



TRABAJO FINAL

Uso de levaduras no convencionales para la remoción de contaminantes

Tesista: Sabrina B. Galvan

Tutora: Lic. Marina Acosta

Directora: Dra. Ivana Cavello

Facultad de Ciencias Exactas

Universidad Nacional de La Plata

2025

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

Parte de la investigación realizada en este trabajo ha sido presentada en el **XVI Congreso Argentino de Microbiología**. Buenos Aires, Argentina. 21 al 23 agosto del 2024.

índice

Agradecimientos	1
Capítulo 1: Introducción.....	2
1.1 Problemáticas de la industria textil.....	2
1.2 Colorantes textiles	3
1.3 Degradación biológica.....	4
1.4 Kéfir.....	6
Objetivos.....	9
Capítulo 2. Materiales y métodos.....	10
2.1 Colorantes textiles	10
Naranja Reactivo 16 (NR16).....	10
Rojo Reactivo 141 (RR141)	10
Negro Reactivo 5 (NR5).....	11
Verde Reactivo 19 (VR19).....	12
Violeta Reactivo 5 (VR5).....	12
2.2 Levaduras del kéfir	13
2.3 Búsqueda de levaduras capaces de remover colorantes textiles – Screening en medio NDM.....	13

2.4 Estudio de la cinética de remoción de los colorantes VR5, NR5 NR16, RR141 y VR19 en cultivo sumergido.....	14
2.5 Efecto de la temperatura en la remoción del colorante NR16.....	14
2.6 Estudio de cinética de remoción del colorante NR16 a escala de Erlenmeyer	15
2.7 Análisis del efecto de la concentración del colorante sobre el crecimiento y la remoción de este en el medio de cultivo.....	16
2.8 Escalado del estudio de decoloración en biorreactor de tipo tanque agitado	16
2.9 Bioensayo de fitotoxicidad	18
Capítulo 3. Resultados y discusión.....	20
3.1 Búsqueda de levaduras capaces de remover colorantes textiles – Screening en medio NDM.....	20
3.2 Estudio de la cinética de remoción de los colorantes VR5, NR5, NR16, RR141 y VR19 en cultivo sumergido.....	24
3.3 Efecto de la temperatura en la remoción del colorante NR16.....	28
3.4 Estudio de cinética de remoción del colorante NR16 a escala de Erlenmeyer	29
3.5 Análisis del efecto de la concentración del colorante sobre el crecimiento y la remoción de este en el medio de cultivo.....	33
3.6 Escalado del estudio de decoloración en biorreactor de tipo tanque agitado	36
3.7 Ensayo de fitotoxicidad	43
Capítulo 4. Conclusiones.....	52
Bibliografía.....	53

Agradecimientos

Al finalizar este trabajo, quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas las personas y entidades que hicieron posible su realización.

En primer lugar, a mi directora Ivana Cavello y a mi tutora Marina Acosta, quienes con su apoyo, dedicación y conocimientos fueron pieza clave en el desarrollo de esta investigación.

A mi familia, por su amor incondicional, paciencia y aliento en cada paso del camino. Su confianza en mí y su apoyo constante que me han dado la fuerza para seguir adelante. A mis amigos, quienes con sus palabras de ánimo, compañía y momentos de distracción hicieron que este camino fuera más llevadero.

A la mejor compañía, Maku; Shisu, Astor Hiroshi y Chimuelo, por brindarme alegría, cariño incondicional y recordarme la importancia de los pequeños momentos de felicidad en la vida.

A la universidad pública, por ser el espacio donde pude desarrollar mis conocimientos y habilidades, y por brindarme las herramientas necesarias para alcanzar mis objetivos académicos y profesionales.

A todos ustedes, mi más sincero agradecimiento.

Capítulo 1: Introducción

1.1 Problemáticas de la industria textil

La industria textil es una de las principales fuentes de contaminación hídrica debido a la gran cantidad de aguas residuales que genera, especialmente aquellas que contienen colorantes (Ahmed et al. 2012). El aumento de la demanda de productos textiles ha incrementado la liberación de aguas residuales coloreadas, cuyas características incluyen variaciones en parámetros como la demanda química de oxígeno (DQO), la demanda biológica de oxígeno (DBO), el pH, la salinidad y la presencia de compuestos orgánicos y químicos (Dos Santos et al. 2007). En regiones donde el agua es escasa, este alto consumo hace necesario el reciclaje y tratamiento eficiente de los efluentes.

Uno de los principales contaminantes de estos efluentes son los colorantes azo, compuestos sintéticos xenobióticos difíciles de degradar, que constituyen aproximadamente el 70% de los colorantes utilizados en la industria (H. F. Pajot et al. 2007). Debido a su compleja estructura química, son resistentes a la biodegradación y los métodos convencionales de tratamiento de aguas residuales resultan ineficaces para eliminarlos (Doruk et al. 2013).

Sumado a esto las aguas residuales textiles contienen sólidos disueltos totales (TDS), sólidos suspendidos (SS), metales pesados, aceites minerales, surfactantes, nitrógeno total y productos químicos de blanqueo, lo que agrava su impacto ambiental (Sumathi Suresh et al. 2014). La liberación de colorantes no fijados, que tras la hidrólisis no pueden reaccionar con las telas, contribuye a la contaminación. Dependiendo del tipo de colorante, entre el 2-3% (para colorantes básicos) y hasta el 50% (para algunos colorantes reactivos) se pierde en los efluentes, lo que hace que su eliminación sea un desafío significativo (Jafari et al. 2014).

A nivel global, se producen aproximadamente 10^6 toneladas de colorantes sintéticos al año, de las cuales entre 1 y 1.5×10^5 toneladas terminan en cuerpos de agua (Jadhav et al. 2016). Esto no solo provoca problemas estéticos, sino que afecta negativamente a la vida acuática al bloquear la penetración de luz, el deterioro de la

actividad fotosintética y la transferencia de oxígeno, además de generar toxicidad en organismos expuestos a metales y cloruros (Jafari et al. 2013; H. F. Pajot et al. 2007).

Los métodos convencionales de tratamiento, como la coagulación, adsorción, oxidación y filtración, presentan limitaciones debido a su alto costo, baja eficiencia y la generación de residuos secundarios como lodos (Das & Charumathi et al. 2012). Para enfrentar estos desafíos, la industria textil debe adoptar tecnologías más sostenibles y modificar sus procesos de producción, buscando alternativas ecológicas y económicamente viables (Ramesh Babu et al. 2007).

1.2 Colorantes textiles

Antiguamente colorantes como el ácido carmínico, el púrpura de Tiro y el índigo eran obtenidos a partir de fuentes animales. Sin embargo, a la hora de extraer estos compuestos naturales, el proceso presenta limitaciones, tales como extracciones laboriosas, bajos rendimientos, falta de pureza y calidad, y poca resistencia a la luz (Pajot et al. 2014). En consecuencia empezaron a elaborarse colorantes sintéticos creados por el hombre, lo que lleva a considerar que una primera clasificación de los colorantes puede ser en dos tipos principales: colorantes naturales (de origen inorgánico o de origen orgánico de animales y plantas) y colorantes orgánicos sintéticos (Jadhav et al. 2016).

A su vez, los colorantes pueden ser clasificados basándose en su estructura química o por su aplicación al tipo de fibra. Las clases químicas incluyen nitroso, nitro, azo, estilbena, carotenoide, triarilmetano, xanteno, acridina, quinolina, metina, tiazol, azina, oxazina, tiazina, sulfuro, antraquinona, indigoides y ftalocianina. También se pueden clasificar según su estado en solución y carga, lo que influye en el método de decoloración para esto hay tres grupos: Grupo I (carga negativa, coloidal), Grupo A (aniónico, soluble) y Grupo C (catiónico) (Venceslau et al 1994).

Actualmente la mayoría de los colorantes textiles son compuestos orgánicos aromáticos complejos diseñados para resistir la decoloración. El color y su intensidad son resultado de grupos cromóforos y auxócromos. Los cromóforos son grupos arilo con electrones π deslocalizados que absorben radiación electromagnética. Los auxócromos son grupos sustituyentes que modifican la energía del sistema (Sumathi Suresh et al.

2014). Los cromóforos se encargan de darle el color y los auxóchromos son sustituyentes que intensifican el color (Dos Santos et al. 2007).

Según el índice de color, los colorantes pueden ser aniónicos (directos, ácidos y reactivos), catiónicos (básicos) o no iónicos (dispersos). Como habíamos dicho también se clasifican por su estructura química siendo los colorantes azo los más comunes, seguidos por los de antraquinona, triarilmetano y ftalocianina. Los colorantes reactivos forman enlaces covalentes con las fibras. Los colorantes solventes son no iónicos y se usan en plásticos y ceras (Sumathi Suresh et al. 2014).

Los colorantes azo se caracterizan por la presencia de uno o más grupos azo ($-N=N-$) como cromóforo en sus anillos aromáticos. Dichos grupos están generalmente unidos a un anillo de benceno o naftaleno, pero también pueden estar unidos a moléculas aromáticas heterocíclicas o a grupos alifáticos enolizables.

Cabe señalar que los colorantes azo, solubles en agua, pueden absorberse fácilmente a través de la piel, lo que incrementa el riesgo de cáncer y reacciones alérgicas (Jadhav et al. 2016), los mismos pueden dividirse reductivamente en aminas incoloras mediante la acción de diversas especies bacterianas o procesos abióticos. La reducción de los enlaces azo también ocurre en presencia de azufre, producido por microorganismos reductores de sulfato. Aunque los productos resultantes de la reducción generalmente no se utilizan como fuentes de carbono o energía para las bacterias, este proceso puede estar mediado por actividades enzimáticas o mediadores redox presentes en sustancias húmicas, que han demostrado mejorar la decoloración (Ramalho et al. 2004).

Los colorantes azo, clasificados como aniónicos, incluyen estructuras monoazo y diazo. En condiciones anaeróbicas, la escisión de sus enlaces genera aminas aromáticas, conocidas por ser cancerígenas y mutagénicas (Sumathi Suresh et al. 2014).

1.3 Degradación biológica

Los métodos fisicoquímicos, como la adsorción, coagulación-floculación y oxidación, presentan limitaciones significativas debido a su alto costo ya que requiere la

utilización de una alta cantidad de químicos, infraestructura especializada y elevados gastos operativos. Además, generan residuos secundarios, como lodos concentrados, que representan un problema adicional de disposición y manejo (Martorell et al. 2012; H. F. Pajot et al. 2007).

En contraste, los métodos biológicos ofrecen ventajas notables, ya que los microorganismos pueden adaptarse a diversas condiciones ambientales y tratar eficientemente concentraciones bajas de contaminantes. Este enfoque resulta más económico, ecológico y minimiza el impacto ambiental en comparación con los tratamientos convencionales (H. F. Pajot et al. 2014). Entre las alternativas biológicas, la biorremediación destaca por su capacidad de transformar los colorantes azo en compuestos menos tóxicos o incluso mineralizarlos (Sumathi Suresh et al. 2014).

Dentro de los microorganismos utilizados en la biorremediación, los hongos ligninolíticos desempeñan un papel clave debido a la acción de enzimas como lignina peroxidasa (LiP), manganeso peroxidasa (MnP) y lacasa. Especies como *Phanerochaete chrysosporium*, *Coriolus versicolor* y *Trametes versicolor* han demostrado una gran eficiencia en la decoloración de colorantes (Sumathi Suresh et al. 2014). Sin embargo, los hongos filamentosos presentan limitaciones como su lento crecimiento y la susceptibilidad a la contaminación bacteriana, lo que reduce su aplicabilidad en tratamientos de aguas residuales (H. F. Pajot et al. 2007).

Por otro lado, las levaduras se destacan por su metabolismo rápido y versátil, lo que les permite resistir ambientes adversos y degradar colorantes de manera eficiente. Comparadas con los hongos filamentosos, las levaduras presentan ventajas como crecimiento más rápido, menor producción de lodos y una mayor tolerancia a variaciones en el medio de cultivo (Das & Charumathi et al. 2012).

La biodegradación de colorantes por levaduras se basa en mecanismos como la biosorción, bioacumulación y biodegradación enzimática. La biosorción es un proceso rápido en el que los colorantes se adhieren a la superficie celular, mientras que la bioacumulación implica la absorción intracelular de estos compuestos. La biodegradación, por su parte, descompone los colorantes en subproductos menos tóxicos mediante la acción de enzimas como azoreductasas e hidrogenasas (Das & Charumathi et al. 2012).

Estudios recientes han demostrado la capacidad de las levaduras de remover colorantes textiles, tal es el caso de *Hanseniaspora opuntiae*, la cual es capaz de remover el colorante Azul Novasyn Luz BLR mediante biosorción, alcanzando porcentajes de remoción superiores al 90% en medio sintético. Además, se observó que esta levadura podía tolerar concentraciones de colorante de hasta 2000 mg/l sin que se inhibiera su crecimiento (Bolivar-Correa et al. 2023). Por otro lado, un estudio centrado en las levaduras del género *Trichosporon* evidenció la capacidad de estas para degradar el colorante azo Negro reactivo 5, y además planteo que la degradación se produce en dos etapas: primero, la ruptura de la molécula del colorante en compuestos más pequeños y luego el catabolismo de estos compuestos. Además, se realizó un análisis genómico y proteómico para identificar las enzimas y vías metabólicas involucradas. Los estudios revelaron la participación de diversas enzimas y sistemas de transporte, y también sistemas de defensa ante el estrés oxidativo (Bulacio Gil et al. 2018). En otros estudios se encontró que levaduras adaptadas al frío, aisladas de la isla King George en la Antártida, entre las cuales se encontraban *Candida sake 41E*, *Leucosporidium muscorum F20A* y *Cystofilobasidium infirmominiatum F13E* mostraron buenos resultados en la remoción de colorantes azo, principalmente de los colorante Negro reactivo 5 y Naranja reactivo 16 (Ruscasso et al. 2022).

En conclusión, la biorremediación, especialmente mediante levaduras y hongos ligninolíticos, representa una alternativa prometedora para el tratamiento de aguas residuales industriales. Su eficiencia, adaptabilidad y menor impacto ambiental la convierten en una opción viable frente a los métodos convencionales, con el potencial de ser optimizada para una aplicación más efectiva y sostenible en el futuro.

1.4 Kéfir

El kéfir de agua es una bebida fermentada obtenida a partir de los nódulos de kéfir, conocidos como tibicos, en ellos conviven en simbiosis bacterias ácido-lácticas, bacterias ácido-acéticas y levaduras. Estos microorganismos viven en una matriz de polisacáridos, principalmente dextrano, producida en su mayoría por bacterias como *Lactobacillus hilgardii*. La simbiosis entre levaduras y bacterias en los nódulos de kéfir se produce

debido a que las bacterias acidifican el medio favoreciendo el crecimiento de levaduras, que a su vez producen factores de crecimiento y compuestos nitrogenados solubles, lo que estimula el crecimiento de bacterias (Monar et al. 2014). Cabe resaltar que el kéfir de agua es un tipo de kéfir diferente al de leche tanto en estructura química, apariencia física como en contenido microbiano (Gökırmaklı et al.2024).

Los microorganismos más comúnmente encontrados son bacterias ácido-lácticas de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* y *Lactococcus*, bacterias ácido-acéticas de los géneros *Acetobacter* y *Gluconobacter*, y levaduras como *Saccharomyces cerevisiae* y *Zygorulasporea florentina* (Arrieta-Echeverri et al. 2023).

Si bien se desconoce el origen del kéfir se sabe que la composición varía debido a la diversidad de sustratos y orígenes de los granos de kéfir de agua. Un estudio en Brasil demostró que la composición de la microbiota del gránulo varía según su lugar de origen (Monar et al. 2014). La composición de la bebida puede variar según el sustrato, las condiciones de cultivo e interacciones microbianas que ocurren durante la fermentación. También, se observaron diferencias entre réplicas, lo que podría estar relacionado con la dinámica de la población y la manipulación de muestras (Arrieta-Echeverri et al. 2023). Además, se ha demostrado en algunos estudios que la composición del kéfir se ve afectada por el tipo de almacenamiento disminuyendo la proporción de levaduras presentes (Gökırmaklı et al. 2024).

Estudios recientes han demostrado que un consorcio compuesto por *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus plantarum*, aislados de kéfir tibetano, fue capaz de eliminar por completo el colorante azoico Remazol Brilliant Orange 3R en un período de 12 horas bajo condiciones óptimas. Además, ensayos posteriores de toxicidad indicaron que la biodegradación resultó en una desintoxicación efectiva del colorante (Ayed et al. 2019). Por otro lado, otros estudios han empleado nódulos de kéfir para la remoción del colorante reactivo Remazol Navy RGB, encontrando que los nódulos de kéfir vivos presentaban una mayor eficiencia de decoloración en comparación con los desactivados mediante tratamiento térmico (Erdoğdular et al. 2019). Asimismo, se ha demostrado que los nódulos de kéfir de leche pueden eliminar el colorante reactivo Remazol Ultra Red RGB mediante un proceso de biosorción, destacándose además que la biomasa de kéfir es reutilizable (Erdoğdular et al. 2021). Más recientemente, se ha encontrado que los nódulos de kéfir de

agua poseen la capacidad de bioabsorber el colorante antraquinona CI Reactivo Azul 4 HFG, logrando eliminar la mayor parte del colorante presente en el medio de cultivo (Pereira Xavier et al. 2022).

En conclusión, la biomasa de kéfir es una alternativa prometedora como un biosorbente ecológico y económico para el tratamiento de aguas residuales que contienen colorantes. Además, los microorganismos que la componen presentan un importante potencial biotecnológico para la degradación de colorantes textiles, lo que abre nuevas oportunidades en el desarrollo de estrategias sostenibles para el tratamiento de efluentes industriales.

Objetivos

El presente trabajo tiene como objetivo general la búsqueda de levaduras provenientes del kéfir con potencial para la remoción biológica de colorantes en efluentes textiles. Se espera que los resultados de este proyecto contribuyan a generar conocimientos necesarios para proponer soluciones al problema ambiental que representan los efluentes coloreados de origen textil.

Asimismo, este estudio busca desarrollar una estrategia de tratamiento biológico de efluentes textiles como una alternativa sostenible y amigable con el medio ambiente en comparación con los tratamientos convencionales. Otro aspecto de gran interés es el bajo costo económico del uso de levaduras para remover colorantes textiles.

Los objetivos específicos del presente trabajo son:

- Realizar un *screening* en placa para seleccionar levaduras capaces de decolorar los colorantes seleccionados
- Estudiar el efecto de diferentes factores en el crecimiento de las levaduras y su capacidad de decoloración
- Estudiar la cinética de remoción de los colorantes en cultivos sumergidos.
- Estudiar el proceso de remoción a una escala mayor en biorreactor tipo tanque agitado.
- Realizar ensayos de fitotoxicidad con semillas de *Lactuca sativa L.*

Capítulo 2. Materiales y métodos

2.1 Colorantes textiles

Durante la realización de este trabajo se utilizaron los siguientes colorantes textiles: Rojo Reactivo 141 (RR141), Negro Reactivo 5 (NR5), Verde Reactivo 19 (VR19), Naranja Reactivo 16 (NR16) y Violeta Reactivo 5 (VR5). Los cuales fueron gentilmente donados por la empresa ALCONIC SA.

Naranja Reactivo 16 (NR16)

Es un colorante azoico comercial comúnmente utilizado en la tinción de la seda y el algodón. Su estructura química se presenta en la figura 1. Se clasifica como un colorante monoazo. Su longitud de máxima absorbancia es de 495nm y su peso molecular es de 617,54 g/mol (Gomes et al. 2011; Jafari et al. 2014)

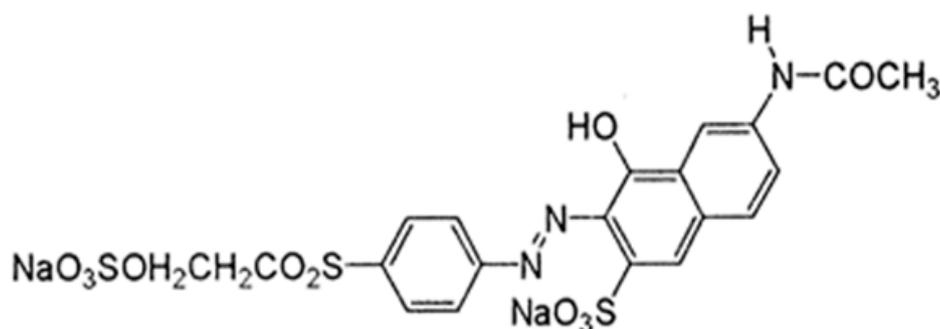


Figura 1: Estructura química del colorante azoico Naranja Reactivo 16 (NR16).

Rojo Reactivo 141 (RR141)

Este compuesto es un colorante azoico de uso comercial. Su estructura química se muestra en la figura 2. Pertenece a la clase de los diazo, con una longitud de máxima absorbancia de 543 nm y un peso molecular de 1774,19 g/mol (Jafari et al. 2014; Senasu et al. 2017).

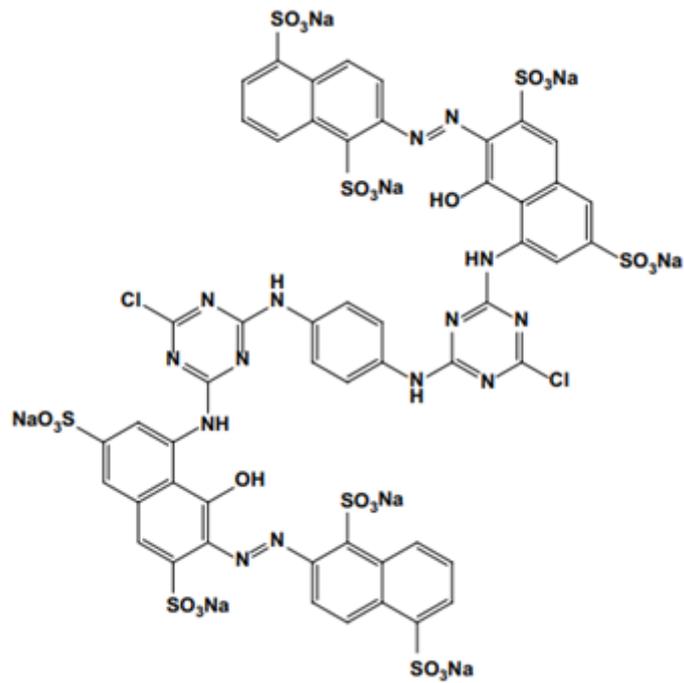


Figura 2: Estructura química del colorante azoico Rojo Reactivo 141 (RR141).

Negro Reactivo 5 (NR5)

Se trata de un colorante azoico utilizado comercialmente, cuya estructura química se ilustra en la figura 3. Está clasificado como un diazo, con una máxima absorbancia de 597 nm y un peso molecular de 991,82 g/mol (Doruk et al. 2013; Jafari et al. 2014).

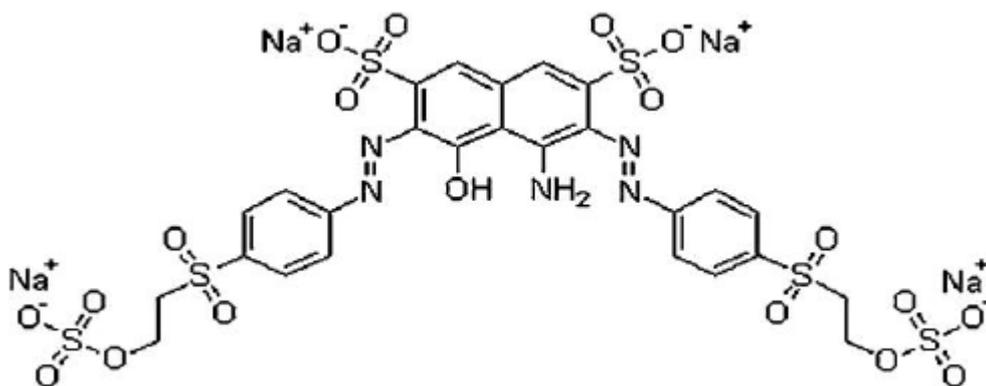


Figura 3: Estructura química del colorante azoico Negro Reactivo 5 (NR5).

Verde Reactivo 19 (VR19)

Este producto es un colorante azoico comercial, cuya estructura química aparece en la figura 4. Clasificado como diazo, tiene una longitud de onda máxima de absorción de 640 nm y un peso molecular de 1418,84 g/mol (Razali et al. 2018; Sane et al. 2018).

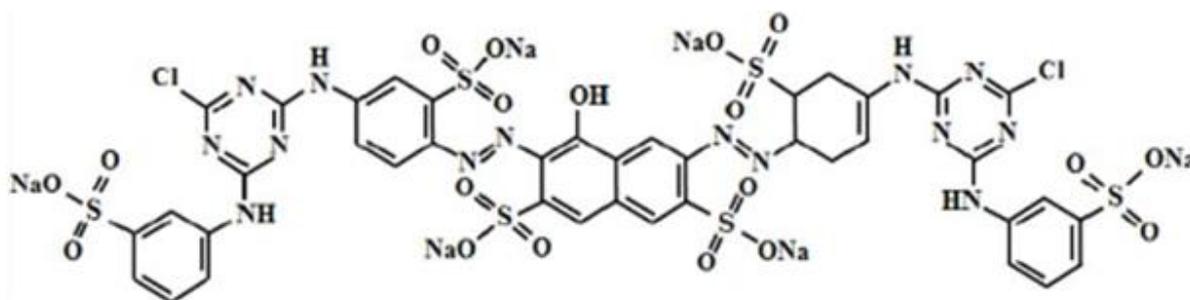


Figura 4: Estructura química del colorante azoico Verde Reactivo 19 (VR19).

Violeta Reactivo 5 (VR5)

Es un colorante azoico de carácter comercial, cuya estructura química se encuentra representada en la figura 5. Se clasifica dentro de los monoazo, con una máxima absorción a 550 nm y un peso molecular de 735,59 g/mol (Cabansag et al. 2013).

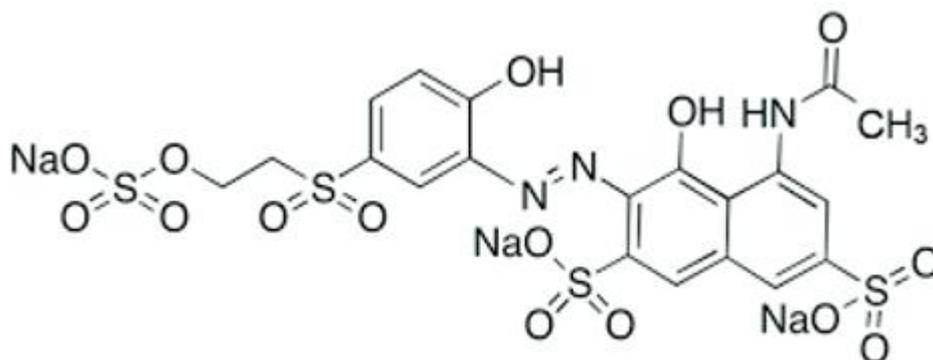


Figura 5: Estructura química del colorante azoico Violeta Reactivo 5 (VR5).

Las soluciones de colorante se preparaban pesando la cantidad de colorante deseada en una balanza y posteriormente disolviendo en agua destilada hasta alcanzar 5000 mg/L. Las soluciones finales fueron esterilizadas por filtración utilizando un filtro de 0,4 nm de poro.

2.2 Levaduras del kéfir

Se trabajó con una colección de 23 cepas de levaduras aisladas de kéfir de agua, diez de las cepas pertenecen al género y especie *Pichia membranifaciens*, cinco cepas pertenecen a *Pichia kudriavzevii*, cuatro cepas a *Geotrichum candidum*, tres a *Saccharomyces cerevisiae* y una cepa de *Candida boidinii* (Moure et al. 2023).

Las cepas se criopreservaron a -80°C.

2.3 Búsqueda de levaduras capaces de remover colorantes textiles – Screening en medio NDM

A fin de seleccionar aquellas levaduras capaces de remover colorantes textiles se realizó un primer estudio cualitativo en placa. Para este ensayo se utilizó un medio sólido conocido como *Normal decolorization media* (NDM) propuesto por Ramalho et al. (2004) (g/l): glucosa, 20; (NH₄)₂SO₄, 2.5; extracto de levaduras, 2.5; KH₂PO₄, 5; MgSO₄.7H₂O, 0.5; CaCl₂, 0.13; agar, 1.5. También se prepararon las soluciones de colorantes (Negro reactivo 5, Naranja reactivo 16, Violeta reactivo 5, Verde reactivo 19 y Rojo reactivo 141) posteriormente esterilizadas por filtración y agregadas, de manera individual al NDM agar antes de su gelificación en una concentración final de 100 mg/l. Luego, las pacas de NDM con los distintos colorantes fueron inoculadas con las levaduras en crecimiento activo provenientes de un medio YPD (Composición g/l: peptona, 5; extracto de levadura, 5; Dextrosa, 20) y se incubaron a 28 °C durante 72 h en oscuridad. Como control se incubó el medio NDM sin la adición de colorante.

El criterio de selección para continuar con los pasos siguientes de la investigación se basó en observar presencia de halo de decoloración alrededor de la colonia y que no

hubiera cambio de color en la misma. De esta manera se seleccionaron aquellas levaduras capaces de producir un halo de decoloración y que además no acumularan el colorante.

2.4 Estudio de la cinética de remoción de los colorantes VR5, NR5 NR16, RR141 y VR19 en cultivo sumergido

De las cepas que fueron con potencial para remover los cinco colorantes en el screening en placa se seleccionó para trabajar la cepa *Pichia membranifaciens* 16 y se llevó a cabo un ensayo cualitativo en medio líquido para confirmar que esta levadura mantuviera la capacidad de remover los colorantes observados en el screening en placa, ahora en cultivos sumergidos. Para ello, se utilizaron Erlenmeyers de 100 ml con 20 ml de medio de cultivo NDM a pH 6,0 con una concentración de cada colorante de 100 mg/l, inoculados con un cultivo *overnight* de Pm16. La degradación se evaluó mediante una comparación visual con un control (Erlenmeyer con 100mg/l colorante sin inocular), verificando la disminución en la intensidad del colorante. Los cultivos fueron incubados a 24 ± 2 °C de temperatura y con una agitación de 150 rpm. Se observó cómo evolucionaron los cultivos a lo largo del tiempo y se selecciono para trabajar en ensayos posteriores el colorante con el cual la levadura tardaba menos tiempo en decolorarlo.

2.5 Efecto de la temperatura en la remoción del colorante NR16

Se realizó un ensayo para determinar la temperatura óptima de crecimiento de la levadura *Pichia membranifaciens* 16 y la degradación del colorante. Se trabajó con Erlenmeyers de 100 ml con 20 ml de medio de cultivo NDM llevado a pH 6,0 con una concentración de 100 mg/l del colorante Naranja reactivo 16. Los Erlenmeyer, se inocularon con la misma densidad óptica (DO) utilizando un inóculo de levaduras en fase de crecimiento exponencial. Los ensayos se realizaron por duplicado y se incubaron a cuatro temperaturas distintas: 15, 22, 28 y 30 °C, con agitación constante a 180 rpm. Como control, se utilizó un cultivo con medio NDM sin colorante. Se tomaron muestras a distintos tiempos de cultivo y se evaluaron midiendo la DO a 600nm sin centrifugar, y la DO del sobrenadante a 495 nm.

2.6 Estudio de cinética de remoción del colorante NR16 a escala de Erlenmeyer

Para estudiar la cinética de crecimiento y de remoción del colorante NR16 por parte de la levadura Pm16 se utilizó Erlenmeyers de 250 ml que contenían 50 ml de medio NDM con una concentración final de colorante de 100 mg/l. Se inoculó el medio de cultivo con la levadura, proveniente de un inóculo overnight con una densidad óptica inicial DO_i de 1,0 y luego se incubó a 28° C con una agitación de 180 rpm. Se tomaron muestras a distintos tiempos para la determinación del crecimiento microbiano y para la determinación del porcentaje de decoloración.

El crecimiento microbiano se determinó indirectamente con la medida de la DO a 600nm en las muestras sin centrifugar.

Para cuantificar la remoción del colorante del medio de cultivo se realizó la medida del sobrenadante de las muestras utilizando un espectrofotómetro UV-VIS a 495nm que es la longitud de onda de absorbancia máxima del colorante NR16. Dicha disminución del colorante en el medio de cultivo se define como porcentaje de decoloración el cual se expresa como con la siguiente ecuación (Manogaran et al. 2021):

$$\text{porcentaje de decoloración} = \frac{(A_0 - A)}{A_0} \times 100$$

Donde A₀ es la absorbancia inicial del sobrenadante a 495nm del medio suplementado con el colorante y A es la absorbancia al tiempo t del sobrenadante a 495nm. (Pajot et al. 2007).

Posteriormente se realizó una curva de calibración del colorante para determinar las ppm remanentes del colorante en el cultivo en distintos tiempos, utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{ppm} = \frac{(\text{Amuestra} - \text{Abiotico})}{\text{pendiente}} - \text{ordenada al origen}$$

Además, se realizaron barridos espectrales de los sobrenadantes en muestras de diferentes tiempos dentro del rango de 200 a 800 nm, con el fin de observar la disminución de intensidad en el pico de absorbancia máxima y la posible aparición de otros picos dentro de las longitudes de onda estudiada. También se evaluó la aparición o disminución de absorbancia a 254 y 312 nm, valores que indican la presencia de aminas aromáticas generadas por procesos de degradación. Estos picos en el espectro representan los grupos benceno y naftaleno, respectivamente (Ong et al. 2012).

También se evaluó el consumo de glucosa a lo largo del tiempo midiendo la glucosa remanente mediante el uso de un kit Glucemia Wiener Lab.

2.7 Análisis del efecto de la concentración del colorante sobre el crecimiento y la remoción de este en el medio de cultivo

Con el objetivo de analizar el efecto de la concentración de colorante en el crecimiento de la levadura seleccionada, se realizó un ensayo cualitativo utilizando Erlenmeyers de 100 ml con 20 ml de medio de cultivo NDM llevado a pH 6,0 y diferentes concentraciones de colorante: 100, 200, 300 y 400 mg/l, agitados a 180 rpm a 28°C. Los ensayos se realizaron por duplicado y se utilizó como control un cultivo en medio NDM sin colorante. A cada tiempo de cultivo se evaluó la densidad óptica (DO) a 600nm sin centrifugar, y la DO del sobrenadante a 495 nm.

2.8 Escalado del estudio de decoloración en biorreactor de tipo tanque agitado

Siguiendo con el estudio del análisis cinético y estequiométrico de la decoloración del colorante NR16 por parte de la levadura Pm16, se realizó un escalado del proceso a un reactor tanque agitado utilizando el reactor BIOFLO 310 volumen útil 1.3l. Los cultivos se realizaron en medio NDM a 28°C con un pH de 5.75, en el caso en que se agregó colorante la concentración final fue de 100 mg/l.

Los cultivos se inocularon con una DO inicial de 0,5 y se realizaron toma de muestras gaseosas y líquidas en intervalos de tiempo definidos. Se monitorearon variables como la temperatura, rpm, el pH y el oxígeno disuelto.

Para la toma de muestra gaseosa se analizó el flujo de aire, el porcentaje de oxígeno a la entrada y salida, y la producción de CO₂.

Para la determinación del flujo de aire se utilizó un caudalímetro de burbuja el cual se conectó a la salida de gases del biorreactor. Utilizando un cronómetro se midió por triplicando el tiempo que una burbuja tarda en recorrer la distancia entre los aforos del caudalímetro. El volumen entre esos dos puntos es conocido siendo este de 198 ml. De modo tal que el flujo se define con la siguiente ecuación:

$$\text{Flujo } \left(\frac{\text{ml}}{\text{min}} \right) = \frac{\text{Volumen del caudalímetro}}{\text{promedio de tiempo}}$$

Por otro lado, el porcentaje del oxígeno a la entrada y salida se midió utilizando un detector paramagnético de O₂. Mientras que para el porcentaje de CO₂ a la salida se utilizó un detector infrarrojo de CO₂.

Teniendo en cuenta estos valores junto con la temperatura ambiente, el volumen líquido y el flujo se pudo calcular la velocidad volumétrica de consumo de O₂ (rO₂) y la velocidad volumétrica de producción de CO₂ (rCO₂) mediante las siguientes ecuaciones:

$$rO_2 = \frac{F * (XN_2) * P}{Vl * R * T} * \left(\frac{\%O_{2in}}{100 - \%O_{2in}} - \frac{\%O_{2out}}{100 - \%O_{2out} - \%CO_{2out}} \right)$$

$$rCO_2 = \frac{F * (XN_2) * P}{Vl * R * T} * \left(\frac{\%CO_{2out}}{100 - \%O_{2out} - \%CO_{2out}} \right)$$

Tanto el consumo total del oxígeno como la producción total de CO₂ se obtuvieron calculando el área bajo la curva de rO₂ y rCO₂ respectivamente.

Posteriormente de la muestra gaseosa se realiza la toma de la muestra líquida. Para esto se tomó un volumen (15ml aproximadamente) conocido del cultivo procesándose de igual manera que lo expuesto para los ensayos en Erlenmeyer, es decir, se determinó la

DO, el pH, la absorbancia del sobrenadante a 495 nm, la concentración de glucosa y la biomasa. Esta última se determinó mediante peso seco a 110°C siempre utilizando una alícuota de 10ml del cultivo.

2.9 Bioensayo de fitotoxicidad

Por último, se realizó un ensayo de fitotoxicidad para evaluar cómo afectaba la presencia de los productos generados durante la degradación del colorante NR16 por medio de la levadura Pm16 en la germinación y en el desarrollo de la raíz de semillas de *Lactuca sativa L.* Para este bioensayo de toxicidad aguda en semillas de *Lactuca sativa L.* se siguieron los protocolos reportados por Standard Methods 18th Edition (1992)

Para realizar este ensayo se utilizaron sobrenadantes de muestras de los cultivos en biorreactores con presencia de colorante que fueron tomadas a distintos tiempos y conservadas a -20°C hasta el momento de la realización del mismo.

Se preparó una serie de placas de Petri de 9 cm de diámetro con doble papel de filtro, sobre las cuales se distribuyeron uniformemente 20 semillas de *Lactuca sativa L.* A cada placa se le agregaron 5 ml de los sobrenadantes, en concentraciones de 100% y diluciones al 50%, 25% y 10%. Todas las condiciones se realizaron por cuatuplicado. Las placas se incubaron en oscuridad a 24 °C durante 5 días. Como control negativo de toxicidad se empleó agua destilada, y como control positivo una solución de ZnSO₄ a 500 mg/l.

Se midió el porcentaje de germinación y la longitud de las radículas e hipocótilos. También se observaron las características que presentaban las plántulas, tales como 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.

Con el conjunto de medidas se realizó el cálculo del promedio y la desviación estándar para cada medida de la radícula e hipocótilo correspondiente a cada muestra y

dilución. Y con esto se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento de la radícula mediante la siguiente ecuación:

$$\%inhibición = \left(\frac{\text{medida de elongación radícula blanco} - \text{medida de elongación radícula } x}{\text{medida de elongación radícula blanco}} \right) * 100$$

Por último, se construyó una curva de porcentaje de inhibición en función del logaritmo decimal de la concentración de colorante en milimoles. A partir de esta curva se determinó la concentración inhibitoria capaz de impedir la elongación de la radicular en un 50% de las plántulas de *Lactuca sativa L.* (IC50). Además, se calcularon índice de germinación (GI%) y el índice de crecimiento relativo (RGI) mediante las siguientes ecuaciones (Young et al. 2011; Ruscasso et al. 2021):

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

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

- RLC es la longitud de la radícula del control
- RLS la longitud radicular de las muestras
- GSC: número de semillas germinadas del control
- GSS: número de semillas germinadas de las muestras

Capítulo 3. Resultados y discusión

3.1 Búsqueda de levaduras capaces de remover colorantes textiles – Screening en medio NDM

El criterio utilizado para determinar si una cepa de levadura era capaz de remover el colorante se basó en dos observaciones: la ausencia de colorante en la colonia visto desde la parte frontal de la placa y la presencia de un halo en la parte posterior de la placa, indicando la actividad degradativa de la cepa (figura 6). Cabe aclarar que este criterio de selección sobre la capacidad de un microorganismo de remover colorantes textiles permite hacer una primera selección, luego debe ser confirmado por diferentes estudios tales como determinación e identificación de los productos de degradación presentes en los sobrenadantes del medio de cultivo, etc. Como fue realizado en el trabajo de Russcaso y col. (2018) donde se realizó un HPLC en los sobrenadantes a diferentes tiempos de cultivo con el objetivo de identificar los productos generados luego de la remoción del colorante.

En la Tabla 1, las levaduras que cumplieron con el criterio fueron marcadas con "sí", mientras que aquellas que no lo cumplieron se identificaron con "no". A partir de esta información, se calculó el porcentaje de levaduras capaces de remover el colorante textil estudiado.

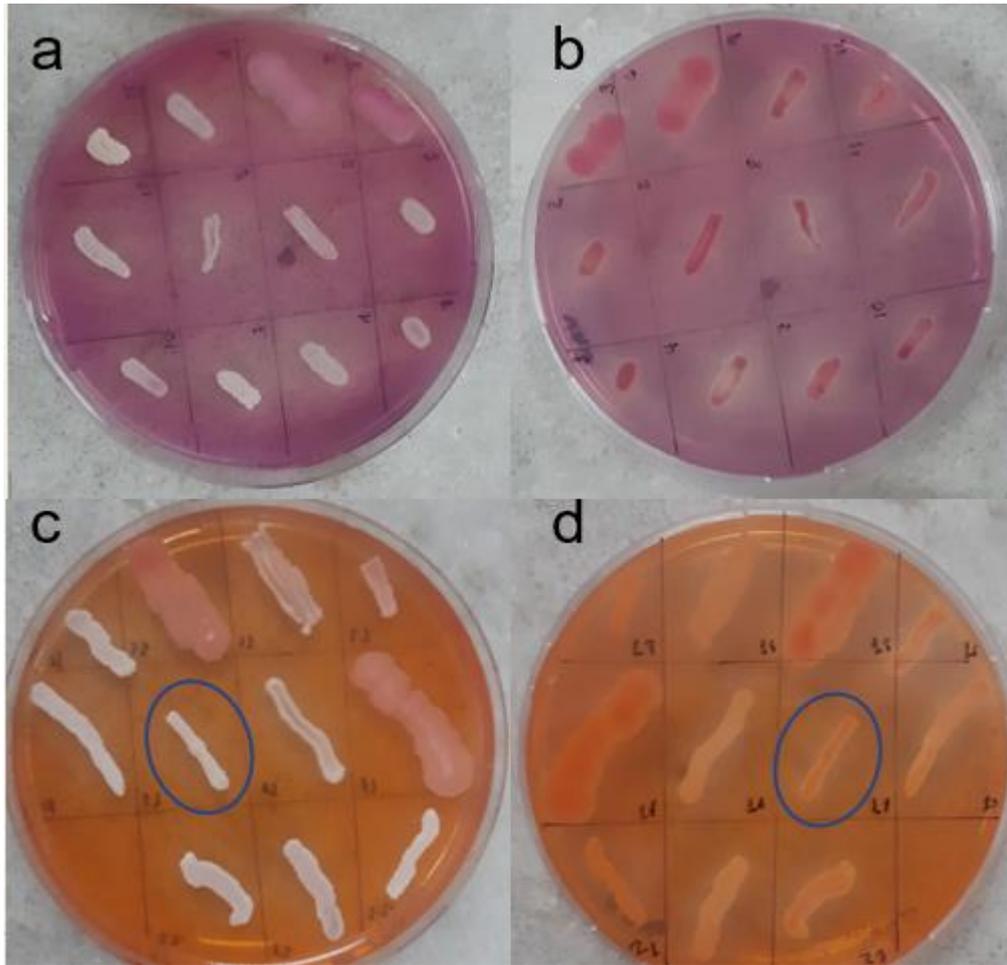


Figura 6: Placas con colorantes correspondientes al screening en placa: **a.** placa con colorante VR5 vista de forma frontal. **b.** placa con colorante VR5 vista desde la parte posterior de la placa. **c.** placa con colorante NR16 vista de forma frontal resaltado en azul la cepa Pm16. **d.** placa con colorante NR16 la parte posterior de la placa resaltado en azul la cepa Pm16.

levadura	Negro reactivo 5	Rojo reactivo 141	Verde reactivo 19	Violeta reactivo 5	Naranja reactivo 16
<i>Pichia membrifaciens</i> 18	si	si	si	si	si
<i>Pichia membrifaciens</i> 16	si	si	si	si	si
<i>Pichia membrifaciens</i> 32	si	no	si	no	si
<i>Pichia membrifaciens</i> 29	si	no	si	si	no
<i>Pichia membrifaciens</i> 24	si	si	si	si	si
<i>Pichia membrifaciens</i> 21	si	no	si	si	si
<i>Pichia membrifaciens</i> 5	si	si	si	no	si
<i>Pichia membrifaciens</i> 11	si	si	si	no	si
<i>Pichia membrifaciens</i> 9A	si	si	no	si	si
<i>Pichia membrifaciens</i> 17	si	no	si	si	si
<i>Pichia kudriavzevii</i> 25	si	no	no	no	si
<i>Pichia kudriavzevii</i> 20	si	no	no	si	si
<i>Pichia kudriavzevii</i> 14	si	no	no	si	si
<i>Pichia kudriavzevii</i> 27	si	no	no	si	si
<i>Pichia kudriavzevii</i> 23	si	no	no	si	si
<i>Geotrichum candidum</i> 31	no	si	no	no	no
<i>Geotrichum candidum</i> 2	no	no	no	no	no
<i>Geotrichum candidum</i> G	no	no	si	no	no
<i>Geotrichum candidum</i> 30	no	no	no	no	no
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 33	no	no	no	no	si
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 35	no	no	no	no	no
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 9B	no	no	no	no	no
<i>Candida boidinii</i> 37	si	no	no	no	no

Tabla 1: Listado de microorganismos estudiados y su capacidad de degradar el colorante o no en función del criterio antes descrito. Aquellas cepas que cumplen con el criterio se considera que si removían el colorante mientras que las que no cumplen el criterio se considera que no removían el colorante.

De las 23 levaduras estudiadas, el 69.5% fueron capaces de remover el colorante Negro reactivo 5, siendo que todas las cepas de *Pichia membranifaciens* y *Pichia kudriavzevii* fueron capaces de decolorarlo. El Naranja reactivo 16 fue removido por el 62.2% de las levaduras, mientras que el Violeta reactivo 5 y el Verde reactivo 19 fueron removidos por el 47.8% y 43.5% de las cepas, respectivamente, destacando entre las levaduras que más los decoloraron, las cepas de *P. membranifaciens*. Finalmente, el Rojo reactivo 141 tuvo el menor porcentaje de levaduras capaces de decolorarlo siendo este solo el 30%.

Con base en los resultados obtenidos, el colorante con menor porcentaje de levaduras capaces de removerlo fue el Rojo reactivo 141, mientras que los colorantes Negro reactivo 5 y Naranja reactivo 16 fueron los más removidos por las levaduras. Esto podría atribuirse a las características químicas de cada colorante; el colorante Rojo reactivo 141, al ser más complejo y de mayor peso molecular, es menos susceptible a la degradación por levaduras.

Por otro lado, las cepas de *Pichia membranifaciens* demostraron tener la capacidad de remover la mayoría de los colorantes estudiados, lo que sugiere que podrían tener un amplio espectro de acción frente a diferentes tipos de colorantes textiles. En particular, las cepas Pm16, Pm18 y Pm24 fueron capaces de remover del medio sólido los cinco colorantes evaluados. Las cepas de *P. kudriavzevii* también mostraron una buena capacidad degradadora, especialmente en los colorantes Negro reactivo 5, Naranja reactivo 16 y Violeta reactivo 5, aunque no mostraron capacidad de decolorar los colorantes Verde reactivo 19 y Rojo reactivo 141.

En contraste, las cepas de *Geotrichum candidum* y *Saccharomyces cerevisiae* presentaron un menor potencial para remover colorantes textiles. Dos de las cuatro cepas de *Geotrichum candidum* y dos de las tres cepas de *Saccharomyces cerevisiae* no lograron remover ningún colorante siendo que las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* bioacumulaban varios de los colorantes pero no los removían, mientras que las otras dos cepas de *G. candidum* y la cepa de *S. cerevisiae* que fueron capaces de remover algún colorante lo hicieron solo con uno cada una.

Como ya se ha mencionado antes, este no es el primer trabajo en el que se reportan levaduras con capacidad de remover colorantes, entre las levaduras reportadas con mayor potencial se encuentran los géneros *Candida*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Trichosporon*, *Debaryomyces*, *Cryptococcus* y *Kluyveromyces* (Sampaio et al. 2018; Al-Tohamy et al. 2022).

En estudios realizados por Pajot et al. (2007) se ha encontrado que aislamientos de levaduras provenientes de Laurel del Monte y suelos subyacentes eran capaces de remover colorantes textiles en placas de agar. Se utilizaron placas con colorantes para evaluar las levaduras aisladas, y se observaron halos incoloros o menos coloreados alrededor de las colonias como un parámetro cualitativo de la capacidad de decoloración. Se buscó una asociación entre la alta eliminación del colorante (según el tamaño del halo) y una baja tinción de las colonias, lo que indicaría levaduras con mayor potencial de biodegradación. Encontraron que el colorante Rojo reactivo 141 era el más recalcitrante y difícil de degradar, además de que las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* no degradaban, sino que bioacumulaban, lo que coincide con los resultados obtenidos en este trabajo. En otra investigación realizado por el mismo autor se encontró que nueve aislamientos de

levaduras provenientes de muestras de aguas residuales y 17 aislamientos de Las Yungas mostraron potencial de decoloración de colorantes azoicos, pero a diferencia de los resultados obtenidos en este trabajo, Pajot encontró cepas de *Pichia kudriavzevii* capaces de remover el colorante Rojo reactivo 141 (Pajot et al. 2010).

Actualmente, no se han encontrado estudios específicos que hayan investigado la capacidad de *Pichia membranifaciens* para degradar colorantes azoicos.

3.2 Estudio de la cinética de remoción de los colorantes VR19, VR5, RR141, NR5 y NR16 en cultivo sumergido

De las 3 cepas *P. membranifaciens* capaces de remover los 5 colorantes se seleccionó a la levadura Pm16 y se realizó una comprobación de que en medio líquido fuese realmente capaz de remover los cinco colorantes textiles en estudio. En base a conocimientos previos del grupo de trabajo se comenzó el estudio con una concentración de glucosa como fuente de carbono y energía de 20 g/l (figura 7), en esta condición la levadura fue capaz de decolorar completamente a los colorantes menos complejos como el Naranja reactivo 16 y el Negro reactivo 5, mientras que los medios de cultivo suplementados con los colorantes Violeta reactivo 5, Verde reactivo 19 y Rojo reactivo 141, colorantes cuya estructura es más compleja la decoloración resultó ser menor como se observa en la figura 8. Por lo que para estos últimos los colorantes se aumentó la concentración de glucosa en el medio de cultivo 30 g/l y 40 g/l. Y como se puede observar en las figuras 9, 10 y 11 el aumento de la concentración de glucosa también provocó un aumento en la remoción del colorante.

Coincidiendo con este trabajo, el aumento en el porcentaje de remoción del colorante al aumentar la concentración de glucosa se ha evidenciado antes en trabajos como el de Jafari et al. (2014) donde se observó que la eficiencia de decoloración del colorante Negro reactivo 5 por la cepa JKS6 aumentaba cuando aumentaba la concentración de glucosa. Esto se debe a que la asimilación de una fuente de carbono como la glucosa proporciona a las células de levadura el poder reductor necesario para la decoloración. De manera coincidente, Al-Tohamy et al. (2023) también informó que la

adición de fuentes de carbono, como glucosa, es necesaria para mejorar la eliminación de colorantes azoicos, o bien, que su presencia potencia significativamente el proceso. En este estudio, se destacó que la máxima remoción del colorante Negro reactivo 5 se logró utilizando glucosa entre las diversas fuentes de carbono evaluadas.

El aumento de la concentración de glucosa en el medio de cultivo puede mejorar la capacidad de una levadura para degradar colorantes azoicos, ya que la glucosa actúa como fuente de carbono y energía favoreciendo tanto el crecimiento celular como la actividad metabólica de la levadura. La degradación de los colorantes azoicos requiere la reducción de los enlaces azo ($-N=N-$), un proceso llevado a cabo por enzimas azo-reductasas. Estas enzimas dependen de los cofactores NADH o NADPH, los cuales se generan durante el catabolismo de la glucosa, lo que explica el efecto positivo del aumento de la concentración de glucosa en la capacidad de remoción de los colorantes azoicos por parte de las levaduras.



Figura 7: Erlenmeyers de cultivo sumergido al tiempo inicial del experimento, utilizando una concentración de 100 mg/l de colorantes. De izquierda a derecha, los colorantes empleados son: VR19, VR5, RR141, NR5 y NR16.



Figura 8: Erlenmeyers de cultivo sumergido al tiempo final del experimento (luego de 24hs), utilizando una concentración de 100 mg/l de colorantes. De izquierda a derecha, los colorantes empleados son: VR19, VR5, RR141, NR5 y NR16.



Figura 9: Erlenmeyers de cultivo sumergido al tiempo final del experimento (luego de 24hs), utilizando una concentración de 100 mg/l de colorante VR19. A la izquierda se encuentra el Erlenmeyer con 40 g/l de glucosa y a la derecha el Erlenmeyer con 30 g/l de glucosa



Figura 10: Erlenmeyers de cultivo sumergido al tiempo final del experimento (luego de 24hs), utilizando una concentración de 100 mg/l de colorante RR141. A la izquierda se encuentra el Erlenmeyer con 40 g/l de glucosa y a la derecha el Erlenmeyer con 30 g/l de glucosa



Figura 11: Erlenmeyers de cultivo sumergido al tiempo final del experimento (luego de 24hs), utilizando una concentración de 100 mg/l de colorante VR5. A la izquierda se encuentra el Erlenmeyer con 40 g/l de glucosa y a la derecha el Erlenmeyer con 30 g/l de glucosa

Diversos estudios han reportado la capacidad de levaduras para la remoción de los colorantes evaluados en este trabajo, colorantes como el Rojo reactivo 141 y el Negro reactivo 5 ya fueron estudiados en trabajos como el de Martorell et al. (2012) donde demostraron que cepas de levaduras como *Candida sp.* MM 4035, *T. porosum* MM 4037 *B. californica* MM 4018 y *Saturno* MM 4034 eran capaces de remover ambos colorantes en cultivos líquidos con 200 mg/l de colorante en medio NDM (glucosa 20g/l) después de 24 hs a 25 °C, mientras que estudios realizados por Do Nascimento et al. (2013) informaron que *Candida rugosa* INCQS 71011 removió el colorante Rojo reactivo 141 en 24 horas de tratamiento con una concentración de glucosa de 20g/l. Por último, un estudio realizado por Ruscasso et al. (2022) reportó resultados utilizando levaduras antárticas para la remoción del colorante Negro reactivo 5 también en medio NDM (glucosa 20g/l), en donde luego de 24 horas de cultivo, las levaduras *Candida sake* 41E, *Cystofilobasidium infirmominiatum* F13E y *Leucosporidium muscorum* F20A fueron capaces de remover el colorante.

En el caso de los colorantes Naranja reactivo 16 y el Violeta reactivo 5 su remoción ha sido evaluada en trabajos como el realizado por Sampaio et al. (2018) donde se evaluó la capacidad de remover los colorantes de aislamientos de levaduras de humedales forestales mediterráneos utilizando glucosa como fuente de carbono y energía, en donde llega a la conclusión de que la capacidad de las levaduras para remover los colorantes azoicos estudiados depende de varios factores como la estructura del colorante, la especie pudiendo variar entre cepas.

Por último, en el caso del colorante Verde reactivo 19 aún no se han encontrado reportes de levaduras con capacidad de degradarlo.

3.3 Efecto de la temperatura en la remoción del colorante NR16

El ensayo cualitativo de crecimiento a diferentes temperaturas de la levadura Pm16 en presencia de 100 mg/l de colorante NR16 dio como resultado, un bajo crecimiento a 15 y 22 °C y donde el porcentaje de remoción del colorante fue prácticamente nulo (figuras 12 y 13). Mientras que a 28 y 30°C la levadura creció y fue capaz de remover el colorante en más de un 95% siendo a 28 °C la temperatura donde el crecimiento y la remoción fue máxima.



Figura 12: Erlenmeyers de cultivo sumergido al tiempo inicial. De izquierda a derecha se muestran los cultivos realizados a diferentes temperaturas.



Figura 13: Erlenmeyers de cultivo sumergido al tiempo final. De izquierda a derecha se muestran los cultivos realizados a diferentes temperaturas: 15 °C, 22 °C, 28 °C y 30 °C.

Ya existen diversos estudios donde se evalúa cómo afecta la temperatura a el porcentaje de remoción de colorante y al crecimiento microbiano. Uno de esos estudios es el de Bolívar Correa et al. (2023), donde se evaluó la remoción del colorante Azul Novasyn Luz BLR en condiciones de agitación constante a 120 rpm, utilizando un pH de 4.0 y dos temperaturas de incubación: 25°C y 35°C, a concentraciones de colorante de conocidas. Los resultados mostraron que la cepa de *Candida rugosa* y la de *Kloeckera spp.* presentaban porcentajes de remoción de colorantes similares en ambas temperaturas. Mientras que para cepas de *Candida Guillermondi* la diferencia fue significativa pasando de un porcentaje de remoción de colorante de aproximadamente el 45% a 25°C a un porcentaje de mas del 90% a 37 °C.

En la investigación de Jafari et al. (2014), se estudió la decoloración del colorante RB5 por la cepa JKS6, utilizando una concentración inicial de colorante de 200 mg/l, en condiciones de agitación a 150 rpm y diferentes temperaturas. Se encontró que la temperatura óptima para la decoloración fue de 32°C.

En general, como la remoción del colorante esta fuertemente asociado a la producción del NADH, la temperatura optima de remoción va a ser aquella en la cual el crecimiento de la levadura sea optimo.

3.4 Estudio de cinética de remoción del colorante NR16 a escala de Erlenmeyer

Se realizó un estudio de la cinética de remoción del colorante NR16 usando la cepa Pm16. El crecimiento microbiano se determinó indirectamente con la medida de la DO a 600nm en las muestras sin centrifugar y para cuantificar la remoción del colorante del medio de cultivo se realizó la medida del sobrenadante de las muestras utilizando un

espectrofotómetro UV-VIS a 495nm. Adicionalmente se hizo un seguimiento de la concentración de glucosa en el medio a lo largo del cultivo.

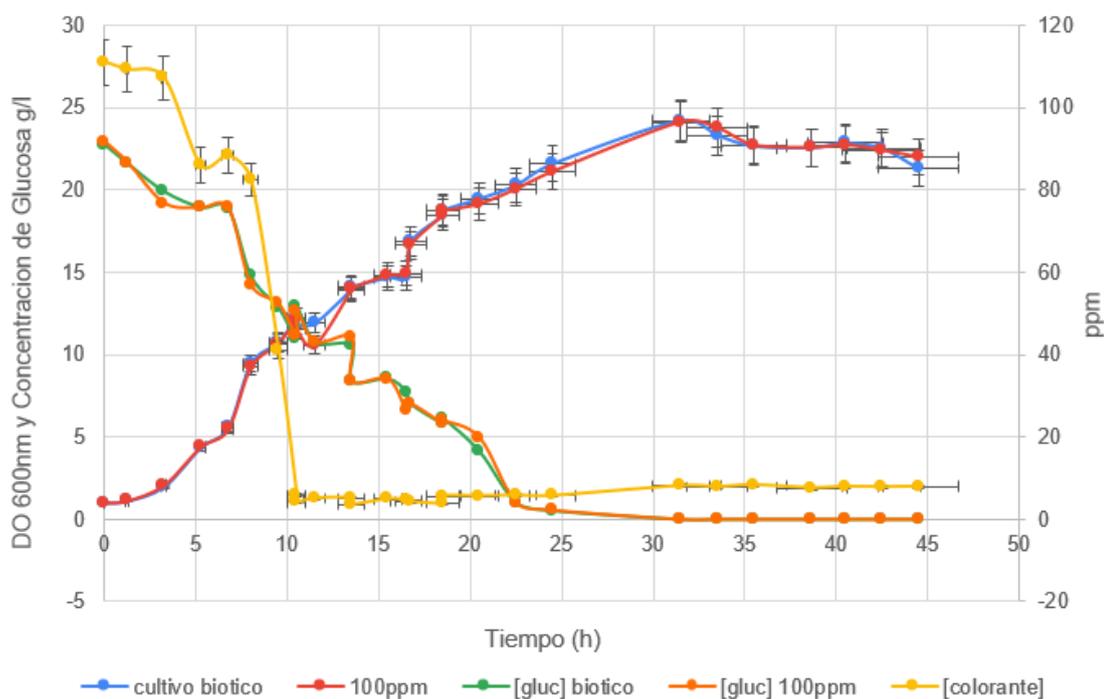


Figura 14: Grafico donde se ilustra el cambio a lo largo del tiempo del estudio de cinética de remoción del colorante NR16 por la cepa Pm16 a escala de Erlenmeyer de: la DO cultivo biótico (celeste), la DO cultivo suplementado con 100 mg/l de NR16 (rojo), la concentración de glucosa del cultivo biótico (verde), la concentración de glucosa del cultivo suplementado con 100 mg/l de NR16 (naranja) y la caída de las ppm del cultivo suplementado con 100 mg/l de NR16 (amarillo).

En la figura 14, se observa la curva de crecimiento de la levadura Pm16 bajo dos condiciones experimentales: un cultivo biótico y un cultivo con la adición de 100 mg/l del colorante NR16. Para ambos casos, se calculó la velocidad máxima de crecimiento en la fase exponencial del cultivo. En el caso del control biótico, se determinó que μ_{max} es igual a $0,27 \pm 0,07 \text{ h}^{-1}$, en tanto que, para el cultivo con la adición del colorante NR16, se obtuvo un valor de μ_{max} de $0,26 \pm 0,07 \text{ h}^{-1}$, lo que sugiere que la presencia del colorante no generó un impacto significativo en la velocidad máxima de crecimiento de la levadura.

En el cultivo suplementado con colorante, se observó que al cabo de 26 horas se alcanzó un 95% de decoloración del medio, logrando reducir la concentración del colorante de 100 mg/l a 6 mg/l. Este proceso de decoloración se representa en la curva

amarilla del gráfico, la cual muestra una correlación directa entre el incremento en la biomasa de la levadura y la disminución abrupta de la concentración de colorante en el medio.

Adicionalmente, también se evaluó la variación de la concentración de glucosa en ambos cultivos a lo largo del tiempo. Al inicio del experimento, la concentración de glucosa fue de 20 g/l en ambas condiciones, y se observó una disminución hasta llegar a valores prácticamente indetectables (0 g/l) a las 30 horas de cultivo. Este comportamiento fue similar tanto en el cultivo control como en el cultivo con colorante.

En estudios anteriores ya se ha reportado que la velocidad de crecimiento puede no verse afectada por la presencia de colorante del mismo modo que ocurre en este trabajo. Uno de estos casos es en el estudio de Ramalho et al. (2004) donde se encontró que la tasa de crecimiento específica ($0.32 \pm 0.03 \text{ h}^{-1}$) no se vio afectada significativamente por la presencia de los colorantes en las concentraciones utilizadas. Esto sugiere que, en las condiciones del experimento, los colorantes no alteraron la velocidad máxima de crecimiento de este microorganismo. Del mismo modo en el estudio de Bulacio Gil et al. (2018), no se evidenció inhibición en el crecimiento en presencia del colorante Negro Reactivo 5 en el medio NDM1 (en g/l: glucosa, 20; extracto de levadura, 2,5; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,5; KH_2PO_4 , 5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,5; CaCl_2 , 0,13) para *T. chiarellii*, *T. akiyoshidainum* HP-2023 y *T. porosum* 4029 siendo similares los perfiles de crecimiento al control sin colorante.

Pero también hay estudios donde la presencia del colorante puede resultar tóxico para el microorganismo como el caso de la investigación llevada a cabo por Nilanjana et al (2012) donde se evaluó la influencia de la concentración del colorante Basic Violet 3 sobre la tasa de crecimiento específico de *P. fermentans* MTCC 189 y se encontró que la tasa de crecimiento específico disminuía al aumentar la concentración del colorante, lo que sugiere que el colorante ejerce un efecto tóxico a concentraciones más altas y afecta la velocidad de crecimiento de la levadura.

En la figura 15 se puede observar el barrido espectral de absorción al tiempo cero del cultivo control y el cultivo con 100 mg/l de NR16. La presencia del colorante genera un pico a 495nm que corresponde al cromóforo del colorante, es decir, el enlace azo,

además en las longitudes 200-300nm también hay picos más marcados que corresponde a la presencia de benceno sustituido (Ruscasso et al. 2021)

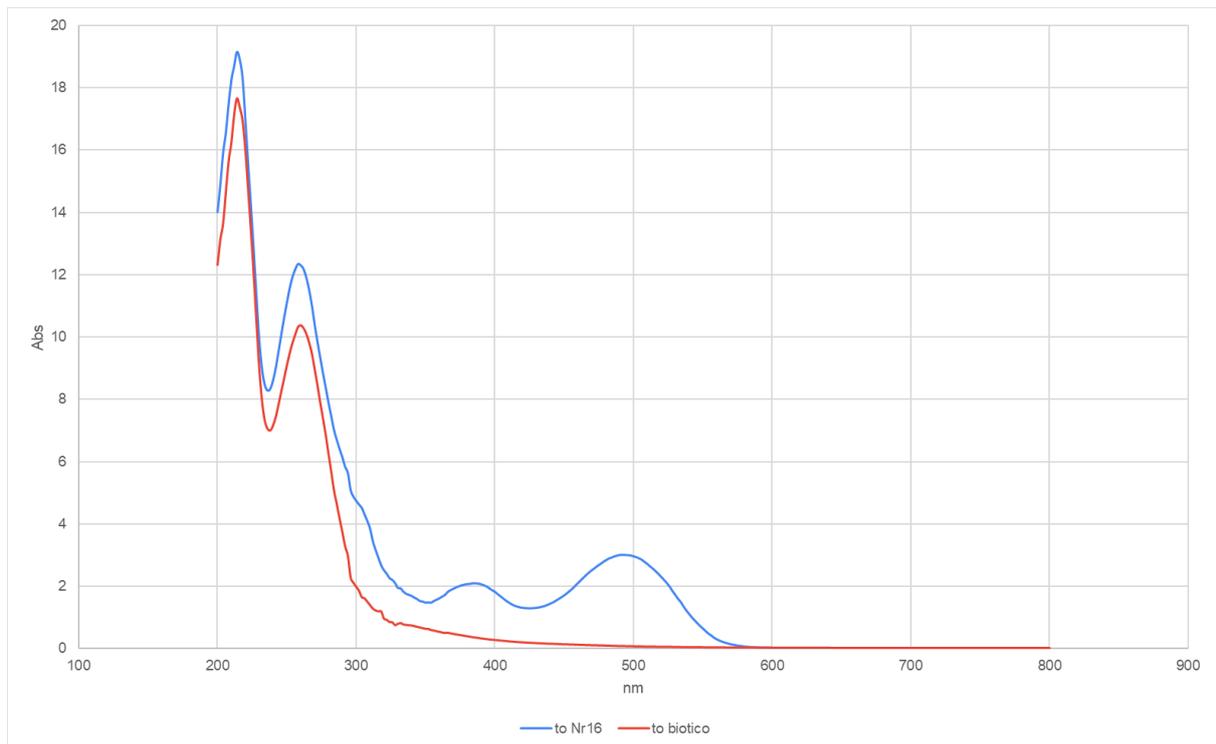


Figura 15: Barrido de UV-VIS del sobrenadante del cultivo control (rojo) y del tiempo inicial de cultivo con 100 mg/l de NR16 (azul)

También se realizaron espectros de absorción del sobrenadante del cultivo a los tiempos de 8hs, 22hs y 48hs de cultivo, siendo el porcentaje de degradación 59%, 97% y 93% respectivamente. En dicho gráfico podemos observar una disminución de la absorbancia a 495 nm (figura 16) lo que implica una ruptura del enlace azo del colorante. Por otro lado, hay una pequeña disminución de los picos comprendidos entre 200-300nm lo que indicaría una posible mineralización parcial del colorante.

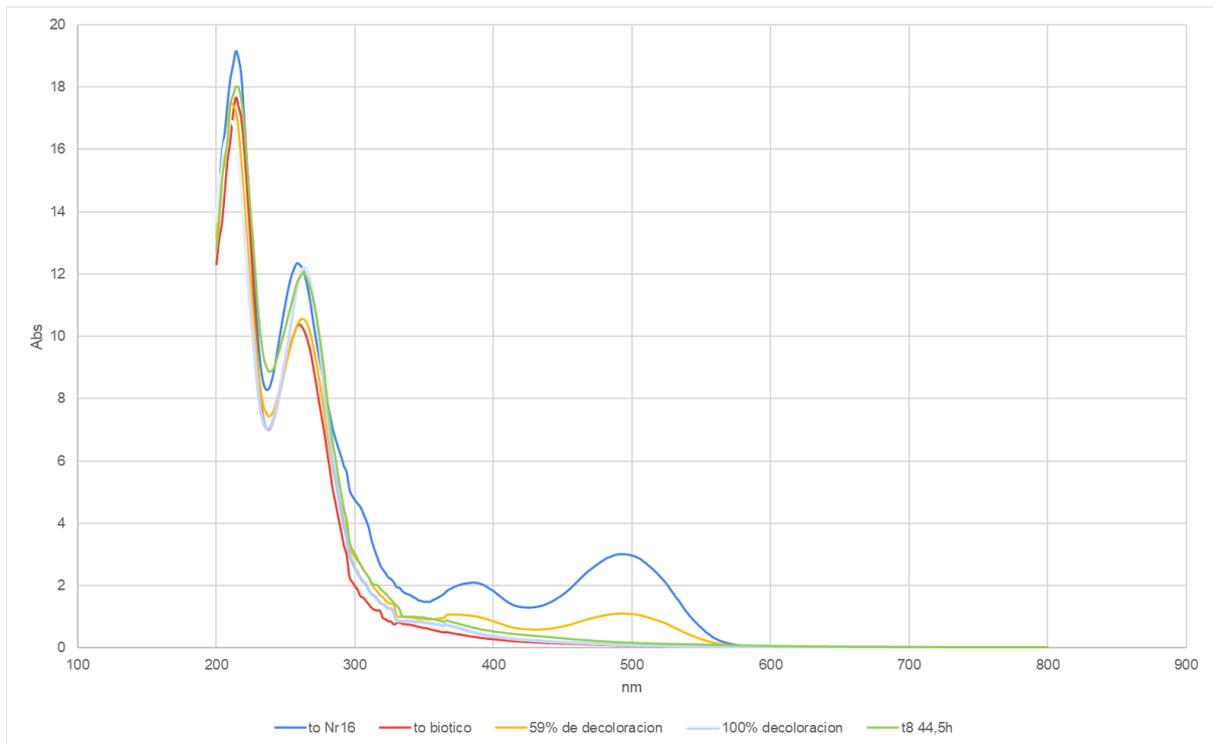


Figura 16: Barrido de UV-VIS del sobrenadante del cultivo control (rojo), del tiempo inicial de cultivo con 100 mg/l de NR16 (azul), un tiempo al 56% de decoloración a 9,5hs (amarillo), un tiempo al 100% de decoloración 10,5 hs (celeste) y un tiempo final a las 44,5hs (verde)

Al igual que en este trabajo en el estudio realizado por Rosu et al. (2018), se reportó que la intensidad de los picos detectados a 250nm no disminuyeron, lo cual sugeriría que la mineralización del colorante no fue completa. Por otro lado, el trabajo realizado por Madhuri et al. (2011) en donde utilizaron un cultivo de *Enterococcus faecalis*, alcanzando un 97,24% de porcentaje de remoción del NR16 a las 3,5h a una concentración inicial de 50 mg/l, 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.

3.5 Análisis del efecto de la concentración del colorante sobre el crecimiento y la remoción de este en el medio de cultivo

En las figuras 19, 20 y 21 podemos observar el ensayo de crecimiento de la levadura Pm16 y la remoción del colorante NR16 a distintas concentraciones de este. Se

pudo observar que el crecimiento de la levadura no sólo no se inhibe por la presencia de altas concentraciones de colorante, sino que además la velocidad de crecimiento no se vio afectada siendo para los cuatro cultivos aproximadamente de $0,26 \text{ h}^{-1}$, la cual fue calculada a partir de los datos de la figura 18. También, como se muestra en la figura 17, se llegó a un porcentaje de degradación de casi el 100% en todas las concentraciones con la única diferencia de que a concentraciones más altas se requería de un mayor tiempo.

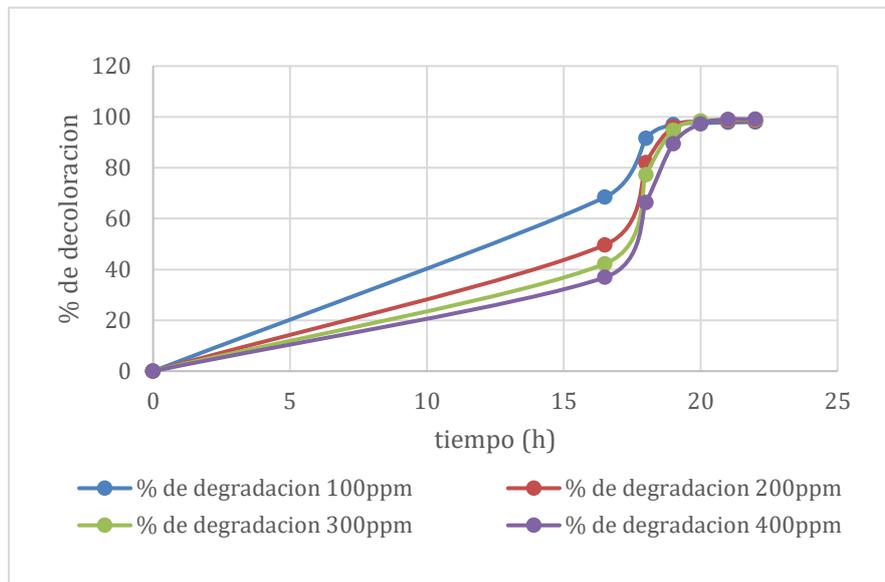


Figura 17: Grafico del porcentaje de decoloración en los distintos tiempos de cultivo para las distintas concentraciones de colorante.

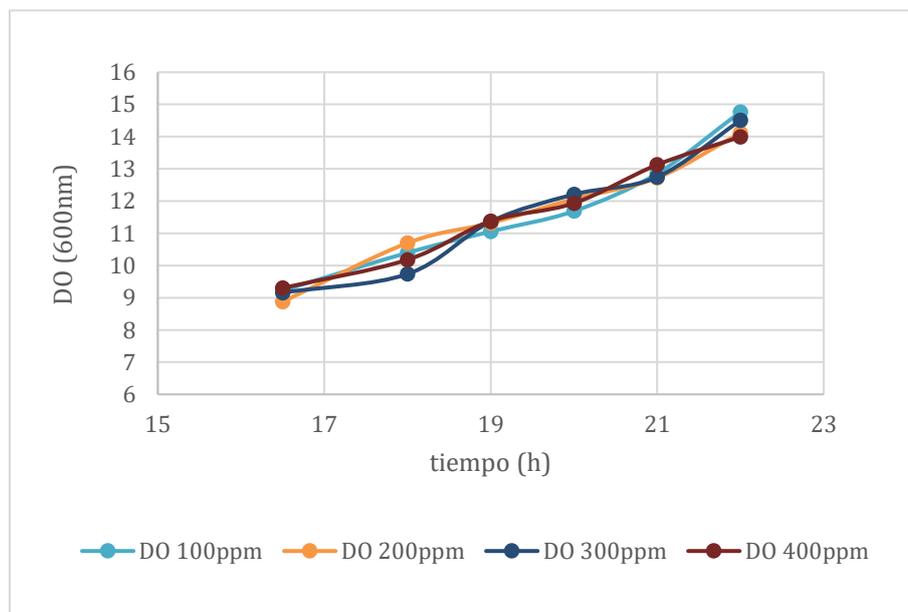


Figura 18: Grafico de la DO (600nm) en los distintos tiempos de cultivo para las distintas concentraciones de colorante.



Figura 19: Erlenmeyer de cultivo sumergido en el tiempo inicial. De izquierda a derecha cultivo control, cultivo con 100 mg/l, cultivo con 200 mg/l, cultivo con 300 mg/l y cultivo con 400 mg/l.



Figura 20: Erlenmeyer de cultivo sumergido en el tiempo intermedio (18hs). De izquierda a derecha cultivo control, cultivo con 400 mg/l, cultivo con 300 mg/l, cultivo con 200 mg/l y cultivo con 100 mg/l.



Figura 21: Erlenmeyer de cultivo sumergido en el tiempo final (24hs). De izquierda a derecha cultivo control, cultivo con 400 mg/l, cultivo con 300 mg/l, cultivo con 200 mg/l y cultivo con 100 mg/l.

Ya se han reportado estudios donde evalúan el efecto de la variación de concentración de colorante en el crecimiento microbiano, siendo uno de estos el estudio de Rosu et al. (2018) donde investigan la remoción de este mismo colorante empleando *Pichia kudriavzevii* con 30 g/l de glucosa como fuente de carbono. En dicho estudio, se logró la remoción total (100%) del colorante en 24 horas para una concentración inicial de 50 mg/l, mientras que, al incrementar la concentración a 400 mg/l, la remoción fue del 95% luego de 72 horas de cultivo.

En el caso de la investigación de Ruscasso et al. (2022), se evaluó el efecto de la concentración de colorante en el crecimiento de la levadura *Leucosporidium muscorum F20A* en medio NDM con 20g/l de glucosa. Se utilizaron concentraciones de colorante Negro Reactivo 5 que variaron de 100 a 700 mg/l y se encontró la concentración de colorante no inhibió el crecimiento de la levadura hasta concentraciones de 700 mg/l; sin embargo, la capacidad de remoción disminuía a altas concentraciones.

En el estudio de Bolivar Correa et al. (2023), se evaluó el efecto de diferentes concentraciones del colorante Azul Novasyn luz BLR en el crecimiento de *H. opuntiae*, utilizando concentraciones de colorante desde 500 hasta 2000 mg/l con una concentración de glucosa de 10g/l. Como resultado se obtuvo que el porcentaje de remoción del colorante disminuía a medida que aumentaba la concentración pero que no se observó ningún efecto inhibitorio sobre el crecimiento hasta los 2000 mg/l.

3.6 Escalado del estudio de decoloración en biorreactor de tipo tanque agitado

Se realizó el escalado a un biorreactor con 1,7l de medio de cultivo, se realizó un cultivo biótico (figura 23), sin suplementación con colorante para estudiar los parámetros cinéticos de la levadura Pm16 y luego se realizó un cultivo manteniendo exactamente las mismas condiciones, pero adicionando 100 mg/l de colorante NR16 (figura 22).

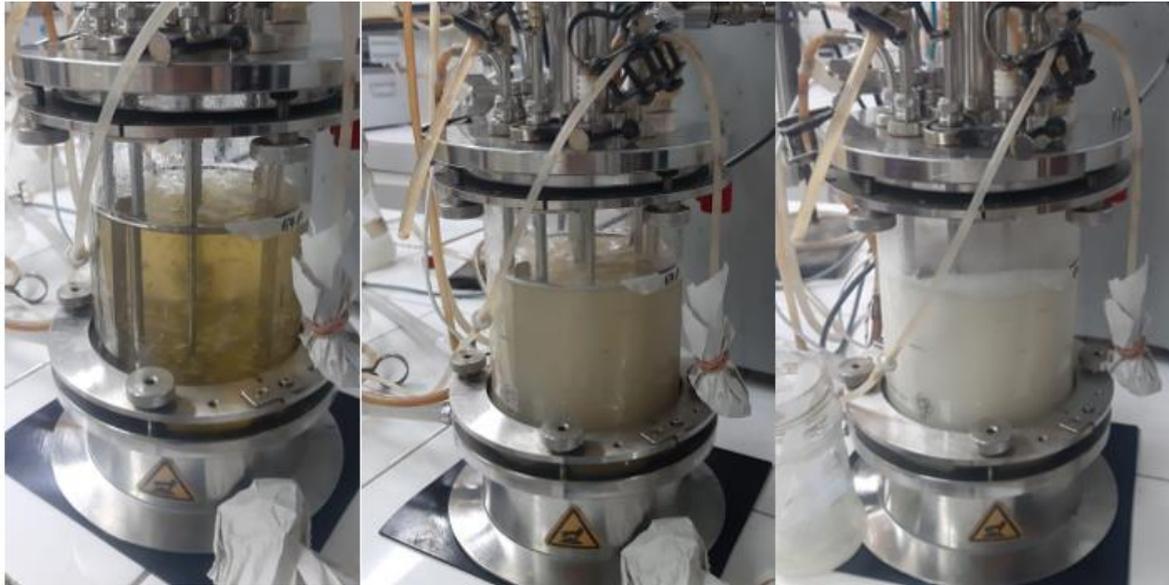


Figura 22: biorreactor biótico en distintos tiempos de cultivos los cuales son de izquierda a derecha: tiempo inicial, tiempo intermedio y tiempo final.



Figura 23: biorreactor con 100 mg/l en distintos tiempos de cultivos los cuales son de izquierda a derecha: tiempo inicial, tiempo intermedio y tiempo final.

A partir de los datos de los cultivos bióticos y los cultivos suplementados con el colorante NR16 se calculó la velocidad de crecimiento para ambos fermentadores siendo esta $0,30 \pm 0,02 \text{ h}^{-1}$ en el cultivo biótico y $0,29 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$ en el cultivo al que se le

adicionaron 100 mg/l de colorante, lo que indicaría que la presencia de colorante en el medio no afecta a la velocidad de crecimiento de la levadura. Además, se calculó el tiempo de duplicación (g) tanto para el control como para el cultivo con colorante siendo esta de 2,31 h y 2,39 h respectivamente.

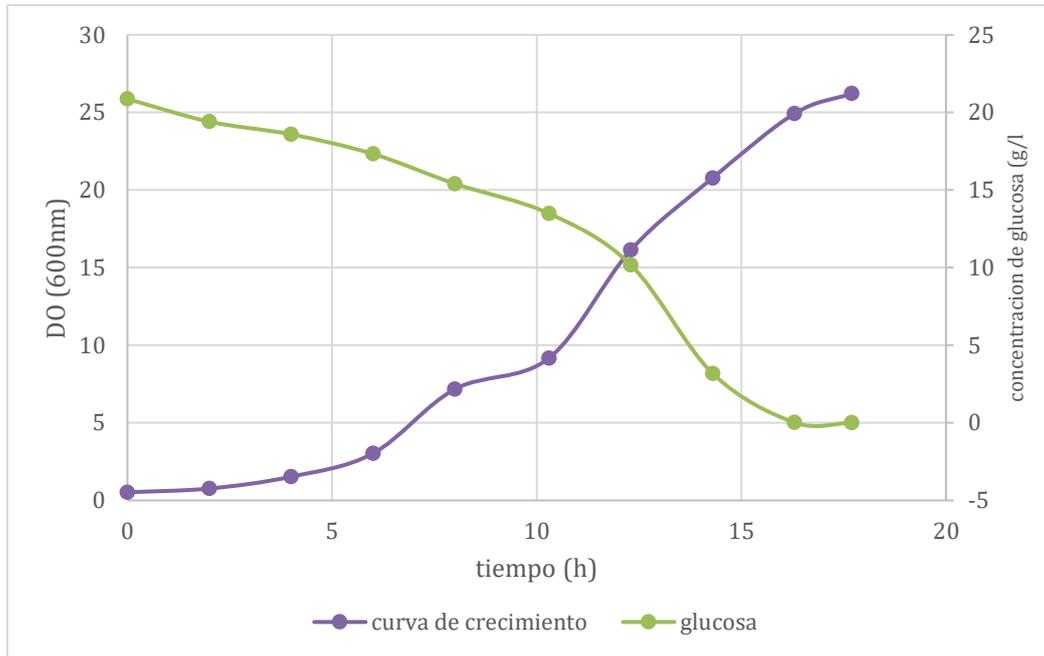


Figura 24: Grafico del biorreactor con el cultivo biótico donde se ilustra como varia a lo largo del experimento la DO (600nm) (violeta) y la concentración de glucosa (verde).

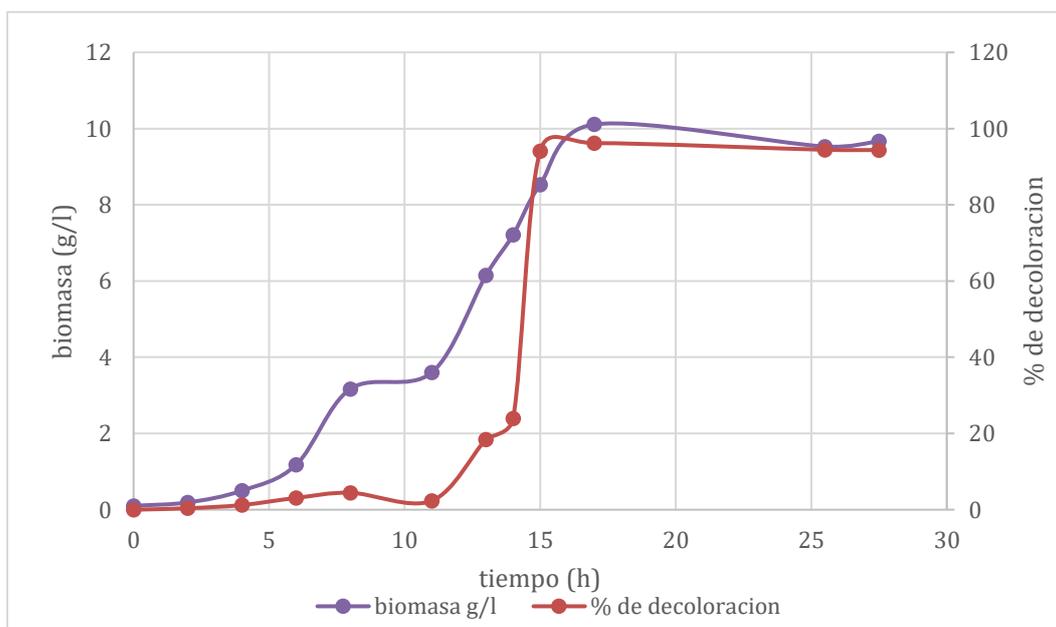


Figura 25: Grafico del biorreactor con el cultivo suplementado con 100 mg/l des colorante NR16 donde se ilustra como varia a lo largo del experimento la biomasa en g/l (violeta) y el porcentaje de decoloración (rojo).

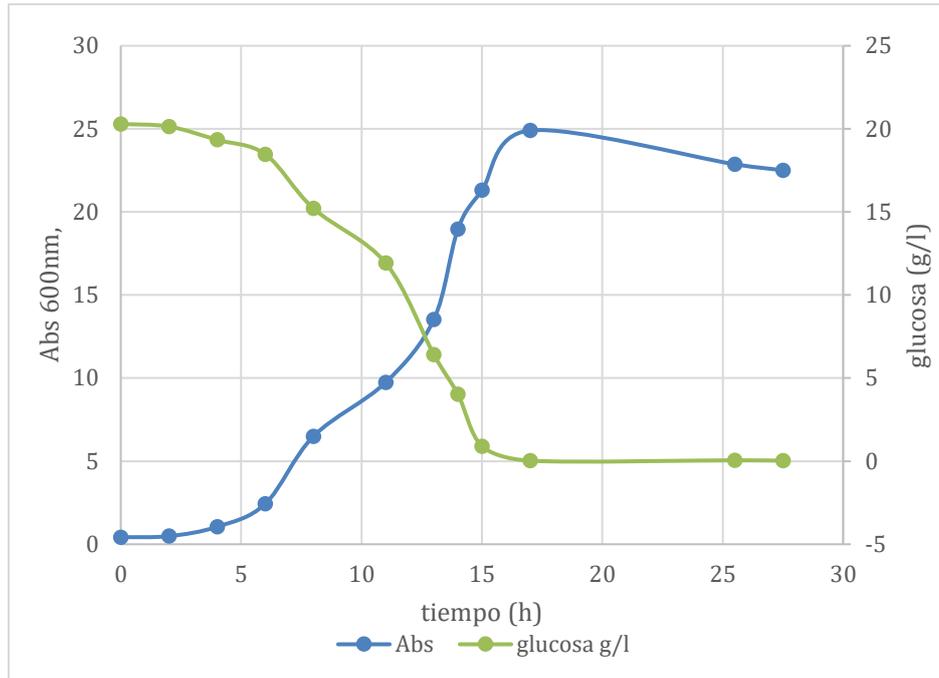


Figura 26: Grafico del biorreactor con el cultivo suplementado con 100 mg/l des colorante NR16 donde se ilustra como varia a lo largo del experimento la DO (600nm) (celeste) y la concentración de glucosa (verde).

Se evaluó glucosa remanente en el medio de cultivo a lo largo del tiempo tanto en el fermentador biótico como en el suplementado con 100 mg/l de colorante. En ambos casos, la concentración inicial de glucosa fue de 20 g/l. La medición se realizó utilizando el kit Glucemia Wiener Lab y al después de 24 hs, la glucosa fue 0 g/l según la sensibilidad del kit. Con esta información de la glucosa inicial y final, y sumado a la información brindada por el peso seco se realizó el cálculo del rendimiento en biomasa con la siguiente ecuación:

$$Y_{x/s} = \left(\frac{\text{biomasa final} - \text{biomasa inicial}}{\text{Glucosa inicial} - \text{Glucosa final}} \right)$$

De modo tal que el rendimiento para el cultivo control fue de 0,59 (Cmol biomasa /Cmol de Glucosa) mientras que para el cultivo con colorante fue de 0,55 (Cmol biomasa /Cmol de Glucosa).

A partir de las mediciones realizadas en la muestra gaseosa, se determinaron las tasas de consumo de oxígeno r_{O_2} y de producción de dióxido de carbono r_{CO_2} en función del tiempo, como se muestra en las figuras 27 y 28.

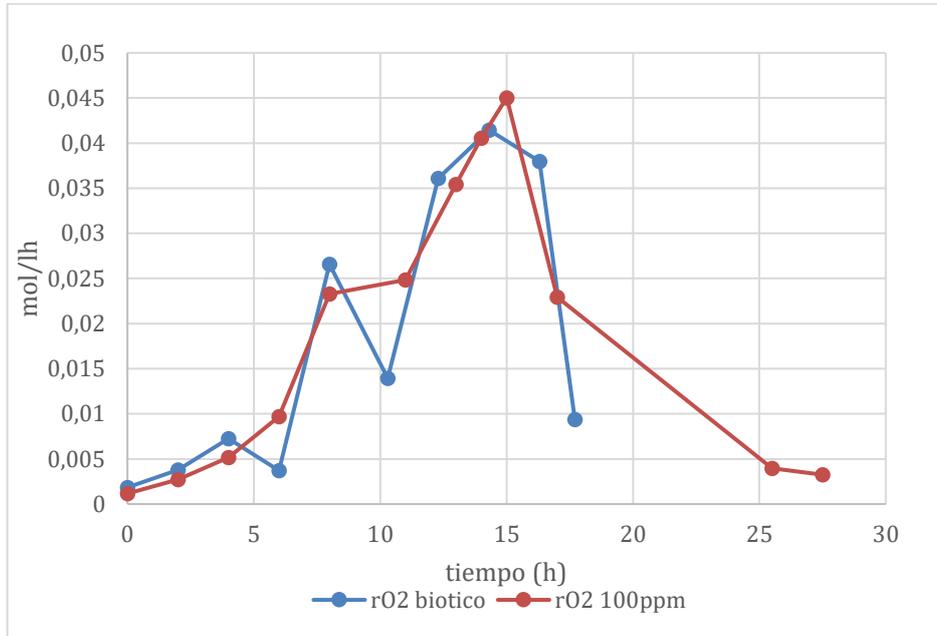


Figura 27: Grafico de la variacion de la velocidad volumetrica de consumo de O_2 para el cultivo biotico (azul) y para el cultivo suplementado con 100 mg/l de colorante NR16.

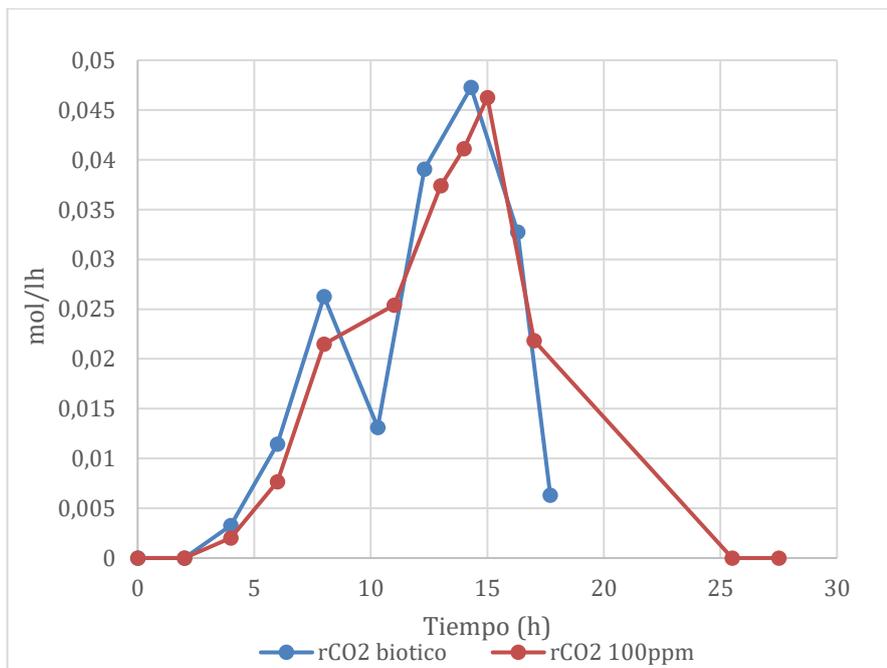


Figura 28: Grafico de la variacion de la velocidad volumetrica de produccion de CO₂ para el cultivo biotico (azul) y para el cultivo suplementado con 100 mg/l de colorante NR16.

Posteriormente, estas tasas se analizaron para calcular el área bajo las curvas. El área bajo la curva para rO₂ vs tiempo de cultivo corresponde a la cantidad de moles totales de oxígeno consumido mientras que el área bajo la curva de rCO₂ vs tiempo de cultivo corresponde a la cantidad de moles de CO₂ producidos, lo que permitió obtener los parámetros b y YCO₂/S. Dichos parámetros se determinaron aplicando las siguientes ecuaciones:

$$b = \frac{\text{moles consumidos de } O_2}{\Delta S}$$

$$Y_{CO_2/S} = \frac{\text{moles producidos de } CO_2}{\Delta S}$$

A partir de los datos obtenidos sobre el rendimiento de biomasa (Y_{x/s}) y dióxido de carbono (Y_{CO₂/s}), es posible analizar y determinar si se está llevando a cabo la producción de un producto en el sistema bajo estudio. Este análisis se basa en el balance de carbono, el cual se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$1 = Y_{x/s} + Y_{CO_2/s} + Y_{p/s}$$

Para evaluar el rendimiento de producto (Y_{p/s}), se realiza el despeje de esta variable dentro de la ecuación, permitiendo así determinar su valor a partir de los datos experimentales disponibles.

Además, es posible determinar el grado de reducción del producto (γ_{producto}), un parámetro que se define como el número de electrones disponibles que se transfieren desde un compuesto reducido por cada gramo de átomo de carbono presente en dicho compuesto (Doran, P.M., 1995). Este concepto resulta fundamental para comprender las características químicas y el destino electrónico del producto formado durante el proceso.

Para calcular el grado de reducción del producto formado, se establece el siguiente balance de γ, considerando las relaciones estequiométricas y las transformaciones electrónicas implicadas en el sistema. En este contexto, b representa el coeficiente de oxígeno en la reacción de combustión del producto, mientras que se utilizan como estados

de referencia NH₃, CO₂ y H₂O para definir los grados de reducción de la biomasa y el sustrato.

$$\gamma_{\text{sustrato}} - 4b = \gamma_{\text{producto}} * Y_{p/s} + \gamma_{\text{biomasa}} * Y_{x/s}$$

De acuerdo con los datos experimentales y utilizando estas referencias, se obtiene que el grado de reducción de la biomasa (γ_{BIOMASA}) tiene un valor de 4.2, mientras que el grado de reducción del sustrato, en este caso glucosa (γ_{SUSTRATO}), es igual a 4.

Siendo b el coeficiente del oxígeno, y usando como estado de referencia, NH₃, CO₂ y H₂O, para los grados de reducción de la biomasa y el sustrato. De esta manera, se puede despejar el γ_P , el cual nos va a dar una idea de la naturaleza del producto.

Biorreactor control:

- $b = 0,23$
- $Y_{\text{CO}_2/s} = 0,22$
- $Y_{p/s} = 0,19$
- $\gamma_P = 3,2$

Biorreactor con 100 mg/l:

- $b = 0,28$
- $Y_{\text{CO}_2/s} = 0,25$
- $Y_{p/s} = 0,20$
- $\gamma_P = 2,9$

De acuerdo con los resultados obtenidos se podría considerar la existencia de un producto cuyo grado de reducción es cercano a 3. Los productos con un grado de reducción cercano a 3 suelen ser compuestos más oxidados, como ácidos orgánicos y otros intermediarios metabólicos que contienen proporciones relativamente altas de oxígeno en su estructura, entre los cuales podemos encontrar el glicerol ($\gamma=3$) y el piruvato ($\gamma=3$) el cual es un intermediario clave en la glucólisis. De modo tal que nos podría dar un indicio

de que el colorante no ha sido completamente mineralizado por parte de la levadura, aunque para tener certeza del producto y de si la levadura mineraliza completamente o no el colorante se debería realizar un análisis de los sobrenadantes por HPLC.

Al igual que en este trabajo, en la investigación realizada por Ruscasso et al. (2021), también se evaluó la decoloración del colorante NR-16 pero utilizando la levadura *C. sake* 41E en biorreactor tipo tanque agitado. Donde se observaron rendimientos de biomasa y velocidades de crecimientos similares entre el control biótico y el suplementado con 100 mg/l de colorante lo que indicaría que el crecimiento de la levadura no se vio afectada por la presencia del colorante. Además, se alcanzó un porcentaje de remoción del 94,3% luego de 48h. *C. sake* 41E presenta una velocidad de crecimiento menor siendo esta de $0,06 \text{ h}^{-1}$ con un rendimiento en biomasa también es menor de $0,26 \text{ Cmolx/Cmols}$, lo que supondría que a iguales condiciones de cultivo la *P. membranifaciens* 16 llegaría al mismo porcentaje de decoloración más rápidamente.

3.7 Ensayo de fitotoxicidad

Para dicho ensayo se tomaron muestras a diferentes tiempos de cultivos del fermentador suplementado con 100 mg/l de colorante. Los sobrenadantes de dichas muestras correspondían a distintos tiempos de cultivo: a tiempo inicial de 0hs donde la concentración de colorante era de 100 mg/l, a un tiempo intermedio de 17hs donde el porcentaje de decoloración era de 96%, es decir, 5 mg/l de colorante y a un tiempo final de 27,5 hs donde ya el cultivo había finalizado con un porcentaje de decoloración del 94% (6 mg/l de colorante).

Si comparamos el control negativo de inhibición (figura 29) con las placas de la muestra del tiempo inicial (figura 30) podemos observar que la germinación es muy reducida en comparación con el control. A medida que la muestra se diluye, el número de semillas germinadas aumenta. Sin embargo, en la Figura 31 se evidencia que, aunque la semilla logra germinar, su radícula se ve afectada: en la muestra al 100%, esta es notablemente corta y presenta una coloración rojiza/amarronada. A medida que la muestra

se diluye, estas alteraciones disminuyen, pero la radícula nunca alcanza las características del control, permaneciendo más corta y con menor cantidad de vellosidades.

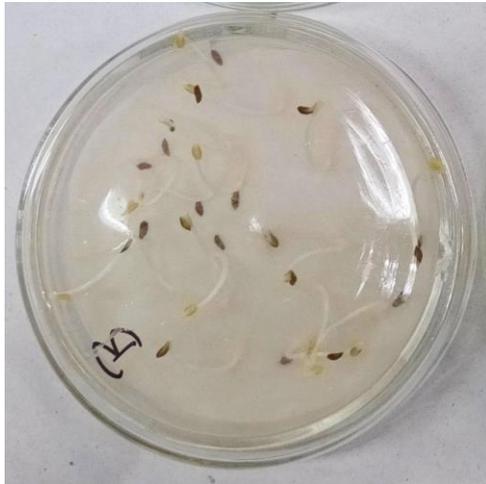


Figura 29: placa de Petri control (blanco)

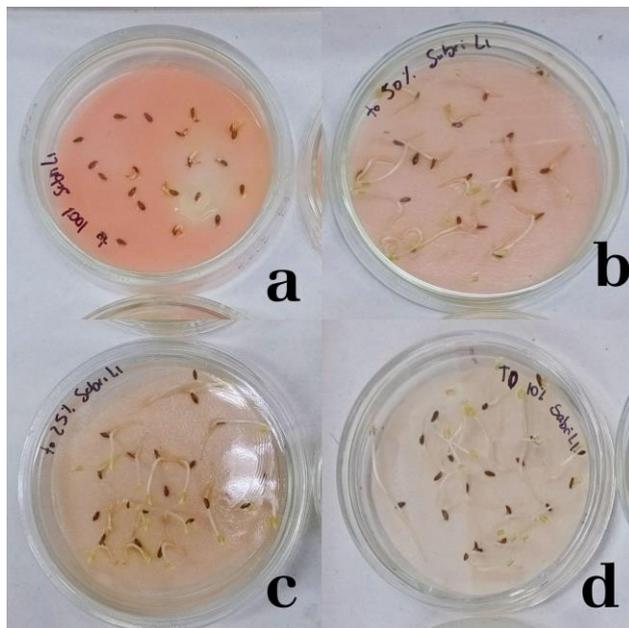


Figura 30: placa de Petri de la muestra a tiempo inicial de cultivo en diluciones de: a. 100%, b. 50%, c. 25% y d. 10%.



Figura 31: Fotografía comparativa de los brotes correspondientes a la muestra control y de la muestra de tiempo inicial para las distintas diluciones. De izquierda a derecha: control, 100%, 50%, 25% y 10%.

En el caso de la muestra en un tiempo intermedio (Figuras 32 y 33), la germinación ya no se ve tan afectada como en el tiempo inicial. Sin embargo, el largo de la radícula sigue reducido en comparación con el control, y la cantidad de vellosidades continúa siendo menor.

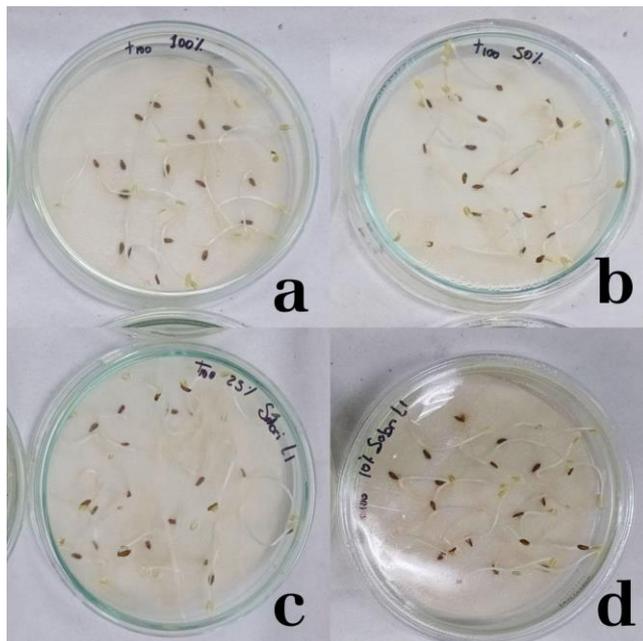


Figura 32: placa de Petri de la muestra a tiempo intermedio de cultivo en diluciones de: a. 100%, b. 50%, c. 25% y d. 10%.



Figura 33: Fotografía comparativa de los brotes correspondientes a la muestra control y de la muestra de tiempo intermedio para las distintas diluciones. De izquierda a derecha: control, 100%, 50%, 25% y 10%

Finalmente, en el tiempo final (Figuras 34 y 35), la germinación sigue sin mostrarse afectada, pero el crecimiento de la radícula mantiene una inhibición, la cual esta evidenciada por su menor longitud en comparación con el control.

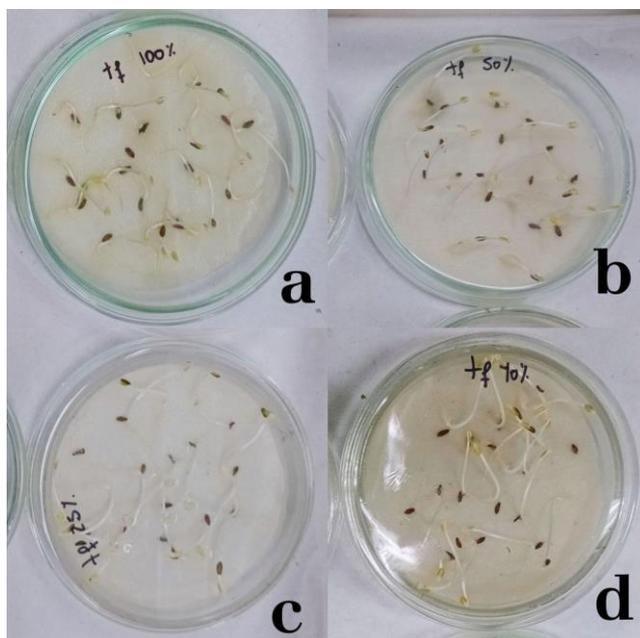


Figura 34: placa de Petri de la muestra a tiempo final de cultivo en diluciones de: a. 100%, b. 50%, c. 25% y d. 10%.



Figura 35: Fotografía comparativa de los brotes correspondientes a la muestra control y de la muestra de tiempo final para las distintas diluciones. De izquierda a derecha: control, 100%, 50%, 25% y 10%.

A partir de los datos obtenidos de los porcentajes de inhibición, se construyó una curva que relaciona el porcentaje de inhibición con el logaritmo decimal de la concentración del colorante, expresada en milimoles (mM) (figura 36). Con base en esta curva, fue posible determinar el valor de la concentración inhibitoria media (IC₅₀), definida como la concentración de colorante necesaria para causar un 50% de inhibición en la elongación de la radícula. Este parámetro permite evaluar la toxicidad del colorante.

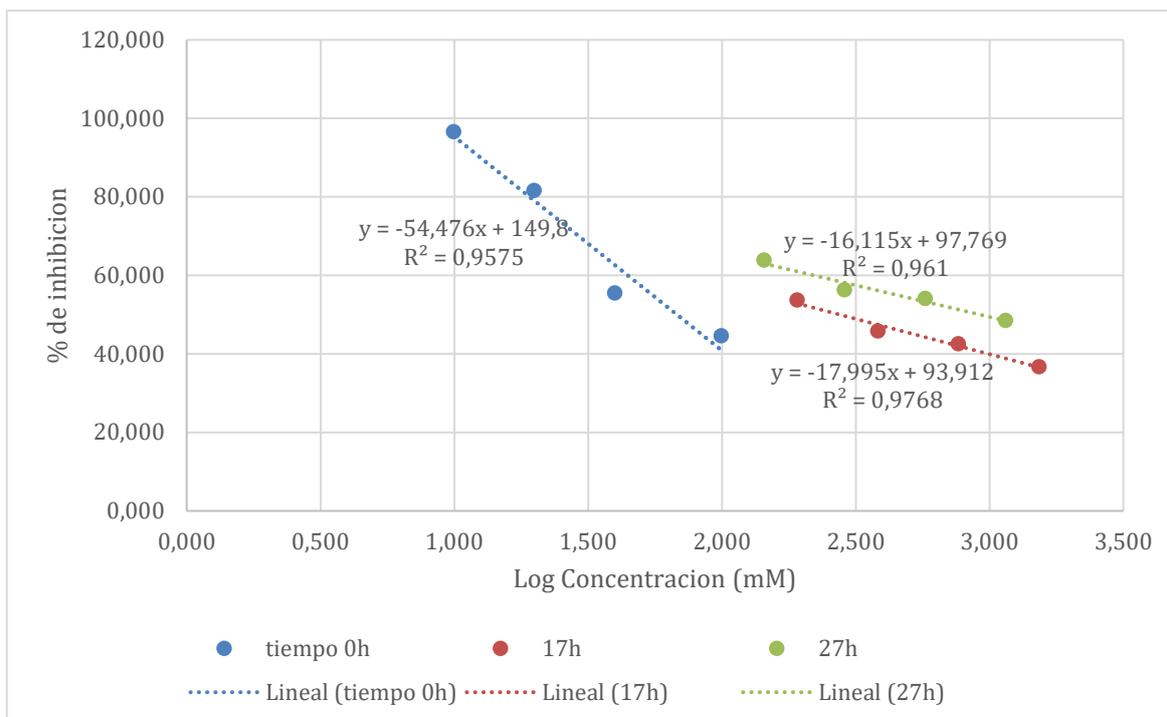


Figura 36: Grafico del porcentaje de inhibición vs el logaritmo decimal de la concentración del colorante para el tiempo inicial (azul), tiempo intermedio (rojo) y tiempo final (verde).

Además de la determinación de IC50, se calcularon otros indicadores, como el índice de germinación (GI%) y el índice de crecimiento relativo (RGI). Estos índices proporcionan información adicional sobre el impacto global del colorante en el desarrollo germinativo y el crecimiento de las plántulas, permitiendo una evaluación más integral del efecto tóxico del compuesto en estudio.

Concentración inhibitoria media (IC50)

tiempo	IC50 (mg/l)
inicial (0h)	14,60241515
intermedio (17hs)	3,599073416
final (27,5h)	1,076879725

Tabla 2: Resultados de la Concentración inhibitoria media.

Podemos observar en la tabla 2 como el IC50 disminuye a medida que avanza el tiempo lo que indicaría que la toxicidad va en aumento. Es decir que tanto al inicio como

al final del tratamiento hay sustancias que inhiben el crecimiento de las plántulas de *L. Sativa L.* En un inicio a las 0hs la presencia del colorante que es tóxico es el causante de la inhibición del crecimiento, mientras que para tiempos del ensayo más avanzados está inhibición del crecimiento puede atribuirse a metabolitos tóxicos.

Índice de germinación (GI%)

GI%			
Porcentaje de dilucion	Tiempo inicial	tiempo intermedio	tiempo final
100%	1,196367583	46,2754782	34,64136355
50	15,46963526	51,2600942	42,47876609
25	42,13723128	57,41867389	44,63402005
10	53,91819096	61,56473728	48,78670504

Tabla 3: Resultados del Índice de germinación (GI%).

Podemos notar que el índice de germinación aumenta a medida que la muestra se diluye (tabla 3). Siendo el tiempo intermedio quién presenta el mayor porcentaje de germinación comparado con otros tiempos.

Índice de crecimiento relativo (RGI)

RGI			
Porcentaje de dilucion	Tiempo inicial	tiempo intermedio	tiempo final
100%	0,033675532	0,462754782	0,360649812
50	0,183701919	0,541078772	0,436268409
25	0,444781886	0,574186739	0,458403449
10	0,553754394	0,632286491	0,514970775

Tabla 4: Resultados del Índice de crecimiento relativo (RGI)

En el estudio llevado a cabo por Young et al. (2012), se establecieron tres categorías para clasificar los valores del Índice de Crecimiento Relativo (RGI) en función del efecto tóxico de las sustancias analizadas. Estas categorías son las siguientes:

- Inhibición de la elongación radicular (I): $0 < \text{RGI} < 0.8$
- Sin efectos significativos (NSE): $0.8 \leq \text{RGI} \leq 1.2$
- Estimulación de la elongación radicular (S): $\text{RGI} > 1.2$

Esta clasificación permite interpretar de manera clara el impacto de las sustancias sobre el desarrollo de la raíz. Podemos ver, en base a los datos de la tabla 6, que en general hay una inhibición en la elongación radicular siendo esta más significativa en el tiempo inicial

En conclusión, con los resultados obtenidos de estos ensayos podemos decir que hay inhibición de la elongación radicular en todas las muestras y un aumento de la toxicidad. Este incremento en la toxicidad tras el tratamiento del colorante Naranja reactivo 16 con la *P. membranifaciens* 16 puede deberse a una mineralización incompleta del colorante, dejando como resultado luego del tratamiento metabolitos que son tóxicos para la *Lactuca sativa* L. Como resultado, estos compuestos mostraron una toxicidad superior a la de la molécula original del colorante.

Ya existen investigaciones anteriores donde se encontró que a pesar de que la levadura en estudio era capaz de decolorar con éxito el colorante, no fueron capaces de mineralizarlo completamente, de modo que luego de terminado el cultivo siguen presentes metabolitos tóxicos que afectaban al desarrollo de la radícula de la plántula de *Lactuca sativa* L, dichos metabolitos se generan durante el tratamiento del colorante. Un trabajo donde se evidencia lo dicho anteriormente es el estudio realizado por Ruscasso et al. (2022) utilizando *Leucosporidium muscorum* F20A, donde se logró una decoloración eficiente del colorante Negro reactivo 5. Sin embargo, los ensayos de fitotoxicidad realizados con muestras recolectadas a las 24, 48, 72 y 144 horas de cultivo mostraron una inhibición del 50% en la elongación de la raíz de *Lactuca sativa* L. Además, se observó un incremento en la toxicidad en todos los tiempos analizados. Los valores de IC50 obtenidos indicaron que la toxicidad aumentaba conforme avanzaba el tratamiento, lo que sugiere que los metabolitos generados eran más tóxicos que el colorante original. Mientras que también en ensayos realizados por Almeida y Corso et al. (2014) también mostraron un aumento en la toxicidad a medida que el tratamiento de colorante avanzaba, este resultado también se lo atribuyo a una mineralización incompleta del colorante.

Por otro lado, también se han reportado estudios con resultados positivos en términos de reducción de toxicidad. Young et al. (2012) analizaron la toxicidad de los productos derivados del tratamiento de un efluente textil utilizando un consorcio microbiano en un biorreactor anaerobio con distintos compartimentos. Observándose que en momentos iniciales del tratamiento se presentaba una mayor toxicidad, manifestada en necrosis e inhibición del crecimiento radicular de *Lactuca sativa L.* Sin embargo, en las muestras recolectadas en la fase final del circuito, después de 14 semanas de tratamiento, no se registraron efectos adversos sobre el crecimiento de las plántulas.

Un estudio adicional realizado por Ayed et al. (2017) también mostró resultados positivos, trabajando con un consorcio bacteriano compuesto por *Staphylococcus aureus* que fue utilizado para la remoción del colorante VR5, evaluando la toxicidad de los metabolitos resultantes en semillas de *Triticum turgidum ssp. duro*. Se registró un porcentaje máximo de germinación del 94,3% en el tratamiento con *S. aureus* ATCC como microorganismo predominante, lo que llevó a la conclusión de que el consorcio bacteriano fue capaz de reducir la toxicidad del colorante de manera efectiva.

Capítulo 4. Conclusiones

La presente investigación ha demostrado que las levaduras aisladas del kéfir de agua, en particular *Pichia membranefaciens* Pm16, poseen potencial para la biotecnología ambiental, especialmente en la decoloración de colorantes textiles. Lo que sugiere su posible aplicación en el tratamiento de efluentes industriales.

La levadura PM16 fue capaz de decolorar los 5 colorantes textiles en estudio. Además, se pudo determinar que la temperatura óptima de trabajo para dicha levadura es de 28°C. Asimismo la levadura PM16 también se destacó por decolorar el colorante NR16 en concentraciones entre 100 y 400 mg/l sin sufrir inhibición de su crecimiento lo que la vuelve una candidata prometedora para procesos de biorremediación.

Además, los ensayos realizados en distintos sistemas de cultivo tanto en Erlenmeyer como en biorreactor de tanque agitado demostraron que la levadura mantuvo una velocidad de crecimiento estable sin evidenciar efectos adversos por la presencia de colorantes.

Por otra parte, el ensayo de fitotoxicidad muestra que al final del tratamiento hay presencia de metabolitos tóxicos generados durante la ruptura del enlace azo del colorante, lo que indicaría una necesidad de un tratamiento acoplado capaz de degradar dichos metabolitos. De esta manera se mantendría la eficiencia de decoloración de la levadura.

En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio resaltan la importancia del kéfir de agua como una fuente valiosa de microorganismos con aplicaciones en la biorremediación.

Bibliografía

- Ahmed, T. F. et al. (2012). Impact of dye industrial effluent on physicochemical characteristics of Kshipra River, Ujjain City, India. *Research Journal of Environmental Sciences*, 1, 41-45.
- Al-Tohamy, R., Ali SS, Li F, Okasha KM, Mahmoud YA-G, Elsamahy T, Jiao H, Fu Y, Sun J (2022). Una revisión crítica sobre el tratamiento de aguas residuales que contienen colorantes: preocupaciones ecotoxicológicas y sanitarias de los colorantes textiles y posibles enfoques de remediación para la seguridad ambiental. *Ecotoxicology and Environmental Safety*
- 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.
- 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.
- Arrieta-Echeverri, M., Fernandez, G., Duarte-Riveros, A., Correa-Álvarez, J., Bardales, J., Villanueva-Mejía, D., & Sierra-Zapata, L. (2023). Multi-omics characterization of the microbial populations and chemical space composition of a water kéfir fermentation. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1223863>.
- 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.
- Ayed, L., Zmantar, T., Bayar, S., Cheref, A., Achour, S., Mansour, H. B., y Mzoughi, R. (2019) Potential Use of Probiotic Consortium Isolated from Kefir for Textile Azo

Dye Decolorization *J. Microbiol. Biotechnol.*; 29(10): 1629-1635

<https://doi.org/10.4014/jmb.1906.06019>

- Bolivar Correa, M., Gaviria Villa A. M., López de Ávila L. M., (2023) Evaluación del potencial de levaduras nativas aisladas de aguas residuales industriales para la remoción de colorantes azoicos *Actualidades Biológicas* 45(118): 1-13
- Bulacio Gil, N. M. (2018). “Mecanismos involucrados en la biodecoloración de efluentes con levaduras del género *Trichosporon*” (tesis doctoral) Universidad nacional de Tucumán <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/78893>
- Cabansag, J. L. J., Dumelod, J. C., Alfaro, J. C. O., Arsenal, J. D., Sambot, J. C., Enerva, L. T., & Leño 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.
- Das, Nilanjana & Charumathi, D. (2012). Remediation of synthetic dyes from wastewater using yeast-An overview. *Indian Journal of Biotechnology*, 11(4), 369–380.
- 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
- 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.
- Doruk Aracagök Y., Nilüfer Cihangir (2013). Decolorization of Reactive Black 5 by *Yarrowia lipolytica* NBRC 1658 *American Journal of Microbiological Research*
- Dos Santos, A.B. et al. (2007). Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: Perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresource Technology*. 98, 2369-2385.

- Erdoğdular A. O., Apar D. K. (2019). Bioremoval of reactive dye Remazol Navy by kefir grains *Appl Biol Chem* 62:22 <https://doi.org/10.1186/s13765-019-0429-1>
- Erdoğdular A. O., Apar D. K. (2021). Biosorption of reactive dye Remazol Ultra Red RGB by metabolically active kefir biomass *Journal of the Faculty of Engineering and Architecture of Gazi University* 36:2 1055-1073
- 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.
- Gökırmaklı, Ç., Şatır, G., & Guzel-Seydim, Z. (2024). Microbial viability and nutritional content of water kéfir grains under different storage conditions. *Food Science & Nutrition*, 12, 4143 - 4150. <https://doi.org/10.1002/fsn3.4074>.
- Jadhav I., Roshan Vasniwal, Divya Shrivastava and Kapilesh Jadhav (2016). Review Article Microorganism-Based Treatment of Azo Dyes *Journal of Environmental Science and Technology* 9 (2), 188-197
- Jafari Narjes, M. R. S. & R. K.-K. (2014). Biodecolorization of textile azo dyes by isolated yeast from activated sludge: *Issatchenkia orientalis* JKS6. *Annals of Microbiology*, 64(2), 475–482. <https://doi.org/10.1007/s13213-013-0677-y>
- Jafari Narjes, R. K.-K. & M. R. S. (2013). Screening, identification and optimization of a yeast strain, *Candida palmiophila* JKS4, capable of azo dye decolorization. *Iranian Journal of Microbiology*, 5(4), 434–440.
- Jafari, N., M. R. S. & R. K.-K. (2014). Biodegradation Perspectives of Azo Dyes by Yeasts. *Microbiology*, Vol. 83, No. 5, 484–497.
- Madhuri M.Sahasrabudhe, Girish R. Pathade (2011). Biodegradation of sulphonated azo dye C.I. reactive orange 16 by *Enterococcus faecalis* strain YZ 66 *European Journal of Experimental Biology* 1 (1): 163-173
- 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.

Martorell, M. M. et al. (2012). Dye-decolourizing yeast isolated from Las Yungas rainforest. Dye assimilation and removal used as selection criteria. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 66, 25-32.

Monar M., Dávalos I., Zapata S., Caviedes M, Ramírez-Cárdenas L. (2014). Chemical and microbiological characterization of Ecuadorian homemade water kéfir. *Avances en Ciencias e Ingenierías*, 2014, Vol. 6, No. 1, Pags. B60-B66

Moure, M. C. (2023). Estudio de la capacidad antifúngica de levaduras del kéfir y su potencial como agente de biocontrol en maíz. Universidad nacional de La Plata

Ong, S. A., Ho, L. N., Wong, Y. S., & Raman, K. (2012). Performance and kinetic study on bioremediation of diazo dye (reactive black 5) in wastewater using spent GAC-biofilm sequencing batch reactor. *Water, Air, and Soil Pollution*, 223(4), 1615–1623. <https://doi.org/10.1007/s11270-011-0969-4>

Pajot, H. F. (2007). Dye-decolourizing activity in isolated yeasts from ecoregion of Las Yungas (Tucumán, Argentina). *Enzyme and Microbial Technology*. 40, 1503-1511

Pajot, H. F., Delgado, O. D., De Figueroa, L. I. C., Fariña, J. I. (2010). Unraveling the decolorizing ability of yeast isolates from dye-polluted and virgin environments: an ecological and taxonomical overview *Springer; Antonie van Leeuwenhoek*; 99; 3; 1-2011; 443-456

Pajot H. F. (2014). Ecology of Dye Decolorizing Yeasts. In *Bioremediation in Latin America*. Springer, Cham.

Pajot H. F., Lucía I.C. de Figueroa & Julia, F. (2006). Dye-decolorizing activity in isolated yeasts from the ecoregion of Las Yungas (Tucumán, Argentina).

- Pereira Xavier I. L., Alcides M., Soares Barbosa N., Pavan Bagagli M. (2022). Evaluation of the application of water kefir grains in the decolouration of solutions containing textile dye *Brazilian Journal of Biosystems Engineering* 16 1083
- Ramalho, P. A. et al. (2004). Characterization of azoreduction activity in a novel ascomycete yeast strain. *Applied and Environmental Microbiology*. 70, 2279-2288.
- Ramesh Babu B., A.K. Parande, S. R. & T. P. K. (2007). Cotton Textile Processing: Waste Generation and Effluent Treatment. *The Journal of Cotton Science*, 153(11:141), 141–153. <https://doi.org/http://journal.cotton.org>
- Razali, N. A., Abidin, C. Z. A., Ong, S. A., Fahmi, M. R., Ibrahim, A. H., & Sabri, S. N. (2018). 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., 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. *Bioresour. Bioprocess.* 9, 18
- Sampaio AC, Bezerra RMF, Dias AA (2018) Los humedales forestales mediterráneos son puntos calientes de levadura para la biorremediación: un estudio de caso utilizando colorantes azoicos. *Sci Rep* 8:15943.
- 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.
- 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.

Sumathi Suresh (2014). Treatment of Textile Dye Containing Effluents *Current Environmental Engineering*, Vol. 1, No. 3

Universidad Nacional de La Plata. (2011). Plan particularizado de ordenamiento urbano y reconfiguración territorial para las márgenes de la cuenca del río Reconquista, (2).

Venceslau M. Correia, T. S. & S. J. J. (1994). Characterisation of textile wastewaters - a review. *Environmental Technology (United Kingdom)*, 15(10), 917–929.
<https://doi.org/10.1080/09593339409385500>

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.