.*, 2004; Amoozegar *et al.*, 2011).

Por otra parte, este efecto podría ser explicado por el aumento de la carga orgánica, la toxicidad de algunos colorantes azoicos y sus intermedios sintéticos de decoloración (aminas aromáticas y compuestos fenólicos), que pueden matar a las células cuando se encuentran a elevadas concentraciones, al mostrar efectos mutagénicos (Tan *et al.*, 2014).

Resultados y discusión

Se ha descrito que los hongos podrían degradar compuestos orgánicos aromáticos, tales como los fenoles, que han sido generados durante procesos de decoloración de las aguas residuales. Tsioulpas *et al.* (2002), ha encontrado varias cepas de *Pleurotus* sp. que podrían degradar compuestos fenólicos y disminuir su fitotoxicidad. Ensayos similares realizados por Aggelis *et al.* (2003) encontraron cepas de *P. ostreatus* que podrían degradar y desintoxicar eficientemente compuestos fenólicos.

Otra posible explicación a este retardo en la eliminación de los colorantes por parte de algunas cepas de levaduras respecto a otras, podría ser la toxicidad debido a la acumulación de algunos subproductos sintetizados por las levaduras cuando alcanzan la fase estacionaria, inhibición de la actividad metabólica celular o una concentración inadecuada de biomasa (Pearce *et al.*, 2003; Saratale *et al.*, 2009; Ogugbue y Sawidis, 2011).

En contraposición con nuestros resultados, para el colorante Reactive Green, Chang y Lin (2001) y Saratale *et al.* (2009), obtuvieron un porcentaje de consumo de un 100% empleando la cepa *Micrococcus glutamicus* después de 42 horas a 37°C, en estático, y a una concentración de 50 mg/L. A la vista de nuestros resultados, la cepa MIBM 1-15, ha conseguido eliminar el mismo colorante a una concentración de 100 mg/L durante 14 horas empleando las condiciones indicadas anteriormente.

Si comparamos el estudio realizado con la cepa TEMS 1 de *Vibrio harveyi* para degradar el colorante Reactive Green (100 mg/L) (Amoozegar *et al.*, 2011), con la decoloración obtenida mediante el empleo de la cepa MIBM 1-15, podemos destacar, por un lado, el menor tiempo empleado por la cepa objeto de este estudio, 14 horas, respecto a las 24 horas empleadas por la cepa TEMS 1 y, por otro lado, un mayor consumo de colorante, 100%, por parte de MIBM 1-15, frente al 16,3% degradado por dicha cepa bacteriana.

Cepas seleccionadas de las especies *P. ostreatus*, *T. versicolor* y *Klebsiella* sp. presentaron un buen crecimiento y degradación de una serie de colorantes (Verde Básico, Azul Disperso y Azul Ácido). Sin embargo, a diferencia de la cepa estudiada, en este trabajo, para el colorante Nigrosina, ninguna de las cepas ha presentado decoloración del mismo, excepto la cepa de *P. ostreatus* que consiguió decolorar un 25% (Pereira y Regina, 2001; Nilsson *et al.*, 2006).

4.3. Eliminación de colorantes en ausencia de fuente de Nitrógeno y/o Carbono

Estudios previos llevados a cabo por Asad *et al.* (2007), describen el aislamiento de tres nuevas cepas de *Halomonas* de efluentes textiles con capacidad para emplear una amplia gama de colorantes azoicos como única fuente de carbono. En base a esto se realizaron dos experimentos para determinar si la levadura estudiada en este trabajo puede usar los colorantes como fuente de carbono, o como fuente de carbono y nitrógeno, lo cual podría ser de interés en los procesos de decoloración.

Para ello, se dispusieron dos ensayos de consumo de colorante, uno utilizando sulfato amónico como fuente de nitrógeno y el colorante como posible fuente de carbono (YNB + colorante) y, el otro, con colorante como posible fuente de carbono y nitrógeno (solución salina + colorante).

A la vista de los resultados obtenidos (Figura 6), se aprecia en ambos casos un bajo porcentaje de decoloración (si se comparan con los obtenidos en las otras condiciones ensayadas), ya que en ningún caso llega al 30% después de 14 horas de incubación. De estos resultados parece deducirse que la cepa MIBM 1-15 no puede desarrollarse en ninguno de los dos medios probados y que, por tanto, la eliminación del colorante observada es la que pueden llevar a cabo las células del inóculo añadidas.

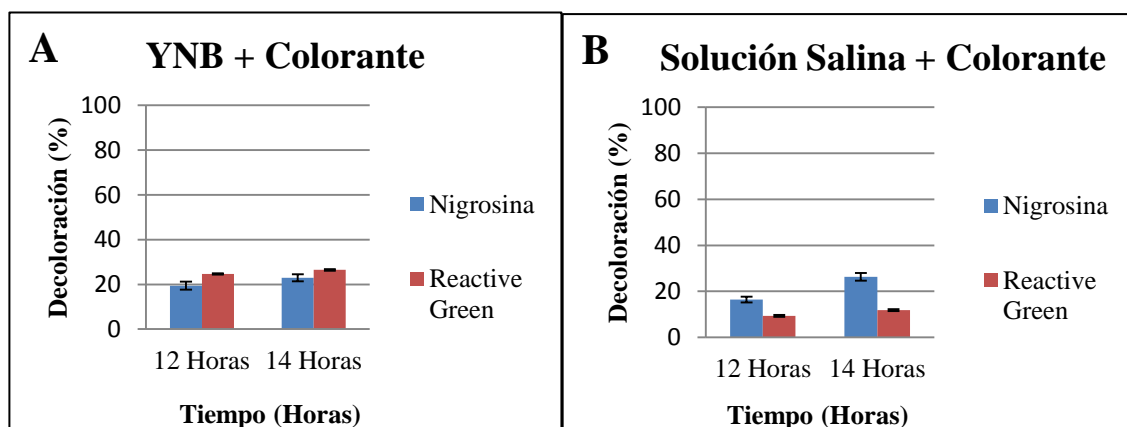


Figura 6: Consumo de los colorantes Reactive Green y Nigrosina en las siguientes condiciones: 25°C, pH 6 y 220 rpm. Se muestra la media de 3 réplicas y el error calculado como la desviación estándar entre las mismas. **A:** Consumo de los colorantes con YNB; **B:** Consumo de los colorantes con solución salina.

Aunque se hayan aislado cepas capaces de usar colorantes como fuente de carbono, también existen estudios que demostraron que la ausencia de glucosa inhibe la actividad enzimática que permite la decoloración. La adición solo de colorante como fuente de

Resultados y discusión

carbono y nitrógeno puede inhibir el metabolismo de la cepa empleada, conllevando un retraso o inhibición de la capacidad para degradar el colorante (Garzón, 2009).

Por esta razón, para continuar con los experimentos, se optó por emplear un medio mínimo suplementado con fuente de carbono y de nitrógeno

4.4. Evaluación del efecto de los distintos parámetros que pueden afectar a la eliminación del colorante

Se llevó a cabo una optimización con el propósito de determinar si hay condiciones de aplicación más ventajosas que las que hemos usado hasta ahora para llevar a cabo la eliminación de los dos colorantes estudiados. Para ello, se ha evaluado el efecto de la temperatura, pH inicial, agitación y concentración de glucosa sobre la decoloración. Los resultados relativos al efecto del pH inicial sobre la decoloración de Nigrosina y Reactive Green se pueden observar en las Figuras 7A y 7B respectivamente.

A la vista de los resultados obtenidos en la optimización del consumo de Nigrosina, no se aprecian diferencias importantes en su eliminación, entre los valores de pH 4 y 6 (Figura 7A), con valores de aproximadamente el 60% al cabo de 12 horas, y del 54% a pH 8, mientras que para los valores de pH 2 y 10, el consumo alcanzó valores más bajos (35%) a las 12 horas. En cambio, si atendemos a los resultados a las 14 horas, comprobamos que la cepa es capaz de consumir, en todos los casos, el 100% de colorante, excepto a pH 10 en el que alcanza un 80%.

En el caso del colorante Reactive Green (Figura 7B), la cepa se comporta mejor a pH 6, consiguiendo un consumo de colorante del 97% a las 12 horas. Para los valores de pH 2, 4 y 8 se obtuvo una menor decoloración, aunque consiguió eliminarlo a un nivel cercano al 87% en 12 horas. A pH 10 el consumo fue significativamente menor, con una decoloración de en torno al 45%, tras 12 horas de incubación. A las 14 horas, se comprobó que la cepa empleada conseguía una eliminación del 100%, para los valores de pH 2, 4, 6 y 8. Sin embargo a pH 10, el porcentaje de consumo es un 48%, muy similar al porcentaje obtenido a las 12 horas.

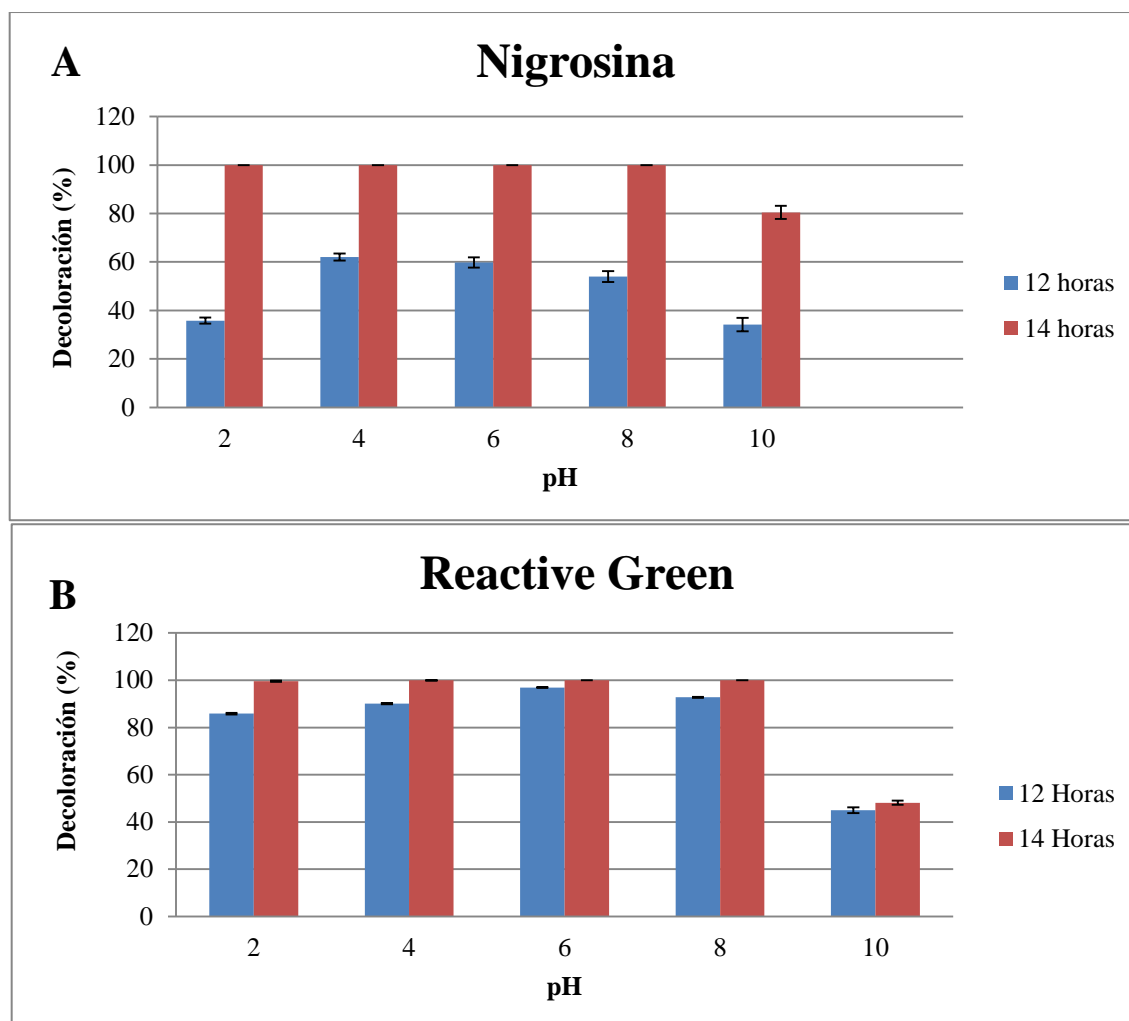


Figura 7: Consumo de los colorantes Nigrosina (A) y Reactive Green (B) a diferentes valores de pH. Las condiciones de incubación han sido: 25°C, 220 rpm y 4 g/L de glucosa. Se muestra la media de 3 réplicas y el error calculado como la desviación estándar entre las mismas.

En la Figura 7B se aprecia que, a pH 10, se alcanzó un porcentaje de consumo cercano al 45% durante 12 horas y de un 48% a las 14 horas. Según Pearce *et al.* (2003), el pH óptimo para la eliminación del colorante suele ser un valor cercano a pH neutro o un valor de pH ligeramente alcalino. El porcentaje de decoloración tiende a bajar cuando los valores de pH son muy ácidos o muy alcalinos.

Comparando los resultados obtenidos en este trabajo con los de Guo *et al.* (2008), empleando la cepa GTW del género *Halomonas*, llevaron a cabo la degradación de varios colorantes azoicos a un pH entre 6,5 y 8,5. Observando las Figuras 7A y 7B, se puede

Resultados y discusión

afirmar que, en general, la cepa MIBM 1-15 después de 14 horas, podría emplear todo el rango de valores de pH estudiados para llevar a cabo la eliminación de los colorantes, destacando que, a pH 10, el consumo se reduce en un 20% para la Nigrosina y en un 52% para el Reactive Green.

Por otra parte, teniendo en cuenta las medidas de pH realizadas antes y después de los ensayos de decoloración, se apreció un significativo descenso del mismo al final de los experimentos, hasta pH 3, llegando a la conclusión de que la levadura empleada acidifica el medio cultivo. Estos datos se contraponen con los resultados obtenidos por An *et al.* (2002) y Wu *et al.* (2009), en los que sugieren que si el pH se neutraliza a 7, se logra una mejor tasa de degradación.

Debido a la tolerancia a la variación de los pHs de la cepa bajo estudio, sería un candidato de gran interés para el tratamiento biológico de diferentes efluentes (Ogugbue y Sawidis, 2011).

En segundo lugar, se trató de determinar la temperatura óptima para la eliminación de cada uno de los dos colorantes. Los resultados correspondientes al efecto de la temperatura sobre la decoloración de Nigrosina y Reactive Green se pueden observar en las Figuras 8A y 8B respectivamente.

En lo que respecta al colorante Nigrosina (Figura 8A), se puede comprobar que a 25°C obtenemos una eliminación del 85% a las 12 horas (muy similar al obtenido a 30°C), siendo esta su temperatura óptima. A las temperaturas restantes (20, 35 y 40°C), el porcentaje de consumo fue menor, encontrándose entre el 55% a una temperatura de 20°C, 76% a una temperatura de 35°C y el 73% a una temperatura de 40°C. En dicha gráfica, a las 14 horas y con las temperaturas de 25, 30 y 35°C se alcanza un 100% de consumo, encontrándose este por encima del 95% a 20 y 40°C.

En el caso del colorante Reactive Green (Figura 8B), la temperatura óptima para su eliminación fue, nuevamente, de 25°C, alcanzando un consumo del 93% a las 12 horas. Datos muy similares se obtienen para 20 y 30°C (cercaos al 90%) El resto de temperaturas (35 y 40°C) mostraron un consumo de colorante más reducido pero también se conseguiría una decoloración del 86% aproximadamente. Atendiendo a los resultados obtenidos a las 14 horas, se puede observar que a 25 y 30°C se consigue un consumo del 100%, mientras que el resto de temperaturas (20, 30 y 40°C) sobrepasan el 89%.

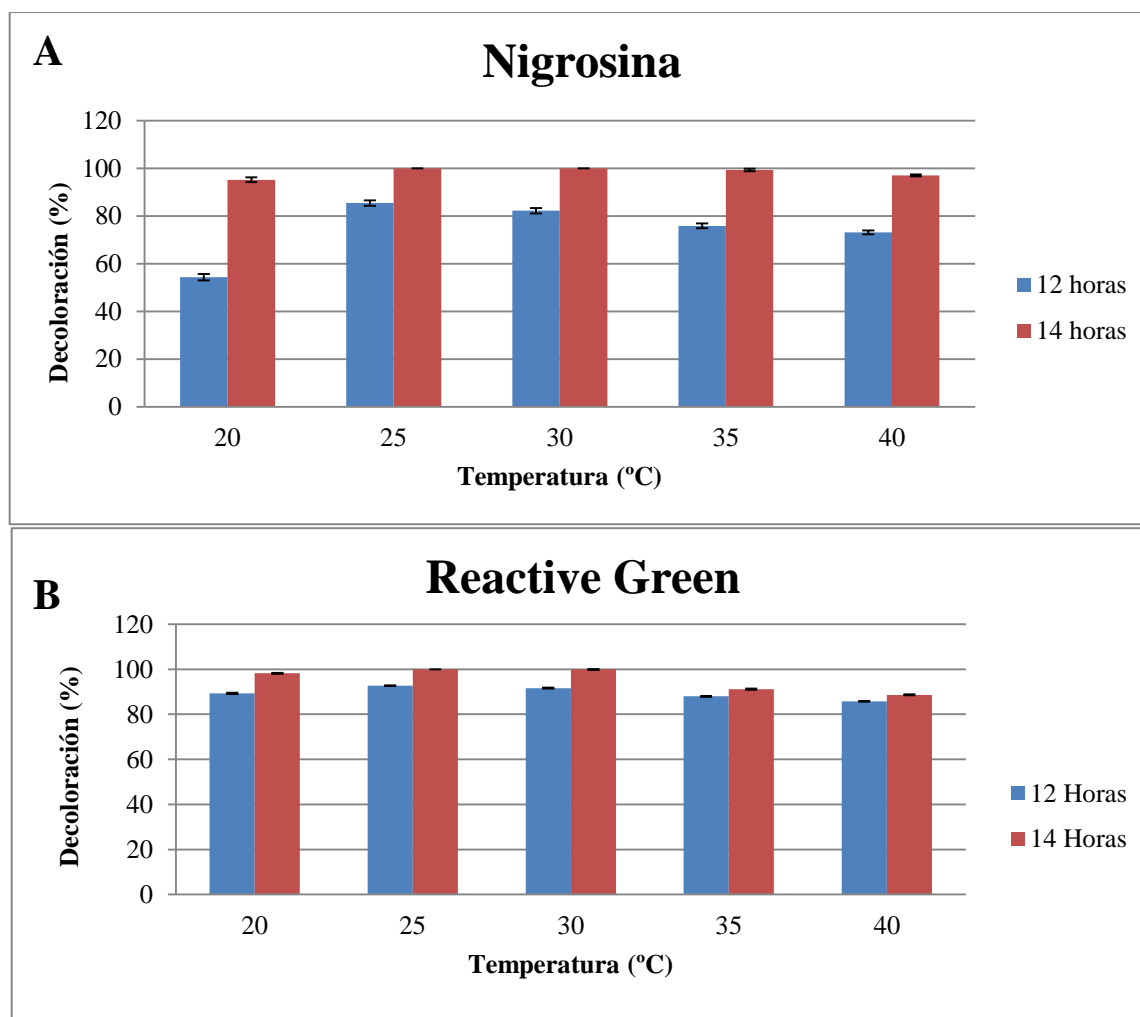


Figura 8: Consumo de los colorantes Nigrosina (A) y Reactive Green (B) a diferentes temperaturas con las siguientes condiciones de incubación: pH 6, 220 rpm y 4 g/L de glucosa. Se muestra la media de 3 réplicas y el error calculado como la desviación estándar entre las mismas.

Se aprecia, por lo tanto, que la temperatura tiene un mayor efecto sobre el consumo del colorante en el caso de la Nigrosina que en el caso del Reactive Green, aunque en ambos casos, aumentando el tiempo de decoloración hasta 14 horas, se han conseguido niveles de consumo entre un 88-100%. El amplio rango de temperaturas a las que la levadura estudiada puede llevar a cabo la decoloración la convierte también en una cepa de interés aplicado atendiendo a este parámetro.

Además de la influencia del pH y la temperatura, se estudió el efecto de la concentración de glucosa sobre el consumo de colorante. Los resultados referentes a dicho

Resultados y discusión

efecto sobre la eliminación de los colorantes Nigrosina y Reactive Green, se pueden observar en las Figuras 9A y 9B respectivamente.

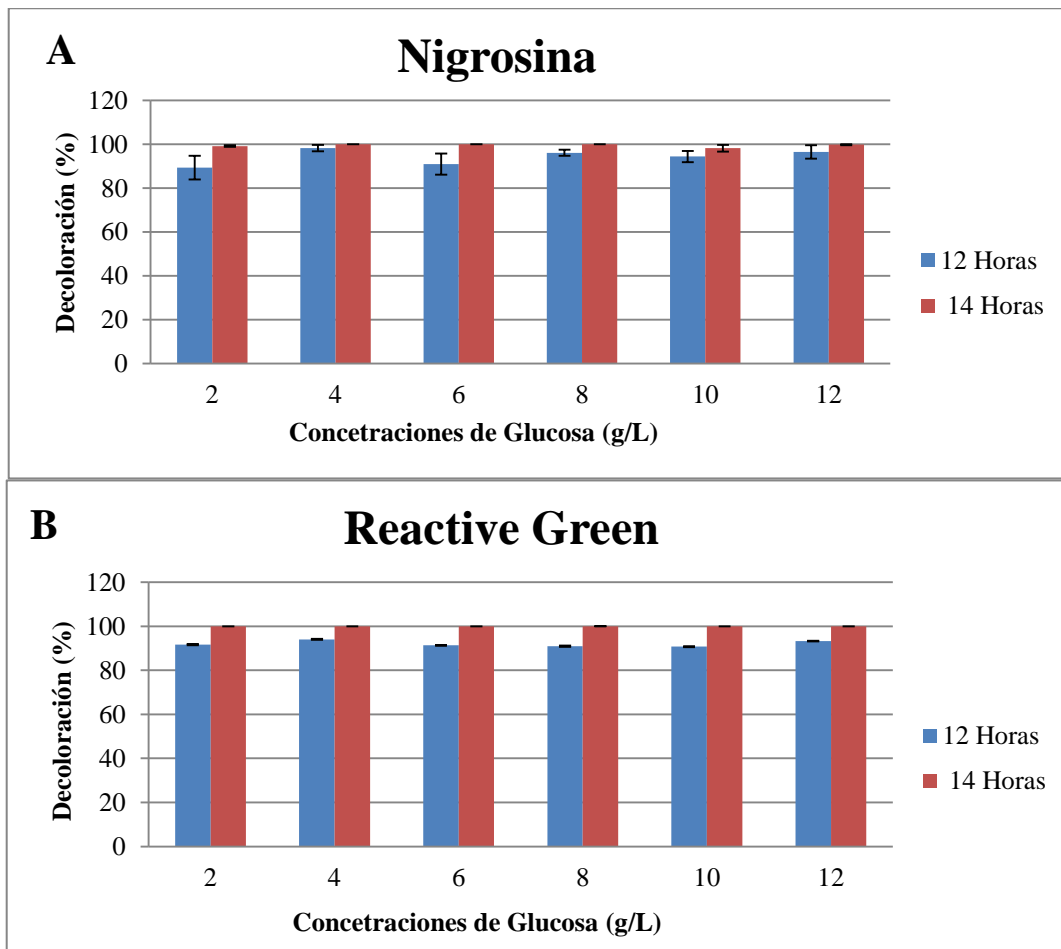


Figura 9: Consumo de los colorantes Nigrosina (A) y Reactive Green (B) a diferentes concentraciones de glucosa con las siguientes condiciones de incubación: 25°C, pH 6, 220 rpm. Se muestra la media de 3 réplicas y el error calculado como la desviación estándar entre las mismas.

Los resultados obtenidos para la concentración de glucosa, presentados en la Figura 9A (Nigrosina), muestran una concentración óptima de glucosa de 4 g/L, llegando al 98% de consumo al cabo de 12 horas, aunque porcentajes muy similares se observan con el resto de las concentraciones, incluso la de 2 g/L (89%). En un estudio llevado a cabo por Tan *et al.* (2009), estos consiguieron degradar aproximadamente un 95% del colorante Rojo Ácido en 12 horas a una concentración de glucosa entre 4-8 g/L. Según estos autores, si la concentración de glucosa está fuera del rango mencionado, los ratios de decoloración disminuyen, empleando más horas para realizar el proceso, mientras que concentraciones muy elevadas, inhibirían la decoloración, efecto que no se aprecia en nuestros resultados. Si observamos los resultados obtenidos a las 14 horas, la cepa MIBM 1-15 es capaz de

llegar a un 100 % de consumo para todas las concentraciones de glucosa estudiadas en ambos colorantes.

En lo que respecta al colorante Reactive Green (Figura 9B), encontramos algo muy similar que en el caso anterior. Nuevamente, la concentración óptima de glucosa sería 4 g/L, a la que hay una degradación del 95% al cabo de 12 horas. En el resto de concentraciones (2, 6, 8 y 10 g/L) sucede igual que en el caso anterior, al obtenerse una decoloración en todas superior al 90% tras 12 horas.

Según Chen *et al.* (2003), la degradación de colorantes azoicos, realizada con la especie *A. hydrophila* en un rango de concentraciones de glucosa (0-10 g/L), indican que las concentraciones superiores a 0,15 g/L, inhiben por completo el proceso.

En nuestro caso, a diferencia de lo descrito por otros autores, después de comprobar los resultados a las 14 horas empleando la cepa MIBM 1-15, todo el rango de concentraciones de glucosa estudiadas podrían ser usadas por el microorganismo para realizar el proceso de decoloración, destacando la capacidad de eliminarlo completamente a las concentraciones de glucosa más bajas (2-4%).

Según los estudios previos sobre degradación de colorantes por parte de microorganismos, estos pueden llevar a cabo el proceso de forma aeróbica o anaeróbica (Marmagne y Coste, 1996; Garzón, 2009).

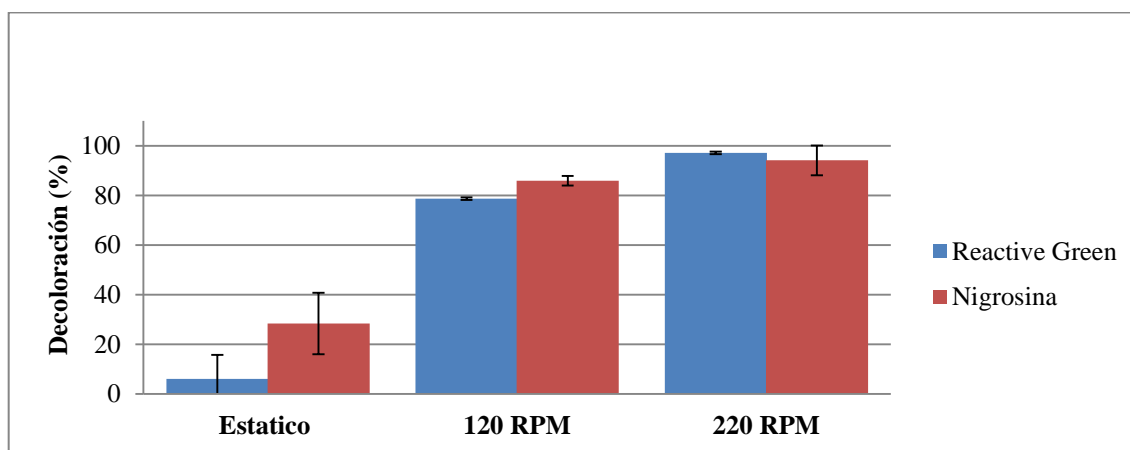


Figura 10: Consumo de los colorantes Reactive Green y Nigrosina en estático y agitación. Las condiciones de incubación han sido: 25°C, pH 6 y 4 g/L de glucosa durante 14 horas. Se muestra la media de 3 réplicas y el error calculado como la desviación estándar entre las mismas.

De acuerdo con ello, el último parámetro evaluado, fue el efecto de la aireación sobre la capacidad de decoloración de la cepa MIBM 1-15. Los resultados

Resultados y discusión

correspondientes al efecto de la aireación sobre el consumo de los colorantes Reactive Green y Nigrosina, se muestran en la Figura 10. Cabe destacar que, para ambos casos (Reactive Green y Nigrosina), el porcentaje de consumo es significativamente más alto en agitación que en estático. Como se puede ver en esta Figura, el consumo en agitación a 120 rpm, para el colorante Reactive Green, es un 78%, al cabo de 14 horas, mientras que si aumentamos las revoluciones a 220 rpm, el consumo alcanza el 97%. Lo mismo sucede para el colorante Nigrosina, ya que a 120 rpm, el consumo es de un 85% después de 14 horas y a 220 rpm el consumo llega al 95%.

Según Tan *et al.* (2013), estudios realizados con la cepa de levadura *C. tropicalis* TL-F, demostraron que hay una mayor eficacia en el consumo de colorantes empleando sistemas de agitación, mientras que los sistemas en estático ralentizan el proceso de degradación, de forma similar a lo obtenido en este estudio. Conclusiones similares han sido también descritas por He *et al.* (2004).

Por el contrario, experimentos realizados por Pearce *et al.* (2003), mostraron que el oxígeno disuelto es un inhibidor del proceso de degradación de los colorantes. Esto sucede porque las moléculas actúan como aceptores de electrones y el oxígeno es más oxidante, siendo más fácil la reducción de los colorantes bajo condiciones anaerobias. De manera similar, estudios realizados por Xu *et al.* (2007) examinaron el rendimiento de la degradación del Rojo Ácido en condiciones aeróbicas y anaeróbicas empleando la cepa S12 de *Shewanella decolorationis*. Los resultados mostraron que el rendimiento máximo lo han obtenido en condiciones anaeróbicas, destacando que en condiciones aeróbicas han conseguido degradar una parte del colorante que necesitaba pequeñas cantidades de oxígeno. En contraposición con estos resultados, la cepa MIBM 1-15, emplea condiciones aeróbicas consiguiendo una degradación muy alta de los colorantes estudiados.

4.5. Relación entre la biomasa microbiana y el consumo de colorante

La última parte del presente trabajo tuvo como objeto establecer la relación entre la biomasa celular y el porcentaje de consumo de los colorantes Nigrosina y Reactive Green en condiciones óptimas de decoloración (Figuras 11A y 11B).

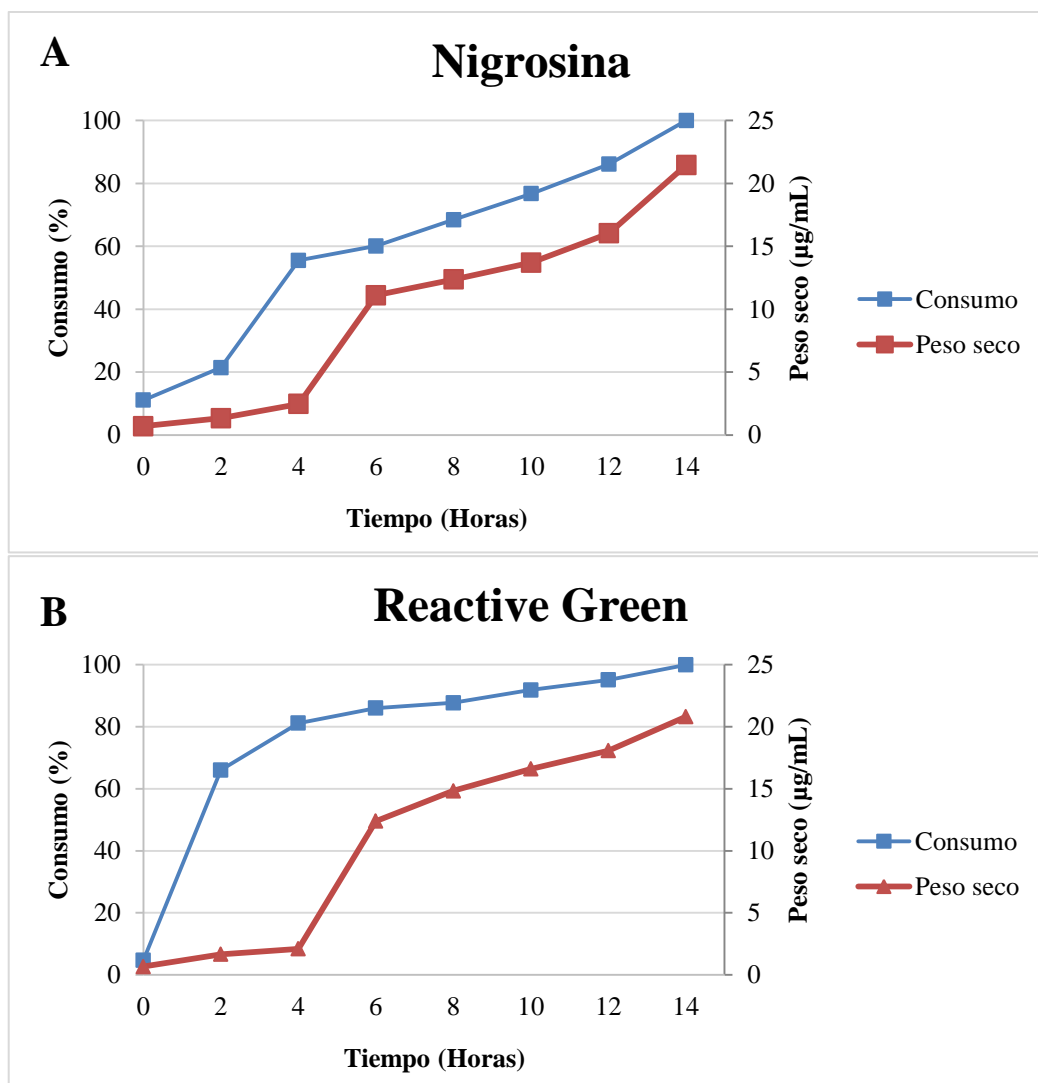


Figura 11: Relación entre el consumo de los colorantes Nigrosina (A) y Reactive Green (B) y el peso seco de levadura, durante 14 horas en condiciones óptimas (25°C, 4 g/L de concentración de glucosa, 220 rpm y pH 6). Se muestra la media de 3 réplicas y el error calculado como la desviación estándar entre las mismas.

En las gráficas se puede observar que la cepa MIBM 1-15 se desarrolla en el medio y condiciones de cultivo utilizados aumentando su biomasa con el tiempo de cultivo. Igualmente, se aprecia una relación directa entre el incremento en biomasa y el porcentaje de consumo de colorante, tanto para la Nigrosina (11A) como para el Reactive Green (11B). Estos resultados concuerdan con los de Tan *et al.* (2013) que demostraron recientemente una dependencia o relación entre la biomasa de la cepa TL-F1 de *Candida tropicalis* y el porcentaje de degradación del colorante Escarlata Acido Brillante. En su

Resultados y discusión

caso, esta relación directa se mantuvo independientemente a las condiciones de cultivo ensayadas.

Por otro lado, Tan *et al.* (2014) sugieren un proceso de decoloración por biodegradación del colorante Rojo Ácido por *Magnusiomyces ingens* (LH-F1), al obtener un precipitado celular incoloro tras los ensayos de decoloración. El caso contrario parece darse en nuestro trabajo dada la adquisición del color del colorante bajo estudio por parte de las células de la levadura MIBM 1-15, apreciable en el precipitado (Tabla 1). Esto parece sugerir un mecanismo de decoloración dependiente de biomasa como la bioacumulación o la biosorción, si bien serán necesarios futuros estudios para esclarecer el mecanismo de decoloración empleado por nuestra levadura.

En líneas generales, el rendimiento de la levadura MIBM 1-15, en términos de eliminación de los colorantes Nigrosina y Reactive Green, mejora el descrito en estudios previos, tanto en lo que respecta al porcentaje de consumo como al tiempo empleado para el mismo. Además, la cepa ha demostrado una gran versatilidad en cuanto a la temperatura y pH a los que puede llevar a cabo su acción, lo que la convierte en una buena candidata para su aplicación en la industria o en el medio ambiente.

5. CONCLUSIONES

1. La cepa MIBM 1-15 se ha mostrado capaz de llevar a cabo la eliminación de los colorantes estudiados en este trabajo en condiciones aerobias.
2. Las concentraciones que permitieron una eliminación del 100% de colorante por parte de la cepa MIBM 1-15, fueron 100 mg/L para el Reactive Green y 25 mg/L para la Nigrosina
3. La cepa MIBM 1-15 se mostró muy versátil para la eliminación de los colorantes Nigrosina y Reactive Green permitiendo la eliminación de los mismos en un amplio intervalo de temperaturas, valores de pH y concentraciones de glucosa, si bien, la dependencia de estos parámetros fue más patente al cabo de las 12 horas que de las 14 horas.
4. Las condiciones óptimas para la eliminación de los colorantes Nigrosina y Reactive Green (un 97% en 12 horas) fueron 4 g/L de glucosa, 220 rpm, 25°C y pH 6, si bien aumentando el tiempo a 14 horas se consiguió la eliminación del 100% de ambos colorantes en la mayor parte de las condiciones probadas.
5. Los estudios de eliminación de los colorantes Nigrosina y Reactive Green en condiciones óptimas mostraron una relación directa entre el incremento en biomasa de la levadura y el porcentaje de consumo de colorante.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. **Aggelis, G.**, Iconomou, D., Christou, M., Bokas, D., Kotzailias, S., Christou, G., Tsagou, V., Papanikolaou, S. (2003). Phenolic removal in a model olive oil mill wastewater using *Pleurotus ostreatus* in bioreactor cultures and biological evaluation of the process. *Water Res.* 37: 3897-3904.
2. **Aksu, Z.** (2005). Application of biosorption for the removal of organic pollutants: A review. *Process Biochem.* 40: 997-1026.
3. **Amoozegar, M.A.**, Hajighasemi, M., Hamed, J., Asad, S., Ventosa, A. (2011). Azo dye decolorization by halophilic and halotolerant microorganisms. *Ann Microbiol.* 61:217-230.
4. **An, S.Y.**, Min, S.K., Cha, I.H., Choi, Y. L., Cho, Y. S., Kim, C. H., Lee, Y. C. (2002). Decolorization of triphenylmethane and azo dyes by *Citrobacter* sp. *Biotechnol Lett.* 24: 1037-1040.
5. **Asad, S.**, Amoozegar, M.A., Pourbabae, A.A., Sarbolouki, M.N., Dastgheib, S.M.M. (2007). Decolorization of textile azo dyes by newly isolated halophilic and halotolerant bacteria. *Bioresource Technol.* 98:2082-2088.
6. **Banat, I.M.**, Nigam, P., Singh, D., Merchant, R. (1996). Microbial degradation of textile-dye containing effluents: A review. *Bioresource Technol.* 58: 217-227.
7. **Baughman, G.L.**, Weber, E.J. (1994). Transformation of dyes and related compounds in anoxic sediment: kinetics and products. *Environ. Sci. Technol.* 28: 267-276.
8. **Chang, J.S.**, Lin, C.Y. (2001). Decolorization kinetics of a recombinant *Escherichia coli* strain harboring azo-dye-decolorizing determinants from *Rhodococcus* sp. *Biotechnol Lett.* 23: 631-636.
9. **Chen, K.C.**, Wu, J.Y., Liou, D.J., Hwang, S.J. (2003). Decolorization of textile dyes by newly isolated bacterial strains. *J Biotechnol.* 101: 57-68.
10. **Christie, R. M.** (2003). *La química del color*. Zaragoza, España: Acribia, S.A.
11. **Crini, G.** (2006). Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: A review. *Bioresource Technol.* 97: 1061-1085.
12. **Daâssi, D.**, Mechichi, T., Nasri, M., Rodriguez-Couto, S. (2013). Decolorization of the metal textile dye lanaset grey g by immobilized white-rot fungi. *J Environ Manage.* 129: 324-332.
13. **Das, N.**, Charumathi, D. (2012). Remediation of synthetic dyes from wastewater using yeast: An overview. *Indian J Biotechnol.* 11: 369-380.
14. **dos Santos, A.B.**, Cervantes, F.J., Van Lier, J.B. (2007). Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresource Technol.* 98: 2369-2385.
15. **Garzón, Jiménez, R.C.** (2009). Cinética de degradación de colorantes textiles de diferentes clases químicas por hongos y bacterias inmovilizados sobre fibra de *Agave tequilana* webber var. azul. Trabajo de grado. Universidad Pontificia Javeriana e Instituto Politecnico Nacional. México
16. **Gomi, N.**, Yoshida, S., Matsumoto, K., Okudomi, M., Konno, H., Hisabori, T., Sugano, Y. (2011). Degradation of the synthetic dye amaranth by the fungus *Bjerkandera adusta* dec 1: inference of the degradation pathway from an analysis of decolorized products. *Biodegradation.* 22: 1239-1245.
17. **Guo, J.**, Zhou, J., Wang, D., Tian, C., Wang, P., Salah, Uddin, M. (2008). A novel moderately halophilic bacterium for decolorizing azo dye under high salt condition. *Biodegradation.* 19:15-19.

18. **He, F., Hu, W., Li, Y.** (2004). Biodegradation mechanisms and kinetics of azo dye 4bs by a microbial consortium. *Chemosphere*. 57: 293-301.
19. **Lewis, D., Loan, T.** (2007). Dyeing cotton with reactive dyes under neutral conditions. *Colouration Technol*. 123: 306-311.
20. **Lin, J., Zhang, X., Li, Z., Lei, L.** (2010). Biodegradation of Reactive Blue 13 in a two stage anaerobic/aerobic fluidized beds system with a *Pseudomonas* sp. isolate. *Bioresource Technol*. 101: 34-40.
21. **López, Díaz, C.** (2005). Oxidación del tinte azo Orange II mediante MnP en reactores enzimáticos operados en continuo. Tesis doctoral. Departamento de ingeniería química. Universidad de Santiago de Compostela.
22. **Marcano, D.** (1990). Introducción a la química de los colorantes. Caracas, Venezuela: Reverte.
23. **Marmagne, O., Coste, C.** (1996). Color removal form textile plant effluents. *American Am Dyest Rep*. 85: 15-21.
24. **Nilsson, I., Moller, A., Mattiasson, B., Rubindamayugi, M., Welander, U.** (2006). Decolorization of synthetic and real textile wastewater by the use of white-rot fungi. *Enzyme Microb Tech*. 38: 94-100.
25. **Ogugbue, J.C., Sawidis, T.** (2011). Bioremediation and detoxification of synthetic wastewater containing triarylmethane dyes by *Aeromonas hydrophila* isolated from industrial effluent. *Biotechnol Res Int*. Article ID 967925, 11, 2011. doi:10.4061/2011/967925.
26. **O'Neill, C., Hawkes, F.R., Hawkes, D.L., Lourenco, N.D., Pinheiro, H.M., Delee, W.** (1999). Color in textile effluents sources, measurement, discharge consents and simulation: A review. *J. Chem Technol Biotechnol*. 74: 1009-1018.
27. **Ozbelge, T.A., Ozbelge, O.H., Baskaya, S.Z.** (2002). Removal of phenolic compounds from rubber-textile wastewaters by physical-chemical methods. *Chem Eng Process*. 41: 479-491.
28. **Ozdemir, S., Cirik, K., Akman, D., Sahinkaya, E., Cinar, O.** (2013). Treatment of azo dye containing synthetic textile dye effluent using sulfidogenic anaerobic baffled reactor. *Bioresource Technol*. 146: 135-143.
29. **Padamavathy, S., Sandhya, S., Swaminathan, K., Subrahmanyam, Y.V., Kaul, S.N.** (2003). Comparison of decolorization of reactive azo dyes by microorganisms isolated from various sources. *J. Environ Sci*. 15: 628-632.
30. **Pandey, A., Singh, P., Iyengar, L.** (2007). Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A Review. *Int Biodeter Biodegr*. 59: 73-84.
31. **Pearce, C., Lloyd, J., Guthrie, J.** (2003). The removal of colour from textile wastewater using whole bacterial cells. *Dyes Pigments*. 58: 179-196.
32. **Pera-Titus, M., Garcia-Monalina, V., Banos, M.A., Gimenez, J., Esplugas, S.** (2004). Degradation of chlorophenols by means of advanced oxidation process: a general review. *Appl Catal Environ*. 47: 219-256.
33. **Pereira, E., Regina, L.** (2001). Decolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajorcaju*. *Enzyme Microb Tech*. 29: 473-477.

Bibliografía

34. **Pérez**, Martínez, A.A. (2009). Degradación de los colorantes negro reactivo 5, rojo directo 28 y verde básico 4 en presencia de aditivos por ozono. Tesis grado de Maestro. Instituto Politécnico Nacional. Escuela superior de ingeniería química e industrias extractivas. México.
35. **Qu**, Y., Shi, S., Ma, F., Yan, B. (2010). Decolorization of Reactive Dark Blue k-r by the synergism of fungus and bacterium using response surface methodology. *Bioresource Technol.* 101: 8016-8023.
36. **Rai**, H., Bhattacharya, M., Singh, J., Bansal, T.K., Vats, P., Banerjee, U.C. (2005). Removal of dyes from the effluent of textile and dyestuff manufacturing industry: a review of emerging techniques with reference to biological treatment. *Crit Rev Env Sci Tec.* 35: 219-238.
37. **Rajaguru**, P., Vidya, L., Baskarathupathi, B., Kumar, P.A., Palanivel, M., Kalaiselvi, K. (2002). Genotoxicity evaluation of polluted ground water in human peripheral blood lymphocytes using the comet assay. *Mutat Res.* 517: 29-37.
38. **Ramalho**, P.A., Cardoso, M.H., Cavaco-Paulo, A., Ramalho, M.T. (2004). Characterization of azo reduction activity in a novel ascomycete yeast strain. *Appl Environ Microbiol.* 70: 2279-2288.
39. **Ramalho**, P. A. (2005). Degradation of dyes with microorganisms: studies with ascomycete yeasts. Tesis doctoral. Universidade do Minho. Braga. Portugal.
40. **Robinson**, T., McMullan, G., Marchant, R., Nigman, P. (2001). Remediation of dyes in textile effluent: A critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technol.* 77: 247-255.
41. **Rodríguez**, S., Bermudez, R., Serrat, M., Korouma, A. (2006). Selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* para la decoloración de efluentes industriales. *Rev Mex De Micología.* 23: 9-15.
42. **Saratale**, R.G., Saratale, G.D., Chang, J.S., Govindwar, S.P. (2009). Ecofriendly degradation of sulfonated diazo dye C.I. Reactive Green 19A using *Micrococcus glutamicus* ncim-2168. *Bioresource Technol.* 100: 3897-3905.
43. **Stolz**, A. (2001). Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Appl Microbiol Biot.* 56: 69-80.
44. **Tan**, L., Qu, Y., Zhou, J., Ma, F., Li, A. (2009). Dynamics of microbial community for X- 3B wastewater decolorization coping with high-salt and metal ions conditions. *Bioresource Technol.* 100: 3003-3009.
45. **Tan**, L., Ning, S., Zhang, X., Shi, S. (2013). Aerobic decolorization and degradation of azo dyes by growing cells of a newly isolated yeast *Candida tropicalis* TL-F1. *Bioresource Technol.* 138: 307-313.
46. **Tan**, L., Li, H., Ning, S., Xu, B. (2014). Aerobic decolorization and degradation of azo dyes by suspended growing cells and immobilized cells of a newly isolated yeast *Magnusiomyces ingens* LH-F1. *Bioresource Technol.* 158: 321-328.
47. **Tsioulpas**, A., Dimou, D., Iconomou, D., Aggelis, G. (2002). Phenolic removal in olive oil mill wastewater by strains of *Pleurotus* spp. in respect to their phenol oxidase (laccase) activity. *Bioresource Technol.* 84: 251-257.
48. **Umbuzeiro**, G.A., Freeman, H., Warren, S.H., Oliveira, D.P., Terao, Y., Watanabe, T., Claxton, L.D. (2005). The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais River. *Chemosphere.* 60: 55-64.
49. **Van der Zee**, F.P. (2002). Azo dye decolorization by anaerobic granular sludge. *Chemosphere.* 44: 1169-1176.

50. **Wong**, P.K., Yuen, P.Y (1998). Decolorisation and biodegradation of N, N-dimethylp-phenylenediamine by *Klebsiella pneumonia* RS-13 and *Acetobacter liquefaciens* S-I. *Appl Microbiol.* 85: 99-87.
51. **Wu**, J., Jung, B.G., Kim, K.S., Lee, Y.C., Sung, N.C. (2009). Isolation and characterization of *Pseudomonas otitidis* WL-13 and its capacity to decolorize triphenylmethane dyes. *J Environ Sci.* 21: 960-964.
52. **Xu**, M., Guo, J., Sun, G. (2007). Biodegradation of textile azo dye by *Shewanella decolorationis* S12 under microaerophilic conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 76:719-726.
53. **Zeroual**, Y., Kim, B.S., Yang, M.W., Blaghen, M., Lee, K.M. (2007). Decolorization of some azo dyes by immobilized *Geotrichum* sp. biomass in fluidized bed bioreactor. *Appl Biochem Biotechnol.* 142: 307-316.
54. **Zollinger**, H. (1987). *Color Chemistry-Syntheses, properties and application of organic dyes pigments.* VCH, New York.