

**ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO**

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA  
INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**REMOCIÓN DE LOS COLORANTES TEXTILES  
REACTIVOS ROJO 141, AMARILLO 84 Y AZUL NAVY 171  
ELIMINADOS EN EL AGUA RESIDUAL, UTILIZANDO UN  
INÓCULO COMPUESTO SELECCIONADO, BAJO  
CONDICIONES ANAEROBIAS A NIVEL DE  
LABORATORIO.**

**Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:**

**INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA**

**ELABORADO POR:**

**IRINA SORAYA MONCAYO BRAVO**

**SANGOLQUÍ, 19 DE FEBRERO 2010**

# **HOJA DE LEGALIZACION DE FIRMAS**

**ELABORADO POR**

**IRINA SORAYA MONCAYO BRAVO**

**COORDINADOR DE LA CARRERA**

**Ing. Rafael Vargas**

**SECRETARIO ACADÉMICO**

**Dr. Miguel Ramirez**

**Lugar y fecha :** \_\_\_\_\_

## CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por el Sta. Irina Soraya Moncayo Bravo como requerimiento parcial a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología.

---

Fecha

---

Alma Koch M.Sc

---

María Soledad Benitez Ph.D.

A ella, mi motivación y razón de vida

## AGRADECIMIENTOS

Mi primer agradecimiento va dirigido al padre de todos, Dios, por sus infinitas bendiciones.

En segundo lugar, quiero agradecer a mi familia por su apoyo a lo largo de todos los años de carrera y con ella, a mis amigos, hermanos por voluntad.

Agradezco a Alma Koch, por sus enseñanzas de vida a lo largo del tiempo que Dios nos dio la oportunidad de compartir y por ser la promotora de tantos sueños.

Agradezco a Soledad Benitez por su colaboración en la codirección de la presente tesis y sus enriquecedoras enseñanzas académicas.

Un especial agradecimiento a Diana Ayala, por compartir aspiraciones y la buena voluntad de mejorar el mundo en que vivimos.

A la Escuela Politécnica del Ejército, por el financiamiento del proyecto gracias al cual fue posible el presente trabajo de investigación y a la empresa Tornasol por facilitarnos los colorantes utilizados a lo largo de los ensayos realizados.

Irina Moncayo

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

HOJA DE LEGALIZACIÓN DE FIRMAS.....	ii
CERTIFICACIÓN .....	iii
AGRADECIMIENTOS .....	iv
RESUMEN .....	v
ABSTRACT .....	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS .....	vii
LISTA DE TABLAS.....	viii
LISTADO DE FIGURAS .....	ix
LISTADO DE ANEXOS .....	xi
<b>CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>I</b>
1.1.- FORMULACIÓN DEL PROBLEMA: .....	1
1.2.- JUSTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.....	2
1.3.- OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN .....	5
1.3.1.-Objetivo General: .....	5
1.3.2.-Objetivos Específicos:.....	5
1.4.- MARCO TEÓRICO .....	6
1.4.1.- La industria textil.....	6
1.4.2- Las aguas residuales de la industria textil .....	7
1.4.3.- Los colorantes reactivos empleados en la industria textil y eliminados en el agua residual .....	8
1.4.4.- Tratamiento de aguas residuales de tipo textil.....	11
1.4.5.- Mecanismos de remoción de color empleados por bacterias anaerobias.....	14
1.4.6. Obtención de microorganismos en condiciones anaerobias a nivel de laboratorio para su aplicación al tratamiento de aguas residuales.....	17
1.5.- SISTEMA DE HIPÓTESIS .....	18
<b>CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
2.1 PARTICIPANTES .....	19
2.2 ZONA DE ESTUDIO:.....	20
2.2.1 Laboratorio de investigación: .....	20
2.2.2 Zonas de muestreo:.....	20

2.3 PERÍODO DE TIEMPO DE INVESTIGACIÓN: .....	20
2.3.1 Fecha de inicio de la investigación:.....	20
2.3.2 Fecha de fin de investigación:.....	21
2.4 DISEÑO: .....	21
Fase 1.- Obtención de inóculos microbianos a partir de muestras colectadas, bajo condiciones anaerobios (evaluación cualitativa):.....	21
Fase 2.- Selección de inóculo bacteriano bajo condiciones anaerobias con capacidad de remover los colorantes en estudio: .....	21
Fase 3.- Evaluación de efecto del pH en la remoción de color:.....	22
2.5 PROCEDIMIENTOS.....	25
2.5.1 Preparación de medio de cultivo Jiang et al., 2004 modificado, utilizado en todos los ensayos realizados .....	25
2.5.2 Colección de muestras con microorganismos en el Río Machánga, en agua residual de lavado de una industria textil y muestras en medio de cultivo Jiang et al., 2004 con colorantes directos Azul 106 y Rojo 23, expuestos al aire. ....	25
2.5.3 Obtención de inóculos bacterianos a partir de muestras colectadas, bajo condiciones anaerobias .....	28
2.5.4 Selección de inóculo bacteriano bajo condiciones anaerobias con capacidad de remover los colorantes en estudio. ....	30
2.5.5 Análisis de pérdida de color por cambio de pH en medios de cultivo con colorante y recuperación de color por modificaciones de pH posterior a la acción bacteriana del inóculo seleccionado.....	32
2.5.8 Cinética de crecimiento bacteriano vs. Remoción de colorantes Azul 171, Amarillo 84 y Rojo 141. ....	37
2.6.- ANÁLISIS DE DATOS .....	39
<b>CAPÍTULO 3: RESULTADOS .....</b>	<b>41</b>
3.1 OBTENCIÓN DE INÓCULOS BACTERIANOS PRIMARIO A PARTIR DE MUESTRAS COLECTADAS.....	41
3.2 SELECCIÓN DE INÓCULOS BACTERIANOS BAJO CONDICIONES ANAEROBIAS.....	43
3.3 SELECCIÓN DE INÓCULO BACTERIANO BAJO CONDICIONES ANAEROBIAS CON CAPACIDAD DE REMOVER LOS COLORANTES EN ESTUDIO .....	43
3.6 ANÁLISIS DE LA ACCIÓN DEL CAMBIO DE PH EN LA REDUCCIÓN DEL COLOR.....	47
3.6.1 Efecto de la reducción de pH con solución de Ácido Clorhídrico 1N, en medios de cultivo con colorante en ausencia de bacterias. ....	47
3.6.2 Uso de solución tampón fosfato a pH 6 en medio de cultivo .....	47
3.7 ELEVACIÓN DEL PH DEL MEDIO DESPUÉS DE LA ACTIVIDAD BACTERIANA.....	49
3.8 ESTUDIO DE LA ESTABILIDAD DE LOS COLORANTES EN EL MEDIO DE CULTIVO .....	50
3.9 CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO Y REMOCIÓN DE COLOR.....	51
3.10. Evaluación de la capacidad de remoción de 100 mg/L, 150 mg/L y 200 mg/L de colorante Azul Navy 171 del inóculo I5 bajo las condiciones anaerobias de estudio, con 0 g/L, 2,5 g/L y 5 g/L de glucosa. ....	53
3.11 Evaluación de la capacidad de remoción de 100 mg/L, 150 mg/L y 200 mg/L de colorante Amarillo 84 del inóculo I5 bajo las condiciones anaerobias de estudio, con 0 g/L, 2,5 g/L y 5 g/L de glucosa. ....	56

3.12 Evaluación de la capacidad de remoción de 100 mg/L, 150 mg/L y 200 mg/L de colorante Rojo 141 del inóculo I5 bajo las condiciones anaerobias de estudio, con 0 g/L, 2,5 g/L y 5 g/L de glucosa.....	61
<b>CAPÍTULO CUATRO: DISCUSIÓN .....</b>	<b>65</b>
4.1 SELECCIÓN DE INÓCULO BACTERIANO EN CONDICIONES ANAEROBIAS CON CAPACIDAD DE REMOVER LOS COLORANTES EN ESTUDIO .....	65
4.2 ANÁLISIS DE PÉRDIDA DE COLOR POR CAMBIO DE PH EN MEDIOS DE CULTIVO CON COLORANTE Y RECUPERACIÓN DE COLOR POR MODIFICACIONES DE PH POSTERIOR A LA ACCIÓN BACTERIANA DEL INÓCULO SELECCIONADO I5.....	68
4.3 CINÉTICA DE CRECIMIENTO BACTERIANO Y REMOCIÓN DE COLOR.....	71
4.4 EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE REMOCIÓN DE COLOR POR ACCIÓN BACTERIANA DEL INÓCULO I5 SELECCIONADO, EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE GLUCOSA COMO SUSTRATO ALTERNO. ....	74
<b>CAPÍTULO CINCO: CONCLUSIONES.....</b>	<b>79</b>
5.1 EN CUANTO A LA SELECCIÓN DEL INÓCULO COMPUESTO MÁS EFICIENTE:.....	79
5.2 EN CUANTO AL ANÁLISIS DE INFLUENCIA DE PH EN LA REMOCIÓN DE COLOR POR ACCIÓN DEL INÓCULO SELECCIONADO:.....	79
5.3 EN CUANTO A LA CINÉTICA DE CRECIMIENTO Y LA REMOCIÓN DEL COLOR.....	80
5.4 EN CUANTO AL ARREGLO FACTORIAL PARA EL COLORANTE REACTIVO AZUL NAVY 171:.....	80
5.5 EN CUANTO AL ARREGLO 2 FACTORIAL PARA EL COLORANTE REACTIVO AMARILLO 84: .....	81
5.6 EN CUANTO AL ARREGLO 2 FACTORIAL PARA EL COLORANTE REACTIVO ROJO 141:.....	82
5.7 EN CUANTO AL TRABAJO EN CONJUNTO:.....	82
<b>CAPÍTULO SEIS: RECOMENDACIONES.....</b>	<b>84</b>
<b>CAPÍTULO SIETE: BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>86</b>

## LISTA DE TABLAS

Tabla 2. 1: Longitudes de onda utilizadas durante toda la experimentación para la medición de los colores amarillo, rojo y azul.....	31
Tabla 3. 1: Temperatura y pH de las muestras puntuales y muestra compuesta colectadas en el Colector Teodoro Gómez de la Torre.....	41
Tabla 3. 2: Porcentaje de remoción de color por acidificación con ácido clorhídrico del medio de cultivo Jiang et al, 2004 modificado, con colorante y sin bacterias. ....	47
Tabla 3. 3: Diferencia en porcentajes promedios de reducción de color por acción bacteriana en presencia de diferentes concentraciones de solución tampón fosfato pH 6. ....	49
Tabla 3.4: Porcentajes de recuperación de color por aumento de pH del medio después de acción microbiana sobre el colorante Azul Navy 171. ....	50
Tabla 3. 5: Porcentajes de remoción de color y cambios de pH del medio de cultivo Jiang et al, 2004 modificado, en presencia de 100 mg/L de colorante con 0,143 mL de solución tampón por cada mL de medio total. ....	50
Tabla 3.6: ANOVA para el experimento 2 factorial de los porcentajes finales de remoción de color azul Navy 171. ....	54
Tabla 3.7: ANOVA para el experimento 2 factorial de los porcentajes finales de remoción de color amarillo. ....	58
Tabla 3.8: ANOVA para el experimento 2 factorial de los porcentajes finales de remoción de color rojo.....	62

## LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. 1: Reacción de esterificación entre la celulosa y el colorante reactivo con anillo heterocíclico (Cegarra, 1980).....	9
Figura 1. 2: Reacción de formación de éteres de los colorantes vinilsulfónicos con celulosa (Cegarra, 1980). .....	9
Figura 1. 3: Estructuras moleculares de los colorantes reactivos textiles Azul Navy 171, Amarillo 84 y Rojo 141 (Bell y Buckley, 2003).....	10
Figura 1. 4: Hipótesis de decoloración por acción bacteriana (Yoo et al., 2001).....	15
Figura 2. 1: Colectores muestreados a) Teodoro Gómez de la Torre y b) Punto de referencia El Recreo, en el río Machángara.....	26
Figura 3. 1: Muestras obtenidas del proceso de lavado de una industria textil que cambiaron su coloración después de dos semanas de almacenamiento a) inóculo 3 y b) inóculo 4. A la derecha de cada figura se observa la muestra con el color original, a la izquierda la muestra que cambio de coloración.....	42
Figura 3. 2: Inóculos compuestos obtenidos por exposición de medio de cultivo con color al aire, en medio de cultivo de Jiang et al, 2004 enriquecido con colorante Azul y Rojo directo, a) antes de la remoción de color y b) posterior a la acción bacteriana. ....	42
Figura 3.3: Remoción de color en el tiempo. Para cada día se muestra la absorbancia promedio (n=3) de cada inóculo en estudio, durante un período de 15 días. ....	44
Figura 3. 4: Porcentajes promedio de remoción de color por acción de los inóculos en estudio. Se indica el valor del ANOVA y los grupos de Homogeneidad de Tukey al 0,05. 45	
Figura 3. 5: Reducción de color a partir de 100 mg/L de los colorantes reactivos: a) Azul Navy 171, b) Amarillo 84 y c) Rojo 14, a los 15 días de incubación. El precipitado corresponde a la biomasa colorida precipitada. ....	46
Figura 3. 6: Comparación de porcentajes de remoción del colorante Azul Navy, Amarillo 84 y Rojo 141, en “Cultivo interrumpido” (abierto cada tres días para extracción de muestras) y en “Cultivo continuo” (incubado sin apertura de la cámara gas pack durante el período de incubación).....	46
Figura 3. 7: Relación entre cinética de crecimiento bacteriano y remoción de los colorantes en estudio.....	52

Figura 3. 8: Gráfico de perfil para la interacción de la concentración de glucosa y concentración de color. ....	53
Figura 3. 9: Porcentaje promedio de remoción de color de cada concentración de colorante Azul 171 y glucosa ensayada. Se indican los grupos de homogeneidad del factor glucosa (a, b, c) y de colorante (a, b y c) (significación = 1) .....	55
Figura 3. 10: Cambio de valor de Absorbancia a través del tiempo para cada concentración de glucosa con 200 mg/L, 150 mg/L y 100 mg/L de colorante. ....	56
Figura 3. 11: Gráfico de perfil para la interacción de la concentración de glucosa y concentración de color. ....	57
Figura 3. 12: Porcentaje promedio de remoción de color de cada concentración de colorante Amarillo 84 y glucosa ensayada. Se indican los grupos de homogeneidad del factor glucosa (a, b, c) y de colorante (a, b y c) (significación 1).....	59
Figura 3. 13: Cambio de valor de Absorbancia a través del tiempo para cada concentración de glucosa con 200 mg/L, 150 mg/L y 100 mg/L de colorante. ....	60
Figura 3. 14: Gráfico de perfil para la interacción de la concentración de glucosa y concentración de color. ....	61
Figura 3. 15: Porcentaje promedio de remoción de color de cada concentración de colorante Rojo 141 y glucosa ensayada. Se indican los grupos de homogeneidad del factor glucosa (a, b, c) y de colorante (a, b y c) (significación 1).....	63
Figura 3. 16: Cambio de valor de Absorbancia a través del tiempo para cada concentración de glucosa con 200 mg/L, 150 mg/L y 100 mg/L de colorante reactivo Rojo 141.....	64
Figura 4. 1: Principales procesos involucrados en la digestión anaerobia de materia orgánica y su relación con la sulfato reducción (Cervantes, 2008).....	73
Figura 4. 2: Mecanismo de reducción del enlace azo por microorganismos anaerobios con la intervención de mediadores (basado en Dos Santos et al, 2007).....	77

## LISTADO DE ANEXOS

ANEXO A.....	98
ANEXO B.....	99
ANEXO C.....	100

# CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

## **1.1.- Formulación del problema:**

Una de las necesidades más importantes del ser humano es la vestimenta, necesidad que a través de los años ha sido la causa del enorme desarrollo de la industria textil. Los procesos productivos comprendidos en este tipo de industria corresponden a una cadena de operaciones demandantes de grandes cantidades de agua, la cual proviene generalmente de pozos y que por su calidad serviría para el consumo humano, cría de animales y riego (UCC, 2009).

El empleo de grandes volúmenes de agua por la industria textil ha originado un severo problema ambiental a nivel mundial: el desecho de aguas residuales altamente contaminadas. Los contaminantes de mayor cuidado en el efluente residual textil son los colorantes y con ellos, los subproductos generados a partir de su ruptura molecular, algunos de ellos tóxicos y/o mutagénicos (Dos Santos *et al.*, 2007). Existen alrededor de cien mil colorantes disponibles en diversas industrias. Cada año se producen setecientas mil toneladas métricas de colorantes alrededor del mundo, que son desechados en gran medida en aguas residuales de industrias como la papelera y la textil (Supaka *et al.*, 2004).

En el estudio realizado por la Fundación Suiza de Cooperación para el Desarrollo Técnico (Swiss Contact), se determinó que el 90% de la industria ecuatoriana corresponde a la industria textil (Witt, 2008). En el Distrito Metropolitano de Quito son 735 las industrias textiles registradas de las cuales para el año 2008, únicamente 45 se unieron al programa de tratamiento de

desechos industriales del Distrito. De acuerdo a la información proporcionada por la EMAP-Q son varias las industrias textiles ubicadas en la capital que descargan efluentes contaminados con color a la alcantarilla. Los efluentes alcanzan los colectores a donde son direccionadas las aguas, previa a su descarga al cuerpo receptor, siendo éste en la ciudad de Quito el río Machangara y el río Monjas. Otras industrias, descargan sus efluentes directamente a cuerpos receptores tanto en la ciudad de Quito como a las afueras.

### ***1.2.- Justificación del problema***

La presencia de color en el agua lleva a dos problemas ambientales graves: 1) la interrupción del grado de iluminación en el medio acuático y 2) la liberación de moléculas tóxicas por la descomposición de los colorantes (Husseiny, 2008, Radulesco, 2008;). El primero ejerce un efecto directo sobre los procesos fotosintéticos de plantas acuáticas y microorganismos fotosintéticos, afectando la capacidad de autodepuración de las aguas. El segundo, impacta negativamente sobre la salud de humanos y animales al tratarse de moléculas mutagénicas y/o carcinogénicas. En el caso de las plantas, puede darse un proceso de bioacumulación que modifica los demás componentes de la cadena trófica.

De acuerdo a una investigación realizada por el Centro de Verificación de Agua de la Provincia de Cotopaxi, más del 60% del agua dulce a nivel nacional está contaminada debido mayormente a la actividad de empresas como la textil, petrolera y minera (Recalde, 2009). En el Ecuador, el 80% de las industrias se encuentran asentadas en la ciudad de Quito y sus efluentes no tratados son arrojados a cuerpos de agua contaminándolos considerablemente. Además de Quito, en algunas ciudades, la actividad textil constituye una parte representativa de su economía. Pelileo es un ejemplo importante, donde el 60% de población se

dedica a la industria textil y del cuero. Las aguas residuales producto de esta actividad, son arrojadas al río Patate el cual presenta una coloración azul por los químicos utilizados en la tintura de jean; así como niveles de DBO<sub>5</sub> (Demanda Bioquímica de Oxígeno) y DQO (Demanda Química de Oxígeno) fuera de lo estipulado por la norma (Vaca, 2009).

La Dirección Metropolitana de Medio Ambiente del Distrito Metropolitano de Quito, organización encargada de velar por el cumplimiento de las leyes municipales en cuanto al ambiente se refiere, mediante la ordenanza 213 en su Anexo D, exige que las aguas residuales que sean descargadas directamente a un cuerpo receptor, presenten una coloración inapreciable en dilución 1:20 (la apreciación del color se estima en 10 mL de muestra diluida). Por lo tanto, aquellas industrias textiles que descarguen a un cuerpo receptor, deberán cumplir con la norma.

Los procesos que generalmente se utilizan en el tratamiento de las aguas residuales son de tipo químico. Los más conocidos son: precipitación, oxidación, reducción y coagulación, intercambio iónico, filtración, adsorción, tratamientos electroquímicos, ósmosis inversa, remoción por evaporación, extracción por solvente, entre otros. Estos presentan diferentes porcentajes de efectividad pero en general, son generadores de nuevos desechos aún más peligrosos que los originales (Radulescu *et al.*, 2008, Supaka *et al.*, 2004).

El tratamiento biológico de aguas contaminadas por colorante, contrario al químico, se caracteriza por generar desechos de fácil tratamiento, ser económicamente viable y por su producción reducida de lodos (Chen *et al.*, 1999, Takahashi *et al.*, 2007,). Además, los resultados obtenidos a partir de un tratamiento biológico, combinado con un tratamiento terciario, permiten cerrar el

ciclo de producción, reintroduciendo el agua utilizada, posterior al tratamiento. Tal es el caso de la empresa indú Vijayeswari Textiles, la cual aplicando un tratamiento biológico reduce 90% de su DBO y DQO, y posterior a un tratamiento de ósmosis inversa, recupera el 100% de sus aguas, sin eliminar agua residual (Mohan, 2009).

En el país, aquellas empresas que deseen optar por el tratamiento biológico están obligadas a importar inóculos extranjeros, ya que no existen proveedores de microorganismos nacionales a nivel comercial; de ahí que investigaciones en el tema son ya requeridas para satisfacer la demanda de la empresa, como la presente investigación.

El Ecuador, al ser un país mega diverso (Burneo, 2009), posee sin duda una gran cantidad de microorganismos capaces de ejercer diferentes acciones sobre los contaminantes de tipo textil, cuyo uso podría en un futuro, disminuir la dependencia comercial a inóculos extranjeros y al desarrollo de alternativas frente a procesos químicos.

En los últimos años se han llevado a cabo varias investigaciones sobre la remoción de color en aguas residuales de tipo textil por acción microbiana. Así por ejemplo, Geourgius y Aivasidis, 2006, alcanzaron la clarificación total de agua residual sintética y real contaminada por colorantes reactivos, utilizando bacterias anaerobias inmovilizadas. Isic, 2002 obtuvo remociones de hasta 92% en agua contaminada por colorantes reactivos utilizando un reactor anaerobio de flujo ascendente a escala de laboratorio. Kapdan y Oztekin, 2003 emplearon un reactor semi-continuo bajo condiciones anaerobias para remover el colorante reactivo Naranja 16 y alcanzaron un 90% de eficiencia en la remoción, a concentraciones superiores a 320 mg/L de colorante. Isik, 2004, obtuvo 100% de remoción de color

en agua residual sintética, empleando un reactor anaerobio de flujo ascendente a escala de laboratorio. Brás *et al.*, 2005, lograron remover 88% de colorantes mono y diazo utilizando acetato como fuente alterna de carbono en un reactor metanogénico de flujo ascendente. Kim *et al.*, 2008, obtuvieron 94% de remoción del color utilizando sulfuro en el medio de cultivo, cuya presencia aumentó la eficiencia en un 9% cada 48 horas. Libra *et al.*, 2004 utilizaron un proceso combinado de tratamiento aerobio y anaerobio de agua residual textil sintética para la decoloración y parcial mineralización del colorante vinilsulfónico Negro 5. Tanto con colorante hidrolizado como parcialmente hidrolizado obtuvieron porcentajes de remoción del 64% y la mineralización del hidrolizado fue total. Estos ensayos indican que es posible alcanzar remociones de colorantes reactivos en condiciones anaerobias de laboratorio.

### ***1.3.- Objetivos de la investigación***

#### **1.3.1.-Objetivo General:**

Remover los colorantes reactivos textiles (Amarillo 84, Rojo 141 y Azul Navy 171) eliminados en las aguas residuales, utilizando un inóculo compuesto seleccionado bajo condiciones anaerobias de laboratorio, y evaluar su eficiencia de remoción.

#### **1.3.2.-Objetivos Específicos:**

1.3.2.1.- Seleccionar el inóculo compuesto más eficiente de entre 6 muestras provenientes de diferentes fuentes de aguas residuales y ambiente, con la capacidad de remover los colorantes bajo condiciones anaerobias.

1.3.2.2.- Elaborar una curva de la cinética de crecimiento del inóculo seleccionado (absorbancia vs. número de bacterias por conteo en siembra profunda).

1.3.2.3.- Probar el inóculo seleccionado en tres concentraciones de los colorantes reactivos mencionados (100, 150 y 200 mg/L) con tres concentraciones de glucosa como fuente alterna de Carbono, bajo condiciones anaerobias.

#### **1.4.- Marco Teórico**

##### **1.4.1.- La industria textil**

La industria textil es el conjunto de operaciones que tiene como objetivo la fabricación de telas. El proceso de elaboración se divide en tres fases: 1) hiladuría, 2) tejeduría y 3) acabados. Las dos primeras son llamadas fases secas porque en general no requieren el uso de volúmenes considerables de agua (Salas, 2003). La tercera fase comprende a su vez un conjunto de sub-fases: 1) lavado (uso de agua caliente en pH alcalino para retirar tierra, impurezas vegetales, grasas y otros contaminantes de las fibras; el desecho en esta fase es agua altamente alcalina), 2) desengomado (elimina agua cargada de materia orgánica y sólidos), 3) blanqueado (emplea hipoclorito de sodio que está presente al final del proceso en el agua residual), 4) mercerización (neutraliza el pH de la tela, implica un lavado para retirar el exceso de álcali y el uso de ácido), 5) tintura (elimina aguas cargadas de colorantes dispersos, directos y reactivos, aminoras provenientes de

colorantes azoicos, aditivos dispersantes, antiespumantes y álcalis); finalmente 6) estampado (proceso generador de aguas residuales cargados con compuestos orgánicos volátiles) (IFC,2007).

#### **1.4.2- Las aguas residuales de la industria textil**

El proceso de producción de la industria textil, requiere del uso de grandes volúmenes de agua en cada una de sus fases. En el Ecuador una empresa textil puede ocupar en promedio 70 m<sup>3</sup> por tonelada de tela. En España, Estados Unidos, Francia y Alemania, se utilizan 125 m<sup>3</sup>, 125-170 m<sup>3</sup>, 100-150 m<sup>3</sup>, 120 m<sup>3</sup> por cada tonelada de tela producida respectivamente (Pey, 2008), que posteriormente se convierten en aguas residuales cargada de cantidades importantes de colorantes no fijados en el proceso de tinturación (Bock y Rott, 2003).

Las aguas residuales de tipo textil provienen de la descarga correspondiente a los procesos de: desengomado (15%), descruce y mercerizado (20%) y del blanqueo, teñido y lavado (65%) (Mansilla *et al.*, 2001). La composición del agua residual depende de los compuestos orgánicos y químicos utilizados, así como también de los colorantes empleados (Talarposhti *et al.*, 2001). En general, se caracterizan por ser alcalinas y tener elevados niveles de DBO (entre 700 y 2000 mg/L) y DQO. Entre los contaminantes presentes están los sólidos en suspensión, aceites minerales, compuestos orgánicos como el fenol, sustancias orgánicas halogenadas por el uso de solventes, metales pesados (cromo, cobre, zinc, plomo, níquel) y restos de colorantes no fijados en la tela (IFC, 2007).

Las concentraciones de colorantes en las aguas residuales pueden alcanzar rangos entre 10 a 200 mg/L, principalmente de colorantes reactivos, los cuales son utilizados en un 60% en la industria y son también los que menor porcentaje de fijación a la tela tienen (50%). Significa entonces, que el 50% del colorante reactivo empleado para la tintura se perderá en el agua residual (Supaka *et al.*, 2004; Khalid *et al.*, 2008).

### 1.4.3.- Los colorantes reactivos empleados en la industria textil y eliminados en el agua residual

Los colorantes reactivos se caracterizan por poseer un anillo cloro triazínico con grupos amino e hidroxilo. El anillo reactivo se conecta al cromóforo mediante un enlace amino formando la molécula completa del colorante, la cual se fija a la celulosa por la reacción con un grupo hidroxilo del anillo celulósico (Cegarra, 1980). Los colorantes reactivos se caracterizan por formar enlaces químicos covalentes con las fibras, de alta solidez (Melnikov y Moriganor, 1982). De acuerdo a sus grupos reactivos se subdividen en: Monoclorotriazínicos, Diclorotriazínicos, Vinilsulfónicos, Tricloropirimidínicos, Vinilsulfonamidínicos, Vinilsulfónicos y Monocloro difluor pirimidínicos (Cegarra, 1980).

Los grupos reactivos se fijan a la celulosa y de acuerdo a la reacción que establezcan con ésta, se clasifican en dos grupos: 1) colorantes reactivos que forman ésteres de celulosa y 2) colorantes reactivos que forman éteres de celulosa (figura 1.1).

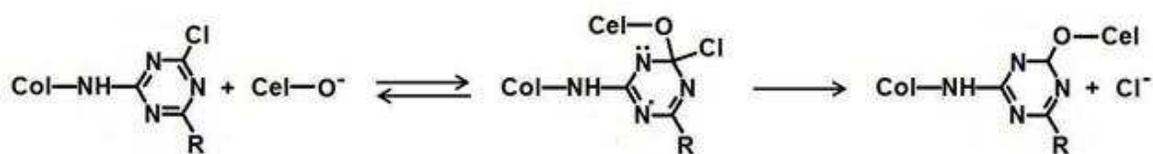
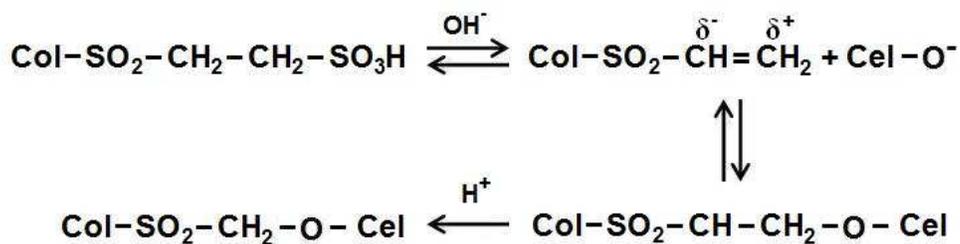


Figura 1. 1: Reacción de esterificación entre la celulosa y el colorante reactivo con anillo heterocíclico (Cegarra, 1980).

Los que no tienen anillos en sus grupos reactivos (colorantes vinilsulfónicos y acrilamidicos), reaccionan por adición nucleofílica al doble enlace C = C, en medio alcalino (figura 1.2).



\*Col-: grupo cromóforo

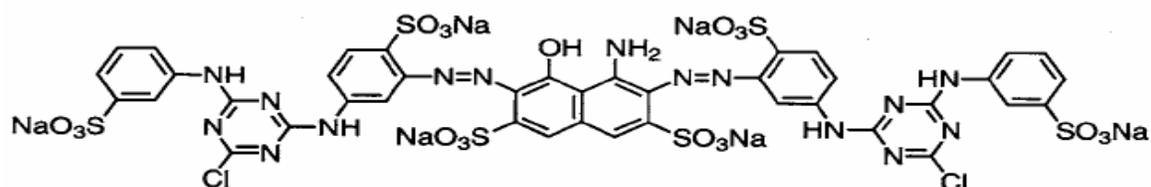
Figura 1. 2: Reacción de formación de éteres de los colorantes vinilsulfónicos con celulosa (Cegarra, 1980).

El grupo cromóforo constituye la parte de la molécula que le da el color característico. Los cromóforos más importantes son: los azo (N=N), carbonil (-C=O), metan (-CH=), nitro (-NO<sub>2</sub>) y quinónicos (Dos Santos *et al.*, 2007).

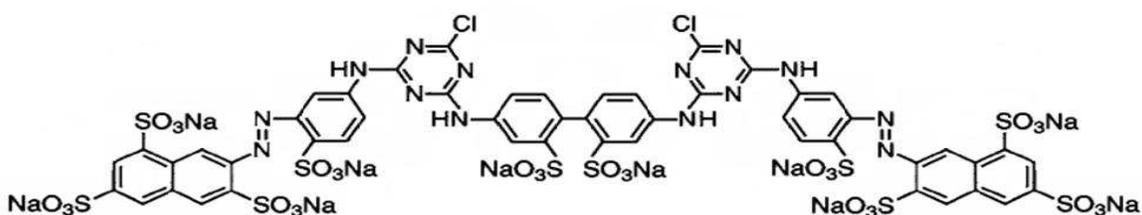
La mayoría de colorantes utilizados en la industria textil son los de tipo azo (-N=N) (Kiyoharu *et al.*, 2002), aproximadamente el 70% de los colorantes textiles de los diez mil colorantes manufacturados (Brás *et al.*, 2004). Los colores más comunes de este tipo son el amarillo, el naranja y el rojo (Dos Santos *et al.*, 2007).

Los colorantes azo son generalmente recalcitrantes a la biodegradación por sus estructuras complejas y de naturaleza xenobiótica que requieren de

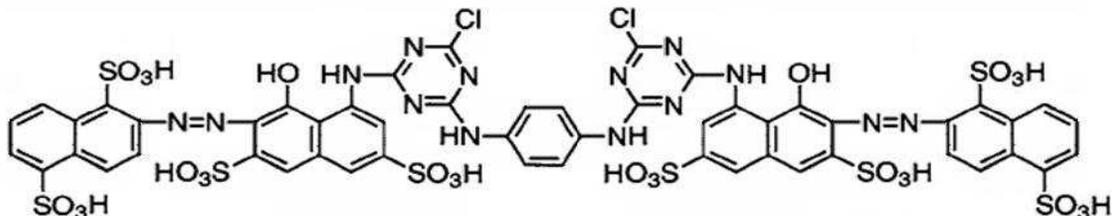
tratamientos anaerobios para su mineralización (Khalid *et al.*, 2007). En la presente investigación se intenta remover los colorantes reactivos azo Rojo 141, Azul Navy 171 y Amarillo 84 (figura. 1.3).



Azul Navy 171



Amarillo 84



Rojo 141

Figura 1. 3: Estructuras moleculares de los colorantes reactivos textiles Azul Navy 171, Amarillo 84 y Rojo 141 (Bell y Buckley, 2003).

Estudios realizados como los de Rajaguru *et al.*, 2002 y Umbuzeiro *et al.*, 2005 indican que los colorantes azo especialmente, contribuyen a la actividad mutagénica del suelo y de las aguas superficiales contaminadas por efluentes textiles, además de las afecciones relacionadas a la presencia de color en aguas

superficiales como la obstrucción de la entrada de luz y la transferencia de oxígeno al cuerpo de agua, afectando a la vida acuática (Pandey *et al.*, 2007).

Otra parte de la molécula del colorante es el llamado auxocromo, grupo que ayuda a intensificar el color del cromóforo. Los auxocromos más importantes son: amina (-NH<sub>3</sub>), carboxil (-COOH), sulfonato (-SO<sub>3</sub>H) e hidroxilo (-OH). El grupo sulfonato le da gran hidrosolubilidad al colorante (Dos Santos *et al.*, 2007), lo que permite deducir que gran parte del colorante añadido en el proceso de este tipo se irá en el agua residual.

En resumen, los colorantes reactivos están conformados básicamente por tres partes: 1) el grupo reactivo que reacciona con la tela ya sea formando ésteres o éteres de celulosa 2) un grupo cromóforo que es el que le da el color a la molécula y 3) uno o varios auxocromos que intensifican el color del cromóforo. La capacidad de biodegradación del colorante depende principalmente de la naturaleza química del cromóforo, así por ejemplo los colorantes azo con grupos hidroxilo o grupos amino son más susceptibles a la biodegradación que aquellos con grupo metil, metoxi, sulfo o nitro (Supaka *et al.*, 2004).

#### **1.4.4.- Tratamiento de aguas residuales de tipo textil**

El tratamiento de efluentes contaminados consiste en el conjunto de subtratamientos primarios, secundarios y terciarios aplicados para retirar contaminantes presentes en el agua residual. Los tratamientos primarios son de carácter físico-químico y tienen como objetivo retirar sólidos en suspensión, coloides, metales pesados, aceites y grasas. Los tratamientos secundarios son utilizados para retirar materia orgánica del agua. Finalmente los tratamientos

terciarios son aplicados para remover sales disueltas, microcontaminantes y para alcanzar una depuración fina del líquido. Todos estos tratamientos son aplicados en las aguas residuales de tipo textil (Rodríguez *et al.*, 2006).

Los tratamientos primarios comprenden procesos como: homogenización, cribado, neutralización, coagulación y floculación, decantación y filtración. Los tratamientos terciarios incluyen un conjunto de técnicas específicas como el arrastre de vapor con agua y aire, procesos de membrana, intercambio iónico, adsorción con carbón activado, procesos de oxidación, procesos de reducción y precipitación química, para mejorar la calidad del agua posterior al tratamiento secundario. Los tratamientos secundarios son procesos biológicos aplicados para remover materia orgánica presente en el agua. Este tipo de tratamiento requiere la presencia de microorganismos como son bacterias aerobias, anaerobias, facultativas y hongos en cultivos puros y mixtos (Pandey *et al.*, 2007). Los microorganismos involucrados remueven materia orgánica y nutrientes (Nitrógeno y el Fósforo por ejemplo), como parte de su metabolismo (Rodríguez *et al.*, 2006).

Por las características de solubilidad y estabilidad que poseen los colorantes reactivos no pueden ser removidos por floculación, sedimentación o adsorción. El tratamiento biológico es una opción de tratamiento de efluentes contaminados por colorantes reactivos, que requerirá previamente mejorar la relación DBO/DQO en promedio igual a 0,35, a un mínimo de 0,6 (Mansilla *et al.*, 2001).

Dentro del tratamiento biológico con el uso de bacterias, tanto condiciones aerobias como anaerobias han sido estudiadas, principalmente en cuanto a la ruptura del doble enlace  $-N=N-$  que caracteriza a los colorantes azoicos (Supaka *et al.*, 2004). La ruptura de este enlace requiere la presencia de agentes

donadores de electrones, los cuales tomarán como aceptor final el enlace azo. En condiciones aerobias, el oxígeno compite con el colorante por los electrones convirtiéndose en el aceptor final (Sen y Demirer, 2003). Los colorantes azo contienen sustituyentes de grupos nitro y sulfónicos recalcitrantes para las bacterias aerobias (Dos Santos *et al.*, 2007). Los microorganismos anaerobios a más de generar electrones para la ruptura del enlace azo, permiten alcanzar un bajo potencial redox necesario para una decoloración eficiente del agua (Dos Santos *et al.*, 2004). De ahí que el tratamiento más recomendable es el uso de bacterias anaerobias.

Bajo condiciones anaerobias se desarrollan microorganismos que tiene la propiedad de tolerar bajas concentraciones de oxígeno, tal es el caso de algunas especies pertenecientes a los géneros *Actynomices*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, entre otros. Cuando en el medio existen bajas concentraciones de oxígeno, se desarrollan las especies anaerobias aerotolerantes a condiciones específicas de pH; *Lactobacillus* por ejemplo, puede desarrollarse a un pH de 4 (Rivas y Mota, 2006). Pese al desarrollo de microorganismos aerobios mientras exista oxígeno disponible, de acuerdo a Brás *et al.*, 2005, aquellos encargados de la remoción de color serán los anaerobios.

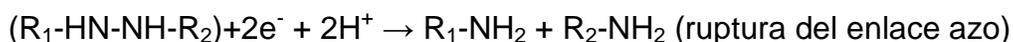
Los microorganismos removedores, pueden actuar en forma de cultivos mixtos y de cultivos puros. Los cultivos mixtos son los más utilizados porque pueden actuar sobre un mayor espectro de colorantes textiles que los cultivos puros, obteniendo mejores resultado (Dos Santos *et al.*, 2007).

La decoloración por cultivos mixtos tanto como por cultivos puros, requiere generalmente de un sustrato alternativo que constituya el donador de electrones para la ruptura del enlace azo; entre los posibles co-sustratos están el extracto de

levadura, peptona y la glucosa (Haroun e Idris, 2009). En condiciones anóxicas, la eficiencia de la glucosa como sustrato alternativo dependerá del inóculo. Los estudios consultados demuestran que los resultados obtenidos son muy variados (Pandey *et al.*, 2007). Kapdan *et al.*, 2000, Huag *et al.*, 1991, Chang *et al.*, 2001 y Chen *et al.*, 2003 demostraron que *Sphingomonas xenophaga* cepa BN6 logra buenos niveles de decoloración de Amarillo reactivo 3 en presencia de glucosa mientras que *Pseudomonas leuteola*, *Aeromonas sp.* y algunos cultivos mixtos alcanzan resultados poco favorables, debido posiblemente a la caída de pH por la formación de ácidos o a la represión catabólica (Pandey *et al.*, 2007). Sin embargo, es casi generalizado el uso de un co-sustrato para alcanzar altos porcentajes de remoción de color.

#### **1.4.5.- Mecanismos de remoción de color empleados por bacterias anaerobias**

El proceso anaeróbico de remoción de colorantes azo radica en la ruptura del doble enlace  $-N=N-$  mediante un proceso que comprende la transferencia de cuatro electrones, equivalentes reductores que actúan sobre el enlace. El proceso de ruptura se divide en dos fases, cada una implica la transferencia de dos electrones al enlace azo que es el aceptor final (figura 1.4).



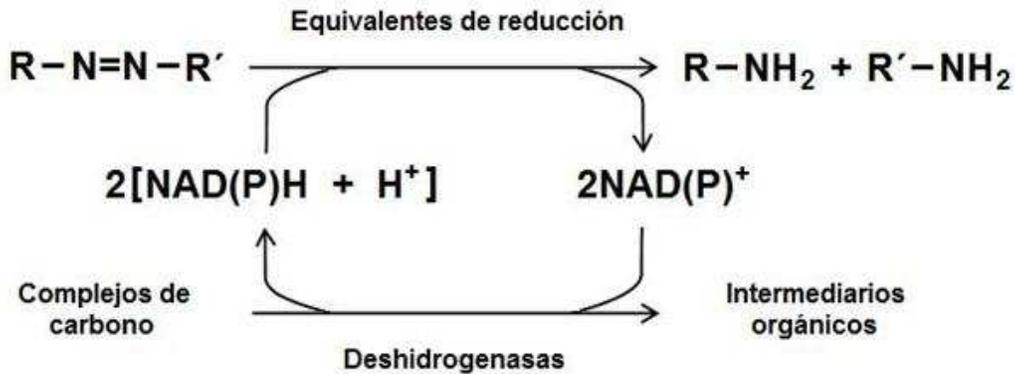


Figura 1. 4: Hipótesis de decoloración por acción bacteriana (Yoo *et al.*, 2001).

No se conoce con exactitud si se trata de un mecanismo de ruptura intra o extra celular. La hipótesis más aceptada es que muchas bacterias poseen enzimas citoplasmáticas específicas que actúan como azo reductasas y que bajo condiciones anaerobias transfieren electrones mediante flavinas solubles a los colorantes azo. Sin embargo, se cree que la ruptura del enlace azo es un proceso extracelular, ya que colorantes azo sulfonados de alta polaridad no pueden penetrar la membrana de la célula. Estas propuestas han sido corroboradas por investigaciones en las que se observa mayor eficiencia de remoción en extractos celulares en comparación al uso de células completas (Russ *et al.*, 2000, Stolz, 2001).

El mecanismo de ruptura requiere de la participación de un co-sustrato, mediadores y el colorante azo. En cada paso se dan reacciones enzimáticas encargadas de la reducción. En primer lugar, el co-sustrato en estado reducido que se oxida por acción enzimática. Estas enzimas que actúan oxidando el sustrato, reducen a los mediadores que se encuentran en estado oxidado. Los mediadores pueden ser compuestos de flavina como son la Flavina Adenina Dinucleótido, la Flavina Adenina Mononucleótido y la riboflavina, así como compuestos quinónicos como son la antraquinona 2,6-disulfonada (AQDS),

antraquinona-2-sulfonada (AQS). Los mediadores son reducidos por enzimas no específicas convirtiéndose en el primer aceptor de electrones del co-sustrato que es el donador. Finalmente los electrones son químicamente transferidos al colorante azo como aceptor terminal de electrones con la consecuente regeneración del mediador (Dos Santos *et al.*, 2004).

Un factor importante en los mecanismos de remoción de color, es el tipo de respiración que llevan a cabo los microorganismos. Bajo condiciones anaerobias existen varios tipos de respiración clasificados de acuerdo al aceptor final de electrones, entre los que se encuentran la acetogénesis, desnitrificación y reducción del sulfato (Madigán, 2003). Cada uno de estos procesos, tolera la presencia de diferentes concentraciones de oxígeno; tal es el caso de la nitrificación y la sulfato reducción, cuyos microorganismos pueden sobrevivir y desarrollarse en condiciones anóxicas (Rivas y Mota, 2006). Las bacterias metanogénicas por el contrario, necesitan condiciones de anaerobiosis más estrictas para su supervivencia (Ritman y McCarty, 2001).

Bacterias anaerobias facultativas en bajas concentraciones de oxígeno y una fuente de carbono fácilmente biodegradable como la glucosa, reducen el nitrato a nitrógeno gaseoso o a óxido nitroso ( $N_2O$ ) y el óxido nítrico (NO) por un proceso de desnitrificación en el que intervienen enzimas nitrato reductasas presentes en bacterias anaerobias facultativas (Llavador, 2005). Cuando los sulfatos son los aceptores de electrones, se lleva a cabo un proceso de respiración que comienza con la adenilación del sulfato para formar adenosina 5-fosfosulfato (APS), el cual es reducido por una enzima APS reductasa a sulfito ( $SO_3^{-2}$ ). En presencia de una fuente de carbono donadora de electrones el ATP requerido es proporcionado por la fermentación del sustrato de carbono. En el proceso, los electrones son transportados de las enzimas hidrogenasas a las

enzimas APS reductasas que conjuntamente con la sulfito reductasa concluyen la reducción del sulfato a sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) (Arnd *et al.*, 2000).

#### **1.4.6. Obtención de microorganismos en condiciones anaerobias a nivel de laboratorio para su aplicación al tratamiento de aguas residuales.**

Los microorganismos removedores de color pueden provenir de fuentes tan variadas como aguas residuales, lodos activados, suelo, entre otros., que deberán ser cultivados en un medio rico en nutrientes que permita aumentar su población. Lo recomendado es el uso de agua residual sintética, la cual consiste en un medio mineral con una fuente de carbono, y el colorante que se pretende remover (Supaka *et al.*, 2004). Estas condiciones al ser controladas, permitirán medir la decoloración del medio ya sea por patrones de comparación de color o por espectrofotometría; este último es el más utilizado por su precisión (Dos Santos *et al.*, 2007).

La selección de microorganismos en condiciones anaerobias parte del cultivo en medios selectivos sólidos o líquidos. Entre los sólidos se encuentran el agar sangre, agar chocolate y agar MacConkey. El medio líquido de mayor uso es el Tioglicolato (Rivas y Mota, 2006), el cual tiene un indicador colorimétrico llamado Resazurina sódica que toma un color rosado en presencia de oxígeno y amarillento en su ausencia.

Para conocer si los microorganismos cultivados en Tioglicolato poseen la capacidad de remover colorantes textiles, deben ser cultivados en medio mineral en presencia de color (agua residual sintética), con una fuente alterna de carbono como la glucosa o el extracto de levadura, que de acuerdo a Moosvi *et al.*, 2005,

parece ser obligatoria en el funcionamiento de bacterias con capacidad de decolorar. Las concentraciones iniciales de color pueden ir desde los cincuenta a los cuatrocientos ppm. Se recomienda que el pH del medio inicial sea seis o cercano, y que no descienda de cinco punto cinco. Los microorganismos que se desarrollen tendrán la capacidad de resistir y/o tolerar el colorante y podrán ser aislados posteriormente para obtener cultivos puros (Moosvi *et al.*, 2005).

Para llevar el inóculo seleccionado al tratamiento de aguas residuales de tipo textil, la biomasa en primer lugar, debe ser estabilizada en un reactor en agua residual sintética. Naimabadi *et al.*, 2009 recomienda añadir el colorante en concentraciones bajas inicialmente (30 mg/L) hasta alcanzar 100 mg/L al día 83 días, 250 mg/L al día 112 y 350 mg/L al día 133. De esta manera se evitará que la biomasa se inhiba por el alto nivel de estrés. Una vez estabilizada la biomasa, el reactor puede ser alimentado con agua residual real, mejorando la relación DBO/DQO en un nivel mínimo de 0.6 (Mansilla *et al.*, 2001).

### **1.5.- Sistema de hipótesis**

El inóculo compuesto seleccionado removerá los colorantes textiles reactivos en estudio, bajo condiciones anaerobias.

## **CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1 Participantes**

La investigación fue llevada a cabo como parte del proyecto “Obtención de un inóculo bacteriano nativo compuesto capaz de degradar contaminantes típicos en efluentes de industrias textiles, para que sea utilizado como biomasa en plantas de tratamiento biológico de aguas residuales a escala real”, financiado por la Escuela Politécnica del Ejército.

La empresa Textil Tornasol contribuyó con la donación de los colorantes reactivos Azul Navy 171, Rojo 141 y Amarillo 84, para el desarrollo de la investigación.

El Programa de Saneamiento Ambiental del Distrito Metropolitano de Quito contribuyó con el informe “Caracterización de las Descargas de Aguas Residuales al Río Machángara”, gracias al cual, se pudo seleccionar y reconocer los colectores de donde se tomaron las muestras.

Las personas que participaron en esta investigación fueron: Irina Moncayo en la planificación y desarrollo de la investigación, M. Sc. Alma Koch como directora de tesis y Soledad Benitez Ph.D como co-directora de tesis.

## **2.2 Zona de Estudio:**

### **2.2.1 Laboratorio de investigación:**

La investigación fue realizada en el Laboratorio de Microbiología ubicado en el Centro de Investigaciones Científicas de la Escuela Politécnica del Ejército, localizada en la Av. Gral. Rumiñahui s/n Sangolquí – Ecuador.

### **2.2.2 Zonas de muestreo:**

Los muestreos fueron llevados a cabo en dos colectores con descargas industriales al río Machángara:

- *Punto de Referencia “El Recreo”:*

La ubicación geográfica es 775515 E 9971714 N (DATUM WGS84); a una altitud de 2809 m.

- *Colector Teodoro Gómez de la Torre:*

La ubicación geográfica de este sitio corresponde a 775567 E 9971852 N (DATUMWGS84); y a una altitud de 2823 m.

## **2.3 Período de tiempo de investigación:**

### **2.3.1 Fecha de inicio de la investigación:** Enero 2009

### **2.3.2 Fecha de fin de investigación:** Noviembre 2009

### **2.4 Diseño:**

La experimentación estuvo dividida en varias fases, cada una fue evaluada independientemente de la siguiente manera:

#### **Fase 1.- Obtención de inóculos microbianos a partir de muestras colectadas, bajo condiciones anaerobios (evaluación cualitativa):**

En esta fase únicamente se evaluó si los inóculos tenían la capacidad de crecer bajo condiciones anaerobias, cultivando los inóculos en el medio selectivo Tioglicolato de acuerdo a lo recomendado por Rivas y Mota, 2006. Fueron seleccionados aquellos inóculos que presentaron crecimiento bajo las condiciones de estudio.

#### **Fase 2.- Selección de inóculo bacteriano bajo condiciones anaerobias con capacidad de remover los colorantes en estudio:**

La selección del inóculo se hizo midiendo la reducción de color por espectrofotometría, de acuerdo a lo sugerido por Dos Santos *et al.*, 2007, y organizando los datos obtenidos dentro de un Diseño Experimental Completamente al Azar (DCA), en el que cada inóculo constituyó un tratamiento diferente. De cada tratamiento se hicieron tres repeticiones. Para cada color se aplicó un DCA y la variable evaluada en todos los casos fue el porcentaje de

remoción de color. Se analizó si había diferencia significativa entre los porcentajes de remoción de los tratamientos aplicados mediante el ANOVA de un factor. Se usó la prueba de Tukey para observar cómo se ubicaban los datos obtenidos en grupos de homogeneidad y así seleccionar el inóculo con mayor capacidad de remover color.

### **Fase 3.- Evaluación de efecto del pH en la remoción de color:**

Para verificar que la remoción de color fue provocada por acción bacteriana y no por el cambio de pH del medio, se hicieron tres experimentaciones diferentes:

#### **Fase 3.1.- Disminución de pH del medio de cultivo utilizando ácido clorhídrico:**

Para esta fase se evaluó la disminución de color relacionando porcentaje de pérdida de color con el pH del medio, debido a la sensibilidad que los colorantes presentan a las modificaciones de este parámetro, como lo especifica Cegarra, 1981. Se obtuvo el porcentaje promedio de color perdido por un cambio promedio en el nivel de pH.

#### **Fase 3.2.- Uso de solución tampón fosfato pH 6 para mitigar el cambio de pH en el medio de cultivo y evaluación de remoción de color en presencia de la misma:**

El objetivo de esta fase fue determinar una concentración adecuada de solución tampón fosfato pH 6, para agregar al medio de cultivo y mitigar los

cambios de pH generados como resultados de la acción bacteriana anaerobia, similar a lo realizado por Brás *et al.*, 2005. Se probaron cinco concentraciones de solución tampón fosfato pH 6 en el medio de cultivo, para cada color por separado. La experimentación fue organizada en tres partes, una para cada color.

Para cada uno de los colorantes se aplicó un DCA de cinco tratamientos (uno por cada concentración de solución tampón), con tres repeticiones cada uno. Se realizó un ANOVA para determinar si existían diferencias significativas entre las concentraciones de solución tampón fosfato pH 6 usadas, a partir de los porcentajes de remoción calculados. Se aplicó la prueba de Tukey para cada DCA con la finalidad de determinar, de acuerdo a los grupos de homogeneidad formados, la concentración ideal de tampón a utilizar en fases posteriores de la experimentación.

### **Fase 3.3.- Elevación de pH en medios de cultivo con pH bajo y evaluación de recuperación de color:**

Se elevó el pH de medios de cultivo después de la acción bacteriana hasta alcanzar el pH original del medio y se evaluó la recuperación de color obteniendo el porcentaje medio de color recuperado por un nivel promedio de pH elevado.

### **Fase 3.4.- Evaluación de estabilidad de colorante en el medio Jiang *et al.*, 2004 modificado, utilizado en la experimentación:**

Con la finalidad de evaluar la pérdida natural de color del medio de cultivo, se cuantificó el porcentaje de remoción del colorante, al someter el medio de cultivo a las condiciones de estudio. El porcentaje de pérdida se obtuvo a partir del promedio de los porcentajes removidos naturalmente, calculando también la

desviación estándar para medir la dispersión de los datos y con ésta la fiabilidad de los mismos.

**Fase 4.- Evaluación de la capacidad del inóculo seleccionado, de remover 100 mg/L, 150 mg/L y 200 mg/L de colorantes Azul Navy 171, Amarillo 84 y Rojo 141 del inóculo, bajo condiciones anaerobias, con 0 g/L, 2,5 g/L y 5 g/L de glucosa:**

El diseño experimental consistió en un arreglo factorial de dos factores AxB (Concentración de glucosa y concentración de colorante) con tres niveles cada uno (tabla 2.1). Para cada colorante se aplicó un arreglo factorial individualmente. La concentración 100 mg/L de colorante fue seleccionada porque ha sido considerada en los trabajos de investigación de remoción de color bajo condiciones anaerobias consultados, como el de Supaka *et al.*, 2004 y Bell y Buckyel, 2003.

La base para la selección de la concentración de glucosa, también fue bibliográfica. Trabajos de investigación como los de Kalhid *et al* y 2008, Naimabadi *et al.*, 2009, ensayan el uso de concentraciones comprendidas entre 0 g/L a 5 g/L. Fueron entonces seleccionados: 100 mg/L, 150 mg/L y 200 mg/L de colorante, con 0 g/L, 2,5 g/L y 5 g/L de glucosa como co-sustrato.

El número de tratamientos fue igual a 27 para cada color. De cada uno hubo un blanco que correspondió al medio con color sin bacterias, el cual fue utilizado para el análisis descriptivo de los datos obtenidos, pero no fue incluido en el análisis de diseño experimental.

## **2.5 Procedimientos**

### **2.5.1 Preparación de medio de cultivo Jiang *et al.*, 2004 modificado, utilizado en todos los ensayos realizados**

El medio de cultivo utilizado en los ensayos del presente trabajo de investigación fue el medio de cultivo Jiang *et al.*, 2004 modificado en la fuente de calcio, magnesio y hierro, usando como fuente de carbono glucosa. La composición del medio fue:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 4 g/L;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,4 g/L; NaCl, 0,7 g/L,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,08 g/L;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1 g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 g/L, EDTA-Fe, 0,3 g/L y glucosa.

Los colorantes reactivos de la investigación, fueron añadidos al medio de cultivo estéril después de filtrarlos en membranas de 0.2  $\mu\text{m}$ .

Para evitar la formación de precipitados en los medios de cultivo, fue necesario que las soluciones stock sean esterilizadas por separado, enfriadas y unidas a temperatura ambiente. Una vez preparada la solución completa, se añadió el colorante en la cantidad necesaria para alcanzar las concentraciones de 100 mg/L, 150 mg/L y 200 mg/L. Finalmente, el volumen fue completado con agua estéril fría.

### **2.5.2 Colección de muestras con microorganismos en el Río Machánga, en agua residual de lavado de una industria textil y muestras en medio de cultivo Jiang *et al.*, 2004 con colorantes directos Azul 106 y Rojo 23, expuestos al aire.**

Las muestras que sirvieron para la experimentación, provinieron de tres diferentes fuentes. Las primeras (muestras I1 e I2) fueron obtenidas por muestreos compuestos en los colectores Teodoro Gómez de la Torre y el Recreo (figura 2.1). Estos colectores fueron seleccionados por dos razones fundamentales: 1.- ambos descargan al río Machángara aguas residuales provenientes de industrias, incluyendo la textil (PSA, 2008); y 2.- estos colectores son de relativo fácil acceso.



Figura 2. 1: Colectores muestreados a) Teodoro Gómez de la Torre y b) Punto de referencia El Recreo, en el río Machángara.

De acuerdo al estudio realizado por el Programa de Saneamiento Ambiental de la EMAAP-Q, las horas de descarga con mayor carga de DQO son en la mañana, de ahí que los muestreos fueron realizados de 9:45 a 11:48 y de 10:30 a 12:15 en los colectores Teodoro Gómez de la Torre y El Recreo, respectivamente.

El muestreo compuesto fue realizado de acuerdo a lo especificado por La Dirección de Medio Ambiente, 1998, el cual consistió en seleccionar una zona de

homogeneidad, donde era visible que el agua a muestrear permanecía estancada por períodos indefinidos de tiempo. Las bacterias en estas zonas estarían mayormente adaptadas a los contaminantes descargados en estos puntos de muestreo por la exposición continua a los colorantes.

Una vez seleccionado el lugar, se procedió a enjuagar con el agua del punto de muestreo la parte interior del balde donde se recogieron los volúmenes colectados y la jarra graduada usada para la colecta de las muestras. Cada quince minutos se tomaron 120 mL de agua, se midió pH y temperatura utilizando un pH metro Hanna HI 9026 con el objetivo de conocer a qué condiciones estaban las bacterias sometidas en el momento de la colecta de la muestra. El tiempo total de muestreo fue de dos horas en el Colector “Teodoro Gómez de la Torre” y de una hora y media en el punto de referencia “El Recreo” en el río Machángara. La diferencia del tiempo en la colección de las muestras radicó en las condiciones climáticas de los días de muestreos. El muestreo en el punto de referencia “El Recreo” fue interrumpido por una fuerte lluvia a la hora y media de iniciado el proceso, lo que obligó a disminuir el tiempo de colección. Cada litro colectado en los puntos muestreados, fue depositado en el balde durante el tiempo que duró el proceso.

Una vez tomados los nueve litros en dos horas de muestreo en el colector “Teodoro Gómez de la Torre” y los siete litros en el punto de referencia “El Recreo”, fueron homogenizados y tanto el pH como la temperatura de la muestra compuesta registrados. Posteriormente se enjuagó el interior de los recipientes plásticos donde se almacenó la muestra con el agua colectada y se los llenó hasta el borde. Los recipientes fueron transportados inmediatamente al laboratorio en condiciones de refrigeración y almacenadas una vez en él, en la refrigeradora. Las muestras permanecieron durante dos meses refrigeradas antes de comenzar el ensayo.

Las segundas muestras (I3 e I4), fueron obtenidas del agua residual proveniente del proceso de lavado una industria textil. Estas muestras fueron utilizadas para la selección de inóculos porque de acuerdo a Peña y Tobón, 2006, es posible encontrar microorganismos removedores, en los mismos contaminantes. El muestreo consistió en coleccionar un litro de agua de lavado proveniente de una máquina de tintura de colores oscuros. La colección se hizo con una jarra plástica directamente de la descarga de la máquina y fue envasada en una botella plástica de un litro. La muestra fue trasladada al laboratorio en un cooler. Una vez en el laboratorio, el líquido coleccionado fue distribuido en botellas de vidrio. Una parte de las botellas fue almacenada a 4°C y otra parte mantenida a temperatura ambiente. Después de dos semanas, dos botellas (una correspondiente a cada muestreo), mostraron cambio de coloración.

Finalmente, los dos últimas muestras microbiológicas (I5 e I6), fueron obtenidas por exposición al aire de tubos de ensayo con medio de cultivo de Jiang *et al.*, 2004 modificado, con colorante directo rojo y azul respectivamente, por 10 minutos. Posteriormente fueron tapados e incubados a temperatura ambiente hasta que se observó reducción de color.

### **2.5.3 Obtención de inóculos bacterianos a partir de muestras coleccionadas, bajo condiciones anaerobias**

Uno de los objetivos de la investigación fue seleccionar bacterias con capacidad de remover color. Los ensayos estuvieron enfocados a la experimentación con bacterias, sin embargo, se habla de muestras microbianas porque al ser compuestas, estuvieron posiblemente conformadas por otro tipo de microorganismos. Ya que las técnicas utilizadas fueron para el cultivo y conteo de

bacterias, a partir de este momento se hablará únicamente de bacterias y no de microorganismos.

Ya que las bacterias fueron obtenidas bajo condiciones aerobias, fue necesario primeramente seleccionar una fuente bacteriana que tenga la capacidad de actuar bajo condiciones anaerobias. Para el efecto, una alícuota de las muestras colectadas fue sembrada en medio Tioglicolato (Peptona de caseína (15 g/L), Extracto de levadura (5 g/L), D-glucosa (5,5 g/L), L-cisteína (5g/L), Cloruro de sodio (2.5 g/L), Sodio tioglicolato (0,5g/L) y Resazurina sódica), de acuerdo a lo recomendado por Rivas y Mota, 2006. Cuando el medio de cultivo tioglicolato presenta una coloración totalmente amarillenta, no hay presencia de oxígeno, mientras que una coloración rosa indica la presencia de la molécula (Benson, 1994).

El cultivo de las bacterias fue realizado de acuerdo a Benson (1994). Se tomaron 0,1 mL de cada fuente de bacterias (inóculos colectados) y se colocaron en 10 mL de medio tioglicolato. Los tubos de ensayo inoculados fueron incubados en una incubadora Wiscube, bajo condiciones anaerobias. El tiempo de incubación fue de 48 horas y la temperatura 35°C.

Se seleccionaron los inóculos que presentaron crecimiento bajo las condiciones de estudio.

Los inóculos que crecieron en condiciones anaerobias en el medio tioglicolato fueron sembrados e incubados en 10 mL de medio salino de Jiang *et al.*, 2004 modificado, en tubos de ensayo bajo las mismas condiciones de anaerobiosis, durante 48 horas a una temperatura de 35°C, con el objetivo de

adaptar a las bacterias a una menor cantidad de nutrientes. Estas bacterias fueron utilizadas como inóculo en la siguiente fase de experimentación.

#### **2.5.4 Selección de inóculo bacteriano bajo condiciones anaerobias con capacidad de remover los colorantes en estudio.**

Los inóculos bacterianos que mostraron crecimiento bajo condiciones anaerobias en el medio de Jiang *et al.*, 2004 modificado (cultivo madre), fueron sembrados en el medio Jiang *et al.*, 2004 modificado, enriquecido con 100 mg/L de colorantes textiles reactivos Azul Navy 171, Rojo 141 y Amarillo 84 por separado, para seleccionar el mejor inóculo removedor. El pH del medio de cultivo fue de 6.

En cada tubo con colorante, se sembró 0,1 mL del cultivo bacteriano madre, con una densidad celular de alrededor de  $3 \times 10^8$  UFC/mL determinada por conteo en siembra profunda. De cada inóculo, se hicieron tres repeticiones para cada colorante. La variable evaluada fue el porcentaje de reducción de color calculado por la relación establecida entre la lectura espectrofotométrica antes y después de la acción bacteriana, similar a lo realizado por Moosvi *et al.*, 2005.

Para la medición de color se utilizó el método espectrofotométrico recomendado por Dos Santos *et al.*, 2007. Las longitudes de onda empleados durante la experimentación estuvieron basadas en los estudios de Bell y Buckley, 2003, Russ *et al.*, 2000 y Harrelkas *et al.*, 2008 para los colores rojo, amarillo y azul respectivamente. Se utilizaron seis diferentes longitudes de onda para cada color, con el objetivo de obtener varios valores de absorbancia que formen una curva (tabla 2.1). Para el análisis estadístico únicamente se tomó el valor de la

longitud de onda más sensible, es decir, la que mayor valor de absorbancia dio (620 nm para el azul, 410 para el color amarillo y 530 nm para el color rojo).

Tabla 2. 1: Longitudes de onda utilizadas durante toda la experimentación para la medición de los colores amarillo, rojo y azul.

<b>Colorante</b>	<b>Longitudes de onda (nm) utilizadas para la medición espectrofotométrica</b>					
Amarillo 84	350	370	390	410	430	450
Rojo 141	490	510	530	550	570	600
Azul 171	590	600	610	620	630	640

Las lecturas espectrofotométricas fueron tomadas cada tres días durante quince días, hasta que uno de los inóculos alcanzó un porcentaje de remoción cercano o superior al 90%. El porcentaje de reducción se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de remoción de color} = \frac{\text{Absorbancia inicial} - \text{Absorbancia final}}{\text{Absorbancia inicial}} * 100$$

Para el análisis estadístico, los datos fueron tomados de la siguiente manera: por día se obtuvieron tres valores de absorbancias diferentes correspondientes a cada repetición, por inóculo y para cada color por separado.

Con estos valores se hizo un promedio por día y se elaboró una curva Absorbancia vs. Tiempo para observar la remoción de color a través del tiempo. A partir de estas absorbancias se obtuvo el porcentaje de remoción para cada inóculo en estudio. Como control, se realizaron las curvas de las tres lecturas por día y por separados y se observó que las tendencias fueron las mismas.

Para determinar si hubo diferencia significativa en los porcentajes de remoción alcanzados por los inóculos en estudio, se realizó un ANOVA de un factor, posterior a la obtención del estadístico de Leven bajo el cual se comprobó la homogeneidad de varianzas. Los datos correspondientes al color rojo, debieron ser transformados elevándolos al cuadrado, para alcanzar un valor de Levene superior a 0,05. Finalmente, se aplicó la prueba de Tukey para observar los grupos de homogeneidad en los que se agruparon los inóculos. Cada color fue evaluado por separado.

Una vez determinado el tiempo necesario para que la reducción del color alcance el 90% partiendo de la misma concentración de inóculo, el ensayo fue repetido haciendo únicamente dos mediciones: una al inicio y otra al final del tiempo establecido, para determinar la remoción en ausencia completa de oxígeno.

#### **2.5.5 Análisis de pérdida de color por cambio de pH en medios de cultivo con colorante y recuperación de color por modificaciones de pH posterior a la acción bacteriana del inóculo seleccionado**

El uso de colorantes reactivos en la tinturación de las telas, requiere de un control del pH estricto, ya que por variaciones de pH, estos colorantes pueden experimentar cambios en su tonalidad (Cegarra, 1981). Por este motivo, se hicieron los análisis detallados a continuación, los cuales permitieron evaluar si la decoloración de los medios se debía a la acción bacteriana (ya sea por metabolismo o adsorción), o solamente a un cambio de color debido a los pH ácidos alcanzados, posterior al metabolismo bacteriano.

### **2.5.7.1 Efecto de la reducción de pH con solución de Ácido Clorhídrico 1N, en medios de cultivo con colorante en ausencia de bacterias**

El objetivo de este ensayo, fue determinar el porcentaje de pérdida de color debido a la acidificación del medio, ya que durante el ensayo, el pH del medio de cultivo, descendió a niveles alrededor de 4.

Para cada colorante se prepararon cuatro tubos con 10 mL de medio de cultivo de Jiang *et al.*, 2004 modificado, enriquecido con 100 mg/L de colorante y 5 g/L de glucosa como fuente de carbono, con el objetivo de asegurar la presencia de un donador primario de electrones (Dos Santos *et al.*, 2004).

Se midió el pH inicial y el color por espectrofotometría. Posteriormente se bajó el pH con una solución de ácido clorhídrico 1N a un pH alrededor de 3,5 – 4. Se incubó el medio libre de bacterias a 35°C por 6 días.

Una vez terminado el tiempo de incubación, se midió nuevamente el color por espectrofotometría a las longitudes de onda especificadas en la tabla 2.1 y se registró el pH final. Con las lecturas espectrofotométricas iniciales y finales a la longitud de onda más sensible, se calculó el porcentaje de remoción. A partir de los datos obtenidos, se estableció el porcentaje de pérdida de coloración por acción del ácido clorhídrico sobre el nivel de pH.

### **2.5.7.2 Uso de solución tampón fosfato a pH 6 en medio de cultivo.**

Para mitigar el efecto de la variación de pH por los metabolitos presentes, se incluyó en el medio de cultivo de Jiang *et al.*, 2004 modificado, una solución tampón fosfato a pH 6 preparada con 438,5 mL de una solución de 46 g/L de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  y 61,5 mL de una solución de 56,8 g/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .

Se hicieron pruebas agregando 0.071, 0.143, 0.214 y 0.286 mL de tampón/mL de medio, al medio de cultivo enriquecido con 100 mg/L de colorante. Se midió el pH y el color espectrofotométricamente a las longitudes de onda especificadas en la tabla 2.1 para cada color. Cada tubo fue inoculado con 0,1 mL del inóculo activado, cuya densidad celular media fue de  $76 \times 10^6$  UFC/mL, y se incubó por 6 días a 35°C en una cámara gas pack. Finalizando el sexto día, se midió el pH final y el color por espectrofotometría a las longitudes de onda anteriormente especificadas. Los ensayos se hicieron para cada color por separado en tubos de ensayo.

El experimento fue organizado en un Diseño Completamente al Azar (DCA) para cada colorante, de 5 tratamientos (cada concentración tampón), con tres repeticiones cada uno. Para determinar la diferencia entre tratamientos se realizó un ANOVA posterior a la obtención del estadístico de Levene. Los grupos de homogeneidad fueron determinados por la prueba de Tukey, con los cuales se seleccionó una única concentración de solución tampón para los medios de cultivo de los tres colores.

### **2.5.7.3 Elevación de pH del medio posterior a la acción bacteriana del inóculo seleccionado bajo condiciones anaerobias.**

El objetivo de este ensayo fue medir el porcentaje de recuperación de color, al elevar el pH ácido alcanzado como consecuencia de la acción bacteriana, al nivel inicial (antes de inocular con bacterias), para establecer si la pérdida de color se debió al cambio de pH o a la acción bacteriana.

Para el efecto, medios de cultivo de Jiang *et al.*, 2004 modificado, con 100 mg/L de colorante fueron inoculados con 0,1 mL de un cultivo madre de densidad celular igual a  $76 \times 10^6$  UFC/mL determinada por la técnica de siembra profunda especificada por Benzon, 1994, e incubados por 6 días a 35°C. Antes de inocular se midió el color espectrofotométricamente a las longitudes de onda especificadas en la tabla 2.1 y el pH.

Una vez terminada la incubación del ensayo se obtuvieron datos de pH y absorbancia final. Posteriormente se elevó el pH con una solución de hidróxido de sodio 1 N, hasta alcanzar el pH del medio original (antes de la incubación con bacterias). Se dejó que el hidróxido de sodio actuara por dos horas y se prosiguió a medir nuevamente el pH y la absorbancia a las mismas longitudes. A partir de las absorbancias registradas, se calcularon los porcentajes de remoción de color antes y después de la modificación del pH. Al restar ambos valores, se obtuvo el porcentaje de recuperación.

El análisis de datos consistió en calcular la media de los porcentajes de recuperación y la media del cambio de pH de las unidades experimentales. Con

estos datos se estableció el porcentaje de recuperación de color por el nivel de cambio de pH dado por la media. El análisis fue realizado para cada colorante por separado. Se obtuvo la desviación estándar de los datos para observar la dispersión de los mismos.

#### **2.5.7.4 Estudio de la estabilidad del colorante en el medio de cultivo Jiang *et al.*, 2004 modificado, sin cambios de pH**

Para conocer la estabilidad del colorante en el medio de cultivo de Jiang *et al.*, 2004 modificado, y cuantificar el porcentaje de pérdida de color al someter el medio de cultivo a las condiciones de estudio, se hizo un análisis de los medios de cultivo con la concentración de la solución tampón seleccionada en la sección 2.5.7.2 sin la presencia de bacterias. Inicialmente se midió el pH y el color espectrofotométricamente a las longitudes de onda especificadas en la tabla 2.1 para cada color. Posteriormente los medios fueron incubados a 35°C por 6 días, tiempo después del cual se midió el pH y el color espectrofotométricamente a las mismas longitudes.

Para el análisis únicamente se tomaron los datos a las longitudes de onda más sensible para cada color. Se obtuvo el promedio de cambio de pH y se lo relacionó con el porcentaje promedio de pérdida de color. Se calculó la desviación estándar de los datos para medir su dispersión.

### **2.5.8 Cinética de crecimiento bacteriano vs. Remoción de colorantes Azul 171, Amarillo 84 y Rojo 141.**

Con la finalidad de relacionar el crecimiento bacteriano con la remoción de color, se realizaron curvas de crecimiento utilizando la técnica de siembra profunda. Se elaboró una curva de crecimiento bacteriano en el medio de cultivo Jiang *et al.*, 2004 modificado, con 100 mg/L de colorante. Para cada color se hizo una curva por separado.

Se inocularon 10 mL del cultivo madre de densidad celular igual a  $2 \times 10^8$  UFC/mL en 390 mL de medio fresco enriquecido con 100 mg/L de colorante y 5 g/L de glucosa como sustrato alternativo. Se incubó a 35°C en un gas pack manteniendo las condiciones de anaerobiosis mencionadas.

La curva de crecimiento se hizo por un período de incubación de 15 días. Durante los primeros siete días, se realizaron conteos cada ocho horas en agar PCA, por siembra profunda. A partir del día nueve se hicieron conteos cada 24 horas. Cada vez que se hizo un conteo se midió el color espectrofotométricamente a las longitudes especificadas en la tabla 2.1 y el pH. Con los datos obtenidos se elaboraron gráficas de Remoción de color (mg/L) vs. Unidades formadoras de colonias (UFC/mL) para observar la relación entre estos dos parámetros.

### **2.5.9 Evaluación de la remoción de 100 mg/L, 150 mg/L y 200 mg/L de los colorantes Azul Navy 171, Amarillo 84 y Rojo 141 del Inóculo I5, bajo condiciones anaerobias con 0 g/L, 2,5 g/L y 5 g/L de glucosa**

Una vez establecida la curva de remoción de color vs. crecimiento bacteriano, se procedió a aplicar el diseño experimental el cual consistió en un arreglo 2 factorial dispuesto en un Diseño Experimental Completamente al Azar, siendo la variable dependiente el porcentaje de remoción de colorante reactivo Azul Navy 171, Amarillo 84 y Rojo 141. Los factores del diseño fueron la concentración de glucosa y la concentración de color. Cada factor tuvo tres niveles: 0 g/L, 2,5 g/L y 5 g/L de glucosa, y 100mg/L, 150 mg/L y 200 mg/L de colorante. El número de repeticiones para cada interacción entre factores fue tres, obteniendo un número total de unidades experimentales de 27. Cada colorante fue evaluado individualmente.

Para cada repetición se hicieron 200 mL de medio de Jiang *et al.*, 2004 modificado, enriquecido con 100, 150 y 200 mg/L de cada colorante por separado. Los medios fueron dispensados en frascos de tapa rosca de 250 mL. En cada frasco se sembraron 7,5 mL de inóculo madre de densidad celular de  $8,0 \times 10^7$  UFC/mL. Una vez inoculados fueron cerrados completamente con tapa rosca.

Los medios inoculados fueron incubados a 35°C por un mes. Se midió el color por espectrofotometría a las longitudes de onda especificadas en la tabla 2.1, cada dos días durante las dos primeras semanas y cada cuatro días durante las dos últimas semanas. Para los colorantes Rojo 141 y Amarillo 84, a los 15 días de incubación, los medios fueron trasvasados a tubos de ensayo de 40 mL y se siguió con la experimentación bajo las mismas condiciones.

Para la medición espectrofotométrica se siguió la metodología empleada por Coughlin *et al.*, 1999. Se tomaron dos mL de medio en microtubos de dos mL, los cuales fueron centrifugados a 10000 g durante 5 minutos con una centrífuga Spectrafuge 24D. Se tomó el sobrenadante y se lo colocó en la cubeta de cuarzo para medir en el espectro a las longitudes de ondas ya especificadas.

Ya que los valores de absorbancias sobrepasaban el límite detectable por el espectro, para el color rojo en 200 mg/L y 150 mg/L de colorante, se realizaron diluciones 750:750 ( $\mu\text{l}$  de medio:  $\mu\text{l}$  de agua) y 750: 500 respectivamente. Para 100 mg/L no fue necesario diluir. Para el color amarillo, también fue necesario hacer diluciones para 200 y 150 mg/L de colorante, con proporciones de 750:500 y 1000:200 respectivamente. Para 100 mg/L no fue necesario diluir. En el caso del azul no fue necesario hacer diluciones para ninguna de las concentraciones de colorante.

A partir de los valores de absorbancia, se calcularon los porcentajes de remoción de color, para cada colorante. Los datos analizados, correspondieron al último día de medición.

## **2.6.- Análisis de Datos:**

El análisis fue realizado en el programa estadístico SPSS 15.0. Para el análisis del diseño experimental, primeramente se obtuvieron gráficas de perfil, para observar la interacción entre factores. Para observar si había diferencia entre

los tratamientos aplicados, se realizó un ANOVA, posterior a la obtención del estadístico de Levene para comprobar la homogeneidad de varianzas ( $>0,05$ ). Para el color azul, fue necesario realizar una transformación previa a la obtención del ANOVA, para no rechazar la hipótesis de homocedasticidad de los datos. La transformación aplicada fue elevación al cuadrado. Finalmente, se aplicó la prueba de Tukey al 0,05 de significancia, con la cual se obtuvieron los grupos de homogeneidad.

Las gráficas descriptivas de cinética y porcentajes fueron hechas en el programa Excel de Microsoft Office 2007.

## CAPÍTULO 3: RESULTADOS

### 3.1 Obtención de inóculos bacterianos primario a partir de muestras colectadas

Del muestreo realizado en el colector Teodoro Gómez de la Torre se obtuvieron nueve lecturas de pH y temperatura correspondiente a cada muestra puntual colectada, y un valor del nivel de pH y temperatura de la muestra compuesta (tabla 3.1). En El Recreo se obtuvieron siete lecturas de niveles de pH y temperatura de las muestras puntuales y una de la muestra compuesta. La muestra compuesta en ambos casos fue utilizada para la experimentación posterior, siendo el volumen final utilizado un litro (I1 e I2 respectivamente).

Tabla 3. 1: Temperatura y pH de las muestras puntuales y muestra compuesta colectadas en el Colector Teodoro Gómez de la Torre.

N° de muestra puntual	Teodoro Gómez de la Torre			El Recreo		
	Hora de recolección	pH	Temperatura (°C)	Hora de recolección	pH	Temperatura (°C)
1	9:45 AM	7,67	16,60	10:30 AM	7,71	15,00
2	10:00 AM	7,55	15,40	10:45 AM	7,69	15,40
3	10:15 AM	7,51	16,10	11:00 AM	7,63	15,30
4	10:30 AM	7,42	16,70	11:30 AM	7,66	15,40
5	10:45 AM	7,81	17,60	11:45 AM	7,67	15,50
6	11:00 AM	7,54	15,60	12:00 AM	7,60	15,50
7	11:15 AM	7,54	15,20	12:15 AM	7,63	15,80
8	11:30 AM	7,54	15,30	<b>Muestra compuesta</b>	7,67	17,00
9	11:46 AM	7,44	16,20			
	<b>Muestra compuesta</b>	7,46	17,30			

Del muestreo realizado en la empresa textil, se obtuvieron dos muestras puntuales diferentes (I3 e I4) que mostraron cambio en la coloración después de aproximadamente dos semanas de su almacenamiento (figura 3.1).



Figura 3. 1: Muestras obtenidas del proceso de lavado de una industria textil, que cambiaron su coloración después de dos semanas de almacenamiento a) inóculo 3 y b) inóculo 4. A la derecha de cada figura se observa la muestra con el color original, a la izquierda la muestra que cambio de coloración.

A partir de tubos con medio Jiang *et al*, 2004 modificado, enriquecido con 100 mg/L de colorantes rojo directo y azul directo por separado, expuestos al aire, se obtuvieron dos inóculos compuestos (I5 e I6). Los tubos fueron seleccionados porque mostraron reducción de color (figura 3.2).

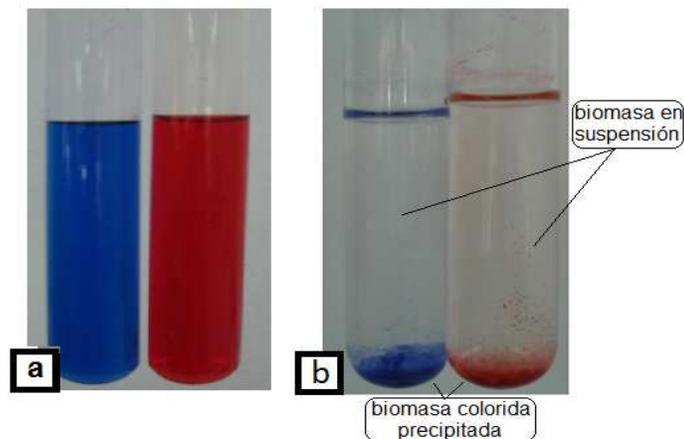


Figura 3. 2: Inóculos compuestos obtenidos por exposición de medio de cultivo con color al aire, en medio de cultivo de Jiang *et al*, 2004 enriquecido con colorante Azul y Rojo directo, a) antes de la remoción de color y b) posterior a la acción bacteriana.

### **3.2 Selección de inóculos bacterianos bajo condiciones anaerobias**

El objetivo de esta fase fue seleccionar microorganismos bajo condiciones anaerobias a partir de las muestras colectadas. De los seis inóculos cultivados en el medio Tioglicolato bajo estas condiciones, únicamente crecieron cuatro: los inóculos I1 e I2 obtenidos en el Río Machángara y los inóculos I5 e I6 obtenido por exposición del medio con colorantes azul y rojo directo, al ambiente.

El medio Tioglicolato en estos casos cambio su coloración rosada típica a amarillenta, un indicador de la ausencia de oxígeno. Adicionalmente en los tubos cultivados se observó la presencia de gas.

### **3.3 Selección de inóculo bacteriano bajo condiciones anaerobias con capacidad de remover los colorantes en estudio**

El objetivo de esta fase de experimentación fue seleccionar el inóculo con mayor capacidad de remoción. Para los tres colorantes en estudio, el mejor inóculo removedor fue I5 obtenido por exposición del medio de cultivo Jiang *et al.*, 2004, enriquecido con 100 mg/L de colorante directo rojo escarlata. En la figura 3.3 se observa que por acción del inóculo I5 se obtuvieron los menores valores de absorbancia durante los quince días que duró el ensayo, y por lo tanto la mayor remoción de color.

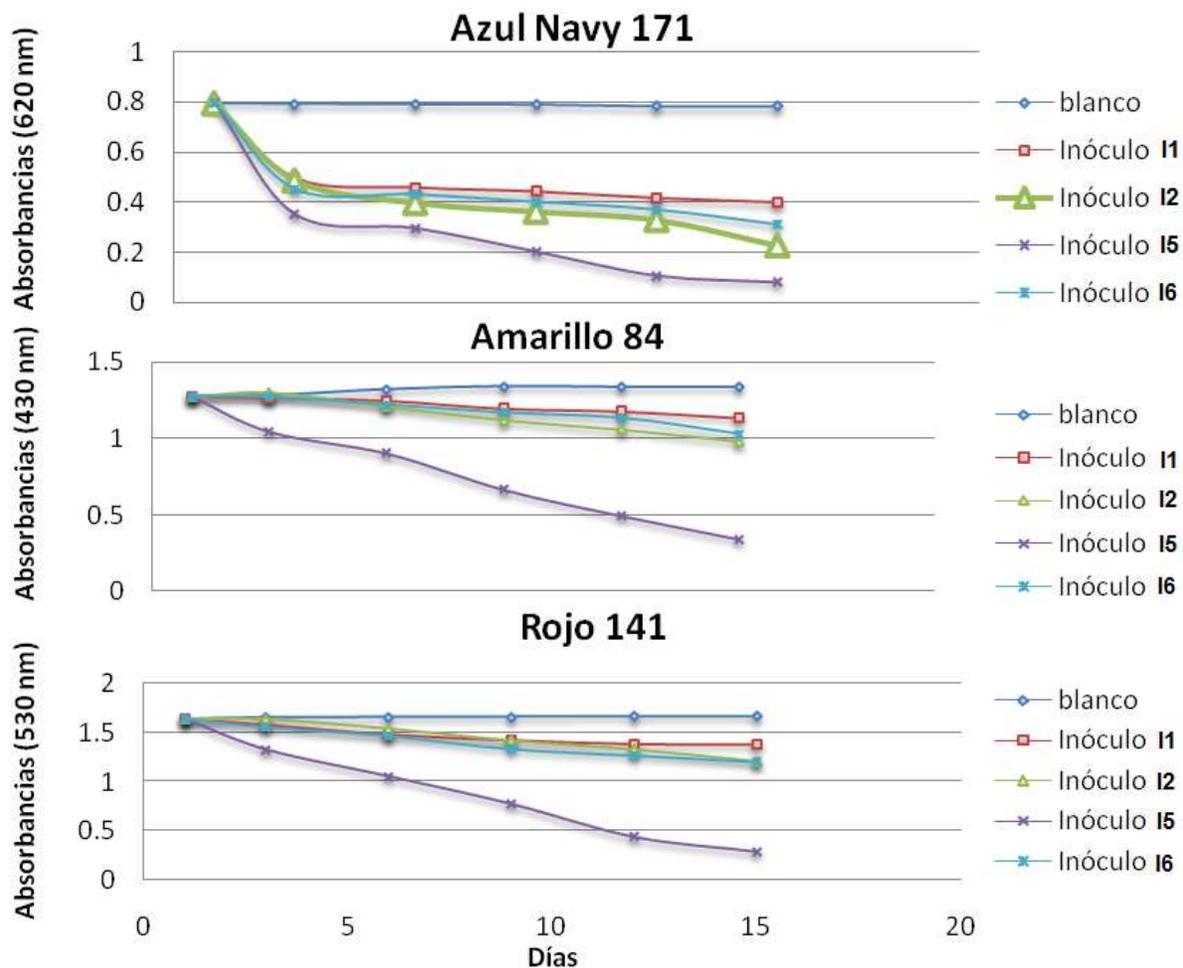


Figura 3.3: Remoción de color en el tiempo. Para cada día se muestra la absorbancia promedio (n=3) de cada inóculo en estudio, durante un período de 15 días.

Al comparar los promedios de los porcentajes de remoción de color para cada inóculo después de 15 días de incubación (figura 3.4), se observó que los mayores porcentajes de remoción fueron alcanzados por el inóculo I5 para los tres colorantes. El segundo mejor inóculo removedor fue I2 para el azul y el amarillo y el I6 para el rojo. Para todos los casos el inóculo que alcanzó los porcentajes más bajos fue I1, obtenido en el colector Teodoro Gómez de la Torre.

El ANOVA realizado indicó que sí existió diferencia significativa entre los porcentajes de reducción de color alcanzada por cada inóculo ( $p = 0,00$ ), en los ensayos aplicados a los tres colores. La prueba de Tukey clasificó a los porcentajes obtenidos, en cuatro grupos de homogeneidad (a, b, c, d) para el caso del azul y el amarillo, y en tres grupos (a, b, c) en el caso del rojo (figura 3.4). Por lo tanto para el caso del azul y el amarillo, el nivel de remoción alcanzado por cada inóculo fue estadísticamente diferente. En el caso del color rojo, el inóculo I2 e I6 no mostraron diferencia estadística, contrario a los inóculo I1 e I5. Los valores obtenidos del color rojo fueron previamente transformados elevándolos al cuadrado, para la obtención del ANOVA y para la aplicación de la prueba de Tukey; sin embargo, los datos mostrados en la figura 3.4, corresponden a los valores antes de la transformación que fueron mantenidos para visualizar la diferencia en la remoción alcanzada por cada inóculo.

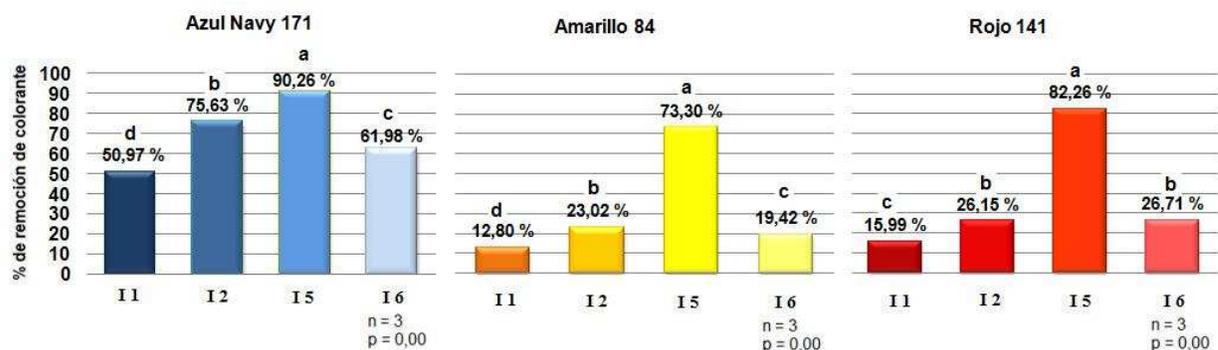


Figura 3. 4: Porcentajes promedio de remoción de color por acción de los inóculos en estudio. Se indica el valor del ANOVA y los grupos de Homogeneidad de Tukey al 0,05.

En base a estos resultados, el inóculo seleccionado para los siguientes análisis con los tres colorantes en estudio fue I5. En la figura 3.5 se observa la reducción de color a partir de 100 mg/L de colorante inicial. El precipitado del fondo del tubo corresponde a la biomasa colorida.

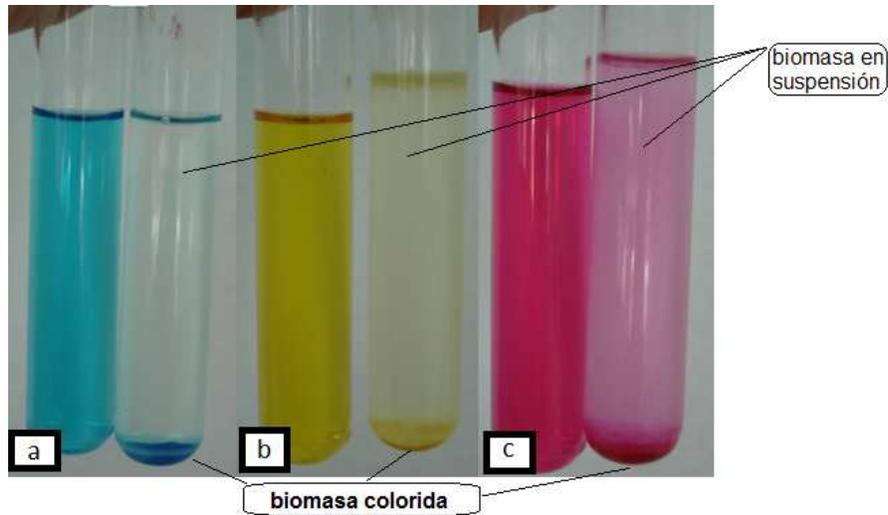


Figura 3. 5: Reducción de color a partir de 100 mg/L de los colorantes reactivos: a) Azul Navy 171, b) Amarillo 84 y c) Rojo 14, a los 15 días de incubación. El precipitado corresponde a la biomasa colorada precipitada.

Con la finalidad de observar si había alguna diferencia en el porcentaje de remoción alcanzado por el inóculo seleccionado I5, al impedir el ingreso de oxígeno, se repitió el ensayo bajo las mismas condiciones y durante el mismo tiempo de incubación, pero sin abrir la cámara gas pack. Se obtuvo un aumento en el porcentaje de remoción de 6% para el color azul, 15,19% para el amarillo y 4% en el rojo (figura 3.6).



Figura 3. 6: Comparación de porcentajes de remoción del colorante Azul Navy, Amarillo 84 y Rojo 141, en “Cultivo interrumpido” (abierto cada tres días para extracción de muestras) y en “Cultivo continuo” (incubado sin apertura de la cámara gas pack durante el período de incubación).

### 3.6 Análisis de la acción del cambio de pH en la reducción del color

Con el objetivo de determinar la acción del cambio de pH en el medio de cultivo sobre la remoción de color, se hicieron cuatro ensayos diferentes, cuyos resultados se presentan a continuación.

#### 3.6.1 Efecto de la reducción de pH con solución de Ácido Clorhídrico 1N, en medios de cultivo con colorante en ausencia de bacterias.

La mayor remoción de color por acidificación del medio fue alcanzada por el colorante Azul Navy 171 seguida del Amarillo 84 y Rojo 141 en ese orden (tabla 3.2). Los pH iniciales fueron 6,39, 6,4 y 6,37, para los colores azul, amarillo y rojo respectivamente. En promedio, el medio con colorante Azul Navy 171, bajó a 3,8, con colorante Amarillo 84, bajó a 3,82, y con colorante Rojo 141 bajó a 4,05.

Tabla 3. 2: Porcentaje de remoción de color por acidificación con ácido clorhídrico del medio de cultivo Jiang *et al.*, 2004 modificado, con colorante y sin bacterias.

<b>COLOR</b>	<b>Azul Navy 171</b>	<b>Amarillo 84</b>	<b>Rojo 141</b>
pH inicial (promedio)	6,39	6,4	6,37
Promedio de diferencia de pH	2,59 S = 0,14	2,58 S = 0,14	2,32 S = 0,48
pH final (promedio)	3,80	3,82	4,02
Promedio de porcentaje de remoción de color	7,77 % S = 2,91	3,88% S = 0,62	1,95% S = 0,48

S = desviación estándar

#### 3.6.2 Uso de solución tampón fosfato a pH 6 en medio de cultivo

En el ensayo realizado para analizar el efecto del uso de una solución tampón fosfato pH 6 en el medio sobre el porcentaje de remoción, se obtuvo que

los dichos porcentajes fueron diferentes para cada concentración de tampón probada. Para los tres colores, la relación de proporcionalidad entre la concentración de solución tampón y porcentaje de pérdida de color fue inversa, así, entre mayor la concentración de tampón menor el porcentaje de remoción. De igual manera se observó que entre mayor fue la concentración de solución tampón utilizada, menor el cambio de pH, en especial para el color azul que presentó la menor variación para todas las concentraciones de tampón ensayadas.

Por el nivel de significancia obtenido por el ANOVA se determinó que existió diferencia significativa en los porcentajes de pérdida de coloración ( $p=0,00$ ) relacionada con la concentración de solución tampón aplicada ( $n=3$ ). Los datos se ubicaron en tres, tres, y cuatro grupos de homogeneidad para los colores azul, amarillo y rojo respectivamente, como se observa en la tabla 3.3. De acuerdo, a los grupos de homogeneidad, el uso de 0,071 mL t/mL m, 0,143 mL t/mL m y 0,214 mL t/mL m, fue diferente a usar 0,286 mL t/mL m. Para el color amarillo, 0,143 mL t/mL m y 0,214 mL t/mL m difirió del uso de 0,071 mL t/mL m. Para el color rojo el uso de 0,071 mL t/mL m y 0,143 mL t/mL m, se ubicó en el mismo grupo de homogeneidad y en un segundo grupo de homogeneidad se ubicaron los resultados obtenidos por el uso de 0,143 mL t/mL m y 0,214 mL t/mL m.

Ya que el objetivo del ensayo fue seleccionar una concentración de solución tampón para los tres colores, la concentración única a ocupar en los siguientes análisis fue 0,143 mL t/mL m, la cual guardó diferencia significativa con la inmediata inferior (0,071 mL t/mL m), pero no mostró diferencia con la inmediata superior (0,214 mL t/mL m) (tabla 3.3). La concentración 0.236 mL/mL a pesar de mostrar el menor porcentaje de reducción de color, no fue seleccionada porque correspondía a casi el 30% del volumen total del medio de cultivo, muy alto para tratarse de una solución tampón.

Los resultados obtenidos permitieron observar que la concentración de solución tampón y la ausencia de la misma en el medio de cultivo, generan diferentes resultados en la remoción de color.

Tabla 3. 3: Diferencia en porcentajes promedios de reducción de color por acción bacteriana en presencia de diferentes concentraciones de solución tampón fosfato pH 6.

mL sol. tampón/ mL de medio de cultivo (mL t/mL m)	Porcentaje de reducción de color (%)		
	Azul	Amarillo	Rojo
<b>(0 mL t/mL m) Promedio</b>	<b>96,70</b>	<b>91,79</b>	<b>87,44</b>
Cambio de pH (inicial → final)	5,74 → 4,50 (d: 1,24)	5,89 → 4,25 (d: 1,64)	5,92 → 4,42 (d: 1,5)
<b>(0,071 mL t/mL m) Promedio</b>	<b>82,63</b>	<b>83,6</b>	<b>51,26</b>
Cambio de pH (inicial → final)	5,84 → 4,60 (d: 1,24)	5,88 → 4,43 (d:1,45)	5,95 → 4,56 (d: 1,39)
<b>(0,143 mL t/mL m) Promedio</b>	<b>85,19</b>	<b>68,07</b>	<b>47,61</b>
Cambio de pH (inicial → final)	5,73 → 4,71 (d:1,02)	5,88 → 4,61(d: 1,27)	5,9 → 4,61 (d:1,29)
<b>(0,214 mL t/mL m) Promedio</b>	<b>83,29</b>	<b>65,44</b>	<b>45,39</b>
Cambio de pH (inicial → final)	5,73 → 4,91 (d:0,82)	5,83 → 4,84 (d:0,99)	5,93 → 4,84 (d: 1,09)
<b>(0,236 mL t/mL m) Promedio</b>	<b>74,93</b>	<b>57,89</b>	<b>38,02</b>
Cambio de pH (inicial → final)	5,63 → 5,04 (d: 0,59)	5,84 → 4,98 (d: 0,86)	5,9 → 4,90 (d: 1)
Significancia E. Levene (v-p)	0,13	0,12	0,07
Significancia ANOVA (p)	0,00	0,00	0,00
Grupos de Homogeneidad (a, b, c, d)	0,000 a	0,000 a	0,000 a
aplicando prueba de Tukey	0,071 b	0,071 b	0,071 b
	0,143 b	0,143 c	0,143 b,c
	0,214 b	0,214 c	0,214 c
	0,286 c	0,286 d	0,286 d

d:diferencia entre pH inicial y final

### 3.7 Elevación del pH del medio después de la actividad bacteriana

En promedio, después de los seis días de incubación, el pH de los medios de cultivo en presencia de colorante Azul Navy 171, Amarillo 84 y Rojo 141 disminuyó a 4.6, 4.72 y 4,74 respectivamente. Al elevar el pH de los medios después del período de incubación, se observó que el color azul y el rojo en promedio recuperaron color en porcentajes menores a 1%. En el caso del amarillo, el cambio de pH provocó una pérdida de coloración (tabla 3.4).

Tabla 3.4: Porcentajes de recuperación de color por aumento de pH del medio después de acción microbiana sobre el colorante Azul Navy 171.

COLOR	Azul Navy 171	Amarillo 84	Rojo 141
pH promedio después de tiempo de incubación	4,60	4,72	4,74
pH promedio alcanzado (final)	5,99	5,93	6,01
Promedio de porcentaje de recuperación de color	0,37% S = 0,88	-0,35% S = 0,73	0,76% S = 0,28

### 3.8 Estudio de la estabilidad de los colorantes en el medio de cultivo

En el ensayo realizado con los medios de cultivo en ausencia de bacterias, se obtuvo que los colorantes amarillo y rojo intensificaron su nivel de coloración durante el tiempo de incubación en un 0,80% y 1,02% respectivamente. El azul por el contrario, perdió 0,70% de su coloración inicial (tabla 3.5). En el transcurso del tiempo de incubación (6 días), el pH subió en un nivel promedio de 0,08, 0,11 y 0,07 para el azul, amarillo y rojo respectivamente.

Tabla 3. 5: Porcentajes de remoción de color y cambios de pH del medio de cultivo Jiang *et al*, 2004 modificado, en presencia de 100 mg/L de colorante con 0,143 mL de solución tampón por cada mL de medio total.

COLOR	Azul Navy 171	Amarillo 84	Rojo 141
pH inicial	5,99	6,06	5,99
Promedio de diferencia de pH	0,08 S = 0,005	0,11 S = 0,02	0,07 S = 0,005
Promedio de porcentaje de recuperación de color	0,70% S = $1,4 \times 10^{-16}$	-0,80% S = 1,6	-1,02% S = $8,5 \times 10^{-1}$

### **3.9 Cinética de crecimiento bacteriano y remoción de color**

Se observó que para los tres colores, la cinética de crecimiento bacteriano siguió la misma tendencia. La densidad celular inicial estuvo en el orden del  $10^5$ , subió al orden del  $10^8$ , se mantuvo y subió hasta alcanzar un máximo del orden del  $10^{10}$  en el caso del amarillo y rojo, y  $10^9$  en el caso del azul. A las máximas densidades celulares se registraron los menores valores de pH. La población decreció hasta el orden del  $10^8$  y se mantuvo en el rojo. En el caso del azul y amarillo la población decreció y se mantuvo en el orden de  $10^7$ .

Para el color azul y amarillo la pérdida de color alcanzó el 50% en las primeras etapas de la cinética, es decir, antes de que la densidad celular se mantuviera en  $10^8$  en el amarillo y  $10^7$  en el azul, aproximadamente a las 100 horas de incubación (figura 3.7). La reducción de color, en ambos casos, se dio a la par con el desarrollo bacteriano. A partir de las 100 horas de incubación se observó reducción de color cuando la población se mantuvo constante.

Para el color rojo, la remoción fue visible una vez que la población bacteriana se mantuvo estable en el orden del  $10^8$ . Alcanzar el 50% de remoción del color requirió el doble de tiempo en comparación al azul y amarillo.

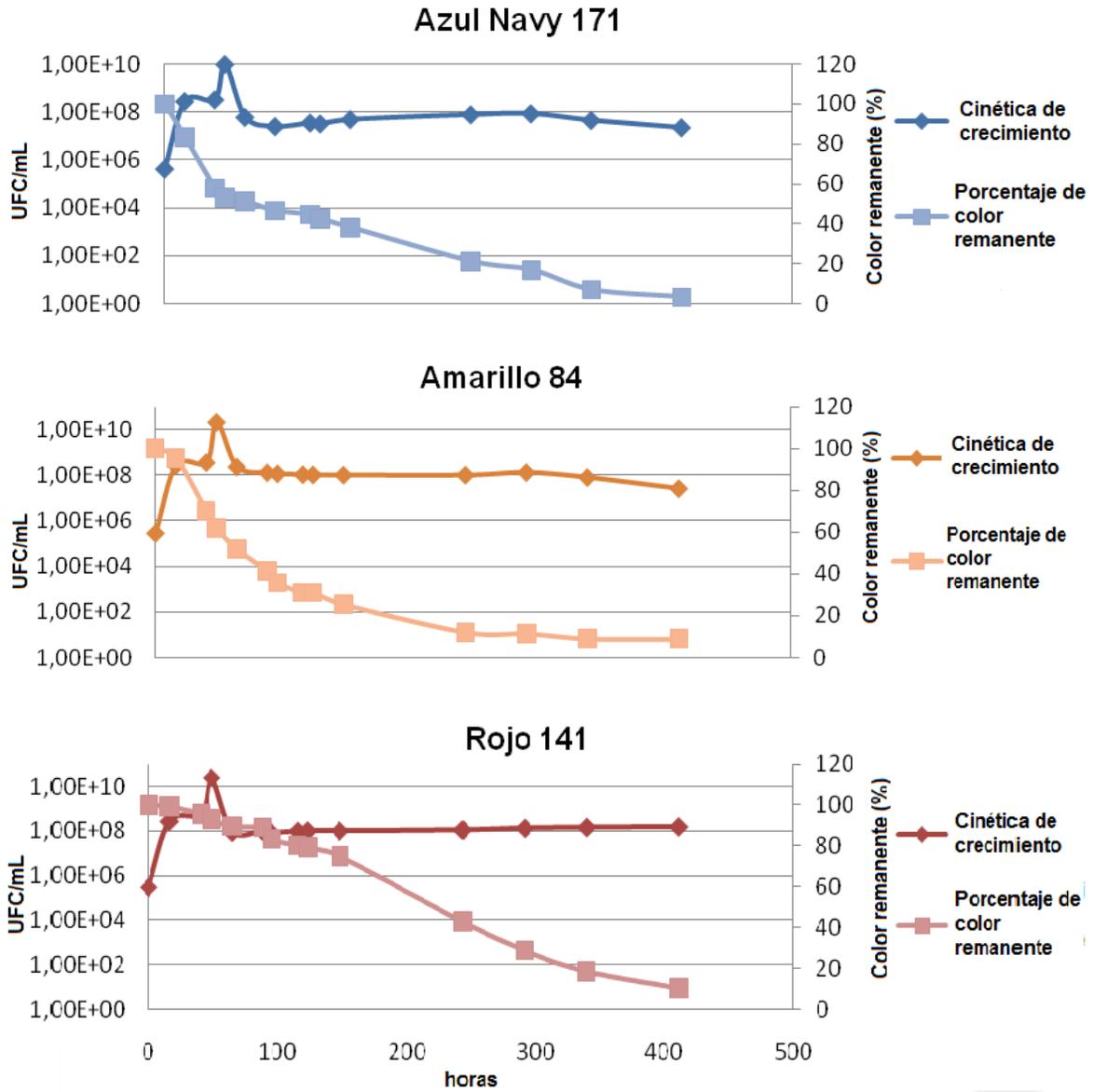


Figura 3. 7: Relación entre cinética de crecimiento bacteriano y remoción de los colorantes en estudio.

### 3.10. Remoción de 100 mg/L, 150 mg/L y 200 mg/L de colorante Azul Navy 171 del Inóculo I5, bajo condiciones anaerobias con 0 g/L, 2,5 g/L y 5 g/L de glucosa.

Antes de aplicar el modelo factorial, a partir de los datos obtenidos se elaboró una gráfica de perfil (figura 3.8), la cual permitió analizar las interacciones entre los factores en estudio: concentración de glucosa y concentración de colorante. Se observó que existió una relación de proporcionalidad directa entre el porcentaje de remoción de color y la concentración de glucosa. Fue visible también, que entre menor la concentración de colorante mayor el porcentaje de remoción.

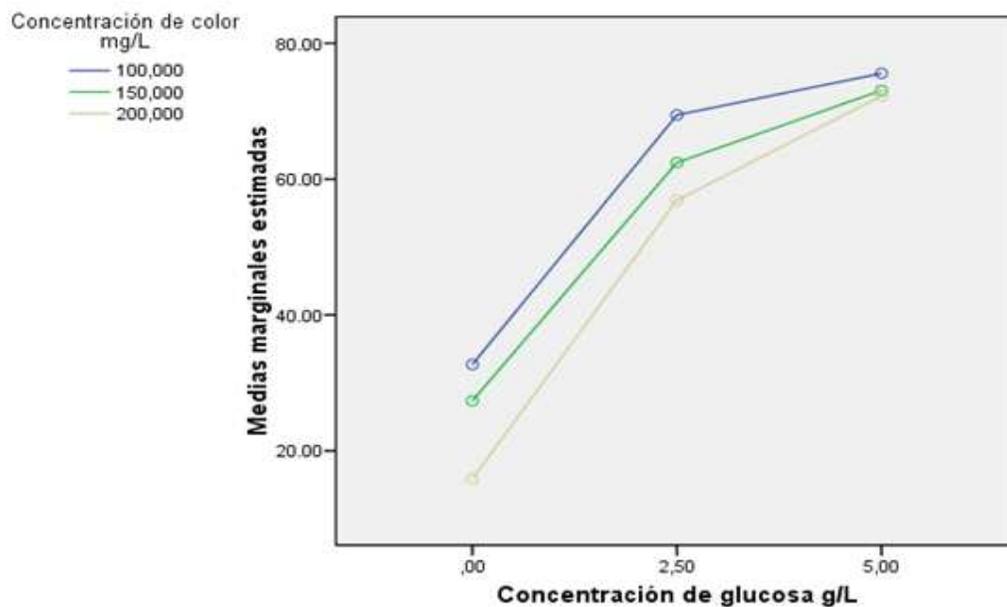


Figura 3. 8: Gráfico de perfil para la interacción de la concentración de glucosa y concentración de color.

El valor del estadístico de Levene ( $0,326 > 0,05$ ), permitió proseguir con la realización del ANOVA al contrastar la hipótesis de homocedasticidad. Por los

niveles críticos obtenidos en el ANOVA (tabla 3.6), se determinó que por lo menos uno de los tratamientos generados de la interacción entre factores fue diferente. El valor de la media cuadrática para el factor “concentración de glucosa”, fue el más alto de entre los factores y la interacción de los mismos. El efecto de este factor fue determinante entonces para la remoción de colorante.

El nivel crítico del estadístico F para el modelo corregido ( $0,000 < 0,05$ ), dice que el modelo explica una parte significativa de la variación observada en el porcentaje de remoción de color. El valor de  $R^2$  igual a 0,998 indica que los efectos de los factores y la interacción entre ellos incluidos en el modelo, explican el 99,8% de la varianza de la variable dependiente, es decir, del porcentaje de remoción de color.

Tabla 3.6: ANOVA para el experimento 2 factorial de los porcentajes finales de remoción de color azul Navy 171.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	111081951,059(a)	8	13885243,882	1764,701	0,00
Intersección	306128310,521	1	306128310,521	38906,401	0,00
ConColor	4205032,890	2	2102516,445	267,213	0,00
ConGluc	105868883,824	2	52934441,912	6727,534	0,00
ConColor * ConGluc	1008034,345	4	252008,586	32,028	0,00
Error	141629,896	18	7868,328		
Total	417351891,476	27			
Total corregida	111223580,955	26			

a. R cuadrado = ,999 (R cuadrado corregida = ,998)

La prueba de Tukey formó grupos de homogeneidad correspondiente a cada concentración de glucosa (figura 3.8). El mayor porcentaje medio de

remoción igual a 73,62% fue obtenido con la mayor concentración de glucosa (5 g/L). Utilizando la mitad de esta concentración (2.5 g/L) la remoción alcanzada fue 62,93%, 10,69% inferior a la primera. En ausencia de glucosa el porcentaje medio removido fue 25%, 48% menor al mayor alcanzado.

Para el factor “concentración de colorante”, la prueba de Tukey ordenó a los porcentajes medios de remoción en tres grupos de homogeneidad: A, B y C (figura 3.9), cada uno perteneciente a una de las concentraciones ensayadas. El mayor porcentaje medio de remoción de color fue alcanzado en la menor concentración de colorante. La relación de proporcionalidad entre la variable dependiente y el factor fue por tanto inversa.

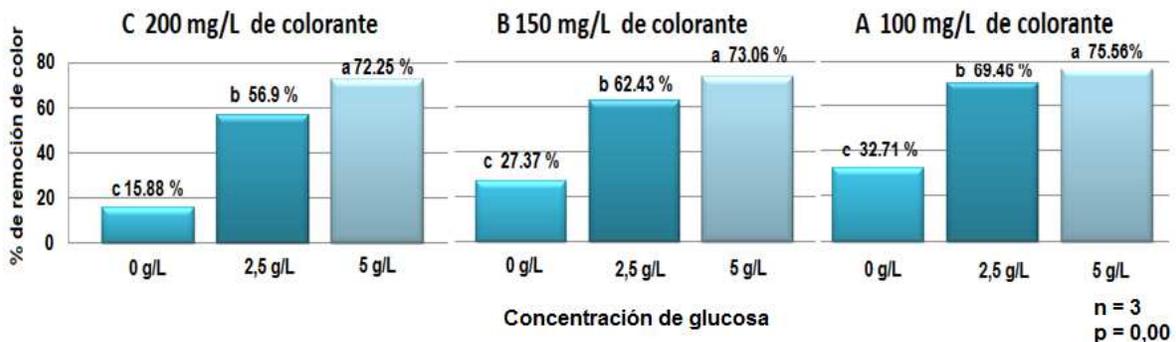


Figura 3. 9: Porcentaje promedio de remoción de color de cada concentración de colorante Azul 171 y glucosa ensayada. Se indican los grupos de homogeneidad del factor glucosa (a, b, c) y de colorante (A, B y C) (significación = 1)

En las curvas de Absorbancias vs. Tiempo realizadas para cada concentración de color (figura 3.10), se observó que entre menor fue la concentración de colorante, menor la diferencia en el uso de 5 g/L y 2,5 g/L de glucosa como co-sustrato.

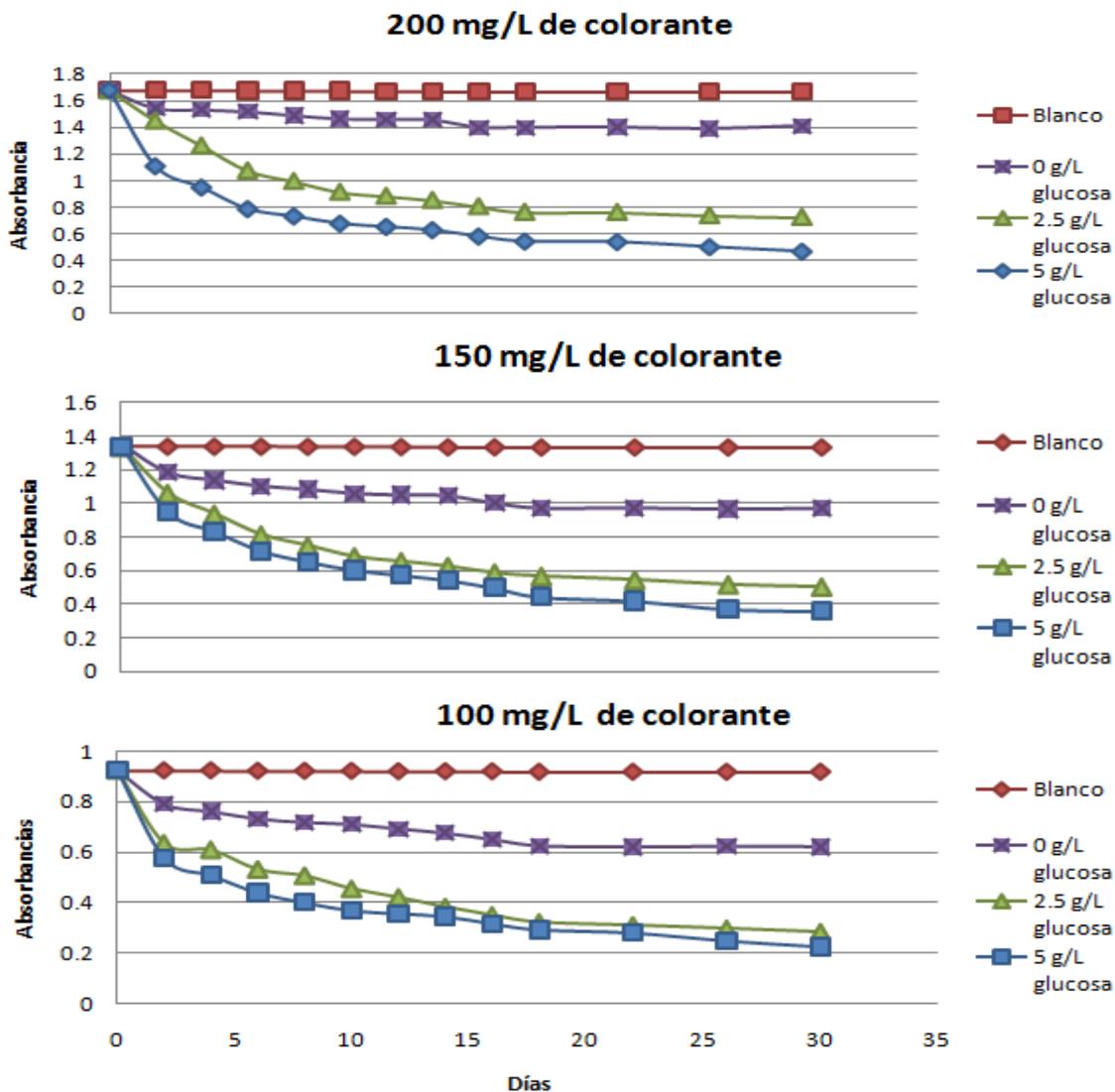


Figura 3. 10: Cambio de valor de Absorbancia a través del tiempo para cada concentración de glucosa con 200 mg/L, 150 mg/L y 100 mg/L de colorante.

### 3.11 Remoción de 100 mg/L, 150 mg/L y 200 mg/L de colorante Amarillo 84 del Inóculo I5, bajo condiciones anaerobias con 0 g/L, 2,5 g/L y 5 g/L de glucosa.

En la gráfica de perfil para el color amarillo (figura 3.11), se observó cualitativamente la interacción de los factores en estudio. Al igual que para el azul,

el mayor porcentaje medio de remoción fue alcanzado en presencia de 5 g/L de glucosa. A 2.5 g/L los porcentajes medios de remoción fueron similares para 150 y 200 mg/L de colorante. En 5 g/L de glucosa los resultados para las tres concentraciones no difirieron notablemente. En ausencia de glucosa, los porcentajes de remoción de color fueron mínimos, considerablemente menores a los alcanzado con el azul bajo las mismas condiciones.

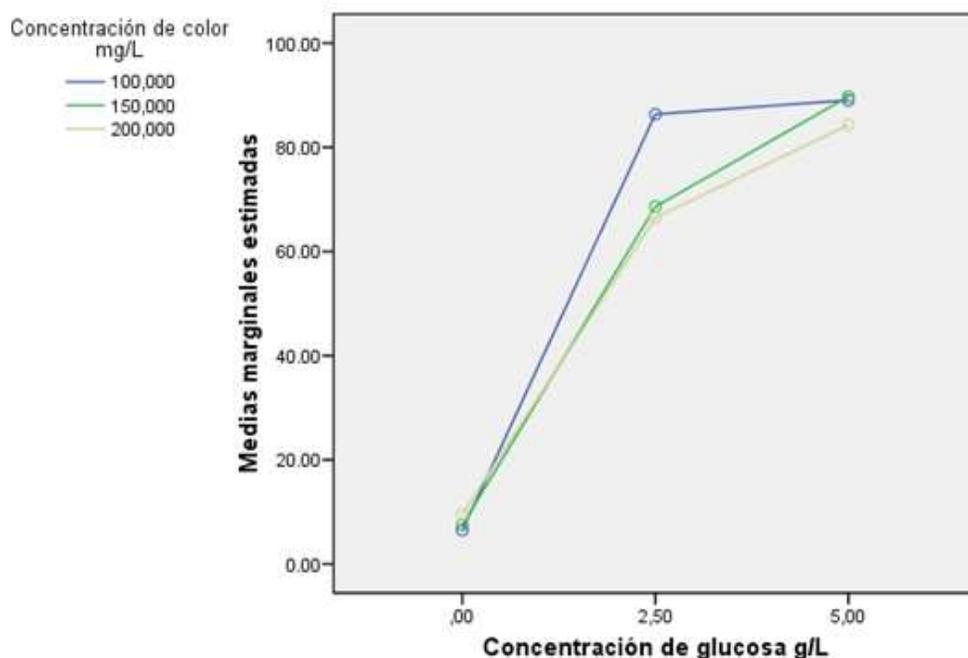


Figura 3. 11: Gráfico de perfil para la interacción de la concentración de glucosa y concentración de color.

El valor del estadístico de Levene alcanzado ( $0,067 > 0,05$ ), contrastó la hipótesis de homocedasticidad con lo que se comprobó la homogeneidad de las varianzas. Por los niveles de significancia obtenidos por el ANOVA (tabla 3.7), para cada factor ( $0,00 < 0,05$ ), se estableció que por los menos uno de los tratamientos generados por las interacciones de los factores en estudio, fue diferente. Por la suma de cuadrado se observó que la concentración de glucosa

ejerció mayor efecto sobre el porcentaje de remoción de color que la concentración de colorante y la interacción de ambos factores.

El valor de  $R^2$  igual a 0,999 indica que los efectos de los factores y la interacción entre ellos incluidos en el modelo, explican el 99,9% de la varianza de la variable dependiente, es decir, del porcentaje de remoción de color.

Tabla 3.7: ANOVA para el experimento 2 factorial de los porcentajes finales de remoción de color amarillo.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	GI	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	33539,126(a)	8	4192,391	1903,975	0,00
Intersección	86043,913	1	86043,913	39076,858	0,00
ConColor	251,274	2	125,637	57,058	0,00
ConGluc	32755,974	2	16377,987	7438,066	0,00
ConColor * ConGluc	531,878	4	132,969	60,388	0,00
Error	39,634	18	2,202		
Total	119622,673	27			
Total corregida	33578,760	26			

a R cuadrado = ,999 (R cuadrado corregida = ,998)

La prueba de Tukey ordenó los porcentajes de remoción para el factor “concentración de glucosa” en tres grupos de homogeneidad (a, b y c), uno para cada concentración, como se observa en la figura 3.12. En promedio para este factor, duplicar la concentración de glucosa representaría un aumento del 14% de remoción de color.

Para el factor “concentración de colorante” se observó que entre menor es la concentración de colorante mayor el porcentaje promedio de remoción (figura 3.11). La prueba de Tukey ordenó los resultados en tres grupos de homogeneidad,

cada uno correspondiente a una concentración de colorante (A, B y C). La diferencia en la remoción alcanzada en 2,5 g/L y 5 g/L de glucosa, fue de 2,66% en 100 mg/L de colorante. En 150 y 200 mg/L, la diferencia fue de 26% y 19% respectivamente, como se observa en la figura 3.12.

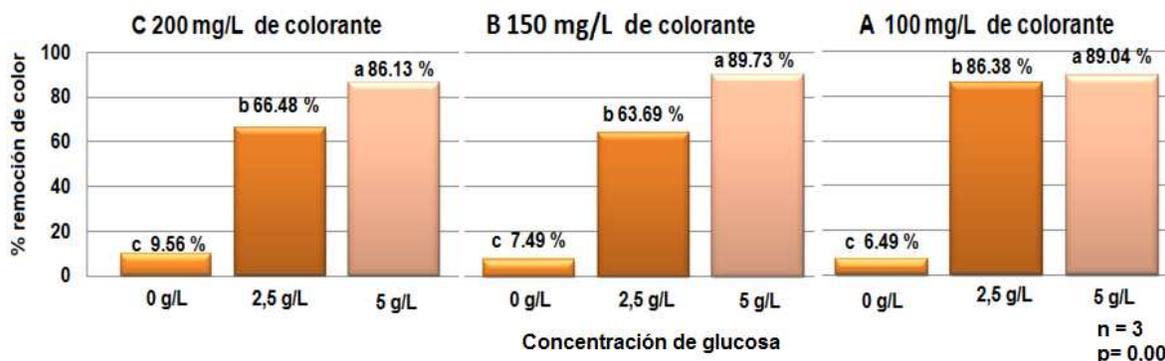


Figura 3. 12: Porcentaje promedio de remoción de color de cada concentración de colorante Amarillo 84 y glucosa ensayada. Se indican los grupos de homogeneidad del factor glucosa (a, b, c) y de colorante (A, B y C) (significación=1)

En las gráficas realizadas de Absorbancia vs. Tiempo (figura 3.13), se visualizó que la concentración de colorante fue disminuyendo a través del tiempo. Para 100 mg/L la reducción de color en 2,5 y 5 g/L de glucosa, fue similar, mientras que para 150 y 200 mg/L la distancia entre las curvas de remoción estuvieron más marcadas. En todas las gráficas, se observa que las tres últimas lecturas presentan mayor remoción que las primeras, debido posiblemente al cambio de contenedores en las últimas etapas de la incubación, como se explicó en materiales y métodos.

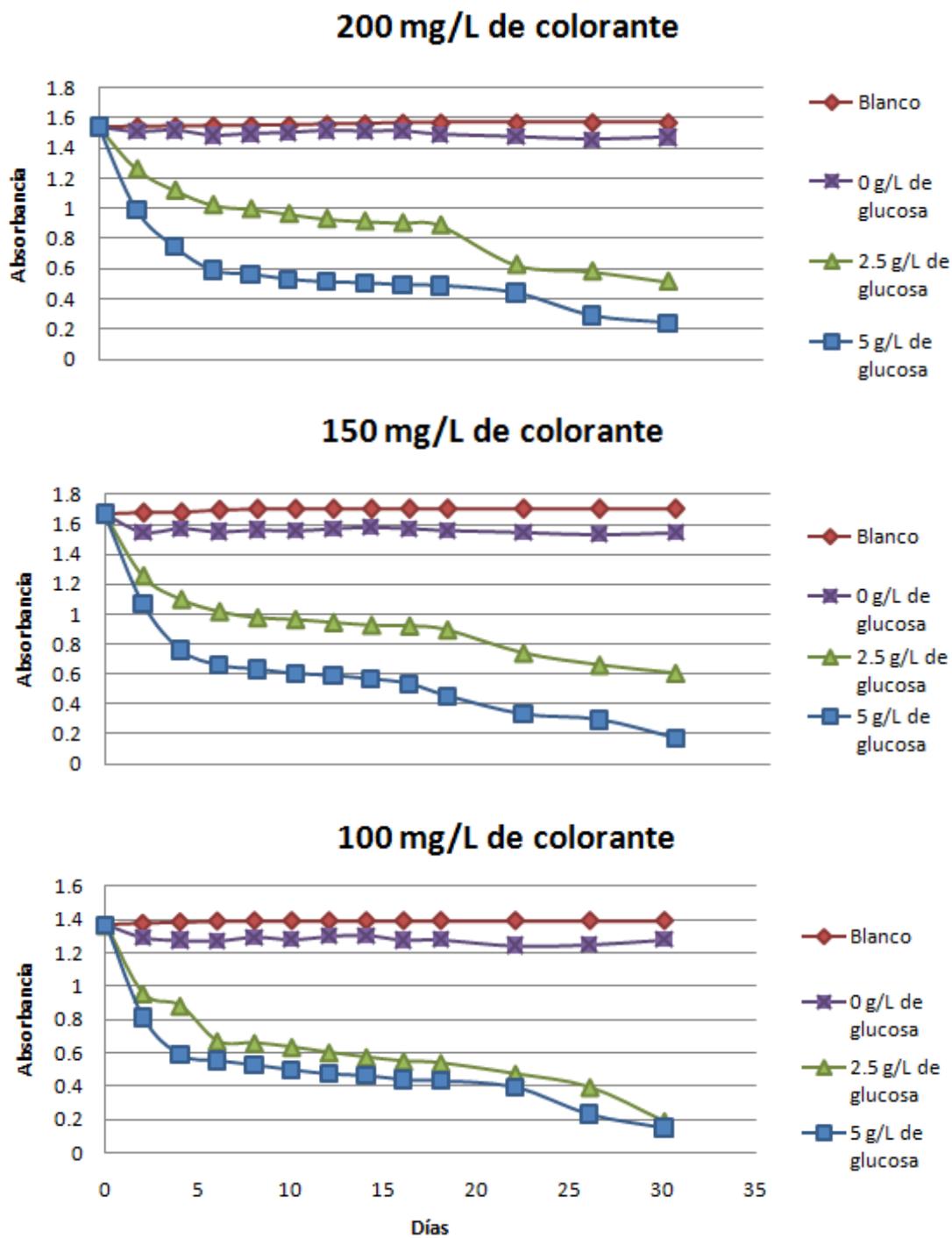


Figura 3. 13: Cambio de valor de Absorbancia a través del tiempo para cada concentración de glucosa con 200 mg/L, 150 mg/L y 100 mg/L de colorante.

### 3.12 Remoción de 100 mg/L, 150 mg/L y 200 mg/L de colorante Rojo 141 del Inóculo I5, bajo condiciones anaerobias con 0 g/L, 2,5 g/L y 5 g/L de glucosa.

En la gráfica de perfil obtenida (figura 3.14) se evidencia la relación de proporcionalidad entre porcentaje de remoción de color y concentración de glucosa. La concentración de colorante que obtuvo el mayor porcentaje de remoción fue 100 mg/L, seguida por 150 y 200 mg/L en este orden. La relación de proporcionalidad entre concentración de color y porcentaje de remoción fue inversa. Los porcentajes de remoción a 2,5 g/L de glucosa de 150 y 200 mg/L de colorante se observan cercanos.

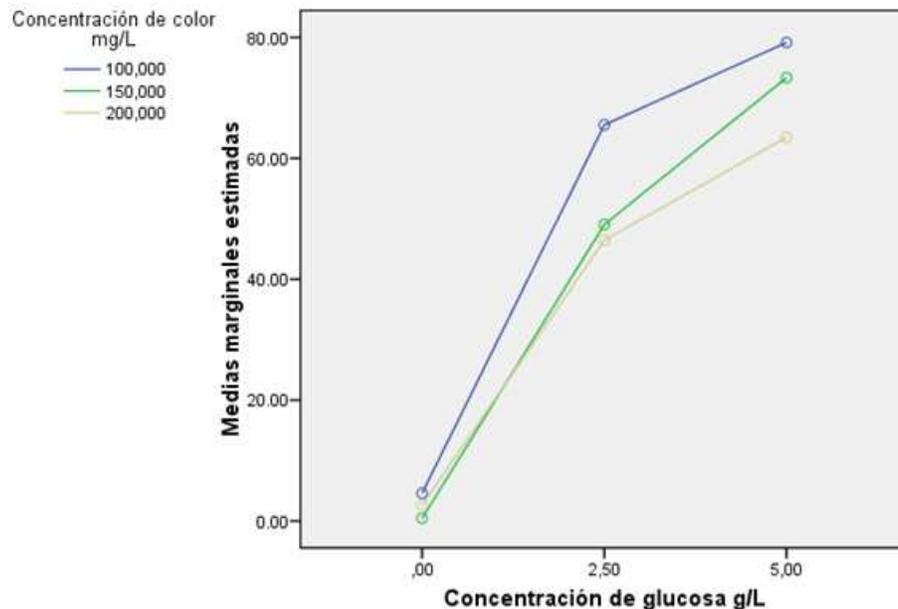


Figura 3. 14: Gráfico de perfil para la interacción de la concentración de glucosa y concentración de color.

El valor del estadístico de Levene, igual a  $0,060 > 0,05$ , permitió contrastar la hipótesis de homocedasticidad y comprobar la homogeneidad de las varianzas. Al realizar el ANOVA (tabla 3.13) se observó que hubo diferencia significativa para

los resultados obtenidos por factor y por la interacción de los mismos. El valor de  $R^2$  igual a 0,999 mostró que los efectos de los factores y la interacción entre ellos incluidos en el modelo, explican el 99,9% de la varianza de la variable dependiente, es decir, del porcentaje de remoción de color.

Por los valores de la suma de cuadrados se observó que el factor glucosa ejerció mayor efecto sobre el porcentaje de remoción de color que la concentración de colorante y la interacción de ambos factores.

Tabla 3.8: ANOVA para el experimento 2 factorial de los porcentajes finales de remoción de color rojo.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	Gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	24351,351(a)	8	3043,919	2441,755	0,00
Intersección	49315,122	1	49315,122	39559,347	0,00
ConColor	717,495	2	358,747	287,778	0,00
ConGluc	23306,231	2	11653,116	9347,836	0,00
ConColor * ConGluc	327,625	4	81,906	65,703	0,00
Error	22,439	18	1,247		
Total	73688,912	27			
Total corregida	24373,790	26			

a  $R^2$  cuadrado = 0,999 ( $R^2$  cuadrado corregida = 0,999)

Para el factor “concentración de glucosa” la prueba de Tukey separó a los porcentajes de remoción en tres grupos de homogeneidad (figura 3.15), uno por cada concentración ensayada (a, b y c).

De igual manera, los valores del factor “concentración de colorante” fueron divididos en tres grupos de homogeneidad (figura 3.15), uno para cada concentración de colorante en estudio (A, B y C).

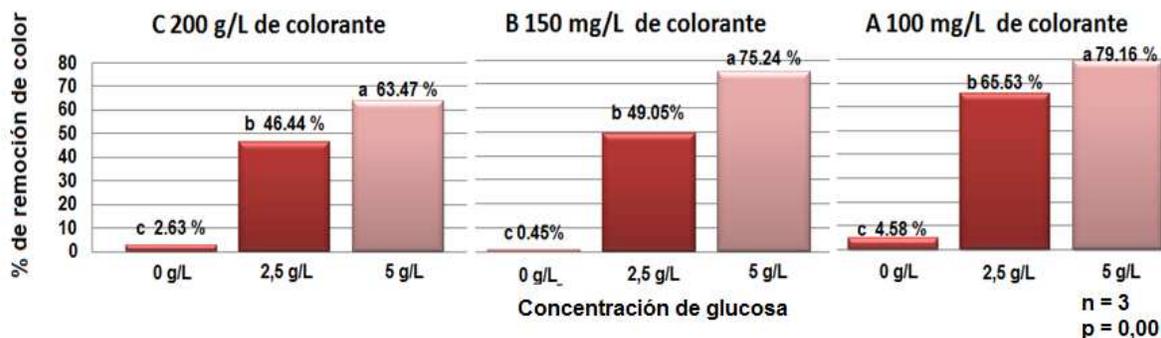


Figura 3. 15: Porcentaje promedio de remoción de color de cada concentración de colorante Rojo 141 y glucosa ensayada. Se indican los grupos de homogeneidad del factor glucosa (a, b, c) y de colorante (A, B y C) (significación 1)

En la gráfica de Absorbancia vs. Tiempo (figura 3.16), se observó que para las tres concentraciones de colorante, el blanco intensificó su coloración. A 200 mg/L de colorante, las absorbancias no fueron muy diferentes usando 2,5 y 5 g/L de glucosa como co-sustrato; mientras que para 150 mg/L de colorante, la diferencia fue notable. A 100 mg/L de colorante, los resultados estuvieron lejanos en un inicio y terminaron acercándose entre sí, alcanzando una diferencia de 13,63%.

Para las tres concentraciones de colorante, en ausencia de glucosa se observó una pequeña disminución de la absorbancia, seguida por su aumento y nuevamente disminución.

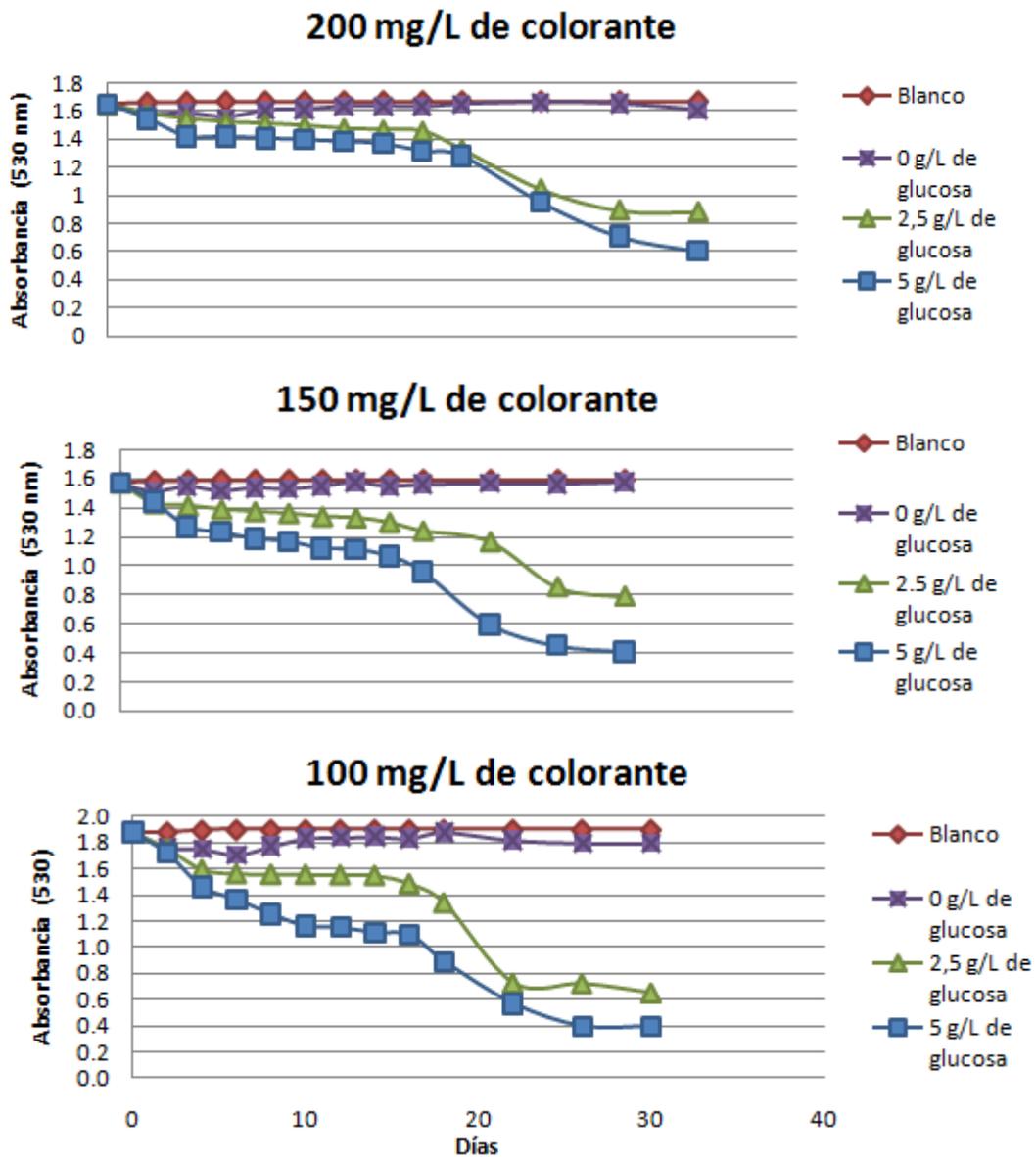


Figura 3. 16: Cambio de valor de Absorbancia a través del tiempo para cada concentración de glucosa con 200 mg/L, 150 mg/L y 100 mg/L de colorante reactivo Rojo 141.

## CAPÍTULO CUATRO: DISCUSIÓN

El presente trabajo de investigación, tuvo como objetivo seleccionar un inóculo bacteriano con capacidad de remover los colorantes textiles reactivos Azul Navy 171, Amarillo 84 y Rojo 171. Para alcanzar el objetivo, se colectaron muestras de aguas residuales provenientes de dos colectores del río Machangara, del agua residual de lavado de la industria textil y a partir de la exposición de medio de cultivo con colorantes directos Rojo 23 y Azul 106, al aire. De las muestras se obtuvieron inóculos bacterianos bajo condiciones anaerobios, cuya capacidad de remoción de color fue evaluada mediante varios ensayos. El inóculo con mayor capacidad de remoción de los colorantes en estudio, fue seleccionado.

### ***4.1 Selección de inóculo bacteriano en condiciones anaerobias con capacidad de remover los colorantes en estudio***

Todos los inóculos incluidos en la selección bajo condiciones anaerobias, demostraron tener la capacidad de remover color en diferentes proporciones. El inóculo I5, obtenido a partir de la exposición del medio Jiang *et al.*, 2004 modificado y enriquecido con 100 mg/L de colorante, alcanzó los mejores resultados en todos los ensayos realizados para la selección del mejor inóculo removedor. El inóculo I6, a pesar de haber sido obtenido bajo las mismas condiciones pero en presencia del colorante directo Azul 106, mostró resultados considerablemente menores. Los porcentajes de remoción de color alcanzados por acción del inóculo I6, fueron aún más bajos que aquellos correspondientes a la acción del inóculo I2 obtenido en el río Machángara. La posible explicación a este fenómeno pudo radicar en la dificultad de remover el colorante Directo Rojo 23 vs. el colorante Directo Azul 106. En el trabajo realizado por Morales y Melgosa, 2009, se obtuvo un 90% de remoción de color, en presencia de un mediador redox en el medio de cultivo. La biomasa autoseleccionada en la presente investigación, pudo

tener mayor capacidad de utilizar el potencial redox del medio, que aquellos seleccionados en el colorante directo azul, para la ruptura del enlace azo del cromóforo.

El inóculo I1, obtenido a partir de la muestra compuesta colectada en el colector “Teodoro Gómez de la Torre”, mostró la menor capacidad de remoción de entre todos los inóculos. El inóculo I2, que provino de una muestra también colectada en el río Machángara, aguas arriba del punto de muestreo en el colector “El Recreo”, fue el segundo mejor inóculo removedor. Esto pudo deberse a que por el punto de referencia “El Recreo” (punto de colecta de la muestra a partir de la que se obtuvo el inóculo I2), fluyen grandes cantidades de agua que estarían más cercanas al punto de descarga de las aguas residuales industriales de la zona sur de Quito (PSA, 2008). Los microorganismos que ahí se colectaron, estuvieron mayormente expuestos a los colorantes y en consecuencia, presentaron mayor capacidad de resistencia y/o tolerancia, similar a lo especificado por Peña y Tobón, 2006. Los mencionados investigadores aseguran que los microorganismos con capacidad de remoción de un contaminante específico, pueden ser encontrados en un efluente contaminado por el mismo contaminante en estudio.

Un parámetro importante que pudo influir en la remoción de colorante por parte de ambos inóculos, fue el pH. Como se observa en la tabla 3.1, el pH de las muestra compuestas tomadas en ambos colectores, fue alrededor de 7. Para la selección del inóculo, las bacterias fueron sembradas en un medio de cultivo de pH 6, el cual disminuyó hasta alcanzar pH inferiores 4, posterior al tiempo de incubación. El pH del medio de cultivo con color, no fue modificado porque en ensayos previos efectuados para elevar el pH, se produjo la remoción de color por la formación de precipitados que arrastraron el colorante. Las bacterias del inóculo I1 pudieron presentar mayor sensibilidad al pH que las del inóculo I2, similar a lo

ocurrido con el inóculo aislado en el trabajo de Moosvi *et al.*, 2005. En el mencionado trabajo de investigación, se comprobó que la remoción de color de ese inóculo en particular, se producía en pH comprendidos entre 6 y 8,5, y que a pH inferiores a 5,5, no había decoloración. Las bacterias del inóculo I2, pudieron soportar los bajos pH alcanzados posterior al tiempo de incubación, como ocurrió en el trabajo de Pereira y Freire, 2006, en el que al realizar pruebas de remoción del colorante Negro reactivo B con varios pH, registraron los mayores porcentajes de remoción a pH ácidos, siendo el mejor 3.

El inóculo compuesto seleccionado bajo condiciones anaerobias, presentó cierta sensibilidad al oxígeno, medida en el ensayo paralelo realizado, en el cual la cámara de gas pack en donde fueron incubados los medios de cultivos con bacterias, se mantuvo cerrada durante los quince días del ensayo. Para los tres colores se observó un aumento en el porcentaje de remoción (figura 3.6). Rivas y Mota, 2006, aseguraron que los microorganismos anaerobios son sensibles al oxígeno en diferentes proporciones. Algunos géneros considerados como anaerobios (*Actinomyces*, *Propionibacterium*, *Lactobacillus* y algunos *Clostridium*), pueden tolerar bajas concentraciones de oxígeno; mientras que otros, presentan alta sensibilidad, pues sus enzimas y cofactores pueden sufrir oxidaciones de grupos químicos que produzcan la inactivación irreversible de dichas moléculas. Adicionalmente, la presencia de oxígeno daría paso a la formación de sustancias tóxicas derivadas de la reducción parcial del oxígeno como son el radical superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^-$ ) que provocan la destrucción de constituyentes celulares.

Los microorganismos aerobios y facultativos, poseen las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasas. Las primeras catalizan la transformación del radical superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno, y las segundas transforman el peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua. Los microorganismos

aerotolerantes pueden carecer en algunos casos de catalasas pero poseen superóxido dismutasas. Los microorganismos anaerobios estrictos sin embargo, no poseen estas enzimas y si lo hacen es en bajas concentraciones, insuficientes para soportar la exposición al oxígeno por períodos prolongados. De ahí que en la primera fase de experimentación, con la apertura del gas pack realizada cada tres días, al permitir el ingreso de oxígeno, se pudo provocar la inactivación de enzimas o muerte de algunos microorganismos anaerobios encargados de la remoción de color. Al incubar los cultivos de forma continua se obtuvieron mejores resultados porque probablemente mayor cantidad de microorganismos anaerobios removedores estuvieron activos.

#### ***4.2 Análisis de pérdida de color por cambio de pH en medios de cultivo con colorante y recuperación de color por modificaciones de pH posterior a la acción bacteriana del inóculo seleccionado I5***

De acuerdo a los trabajos consultados, incluso a nivel de laboratorio, cuando de condiciones anaerobias se trata, es preferible trabajar con reactores que permitan controlar las condiciones de anaerobiosis, gases y pH (Bell y Buckley, 2003, Naimabadi *et al.*, 2009, Supaka *et al.*, 2004). Aunque la experimentación no fue realizada en un reactor anaerobio, se procuró trabajar bajo condiciones anaerobias y se tomaron medidas para mitigar y medir los cambios de pH, para posteriormente relacionarlos con la remoción de color.

El pH fue entonces un parámetro de control importante. En la presente investigación se trabajó con el medio de cultivo Jiang *et al.*, 2004 modificado y enriquecido con colorante, el cual alcanzó un pH alrededor de 6 y no fue modificado porque en ensayos previos realizados para elevar el pH, se observó remoción de color por la formación de precipitados colorimétricos. Aún así, se

llevaron a cabo cuatro ensayos que tuvieron como objetivo medir la remoción de color por acidificación del medio de cultivo, seleccionar una concentración solución tampón a pH 6 para mitigar las fluctuaciones de pH, determinar el porcentaje de recuperación de color al elevar el pH al del medio original posterior a la actividad bacteriana y medir la pérdida propia del medio de cultivo sin ser inoculado.

El primer ensayo realizado permitió observar que la acidificación del medio con ácido clorhídrico, produce una pérdida de color del medio para los tres colorantes, siendo el más susceptible, el colorante Azul Navy 171 (7,77%). Existía entonces la posibilidad, de que la remoción de color alcanzada se deba a la caída de pH posterior al tiempo de incubación de la biomasa y no necesariamente a la acción bacteriana sobre el colorante. Sin embargo, investigaciones como la de Robinson *et al.*, 2001 y Dos Santos *et al.*, 2007, aseguran que el ión Cloro ( $\text{Cl}^+$ ), por su alto poder oxidante, ataca al grupo amino del colorante, iniciando y acelerando la ruptura del enlace azo con la subsecuente eliminación de aminas aromáticas. La decoloración por este sistema, puede ser entonces resultado de una reacción química y no necesariamente se debe al cambio de pH.

Varias de las investigaciones utilizadas como base para el desarrollo del presente trabajo, destacan la importancia de tamponar el medio de cultivo con colorante para mitigar las fluctuaciones de pH a provocarse durante el tiempo de incubación. Tal es el caso del trabajo de Dos Santos *et al.*, 2004, Dos Santos *et al.*, 2005, Khalid *et al.*, 2008, Brás *et al.*, 2005 entre otros. Una razón importante del uso del tampón, es el rango al que trabajan las enzimas azoreductasas, las cuales se encargan de la ruptura del enlace azo. De acuerdo a Ramya *et al.*, 2008, dichas enzimas trabajan de mejor manera en pH alrededor de la neutralidad y a temperaturas comprendidas entre los 30 – 40°C. El ensayo realizado con varias concentraciones de solución tampón fosfato pH 6, permitieron observar que entre mayor la concentración de tampón agregada al medio, menor el cambio de pH y

menor el porcentaje de remoción. Este resultado podía significar que la remoción de color observada se debía a la disminución de pH del medio y no en sí a la acción bacteriana. Dicho supuesto quedó descartado una vez que el pH 4 de los medios, resultado de la incubación bacteriana, fue elevado hasta alcanzar niveles cercanos o superiores al original (antes de inocular e incubar los medios de cultivo). Los colores azul y rojo recuperaron apenas 0,37% y 0,76% respectivamente, y el amarillo experimentó una pérdida de 0,35% de coloración.

Con el último ensayo aplicado en cuanto al pH, se pudo determinar que los colorantes Amarillo 84 y Rojo 141, en el medio de cultivo Jiang *et al.*, 2004, modificado, intensifican su coloración con el tiempo, mientras que el Azul Navy 171 experimenta una pérdida de 0,708% de color.

A pesar del uso de la solución tampón, la acción bacteriana sobre el colorante posterior al tiempo de incubación, provocó caídas de pH alcanzado niveles entre 4, 25 y 5. Aún así, las bacterias que se adaptaron a las condiciones de estudio, lograron remover los colorantes en diferentes proporciones. La mayoría de trabajos de investigación consultados coinciden en que los mayores porcentajes de remoción son obtenidos a pH neutro. Moosvi *et al.*, 2005 obtuvo la mayor eficiencia en remoción a pH entre 6 y 8,5; Khalid *et al.*, 2008, recomienda trabajar en pH comprendidos entre 7 y 9. Brás *et al.*, 2005, Dos Santos, *et al.*, 2005 y Haroun e Idris, 2009, trabajan con pH alrededor de 7. El pH pudo ser entonces, un parámetro que aunque fue cuantificado, no fue controlado durante el periodo de incubación, lo que pudo influenciar en los resultados obtenidos a lo largo de la experimentación.

### **4.3 Cinética de crecimiento bacteriano y remoción de color**

De acuerdo a Rittman y McCarty, 2001 y a Dos Santos *et al*, 2006, en un consorcio bacteriano, intervienen procesos microbianos de alimentación correlacionados, produciéndose una cadena de dependencia entre microorganismos. La curva de crecimiento del inóculo I5, refleja el proceso típico de la digestión anaerobia descrita por Cervantes *et al*, 2008 (figura 4.1). En primera instancia, la materia orgánica disponible (glucosa), pasa por un proceso en el que bacterias denominadas acidogénicas, hidrolizan los compuestos de carbono en cadenas simples, originando ácidos grasos volátiles (AGV). Géneros de bacterias acidogénicas como *Clostridium*, *Streptococcus* y *Propionibacterium*, alcanzan altas tasas de fermentación dentro de un rango de pH comprendido entre 5-9 y tienen mayor velocidad de crecimiento en comparación a los grupos microbianos propios de la digestión anaerobia. El crecimiento acelerado de bacterias que se observa en las primeras 25 horas de incubación en los tres colorantes, podría corresponder al desarrollo de bacterias acidogénicas, inclusive por el pH del medio de cultivo de alrededor de 6 en el que fueron sembradas.

En una segunda fase, bacterias acetogénicas, toman los AGV y alcoholes generados en la primera fase, para liberar ácido acético, H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub>. Las bacterias acetogénicas, son de acuerdo a Cervantes, 2008, productoras obligatorias de H<sub>2</sub>, el cual es consumido por arqueobacterias metanogénicas hidrogenotróficas. Las acetogénicas, pudieron constituir aquel grupo de bacterias que se observa en el pico de la curva de crecimiento del inóculo I5 correspondiente a las horas de incubación 25-50, ya que para su desarrollo, sería obligatorio la presencia de acidogénicas que preparen el alimento a consumir.

En una tercera y última fase, se pudieron dar dos procesos específicos: metanogénesis o sulfato reducción. El primero es llevado a cabo por bacterias

metanogénicas hidrogenotróficas no acetoclásticas ó acetoclásticas, las cuales son altamente sensibles al oxígeno y al pH, pudiendo desarrollarse en pH comprendidos de acuerdo a Ritman y McCarty, 2001, entre 6,5 y 8. El segundo constituye un tipo de respiración que se produce cuando en el medio se encuentra una fuente de sulfato que sirva de aceptor de electrones, como es el caso del medio de cultivo Jiang *et al.*, 2004 modificado, con el que se trabajó en la presente investigación y en general, de aguas residuales de la industria textil. La alta presencia de sulfato, permite que las bacterias sulfato reductoras, lleven a cabo un proceso de reducción en el que se produce ácido sulfhídrico, altamente perceptible por su desagradable olor.

Debido a que en el medio de cultivo utilizado en esta investigación, existió una alta concentración de sulfato por el que se produjo ácido sulfhídrico altamente perceptible y debido a que las bacterias sulfato reductoras pueden desarrollarse a pH ácidos como los alcanzados durante la experimentación, es muy probable que las bacterias que se autoseleccionaron en el inóculo I5, hayan constituido bacterias Sulfato Reductoras. En la curva de crecimiento, éstas podrían estar contempladas en la población que se observa a partir de las 100 horas de incubación, en donde es visible una disminución de la población. Las bacterias sulfato reductoras, compiten por sustrato con las demás bacterias anaeróbicas, provocando una disminución de la densidad celular, como se observa en las curvas de los tres colorantes. Con estos antecedentes, es muy probable que las bacterias seleccionadas incluyan sulfato reductoras y posiblemente hay ausencia de metanogénicas, pues de acuerdo a Cervantes, 2008, las primeras ejercen un efecto tóxico sobre las segundas.

Son varios los estudios que se han realizado para determinar la capacidad removedora de las bacterias sulfato reductoras, en un intento de dilucidar el mecanismo de acción. Cervantes *et al*, 2006, realizó estudios de remoción del

colorante reactivo Naranja 14 y determinó que la reducción del colorante, se producía simultáneamente al proceso de reducción de sulfato del medio. Plum *et al.*, 2001 y Pandey *et al.*, 2007, hacen referencia a caracterizaciones moleculares de microorganismos en reactores anaerobios, mediante las cuales se ha determinado que  $\gamma$ -proteobacterias, junto con bacterias sulfato reductoras son constituyentes importante de cultivos mixtos con capacidad de remover colorantes reactivos. Yoo *et al.*, 2001 observaron en su investigación, que el uso de inhibidores de bacterias sulfato reductoras, provocó caídas considerables en el nivel de remoción final alcanzado. Guerrero *et al.*, 1999, asegura que la presencia de glucosa en un cultivo anaerobio, favorece al crecimiento de bacterias sulfato reductoras.

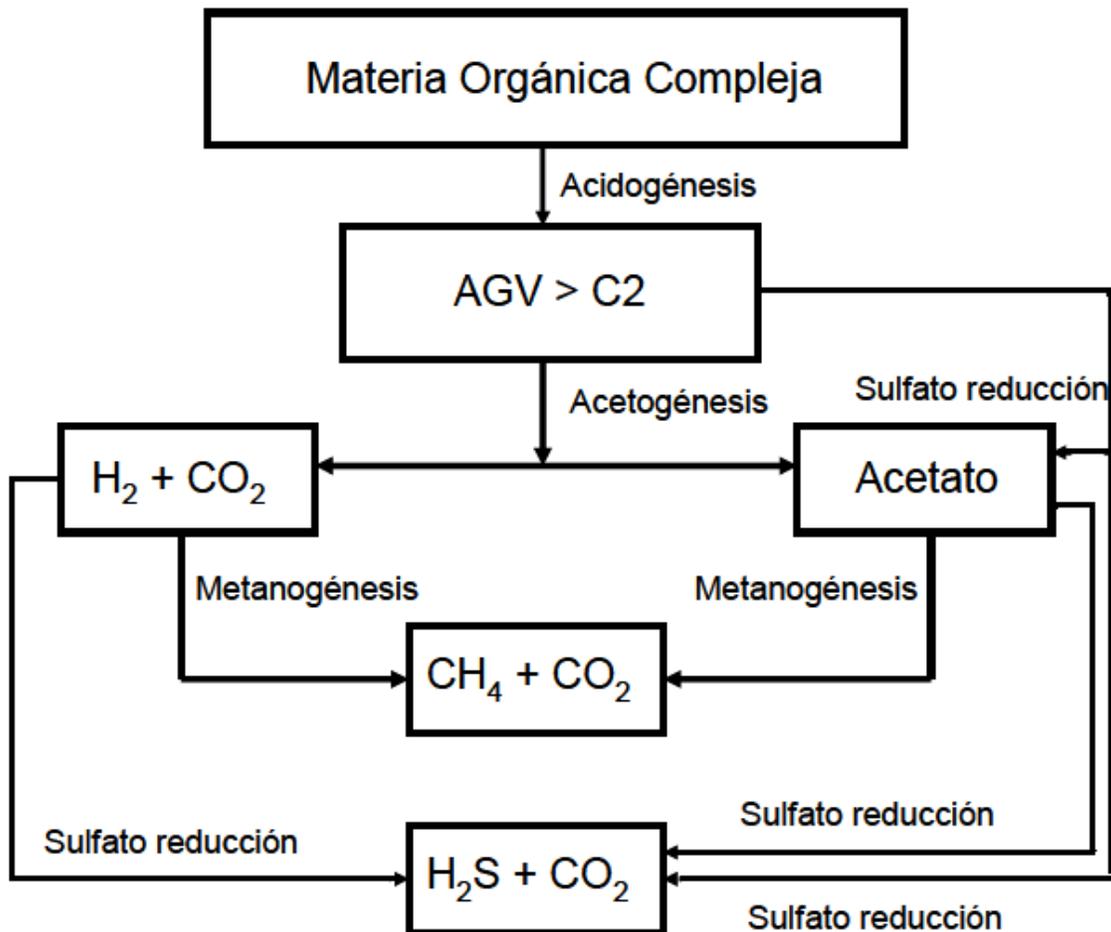


Figura 4. 1: Principales procesos involucrados en la digestión anaerobia de materia orgánica y su relación con la sulfato reducción (Cervantes, 2008).

#### **4.4 Evaluación de la capacidad de remoción de color por acción bacteriana del inóculo I5 seleccionado, en presencia de diferentes concentraciones de glucosa como sustrato alterno.**

Como se observó en los resultados obtenidos, para la remoción de los tres colorantes en estudio, fue indispensable la presencia de glucosa como co-sustrato. En todos los casos, los mayores porcentajes de remoción fueron alcanzados a la mayor concentración de glucosa ensayada (5 g/L) y los menores en ausencia de la misma (figuras 3.9, 3.12 y 3.15). Cada concentración de glucosa ensayada presentó diferencia significativa (tablas 3.6, 3.7 y 3.8). La importancia del uso de un co-sustrato como la glucosa en la remoción de color, es compartida por varios trabajos de investigación sobre el tema. Pandey *et al.*, 2007, asegura que bajo condiciones anaerobias, la presencia de una fuente orgánica de carbono es indispensable, destacando el uso de la glucosa. Stolz, 2001, afirma que bajo condiciones anaerobias, son varios los microorganismos con capacidad de remover color, sin embargo, sin importar de cuál se trate, el grado de decoloración alcanzada dependerá de la presencia de un co-sustrato así como también de la estructura del colorante. Dos Santos *et al.*, 2004 en su investigación dedujo que la remoción de color es acelerada por la adición de un co-sustrato en ausencia o presencia de mediadores. De la misma manera, Moosvi *et al.*, 2005 cita en su trabajo que la decoloración del medio por actividad bacteriana requiere obligatoriamente la presencia de un sustrato alterno.

A pesar de que el uso de 2,5 y 5 g/L de glucosa, presentaron diferencias estadísticamente significativas, al llevar el ensayo a mayores escalas, sería importante determinar si se justifica duplicar la concentración del sustrato alterno, para obtener un aumento del 6,11%, 2,66% y 13,63% de remoción, partiendo de 100 mg/L de los colorantes Azul Navy 171, Amarillo 84 y Rojo 141, respectivamente.

En cuanto a las concentraciones de colorante ensayadas, para los tres colores, se observó que a menor concentración de colorante mayor el porcentaje de remoción alcanzado (figuras 3.9, 3.12 y 3.15). Al igual que en el factor glucosa, cada concentración de colorante ensayada guardó diferencia significativa (tablas 3.6, 3.7 y 3.8). Este resultado coincide con los obtenidos por Bell y Buckley, 2003, y Kalhid *et al.*, 2001, en los que se obtuvieron menores porcentajes de remoción de color a mayores concentraciones de colorante ensayadas. De acuerdo a Mansilla, 2001, las aguas residuales de tipo textil pueden alcanzar concentraciones de colorante de aproximadamente 200 mg/L en total, es decir, de la mezcla de colorantes. Ya que la concentración de cada colorante en el agua residual textil sería menor a 200 mg/L, el inóculo seleccionado posiblemente podría tratar el agua residual textil real.

Un importante trabajo de investigación, cuyos resultados son altamente comparables con los obtenidos en el presente trabajo, es la experimentación realizada por Guerrero *et al.*, 1999, en la cual, se ensayó la remoción de 100, 200, 400 y 800 mg/L de colorante, en presencia de glucosa y sulfato de sodio como aceptor de electrones. En los resultados de dicha investigación se observa que en ausencia de glucosa, no existe remoción de color, citando incluso, una posible inhibición de la biomasa por efecto del colorante sobre el ADN bacteriano y concluyendo que a concentraciones menores de 100 mg/L el colorante no causa efecto inhibitorio sobre la biomasa anaerobia. De igual manera, se determina que entre mayor es la concentración de color, menor la remoción alcanzada.

Un parámetro importante que pudo influir en los resultados obtenidos, fue el tamaño de inóculo. Moosvi, *et al.*, 2005, obtuvo en su investigación, los mejores resultados colocando 20% de inóculo en el medio de cultivo (v/v). En la presente

investigación, el volumen de inóculo fue apenas del 3.75%. La cantidad de bacterias colocada en condiciones anaerobias, es importante porque son de lento crecimiento (Rittman y McCarty, 2001).

Los resultados obtenidos de remoción de color vs. concentración de glucosa al ser concatenados con la bibliografía, permitieron formar una idea del mecanismo de remoción utilizado por los microorganismos involucrados. Como lo reporta Pandey *et al.*, 2007, es ya conocida la presencia de azoreductasas en microorganismos tanto anaerobios como aerobios, utilizadas en la decoloración de colorantes azo sulfonados como es el caso de los contemplados en esta investigación. Se ha establecido que los géneros *Clostridium* y *Eubacterium* en condiciones anaerobias elaboran azoreductasas sensibles al oxígeno que son liberadas del citosol.

Bajo condiciones anaerobias, el mecanismo de ruptura del enlace azo comienza con la reducción de cofactores como NADH, NAD(P)H, FMNH<sub>2</sub> y FADH<sub>2</sub> por la oxidación de un co-sustrato como es la glucosa. Los cofactores reducidos transportarían los electrones que serían usados por las azo reductasas para la ruptura del enlace azo, produciendo aminas aromáticas como desecho. Dos Santos *et al.*, 2007, aseguran que en estudios realizados se le atribuye a enzimas con actividad de quinona reductasa la capacidad de reducir el enlace azo. Pandey *et al.*, 2007 cita investigaciones en las que se asevera, una flavina adenina dinucleótido deshidrogenasa sería la responsable de la ruptura del enlace; esta enzima también tendría la propiedad de romper las aminas aromáticas nitrogenadas generadas tras el proceso de reducción. Otras enzimas involucradas también serían, de acuerdo a Pandey *et al.*, 2007 reductasas flavina dependientes presentes en el citosol, las cuales transportarían electrones mediante flavinas solubles, esto a nivel in vitro.

Otro mecanismo de ruptura requeriría la intervención de mediadores. El mecanismo (figura 4.2) consistiría en la reducción de moduladores oxidados, con electrones provenientes de un sustrato alterno. Los moduladores reducidos darían los electrones necesario para la ruptura del enlace azo, por acción enzimática de enzimas azoreductasas. Dos Santos *et al.*, 2004, especifican que compuestos de flavina, como la ribofablina, flavina adenina dinucleótido FAD, y flavina adenina mononucleotido FMN son mediadores.



Figura 4. 2: Mecanismo de reducción del enlace azo por microorganismos anaerobios con la intervención de mediadores (basado en Dos Santos *et al*, 2007).

Wuhrmann *et al.*, 1980 propuso que el mecanismos de reducción del colorante correspondía a un proceso intracelular. Dos Santos *et al*, 2007 por el contrario aseguran que la remoción anaerobia solo podría ocurrir extracelularmente ya que los colorantes sulfonados como los reactivos en estudio, presentan baja permeabilidad a las paredes de las células, similar a lo especificado ya por Dubin y Wright, 1975.

Para conocer si el uso del inóculo seleccionado, es o no viable en el tratamiento de agua textil residual, tendría que ser probado en un reactor

anaerobio donde pH, fuente de carbono, ausencia de oxígeno y crecimiento, sean controlados al máximo. Sin embargo, mediante la presente investigación, se ha comprobado que el inóculo seleccionado tiene la capacidad de remover los colorantes en estudio, dependiendo eso sí, de las condiciones de cultivo.

En Quito, únicamente el 5% de las empresas textiles aplican algún tipo de tratamiento (Witt, 2008). Se desconoce la proporción de aquellas que aplican un tratamiento biológico, por lo tanto no se dispone de datos que permitan comparar los resultados obtenidos con inóculos importados aplicados en la empresa textil en el Ecuador.

El inóculo seleccionado en la presente investigación, podría constituir una alternativa para el tratamiento biológico de aguas residuales de las varias industrias textiles, que aún no aplican ningún tipo de tratamiento a sus aguas residuales, sin que exista la dependencia a la importación de inóculos. Sería necesario realizar un proceso de escalado para cuantificar la eficiencia de remoción del inóculo seleccionado en condiciones reales, partiendo de los resultados obtenidos en la presente investigación.

## **CAPÍTULO CINCO: CONCLUSIONES**

### ***5.1 En cuanto a la selección del inóculo compuesto más eficiente:***

5.1.1 Los inóculos que crecieron bajo las condiciones anaerobias de estudio removieron color en diferentes proporciones.

5.1.2 El mejor consorcio removedor en 100 mg/L de color y 5 g/L de glucosa de co-sustrato en la fase de selección fue I5 obtenido a partir de la exposición del medio Jiang *et al*, 2004 enriquecido con 100 mg/L de colorante directo Rojo 23.

### ***5.2 En cuanto al análisis de influencia de pH en la remoción de color por acción del inóculo seleccionado:***

5.2.1 Acidificar el medio con ácido clorhídrico produce una reducción de color de 7,77% para el colorante Azul Navy 171, 3,88% para el colorante Amarillo 84 y 1,9% para el colorante Rojo 141.

5.2.2 El colorante más susceptible a la remoción de color por cambios de pH es el Azul Navy 171.

5.2.3 El uso de solución tampón de fosfatos permitió disminuir la reducción colorimétrica por variación de pH.

5.2.4 La mayor reducción de color fue provocado por la acción microbiana y no por cambios de pH en el medio.

### ***5.3 En cuanto a la cinética de crecimiento y la remoción del color***

5.3.1 La cinética de crecimiento del consorcio siguió la misma tendencia en los tres colorantes, comenzando con una fase logarítmica, seguida de una pequeña fase de latencia y una segunda logarítmica, y finalmente decayendo y manteniéndose constante.

5.3.2 La remoción del colorante reactivo Rojo 141 es efectuada por los microorganismos que se desarrollan en la fase de la cinética en la cual la población se mantiene constante.

### ***5.4 En cuanto al arreglo factorial para el colorante reactivo Azul Navy 171:***

5.4.1 Entre menor es la concentración de color mayor es la eficiencia de remoción alcanzada, pues a 100, 150 y 200 mg/L se obtuvieron porcentajes de remoción promedios de 59%, 54% y 43%, porcentajes promedios calculados a partir de todas las concentraciones de glucosa.

5.4.2 Entre mayor es la concentración de glucosa mayor es la remoción de color. Los porcentajes alcanzados fueron 25 %, 62 % y 73 % a 0 g/L, 2,5 g/L y 5 g/L de glucosa respectivamente.

5.4.3 La remoción más alta alcanzada fue de 75,56% que correspondió a la menor concentración de color ensayada (100 mg/L) y la mayor concentración de glucosa (5 g/L).

5.4.4 El uso de 5 g/L de glucosa aumenta el porcentaje de remoción de color en 6,16%, 10,63 % y 15,36% en comparación al uso de 2,5 g/L, en 100 mg/L, 150 mg/L y 200 mg/L de colorante respectivamente.

### ***5.5 En cuanto al arreglo 2 factorial para el colorante reactivo Amarillo 84:***

5.5.1 Entre menor es la concentración de color mayor es la eficiencia de remoción alcanzada, pues a 100, 150 y 200 mg/L se obtuvieron porcentajes de remoción de 60%, 55% y 53% respectivamente, porcentajes promedios calculados a partir de todas las concentraciones de glucosa.

5.5.2 Entre mayor es la concentración de glucosa mayor es la remoción de color. Los porcentajes alcanzados fueron 7 %, 73 % y 87 % a 0 g/L, 2,5 g/L y 5 g/L de glucosa respectivamente.

5.5.3 El porcentaje de remoción promedio más alta fue de 89,73% que correspondió a la interacción entre 150 mg/L de colorante y 5 g/L de glucosa.

5.5.4 El uso de 5 g/L de glucosa aumenta el porcentaje de remoción de color en 2,66%, 26,06% y 19,65% en comparación al uso de 2,5 g/L, en 100 mg/L, 150 mg/L y 200 mg/L de colorante respectivamente.

### **5.6 En cuanto al arreglo 2 factorial para el colorante reactivo Rojo 141:**

5.6.1 La relación de proporcionalidad que existe entre concentración de glucosa y remoción es directa, ya que se obtuvieron porcentajes de remoción de color iguales a 2,6%, 53,67% y 72% a 0 g/L, 2.5 g/L y 5 g/L de glucosa respectivamente.

5.6.2 Entre menor es la concentración de colorante, mayor el porcentaje de remoción alcanzado, ya que a 100 mg/L, 150 mg/L y 200 mg/L se obtuvieron remociones de 49 %, 40 % y 37 % de color respectivamente, porcentajes promedios calculados a partir de todas las concentraciones de glucosa.

5.6.3 El uso de 5 g/L de glucosa aumenta el porcentaje de remoción de color en 13,63%, 26,19% y 17,07% en comparación al uso de 2,5 g/L, en 100 mg/L, 150 mg/L y 200 mg/L de colorante respectivamente.

5.6.4 El mayor porcentaje de remoción de color fue 79,16%, obtenidos en 100 mg/L de colorante y 5 g/L de glucosa.

### **5.7 En cuanto al trabajo en conjunto:**

5.7.1 Entre menor la concentración de colorante, mayor la remoción de color efectuada por el inóculo seleccionado.

5.7.2 Los tiempos requeridos para la remoción de color se extienden en condiciones anaerobias si no hay un control de pH, concentración de oxígeno y tamaño de inóculo.

5.7.3 El inóculo seleccionado tiene la capacidad de remover los colorantes reactivos Azul Navy 171, Rojo 141 y Amarillo 84, en proporciones dependientes de la concentración de colorante, glucosa, del pH y del nivel de oxígeno.

## **CAPÍTULO SEIS: RECOMENDACIONES**

Sería importante realizar ensayos de pH que permitan determinar el nivel óptimo necesario para alcanzar una remoción de color más eficiente.

Se recomienda probar con tamaños de inóculos más grandes a los utilizados en la presente experimentación, con el objetivo de reducir el tiempo de retención celular necesario para alcanzar remociones superiores al 80%.

Se recomienda probar el inóculo seleccionado en un reactor anaerobio a escala de laboratorio, en el cual se puedan controlar de mejor manera las condiciones de pH y de anaerobiosis requerido para el exitoso desarrollo de microorganismos anaerobios, en especial los sulfato reductores.

Se recomienda continuar con el proceso de escalado, para cuantificar la eficiencia de remoción de color en condiciones reales con agua residual textil, y así observar la viabilidad que tendría el inóculo en el tratamiento de aguas residuales de este tipo.

Se recomienda ensayar el uso de una fuente de carbono alterna más económica, como la melaza, para aumentar la probabilidad del uso de este tipo de inóculos en el tratamiento de aguas residuales textiles.

Se recomienda realizar ensayos para determinar el grado de toxicidad de las moléculas generadas por la ruptura de los colorantes.

Se recomienda caracterizar el inóculo compuesto seleccionado, para así establecer las posibles relaciones existentes entre los microorganismos y determinar si alguno de ellos puede ser eventualmente patógeno para la salud humana o el medio ambiente.

## CAPÍTULO SIETE: BIBLIOGRAFÍA

1. Arndt, C., Gaill, F. y Felbeck, H. (2000). Anaerobic sulfur metabolism in thitrophic sumbioses. *The Journal of Experimental Biology*, 204:741–750.
2. Bell, J. y Buckley, C. (2003). Treatment of a textile dye in the anaerobic baffled reactor. *Water SA* , 29(2):129-134.
3. Benson, H. (1994). Microbiological applications. Sexta Edición. WCB Wm C. Brown Publishers. Dubuque-Estados Unidos. pp 83 y 87
4. Bock D y Rott U. (2003). Co-fermentation of Colored Concentrates from the Textile Processing Industry. *Journal of Environmental Science and Health* , 1889–1901.
5. Brás R. Gómez A. Ferra M.I.A. Pinheiro H.M y Gonçalves I.C. (2005). Monoazo and diazo dye decolourisation studies in a methanogenic UASB reactor. *Journal of Biotechnology* , 115: 57-66.
6. Burneo, S. (2009). Megadiversidad. *Letras Verdes*, 3: 6-7.
7. Carlier, C.M., Laboureur, P., Buckley, C.A. (1996). Treatment of exhausted reactive dyw bath effluent using anaerobc digetion laboratory and full-scale trials. *Water S.A 22* , 225-233.

8. Cegarra J. (1980). Colorantes Reactivos., *Fundamentos Científicos y Aplicados de la Tintorería de Materiales Textiles* (págs. 498-501). Barcelona: Universidad Politécnica de Barcelona.
9. Cervantes FJ, Enríquez JE, Mendoza-Hernández MR, Razo-Flores E & Field JA (2006) The role of sulphate reduction on the reductive decolorization of the azo dye reactive orange 14. *Water Sci. Technol.* 54: 171-177.
10. Cervantes, F. (2008). Reducción de colorantes azo por distintos grupos microbianos en consorcios anaerobios. *BioTecnología*, 12: 5-20.
11. Chang, J.S., Chou, C., Lin, Y., Ho, J., T.L. (2001). Kinetic Characteristics of bacterial azo-dye decolorization by *Pseudomonas luteola*. *Water Research* 35, 2042-2850.
12. Chen K. Huag W. Wu Y. y Houg J. (1999). Microbial decolorization of azo dyes by *Proteus mirabilis*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 686-690.
13. Chen, K.C., Wu, J.Y., Liou, D.J., Hwang, S.J. (2003). Decolorization of textile dyes by newly isolated bacterial strains. *Journal of Biotechnology* 101, 57-68.
14. Christie, R. (2001). Colour Chemistry. *The royal Society of Chemistry, Cabridge. United Kingdom* .

15. Coughlin M. K. B. (1999). Degradation of azo dyes containing aminonaphthol by *Sphingomonas* sp strain 1CX. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* , 341-346.
16. Corporación Financiera Internacional (IFC), "Guías sobre medio ambiente, salud y seguridad FABRICACIÓN DE TEXTILES", [en línea]. USA. 30 de Abril de 2007. Disponible en la web: [http://www.ifc.org/ifcext/sustainability.nsf/AttachmentsByTitle/gui\\_EHSGuidelines2007\\_TextilesMfg\\_Spanish/\\$FILE/0000199659ESes+Textiles+Manufacturing+rev+cc.pdf](http://www.ifc.org/ifcext/sustainability.nsf/AttachmentsByTitle/gui_EHSGuidelines2007_TextilesMfg_Spanish/$FILE/0000199659ESes+Textiles+Manufacturing+rev+cc.pdf)
17. Dirección de Medio Ambiente. (1998). Manual para muestreo de aguas y sedimentos. Primera Edición. pp 50-53.
18. Dos Santos, A., Bisschops I., Cervantes, F. y Van Lier, J. (2004). Effect of different redox mediators during thermophilic azo dye reduction by anaerobic granular sludge and comparative study between mesophilic (30°C) and thermophilic (55°C) treatments for decolorisation of textile wastewaters. *Chemosphere* , 55: 1149-1157.
19. Dos Santos, A., Bisschops, I., Cervantes, F. y Van Lier J. (2005). The transformation and toxicity of anthraquinone dyes during thermophilic (55°C) and mesophilic (30°C) anaerobic treatments. *Journal of Biotechnology* , 115: 345-353.
20. Dos Santos. A., Cervantes. F y van Lier. J. (2007). Review paper on current technologies for decolorisation of textile wastewater: Perspectives for anaerobic biotechnology. *Elsevier* , 98: 2369-2385.

21. Dubin P. y Wright K. L. (1975). "Reduction of azo food dyes in cultures of *Proteus vulgaris*." *Xenobiotica*, 5(9), 563–571
22. Ergas S. Therriault B y Reckhow D. (2006). Evaluation of Water Reuse Technologies for the Textile Industry. *Journal of Environmental Engineering*, 316-323.
23. Garcés L. y Pañuela M. (2004). Tratamiento de las aguas residuales de una industria textil utilizando colector solar. *Revista Lasallista de Investigación* , 24-31.
24. Georgiou D. y Aivasidis A. (2006). Decoloration of textile wastewater by means of a fluidized-bed loop reactor and immobilized anaerobic bacteria. . *Journal of Hazardous Materials* , 372-377.
25. Guerrero, M., Briones, R., Kuppusamy I. 1999. Biodegradación anaerobia de colorantes tipo azo vía sulfato-reductoras. Instituto de Ingeniería UNAM.
26. Gutierrez, H. (2008). Análisis y Diseño de Experimentos. Segunda Edición. Editorial McGraw Hill. Mexico DF. pp 4-15, 62-96, 128-164.
27. Hao, O.J., Kim, H., Chang, P.C. (2000). Decolorization of Wastewater . *Environmental Science Technology* 30 , 449-505.
28. Haroun, M. y Idris, A. (2009). Treatment of textile wastewater with an anaerobic fluidized bed reactor. *Desalination* 237 , 357-366.

29. Harrelkas, F., Paulo, A., Alves, M.M., El Khadir, L., Zajraa, O., Pons, M.N. Van der Zee, F.P. (2008). Photocatalytic and combined anaerobic-photocatalytic treatment of textile dyes. *Chemosphere* 72 , 1816-1822.
30. Huag, W., Schmidt, A., Nortemann, B., Hempel, D.C., Stolz, A., Knackmuss, H.J. (1991). Mineralization of the sulfonated azo dye Mordant Yellow 3 by a 6-aminonaphthalene-2-sulfonate-degrading bacterial consortium. *Applied and Environmental Microbiology* 57 , 3144-3149.
31. Hussein, S. (2008). Biodegradation of the Reactive and Direct Dyes Using Egyptian Isolates. *Journal of Applied Sciences Research*, 4(6): 599-606.
32. İşik, M. (2004). Efficiency of simulated textile wastewater decolorization process based on the methanogenic activity of upflow anaerobic sludge blanket reactor in salt inhibition condition. *Enzyme & Microbial Technology* , 399-404.
33. İşik, M y Sponza, D. (2007). Anaerobic/aerobic treatment of a simulated textile wastewater. *Separation and Purification Technology*, 60: 64-72
34. Jiang H, Tay J y Tay S. (2004). Changes in structure, activity and metabolism of aerobic granules as a microbial response to high phenol loading. *Applied Microbiology & Biotechnology* , 602-608.

35. Kapdan, I. y Oztekin, R. (2003). Decolorization of textile dyestuff Reactive Orange 16 in fed-batch reactor under anaerobic condition. . *Enzyme & Microbial Technology* , 231-235.
36. Khalid, A., Arshad, M., Crowley, D. (2008). Accelerated decolorization of structurally different azo dyes by newly isolated bacterial strains. *Environmental Biotechnology* 78 , 361-369.
37. Kim, S; An, J y Kim, B. (2008). The effects of reductant and carbon source on the microbial decolorization of azo dyes in an anaerobic sludge process . *Dyes & Pigments* , 256-263.
38. Kiyoharu I, Kitade Y, Nakanishi M y Yatome C. (2002). Decolorization of methyl red by a Mixed Culture of Bacillus sp. and Pseudomonas stutzeri. *Journal of Environmental Science and Health* , 415-421.
39. Libra, J; Borchert, M; Vigelahn, L y Storm, T. (2004). Two stage biological treatment of a diazo reactive textile dye and the fate of the dye metabolites. *Chemosphere* , 56: 167-180.
40. Llavador, F. (2005). METABOLISMO BACTERIANO Y MODELIZACIÓN MATEMÁTICA DE PROCESOS. Asociación Española de Abastecimiento de Agua y Saneamiento Ambiental, Entidad Pública de Saneamiento de Aguas Residuales de la Comunidad Valenciana, 1-67.
41. López, P. (2008). La columna de Winogradsky. Un ejemplo de microbiología básica en un laboratorio de educación secundaria. *Eureka*; 5(3), pp. 373-376

42. Madigan, M. T, Martinko, J. M. & Parker, J. 2003. *Brock Biología de los Microorganismos*, 10ª edición. Ed. Prentice-Hall, Madrid
43. Mansilla H. D., Lizama C., Gutarra A. y Rodríguez J. (2001) Tratamiento de residuos líquidos de la industria de celulosa y textil, en Eliminación de contaminantes por fotocátalisis heterogénea, Blesa M.A. editor, Editorial CYTED, La Plata, Argentina, 285-294.
44. Melnikov, B. y Moriganor P. (1982). Clasificación técnica de los colorantes. En B. y Melnikov, *Empleo de los colorantes* (pág. 38). La Habana: Pueblo y Educación.
45. Mohan, C. "Proceso totalmente biológico y nada de descarga en Vijayeswari Textiles", [en línea]. La India. 2009. Disponible en la web: [http://www.novozymes.com/NR/rdonlyres/80957271-7391-434E-849C-687DF844EEBB/0/ES\\_india.pdf](http://www.novozymes.com/NR/rdonlyres/80957271-7391-434E-849C-687DF844EEBB/0/ES_india.pdf)
46. Moosvi, S., Keharia, H. y Madamwar, D. (2005). Decolorization of textile dye Reactive Violet 5 by a newly isolated bacterial consortium RVM 11.1. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* , 21:667-672.
47. Morales F. y Melgosa R. (2009). Tratamiento del Colorante Azo Rojo Directo 23 mediante Reactores Discontinuos Secuenciados Anaerobios/Aerobios . *Información Tecnológica* , 20: 73-82.
48. Naimabadi, A., Moovahedian, H. y Shahsavani, A. (2009). Decolorization and biodegradation of azo dye reactive Red 2 by anaerobic/aerobic sequential process. *Iran Journal of Environmental, Health, Science and Engineering*, 6:67-72.

49. Pandey, A., Singh, P., Iyengar, L. (2007). Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59: 73-84.
50. Peña C. y Tobón Y. (2006). Remoción del color de lodos provenientes de la industria textil por *Aspergillus* sp. . *Redalyc* , 42, 142. 88-94.
51. Pereira W. y Freire R. (2006). Azo Dye Degradation by Recycled Waste Zero-Valent Iron Powder. *Sociedad Brasileira de Química* , 17. 5. 832-838.
52. Pey, C. (2008). *Aplicación de procesos de oxidación avanzada (Fotocatálisis solar) para tratamiento y reutilización de efluentes textiles. Tesis de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Textil Papelera. Universidad Politécnica de Valencia.*
53. Programa de Saneamiento Ambiental (PSA). (2008) Caracterización de aguas de colectores del río Machángara. Empresa Metropolitana de Agua Potable. Quito-Ecuador
54. Plumb J., Bell J. y Stuckey D. (2001). Microbial Populations Associated with Treatment of an Industrial Dye Effluent in an Anaerobic Baffled Reactor. *Applied and Environmental Microbiology* , 67: 3236-3235.

55. Quezada, M. y Buitrón G. 1999. Biodegradación aerobia de colorantes tipo Azo (Rojo Ácido 151) Coordinación de Bioprocesos Ambientales, Instituto de Ingeniería, Universidad Autónoma de México.
56. Rădulescu C, Ioniță I, Moater E. (2008). Monitoring and Degradation of Some Organic Pollutants from Waste Waters Resulting From Textile Industry. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry* , 51-161.
57. Rajaguru, P., Vidya, L., Baskarasethepathi, B., Kumar, P.A., Palanivel, M., Kalaiselvi, K. . (2002). Genotoxicity evaluation of polluted ground water in human peripheral blood lymphocytes using the comet assay. *Mutation Research* 517 , 29-37.
58. Ramya, M., Anusha, B., Kalavanthy, S. 2008. Decolorization and biodegradation of Indigo Carmine by a textile soil isolate *Peanibacillus* larvae. *Biodegradation*. 19:28-291.
59. Razo-Flores, E., Luijten, M., Donlon, B., Lettinga, G., Field, J. (1997b). Complete biodegradation of the azo dye azosalicylate under anaerobic conditions. *Environmental Science and Technology* 31 , 2098-2103.
60. Recalde, C. (8 de Octubre de 2009). Por una Ley en defensa de la vida, en defensa del agua. *Voltairenet.org* .
61. Rittman, B. y McCarty P. (2001). Usos del Tratamiento por Metanogénesis. En B. y. Rittmann, *Biología del Medio Ambiente* (págs. 560- 562). Madrid-España: McGraw-Hill. Primera Edición.

62. Rivas, C. y Mota M. . (2006). Bacterias Anaerobias. En U. d. República., *Temas de Bacteriología y Virología Médica* (págs. 356-357). Montevideo. Uruguay: FEFMUR, Segunda Edición.
63. Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R. Nigman, P. 2001. Remediation Of Dyes In Textile Effluent: A Critical Review on Current Treatment Technologies With A Proposed Alternative. *Bioresource Technology*, 77: 247-255
64. Rodríguez, A., Letón, P., Rosal, R., Dorado, M., Villar, S. y Sanz, J. "Tratamientos avanzados de aguas residuales industriales". Madrid: CEIM Dirección General de Universidades e Investigación, 2006. Informe Técnico de la Universidad de Alcalá del Círculo de Innovación en Tecnologías Medioambientales y Energía (CITME).
65. Russ, E., Rau, J. Stolz, S. (2000). The Function of Cytoplasmic Flavin Reductases in the Reduction of Azo Dyes by Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:1429-1434.
66. Salas, G. (2003). Tratamiento físico químico de las aguas residuales de la industria textil. *Perú Química* , 5: 73-80.
67. Sen, S y Demirer, G. (2003). Anaerobic Treatment of Synthetic Textile Wastewater. *Journal of Environmental Engineering* , 595-601.

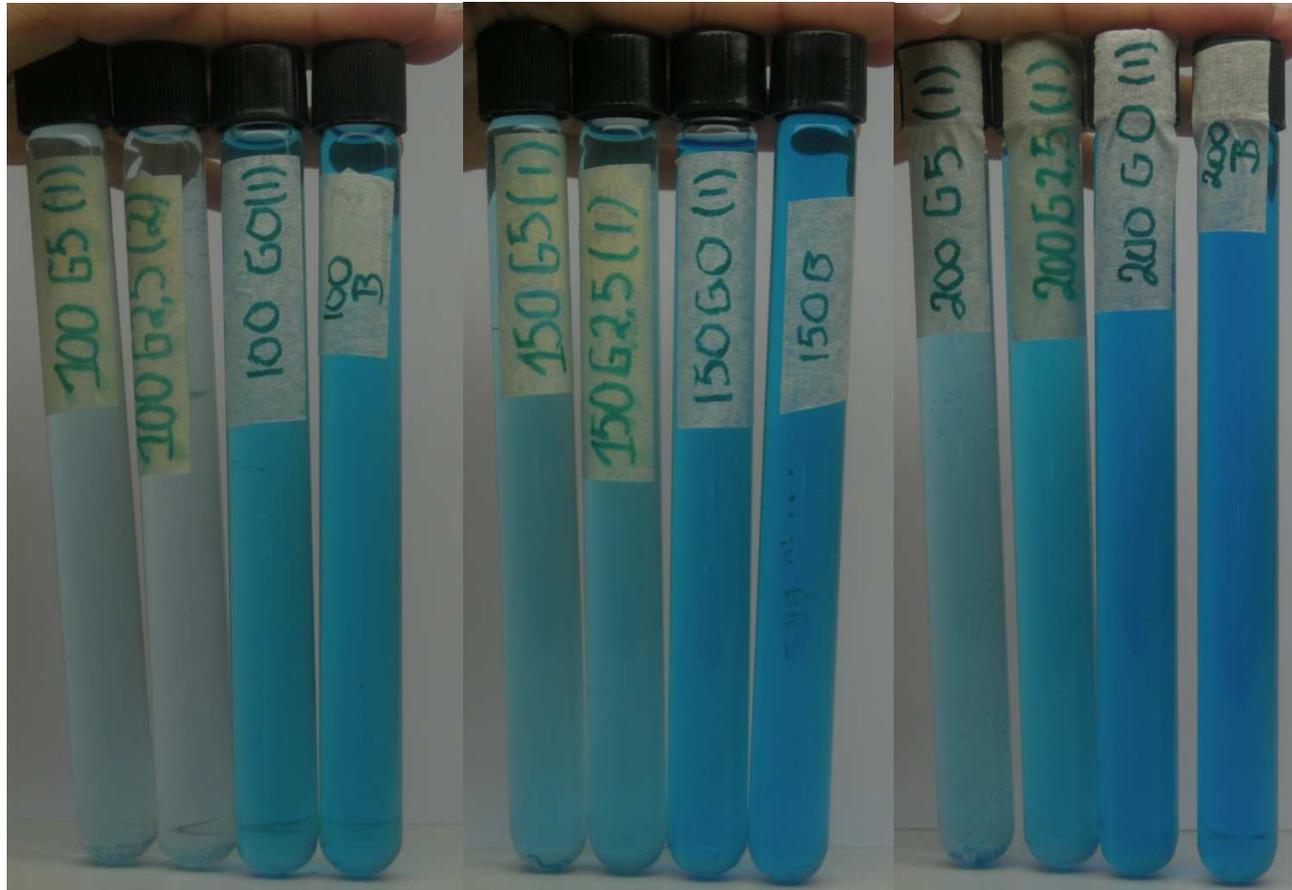
68. Stolz, A. (2001). Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56 , 69-80.
69. Supaka N, Juntongjin K, Damronglerd S, Delia M, Strehaiano P. (2004). Microbial decolorization of reactive azo dyes in a sequential anaerobic-aerobic system. *Chemical Engineering Journal* 99 , 169-176.
70. Takahashi N, Kumagai T, Shimizu M, Suzuki T y Ohtsuki T. (2007). Removal of Dissolved Organic Carbon and Color from Dyeing Wastewater by Pre-Ozonation and Subsequent Biological Treatment Using Test-Scale Plant. *Ozone: Science and Engineering*, 29: 139–145.
71. Talarposhti. A, Donnelly. T, Aderson. G. (2001). Colour removal from a simulated dye wastewater using a two-phase anaerobic packed bed reactor. *Water Res.* , 35, 425-432.
72. Universidad Cooperativa de Colombia (UCC). 2009. Agua: conflicto geopolítico [en línea], Colombia. 2009. Disponible en la web: [www.lafogata.org/06planeta/planeta7/pla\\_9-6.htm](http://www.lafogata.org/06planeta/planeta7/pla_9-6.htm)
73. Umbuzeiro, G.A., Freeman, H., Warren, S.H., Oliveira, D.P., Terao, Y., Watanabe, T., Claxton, L.D. . (2005). The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Crisais River. *Chemosphere* 60 , 55-64.
74. Vaca, M. (13 de Septiembre de 2009). Industria del Jean afecta al río Patate. *El Telégrafo* , pág. 21.

75. Velasco, A. y Carvajal, P. 2005. Consumo de agua y materias primas en el sector industrial. *Centro Ecuatoriano de Producción más limpia*, 5.
76. Salas, G. (2003). Tratamiento físico químico de las aguas residuales de la industria textil. *Perú Química* , 5: 73-80.
77. Stolz A. 2001. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 56, 69-80.
78. Supaka, N., Juntongjin, K., Damronglerd, M., Strehaiano, P. (2004). Microbial decolorization of reactive azo dyes in a sequential anaerobic-aerobic system. *Chemical Engineering Journal* 99: 169-176
79. Witt, C. (23 de Agosto de 2008). 5% de industrias cumple con normas ambientales . *El Telégrafo* , pág. 13.
80. Wuhrmann, K., Mechsner, K., and Kappeler, T. (1980). "Investigation on rate-determining factors in the microbial reduction of azo dyes." *European. Journal Applied Microbiology and. Biotechnology.*, 9(4), 325–338.
81. Yoo E, Libra J y Adrian L. (2001). Mechanism of decolorization of azo dyes in anaerobic mixed culture. *Journal of Enviromental Engineering* , 844-849.

## ANEXO A

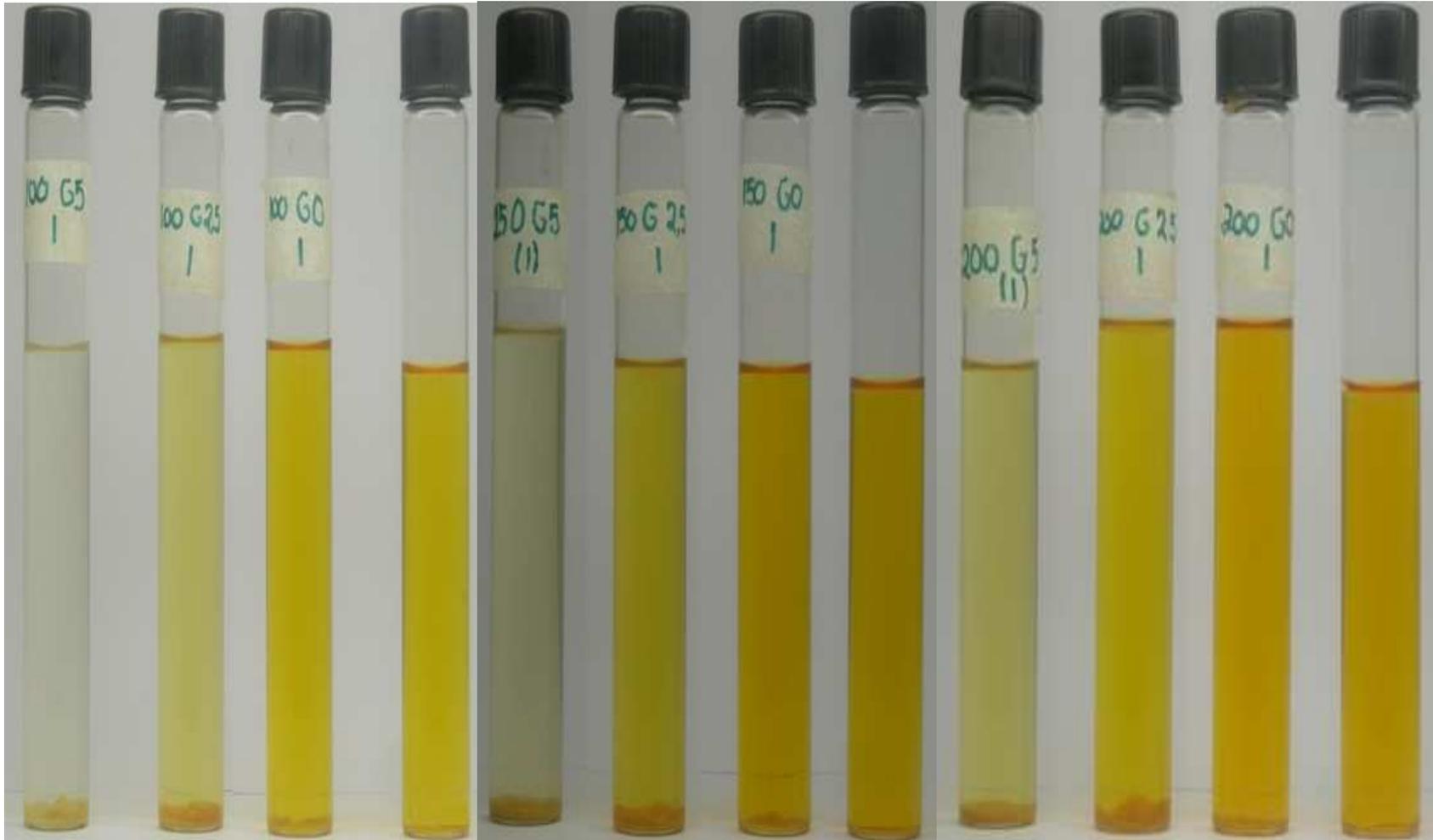
Remoción de color por parte del inóculo seleccionado en diferentes concentraciones de color y glucosa.

AZUL NAVY 171:



## ANEXO B

AMARILLO 84:



## ANEXO C

ROJO 141:



100 mg/L colorante 5g/L Glucosa 150 mg/L colorante 5g/L Glucosa

