

BIODEGRADACIÓN AERÓBICA DEL COLORANTE NARANJA REACTIVO 16 POR UNA LEVADURA ANTÁRTICA

(Aerobic degradation of Reactive Orange 16 by antarctic yeast)

Ruscasso, F.¹; Garmendia, G.²; Vero, S.³; Cavalitto, S.¹ y Cavello, I.¹.

¹CINDEFI (UNLP, CONICET – La Plata). 50 y 115, La Plata, Bs As - Argentina.

²Cátedra de Microbiología, Departamento de Biociencias, Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. Email: icavello@biotec.quimica.unlp.edu.ar

La producción mundial anual de colorantes asciende a más de 7×10^5 toneladas. Se estima que el 10-15% de la producción total de colorantes se pierde durante los procesos de síntesis y tinción. Se estima que hasta un 90% de colorantes reactivos podrían permanecer no afectados después del tratamiento con lodos activados. Los efluentes de las industrias de teñido están marcadamente coloreados y la eliminación de estos desechos en las aguas causa daños ambientales. Dado que el color reduce la penetración de la luz, la actividad fotosintética en la vida acuática puede verse afectada. Además, debido a su propia toxicidad, así como debido a la presencia de metales, cloruros, etc., o debido a sus productos intermedios de decoloración, estos son perjudiciales para la vida acuática y también para los organismos vivos que beben de estas aguas (Jafari et al., 2014).

Aunque los colorantes constituyen sólo una pequeña parte del volumen total de la descarga de desechos de la elaboración textil, los procesos de tratamiento de aguas residuales basados en microbios típicos no los eliminan fácilmente. Por el contrario, los componentes de tinte en el efluente de aguas residuales textiles pueden ser perjudiciales para la población microbiana presente en tales plantas de tratamiento y pueden conducir a una disminución de la eficiencia o fracaso del tratamiento en dichas plantas (Pajot et al., 2007).

Las investigaciones recientes sobre la decoloración y degradación de los efluentes textiles se han centrado en las técnicas biológicas debido a su simplicidad general, tecnologías baratas, rentables y amigables con el medio ambiente. El objetivo de estos métodos biológicos sería no solo la eliminación del color, sino también la mineralización completa de los colorantes. El objetivo del presente trabajo fue estudiar la potencial aplicación de *Candida sake* 41E – levadura Antártica- en la tratamiento de este tipo de efluentes, planteando de esta forma un tratamiento de bajo costo y amigable con el medio ambiente

Materiales y Métodos

Colorante textil y microorganismo seleccionado. El colorante Naranja Reactivo 16 fue gentilmente aportado por la empresa ALCONIC. Se trabajó con una colección de levaduras 62 levaduras provenientes de distintos lugares de la Isla 25 de Mayo aisladas e identificadas por la cátedra de Microbiología (Facultad de Qca, UndelaR, Montevideo, Uruguay). La selección primaria de levaduras antárticas capaces de degradar el colorante se llevó a cabo utilizando el medio sólido conocido como *Normal decolorization media* (NDM) propuesto por Ramalho et al., (2004) que se inocularon con las levaduras en crecimiento activo y se incubaron a 15°C durante 72 h. Como control se incubará el medio NDM sin la adición de colorante. Se realizó una observación diaria de las placas a fin de observar la aparición de un halo de degradación del colorante alrededor de la colonia, así como el color de la misma.

Cinética de decoloración en medio líquido. Para el estudio de la cinética de decoloración se utilizó el medio (NDM) suplementado con 100 ppm de colorante inoculados con *C. sake* 41E proveniente de un inóculo overnight (DOI 0.06). Los cultivos se incubaron a 15° C, 150 rpm hasta observar decoloración total del medio. Se tomaron muestras cada dos horas para la determinación de la densidad óptica del medio y para determinación del porcentaje de decoloración definido como $(A_0 - A) / A_0 \times 100$. Donde A_0 es la absorbancia inicial del medio suplementado con el colorante y A es la absorbancia al tiempo t . Adicionalmente se realizó un barrido espectral de cada muestra para analizar la desaparición del colorante. Se realizaron controles bióticos y abióticos sin el colorante en estudio o sin la levadura en estudio, respectivamente. Se determinó peso seco mediante el secado a 70°C hasta peso constante y la glucosa remanente se determinó colorimétricamente utilizando el kit de glucemia de Weiner.

Estudio del efecto de distintos factores para la optimización de la decoloración. Como primer paso hacia la optimización del proceso de decoloración se estudió el efecto de distintos factores en la decoloración, a saber:

- a) Concentración de colorante: se varió la concentración del NR5 en medio líquido desde 100 ppm hasta 300 ppm.
- b) Concentración de fuente de carbono (glucosa): La concentración de glucosa en el medio se varió desde 5 a 30 g/l.
- c) Temperatura de crecimiento: se estudiaron 3 temperaturas de cultivo (15°, 20° y 28°C).

Análisis por HPLC. Con el objetivo de confirmar la degradación biológica del colorante por parte de la levadura *C. sake* 41E, se realizaron corridas en HPLC utilizando una columna C-18 utilizando metanol: H₂O (50:50) como fase móvil. Los productos de degradación se monitorearon a 254 nm utilizando como control el cultivo biótico (sin colorante).

Resultados

Con el objetivo de seleccionar una o varias levaduras con potencial aplicación en la bioremediación de efluentes provenientes de la industria textil, se comenzó con un *screening* en medio sólido utilizando Naranja reactivo 16 (NR16). Se tomó como parámetro cualitativo de la capacidad de decoloración la presencia de halo incoloro alrededor de la colonia. Este estudio cualitativo demostró que, de un total de 62 levaduras estudiadas, el 56% fue capaz de producir halo de decoloración en el medio sólido estandarizado suplementado con 100 mg/l de NR16.

En la Fig. 1 se muestra una curva típica de crecimiento de *C. sake* 41E y en simultáneo el agotamiento del colorante en el medio de cultivo. Como puede observarse, la decoloración se produce durante la fase de crecimiento exponencial y se encuentra asociada al metabolismo primario, obteniéndose una decoloración del 89,42% a las 48 h de cultivo y un 95% de decoloración luego de 72 h de cultivo.

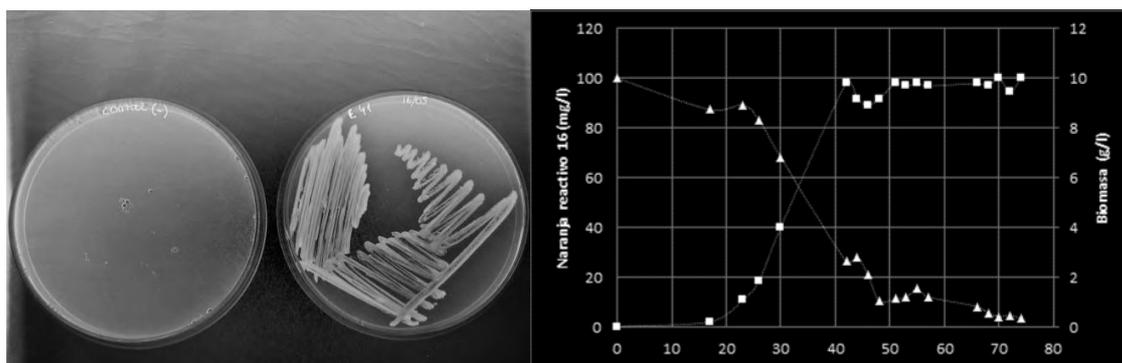


Fig. 1 Evolución en el tiempo del crecimiento de cada levadura y el descenso de la concentración del colorante NR 16 (concentración inicial 100 mg^l⁻¹). **Fig. 1** Kinetic of growth and decolorization in dye-containing NDM.

Al estudiar el efecto de la concentración inicial de colorante (100 a 300 mg^l⁻¹) sobre la eficiencia en la decoloración por parte de *C. sake* 41E se pudo observar una decoloración extensa en todas las concentraciones iniciales de colorante estudiadas. Al aumentar la concentración inicial de colorante se observó una disminución en la eficiencia de decoloración. Después de 74 h de incubación, se observó una decoloración de casi el 96% para 100ppm y 200ppm iniciales, y del 93% para 300 ppm iniciales.

En la Fig. 2 se muestra el efecto que tuvo concentraciones de glucosa creciente sobre la decoloración del Naranja Reactivo 16. Se observó que *C. sake* 41E no puede utilizar NR 16 como una única fuente de carbono para el crecimiento celular. La dependencia de la decoloración por esta levadura con una fuente adicional de carbono implica una vía cometabólica de degradación. En presencia de 5g/l de glucosa sólo se obtuvo un 26.8% de decoloración y en presencia de 30 g/l esta decoloración fue máxima y alcanzó una eficiencia de decoloración de un 98% al cabo de 68 h de cultivo.

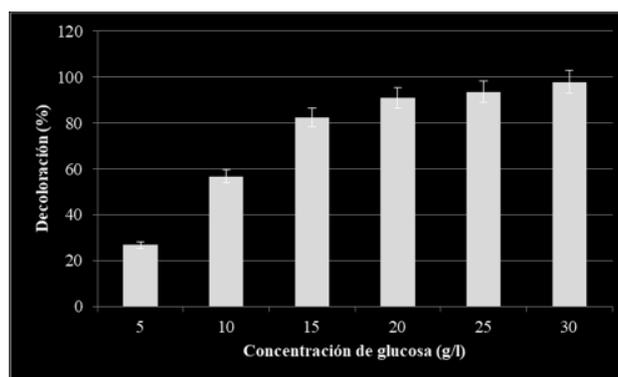


Fig. 2 Efecto de la concentración de glucosa en la eficiencia de decoloración de *C. sake* 41E. Concentración inicial de NR 16 100 mg^l⁻¹. **Fig. 2** Effect of glucose concentration on NR16 decolorization by *C. sake* 41E.

El aumento de la temperatura no aumentó de manera significativa la eficiencia en la decoloración del NR16 por parte de *C. sake* 41E. Se observó que con un aumento de la temperatura de 15 a 20°C, la eficiencia de decoloración aumentó de 95,7 a 96,8% y, con un aumento adicional de la temperatura a 28°C, la decoloración disminuyó a 90,1%.

Con el objetivo de confirmar la degradación del colorante se realizó un análisis de los productos de degradación por HPLC. En la Fig. 3 se observan los cromatogramas solapados del cultivo biótico de *C. sake* 41E y de un cultivo de *C. sake* 41E en presencia de 400 ppm de Naranja reactivo 16. Se pueden observar la presencia de al menos 3 picos con tiempos de retención entre los 16 y 17.5 minutos que en el cultivo biótico no están presentes. Esto confirma que el colorante es degradado por parte de la levadura *C. sake* 41E a diferentes metabolitos.

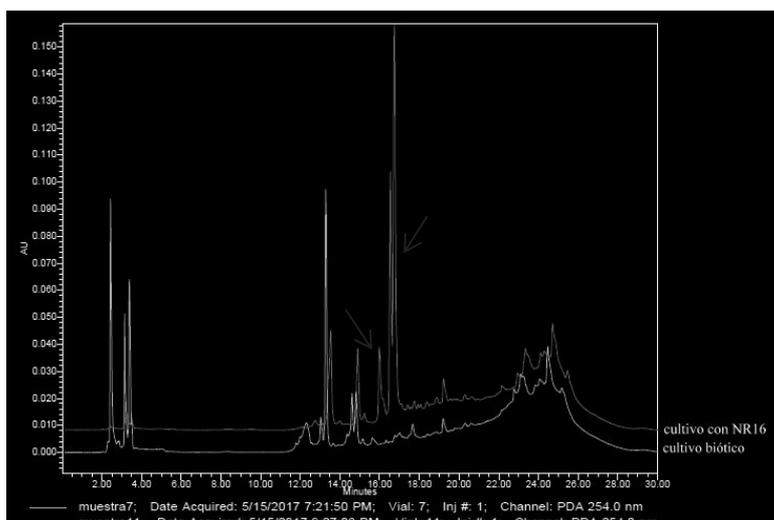


Fig. 3 Análisis de los productos de degradación del colorante NR16 por *C. sake* 41E. **Fig. 3** HPLC analysis of degradation products of NR16 under submerged fermentation by *C. sake* 41E

Discusión y Conclusiones

Los resultados que emergen de este estudio proporcionan una serie de resultados para proponer una nueva alternativa ecológica para el tratamiento de aguas residuales de las industrias textiles. Se demuestra que la levadura efectivamente tiene la capacidad de biodegradar el colorante pudiendo de esta manera plantearse una alternativa práctica en la biotransformación de diversos efluentes de colorantes. Estudios similares a este han sido planteados para levaduras del género *Candida* (*C. oleophila*), *Issatchenkia* (*I. orientalis*) y *Debaryomyces* (*D. polymorphus*). Siendo este el primer reporte del estudio sistemático para levaduras de origen antártico (Jafari et al., 2014).

Agradecimientos

Al CINDEFI-CONICET, Instituto Antártico Uruguayo, ANII, Pedeciba.

Referencias

- Jafari, N.; Reza Soudi, M.; Kasra-Kermanshahi. 2014. Biodegradation perspectives of Azo dyes by Yeasts. *Microbiology*, 83(5):484-497.
- Pajot, H.; de Figueroa, L.; Fariña, J. 2007. Dye-decolorizing activity in isolated yeasts from the ecoregion of Las Yungas (Tucumán, Argentina). *Enzyme and Microbial Technology*, 40:1503-1511.
- Ramalho, P.; Cardoso, M.; Cavaco-Paulo, A.; Ramalho M. 2004. Characterization of Azo reduction activity in a novel ascomycete yeast strain. *Applied Environmental Microbiology*, 70:2279-2288.