



Tesis de grado

Tratamiento Biológico para la Remoción de Colorantes Textiles a Escala Laboratorio

Tesista: Mariel B. Scaramutti

Tutora: Lic. Florencia Ruscasso

Directora: Dra. Ivana Cavello

Facultad de Ciencias Exactas

Universidad Nacional de La Plata

2023

El presente trabajo fue realizado en el Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. Ivana Cavello y la tutoría de la Lic. Florencia Ruscasso.

Parte de los resultados de esta investigación fueron presentados en:

- **V Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental** (V CAMAYA 2021) La Plata, Buenos Aires, Argentina. 15 al 17 septiembre 2021. Mostración: "Biodecoloración de una mezcla de colorantes textiles usando una levadura antártica". Ruscasso, F.; Rios, P.; Curutchet, G.; Cavello, I.; Cavalitto, S.
- **Congreso Conjunto SAIB-SAIGE 2021**. 1 a 5 de noviembre de 2021. Mostración "Azodyes decolorization by the halotolerant yeast *Leucosporidium muscorum* F20A under submerged fermentation" Ruscasso F, Scaramutti M, Rios P, Cavello I.

Tabla de contenido

Tabla de contenido.....	3
Abreviaturas.....	5
Agradecimientos	6
Introducción	7
1.1 La industria textil y su impacto en el deterioro del ambiente	7
1.2. Etapas del proceso textil y naturaleza química de los colorantes	10
1.3. Síntesis y clasificación de colorantes azoicos.....	12
1.4. Impacto ambiental de los colorantes textiles	15
1.5 Tratamiento de efluentes textiles.....	19
1.6. Posibles mecanismos de degradación de los colorantes azoicos	22
1.7 Un análisis científico y social	24
Objetivos	25
2.1 Objetivos Generales:	25
2.2 Objetivos Específicos:.....	25
Materiales y métodos	26
3.1 Microorganismo	26
3.2 Colorantes textiles.....	26
3.3 Decoloración en medio líquido	28
3.4 Escalado del estudio de remoción de los colorantes textiles	34
3.5 Bioensayo de toxicidad con semillas de <i>Lactuca sativa L.</i>	40
Resultados y Discusión	44
4.1 Resultados de los ensayos en medio líquido.....	44
4.1.1 Ensayo de Screening en medio líquido	44
4.1.2 Ensayo de Cinética de remoción de los colorantes VR-5, NR-16 y una mezcla de ambos	47
4.1.3 Remoción de NR-16 y VR-5 en condiciones salinas	54
4.1.4 Remoción de NR-16, VR-5 y una mezcla de ambos usando Glicerol como fuente alternativa de carbono	56
4.1.5 Crecimiento de <i>L. muscorum</i> F20A utilizando Almidón como fuente alternativa de carbono.....	59
4.1.5 Cinética de remoción de muestra de efluente real.....	60
4.1.2 Escalado de la cinética de remoción en biorreactor tipo tanque agitado	63
4.2 Resultados de los ensayos de fitotoxicidad utilizando semillas de <i>L. sativa L.</i>	68
Conclusiones	80

Bibliografia 81

Abreviaturas

Ácido Desoxirribonucleico	ADN
Nanómetros	Nm
Minutos	Min
Horas	h
Revoluciones por Minuto	rpm
Litro	l
Microlitro	μl
Gramo	g
Kilogramo	Kg
Milimolar	mM

Agradecimientos

Primeramente, quería expresar mi agradecimiento al Dr. Sebastián Cavalitto por permitirme realizar este trabajo dentro de la comunidad del Centro de Investigación y Desarrollo de Fermentaciones Industriales (CINDEFI) y su buena predisposición en todo momento. Gracias a mi directora, la Dra. Ivana Cavello por los saberes compartidos y principalmente, por aceptar acompañarme en esta última etapa. Gracias a mi tutora la Lic. Florencia Ruscasso, quien me brindó, con mucha paciencia y dedicación, su constante acompañamiento, conocimientos y especialmente, muchas gracias por todas las horas compartidas en el laboratorio.

Gracias a mis compañeros/as de laboratorio, Marina, Brenda, Inés, Andrea, Juan Pablo, Facundo y Gastón, por generar un ambiente agradable y brindar su ayuda en todo momento.

Estoy enteramente agradecida con mi familia, mis padres, Ale y Sergio y mi hermana Mayra, quienes con su permanente compañía y sostén me ayudaron a llegar tan lejos.

Muchas gracias a mis amigos y a todas las personas que fui conociendo a lo largo de estos años de carrera, Juan, Flor, Ones, Gri, Ague, Andrés, Tomi, Kevin, Belu, Eva, Anto y Luli. Quienes me concedieron su valioso tiempo, su amistad, experiencias hermosas y aprendizajes que, sin duda, formarán parte de la persona que soy y de los recuerdos de esta etapa tan especial de mi vida.

Gracias a mis eternos amigos, Lanchi y Toto, por ser fuente constante de apoyo y felicidad.

Finalmente, agradecida con la Universidad pública, gratuita y de calidad, gracias a la educación pública.

¡Gracias!

Mariel

Introducción

1.1 La industria textil y su impacto en el deterioro del ambiente

La contaminación de los ambientes acuáticos es una de las problemáticas ambientales más relevantes y preocupantes de nuestra época. La industria textil es una de las que más contribuye a este impacto, ya que resulta ser una de las principales fuentes de contaminación de reservorios de aguas subterráneas y superficiales, el 17-20% de la contaminación del agua es producto del manejo inadecuado de los efluentes textiles (Sharma *et al.*, 2021). Además, la industria textil produce cerca del 10% de las emisiones de dióxido de carbono (CO₂) a nivel global, contribuye a la contaminación oceánica por microplásticos, y a su vez consume 1,5 trillones de litros de agua al año (Kirsi Niinimäki *et al.*, 2020).

En la industria textil el proceso de manufactura de las telas consume y a su vez, desecha grandes volúmenes de agua. Por cada 8000 kg de tela, se utilizan alrededor de 1,6 millones de litros de agua cada día (Mansour *et al.*; 2012; Sharma *et al.*, 2021). Una consecuencia del excesivo consumo de agua por parte de esta industria ha sido por ejemplo la desaparición del “Mar Aral” (Figura 1), una laguna ubicada entre el norte de Kazajistán y el sur de Uzbekistán. Este grave daño ambiental surgió como resultado del uso indiscriminado de este cuerpo de agua con el objetivo de irrigar campos de algodón (Benkhaya *et al.*, 2020).

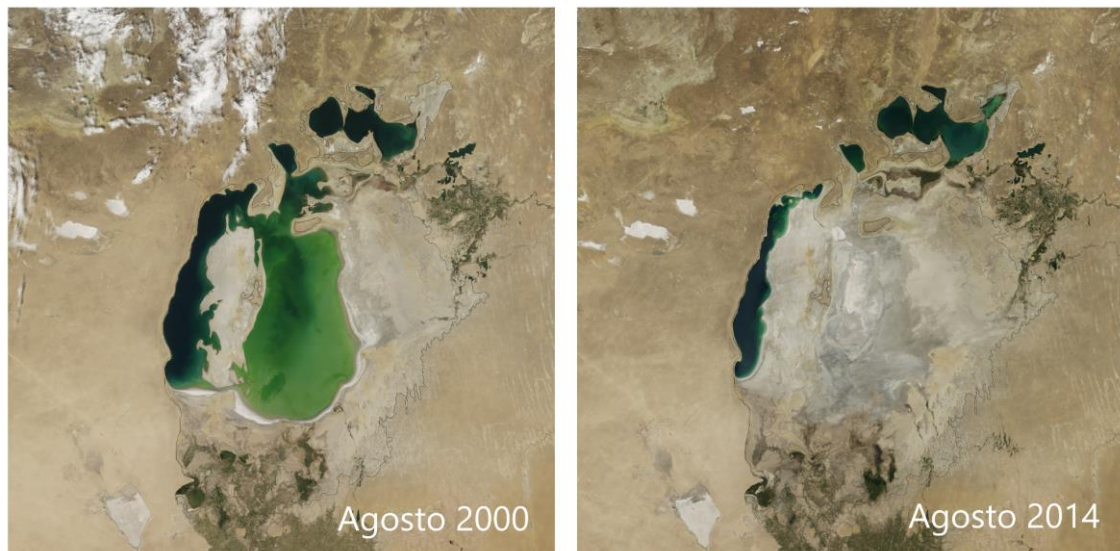


Figura 1: Imagen satelital de la sequía antropogénica del Mar Aral. Fuente: Earth Observatory, National Aeronautics and Space Administration (NASA).

La producción textil per cápita se ha exacerbado en el período comprendido entre los años 1975 a 2018 como producto del consumo excesivo de indumentaria, dando un aumento de 5,9 kg a 13 kg de prendas por persona. De esta manera, los desechos textiles alcanzan los 92 millones de toneladas al año. Este fenómeno de aumento de la producción textil se ha denominado como *fast fashion*, término acuñado para describir la compra recurrente e impulsiva de productos textiles. De esta manera, el incremento de la velocidad de producción, la alta demanda, la baja en la calidad textil, la precarización laboral y legislaciones laxas en materia ambiental, son factores que contribuyen diariamente a que los precios de la indumentaria sean bajos, potenciando aún más este fenómeno donde se utilizan más prendas con menos frecuencia (Kirsi Niinimäki *et al.*, 2020), sumado a ello, gran parte la producción es descartada sin uso y termina en vertederos o es incinerada, lo que representa un enorme gasto de recursos y consecuencias catastróficas para el ambiente y sus habitantes. Como consecuencia, por un lado observamos basurales clandestinos a cielo abierto, como el situado en el desierto de Atacama (Chile) (Figura 2) que resulta ser el destino final de alrededor de 59.000 toneladas de prendas, que son depositadas allí cada año (National Geographic, 2022). Por otro lado, la grave contaminación del mar y suelos de la región del Mercado de Kantamanto en la ciudad de Acra (Ghana). Allí, llegan alrededor de 15 millones de prendas usadas desde China, Estados Unidos o Europa, que intentan ser aprovechadas por la población como productos para revender, la problemática radica en su baja calidad o incluso ya se encuentran deterioradas siendo descartadas en enormes basurales a cielo

abierto, como puede verse en la Figura 3 (BBC, 2021). Así, el impacto ambiental generado por la producción textil se ve reflejado en mayor medida en países en vías de desarrollo, donde se asientan estas industrias que operan para los países desarrollados (Kirsi Niinimäki *et al.*, 2020).



Figura 2: a. Fotografía del basural de desechos textiles localizado en el desierto de Atacama (Chile). b. Fotografía aérea del mismo. c y d. Fotografías de prendas sin uso que aún llevan etiquetas. Fuentes: National Geographic, Diario El Perfil, Diario El Planeta Urbano.



Figura 3: Fotografías de residuos textiles en las ciudades ghanesas de Acra y Kpone respectivamente. Fuente: EcoAge, The Or Fundation.

De la mano de la problemática ambiental, existe una problemática social alrededor de la industria textil a nivel mundial. El caso de Bangladesh es uno de los más emblemáticos. Este país es uno de los mayores productores textiles del mundo, después de China, sin embargo, los trabajadores de este rubro perciben menos del salario mínimo fijado por el gobierno bengalí. Es por este motivo que la producción textil se lleva adelante principalmente en estos países, pues la mano de obra es muy barata en comparación con países que también son grandes productores como México o Estados Unidos (BrandedJoy, 2022). Además, se han registrado trabajadores que han perdido su trabajo por negarse realizar horas de labor extra (Mehta, 2020). A nivel regional, en Argentina el 80% de la producción de indumentaria de la ciudad y provincia de Buenos Aires se realiza talleres irregulares tercerizados, con mano de obra en su mayoría migrante, en condiciones de ilegalidad o informalidad laboral (Caggiano S. 2014).

1.2. Etapas del proceso textil y naturaleza química de los colorantes

Existen una serie de pasos previos al proceso de teñido que tienen como objetivo preparar las fibras textiles para una mejor absorción de los colorantes y eliminar impurezas y colores indeseados en las telas. Estos pasos preparativos fueron descritos por Carmen *et al.* (2012) y Kishor *et al.*, (2021), pueden ordenarse de la siguiente manera:

- **Encolado:** En esta primera etapa se añaden a las fibras químicos como el alcohol polivinílico (PVA), carboximetilcelulosa, almidón, agentes humectantes y pectinas. Estos agregados tienen la función de proveer fuerza a las fibras textiles y minimizan las roturas que pueden darse en las telas durante todo el proceso de tratamiento. Estos agregados resultan en un aumento en la demanda química y bioquímica de oxígeno, demanda química de oxígeno (DQO) y demanda biológica de oxígeno (DBO) respectivamente.
- **Desencolado:** Se remueven los productos agregados en la etapa de encolado. Este paso es importante para potenciar la capacidad de absorción de la fibra textil.
- **Desencrudado:** Aquí se quiere remover impurezas de las fibras textiles usando soluciones básicas, como el hidróxido de sodio, glicerol, éteres y detergentes con el objetivo de romper aceites naturales, grasas, ceras y surfactantes y emulsionar y suspender dichas impurezas.

- **Blanqueado:** En este paso se remueven colores indeseados de la fibra usando químicos como hipoclorito de sodio, peróxido de hidrógeno, así también como cloro, ácidos, surfactantes y fosfato de sodio. Estos agentes aumentan la alcalinidad y las sustancias sólidas en las aguas de desecho.
- **Mercerizado:** Es un proceso químico utilizado para aumentar la capacidad de teñido, el brillo y la apariencia de las fibras textiles. En este paso, se utilizan soluciones alcalinas concentradas y luego soluciones ácidas.
- **Teñido:** En esta etapa se añaden los colorantes disueltos en un gran volumen de agua. Dependiendo del proceso de teñido pueden ser agregados agentes químicos para mejorar la absorción del colorante en la tela, tales como metales, sales, surfactantes, ácido acético, urea, almidones, coadyuvante orgánico, sulfuro y formaldehído. Durante el enjuague de las telas es donde se produce la pérdida de colorantes que terminarán en las aguas de desecho produciendo aguas altamente coloreadas y un aumento de la DBO.
- **Acabado:** Es el último paso de producción donde se utilizan diferentes tipos de químicos, orgánicos e inorgánicos con el objetivo de proteger la fibra textil de agresiones físicas, humedad, luz ultravioleta y actividad microbiana. Algunos de estos químicos son suavizantes, retardantes de llama y biocidas.

Con respecto al origen de los colorantes, éste puede ser natural o sintético. Aquellos que tienen su origen en plantas, animales o minerales se denominan colorantes naturales, mientras que los colorantes sintéticos son compuestos aromáticos producidos por síntesis química que pueden clasificarse según su aplicación y estructura química. Dichos colorantes contienen en su estructura grupos funcionales capaces de absorber energía electromagnética dentro del rango visible (400-800 nm), llamados cromóforos, los cuales son responsables de conferir el color gracias a su estructura cromógeno-cromófora aceptora de electrones. El grupo cromógeno está constituido por grupos alifáticos o estructuras aromáticas como anillos de benceno, naftaleno y antraceno. Estos grupos cumplen un rol importante en la intensidad del color y las diferentes tonalidades, pero también le dan carácter de contaminantes recalcitrantes, lo que dificulta su biodegradación y requiere que la misma cumpla ciertos parámetros de pH o ambiente reductor. Por ejemplo, la anilina se ha descubierto que puede degradarse bajo condiciones anóxicas. Además, el grupo cromógeno, posee en su estructura grupos capaces de formar

enlaces covalentes con la fibra textil (Sharma *et al.*, 2021; Benkhaya *et al.*, 2020; De Almeida *et al.*, 2021). El grupo cromógeno se une a la estructura cromófora, la cual presenta los dobles enlaces conjugados con electrones deslocalizados. Dichas estructuras cromóforas poseen configuraciones representadas por grupos azo ($-N=N-$), etileno ($=C=C=$), metino ($-CH=$), carbonilo ($=C=O$), carbono- nitrógeno ($=C=NH$; $-CH=N-$), carbono- azufre ($=C=S$; $\equiv CS-S-C\equiv$), nitro ($-NO_2$; $-NO-OH$), nitroso ($-N=O$; $=N-OH$) o quinonas. La presencia de sustituyentes sulfonados contribuyen a la resistencia, a la degradación y decoloración. Otro grupo funcional de gran importancia en los colorantes sintéticos es el grupo auxocromo, capaz de ionizarse y donar electrones, otorgando al colorante la capacidad de adhesión y contribuyendo a la intensidad de teñido de la fibra textil. Estos grupos auxocromo pueden comprender en su estructura los siguientes grupos: $-NH_2$ (amino), $-COOH$ (carboxilo), $-SO_3H$ (sulfonato) y $-OH$ (hidroxilo) (Chequer *et al.*, 2013; Carmen *et al.*, 2011; Mehra *et al.*, 2021; Kapoor *et al.*, 2021; De Almeida *et al.*, 2021).

En particular, en los colorantes sintéticos azo, como se ha mencionado anteriormente, su principal característica es la presencia del grupo funcional azo ($-N=N-$) que une dos radicales que pueden ser arilo o alquilo, simétricos o asimétricos (Sharma *et al.*, 2021). Estos colorantes resultan ser los más comúnmente hallados en los efluentes textiles ya que son uno de los más utilizados y producidos a nivel mundial (aproximadamente un 70% de los colorantes son azoicos) (B. Montañez-Barragán *et al.*, 2019; Benkhaya *et al.*, 2020). Su amplio uso se debe a su bajo costo, comparado con los pigmentos naturales, y a su diversidad estructural, variedad de colores, su alto coeficiente de extinción molar, estabilidad, resistencia a la luz y la humedad. Este tipo de colorantes son aplicados tanto en la industria textil, papelera, farmacéutica y cosmética como también en aplicaciones de alta tecnología como pueden ser sistemas ópticos, impresoras por transferencia térmica, celdas de combustible, celdas solares, terapia fotodinámica e indicadores metalcrómicos. Sumado a ello, debido a su estabilidad fisicoquímica y sus propiedades ópticas pueden ser usados en cristales líquidos y nanotubos (Chequer *et al.*, 2013; Kapoor *et al.*, 2021; Benkhaya *et al.*, 2020).

1.3. Síntesis y clasificación de colorantes azoicos

La síntesis de los colorantes azoicos puede ser llevada adelante por medio de la reducción de derivados nitroaromáticos en medio alcalino, reducción de grupos nitrosos con hidruro de litio y aluminio (AlLiH_4), oxidación de aminas primarias, condensación de hidrazinas y quinonas y condensación de aminas primarias con derivados nitrosos. El método más común de síntesis es la diazotización de una amina aromática primaria, luego la sal de diazonio obtenida es acoplada a algún nucleófilo como son los grupos amino o hidroxilo (Benkhaya *et al.*, 2020).

La clasificación de estos colorantes depende del número de enlaces azo presentes en su estructura molecular, monoazo es aquella molécula con la presencia de un solo enlace azo, luego están los diazo con dos grupos azo y por último los poliazo, que poseen tres o más enlaces azo en su molécula (Benkhaya *et al.*, 2020). Un colorante perteneciente a los monoazo es el Colorante Naranja 5, usado para teñir acetato de celulosa, poliamidas, poliéster y poliacrilonitrilo o el Amarillo Ácido 17 utilizado para teñir fibras de lana y nylon. También, en esta clasificación se encuentra el Negro Mordiente 17 (Figura 4), un colorante aromático mono sulfonado usado a gran escala para teñir poliamida, un polímero termoplástico con un grupo amida ($-\text{CONH}$) en su estructura principal. Las poliamidas alifáticas son más conocidas como nylon (Benkhaya *et al.*, 2020; Kausar *et al.*, 2022).

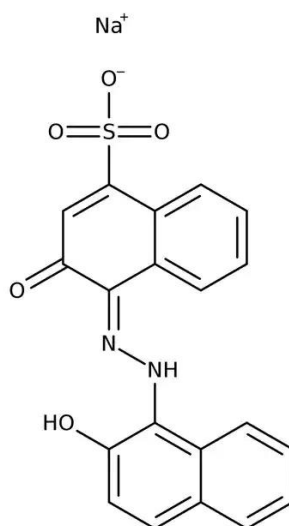


Figura 4: Estructura molecular del colorante Negro Mordiente 17 (Fuente: Fisher Scientific).

Por un lado, los colorantes diazo a su vez se clasifican en primarios y secundarios. Para formar un diazo primario se lleva a cabo una reacción de acoplamiento

de dos moléculas de ácido azoico. Un ejemplo de este tipo de colorantes es el Azul Directo 1 (Figura 5). Por otro lado, los colorantes azoicos secundarios, pueden ser simétricos o asimétricos, los simétricos suelen sintetizarse como producto de una diazotización doble de una diamina y se acopla a dos grupos idénticos, mientras que los asimétricos, se sintetizan por acoplamiento de un ácido aminoazoico y un acoplador fenólico. Como ejemplo de estos colorantes hallamos el Naranja Directo (Figura 6) (Benkhaya *et al.*, 2020).

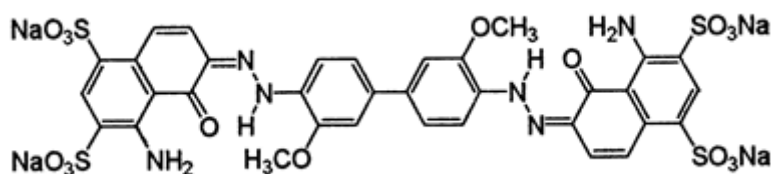


Figura 5: Estructura molecular del colorante diazo Azul Directo 1. (Fuente: World Dye Variety).

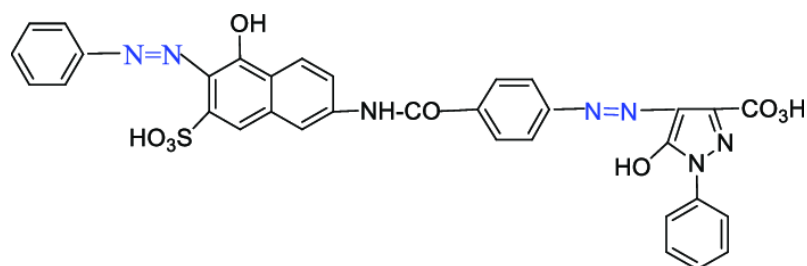


Figura 6: Estructura molecular del colorante Naranja Directo (Fuente: ResearchGate).

Finalmente, los colorantes poliazo suelen caracterizarse por presentar tonalidades intensas y son usados ampliamente para el teñido de cuero. Un ejemplo de colorante poliazo es el Azul Directo 71 (Benkhaya *et al.*, 2020), en la Figura 7 se muestra su estructura molecular.

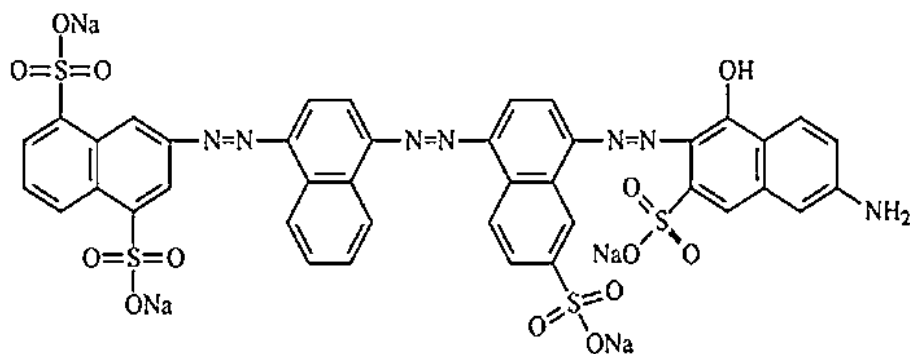


Figura 7: Estructura molecular del colorante diazo Azul Directo 71 (Fuente: ResearchGate).

1.4. Impacto ambiental de los colorantes textiles

Alrededor de 200.000 toneladas de colorantes textiles se descargan en los efluentes cada año al no adherirse correctamente a las telas, persistiendo en el ambiente debido a su alta estabilidad frente a la luz, la temperatura y diversos agentes químicos. Además, la utilización de agentes resistentes a la degradación biológica en la confección de textiles, especialmente para fibras naturales como el algodón, dificulta aún más la biodegradación en el ambiente en el cual son dispuestos finalmente dichos efluentes (Chequer *et.al.*, 2013).

Los efluentes textiles se caracterizan por tener una composición compleja, contienen principalmente compuestos orgánicos recalcitrantes, como los colorantes, compuestos clorados y productos añadidos durante el proceso de teñido como bases y sales. Estas últimas se utilizan para potenciar la fijación de los colorantes a la fibra textil, resultando en un efluente que puede contener una concentración de alrededor de 40-100 g/L de NaCl. Estas altas concentraciones salinas contenidas en los efluentes son uno de los motivos de la inhibición del crecimiento microbiano en las mismas. (B. Montañez-Barragán *et al.*, 2019; Tian, F *et al.*, 2021). Como se mencionó previamente, las aguas residuales tienen alta DBO, este parámetro determina la cantidad de oxígeno requerida para que se lleve a cabo la degradación de materia orgánica por parte de microorganismos. La DBO aumenta proporcionalmente con la cantidad de materia a degradar disuelta en el agua de desecho. De esta forma, estas aguas con altas DBO al ser vertidas en los cuerpos de agua causan contaminación ya que disminuyen los niveles de oxígeno disuelto, el cual es utilizado por los microorganismos aeróbicos para llevar a cabo sus actividades metabólicas. También, los efluentes presentan alta DQO, la cual se define como la medida de todas las sustancias oxidables presentes en las aguas, sean biodegradables o no. Tanto la DBO como la DQO, cuando son altas se traducen en una disminución crítica de la concentración de oxígeno disuelto generando ambientes privados de oxígeno o anaerobios e impactando en todas las formas de vida aeróbicas en estos ecosistemas (Rabbi *et al.*, 2018). Otra característica de los efluentes textiles son los altos niveles de sólidos en suspensión (SS) y sólidos disueltos totales (TDS), parámetros que miden la concentración de las sales inorgánicas, de la materia orgánica y otros materiales disueltos

en agua que causan aumentos en la salinidad y la composición iónica (Mehra *et al.*, 2021; Rabbi *et al.*, 2018; D.A. Yaseen *et al.*, 2019).

Además, los colorantes son considerados como micro contaminantes ya que se liberan a muy bajas concentraciones, como lo puede ser una concentración de 1 ppm (Sharma *et al.*, 2021). La presencia de colorantes textiles en cuerpos de agua reduce la penetración de la luz solar, afectando así a los organismos fotosintéticos presentes en el ambiente acuático. Esto produce la consiguiente deficiencia de oxígeno, así como la eutrofización por aporte excesivo de compuestos nitrogenados y fosforados, turbidez y malos olores. Observamos en la Figura 8 la contaminación provocada por presencia de colorante rojo de origen textil:



Figura 8: Contaminación de origen textil en río de la provincia de Zhejiang, China. (Fuente: Fane, B. Wastl, 2022. Fotografía: CPF)

Los colorantes al ser compuestos recalcitrantes permanecen intactos en el ambiente por largos períodos de tiempo, pudiendo llegar a ser transportados hasta regiones alejadas del sitio donde se produjo el vertido del efluente (Sharma *et al.*, 2021; Przystaś *et al.*, 2012; Kapoor *et al.*, 2021) y acumulándose en sedimentos, resultando perjudiciales para las comunidades microbianas y vegetales. Los colorantes y sus productos de degradación pueden ingresar a las cadenas alimenticias generando una biomagnificación tal que los animales en niveles tróficos elevados sufren un mayor nivel de contaminación comparado con aquellos animales en posiciones inferiores de la cadena trófica. En este caso, los humanos se ven afectados indirecta o directamente por la

acumulación de los colorantes en el ambiente. Directamente, por ejemplo, al consumir especies acuáticas contaminadas o plantaciones contaminadas, debido a la irrigación de suelos de cultivo con aguas contaminadas (Mehra *et al.*, 2021).

Asimismo, se ha reportado que los efluentes textiles tienen efectos tóxicos en plantas, las cuales cumplen un rol muy importante a nivel ecológico como lo es proveer un hábitat para la vida salvaje, proteger a los suelos de la erosión y proveer de la materia orgánica tan necesaria para la fertilidad del suelo (Ogugbue *et al.*, 2011). El impacto de los colorantes puede ser monitoreado mediante el uso de indicadores naturales como lo son los organismos fotosintéticos. Usando una serie de especies de algas y plantas acuáticas que incluyen angiospermas, líquenes y charales, es posible evaluar la fitotoxicidad de los colorantes y el riesgo ecológico que representan. Estos organismos, son altamente sensibles a los cambios del ambiente en el que están insertos y al que se introducen los colorantes, pudiendo reflejar dichos cambios en cómo se ve afectado su corto ciclo de vida. Al mismo tiempo, estas especies vegetales son cruciales para el ciclo de nutrientes, la oxigenación del agua, proveen refugio y hábitat para otros organismos acuáticos. Al mismo tiempo, se hallan en diversos hábitats, haciendo que este análisis sea representativo de diferentes ambientes acuáticos (Sharma *et al.*, 2021).

En esa misma línea, otros organismos afectados por los colorantes son el fitoplancton, microalgas, microalgas epífitas y bénticas. Estas últimas; las microalgas, resultan ser un eslabón de suma importancia ecológicamente hablando ya que son las productoras primarias de los ecosistemas acuáticos. La contaminación, generada por los colorantes, provoca una alteración de varios parámetros del desarrollo de las microalgas tales como; la generación de pigmentos y proteínas, la tasa de crecimiento y el peso seco de la planta, el número de frondas y su contenido de clorofila, un desbalance en la transferencia trófica de energía y nutrientes. Algunos colorantes azo como Rojo Directo 2, Azul directo 15 y Rojo Congo causan mutaciones a la flora y fauna acuática (Sharma *et al.*, 2021). Asimismo, se han visto efectos en parámetros bioquímicos, fisiológicos e histológicos de peces. En ellos, se registraron daños en el ADN y fluctuaciones en el conteo de células sanguíneas, inhibición química de la respiración y cambios en el comportamiento (Mehra *et al.*, 2021).

Como se ha descrito, los colorantes azoicos representan un alto riesgo para la salud ya que estas moléculas o sus productos de degradación pueden ser tóxicos y

carcinogénicos (Montañez-Barragán *et al.*, 2019). El 48% de los colorantes azoicos conocidos generan aminas aromáticas (Benkhaya *et al.*, 2020), las cuales son compuestos no coloreados generados como producto de la rotura del enlace azo y son conocidas por ser tóxicas y potencialmente carcinogénicas, por lo menos uno de cada ocho agentes sospechados de provocar cáncer en humanos, son aminas aromáticas o compuestos que derivan en las mismas (Akceylan *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2019). Se cree que las aminas aromáticas, por acción de enzimas que catalizan reacciones de oxidación y conjugación, dan como productos moléculas electrofílicas que se unen covalentemente a la molécula de ADN y causan mutaciones y carcinogénesis química (Wang *et al.*, 2019). La Unión Europea ha clasificado a 22 las aminas aromáticas conocidas hasta la fecha, como carcinogénicas de tipo 1A¹ o B², así también como agentes mutagénicos de tipo 1B o 2³ (Cretazz *et al.*, 2019). En ciertos países se ha llegado a prohibir cerca del 7-8% de los colorantes azo por su capacidad de desprender aminas aromáticas (Sharma *et al.*, 2021).

De esta forma, si estos colorantes son ingeridos, pueden ser metabolizados a aminas aromáticas por los microorganismos presentes en la flora intestinal. El hígado de mamíferos produce enzimas que también pueden catalizar la reducción del enlace azo, dando como resultado N-hidroxilaminas que pueden provocar daños al ADN, teniendo como consecuencia tumores malignos. Los sustituyentes donores de electrones en posiciones orto y para, aumentan este potencial carcinogénico. Algunos de los colorantes azoicos más conocidos y sus productos de degradación pueden inducir cáncer en humanos y animales, como son la bencidina, el pigmento Negro Mordiente 38, las nitrosaminas, dimetilaminas y varias anilinas (Carmen *et al.*, 2011; Chequer *et al.*, 2013).

En particular, el uso de colorantes de tipo azo ha sido prohibido por la Unión Europea debido a su relación con diferentes tipos de cáncer y anormalidades cromosómicas. Por ejemplo, el colorante Rojo Disperso 1 tiene efectos mutagénicos así también como el Rojo Básico 9, que es potencialmente carcinógeno en humanos y es

¹ Categoría 1: Sustancias de las que se sabe o se considera que inducen mutaciones hereditarias en las células germinales humanas.

Categoría 1A: Sustancias que se sabe que inducen mutaciones hereditarias en las células germinales humanas.

² Categoría 1B: Sustancias de las que se considera que inducen mutaciones hereditarias en las células germinales humanas.

³ Categoría 2: Sustancias que son motivo de preocupación porque pueden inducir mutaciones hereditarias en células germinales humanas.

(Fuente: Instituto Nacional de Salud y Trabajo, Madrid, España)

ampliamente utilizado en la industria textil, papelera y productora de colorantes (Kapoor *et al.*, 2021).

1.5 Tratamiento de efluentes textiles

Se ha reportado que muchos microorganismos remueven exitosamente colorantes azoicos en efluentes sintéticos simulados. Sin embargo, varios estudios se han llevado a cabo en condiciones no salinas, lo que dista de las características reales de un efluente textil (B. Montañez-Barragán *et al.*, 2019), que como se ha mencionado, posee una concentración salina de por lo menos 40 g/L.

Para el tratamiento de estas aguas de desecho son ampliamente utilizados los métodos fisicoquímicos, como la aplicación de ozono, peróxido de hidrógeno, luz ultravioleta, o una combinación de varios métodos, así como también, métodos de adsorción con carbón activado, electrocoagulación, floculación, intercambio iónico, filtración por membrana, y ósmosis reversa. No obstante, son métodos costosos, de limitada aplicación, que generan contaminación secundaria y producen desechos difíciles de descartar (Mansour *et al.*, 2012; Przystaś *et al.*, 2012; Forgacs *et al.*, 2004). Por ejemplo, los soportes de carbón son excelentes adsorbentes pero su preparación es muy costosa energéticamente y se ve reflejado en su precio. Además, se necesitan grandes cantidades de adsorbente de carbón para la remoción de colorantes en grandes volúmenes de efluentes. Otro método muy utilizado para la adsorción de colorantes, son los soportes inorgánicos y orgánicos, siendo estos últimos más beneficiosos ya que, suelen provenir de fuentes renovables y son desechos sin valor comercial, producto de otros procesos industriales. Sin embargo, este tipo de adsorción es inespecífica y otros componentes de las aguas de residuos son captadas compitiendo con los colorantes por los sitios de adsorción. Sumado a ello, el colorante sólo es adsorbido en la superficie del soporte sin que cambie su estructura química siendo un problema posterior el descarte adecuado del colorante una vez que el soporte es regenerado (Forgacs *et al.*, 2004). Por este motivo, se ha puesto atención a los métodos biológicos por su bajo costo, por ser una solución más sustentable ya que se produce menor cantidad de lodos y de productos secundarios tóxicos (Kapoor *et al.*, 2021).

Existen tres fenómenos por los cuales se produce la remoción de colorantes por medios biológicos: por biosorción en la biomasa, por bioacumulación o por biodegradación. En el caso de la biosorción y la bioacumulación, los colorantes son atrapados en la matriz del adsorbente, es decir, en la biomasa, de forma pasiva y activa, respectivamente. En estos casos no se produce una transformación de la molécula. Mientras que en la biodegradación se produce la rotura enzimática de la estructura molecular del colorante, resultando en la decoloración del medio acuoso. Si esta biodegradación tiene como productos compuestos de bajo peso molecular como agua (H₂O), CO₂ y amoníaco (NH₃), el proceso es conocido como mineralización. La biodegradación puede considerarse como el más eficaz en comparación al primero, teniendo en cuenta que no es necesario aplicar un tratamiento posterior de desorción de los colorantes o disposición de la biomasa (Przystas *et al.*, 2012; Ruscasso *et al.*, 2020).

En el caso de la degradación de los colorantes azoicos, existen diferentes microorganismos capaces de llevarla a cabo citados en Kappor *et al.* (2021), tales como los hongos, bacterias y levaduras que se detallarán a continuación.

Los hongos son uno de los microorganismos seleccionados para el tratamiento de efluentes textiles, el mecanismo de remoción de los colorantes es por biosorción o biodegradación. Estos organismos tienen estabilidad química frente a condiciones ácidas o alcalinas, buena estabilidad estructural y, además, los hongos macroscópicos tienen una estructura rígida que potencia las propiedades de biosorción. Ciertas especies de hongos microscópicos han probado ser más eficientes en la remoción de colorantes que el carbón activado y hasta pueden llevar a cabo la completa mineralización de este. Los hongos filamentosos producen enzimas oxidantes que pueden degradar los colorantes azoicos. Sin embargo, el proceso se lleva a cabo en fase estacionaria precisando largos tiempos de tratamiento, aumentando la probabilidad de contaminación. Dos ejemplos de hongos utilizados son: *Cunninghamella elegans* y *Trametes versicolor* (Kappor *et al.*, 2021).

También se han reportado bacterias adaptadas a variaciones de diversos parámetros ambientales como son concentración de oxígeno (O₂), pH y temperatura, que son capaces de degradar colorantes azoicos y su eficiencia varía si las condiciones son aerobias o anaerobias. Algunas cepas reportadas son *Geobacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas luteola* y *Sphingomonas paucimobilis*. También, se ha reportado a *Pseudomonas putida* la cual pudo decolorar aguas de desecho textil hasta en un 68,6%

luego de 24h de incubación en condiciones aeróbicas. Siendo comparable este resultado, con los procesos de tratamiento convencionales que llegan a reducir el color sólo en un 34,5% (Mansour *et al.*, 2012). Los consorcios de bacterias han llevado a la completa degradación o alta mineralización de colorantes comparándolas con tratamientos de un solo microorganismo, ya que las reacciones enzimáticas combinadas aumentan la eficiencia de degradación. Además, los consorcios se adaptan a las condiciones de tratamiento y metabolizan compuestos tóxicos en compuestos menos peligrosos (Kappor *et al.*, 2021).

Las levaduras son ampliamente utilizadas para la remoción de colorantes azoicos. Estos microorganismos pueden decolorar soluciones contaminadas con colorantes ya sea por adsorción o degradación enzimática asociada al crecimiento. Tal es el caso de *Candida tropicalis*, que presentó una bioacumulación del 94% del pigmento Azul de Remazol 718 y 44% para el pigmento Rojo Reactivo 701 (G. Dönmez *et al.*, 2002); y a *Trichosporon akiyoshidainum* que alcanzó una adsorción del 63% para el colorante Azul de Remazol 199 y un 90% para Rojo Reactivo 168 (H.F. Pajot *et al.*, 2007). Otras levaduras que presentaron buenos resultados de remoción fueron *Candida sake* 41E, *Leucosporidium muscorum* F20A y *Cystofilobasidium infirmominiatum* F13E, estudiadas por Ruscasso *et al.* (2022), donde una serie de levaduras adaptadas al frío aisladas de la isla King George, Antártida, obtuvieron porcentajes de remoción de un 81% del colorante RB-5 y un 56% para el colorante NR-16.

De este modo, las levaduras presentan ciertas ventajas frente a los hongos filamentosos y las bacterias, por su velocidad de crecimiento comparable a las bacterias y su capacidad de resistir condiciones desfavorables de crecimiento como lo logran los hongos (Ruscasso *et al.*, 2022).

El uso de microorganismos modificados genéticamente es otra opción viable para el tratamiento de colorantes, ya que algunos de éstos suelen ser resistentes a la degradación natural por medio de métodos biológicos. Sumado a esto, algunas enzimas bacterianas son inactivadas por ciertas moléculas de los colorantes azo. De esta manera, las modificaciones genéticas permiten una mayor tasa de degradación y estabilidad. Así, por ejemplo, el gen de la azoreductasa *azoK* aislado de la bacteria *Klebsiella pneumoniae* que luego fue expresado en *Escherichia coli* DH5 α y finalmente se usó una cepa *E. coli* recombinante para degradar el colorante Naranja de Metilo (Kapoor *et al.*, 2021).

Por último, el método de inmovilización de células ha sido aplicado para la remoción de colorantes. Este método se basa en la adhesión de los microorganismos a la superficie de un material poroso. Una ventaja de los soportes de células es que proveen un ambiente más seguro frente a las alteraciones de temperatura, pH o la exposición a químicos tóxicos dándole a los cultivos más estabilidad que aquellos cultivos de células libres. También las enzimas pueden ser inmovilizadas, una técnica altamente amigable con el ambiente. Se ha reportado la remoción de hasta un 77% del colorante Negro Ácido 172 por parte de lacasas inmovilizada de *Trametes pubescens* y un 96% para el colorante Rojo Congo por parte de lacasas de *T. versicolor* (Kapoor *et al.*, 2021).

En conclusión, existen diversos métodos biológicos como alternativas posibles para el tratamiento de efluentes textiles, la ventaja de esta diversidad radica en la posibilidad de evaluar qué tipo de organismo es idóneo para adaptarse a las diferentes características de los efluentes que se quieran tratar.

1.6. Posibles mecanismos de degradación de los colorantes azoicos

El mecanismo por el cual se inicia la degradación de los colorantes azoicos es la ruptura del enlace $-N=N-$, la cual puede llevarse a cabo por enzimas producidas por microorganismos como la azoreductasa, lacasa, peroxidasa u oxidasa (Kapoor *et al.*, 2021). Dicha actividad enzimática, en el caso de las azoreductasas por ejemplo, puede efectuarse si la enzima entra en contacto directamente con la molécula del colorante o indirectamente gracias a la asistencia de cofactores e intermediarios como son las coenzimas dinucleótido de flavina y adenina (FADH), nicotinamida adenina dinucleótido (NADPH) y Nicotinamida-Adenina Dinucleótido fosfato (NADH) que llevan a cabo la transferencia de dos electrones desde la enzima hacia el enlace azo presente en la molécula del colorante. De esta forma, las coenzimas cumplen el rol de intermediarios, facilitando y acelerando la transferencia de electrones. En su forma oxidada (NAD^+ , $NADP^+$ y FAD) reciben los electrones de la azoreductasa, reduciéndose. Luego estos electrones son transferidos al enlace de la molécula del colorante de manera que las coenzimas son reoxidadas. En la Figura 9, se describe esquemáticamente el mecanismo por el cual se produce la rotura del enlace azo por acción de las azoreductasas bacterianas (Lellis *et al.*, 2019; Kapoor *et al.*, 2021).

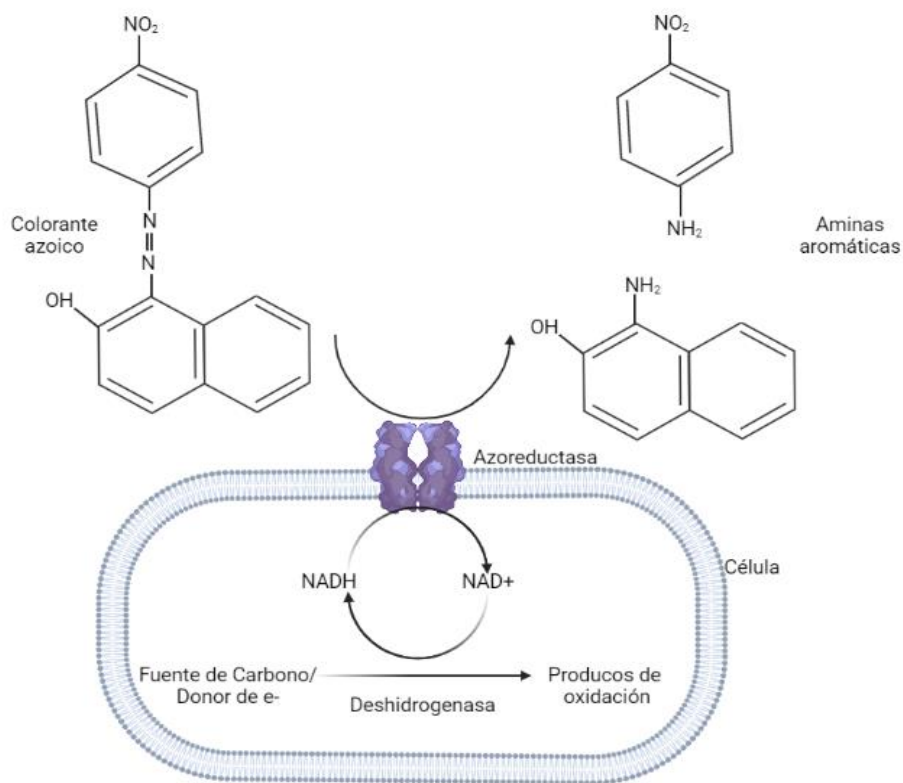


Figura 9: Esquema en el que se observa como las coenzimas en su forma oxidada aceptan los electrones desde la azoreductasa y pasan a su forma reducida, las cuales son luego reoxidadas cuando donan esos electrones aceptados a las moléculas del colorante, donde atacarán nucleofílicamente el enlace azo (Lellis *et al.*, 2019; Kapoor *et al.*, 2021).

Las azoreductasas provenientes de microorganismos anaerobios son sensibles al oxígeno. Cuando la enzima se encuentra en presencia de oxígeno, éste compite con la molécula del colorante provocando que la coenzima sea oxidada en lugar del enlace azoico, interrumpiendo así la transferencia de electrones hacia el enlace azo y, por lo tanto, impidiendo también la ruptura reductiva del mismo. De esta manera, como las azoreductasas de los microorganismos aeróbicos son resistentes al oxígeno, su actividad no se ve afectada. A partir de la transferencia de electrones al enlace $-N=N-$ del colorante, éste se debilita hasta romperse. Producto de esta ruptura, se forman aminas aromáticas carentes de color que podrían ser metabolizadas posteriormente por procesos aeróbicos o microaerófilos (Lellis *et al.*, 2019; Kapoor *et al.*, 2021; Misal *et al.*, 2018).

Asimismo, la enzima lacasa es producida principalmente por cultivos fúngicos y vegetales. El mecanismo por el cual las lacasas degradan los colorantes azoicos se

compone de una cadena de pasos: en primer lugar, se produce la oxidación del grupo fenólico del colorante azoico dando el radical fenoxilo que es oxidado consecutivamente al ion carbonilo. Luego, este ion es atacado nucleofílicamente por el ion hidroxilo (OH⁻) para producir nitrohidrazinas y naftoquinonas que posteriormente, por acción de radicales libres del oxígeno, se remueve el N₂ de la nitrohidrazina dando como producto nitrobenceno. Éste último compuesto es hidrolizado para formar nitrobenceno y nitrofenol (Kapoor *et al.*, 2021).

1.7 Un análisis científico y social

Si bien la gestión inadecuada de efluentes textiles ha tenido y tiene grandes consecuencias en el ambiente y también generan efectos negativos a nivel social cuando se vulneran los derechos de los trabajadores de este rubro, la industria textil puede ser profundamente enriquecida si se llevaran adelante prácticas responsables en materia ambiental y laboral.

El objetivo del presente trabajo es el desarrollo de una alternativa viable frente a un desafío existente, como lo es el tratamiento de colorantes textiles, pero también es de suma importancia tener en cuenta que la tarea científica no solo radica en desarrollar soluciones sino también en realizar un análisis social y una contextualización de las problemáticas ambientales.

Objetivos

2.1 Objetivos Generales:

El presente trabajo tiene como objetivo el desarrollo de una estrategia de tratamiento biológico para efluentes textiles como una alternativa sustentable frente a los tratamientos fisicoquímicos, que sea amigable con el medio ambiente y suponga un bajo costo económico.

2.2 Objetivos Específicos:

- Analizar la remoción de los colorantes textiles Violeta Reactivo 5 y Naranja Reactivo 16 por parte de la levadura antártica *Leucosporidium muscorum F20A*.
- Analizar la cinética de remoción de los colorantes a escala Erlenmeyer.
- Analizar la cinética de remoción de los colorantes a escala biorreactores tipo tanque agitado.
- Realizar un ensayo de fitotoxicidad con los productos de remoción presentes en el medio de cultivo.

Materiales y métodos

3.1 Microorganismo

Leucosporidium muscorum F20A (KU659533) es una levadura de origen antártico que, en estudios previos de bioprospección, demostró la capacidad de remover colorantes azoicos de placas con el medio de cultivo *Normal decolorization media* (NDM) (Tabla 1) (Ruscasso *et al.*, 2022) suplementado con 100 ppm de diferentes colorantes: Negro Reactivo 5, Naranja Reactivo 16, Azul Reactivo 19 y Azul Ácido 74. *L. muscorum* F20A es objeto de estudio en el presente trabajo. La cepa se encuentra formando parte de la colección de levaduras adaptadas al frío del Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales (CINDEFI), conservada a -20°C en glicerol. Para cada ensayo se procederá a su activación mediante la realización de un cultivo líquido en medio NDM por 72 h.

Tabla 1: Composición química del medio de cultivo *Normal Decolorization Media* (Ruscasso *et al.*, 2021).

Normal Decolorization Media	
Sustrato	Concentración (g/L)
KH ₂ PO ₄	5
MgSO ₄	0,5
CaCl ₂	0,13
Extracto de Levadura	2,5
Urea	2,25
Glucosa	20

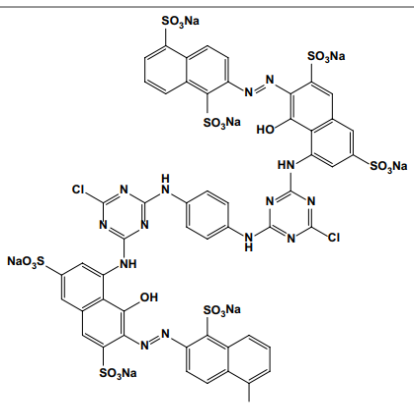
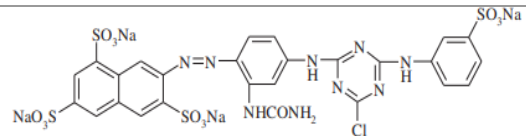
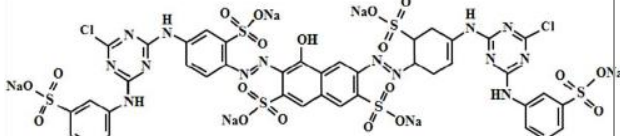
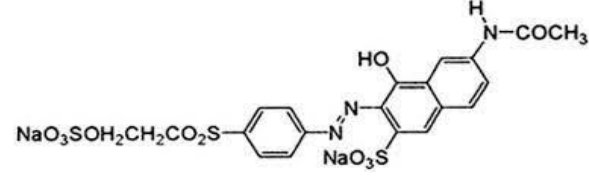
3.2 Colorantes textiles

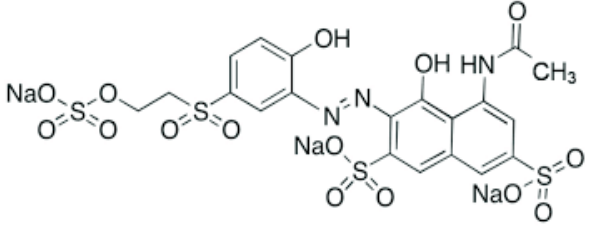
Se utilizaron los colorantes modelos: Rojo Reactivo 141 (RR-141), Amarillo Reactivo 84 (AR-84), Verde Reactivo19 (VR-19), Naranja Reactivo 16 (NR-16) y Violeta Reactivo 5 (VR-5). En la tabla 2 se encuentran detallados para cada colorante el peso molecular, la longitud de onda de absorbancia máxima y la clasificación fisicoquímica. Estos colorantes fueron gentilmente donados por la empresa ALCONIC SRL.

Además, se utilizó una muestra de efluente textil real, donada por una industria

textil ubicada en la localidad de Luján (provincia de Buenos Aires). La cual vierte sus efluentes tratados por un sistema de lodos convencional al río Luján, perteneciente a la cuenca del Plata.

Tabla 2: Tabla informativa de colorantes utilizados en el presente trabajo. (PubChem; ResearchGate; Senasu et al., 2017; Barka et al., 2011; Razali et al., 2018; Sane et al., 2018; Gomes et al., 2011; Cabansag et al., 2013)

Colorante	Clasificación	λ máxima de absorbancia	Peso Molecular
 <p>Rojo Reactivo 141 (RR-141)</p>	Diazo	543 nm	1774,19 g/mol
 <p>Amarillo Reactivo 84 (AR-84)</p>	Monoazo	226nm	1628,22 g/mol
 <p>Verde Reactivo 19 (VR-19)</p>	Diazo	640nm	1418,84 g/mol
 <p>Naranja Reactivo- 16 (NR-16)</p>	Monoazo	495nm	617,54 g/mol

 <p>Violeta Reactivo-5 (VR-5)</p>	Monoazo	560nm	735,59 g/L
--	---------	-------	------------

3.3 Decoloración en medio líquido

3.3.1 Ensayo de Screening en medio líquido

El objetivo de este ensayo fue estudiar la capacidad de remover colorantes azo por parte de la levadura en estudio utilizando tres concentraciones de glucosa: 20, 30, 40 g/L, con el fin de evaluar la concentración óptima de la fuente de carbono. El ensayo se llevó a cabo utilizando Erlenmeyers de 100 ml con 20 ml de medio de cultivo NDM a pH 6, con una concentración de cada colorante de 100 ppm, inoculados con un cultivo *overnight* de *L. muscorum F20A*. A modo control, se realizó un cultivo biótico conteniendo el medio NDM y el inóculo de levadura, sin la adición de colorante. Este control permitió comparar cualitativamente los cultivos decolorados con el cultivo sin adición de colorante. Los cultivos fueron incubados a 20 ± 2 °C de temperatura y con una agitación de 150 rpm.

3.3.2 Ensayo de Cinética de remoción de los colorantes VR-5, NR-16 y una mezcla de ambos

Con el objetivo de estudiar la cinética de remoción de los colorantes se realizó un cultivo en medio líquido utilizando Erlenmeyers de 250 ml conteniendo 50 ml de medio NDM, a pH 6 y con una concentración final de 100 ppm del colorante VR-5, el NR-16 o la mezcla de ambos. Para dar inicio al ensayo se inoculó el medio de cultivo estéril con la levadura proveniente de un inóculo *overnight* y se incubó a 20 ± 2 °C de temperatura y a 150 rpm por 48 h. Adicionalmente, se realizó el control biótico, para analizar el crecimiento de la levadura sin el agregado del colorante textil, y un control abiótico, conteniendo medio de cultivo y colorante sin el agregado de la levadura, con el objetivo de asegurar que la decoloración del medio de cultivo es producto del metabolismo de la levadura y no intervienen factores fisicoquímicos.

Se tomaron muestras diarias con intervalos de 2h entre ellas, en condiciones de esterilidad. Se colocó una alícuota de la muestra en un Eppendorf de 1 ml y se centrifugó durante 10 min a 13000 rpm. De esta manera, todos los restos celulares quedan retenidos en forma de *pellet*, pudiendo separar así el sobrenadante por trasvasado. Este posteriormente se coloca en la cubeta del espectrofotómetro y se mide la absorbancia a la longitud de onda máxima de los colorantes en estudio, 560nm para el colorante VR-5, 440nm y 495nm para NR-16 y para la mezcla se ambos se midió la absorbancia a las 3 longitudes de onda mencionadas. El porcentaje de remoción fue calculado con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ remoción} = \frac{(A_0 - A) \times 100}{A_0}$$

Ecuación 1: Fórmula utilizada para determinar el porcentaje de remoción en el medio de cultivo (Manogaran et al., 2021).

Donde A_0 es la absorbancia inicial del medio suplementado con el colorante y A es la absorbancia a cierto tiempo (t), correspondiente al tiempo en que se ha tomado la muestra. Se utilizó un espectrofotómetro UV-visible (T60, PG instruments UK, Figura 10) para llevar a cabo un análisis espectral de cada muestra y obtener las absorbancias anteriormente nombradas que permitieron calcular la desaparición del colorante en el medio de cultivo.



Figura 10: Espectrofotómetro de UV-visible utilizado en la experiencia.

Además del porcentaje de remoción, con el dato de la absorbancia determinamos

la concentración de colorante remanente en cada muestra tomada. Para realizar este cálculo se debe armar una curva de calibración que relacione la concentración del colorante con su correspondiente medida de absorbancia teniendo en cuenta la contribución de la absorbancia del medio de cultivo a la longitud de onda que absorbe el colorante estudiado. Considerando que la curva de calibración es una ecuación lineal, de la forma “ $y=a+bx$ ”, y que tanto la pendiente (a) y la ordenada al origen (b) formarán parte de la ecuación que permite realizar este cálculo. De esta forma, podemos representar la ecuación que determina la concentración remanente de colorante a cualquier tiempo “t” de la siguiente manera:

$$ppm = \frac{(A_{muestra} - A_{biótico})}{pendiente} - ordenada\ al\ origen$$

Ecuación 2: Concentración de colorante remanente en cada muestra (Harris, D.C. 2003)

Por último, se llevó a cabo un barrido espectral en un rango de absorbancias desde 200-800 nm a distintos tiempos de decoloración (tiempo inicial, intermedio y final) con el objetivo de detectar, por un lado, la aparición de aminas aromáticas, las cuales presentan absorción en la región ultravioleta y, por otro lado, la desaparición del pico de absorbancia en el rango visible correspondiente a la desaparición del colorante textil (Manu *et al.*, 2002).

A continuación, se muestra un esquema del protocolo seguido en las determinaciones espectrofotométricas mencionadas (Figura 11).

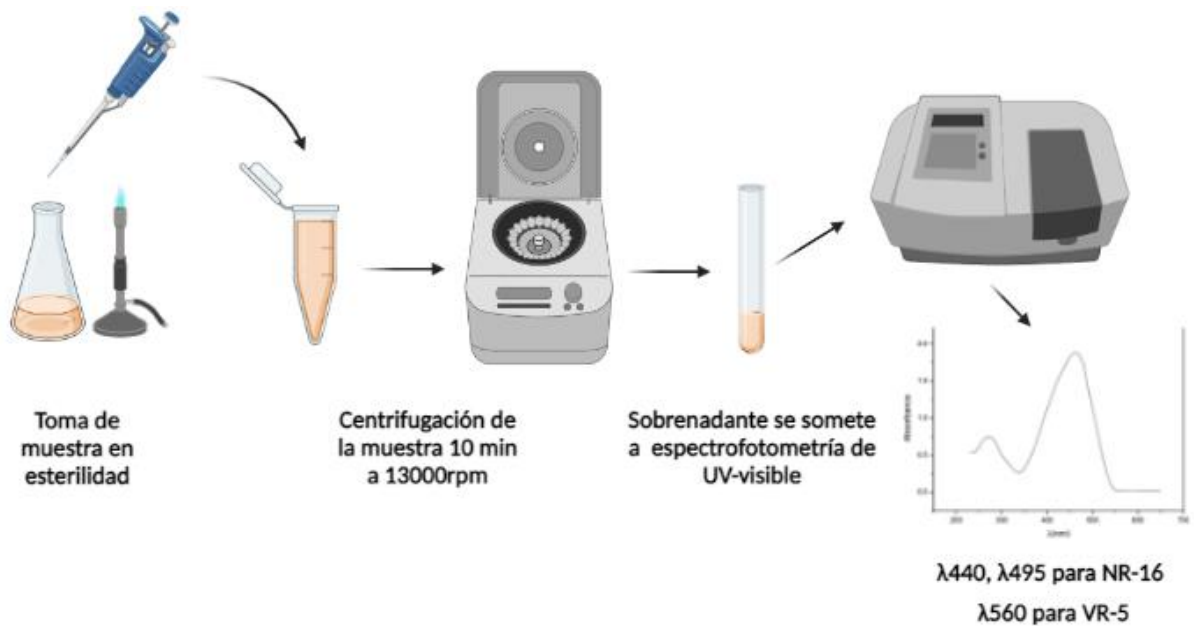


Figura 11: Esquema que representa el protocolo seguido para la determinación de la absorbancia de NR-16 y VR-5 y de la mezcla de ambos colorantes. mencionar

Para llevar a cabo un monitoreo del crecimiento de *L. muscorum* F20A se midió la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) a las muestras tomadas (Al-Tohamy *et al.*, 2020). Con estos datos se realizaron curvas de crecimiento representando DO_{600} en función del tiempo. Sumado a ello, para determinar la concentración de biomasa formada se utilizó el método gravimétrico de peso seco (Rosu *et al.*, 2018), en el cual se tomaron 10 ml de muestra y se centrifugaron durante 10 min a 12000 rpm. Luego, el *pellet* de células obtenido se resuspendió en un mínimo volumen de agua destilada y trasvasó a un frasco pesado previamente y fue llevado a estufa a 105°C con el objetivo de eliminar por evaporación el contenido líquido hasta peso constante. Por diferencia gravimétrica del peso del frasco secado en estufa menos el peso del frasco previo al agregado de la disolución resuspendida, se determinó la concentración de biomasa en g/L utilizando la siguiente ecuación:

$$Biomasa(g/L) = (Peso Frasco_{Biomasa} - Peso Frasco_{Vacio}) \times \left(\frac{1L}{0.01L}\right)$$

Ecuación 3: Expresión para la determinación de biomasa en g/L por método gravimétrico de peso seco.

En la Figura 12 se esquematiza el protocolo seguido para cuantificar el crecimiento microbiano:

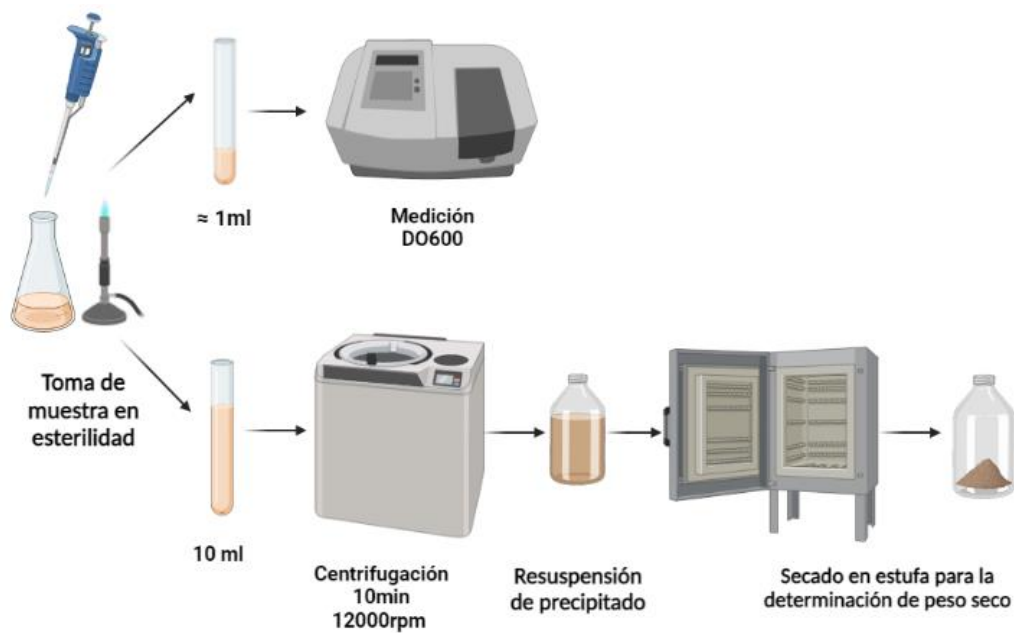


Figura 12: Esquema que representa el protocolo seguido para la determinación de biomasa por métodos ópticos y métodos gravimétricos de peso seco

Finalmente, a partir de los datos de densidad óptica (DO) o el cálculo de concentración de biomasa (g/L), se pudo determinar la velocidad máxima de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$, h^{-1}). Dicha velocidad de crecimiento fue calculada a partir de la ecuación 4, la cual representa el cambio instantáneo del número de células durante el crecimiento microbiano, reflejado en la DO (Hall et al., 2013):

$$\frac{dN}{dt} = \mu N$$

Ecuación 4: Donde N es el número de células en un tiempo “t” y μ representa la tasa constante de crecimiento.

De esta manera, operando algebraicamente e integrando desde un tiempo $t=0$ a cierto tiempo t, se obtiene la ecuación 5 que representa gráficamente el crecimiento microbiano durante la fase exponencial esquematizada en la Figura 13 (Hall et al., 2013).

$$\ln \frac{Nt}{N0} = \mu(t - t0)$$

Ecuación 5: Ecuación lineal que representa el crecimiento microbiano.

En la clásica curva de crecimiento microbiano se identifican tres fases: Fase de latencia o Fase *Lag* donde las células no se replican, sino que se adaptan al nuevo ambiente y se caracteriza por una velocidad de crecimiento nula ($\mu=0$), luego, esta fase es seguida por la fase exponencial donde μ toma un valor constante mayor a cero y la

población microbiana aumenta exponencialmente con el tiempo. Posteriormente, se alcanza la fase estacionaria donde la tasa de crecimiento es nula, es decir $\mu=0$ nuevamente, ya sea por agotamiento de recursos o acumulación de metabolitos de desecho (Buchanan *et al.*, 1997; Hall *et al.*, 2013).

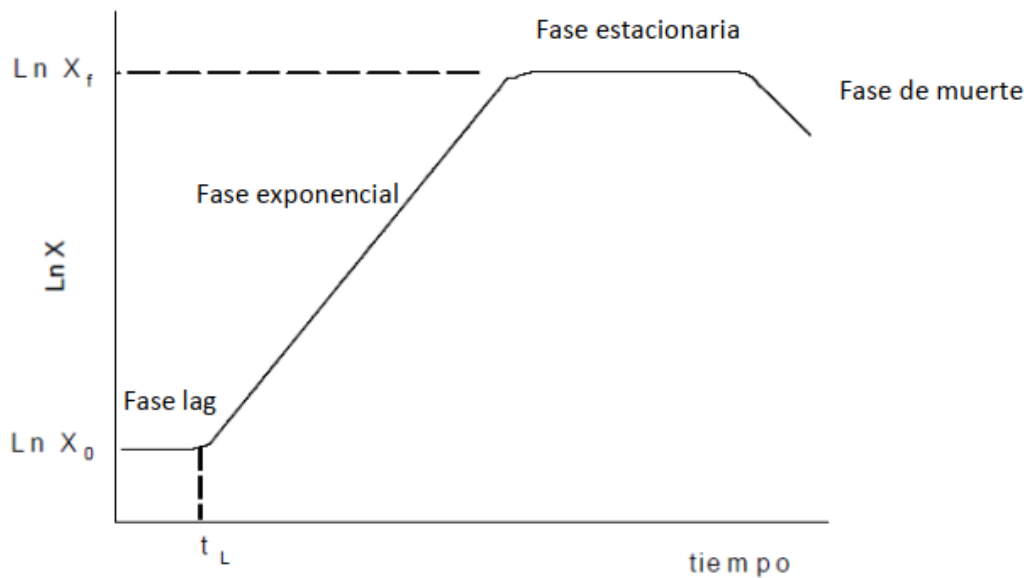


Figura 13: a. Gráfica que describe el crecimiento microbiano a partir de la medida de DO en función del tiempo, (Buchanan *et al* 1997; Hall *et al.*, 2013; Ruscasso, 2018).

3.3.3 Influencia del NaCl en el proceso de remoción

Tal como se mencionó en la introducción, los efluentes textiles presentan altas concentraciones salinas, por lo que se estudió si una concentración de 10 g/L de NaCl afecta a la remoción de los colorantes NR-16, VR-5 y su mezcla en el medio NDM. Con el objetivo de determinar si el crecimiento de la levadura se ve afectado por la concentración de NaCl, se utilizó el mismo protocolo para realizar los cultivos y toma de muestras.

3.3.4 Estudio de la cinética de remoción con otras fuentes de carbono y energía

Con la finalidad de analizar otras fuentes de carbono que pueda usar la levadura se realizó un ensayo de remoción de los colorantes NR-16, VR-5 y una mezcla de ambos con el medio NDM con NaCl suplementado con 40g/L de glicerol o 20g/L de almidón como reemplazo de la glucosa.

Se aplicaron los protocolos de análisis detallados en las Figuras 11 y 12, para el estudio de la decoloración y el crecimiento microbiano respectivamente.

3.3.5 Ensayo de Cinética de Remoción del Efluente Textil

Se puso en práctica la capacidad de *L. muscorum F20A* para llevar a cabo la remoción de un efluente textil real que cuenta con una composición mixta de colorantes y demás químicos que puedan encontrarse en condiciones normales en aguas de desecho textiles.

En esta experiencia se adicionó, a la muestra de efluente real, las sales del medio NDM y se filtró la muestra con filtro de 0,22 μm . Luego, se agregó la solución líquida estéril de urea y se analizó el crecimiento microbiano mediante la toma de muestras con el procedimiento antes mencionado. El análisis de la remoción se realizó por espectroscopía UV-visible aplicada a muestras de diferentes tiempos de cultivo: inicial, intermedio y final; donde se observó la disminución en la intensidad o desaparición de la absorbancia en el rango visible del espectro, correspondiente a la remoción de los colorantes presentes en el efluente textil.

3.4 Escalado del estudio de remoción de los colorantes textiles

La cinética de remoción se llevó a cabo en un biorreactor BIOFLO[®] 310 tipo tanque agitado de volumen útil de 1.3L (Figura 14), utilizando como medio de cultivo el medio NDM, con una concentración total de 100 ppm de los colorantes NR-16 y VR-5 en partes iguales, es decir, 50 ppm de cada uno.



Figura 14: Fotografía del biorreactor BIOFLO® 310 utilizado en la experiencia de escalado.

La toma de muestras se realizó en intervalos de tiempo definidos donde se monitoreó el pH del cultivo, la temperatura, la velocidad de agitación (rpm), la concentración de los colorantes, el crecimiento de *L. muscorum* F20A, el flujo de aire que egresa del biorreactor, el consumo de O₂, la producción de CO₂ y el consumo de glucosa. Finalmente, parte del sobrenadante colectado fue conservado a -20°C de temperatura para luego realizar el ensayo de fitotoxicidad.

El tratamiento de las muestras líquidas fue análogo al realizado en la cinética de remoción a escala Erlenmeyer. Tanto para la determinación de la concentración de colorante en el sobrenadante de la muestra centrifugada como para el análisis del crecimiento microbiano se utilizó espectrofotometría de UV-Visible y el método gravimétrico de peso seco.

El ensayo de consumo de glucosa fue llevado a cabo con el Kit Glicemia Wiener Lab®. El fundamento de esta técnica está basado en la reacción de glucosa con oxígeno O₂ y H₂O catalizada por la enzima glucosa oxidasa (GOD) para dar ácido glucónico y

H₂O₂ que posteriormente reacciona con 4-aminofenazona (4-AF) y 4-hidroxibenzoato, en una reacción catalizada por la enzima peroxidasa para dar quinonimina roja que posee un característico color rosado, el cual evidencia la presencia de glucosa (Visvanathan *et al.*, 2020). Este ensayo consta de una etapa de construcción de una curva de calibración utilizando un patrón de glucosa de una concentración de 1g/L, y un reactivo de glicemia necesario para llevar a cabo la detección de glucosa. Se detallan en la Figura 15, las reacciones involucradas en la determinación del consumo de glucosa y en la Figura 16 un esquema del procedimiento para la construcción de la curva de calibración:

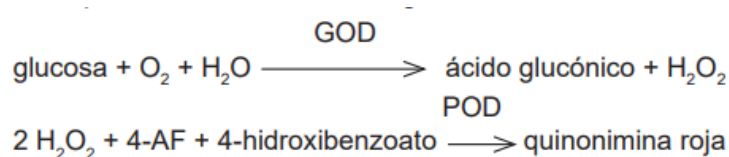


Figura 15: Reacciones que se llevan a cabo en el ensayo de consumo de glucosa.

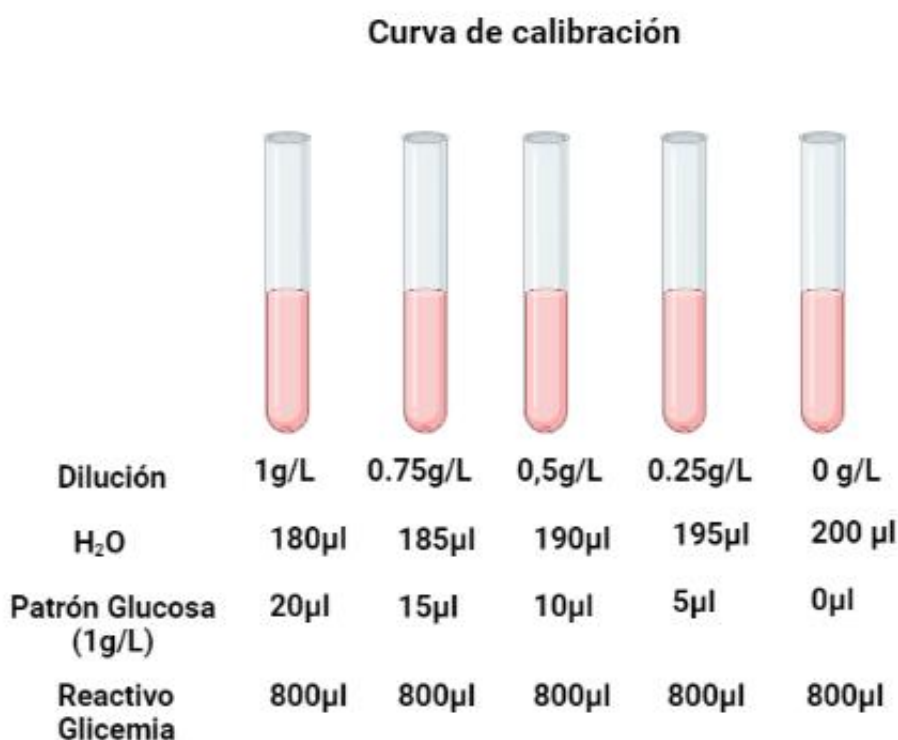


Figura 16: Esquema representando las diluciones y volúmenes de reactivos en la construcción de la curva de calibración.

Luego, se midieron las muestras del biorreactor. Se tomaron 20μl de muestra con la dilución correspondiente y se le agregaron 180μl de H₂O y 800μl de reactivo de glicemia, dando inicio de esta manera a la reacción en un baño a 37°C durante 10 min.

Posteriormente, se tomaron 300µl de cada muestra para llevarlas a una placa de ELISA y medir absorbancia en espectrofotómetro a 505 nm de longitud de onda. En la Figura 17, se representa el tratamiento de la muestra para determinar el consumo de glucosa:

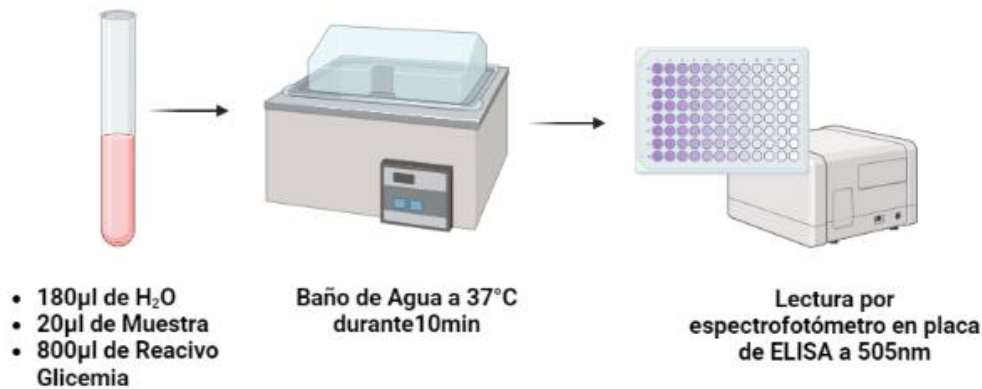


Figura 17: Esquema que representa el tratamiento de la muestra en el ensayo de determinación de consumo de glucosa.

A partir de la ecuación de la recta obtenida de la curva de calibración puede calcularse la concentración de glucosa en cada muestra, con la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de Glucosa } \left(\frac{g}{L}\right) = \frac{\text{Absorbancia} - \text{ordenada al origen}}{\text{pendiente}}$$

Ecuación 6: Ecuación utilizada para determinar la concentración de glucosa haciendo uso de la curva de calibración y los datos de absorbancia arrojados como resultado del análisis de cada muestra.

Para llevar a cabo la toma de muestras gaseosas se analizó el flujo o caudal de aire que ingresó al biorreactor, así también como la composición de O₂ y CO₂ que ingresan y salen del reactor.

En principio, se midió el caudal de aire que ingresó al biorreactor con un caudalímetro de burbuja (Figura 18), para esto se conectó el caudalímetro con la manguera de salida de gases del biorreactor. De esta manera, se cronometró el tiempo que una burbuja de aire tarda en recorrer el volumen conocido del caudalímetro, esta medida

se realizó por duplicado. Finalmente, teniendo los datos de tanto el tiempo como el volumen recorrido, se determinó el flujo de aire con la ecuación 7:



Figura 18: Fotografía del caudalímetro de burbuja utilizado.

$$Flujo \left(\frac{cm^3}{min} \right) = \frac{60 \text{ seg} \times 198.2 \text{ cm}^3}{\text{tiempo medido}}$$

Ecuación 7: Ecuación utilizada para determinar el flujo de aire de salida del biorreactor.

Luego, se midió la composición gaseosa a la entrada y salida del biorreactor utilizando un detector paramagnético de O₂ Servomex® Series 1100, mientras que para cuantificar el CO₂ se utilizó un detector infrarrojo Horiba® Pir 2000 de CO₂. Ambos equipos se pueden ver en las Figuras 19 y 20 respectivamente:



Figura 19: Detector paramagnético de O₂ Servomex® Series 1100.



Figura 20: Detector infrarrojo de CO₂ Horiba® Pir 2000.

De esta manera, conociendo los porcentajes de O₂ de entrada y de salida del biorreactor, se determinó la velocidad volumétrica de consumo de oxígeno (rO_2) con la siguiente ecuación:

$$rO_2 = \frac{F \times (XN_2) \times PT \times 60}{VL \times R \times T} \times \left(\frac{\%O_2 \text{ in}}{100 - \%O_2 \text{ in}} - \frac{\%O_2 \text{ out}}{100 - \%O_2 \text{ out} - \%CO_2 \text{ out}} \right)$$

Ecuación 8: Fórmula para determinar la velocidad de consumo de O₂ conociendo los porcentajes de salida y entrada de dicho gas del biorreactor. Con XN₂= 0.79.

Mientras que, conociendo el porcentaje de CO₂ de salida del biorreactor se pudo determinar la velocidad de producción de dióxido de carbono (rCO₂) utilizando la ecuación:

$$rCO_2 = \frac{F \times (XN_2) \times PT \times 60}{VL \times R \times T} \times \left(\frac{\%CO_2 \text{ out}}{100 - \%O_2 \text{ out} - \%CO_2 \text{ out}} \right)$$

Ecuación 9: Ecuación que permite calcular la velocidad de producción de CO₂ conociendo el porcentaje de salida del mismo. Con XN₂= 0.79.

3.5 Bioensayo de toxicidad con semillas de *Lactuca sativa* L.

Con el objetivo de evaluar el efecto fitotóxico de los productos generados durante las cinéticas de degradación, se realizó un bioensayo estático de toxicidad aguda en semillas de *L. sativa* L. Para realizar esta experiencia se tomaron muestras de las diferentes etapas del proceso de tratamiento de los colorantes estudiados. Se siguieron los protocolos reportados por Castillo Morales, G. (2004). Las semillas utilizadas deben encontrarse libres de pesticidas y fungicidas y poseer un alto poder germinativo, alrededor de un 90% de germinación. Además, es deseable que las semillas elegidas presentaran baja variabilidad de elongación.

En el estudio citado también se menciona que, si bien la especie utilizada no es representativa de ambientes acuáticos, los resultados del ensayo de fitotoxicidad obtenidos pueden brindar información sobre el potencial efecto contaminante de las muestras en especies vegetales cercanas a cuerpos de agua contaminados o de semillas y plántulas en general, ya que el desarrollo primordial de diversas especies de plantas suele ser similar. En conclusión, el ensayo llevado a cabo es útil para evaluar la toxicidad de compuestos puros o mezclas complejas sobre la germinación de semillas y el desarrollo de las plántulas, ya que estos agentes tóxicos pueden causar efectos en las primeras fases de desarrollo vegetal como lo es la inhibición de la germinación o tanto inhibir como

retardar la elongación de la radícula y el hipocótilo (Figura 21).

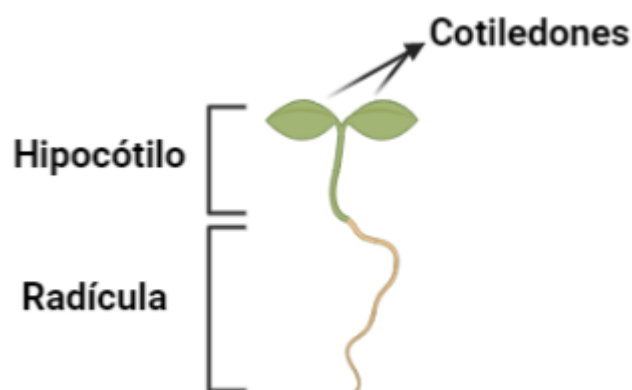


Figura 21: Esquema representativo de los diferentes tejidos de la plántula de *L. sativa* L.

Para el ensayo se prepararon una serie de placas de Petri de 9 cm de diámetro con doble papel de filtro Whatman n°1, el mismo se impregnó con 5 ml de los sobrenadantes obtenidos en los distintos pasos del proceso de remoción: a tiempo inicial, tiempo intermedio y tiempo final. Los cuales se utilizaron al 100% y en diluciones de 50%, 25% y 10%, hechas con agua dura reconstituida y por cuadruplicado. Como control negativo de toxicidad se utilizó agua reconstituida y como control positivo una solución de $ZnSO_4$ de 500mg/L de concentración. Luego, se colocaron 20 semillas de *L. sativa* L. en cada placa distribuidas uniformemente y se incubaron en oscuridad a $24 \pm 2^\circ C$ durante 120 h. Una vez cumplido ese tiempo, se cuantificaron las semillas germinadas a fin de calcular el porcentaje de germinación y se examinaron las características generales de las plántulas que hayan brotado. Se tuvieron en cuenta características como ser oscurecimiento o tonalidades marrones en el tejido vegetal, rasgos atribuidos principalmente a tejidos necrosados y también modificaciones en vellosidades absorbentes de la radícula y desarrollo y coloración de cotiledones.

Posteriormente a la observación exhaustiva de las plántulas se procedió a congelar las placas de Petri con el objetivo principal de que los brotes adquirieran una consistencia blanda y más fácilmente manipulable a la hora de medirlos. De esta manera, se midió la longitud de las radículas e hipocótilos de cada una de las plántulas y se registraron estas medidas para un posterior análisis estadístico realizado por el método Student T-test con un $p \leq 0.05$. En la Figura 22, se esquematiza el protocolo seguido para el ensayo de fitotoxicidad realizado.

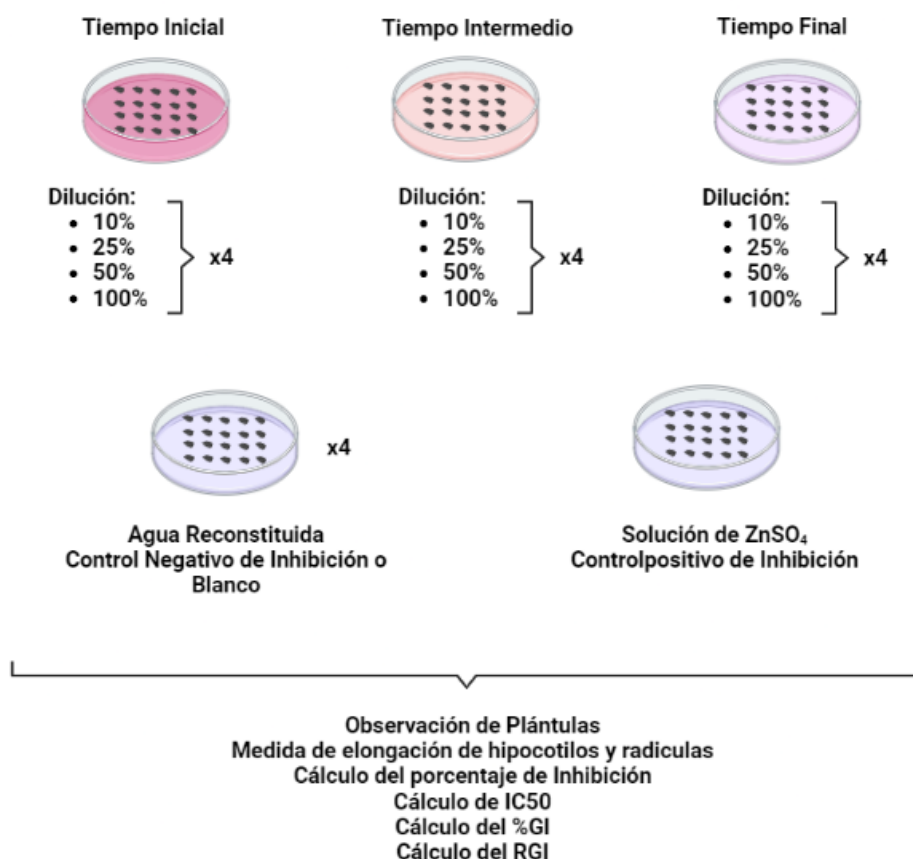


Figura 22: Esquema general del ensayo de fitotoxicidad realizado.

Una vez obtenidas las medidas correspondientes, se llevó a cabo el cálculo del promedio y la desviación estándar de los resultados de cada medida de hipocótilo y radícula de cada muestra, porcentaje de inhibición del crecimiento de la radícula calculado utilizando la ecuación 10.

$$\%Inhibición = \left(\frac{\text{media de elongación radícula}_{BLANCO} - \text{media de elongación radícula}_X}{\text{media de elongación radícula}_{BLANCO}} \right) \times 100$$

Ecuación 10: Fórmula utilizada para el cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento de radícula de un ensayo X.

Teniendo los porcentajes de inhibición se construyó una curva de %Inhibición en función del logaritmo decimal de la Concentración de colorante en milimoles (mM). De modo que a partir de esta curva se pudo determinar el valor de la concentración que causó

el 50% de inhibición, es decir, la concentración inhibitoria que impidió la elongación de la radícula en un 50% de las plántulas de *L. sativa* L (IC₅₀). A su vez, se calcularon el índice de germinación (GI%) y el índice de crecimiento relativo (RGI) con las siguientes fórmulas (Young *et al.*, 2011; Ruscasso *et. al.*, 2021):

$$GI\% = \frac{(RLS \times GSS \times 100)}{RLC \times GSC}$$

Ecuación 11: Fórmula para calcular el índice de germinación %GI, donde:

- RLC es la longitud de la radícula del control.
- RLS la diferencia entre la longitud radicular de las muestras y el control.
- GSC: número de semillas germinadas del control.
- GSS: número de semillas germinadas de las muestras.

$$RGI = \frac{RLS}{RLC}$$

Ecuación 12: Formula para calcular el índice de crecimiento relativo.

Resultados y Discusión

L. muscorum F20A (KU659533) es una levadura psicotolerante que puede encontrarse en muestras acuáticas provenientes de glaciares de Noruega, Argentina, el Archipiélago Ártico y la Antártida. Este tipo de levaduras psicrófilas o psicotolerantes pueden ser utilizadas en tratamientos a temperatura ambiente sin necesidad de invertir energía en el termostatación del cultivo lo que representa una ventaja frente a otros métodos de tratamientos más costosos energéticamente (Ruscasso *et al.*, 2022).

En el trabajo realizado por Ruscasso *et al.* (2022), se estudió la capacidad de degradar colorantes textiles por parte de una colección de 61 levaduras antárticas de diferentes muestras terrestres y marinas del suelo de la Isla King George, Antártida. Las levaduras fueron aisladas y crecidas en el Medio *Yeast Extract Peptone Dextrose* e identificadas por Martínez *et al.* (2016). Dentro de esta colección se estudió *L. muscorum* F20A, a raíz de estos estudios se pudo confirmar la ausencia de actividad enzimática oxidativa en medio sólido. Sin embargo, se consideró la posibilidad de que la rotura del enlace azo se lleve a cabo por enzimas reductasas. Cabe señalar que la levadura no es capaz de usar a los colorantes como fuente de carbono, sino que el proceso de remoción depende de la adición de una fuente de carbono que la levadura pueda oxidar. Es decir, la asimilación de una fuente de carbono provee a la célula del poder reductor necesario para llevar a cabo la degradación del colorante textil.

4.1 Resultados de los ensayos en medio líquido

4.1.1 Ensayo de Screening en medio líquido

A partir del ensayo de *screening* realizado con 100 ppm de diversos colorantes textiles, la levadura *L. muscorum* F20A fue capaz de decolorar total o parcialmente en todos los medios al cabo de 20 horas de cultivo (Figura 23). Como resultado de esta experiencia, se determinó el uso de los colorantes modelos NR-16 y VR-5 para los estudios posteriores, y el uso de una concentración de fuente de carbono de 20 g/L, ya que en dichas condiciones para ambos colorantes se observaron buenos resultados cualitativos frente a los otros colorantes ensayados.



Figura 23: Fotografía comparativa de los cultivos al tiempo inicial (izquierda), luego de 20h de cultivo (derecha) y el control compuesto de medio de cultivo NDM e inóculo de levadura. En la presente figura se visualizan los colorantes: AR-84, NR-16, RR-141 VR-5 y VR-19 (de arriba hacia abajo).

En la literatura, se hallaron reportes de procesos de remoción de los colorantes estudiados por parte de otros microorganismos. Por ejemplo, podemos mencionar para el colorante VR-5, el trabajo de Moosvi *et al.* (2005), donde reportaron la capacidad de un consorcio bacteriano de decolorar hasta un 94% de 100 ppm iniciales del colorante después de 37h de cultivo, utilizando 1g/L de glucosa como fuente de carbono. La mayor eficiencia de remoción se llevó a cabo en condiciones anaerobias y la temperatura óptima fue a los 30°C y un pH de 7 a 8,5. Mientras que, Sayahi *et al.*, (2016) se reportaron un 12% de remoción de 25ppm de VR-5 después de 24h de tratamiento con lacasas provenientes del hongo *Trametes Trogii*, al cual, para alcanzar un porcentaje de remoción mayor en menos tiempo, fue necesario adicionar un sustrato especial como el colorante

de antraquinona RBBR que suele encontrarse en los efluentes industriales y el 1-hidroxibenzotriazol (HBT). Tanto el 1-hidroxibenzotriazol (HBT) y la RBBR funcionan como mediadores redox que facilitan la degradación de colorantes por parte de las enzimas lacasas, y potencian la especificidad de dichas enzimas hacia los colorantes.

Por otra parte, para el colorante NR-16, podemos encontrar un trabajo donde reportaron la capacidad de *Pseudomonas aeruginosa* de lograr hasta un 87% de remoción de 50 ppm iniciales luego de 48h de cultivo (Mishra *et al.*, 2020). Por otro lado, en el trabajo realizado por Rosu *et al.*, (2018) se estudió la remoción del NR-16, utilizando un cultivo de *Pichia kudriavzevii* y 30g/L de glucosa como fuente de carbono. En dicho estudio se reportó un 100% de remoción en 24h de cultivo con una concentración inicial de colorante de 50ppm, mientras que al aumentar la concentración a 400ppm se obtuvo un 95% de remoción luego de 72h.

Para los demás colorantes utilizados, podemos mencionar el trabajo de Nascimento *et al.*, (2013) donde reportaron que *Candida rugosa* INCQS 71011 removió 100ppm del colorante RR-141 en un 75,60% luego de un tratamiento de 24h. Mientras que para AR-84, *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360 removió en un 86% dicho colorante en una concentración de 50ppm luego de 30h de cultivo (Govindwar *et al.*, 2014). Finalmente, un estudio reportó para la remoción del colorante VR-19 llevada a cabo por un consorcio de bacterias obteniendo un 97% de remoción después de 24h de cultivo a 30°C, un pH de 8,3 y una concentración inicial del colorante de 100ppm (Das *et al.*, 2017). En otro estudio realizado por Ruscasso *et al.* (2022), se obtuvieron resultados similares al presente trabajo. Se utilizaron un conjunto de levaduras antárticas para evaluar la remoción del colorante azo Negro Reactivo-5, teniendo como resultado que al cabo de 24h de cultivo se registraron porcentajes de remoción de 99,5% para la levadura *Candida sake* 41E, 93,6% para *Cystofilobasidium infirmominiatum* F13E y 93,5% para *Leucosporidium muscorum* F20A.

Estos resultados reportados pueden compararse con el desempeño de *L. muscorum* F20A obtenido en este ensayo realizado, al coincidir con el alto porcentaje de remoción alcanzado luego de las 20 horas de cultivo. Además, se destacan los beneficios de trabajar con esta cepa, ya que en el proceso no se encontró la necesidad de termostatar el cultivo ni trabajar en condiciones de anaerobiosis.

4.1.2 Ensayo de Cinética de remoción de los colorantes VR-5, NR-16 y una mezcla de ambos

4.1.2.1 Remoción VR-5

Se realizó la cinética de remoción del colorante VR-5 a fin de determinar el porcentaje de remoción alcanzado a cada tiempo de cultivo, y la concentración de biomasa correspondiente. También, se obtuvo la velocidad máxima de crecimiento de *L. muscorum* F20A en dichas condiciones.

Luego de 31h de cultivo se alcanzó alrededor de un 95% de remoción con biomasa final de 12,63 g/L, la velocidad máxima de crecimiento obtenida fue de $\mu = 0,14 \pm 0,02h^{-1}$. Aparte, el cultivo biótico presentó una velocidad de crecimiento de $\mu = 0,15 \pm 0,003h^{-1}$, lo que sugiere que el crecimiento de *L. muscorum* F20A no se vio afectado por la presencia del colorante VR-5 ya que no se encontró una diferencia significativa entre ambos valores (ver Figura 24).

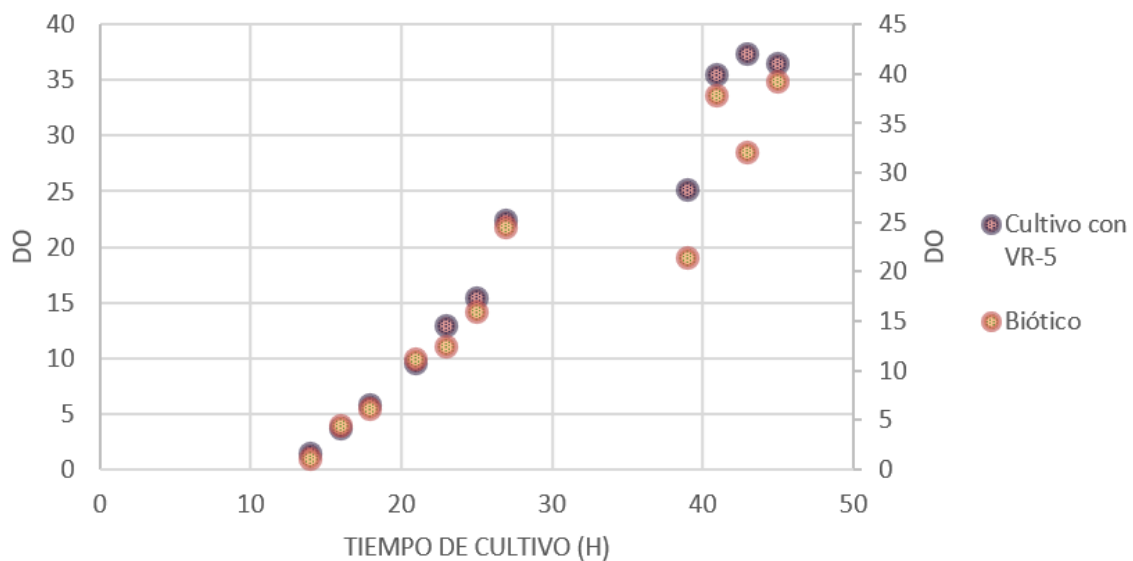


Figura 24: Gráfica de DO en función del tiempo del cultivo con agregado de VR-5 y el cultivo biótico.

A partir de la medida de DO y el cálculo del porcentaje de remoción en función del tiempo se construyó la curva de la Figura 25, donde se esquematizó como el porcentaje de remoción aumentó a medida que la levadura creció. Al igual que lo mencionado en la sección anterior, se observó que gran parte de la remoción ocurrió

durante la fase exponencial, pudiendo suponer que está ligada al metabolismo de *L. muscorum* F20A. Esto ya ha sido previamente reportado, cabe mencionar el trabajo de Ali, S. *et al.*, (2021) donde estudiaron la remoción del colorante Naranja Ácido 7 (NA-7) por un consorcio de levaduras conformado por *Meyerozyma caribbica*, *M. guilliermondii*, *Debaryomyces hansenii* y *Vanrija humicola*, observando que las fuentes de carbono proveyeron el poder reductor necesario para la rotura del enlace azo presente en los colorantes; ya que la adición de glucosa al medio de cultivo mejoró la eficacia de la degradación de NA-7 en un 94,18%. Resultados similares se vieron en el trabajo realizado por Guo, G. *et al.* (2019), donde encontraron un efecto positivo en la remoción del colorante ácido escarlata GR luego del aumento de la concentración de glucosa de 0-7g/L a un cultivo de *Galactomyces geotrichum*. Asimismo, los resultados reportados por Rania Al-Tohamy (2023) coinciden con lo mencionado, los autores reportaron que durante la remoción de colorantes azo suele ser necesario el agregado de fuentes de carbono como glucosa, fructosa, peptona, extracto de levadura y extracto de malta, o bien la remoción se ve potenciada por el agregado de estas. En este último estudio, se reportó que la máxima remoción del colorante NR-5 fue alcanzada utilizando glucosa de entre las fuentes de carbono mencionadas. También, se señala la importancia de los equivalentes reductores que se originan a partir del metabolismo de las diferentes fuentes de carbono, dichos equivalentes serán transferidos al colorante para llevar a cabo su reducción. Estudios anteriores reportaron resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo para concentraciones de colorantes dentro del rango 100-200 ppm y utilizando glucosa como fuente de carbono. Lucas *et al.* (2006), reportó un 100% de porcentaje de remoción del colorante NR-5 en una concentración de 200ppm iniciales en 24h, utilizando un cultivo batch de *Candida oleophila* en condiciones aerobias. Y, tal como se ha visto para *L. muscorum* F20A, la remoción llevada a cabo por *C. oleophila* fue durante la fase exponencial del crecimiento de dicho microorganismo.

Asimismo, se han reportado estudios en donde la incorporación de fuentes orgánicas de nitrógeno como peptona, extracto de carne, urea y extracto de levadura ayudan a regenerar a la coenzima NADH, la cual es clave como donador de electrones durante la reducción del enlace azo y la consecuente decoloración del medio (Saravanan *et al.*, 2022).

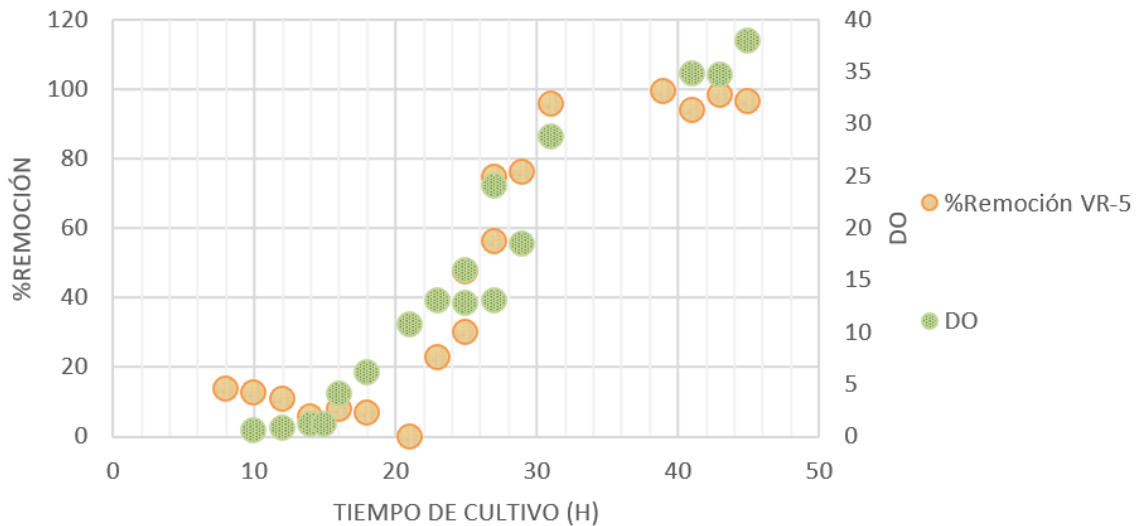


Figura 25: Curva de crecimiento *L. muscorum F20A* y porcentaje de decoloración del colorante VR-5.

Además, en el presente trabajo se realizó un barrido espectral (Figura 26a), donde se pudo visualizar la disminución del pico de absorbancia a 560nm de longitud de onda como consecuencia de la ruptura del grupo cromóforo, es decir, el enlace azo; dicho pico corresponde a la longitud máxima de absorción del colorante VR-5, (señalada en el gráfico con una flecha en la región visible). Por otro lado, entre las longitudes de onda comprendidas entre los 200-300nm, se observó la presencia de picos que se atribuyen a la presencia de benceno sustituido (Ruscasso *et al*, 2021), dichos picos no disminuyeron su intensidad. Por lo tanto, puede suponerse que no ocurrió una mineralización completa de la molécula del colorante VR-5. A modo comparativo, se observa el barrido espectral realizado para el cultivo biótico de la Figura 26a, donde los picos comprendidos entre los 200-300nm tienen menor intensidad que en el cultivo con agregado de VR-5.

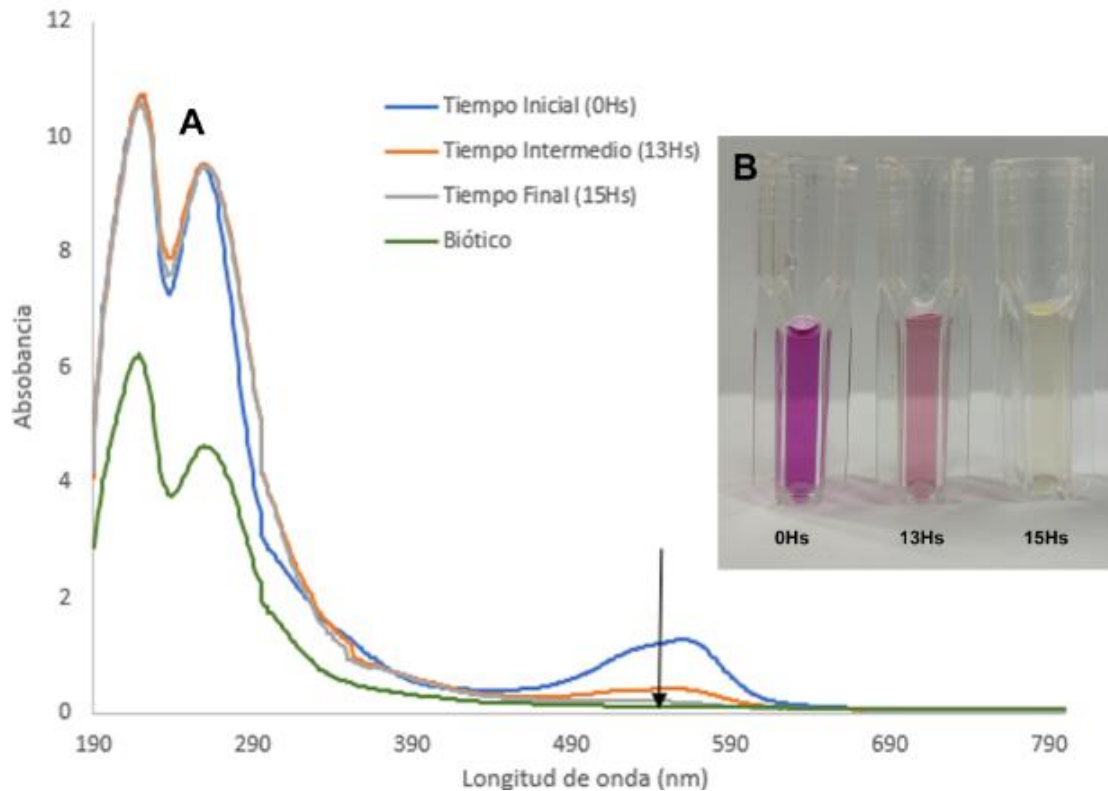


Figura 26: a. Barrido espectral de VR-5 tratado con *L. muscorum F20A* b. Fotografía de las muestras a diferentes tiempos de cultivo: tiempo inicial (0 horas de cultivo), intermedio (13 horas de cultivo), y final (15 horas de cultivo), de izquierda a derecha.

4.1.2.2 Remoción NR-16

Por otra parte, de la cinética de remoción del colorante NR-16 se registró un 99,66% de remoción a las 23h de cultivo, con una velocidad de crecimiento máxima de $\mu = 0,16 \text{ h}^{-1}$ y una biomasa final de 12,53g/L. En la Figura 27, apreciamos la curva de crecimiento de la levadura y el porcentaje de remoción a cada tiempo de cultivo y cómo esta estuvo ligada al crecimiento de la levadura, tal como se mencionó previamente. Al comparar las velocidades de crecimiento del cultivo con agregado del colorante y el cultivo biótico, se supone que el colorante NR-16, al igual que para el VR-5, no afectó al crecimiento de la levadura. El cultivo biótico presentó una velocidad de crecimiento de $\mu = 0,150 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$.

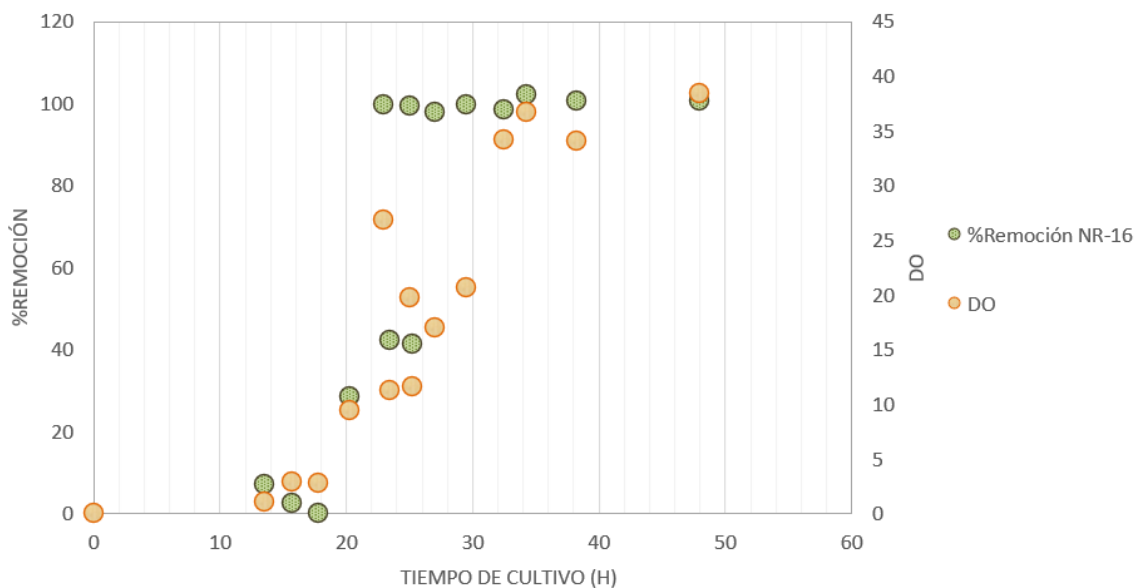


Figura 27: Curvas del crecimiento de *L. muscorum* F20A y porcentaje de remoción del colorante NR-16 en función del tiempo.

Por un lado, del barrido UV-Vis realizado, se pudo visualizar la disminución de la absorbancia en la longitud de onda máxima de absorción del colorante NR-16, es decir a 495nm (Figura 28a). La decoloración del medio de cultivo (Figura 28b) es consecuencia de la rotura del enlace azo, fenómeno que pudimos observar a través de la disminución de la absorbancia en el visible. Por otro lado, visualizamos un pico de absorbancia en la región de los 388nm que no se visualizó en el espectro del colorante VR-5, dicha absorbancia se corresponde a la presencia de anillos aromáticos unidos al grupo azo (Ruscasso *et al.*, 2021). La disminución en la intensidad de estos picos sugiere la reducción de la aromaticidad. A diferencia de los resultados presentados para el colorante VR-5, pudo verse una disminución en los picos correspondientes al rango entre los 200-300nm, lo cual sugiere la reducción de grupos benceno hasta un valor cercano al barrido espectral del cultivo biótico. En el estudio realizado por Rosu *et al.* 2018, se reportó que los picos detectados a 250nm no disminuyeron, lo cual sugería que la mineralización del colorante no fue completa. Sin embargo, en este trabajo puede verse dicha disminución por lo que puede suponerse una mineralización, en principio parcial, del colorante NR-16. Por otro lado, el trabajo realizado por Madhuri *et al.*, (2019) en donde utilizaron un cultivo de *Enterococcus faecalis*, alcanzando un 97,24% de porcentaje de remoción del NR-16 a las 3,5h a una concentración inicial de 50ppm, en condiciones estáticas a 37°C, detectaron la desaparición total del pico de absorbancia a 495nm y la aparición de un pico

a 302nm, que podría indicar la producción de aminas aromáticas producto de la biodegradación del colorante (Ong *et al.*, 2012).

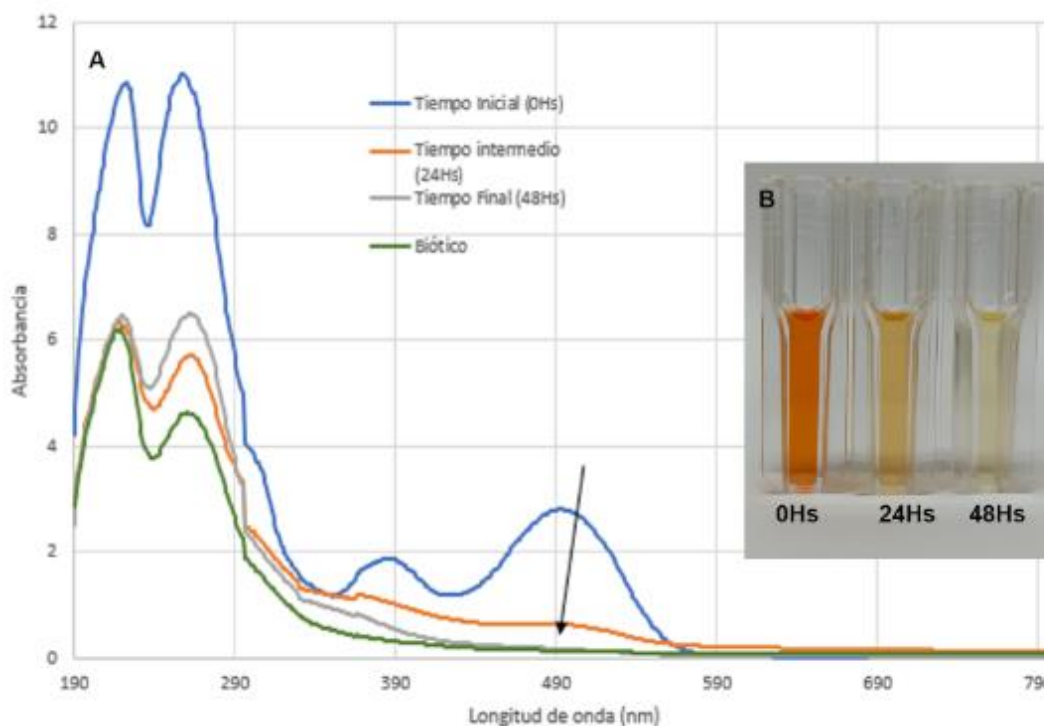


Figura 28: Barrido espectral de NR-16 tratado con *L. muscorum* F20A **b.** Fotografía de las muestras a diferentes tiempos de cultivo: tiempo inicial, intermedio y final, de izquierda a derecha.

4.1.2.3 Remoción de la mezcla de VR-5 y NR-16

Con el objetivo de recrear un entorno similar a un efluente textil, se puso a prueba el crecimiento de *L. muscorum* F20A en un cultivo con el agregado de una mezcla de los colorantes VR-5 y NR-16. Así, se obtuvo remoción simultánea de ambos colorantes por parte de la levadura, como se muestra en ambas gráficas del porcentaje de remoción en función del tiempo (Figura 29). Alcanzando valores de 96,27% y 96,48%, para los colorantes NR-16 y VR-5 respectivamente, a las 25,25h de cultivo y una biomasa final de 14,26 g/L. En la Figura 30, se notan las curvas de crecimiento de *L. muscorum* F20A con el agregado de la mezcla de NR-16 y VR-5 y la curva de crecimiento del cultivo biótico, la velocidad de crecimiento obtenida para el cultivo con agregado de la mezcla fue $\mu_{\text{máx}}=0,16 \text{ h}^{-1}$, valor similar al $\mu_{\text{máx}}$ obtenido para el cultivo biótico ($0,15 \pm 0,003 \text{ h}^{-1}$), por lo que se puede decir que la presencia simultánea de los colorantes no afectó el crecimiento de la levadura ni dificultó la decoloración del medio.

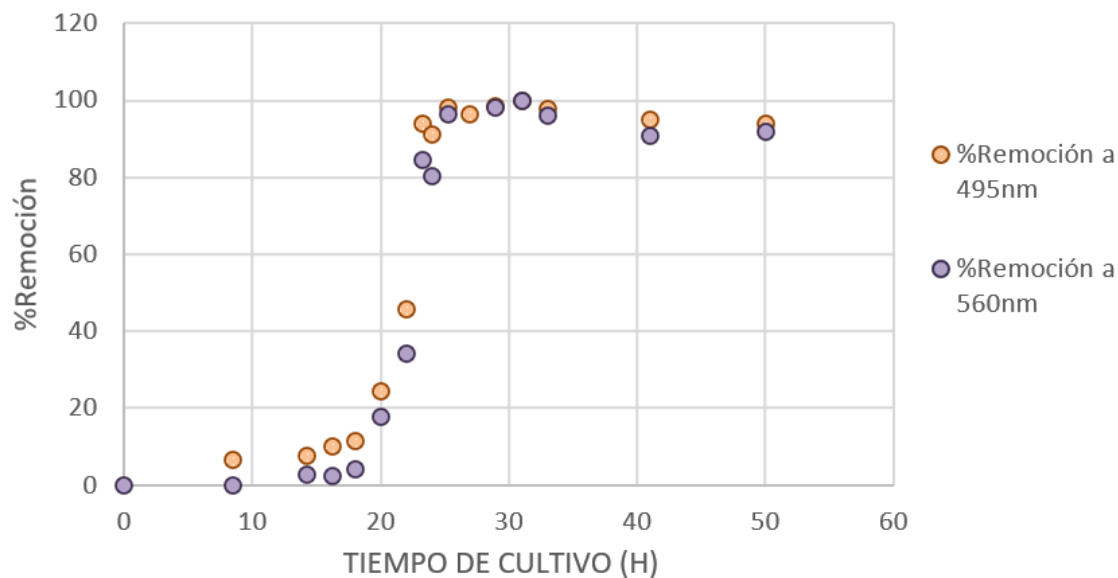


Figura 29: Porcentajes de remoción de los colorantes NR-16 y VR-5 en función del tiempo, calculada a partir de absorbancias medidas a 495nm y 560nm.

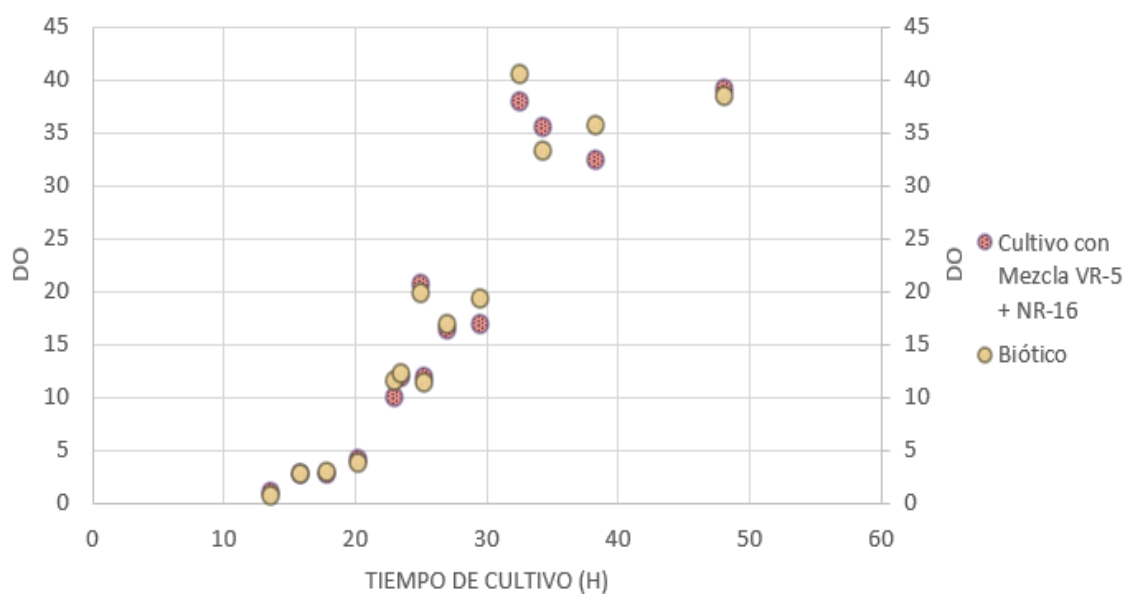


Figura 30: Curva de crecimiento de *L. muscorum* F20A en cultivo biótico y con el agregado de VR-5 y NR-16.

La Figura 31a muestra el espectro UV-Vis obtenido, en donde se ve la disminución en la absorbancia máxima de ambos colorantes, en 560nm para VR-5 y 495nm para NR-16, así como la disminución en la región de los 388nm. La decoloración progresiva del medio a través del tiempo puede observarse en la Figura 31b.

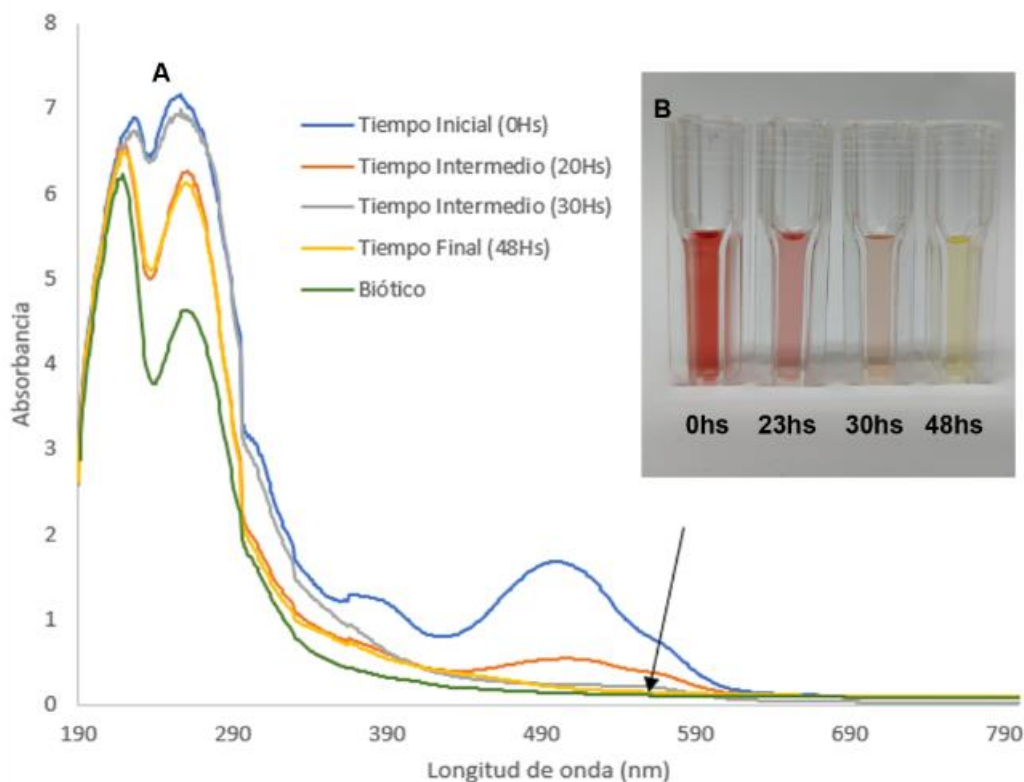


Figura 31: a. Barrido espectral de la mezcla de los colorantes VR-5 y NR-16 tratados con *L. muscorum* F20A b. Fotografía de las muestras a diferentes tiempos de cultivo: tiempo inicial, intermedios y final, de izquierda a derecha.

4.1.3 Remoción de NR-16 y VR-5 en condiciones salinas

Como se mencionó previamente, una característica de los efluentes textiles es su alta concentración de sales. Por lo tanto, se puso a prueba el crecimiento y la capacidad de remoción de colorantes por parte de la levadura *L. muscorum* F20A en condiciones salinas, agregando 10g/L de NaCl a los medios de cultivo. Los resultados obtenidos a partir de este experimento, se obtuvo un porcentaje de remoción del colorante NR-16 de 98,87% a las 23,25h, alcanzando una concentración de biomasa final de 12,14g/L. Mientras que para el colorante VR-5 se obtuvo una remoción total a las 23h de cultivo, una biomasa final de 13,71g/L. En las Figuras 32 y 33 puede visualizarse el crecimiento de la levadura en condiciones salinas y el porcentaje de remoción obtenido a lo largo del crecimiento.

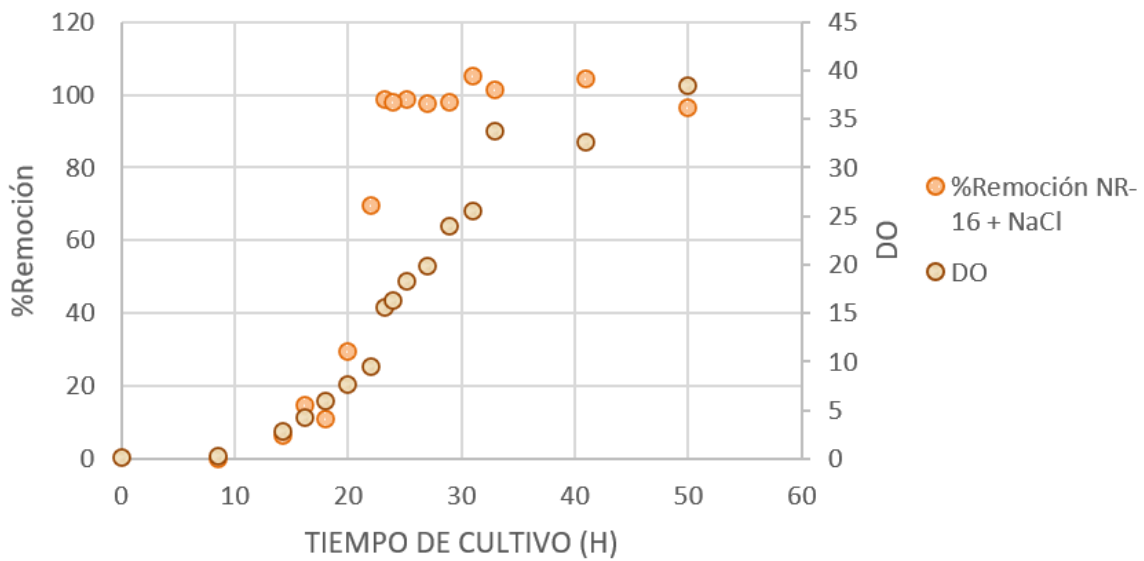


Figura 32: Curva de crecimiento de *L. muscorum* F20A y porcentaje de remoción de NR-16 en función del tiempo, con el agregado de 1g/L de NaCl.

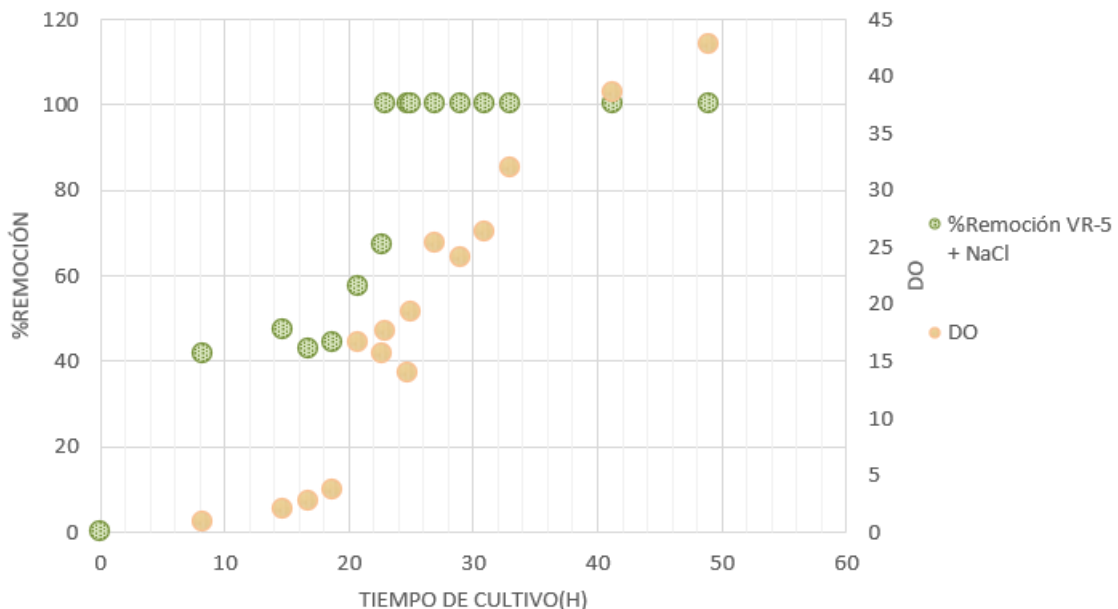


Figura 33: Curva de crecimiento de *L. muscorum* F20A y porcentaje de remoción de VR-5 en función del tiempo, con el agregado de 1g/L de NaCl.

Adicionalmente, al comparar el crecimiento de *L. muscorum* F20A en condiciones salinas o no salinas y con o sin colorantes, se pudo destacar que el crecimiento de la levadura no fue afectado con el agregado de NaCl o por el agregado simultáneo del colorante y de NaCl. Así, en la Figura 34, se representan las curvas de crecimiento de *L. muscorum* F20A con y sin el agregado de NaCl, donde las velocidades de crecimiento del cultivo Biótico + NaCl fue de $0,17 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ y de $0,16 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ para el cultivo Biótico sin NaCl. También se representan en el mismo gráfico, los cultivos de NR-16 + NaCl y

de VR-5 + NaCl, para los cuales las velocidades de crecimiento fueron de $\mu_{\text{máx}} = 0,14 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$ y de $\mu_{\text{máx}} = 0,16 \pm 0,01 \text{ h}^{-1}$ respectivamente.

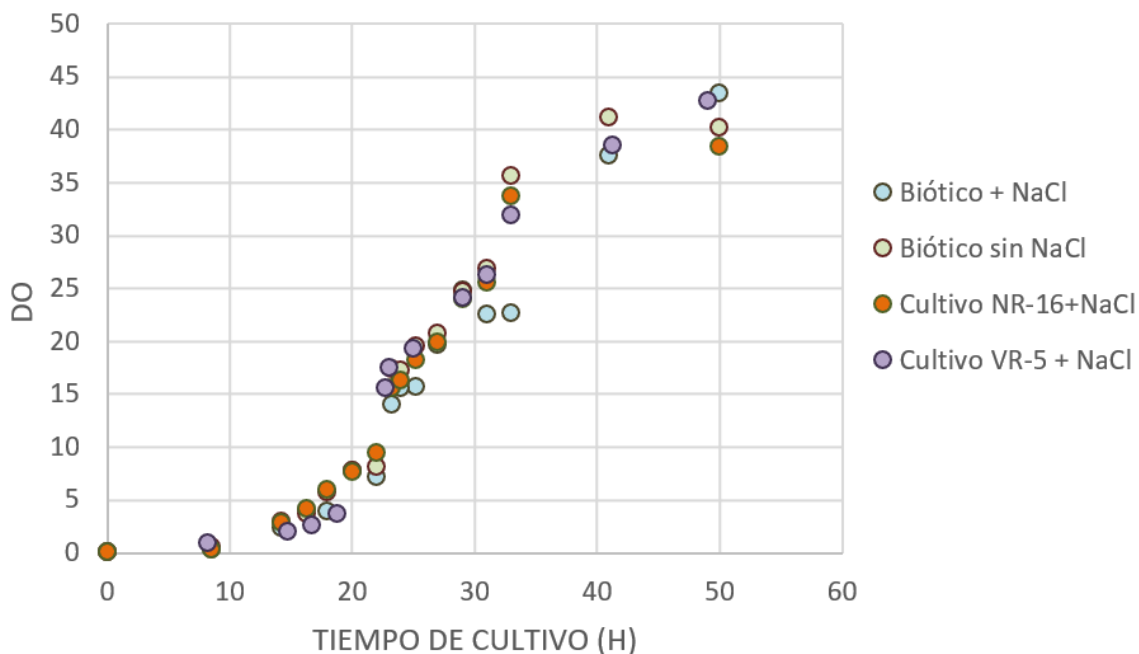


Figura 34: Curva de crecimiento de *L. muscorum* F20A en cultivo biótico con NaCl y sin NaCl, también se representa la curva de crecimiento de la levadura con el agregado de los colorantes NR-16 y VR-5, en condiciones salinas (10g/L de NaCl).

En un estudio realizado por Mishra *et al.* (2019), se reportaron resultados similares con un cultivo de *P. aeruginosa* tolerante al NaCl (6g/L), donde reportaron un 98,9% de remoción del colorante NR-16 en una concentración inicial de 50ppm. Otros estudios como el llevado a cabo por Kalia, S. *et al.* (2023), alcanzaron porcentajes menores a los obtenidos con *L. muscorum* F20A, alrededor de un 85,00% para el colorante Azul Reactivo 13 en concentraciones de 100ppm a 200ppm en 48h, para un cultivo de *Trichoderma reesei*. Igualmente, Jafari N., *et al.* (2013) reportó un 85,70% de remoción de 200ppm con el colorante azo NR-5 para un cultivo de *Candida palmioleophila* JKSA4 luego de 24h.

4.1.4 Remoción de NR-16, VR-5 y una mezcla de ambos usando Glicerol como fuente alternativa de carbono

Con el objetivo de analizar la utilización de fuentes alternativas de carbono y energía, se utilizó el glicerol como opción más económica frente al uso de glucosa. Los

resultados para el colorante NR-16 dieron un porcentaje máximo de remoción del 94,56% a las 29h de cultivo y una biomasa final de 6,87 g/L. A partir de la medida de DO se pudo calcular la velocidad máxima de crecimiento, la misma fue $\mu_{\text{máx}}=0,10 \text{ h}^{-1}$. Para el caso del colorante VR-5 el porcentaje máximo de remoción fue de 97,01% a las 48h de cultivo y una biomasa final de 6,92 g/L. Mientras que la velocidad máxima de crecimiento fue de $\mu=0,12\text{h}^{-1}$. En las Figuras 35, 36 y 37, se aprecia como la levadura puede crecer utilizando glicerol como fuente de carbono y a su vez llevar a cabo una decoloración efectiva de medios suplementados con los colorantes estudiados.

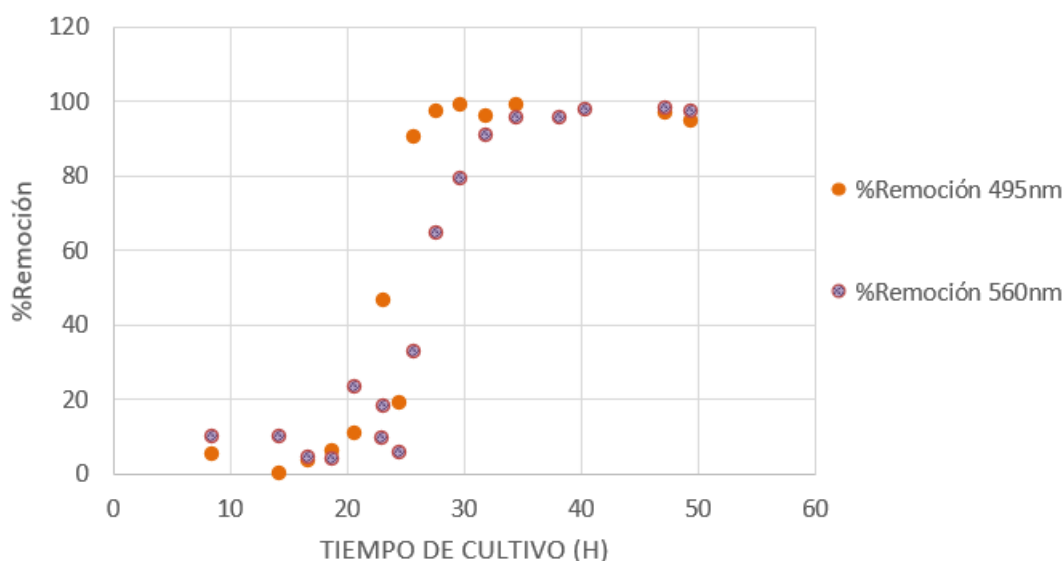


Figura 35: Porcentaje de remoción de los colorantes individuales, NR-16 y VR-5, en función del tiempo, utilizando glicerol como fuente de carbono.

Luego, se estudió la mezcla de los colorantes VR-5 y NR-16 utilizando al glicerol como fuente de carbono y energía, en este caso se obtuvo un porcentaje máximo de remoción a 560nm de 93,86%, mientras que a 495nm fue de un 94,82% a las 48h de cultivo (Figura 36). Se generó una biomasa final de 7,79 g/L y la velocidad máxima de crecimiento fue de $\mu_{\text{máx}}=0,11 \text{ h}^{-1}$.

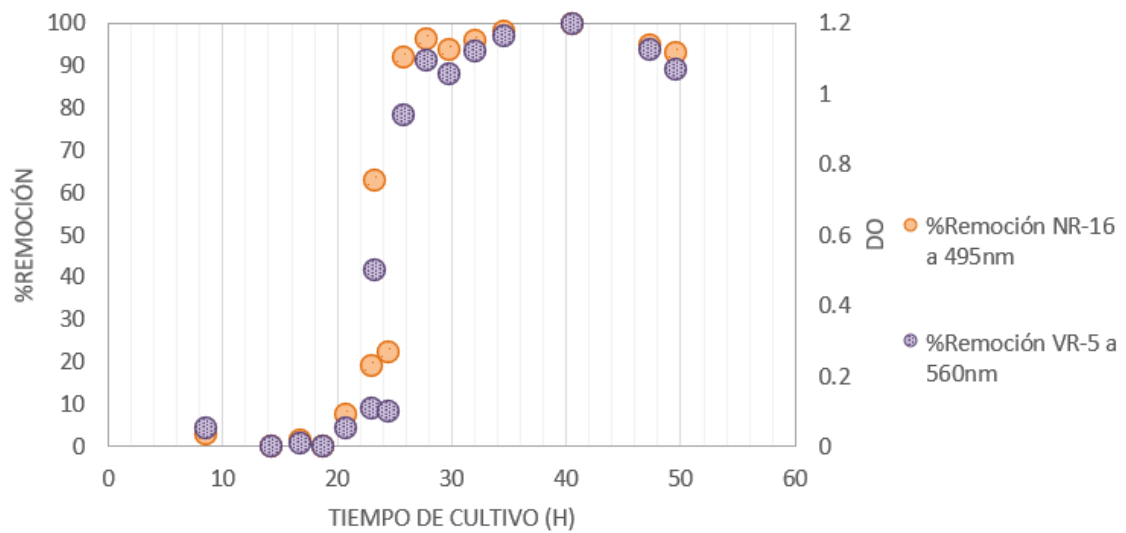


Figura 36: Curva de crecimiento de *L. muscorum* F20A y porcentaje de remoción de la mezcla de VR-5 y NR-16 en función del tiempo, utilizando glicerol como fuente de carbono.

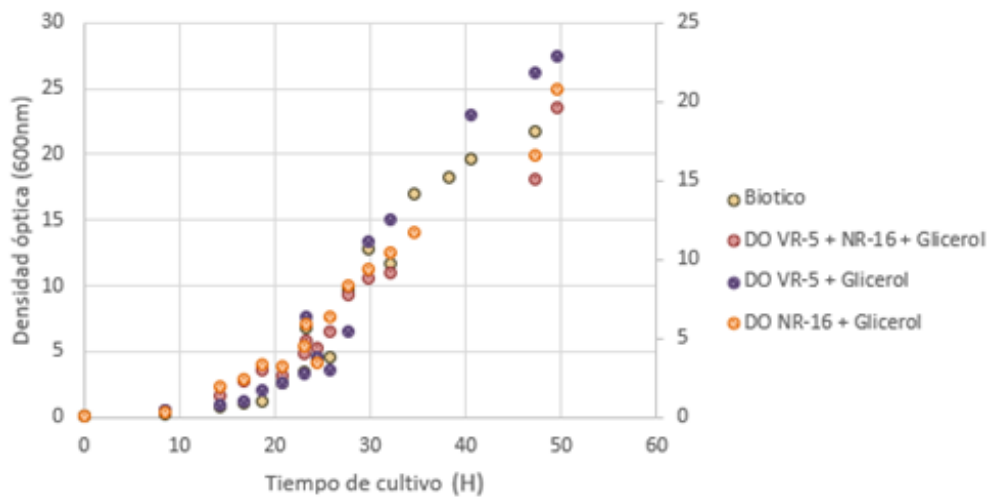


Figura 37: Curva de crecimiento de *L. muscorum* F20A en cultivo biótico, cultivo con el agregado de VR-5 y NR-16 y una mezcla de ambos colorantes, utilizando glicerol como fuente de carbono.

Finalmente, en la Figura 38, se visualiza la decoloración de NR-16, VR-5 y la mezcla de ambos colorantes, luego de 24h y 48h de cultivo.

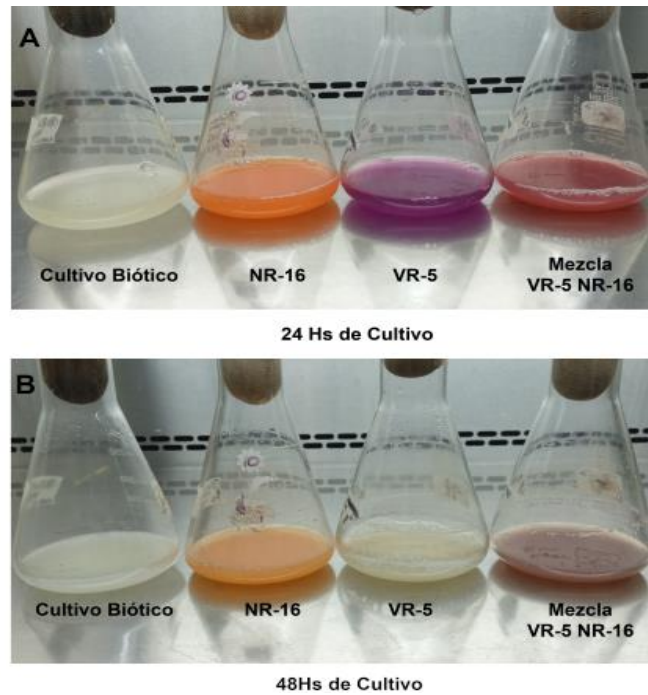


Figura 38: Foto comparativa de los cultivos utilizando glicerol como fuente de carbono a las 24 h (a) y 48 h (b) de cultivo.

4.1.5 Crecimiento de *L. muscorum* F20A utilizando Almidón como fuente alternativa de carbono

Como ya se ha mencionado, el almidón es un componente habitual de los efluentes textiles ampliamente utilizado en las etapas preparativas de las telas previamente al teñido. Esto supone una alternativa frente al uso de glucosa como fuente de carbono ya que al utilizar el mismo almidón proveniente de los efluentes no es necesario el agregado de una fuente de carbono adicional, siendo esta alternativa una interesante ventaja económica.

Al comparar los cultivos de *L. muscorum* F20A, utilizando diferentes fuentes de carbono: glucosa, almidón y glicerol encontramos que la levadura no puede crecer a base de almidón (ver Figura 39). Estos resultados se deben a que *L. muscorum* F20A no tiene la capacidad de degradar el almidón, ya que carece de actividad amilolítica (Martínez *et al.*, 2016).

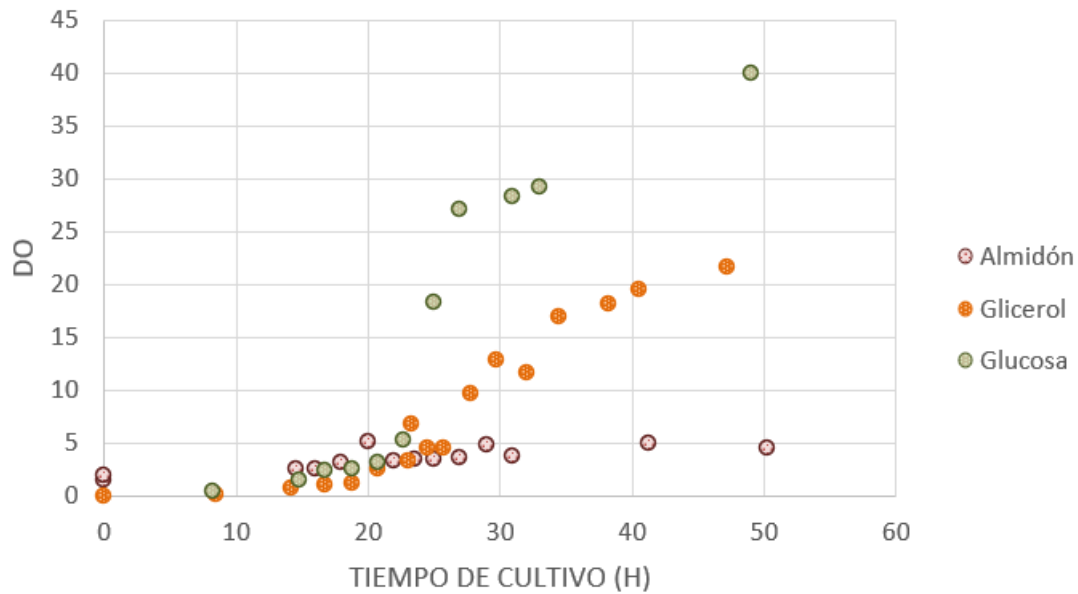


Figura 39: Curvas de crecimiento de *L. muscorum* F20A con diferentes fuentes de carbono.

De esta manera, con los resultados obtenidos se podría decir que, si bien el almidón no podría utilizarse en un cultivo de la levadura de estudio, ya que, esta carece de las enzimas necesarias para el metabolismo de dicha fuente de carbono, el uso de glicerol como fuente alternativa arrojó buenos resultados. Sin embargo, se pudo ver una diferencia entre las velocidades de crecimiento comparando los cultivos suplementados con glucosa y con glicerol, siendo esta última velocidad menor. En resumen, se han alcanzado porcentajes altos de remoción de los colorantes utilizando glicerol, pero a tiempos de cultivo mayores que aquellos cultivos crecidos con glucosa como fuente de carbono y energía.

4.1.5 Cinética de remoción de muestra de efluente real

Los efluentes textiles, son una mezcla compleja de compuestos químicos orgánicos e inorgánicos. La importancia de este ensayo radica en la oportunidad de evaluar el crecimiento de la levadura de estudio y la remoción generada por la misma frente a un efluente textil real de composición compleja.

L. muscorum F20A logró crecer a una velocidad máxima de $\mu_{\text{máx}} = 0,13 \text{ h}^{-1}$ y se alcanzó un 85,92% de remoción a las 24h de tratamiento, generando una biomasa final

de 12,62 g/L. En la Figura 40, contemplamos el crecimiento de la levadura durante la remoción del efluente real.

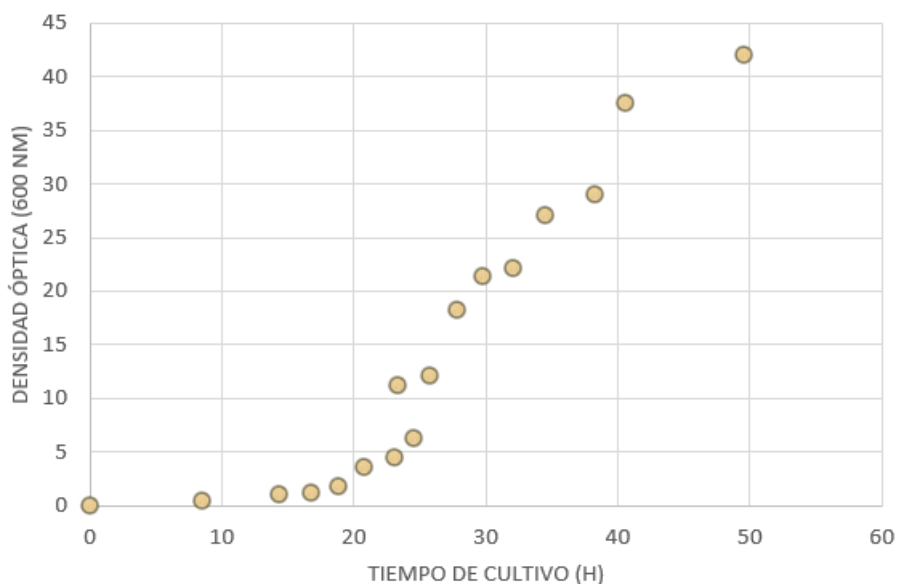


Figura 40: Curva de crecimiento de *L. muscorum* F20A en el efluente real.

En el barrido espectral, puede observarse el descenso de los picos de absorbancia al cabo de las 48h, correspondiente a la degradación de los grupos cromóforos de los colorantes presentes en la muestra de efluente textil (Figura 41a). También, puede verse un aumento en la absorbancia en el rango de los 260nm a las 24h de cultivo, esto se corresponde con la producción de aminas aromáticas; luego, a las 48h se pudo observar una disminución en la intensidad de dicho pico de absorbancia, probablemente relacionado con la degradación de las aminas generadas (Ruscasso *et al.*, 2021). El proceso de remoción llevado a cabo por *L. muscorum* F20A se ve reflejado en las Figuras 41b donde se visualiza la decoloración del medio de cultivo.

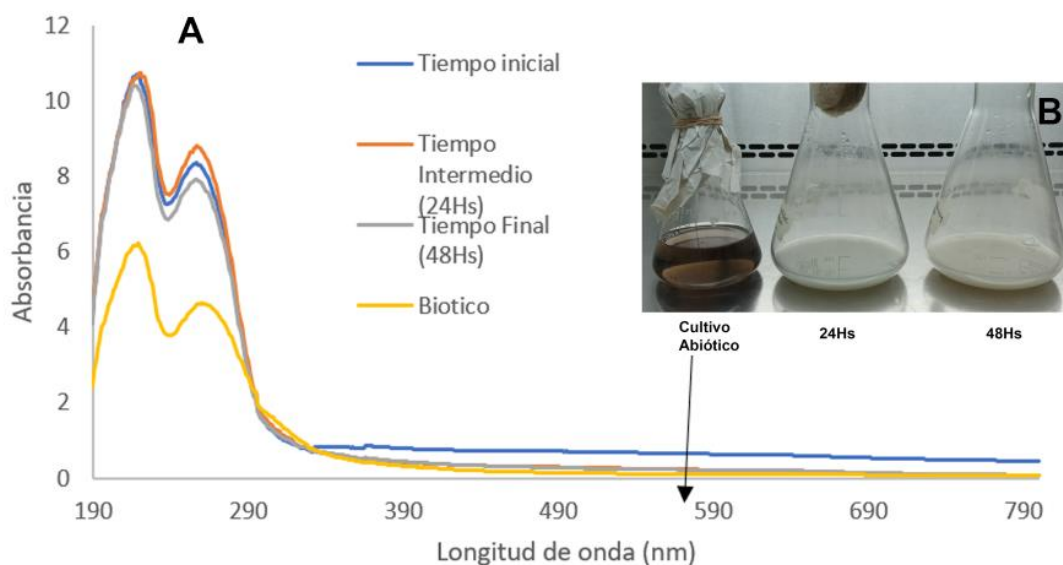


Figura 41: a. Barrido espectral de la mezcla de la muestra de efluente real tratada con *L. muscorum* F20A b. Fotografía de las muestras a diferentes tiempos de cultivo.

En estudios anteriores, se obtuvieron resultados similares para mezclas de colorantes a modo de simulación de efluentes textiles. Ali, N *et al.* (2009), llevaron a cabo la simulación de un efluente utilizando diversas sales y 20ppm de colorante Rojo Acido 151 y Naranja 2, los cuales arrojaron porcentajes de remoción del 98% y 84% respectivamente. Estos efluentes simulados fueron tratados durante 24h con un cultivo de *A. niger*. Por otro lado, en el trabajo de Anastasi, A., *et al.* (2011), reportaron hasta un 96% de remoción de efluentes textiles simulados, donde utilizaron sales y colorantes para simular la composición de aguas residuales del teñido de lana, cuero y algodón; se utilizó un cultivo del hongo *Bjerkandera adusta* durante 7 días.

Al comparar el desempeño de *L. muscorum* F20A con trabajos que utilizaron con la misma concentración inicial de colorante, se encontraron tiempos de cultivo más prolongados. Es así el caso del trabajo de Salem, S. S. *et al.* (2019), donde reportaron un 98,62% y un 92,42% de remoción para los colorantes Amarillo Reactivo y Rojo Reactivo respectivamente, luego de ser tratados durante 7 días con un cultivo de *Aspergillus niger*. Cabe mencionar la ventaja que representa trabajar con microorganismos que lleven a cabo una remoción de los colorantes en fase exponencial como lo es *L. muscorum* F20A ya que se acortan los tiempos de cultivo con respecto al uso de hongos filamentosos ya que

estos últimos realizan el proceso en fase estacionaria (Kapoor *et al.*, 2021), esto puede verse en los trabajos realizados por Wong Y. *et al.*, (1999) y Porri, A. *et al.*, (2011). Otros estudios, presentaron resultados cercanos a los obtenidos con *L. muscorum* F20A, pero utilizando menores concentraciones de colorante, lo que posiciona a la cepa utilizada en términos favorables de rendimiento de operación. El trabajo de Al-Tohamy *et al.* (2020), mostró una remoción mayor al 93% entre las 12-21h de cultivo de NR-5 con una concentración inicial de 50 ppm. Se utilizó un cultivo de *Sterigmatomyces halophilus* SSA-1575 y se propuso que la remoción se llevó a cabo vía adsorción o la combinación de biodegradación y adsorción. En adición, se encontró una correlación negativa entre la agitación del cultivo y la remoción de los colorantes, probablemente debido a la competencia generada entre el O₂ y de la enzima azoreductasa. Ésta última correlación no se estudió durante las cinéticas realizadas con *L. muscorum* F20A, sin embargo, se obtuvieron buenos resultados con la agitación del cultivo utilizada. Por otro lado, Deivasigamani *et al.*, (2013), reportaron para un cultivo de *Candida krusei* una remoción total del colorante Violeta Básico 3 en 24h. La concentración utilizada fue de solo 10ppm y se utilizó bagazo de caña de azúcar como única fuente de nutrientes.

4.1.2 Escalado de la cinética de remoción en biorreactor tipo tanque agitado

A partir de la experiencia de escalado de remoción de los colorantes en Erlenmeyer a un biorreactor tipo tanque agitado, se pudieron determinar diferentes parámetros cinéticos y estequiométricos de la levadura estudiada, tales como el $\mu_{\text{máx}}$ y el tiempo de duplicación (g) de acuerdo con la ecuación 13:

$$\text{tiempo de duplicación} = \frac{\text{Ln}(2)}{\mu_{\text{máx}}}$$

Ecuación 13: Fórmula utilizada para el cálculo del tiempo de duplicación. (Prescott, LM, 2002)

Conjuntamente, se pudo calcular la tasa volumétrica de consumo de oxígeno (r_{O_2}), de generación de dióxido de carbono (r_{CO_2}) y, a partir del área bajo la curva construida a partir de la tasa de consumo de O₂ y producción de CO₂ en función del tiempo los mmoles de oxígeno totales consumidos durante el proceso y los mmoles de CO₂

producidos. Así, se determinó el rendimiento de biomasa ($Y_{X/S}$) y el rendimiento de producción de dióxido de carbono ($Y_{CO_2/S}$), haciendo uso de las ecuaciones 14 y 15:

$$Y_{x/s} = \frac{dX}{dS} = \frac{X_i - X_f}{S_f - S_i}$$

Ecuación 14: Fórmula utilizada para el cálculo del rendimiento de biomasa formada (X), respecto al sustrato consumido (S), siendo X_i y S_i las condiciones iniciales y X_f y S_f las finales (Pirt, S. J., 1975).

$$Y_{CO_2/S} = \frac{\text{moles de } CO_2 \text{ producidos}}{S_f - S_i}$$

Ecuación 15: Fórmula utilizada para el cálculo del rendimiento de producción de CO_2 (Mignone, C. et al., 1994).

A continuación, en la Figura 42, puede visualizarse el crecimiento de *L. muscorum* F20A en el biorreactor tipo tanque agitado, a partir de la cual se determinó un $\mu_{\text{máx}} = 0,12 \text{ h}^{-1}$ y un tiempo de duplicación de 5,78 h y de manera análoga a las cinéticas realizadas a escala de Erlenmeyer, se pudo detectar un aumento en el porcentaje de remoción para ambos colorantes a medida que *L. muscorum* F20A ingresaba a la fase exponencial de su crecimiento.

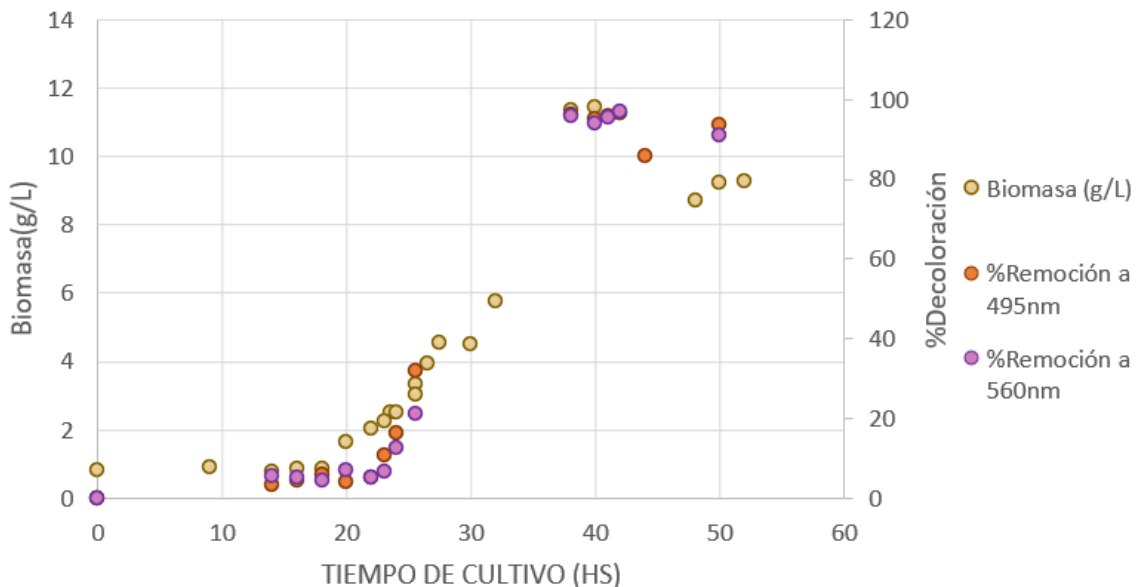


Figura 42: Curva de crecimiento de *L. muscorum* F20A y porcentaje de remoción para los colorantes VR-5 y NR-16.

Los porcentajes máximos de remoción, a las 38h de cultivo, fueron un 95,82% y un 96,32% para VR-5 y NR-16 respectivamente, con una biomasa final de 12,34g/L. En la Figura 43, se puede ver la progresiva decoloración del medio de cultivo, desde el tiempo inicial hasta alcanzar el porcentaje de decoloración máximo luego de 38h. También en la Figura 44, puede verse el barrido espectral de muestras tomadas del biorreactor correspondientes a los tiempos inicial, intermedio y final. En dicho barrido, se registra la desaparición de los colorantes al disminuir el pico entre las longitudes de onda a 495-560nm y puede verse la presencia de picos entre los 200-300nm correspondiente a la formación de aminas aromáticas y grupos benceno sustituidos como producto de la degradación de los colorantes, pero hacia el tiempo final puede notarse una disminución.

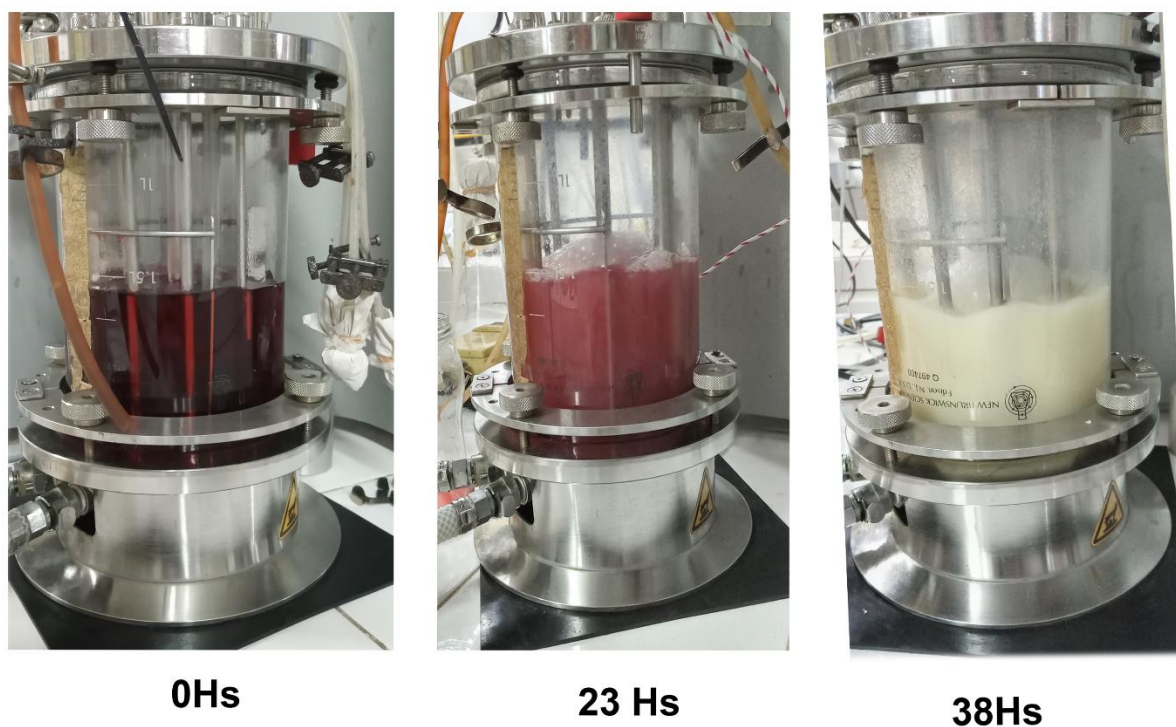


Figura 43: Fotografía del biorreactor utilizado en la experiencia de remoción de la mezcla de colorantes NR-16 y VR-5.

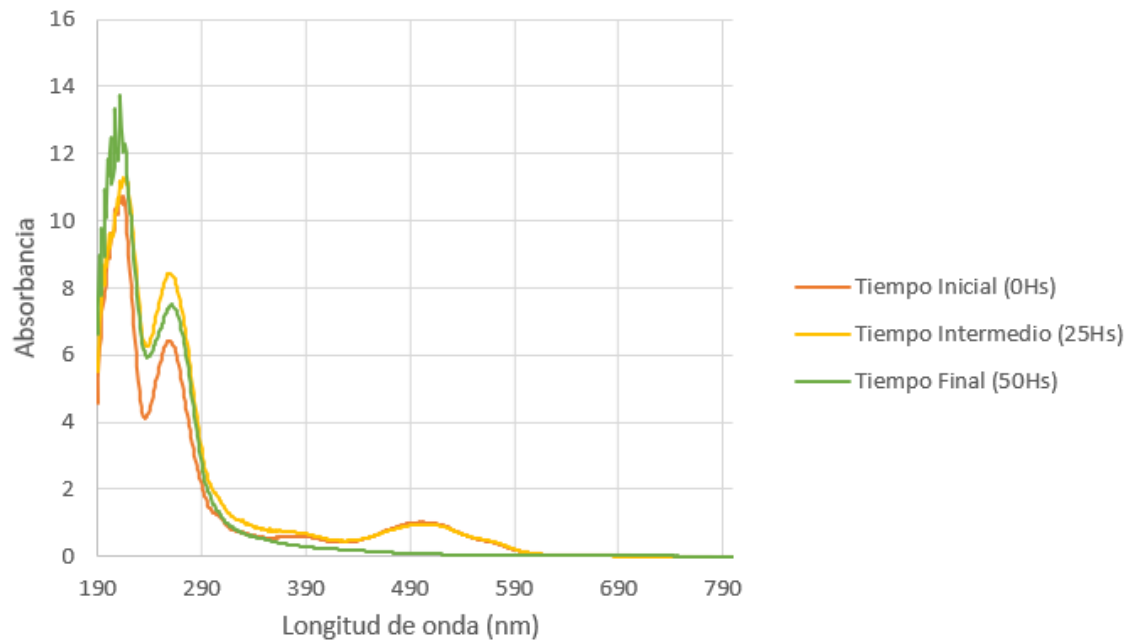


Figura 44: Barrido espectral de la mezcla de los colorantes NR-16 y VR-5 tratada con *L. muscorum* F20A.

Como se mencionó anteriormente, fue posible determinar:

$$Y_{X/S} = 0,33 \frac{\text{Cmol } x}{\text{Cmol } S}$$

$$Y_{\text{CO}_2/S} = 0,15 \frac{\text{mol } \text{CO}_2}{\text{Cmol } S}$$

De esta manera, a partir de estos datos determinamos si existió la formación de producto en el proceso de remoción de la mezcla de colorantes utilizando el balance de carbono (ecuación 16), donde $Y_{P/S}$ representa el rendimiento de la formación de producto:

$$1 = Y_{x/s} + Y_{\text{co}_2/s} + Y_{p/s}$$

Ecuación 16: Balance de carbono de los compuestos involucrados en la cinética estudiada (Mignone, C. *et al.*, 1994).

Teniendo en cuenta este balance, se han formado productos ya que la suma de los valores de $Y_{X/S}$ y de $Y_{\text{CO}_2/S}$, resulta ser menor a la unidad. Por lo tanto, el rendimiento de la formación de producto resultó ser de $Y_{P/S} = 0,52 \frac{\text{Cmol } P}{\text{Cmol } S}$.

Además, es posible determinar el grado de reducción del producto (γ), que se define como el número de electrones disponibles que se transfieren de un compuesto reducido, por cada 1 gr de átomo de carbono de dicho compuesto (Doran, PM, 1995). Para conocer el grado de reducción del producto formado se plantea el siguiente balance de γ :

$$\gamma_{SUSTRATO} - 4 \cdot b = \gamma_{PRODUCTO} \cdot Y_{P/S} + \gamma_{BIOMASA} \cdot Y_{X/S}$$

Ecuación 17: Balance del grado de reducción (γ) del producto formado durante el proceso de remoción (Doran, PM, 1995).

Siendo b el coeficiente del oxígeno en la reacción de combustión del producto, y usando como estado de referencia, NH_3 , CO_2 y H_2O , para los grados de reducción de la biomasa y el sustrato. Por lo tanto, se obtiene que el $\gamma_{BIOMASA}$ es igual a 4,2 y $\gamma_{SUSTRATO}$, es decir, glucosa, es igual a 4. De esta manera, despejamos el γ_P , en la siguiente expresión:

$$\gamma_{PRODUCTO} = \frac{\left(4 - \frac{Y_X}{S} \cdot 4,2 \cdot b\right)}{\frac{Y_P}{S}}$$

Ecuación 18: Ecuación utilizada para la determinación del grado de reducción del producto generado durante el proceso de decoloración.

Finalmente, resultó ser $\gamma_{PRODUCTO} = 3,84$. De acuerdo con este valor, el producto obtenido podría ser un ácido orgánico, como el ácido glucónico $\gamma = 3,67$, el ácido succínico $\gamma = 3,50$ o al ácido acético o ácido láctico ambos con $\gamma = 4$ (Atkinson, B. *et al.*, 1982). De esta manera, estos resultados coinciden con la suposición de que los colorantes tratados no fueron completamente mineralizados por parte de *L. muscorum* F20A, tal como se observó en los barridos espectrales realizados, donde se pudo visualizar la presencia de picos correspondientes a moléculas orgánicas complejas en el UV.

Estudios similares en biorreactor, como el de Laraib, Q., *et al.*, (2020) obtuvieron los siguientes resultados con el hongo *Aspergillus terreus* QMS-1. Dicha cepa del hongo fue inmovilizada en *Luffa cylindrica* (esponja vegetal) y mostró una remoción del 97% de 100ppm del colorante Rojo Congo al cabo de 12h de cultivo en biorreactor tipo tanque agitado, y una remoción total luego de 48h. Como medio de cultivo se utilizó un efluente simulado, diferentes sales y ácido acético. En otro estudio realizado por Sari *et al.* (2015),

se reportaron resultados de células inmovilizadas, en este caso de *T. versicolor* U97. Se logró decolorar 100ppm del colorante VR-19 en un 82%, en 72h de cultivo en un biorreactor de 4L de volumen útil. Sin embargo, reportaron dificultades en la aireación como resultado del crecimiento de micelios y concluyeron que se necesitaba un biorreactor de al menos 24m³ de volumen para alcanzar un 80% de decoloración.

En el estudio realizado por Ruscasso *et al.* (2021), se estudió la decoloración del colorante NR-16 por la levadura *C. sake* 41E en biorreactor tipo tanque agitado y se obtuvo un porcentaje de remoción del 94,3% luego de 48h. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en el presente trabajo y utilizando la misma concentración de colorante inicial (100ppm). En otro estudio realizado por Yang, Q., *et al.* (2009), se utilizó un efluente simulado para el cual se reportó un porcentaje de 50% a 70% de remoción de 30 ppm del colorante NR-5, luego de 12h de ser tratados con un consorcio de hongos y bacterias (análisis de biología molecular determinaron que un 70% de los microorganismos que conformaban el consorcio eran del género *Candida*). Si bien este estudio presentó una remoción considerable a las 12h, la concentración de colorante fue menor que la utilizada con *L. muscorum* F20A.

4.2 Resultados de los ensayos de fitotoxicidad utilizando semillas de *L. sativa* L

Con el objetivo de evaluar la toxicidad de los metabolitos involucrados en la degradación de la mezcla de los colorantes VR-5 y NR-16, se llevó a cabo el bioensayo de fitotoxicidad utilizando semillas de *L. sativa* L y muestras de medio de cultivo representativas de los tiempos inicial, intermedio y final. Siendo éstas a las 0 h, 27 h y 38 h, respectivamente.

Luego de la observación de las placas de Petri, se pudo ver que todas aquellas que corresponden a las placas control negativo de toxicidad tuvieron más del 90% de germinación, las plántulas presentaron tallo blanco, radícula blanca con vellosidades y cotiledones verdes como puede verse en la Figura 45.



Figura 45: Fotografía de placa de Petri conteniendo brotes de *L. sativa* L de la muestra control.

A continuación, se detallarán las observaciones de los germinados de *L. sativa* L crecidos con el agregado de muestras los diferentes tiempos de cultivo y las diferentes diluciones aplicadas a dichas muestras:

- Para las placas correspondientes al tiempo inicial con un 10% de dilución, se observó disminución de vellosidades en la radícula y oscurecimiento de éstas. También, hubo disminución en el largo del tallo y germinación retrasada con respecto a las muestras control. Sin embargo, se observó el desarrollo de cotiledones teniendo éstos una coloración verde (Figura 46a).
- En la dilución del 25%, se notaron las radículas amarronadas y cotiledones pálidos, algunas sin vellosidades, mientras que algunos brotes presentaron disminución considerable del largo del tallo y germinación significativamente retrasada con respecto al blanco (Figura 46b).
- Al examinar la dilución al 50% correspondiente al tiempo inicial, se observaron radículas amarronadas, sin formación de vellosidades y su longitud considerablemente disminuida con respecto al control. Se registró una disminución de la germinación y color en los cotiledones, algunos sin desarrollo de éstos, así como el largo de tallo fue significativamente menor al largo del tallo de las muestras control (Figura 46c). En esta dilución, se

registró una germinación menor al 90%. Para las placas conteniendo muestras de cultivo al 100%, se registró ausencia total de germinación.



Figura 46: Fotografía comparativa de los brotes correspondientes a la muestra control y de la muestra de tiempo inicial para las diluciones de **a.** 10%, **b.** 25%, **c.** 50%.

- De las placas con el agregado del sobrenadante del proceso de remoción de la mezcla a un tiempo intermedio, se pudo observar, para una dilución de un 10% de la misma, un desarrollo de tallo y radícula similar al blanco. Sin embargo, se notó una disminución en las vellosidades de las radículas (Figura 47a).
- En el caso de la dilución al 25% hubo un retraso de la germinación con respecto al blanco, disminución del largo del tallo y radícula y éstas últimas presentaron menos vellosidades que en la muestra blanco (Figura 47b).
- Mientras que para la dilución al 50%, se observó una disminución considerable del largo de los tallos y radícula al ser comparados con la muestra control o blanco, las radículas presentaban una coloración marrón y hubo una disminución en el desarrollo de los cotiledones y aquellos que

sí se desarrollaron se encontraban una coloración pálida al ser comparados con la muestra blanco (Figura 47c). En todas las diluciones correspondientes al tiempo intermedio hubo un porcentaje de germinación menor al 90%.

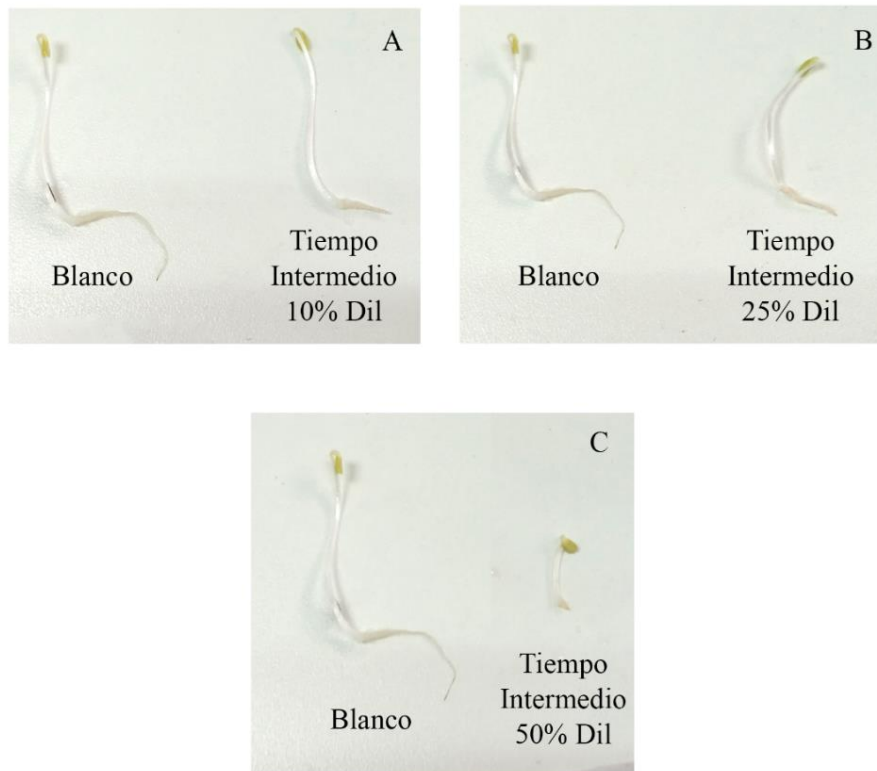


Figura 47: Fotografía comparativa de los brotes correspondientes a la muestra control y de la muestra de tiempo intermedio para las diluciones de **a.** 10%, **b.** 25%, **c.** 50%.

- Para las placas analizadas del tiempo final, se detectó en todas las diluciones una germinación menor al 90%. En principio, para la dilución al 10% el largo de los tallos y desarrollo de cotiledones fue similar a los del blanco, pero se apreció una disminución en las vellosidades de las radículas (Figura 48a).
- Para la dilución al 25%, el largo de los tallos y radículas resultó ser similar a la muestra control, también se observó disminución en las vellosidades, así también como menor coloración y desarrollo de cotiledones (Figura 48b). No obstante, hubo mayor desarrollo comparado con las demás diluciones al 25% de otros tiempos.

- Por último, para la dilución al 50% se registró una disminución casi total del largo de los tallos, ausencia de cotiledones y en la mayoría de las plántulas se observó una germinación retrasada respecto de la muestra control (Figura 48c).

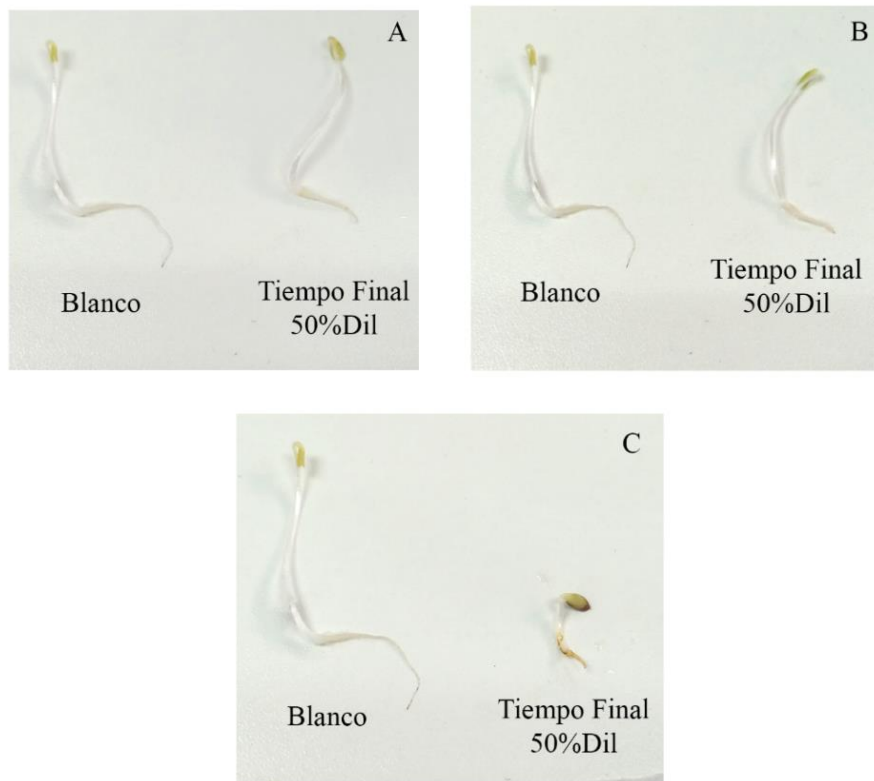


Figura 48: Fotografía comparativa de los brotes correspondientes a la muestra control y de la muestra de tiempo inicial para las diluciones de **a.** 10%, **b.** 25%, **c.** 50%.

Finalmente, cabe mencionar que en todos los tres tiempos de cultivo todas las diluciones al 100% de concentración presentaron ausencia de germinación, esto se observa en las Figuras 49d, 50d y 51d.

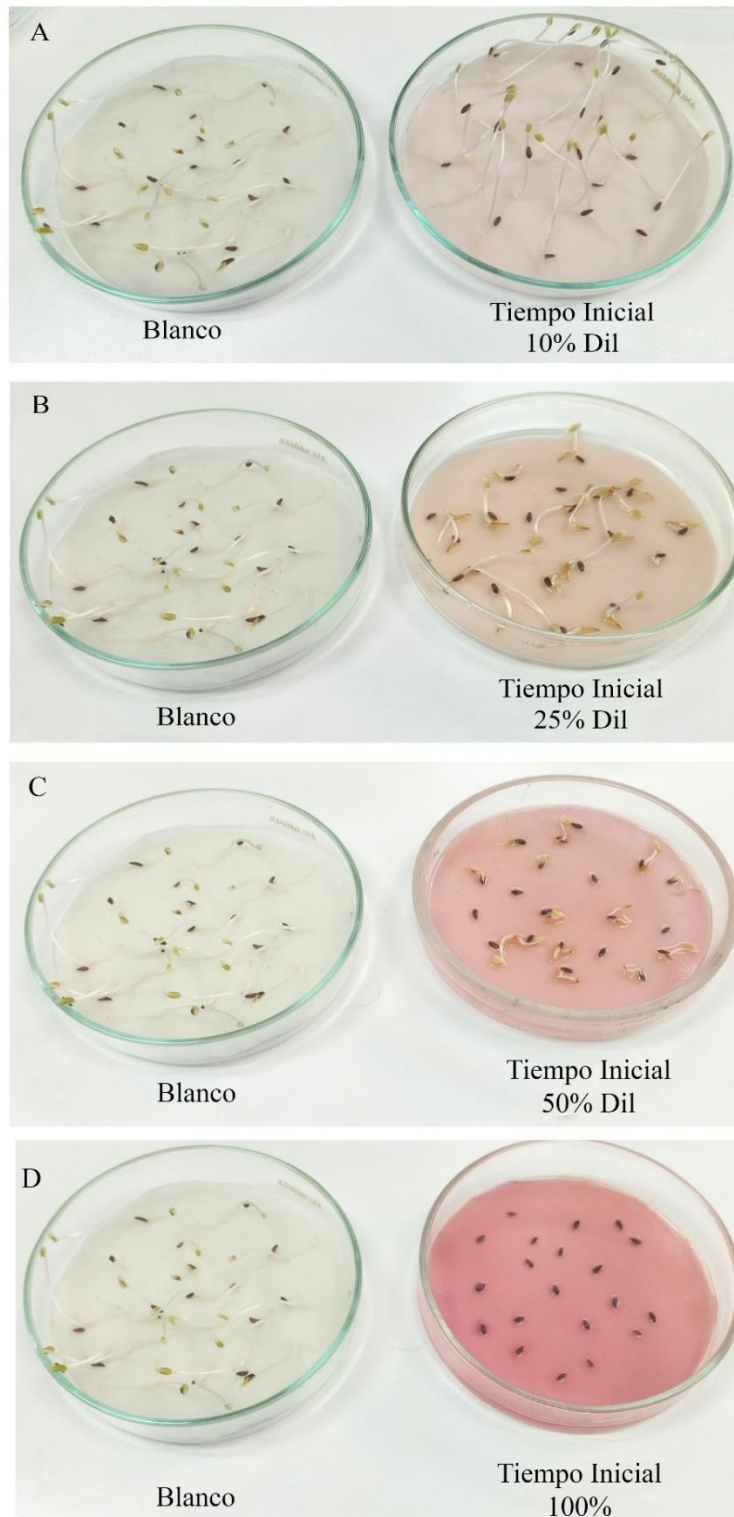


Figura 49: Fotografía de las placas conteniendo las muestras del tiempo inicial del cultivo y sus correspondientes diluciones, **a.** 10%, **b.** 25%, **c.** 50% y **d.** 100%.

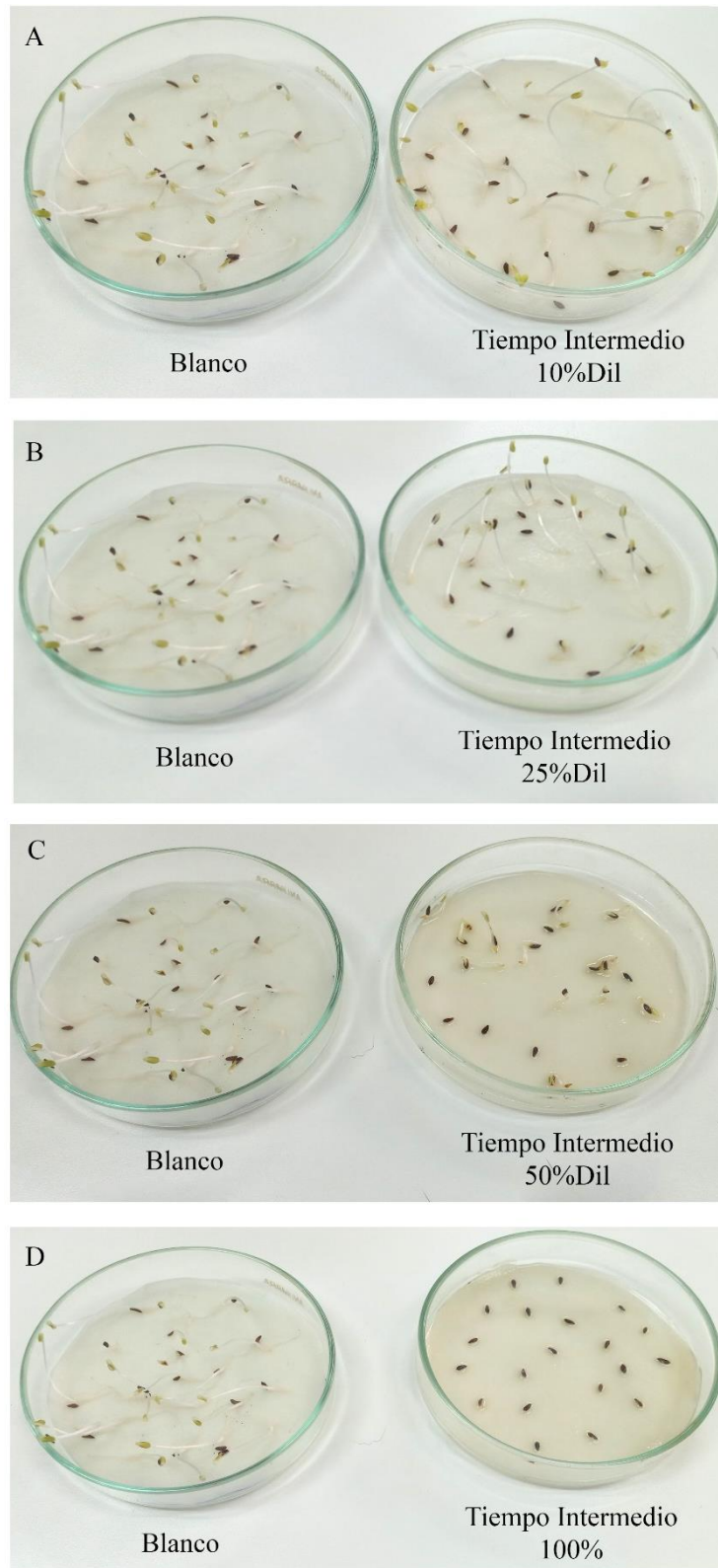


Figura 50: Fotografía de las placas conteniendo las muestras del tiempo intermedio del cultivo y sus correspondientes diluciones, **a.** 10%, **b.** 25%, **c.** 50% y **d.** 100%.

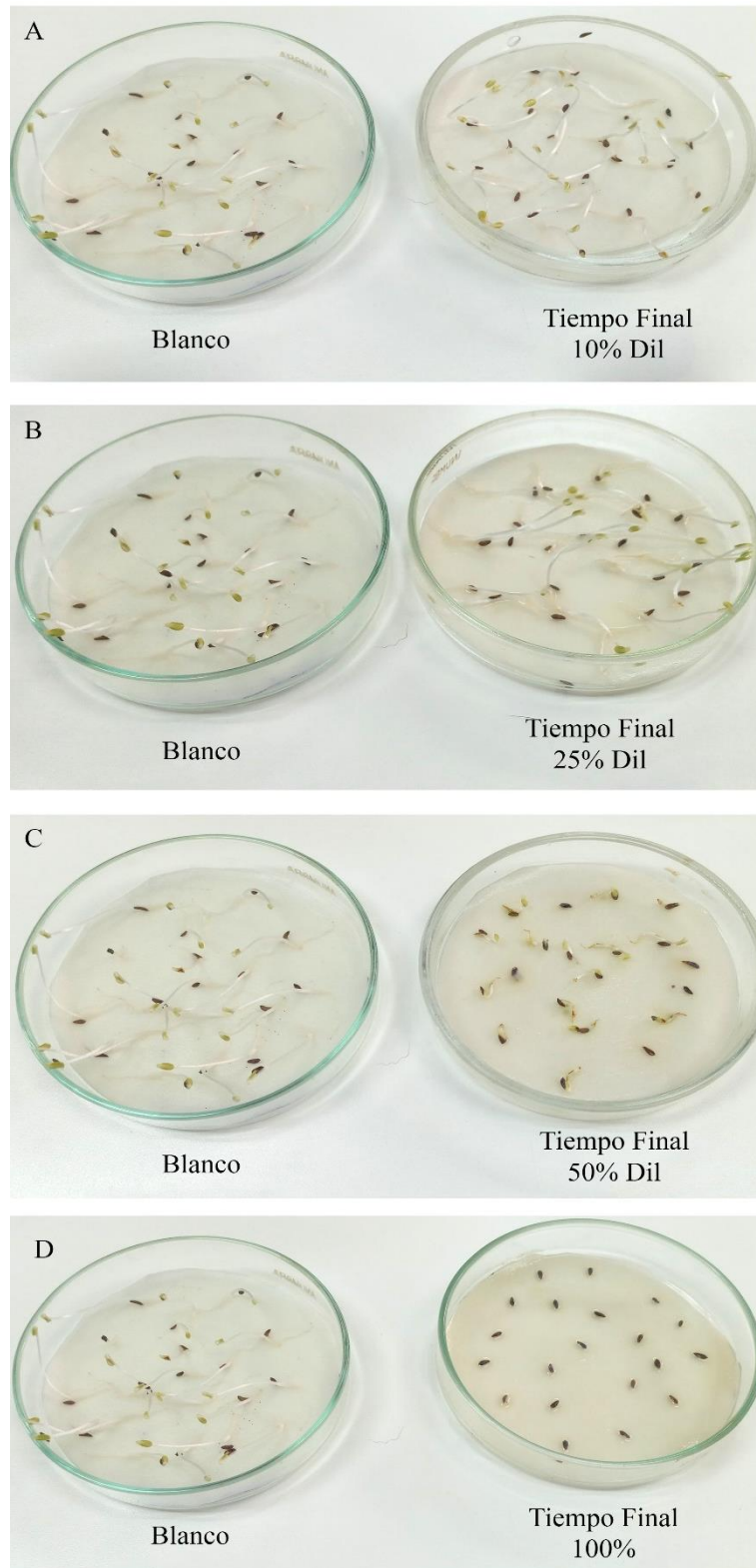


Figura 51: Fotografía de las placas conteniendo las muestras del tiempo final del cultivo y sus correspondientes diluciones, **a.** 10%, **b.** 25%, **c.** 50% y **d.** 100%.

Adicionalmente, se realizaron las medidas, a las plántulas de *L. sativa* L obteniendo los siguientes parámetros: (RGI), (GI%) y (IC₅₀), en este último se realizó el

análisis por separado para cada uno de los colorantes utilizados en la mezcla (NR-16 y VR-5). De esta manera, en las tablas 3 y 4 se presentan los resultados obtenidos del ensayo de fitotoxicidad para cada tiempo de cultivo y sus respectivas diluciones, mientras que en la tabla 5 se presentan los resultados obtenidos para IC₅₀ en los diferentes tiempos de cultivo para cada colorante.

Tabla 3: Tabla conteniendo los resultados obtenidos para el índice de crecimiento relativo (RGI).

Porcentaje de Dilución	RGI		
	Tiempo Inicial	Tiempo Intermedio	Tiempo Final
100	0	0	0
50	0,109	0,068	0,042
25	0,208	0,172	0,106
10	0,523	0,356	0,218

En la tabla 4, se han registrado mayores valores para el RGI en la dilución del 10% y a su vez, se ve cómo este valor disminuye a medida que avanza el tiempo de tratamiento. En el trabajo realizado por Young *et al.* (2012), se describieron tres categorías en los que se agrupan los valores de RGI en cuanto al efecto tóxico las sustancias estudiadas, donde x representa al valor de RGI:

- Inhibición de la elongación de raíz (I): $0 < x < 0,8$
- Sin efectos significativos (NSE): $0,8 \leq x \leq 1,2$
- Estimulación en la elongación de raíz (S): $x > 1,2$

Teniendo en cuenta estos valores, a partir de los resultados obtenidos para el RGI, hubo una inhibición de la elongación de raíz en todos los tiempos de cultivo y en todas las diluciones realizadas.

Tabla 4: Tabla conteniendo los resultados obtenidos para el índice de germinación (GI%).

Porcentaje de Dilución	GI%		
	Tiempo Inicial	Tiempo Intermedio	Tiempo Final
100	0	0	0
50	9,079	3,620	17,297
25	20,819	16,521	35,737
10	50,850	33,588	50,932

Para el GI%, en la tabla 5 se observa que, la germinación aumenta a medida que se diluye la muestra. Además, se registró un menor GI% para el tiempo intermedio de cultivo al compararlo con los otros tiempos de tratamiento.

Tabla 5: Tabla conteniendo los resultados obtenidos de los colorantes VR-5 y NR-16 para la concentración inhibitoria IC50.

IC50 (mg/L)		
Tiempo de Cultivo	Colorante VR-5	Colorante NR-16
Inicial	9,130	9,128
Intermedio	0,316	0,225
Final	0,269	0,301

En esta última determinación, tanto para el colorante VR-5 como el NR-16 el IC50 de las plántulas de *L. sativa* L disminuye con el avance del tiempo del cultivo. Por lo tanto, al inicio como al final de tratamiento el crecimiento se ve inhibido por sustancias que afectan el desarrollo de las plántulas de *L. sativa* L., esto puede deberse en principio al carácter tóxico de los colorantes presentes al principio del tratamiento y a los productos generados luego del tratamiento. Si se analizan los resultados para la IC₅₀, vemos que para el colorante NR-16 no es recomendable cortar el tratamiento durante el tiempo intermedio de cultivo, el cual en este caso fue alrededor de las 30 h. Luego, este parámetro aumenta hacia el final del tratamiento, por lo tanto, se supone que aquellos metabolitos tóxicos que se encontraban presentes durante las horas intermedias de cultivo pueden ser degradados cerca de los tiempos finales e incluso podría añadirse más fuente de carbono, con el objetivo de generar poder reductor adicional que promueva la reducción de dichas sustancias tóxicas.

En estudios anteriores, se registraron resultados similares a los presentados en este trabajo, como el realizado por Ruscasso *et al.* (2021), donde se utilizaron semillas de *L. sativa* L. para llevar a cabo un ensayo de fitotoxicidad al cultivo resultante del tratamiento del colorante NR-16 con *Candida sake* 41E. Dichas semillas fueron expuestas a dos tiempos de tratamiento, a las 48 h y 72 h de cultivo, de esta manera se obtuvo el resultado de que los compuestos intermediarios generaron un aumento de la toxicidad, ya que se registró un 50% de inhibición en la elongación de radícula luego de exponer las semillas a una muestra de cultivo correspondiente a 48 h de tratamiento. Luego de las 48 h, se registró un descenso en la toxicidad y no se vio afectada la elongación de la raíz. Sin

embargo, a las 72 h se registró incremento en la toxicidad e inhibición en el desarrollo de la raíz en todas las concentraciones testeadas que se atribuyó a la acumulación de aminas aromáticas resultantes del tratamiento del colorante NR-16. Un aumento similar en la inhibición de la elongación de la radícula de *L. sativa* L. fue observado en el trabajo de Almeida y Corso (2014), donde se trató el colorante rojo MX-5B con *Aspergillus terreus*.

En otro estudio presentado por Ruscasso *et al.* (2022), utilizando la misma levadura del presente trabajo *L. muscorum* F20A, se alcanzó una decoloración efectiva del colorante NR-5. Sin embargo, frente a las pruebas de fitotoxicidad realizadas con diluciones en un 10, 25, 50 y 100% de muestras recolectadas a las 24, 48 72 y 144h de cultivo, se registró la inhibición de elongación de raíz en un 50% de las plántulas de *L. sativa* L., y, sumado a ello hubo un aumento de la toxicidad para todos los tiempos de cultivo analizados. También, reportaron resultados obtenidos para IC₅₀, donde este parámetro indicó el aumento de toxicidad a medida que avanza el tratamiento del colorante. Es decir, los metabolitos presentes en solución eran aún más tóxicos que el colorante en condiciones previas al tratamiento. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente trabajo, ya que se detectó toxicidad a lo largo de todo el tratamiento.

En otros trabajos, se obtuvieron resultados similares utilizando semillas de *L. sativa* L. pero con otros colorantes azoicos, como es el presentado por de Almeida *et al.* (2021), donde se utilizó un cultivo de *Phanerochaete chrysosporium* ME-446 para tratar los colorantes Amarillo Directo- 27 (DY27), NR-5 y Rojo Reactivo-120. En este estudio, se observó que los tratamientos con mayor remoción de colorantes presentaron menores índices de germinación y elongación de radícula que los presentados en el control. El aumento en la concentración del colorante también causó mayor toxicidad, tal y como se obtuvo en el presente trabajo, para ambos colorantes NR-16 y VR-5, donde se visualizó ausencia de germinación en las soluciones sin diluir. Sin embargo, en el estudio realizado por Almeida *et al.* (2014), registró un aumento de la germinación comparando los efluentes no tratados con aquellos tratados, obteniendo una mayor germinación en estos últimos. Pero, al analizar el efecto de los productos de la remoción del colorante RR-120 por parte de *P. chrysosporium*, se evidenció menor germinación que en aquellas semillas tratadas directamente con el colorante, teniendo como resultado que el tratamiento generó productos más tóxicos que el colorante en sí.

A su vez, se han registrado resultados positivos. El estudio de Young *et al.*, (2012), utilizó semillas de *L. Sativa* L. para analizar la toxicidad de los productos de tratamiento de un efluente textil con un consorcio de microorganismos extraídos de *feedlots*. El equipo utilizado fue un biorreactor anaerobio conformado por un circuito de diferentes compartimentos, donde tomaron muestras en tres puntos del tratamiento, los puntos iniciales del circuito del biorreactor presentaron más toxicidad, ya que se registró necrosis e inhibición de la elongación de la radícula de *L. sativa* L. en todas las diluciones. Mientras que aquellas muestras tomadas hacia el final del circuito, luego de 14 semanas de tratamiento, el crecimiento de las plántulas analizadas no se vio afectado. Otro trabajo que presentó muy buenos resultados fue el de Ayed *et al.* (2016), donde se utilizaron un consorcio bacteriano conformado por *Staphylococcus aureus*, *S. aureus* y *S. aureus* ATCC 25923 para remover el colorante VR-5, se analizó la toxicidad de los metabolitos resultantes semillas de *Triticum turgidum ssp durum*. Se registró un porcentaje máximo de germinación del 94,30% correspondiente al tratamiento con *S. aureus* ATCC como microorganismo predominante en el consorcio. De esta manera, concluyeron que el consorcio bacteriano pudo reducir la toxicidad del colorante.

Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, se concluye que la levadura *L. muscorum* F20A fue capaz de decolorar exitosamente los colorantes azo estudiados, tanto en condiciones no salinas como con un suplemento de 10 g/L de NaCl. Asimismo, la levadura pudo decolorar una muestra de un efluente real y crecer dentro de dicho entorno. Se encontró que la glucosa fue la fuente de carbono más eficiente para el crecimiento y decoloración de los medios en comparación con el glicerol. Además, se evidenció que el almidón no pudo ser metabolizado como fuente de carbono.

A su vez, fue posible escalar el proceso a un biorreactor tipo tanque agitado, sin embargo, al analizar las diferentes etapas del tratamiento se encontraron efectos tóxicos que pueden deberse a la presencia de metabolitos formados durante la remoción de los colorantes por parte de la levadura de estudio. De esta manera, se podría plantear como estrategia el acoplamiento de un tratamiento posterior para la degradación de aquellos metabolitos que permanecen luego de la decoloración del medio de cultivo. Por lo tanto, teniendo en cuenta que durante el tratamiento de los colorantes sólo se adicionó fuente de carbono en el inicio de los cultivos y esta no es renovada, una posible perspectiva a futuro podrían ser tratamientos más prolongados con *L. muscorum* F20A que involucren el agregado de fuente de carbono adicional y, por lo tanto, la generación de poder reductor adicional. Así, se abre la posibilidad de aprovechar la eficiencia en la decoloración que ha presentado esta levadura y estudiar la reducción de aquellos productos generados luego de la rotura del enlace azo presentes en los colorantes.

Finalmente, en los estudios anteriormente mencionados en el presente trabajo demuestran que, el tratamiento biológico de colorantes textiles puede ser una alternativa viable y amigable con el medioambiente frente a otros tratamientos que suponen mayor costo y complejidad.

Bibliografia

- Akceylan, E., Bahadir, M., & Yılmaz, M. (2009). Removal efficiency of a calix [4] arene-based polymer for water-soluble carcinogenic direct azo dyes and aromatic amines. *Journal of Hazardous Materials*, 162(2-3), 960-966.
- Ali, N., Hameed, A., Siddiqui, M., Ghumro, P. B., & Ahmed, S. (2009). Application of *Aspergillus niger* SA1 for the enhanced bioremoval of azo dyes in simulated textile effluent. *African Journal of Biotechnology*, 8(16).
- Ali, S. S., Al-Tohamy, R., Koutra, E., Kornaros, M., Khalil, M., Elsamahy, T., ... & Sun, J. (2021). Coupling azo dye degradation and biodiesel production by manganese-dependent peroxidase producing oleaginous yeasts isolated from wood-feeding termite gut symbionts. *Biotechnology for Biofuels*, 14, 1-25.
- Almeida, E. J. R., & Corso, C. R. (2014). Comparative study of toxicity of azo dye Procion Red MX-5B following biosorption and biodegradation treatments with the fungi *Aspergillus niger* and *Aspergillus terreus*. *Chemosphere*, 112, 317-322.
- Al-Tohamy, R., Ali, S. S., Xie, R., Schagerl, M., Khalil, M. A., & Sun, J. (2023). Decolorization of reactive azo dye using novel halotolerant yeast consortium HYC and proposed degradation pathway. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 263, 115258.
- Al-Tohamy, R., Kenawy, E. R., Sun, J., & Ali, S. S. (2020). Performance of a newly isolated salt-tolerant yeast strain *Sterigmatomyces halophilus* SSA-1575 for azo dye decolorization and detoxification. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1163.
- Anastasi, A., Parato, B., Spina, F., Tigini, V., Prigione, V., & Varese, G. C. (2011). Decolourisation and detoxification in the fungal treatment of textile wastewaters from dyeing processes. *New Biotechnology*, 29(1), 38-45.
- Ayed, L., Bekir, K., Achour, S., Cheref, A., & Bakhrouf, A. (2017). Exploring bioaugmentation strategies for azo dye CI Reactive Violet 5 decolourization using bacterial mixture: dye response surface methodology. *Water and Environment Journal*, 31(1), 80-89.
- Barka, N., Qourzal, S., Assabbane, A., Nounah, A., & Ait-Ichou, Y. (2011). Removal of reactive yellow 84 from aqueous solutions by adsorption onto hydroxyapatite. *Journal of Saudi Chemical Society*, 15(3), 263-267.
- Ben Mansour, H., Houas, I., Montassar, F., Ghedira, K., Barillier, D., Mosrati, R., & Chekir-Ghedira, L. (2012). Alteration of in vitro and acute in vivo toxicity of textile dyeing wastewater after chemical and biological remediation. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(7), 2634-2643.
- Benkhaya, S., M'rabet, S., & El Harfi, A. (2020). A review on classifications, recent synthesis and applications of textile dyes. *Inorganic Chemistry Communications*, 115, 107891.
- Benkhaya, S., M'rabet, S., & El Harfi, A. (2020). Classifications, properties, recent synthesis and applications of azo dyes. *Heliyon*, 6(1), e03271.

- Cabansag, J. L. J., Dumelod, J. C., Alfaro, J. C. O., Arsenal, J. D., Sambot, J. C., Enerva, L. T., & Leaño Jr, J. L. (2013). Photocatalytic degradation of aqueous CI Reactive Violet 5 using bulk zinc oxide (ZnO) slurry. *Philippine Journal of Science*, 142(1), 77-85.
- Caggiano, S. (2014). Desigualdades entrelazadas, luchas divergentes: migración e industria textil en Argentina/Entangled inequalities, divergent struggles: migration and the Argentine textile industry. *Revista CIDOB d'afers internacionals*, 151-170.
- Carmen, Z., & Daniela, S. (2012). *Textile organic dyes-characteristics, polluting effects and separation/elimination procedures from industrial effluents-a critical overview* (Vol. 3, pp. 55-86). Rijeka: IntechOpen.
- Chequer, F. D., De Oliveira, G. R., Ferraz, E. A., Cardoso, J. C., Zanoni, M. B., & De Oliveira, D. P. (2013). Textile dyes: dyeing process and environmental impact. *Eco-friendly textile dyeing and finishing*, 6(6), 151-176.
- Crettaz, S., Kämpfer, P., Brüscheweiler, B. J., Nussbaumer, S., & Deflorin, O. (2020). Survey on hazardous non-regulated aromatic amines as cleavage products of azo dyes found in clothing textiles on the Swiss market. *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 15(1), 49-61.
- Danouche, M., Ferioun, M., Bahafid, W., & El Ghachtouli, N. (2021). Mycoremediation of azo dyes using *Cyberlindnera fabianii* yeast strain: application of designs of experiments for decolorization optimization. *Water Environment Research*, 93(8), 1402-1416.
- Das, A., & Mishra, S. (2017). Removal of textile dye reactive green-19 using bacterial consortium: process optimization using response surface methodology and kinetics study. *Journal of environmental chemical engineering*, 5(1), 612-627.
- de Almeida, A. P., Macrae, A., Ribeiro, B. D., & do Nascimento, R. P. (2021). Decolorization and detoxification of different azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* ME-446 under submerged fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52, 727-738.
- de Almeida, A. P., Macrae, A., Ribeiro, B. D., & do Nascimento, R. P. (2021). Decolorization and detoxification of different azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* ME-446 under submerged fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(2), 727-738.
- Deivasigamani, C., & Das, N. (2011). Biodegradation of Basic Violet 3 by *Candida krusei* isolated from textile wastewater. *Biodegradation*, 22, 1169-1180.
- do Nascimento, C. R. S., Nishikawa, M. M., Vaz, A. B., Rosa, C. A., & da Silva, M. (2013). Textile azo dye degradation by *Candida rugosa* INCQS 71011 isolated from a non-impacted area in Semi-Arid Region of Brazilian Northeast. *African Journal of Biotechnology*, 12(47), 6636-6642.

- Dönmez, G. (2002). Bioaccumulation of the reactive textile dyes by *Candida tropicalis* growing in molasses medium. *Enzyme and Microbial Technology*, 30(3), 363-366.
- Exploring bioaugmentation strategies for azo dye CI Reactive Violet 5 decolourization using bacterial mixture: dye response surface methodology
- Forgacs, E., Cserhádi, T., & Oros, G. (2004). Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Environment international*, 30(7), 953-971.
- Gomes, L., Miwa, D. W., Malpass, G. R., & Motheo, A. J. (2011). Electrochemical degradation of the dye reactive orange 16 using electrochemical flow-cell. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22, 1299-1306.
- Govindwar, S. P., Kurade, M. B., Tamboli, D. P., Kabra, A. N., Kim, P. J., & Waghmode, T. R. (2014). Decolorization and degradation of xenobiotic azo dye Reactive Yellow-84A and textile effluent by *Galactomyces geotrichum*. *Chemosphere*, 109, 234-238.
- Harris, D. C. (2003). *Análisis químico cuantitativo*. Reverté.
- Jafari, N., Kasra-Kermanshahi, R., & Soudi, M. R. (2013). Screening, identification and optimization of a yeast strain, *Candida palmiophila* JKS4, capable of azo dye decolorization. *Iranian journal of microbiology*, 5(4), 434.
- Kalia, S., Samuchiwal, S., Dhaka, V., & Malik, A. (2023). Development and optimization of the dye removal process by *Trichoderma reesei* using starch effluent as a growth supplement. *AQUA-Water Infrastructure, Ecosystems and Society*, 72(3), 395-410.
- Kapoor, R. T., Danish, M., Singh, R. S., Rafatullah, M., & HPS, A. K. (2021). Exploiting microbial biomass in treating azo dyes contaminated wastewater: Mechanism of degradation and factors affecting microbial efficiency. *Journal of Water Process Engineering*, 43, 102255.
- Kausar, A. (2022). Nanocarbon and macrocarbonaceous filler-reinforced epoxy/polyamide: A review. *Journal of Thermoplastic Composite Materials*, 35(12), 2620-2640.
- Kishor, R., Purchase, D., Saratale, G. D., Saratale, R. G., Ferreira, L. F. R., Bilal, M., ... & Bharagava, R. N. (2021). Ecotoxicological and health concerns of persistent coloring pollutants of textile industry wastewater and treatment approaches for environmental safety. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(2), 105012.
- Laraib, Q., Shafique, M., Jabeen, N., Naz, S. A., Nawaz, H. R., Solangi, B., ... & Sohail, M. (2020). *Luffa cylindrica* immobilized with *Aspergillus terreus* QMS-1: An efficient and cost-effective strategy for the removal of congo red using stirred tank reactor. *Polish Journal of Microbiology*, 69(2), 193.
- Lellis, B., Fávoro-Polonio, C. Z., Pamphile, J. A., & Polonio, J. C. (2019). Effects of textile dyes on health and the environment and bioremediation potential of living organisms. *Biotechnology Research and Innovation*, 3(2), 275-290.

- Lucas, M. S., Amaral, C., Sampaio, A., Peres, J. A., & Dias, A. A. (2006). Biodegradation of the diazo dye Reactive Black 5 by a wild isolate of *Candida oleophila*. *Enzyme and Microbial Technology*, 39(1), 51-55.
- Manogaran, M., Yasid, N. A., Othman, A. R., Gunasekaran, B., Halmi, M. I. E., & Shukor, M. Y. A. (2021). Biodecolourisation of Reactive Red 120 as a sole carbon source by a bacterial consortium—Toxicity assessment and statistical optimisation. *International journal of environmental research and public health*, 18(5), 2424.
- Manu, B., & Chaudhari, S. (2002). Anaerobic decolorisation of simulated textile wastewater containing azo dyes. *Bioresource technology*, 82(3), 225-231.
- Mehra, S., Singh, M., & Chadha, P. (2021). Adverse impact of textile dyes on the aquatic environment as well as on human beings. *Toxicology International*, 28(2), 165-176.
- Misal, S. A., & Gawai, K. R. (2018). Azoreductase: a key player of xenobiotic metabolism. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1), 1-9.
- Mishra, S., Mohanty, P., & Maiti, A. (2019). Bacterial mediated bio-decolourization of wastewater containing mixed reactive dyes using jack-fruit seed as co-substrate: process optimization. *Journal of Cleaner Production*, 235, 21-33.
- Montañez-Barragán, B., Sanz-Martín, J. L., Gutiérrez-Macías, P., Morato-Cerro, A., Rodríguez-Vázquez, R., & Barragán-Huerta, B. E. (2020). Azo dyes decolorization under high alkalinity and salinity conditions by *Halomonas* sp. in batch and packed bed reactor. *Extremophiles*, 24(2), 239-247.
- Moosvi, S., Keharia, H., & Madamwar, D. (2005). Decolorization of textile dye Reactive Violet 5 by a newly isolated bacterial consortium RVM 11.1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 667-672.
- Niinimäki, K., Peters, G., Dahlbo, H., Perry, P., Rissanen, T., & Gwilt, A. (2020). The environmental price of fast fashion. *Nature Reviews Earth & Environment*, 1(4), 189-200.
- Ogugbue, C. J., & Sawidis, T. (2011). Bioremediation and detoxification of synthetic wastewater containing triarylmethane dyes by *Aeromonas hydrophila* isolated from industrial effluent. *Biotechnology research international*, 2011.
- Pajot, H. F., de Figueroa, L. I., & Fariña, J. I. (2007). Dye-decolorizing activity in isolated yeasts from the ecoregion of Las Yungas (Tucumán, Argentina). *Enzyme and Microbial Technology*, 40(6), 1503-1511.
- Porri, A., Baroncelli, R., Guglielminetti, L., Sarrocco, S., Guazzelli, L., Forti, M., ... & Vannacci, G. (2011). *Fusarium oxysporum* degradation and detoxification of a new textile-glycoconjugate azo dye (GAD). *Fungal Biology*, 115(1), 30-37.
- Przystaś, W., Zabłocka-Godlewska, E., & Grabińska-Sota, E. (2012). Biological removal of azo and triphenylmethane dyes and toxicity of process by-products. *Water, Air, & Soil Pollution*, 223(4), 1581-1592.

- Rabbi, M. A., Hossen, J., Sarwar, M., Roy, P. K., Shaheed, S. B., & Hasan, M. M. (2018). Investigation of waste water quality parameters discharged from textile manufacturing industries of bangladesh. *Current World Environment*, 13(2).
- Rabbi, M. A., Hossen, J., Sarwar, M., Roy, P. K., Shaheed, S. B., & Hasan, M. M. (2018). Investigation of waste water quality parameters discharged from textile manufacturing industries of bangladesh. *Current World Environment*, 13(2).
- Ramalho, P. A., Cardoso, M. H., Cavaco-Paulo, A., & Ramalho, M. T. (2004). Characterization of azo reduction activity in a novel ascomycete yeast strain. *Applied and environmental microbiology*, 70(4), 2279-2288.
- Razali, N. A., Abidin, C. Z. A., Ong, S. A., Fahmi, M. R., Ibrahim, A. H., & Sabri, S. N. Treatment of O3 with Na2S2O8 by ANOVA Interpretation towards Degradation of Azo Dye.
- Rosu, C. M., Avadanei, M., Gherghel, D., Mihasan, M., Mihai, C., Trifan, A., ... & Vochita, G. (2018). Biodegradation and detoxification efficiency of azo-dye reactive orange 16 by *Pichia kudriavzevii* CR-Y103. *Water, Air, & Soil Pollution*, 229, 1-18.
- Ruscasso, F. (2018). Biodegradación aeróbica del colorante Naranja Reactivo 16 por una levadura antártica.
- Ruscasso, F., Cavello, I., Butler, M., Loveira, E. L., Curutchet, G., & Cavalitto, S. (2021). Biodegradation and detoxification of reactive orange 16 by *Candida sake* 41E. *Bioresource Technology Reports*, 15, 100726.
- Ruscasso, F., Cavello, I., Curutchet, G., & Cavalitto, S. (2022). Antarctic yeasts: potential use in a biologic treatment of textile azo dyes. *Bioresources and Bioprocessing*, 9(1), 1-12.
- Sahasrabudhe, M. M., & Pathade, G. R. (2011). Biodegradation of sulphonated azo dye CI reactive orange 16 by *Enterococcus faecalis* strain YZ 66. *European Journal of Experimental Biology*, 1(1), 163-173.
- Salem, S. S., Mohamed, A., El-Gamal, M., Talat, M., & Fouda, A. (2019). Biological decolorization and degradation of azo dyes from textile wastewater effluent by *Aspergillus niger*. *Egyptian Journal of Chemistry*, 62(10), 1799-1813.
- Sane, P. K., Tambat, S., Sontakke, S., & Nemade, P. (2018). Visible light removal of reactive dyes using CeO2 synthesized by precipitation. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(4), 4476-4489.
- Saravanan, S., Kumar, P. S., Chitra, B., & Rangasamy, G. (2022). Biodegradation of textile dye Rhodamine-B by *Brevundimonas diminuta* and screening of their breakdown metabolites. *Chemosphere*, 308, 136266.
- Sari, A. A., Tachibana, S., Muryanto, & Hadibarata, T. (2016). Development of bioreactor systems for decolorization of Reactive Green 19 using white rot fungus. *Desalination and Water Treatment*, 57(15), 7029-7039.

- Sayahi, E., Ladhari, N., Mechichi, T., & Sakli, F. (2016). Azo dyes decolourization by the laccase from *Trametes trogii*. *The Journal of The Textile Institute*, 107(11), 1478-1482.
- Senasu, T., & Nanan, S. (2017). Photocatalytic performance of CdS nanomaterials for photodegradation of organic azo dyes under artificial visible light and natural solar light irradiation. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 28, 17421-17441.
- Sharma, J., Sharma, S., & Soni, V. (2021). Classification and impact of synthetic textile dyes on Aquatic Flora: A review. *Regional Studies in Marine Science*, 45, 101802.
- Srinivasan, S., & Sadasivam, S. K. (2021). Biodegradation of textile azo dyes by textile effluent non-adapted and adapted *Aeromonas hydrophila*. *Environmental Research*, 194, 110643.
- Tian, F., Wang, Y., Guo, G., Ding, K., Yang, F., Wang, H., ... & Liu, C. (2021). Enhanced azo dye biodegradation at high salinity by a halophilic bacterial consortium. *Bioresource technology*, 326, 124749.
- Visvanathan, R., Qader, M., Jayathilake, C., Jayawardana, B. C., Liyanage, R., & Sivakanesan, R. (2020). Critical review on conventional spectroscopic α -amylase activity detection methods: merits, demerits, and future prospects. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(7), 2836-2847.
- Wang, S., Hanna, D., Sugamori, K. S., & Grant, D. M. (2019). Primary aromatic amines and cancer: Novel mechanistic insights using 4-aminobiphenyl as a model carcinogen. *Pharmacology & Therapeutics*, 200, 179-189.
- Wong, Y., & Yu, J. (1999). Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Water research*, 33(16), 3512-3520.
- Yang, Q., Li, C., Li, H., Li, Y., & Yu, N. (2009). Degradation of synthetic reactive azo dyes and treatment of textile wastewater by a fungi consortium reactor. *Biochemical Engineering Journal*, 43(3), 225-230.
- Yaseen, D. A., & Scholz, M. (2019). Textile dye wastewater characteristics and constituents of synthetic effluents: a critical review. *International journal of environmental science and technology*, 16(2), 1193-1226.
- Young, B. J., Riera, N. I., Beily, M. E., Bres, P. A., Crespo, D. C., & Ronco, A. E. (2012). Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 76, 182-186.

Páginas Web

- Earth Observatory, National Aeronautics and Space Administration (2014) The Aral Sea Loses Its Eastern Lobe. Enlace: <https://earthobservatory.nasa.gov/images/84437/the-aral-sea-loses-its-eastern-lobe>
- National Geographic en Español (2022). Un vertedero colosal de ropa asfixia la reserva natural del Desierto de Atacama, en Chile. Enlace: <https://www.ngenespanol.com/ecologia/toneladas-de-ropa-contaminan-la-reserva-natural-del-desierto-de-atacama/>
- El Planeta Urbano (2022) ¿Por qué el desierto de Atacama se convirtió en un basural a cielo abierto de ropa usada? Enlace: <https://elplanetaurbano.com/2022/06/por-que-el-desierto-de-atacama-se-convirtio-en-un-gigantesco-basural-a-cielo-abierto-de-ropa-usada/>
- Instituto Nacional de Seguridad y Salud en el Trabajo, Madrid, España. Cancerígenos, Mutagénicos y Reprotóxicos. Enlace: <https://www.insst.es/materias/riesgos/riesgos-quimicos/cancerigenos-mutagenos-y-reprotoxicos>
- National Geographic en Español (2022). Un vertedero colosal de ropa asfixia la reserva natural del Desierto de Atacama, en Chile. Enlace: <https://www.ngenespanol.com/ecologia/toneladas-de-ropa-contaminan-la-reserva-natural-del-desierto-de-atacama/>
- Perfil (2022) El desierto de Atacama en Chile, un ecosistema “frágil” convertido en basural. <https://www.perfil.com/noticias/ecologia/el-desierto-de-atacama-en-chile-un-ecosistema-fragil-convertido-en-basural-ilegal-del-planeta.phtml> .
- Wiener Lab, Glicemia enzimática AA. Enlace: https://access.wienerlab.com/VademecumDocumentos/Vademecum%20espanol/glicemia_enzimatica_aa_liquida_sp.pdf

Notas Periodísticas:

- BBC, 2021. " El país que se convirtió en vertedero de ropa usada de los países ricos". Enlace: <https://www.bbc.com/mundo/noticias-internacional-58931588> Enlace: <https://eco-age.com/resources/decolonising-fashion-dead-white-mans-clothes-ghana/>
- Branded Joy Editorial Staff, (2022). “Why are clothes made in other countries?”, Branded Joy. Enlace: <https://brandedjoy.com/why-are-clothes-made-in-other-countries/>
- Fane, B, y Juergen Wastl, J, (2022). “When economy meets environment: Sustainable development and the case of wastewater pollution in textile manufacturing”. Digital Science. Enlace: <https://www.digital-science.com/blog/2022/04/sdgs-wastewater-pollution-in-textile-manufacturing/>