

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**OBTENCIÓN DE UN INÓCULO BACTERIANO,
PROVENIENTE DE SUELO CONTAMINADO POR AGUA
RESIDUAL TEXTIL, CAPAZ DE DEGRADAR
COLORANTES TEXTILES REACTIVOS EN
CONDICIONES AEROBIAS A ESCALA DE
LABORATORIO**

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ELABORADO POR:

DIANA KARINA AYALA MUÑOZ

SANGOLQUÍ, 29 de Enero de 2010

HOJA DE LEGALIZACION DE FIRMAS

ELABORADO POR

DIANA KARINA AYALA MUÑOZ

COORDINADOR DE LA CARRERA

Ing. RAFAEL VARGAS

SECRETARIO ACADÉMICO

Dr. Miguel Ramírez

Lugar y fecha : _____

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. DIANA KARINA AYALA MUÑOZ como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA.

Fecha

ALMA KOCH M.Sc.

MARÍA SOLEDAD BENÍTEZ PhD.

DEDICATORIA

Al único ser que me ha hecho sentir completamente que soy la niña de sus ojos, Dios.

Diana Karina Ayala Muñoz

AGRADECIMIENTO

A la Escuela Politécnica del Ejército por haber financiado el desarrollo de la tesis.

A mis padres por enseñarme a luchar por mis sueños, acompañarme en los malos y buenos momentos, alentarme y disfrutar conmigo mis logros, preocuparse por mi bienestar espiritual y físico, sacrificarse conmigo y sobretodo les agradezco por orar por mí.

A mi directora de tesis, Alma Koch, por brindarme su confianza, ánimos, apoyo y amistad incondicional, por desafiarme día a día y aportar con su conocimiento en la realización de la tesis.

A mi codirectora de tesis, María Soledad Benítez, por compartir su amplio conocimiento conmigo, permitirme aprender de su experiencia y aconsejarme acertadamente.

A mis hermanos por su preocupación y oración diaria y por ser mis ejemplos a seguir.

A mi amiga y colega, Irina, por darme un ejemplo de dedicación y superación a pesar de los problemas, por su apoyo incondicional, por compartir conmigo el día a día y especialmente por brindarme su sonrisa aún en los momento más difíciles.

A mi Cris por apoyarme y presionarme cada segundo durante la realización de la tesis, inspirarme con su ejemplo, escucharme, entenderme y darme seguridad, tranquilidad, alegría y mucho amor.

A mi amigo Daniel por ser un apoyo continuo e incondicional sobretodo en los momentos de mayor estrés.

A todos los que se preocuparon por mí, me animaron y sonrieron conmigo.

Diana Karina Ayala Muñoz

Índice de Contenidos

Hoja de Legalización de Proyecto.....	ii
Hoja de Certificación del Director y Codirector.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimiento.....	v
Índice de Contenidos.....	vi
Listado de Tablas.....	ix
Listado de Cuadros.....	xi
Listado de Figuras.....	xii
Listado de Anexos.....	xv
Resumen.....	xviii
Abstract.....	xix
CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Formulación del problema.....	1
1.2 Justificación del problema.....	1
1.3 Objetivos de la investigación.....	3
1.3.1 Objetivo general.....	3
1.3.2 Objetivos específicos.....	3
1.4 Marco teórico.....	4
1.4.1 Contaminación ambiental por la industria textil.....	4
1.4.2 Colorante, principal contaminante del agua residual textil.....	7
1.4.2.1 Características de colorantes utilizados en la industria textil.....	7
1.4.2.2 Colorantes reactivos tipo azo.....	8
1.4.3 Tratamientos físico-químicos de efluentes residuales con colorantes textiles.....	11
1.4.4 Tratamientos Biológicos de efluentes residuales con colorantes textiles tipo azo.....	11
1.4.4.1 Remoción de colorantes reactivos tipo azo por acción bacteriana en condiciones aerobias.....	12
1.5 Sistema de hipótesis.....	17

CAPÍTULO 2.....	18
MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
2.1 Participantes.....	18
2.2 Zona de Estudio.....	18
2.3 Período de tiempo de investigación.....	18
2.4 Diseño Experimental:.....	18
2.4.1 Selección inicial del Inóculo Bacteriano.....	18
2.4.2 Determinación de la acción bacteriana en la remoción de tres colorantes reactivos.....	19
2.5 Procedimientos.....	21
2.5.1 Selección de los Colorantes Textiles Utilizados.....	21
2.5.2 Preparación del Medio de Cultivo.....	21
2.5.3 Determinación de la Remoción de Color por Espectrofotometría.....	22
2.5.4 Muestreo.....	23
2.5.5 Medición de pH en muestras de suelo.....	25
2.5.6 Conteo Bacteriano por Siembra Profunda.....	25
2.5.7 Selección inicial del inóculo bacteriano compuesto de las muestras de suelo.....	26
2.5.8 Determinación de la influencia del pH en la remoción de color del medio.....	27
2.5.9 Activación y preservación del inóculo bacteriano compuesto seleccionado.....	27
2.5.10 Análisis de la acción del inóculo bacteriano compuesto seleccionado en medios de cultivo con los colorantes por separado a diferentes concentraciones.....	28
2.6 Análisis de Datos.....	29
2.6.1 Selección inicial de inóculo bacteriano compuesto.....	29
2.6.2 Capacidad del inóculo bacteriano compuesto seleccionado para remover tres concentraciones de cada colorante en estudio por separado, con y sin glucosa.....	29
CAPÍTULO 3.....	30
RESULTADOS.....	30
3.1 Selección inicial del inóculo bacteriano compuesto.....	30
3.1.1.1 Determinación de la acción bacteriana en la remoción de color obtenida.....	34
3.2 Activación y preservación del inóculo bacteriano compuesto.....	36
3.3 Remoción de tres colorantes reactivos textiles por el inóculo bacteriano compuesto seleccionado.....	37
3.3.1 Remoción de colorante Azul Reactivo Navy 171.....	37

3.3.1.1 Determinación de la acción bacteriana en la remoción de Azul Navy 171	39
3.3.2 Remoción de colorante Amarillo Reactivo 84.....	43
3.3.2.1 Determinación de la acción bacteriana en la remoción de Amarillo Reactivo 84	45
3.3.3 Remoción de colorante Rojo Reactivo 141	49
CAPÍTULO 4.....	55
DISCUSIÓN	55
4.1 Importancia del muestreo en la selección del inóculo bacteriano compuesto	55
4.2 Inóculo bacteriano compuesto, un cultivo mixto.....	56
4.3 Eficiencia del inóculo bacteriano compuesto en la remoción de colorantes	57
4.4 Posible mecanismo de remoción de color por acción del inóculo bacteriano compuesto	58
4.5 Factores que afectan la remoción de color por acción bacteriana	60
4.5.1 Efecto de la concentración bacteriana en la remoción de color.....	60
4.5.2 Efecto de las condiciones aerobias en la remoción de color.....	60
4.5.3 Efecto de la adición de una fuente alterna de carbono en la remoción de color....	61
4.5.4 Efecto del pH del medio en la remoción de color.....	62
CAPÍTULO 5.....	63
CONCLUSIONES	63
CAPÍTULO 6.....	65
RECOMENDACIONES.....	65
CAPÍTULO 7.....	66
BIBLIOGRAFÍA	66
ANEXOS	74

Listado de Tablas

Tabla 2.3 Longitudes de onda y utilizadas para medir absorbancias de los medios de cultivo con los tres colorantes en estudio (Modificado de Ferramola <i>et al.</i> , 2009).....	22
Tabla 2.1. Descripción de los tratamientos del diseño experimental dispuesto para la selección inicial del inóculo bacteriano compuesto con sus respectivos unidades experimentales, controles y número de repeticiones.	19
Tabla 2.2 Descripción de los tratamientos del diseño experimental dispuesto para la determinación de la acción bacteriana en la remoción de colorantes con sus respectivos unidades experimentales, controles y número de repeticiones.	20
Tabla 3.1 pH de las cuatro muestras colectadas de suelo contaminado por agua residual textil.	30
Tabla 3.2 Conteo de la población bacteriana de los cultivos enriquecidos de las muestras de suelo contaminado por agua residual textil.....	31
Tabla 3.3 Porcentaje de pérdida o ganancia de color en el medio de cultivo con mezcla de 40 mg/L de tres colorantes reactivos debido a cambios de pH. Los valores negativos correspondientes al porcentaje de pérdida de color en el medio de cultivo establecen una ganancia de coloración del medio y los valores positivos indican una pérdida de color.	35
Tabla 3.4 Subconjuntos homogéneos que representan a los porcentajes de remoción de color obtenidos por concentración de colorante Azul Navy 171 en medios con 5 g/L de glucosa (n=3).	37
Tabla 3.5 Subconjuntos homogéneos que representan a los porcentajes de remoción de color obtenidos por concentración de colorante Azul Navy 171 en medios con 0 g/L de glucosa (n=3).	39

Tabla 3.6 Porcentaje de pérdida de Color Azul Navy 171 por variación de pH del medio de cultivo con diferentes concentraciones de colorante y glucosa. Valores negativos: ganancia de coloración del medio.....	42
Tabla 3.7 Subconjuntos homogéneos que representan a los porcentajes de remoción de color obtenidos por concentración de Amarillo Reactivo 84 en medios con 5 g/L de glucosa (n=3).	43
Figura 3.11 Remoción de color obtenido en los medios de cultivo con colorante Amarillo Reactivo 84 en función del tiempo de incubación con el inóculo bacteriano compuesto en agitación a 35°C. Las curvas de color azul corresponden al ensayo con 5 g/L de Glucosa y las curvas de color rojo al ensayo con 0 g/L de Glucosa.	44
Tabla 3.8 Subconjuntos homogéneos que representan a los porcentajes de remoción de color obtenidos por concentración de Amarillo Reactivo 84 en medios de cultivo sin glucosa. Los valores negativos indican una intensificación del color en el medio de cultivo (n=3).	44
Tabla 3.9 Porcentaje de Pérdida de Color Amarillo Reactivo 84 debida al cambio de pH en el medio de cultivo bacteriano. Valor Negativo: Ganancia de Color.	48
Tabla 3.10 Subconjuntos homogéneos que representan a los porcentajes de remoción de color obtenidos por concentración de Rojo Reactivo 141 en medios con 5 g/L de glucosa (n=3).	49
Tabla 3.11 Subconjuntos homogéneos que representan a los porcentajes de remoción de color obtenidos por concentración de Rojo Reactivo 84 en medios con 0 g/L de glucosa (n=3).	50
Tabla 3.12 Porcentaje de pérdida de color Rojo Reactivo 141 debida al cambio de pH en el medio. Valor Negativo: Ganancia de Color.....	54

Listado de Cuadros

Cuadro 1.1 Valores de DBO, DQO, Sólidos Suspendidos (SS) y Caudal que presentan las descargas producidas por las Industrias Textiles en el Sector el Inca en comparación con otras industrias y con los límites permisibles para el sector textil (Da Ross, 1995).. 5

Cuadro 1.2 DQO, DBO y Caudal que aporta cada proceso textil en comparación con los límites permisibles para el sector textil dispuestos por la Dirección Metropolitana Ambiental de Quito (Santos et al., 2007 (b))..... 6

Cuadro 2.1 Información de los colorantes utilizados para el estudio (JAGSON COLORCHEM LIMITED, 2009)..... 21

Listado de Figuras

Figura 1.1 Estructura Química de algunos colorantes azo con uno o más grupos azo y sus diferentes sustituyentes (Tan, 2001).....	9
Figura 1.2 Compuestos tóxicos producto de la degradación de colorantes azo (Tan, 2001).....	9
Figura 1.3 Estructura química de los colorante azo: a) Amarillo Reactivo 84 (Cserhádi, 2007). b) Azul Reactivo Navy 171 (Yuen <i>et al.</i> , 2005). c) Rojo Reactivo 141 (Vinitnantharat <i>et al.</i> , 2004).....	10
Figura 1.4 Reducción Aerobia del Colorante tipo azo Metil Rojo (Suzuki <i>et al.</i> , 2001).	14
Figura 2.1 Esquema de las zonas donde se colectó las muestras del suelo contaminado por agua residual textil.....	23
Figura 2.2 Zonas de colección de muestras de suelo contaminado por agua residual textil. Muestreos puntuales. a) Zona 1: Canal de tierra de paso de distribución de agua residual textil tratada físicamente. b) Zona 2: Carrizales utilizados como tratamiento biológico para el agua residual textil de la Empresa Sintofil S.A. c) Zona 3, junto a la zona lateral derecha del carrizal. d) Zona 4, a 20 metros de la parte inicial derecha del carrizal.	24
Figura 3.1 Comparación entre muestras de porcentajes de la remoción de color obtenidos por cada inóculo bacteriano compuesto en el medio de cultivo líquido con mezcla de tres colorantes reactivos azo después de siete días de incubación a 35°C y agitación manual cada 24 horas (n=3).	31
Figura 3.2 Curvas de Absorbancia a 510 nm en función del tiempo de incubación de los medios de cultivo con mezcla de colorantes inoculados con a) Inóculo Muestra de Suelo	

1, b) Inóculo Muestra de Suelo 3, c) Inóculo Muestra de Suelo 2, d) Inóculo Muestra de Suelo 4 después de 7 días de incubación.	32
Figura 3.3 Cambio de Color del medio de cultivo por acción de cada inóculo bacteriano compuesto (muestras 1-4 comparada con su respectivo control (C)) después de 10 días de incubación.	33
Figura 3.4 Remoción de Color y Crecimiento Bacteriano de los inóculos de las muestras 1 y 3 en función del tiempo de incubación en el medio de cultivo con mezcla de colorantes.	34
Figura 3.5 Crecimiento Bacteriano (azul) del inóculo muestra 3 y pH del medio inoculado (rojo) versus el Porcentaje de Remoción de color obtenido en el medio.	35
Figura 3.6 Crecimiento bacteriano del inóculo de la muestra 3 conservado en un medio salino con glucosa sin colorantes a 35°C y 45 rpm de agitación continua.	36
Figura 3.7 Remoción de color obtenido en los medios de cultivo con colorante Azul Navy 171 en función del tiempo de incubación con el inóculo bacteriano compuesto en agitación a 35°C. Las curvas de color azul corresponden al ensayo con 5g/L de Glucosa y las curvas de color rojo al ensayo con 0 g/L de Glucosa.	38
Figura 3.8 Remoción de Color Azul Navy 171 obtenida por acción bacteriana luego de 14 días de incubación en agitación de 45 rpm y 35°C. En la gráfica se muestra las 3 concentraciones del colorante en estudio (40, 70, 100 mg/L) con sus respectivos controles (C).	39
Figura 3.9 Crecimiento bacteriano y porcentaje de remoción del colorante Azul Navy 171 en medios de cultivo con 5 g/L de glucosa en función del tiempo de incubación. a) Medios con 40 mg/L de colorante. b) Medios con 70 mg/L de colorantes. c) Medios con 100 mg/L de colorante.	40

Figura 3.10 Crecimiento del inóculo bacteriano compuesto y variación del pH del medio de cultivo con 5g/L de glucosa en función del porcentaje de remoción de color Azul Navy 171 logrado a lo largo del tiempo de incubación (14 días).....	41
Figura 3.12 Remoción de color Amarillo reactivo 84 obtenida por acción bacteriana luego de 18 días de incubación a 35°C y 45 rpm. En la gráfica se muestra las tres concentraciones del colorante en estudio (40, 70, 100 mg/L) con sus respectivos controles (C).	45
Figura 3.13 Crecimiento bacteriano y porcentaje de remoción del colorante Amarillo Reactivo 84 en medios de cultivo con 5 g/L de glucosa en función del tiempo de incubación. a) Medios con 40 mg/L de colorante. b) Medios con 70 mg/L de colorantes. c) Medios con 100 mg/L de colorante.	46
Figura 3.14 Crecimiento del inóculo bacteriano compuesto y variación del pH del medio de cultivo con 5 g/L de glucosa en función del porcentaje de remoción de color Amarillo Reactivo 84 durante 16 días de incubación.....	47
Figura 3.15 Remoción de color obtenido en los medios de cultivo con colorante Rojo Reactivo 141 en función del tiempo de incubación con el inóculo bacteriano compuesto en agitación a 35°C. Las curvas de color azul corresponden al ensayo con 5 g/L de glucosa y las curvas de color rojo corresponden al ensayo con 0 g/L de glucosa.	50
Figura 3.16 Diferencia en la coloración de los medios de cultivo con colorante Rojo Reactivo 141 en ausencia y presencia de glucosa después de 14 días de incubación a 35°C y 45 rpm de agitación. a) Medios con 40 mg/L de colorante, b) Medios con 70 mg/L de colorante, c) Medios con 100 mg/L de colorante.....	51
Figura 3.17 Crecimiento bacteriano y porcentaje de remoción del colorante Rojo Reactivo 141 en medios de cultivo con 5 g/L de glucosa en función del tiempo de incubación. a) Medios con 40 mg/L de colorante. b) Medios con 70 mg/L de colorantes. c) Medios con 100 mg/L de colorante.	52

Figura 3.18 Crecimiento del inóculo bacteriano compuesto y variación del pH del medio de cultivo con 5 g/L de glucosa en función del porcentaje de remoción de color Rojo Reactivo 141 durante 22 días de incubación.	53
--	----

Listado de Anexos

ANEXO A Porcentajes de Remoción de color obtenidos por cada inóculo bacteriano correspondiente a una muestra de suelo con sus respectivas repeticiones medidas cada 24 horas a partir del cuarto día de incubación para la selección inicial del inóculo bacteriano.....	74
--	----

ANEXO B Análisis de Varianza de los datos obtenidos al medir el porcentaje de remoción de color en cada medio de cultivo con mezcla de colorantes para la selección inicial del inóculo bacteriano.....	74
---	----

ANEXO C Datos de la Absorbancia (abs), Crecimiento bacteriano (UFC/ml), pH del medio y Porcentaje de Remoción de Color (%) de los dos mejores inóculos bacterianos seleccionados.....	75
---	----

ANEXO D Datos utilizados para realizar la curva de crecimiento del inóculo de la muestra 3 en medio de cultivo utilizado para la Activación del Inóculo.....	75
--	----

ANEXO E Porcentajes de Remoción de Color (Azul Navy 171) obtenidos por el inóculo bacteriano cada 48 horas después de la inoculación inicial con 5g/l de glucosa.	76
--	----

ANEXO F Análisis de Varianza realizado para los porcentajes de remoción de color (Azul Navy 171) obtenidos por el inóculo bacteriano cada 48 horas después de la inoculación inicial con 5g/l de glucosa.....	76
---	----

ANEXO G Porcentajes de Remoción de Color (Azul Navy 171) obtenidos por el inóculo bacteriano cada 48 horas después de la inoculación inicial con 0g/l de glucosa.	77
--	----

ANEXO H Análisis de Varianza realizado para los porcentajes de remoción de color (Azul Navy 171) obtenidos por el inóculo bacteriano cada 48 horas después de la inoculación inicial con 0g/l de glucosa.....	77
ANEXO I Porcentajes de Remoción de Color (Amarillo Reactivo 84) obtenidos por el inóculo bacteriano cada 48 horas después de la inoculación inicial con 5g/l de glucosa.	78
ANEXO J Análisis de Varianza realizado para los porcentajes de remoción de color (Amarillo Reactivo 84) obtenidos por el inóculo bacteriano cada 48 horas después de la inoculación inicial con 5g/l de glucosa.....	78
ANEXO K Porcentajes de Remoción de Color (Amarillo Reactivo 84) obtenidos por el inóculo bacteriano cada 48 horas después de la inoculación inicial con 0g/l de glucosa.	79
ANEXO L Análisis de Varianza realizado para los porcentajes de remoción de color (Amarillo Reactivo 84) obtenidos por el inóculo bacteriano cada 48 horas después de la inoculación inicial con 0g/l de glucosa.....	79
ANEXO M Porcentajes de Remoción de Color (Rojo Reactivo 141) obtenidos por el inóculo bacteriano cada 48 horas después de la inoculación inicial con 5g/l de glucosa.	80
ANEXO N Análisis de Varianza realizado para los porcentajes de remoción de color (Rojo Reactivo 141) obtenidos por el inóculo bacteriano cada 48 horas después de la inoculación inicial con 5g/l de glucosa.....	80
ANEXO O Porcentajes de Remoción de Color (Rojo Reactivo 141) obtenidos por el inóculo bacteriano cada 48 horas después de la inoculación inicial con 0g/l de glucosa.	81

ANEXO P Análisis de Varianza realizado para los porcentajes de remoción de color (Rojo Reactivo 141) obtenidos por el inóculo bacteriano cada 48 horas después de la inoculación inicial con 0g/l de glucosa.....	81
ANEXO Q Datos obtenidos del diseño experimental dispuesto para las muestras con colorante azul navy 171. Todos los valores presentados corresponden a los promedios de los datos obtenidos en las repeticiones de cada ensayo.	82
ANEXO R Datos obtenidos del diseño experimental dispuesto para las muestras con colorante amarillo 84. Todos los valores presentados corresponden a los promedios de los datos obtenidos en las repeticiones de cada ensayo.	83
ANEXO S Datos obtenidos del diseño experimental dispuesto para las muestras con colorante rojo reactivo 141. Todos los valores presentados corresponden a los promedios de los datos obtenidos en las repeticiones de cada ensayo.	85

Resumen

En este estudio se obtuvo un inóculo bacteriano compuesto capaz de remover tres colorantes reactivos (Azul Navy 171, Amarillo 84 y Rojo 141), en conjunto y por separado, de un medio de cultivo líquido sintético bajo condiciones aerobias. El cultivo bacteriano compuesto se obtuvo de muestras de suelo contaminado por agua residual textil. La remoción de color del medio de cultivo fue determinada por espectrofotometría a diferentes longitudes de onda para cada colorante disuelto en el medio de cultivo (Amarillo 84: 410nm, Azul Navy 171: 620nm, Rojo 141: 530nm y mezcla de los tres colorantes: 510nm) y el crecimiento bacteriano en los medios de cultivo se determinó por siembra profunda. El inóculo bacteriano compuesto removió el 95% del color producto de la mezcla de los tres colorantes disueltos en el medio de cultivo sintético en 5 días de incubación y con agitación manual cada 24 horas. Este inóculo fue activado y preservado en su estado estacionario de crecimiento en medio de cultivo mínimo salino y 5 g/L de glucosa para ser utilizado posteriormente. El inóculo bacteriano compuesto removió 83 – 95% de los tres colorantes por separado en diferentes concentraciones (40, 70 y 100 mg/L) en un periodo de 8 – 22 días de incubación en condiciones de agitación continua dependiendo del colorante y su concentración. La remoción de color observada en los medios de cultivo tanto con los colorantes en conjunto como por separado se dio en presencia de 5g/L de glucosa. La acidificación del medio durante el periodo de incubación no influyó en la remoción de color lograda por el inóculo bacteriano en el medio. La obtención del inóculo

bacteriano compuesto capaz de remover los tres colorantes en estudio en condiciones aerobias puede ser aplicado en la bioremediación aerobia de efluentes textiles, caracterizados por tener 20-50% de colorantes reactivos con grupos azo (-N=N-), considerados compuestos tóxicos, mutagénicos y carcinogénicos al igual que sus productos de degradación.

Abstract

In this research, a compound bacterial inoculum able to remove three azo reactive dyes (Blue Navy 171, Yellow 84 and Red 141) from a synthetic liquid culture medium under aerobic conditions was obtained. The inoculum was isolated from soil contaminated by textile wastewater. Color removal from the liquid medium was determined by spectrophotometry in different wavelengths for each dye (Yellow 84: 410nm, Blue Navy 171: 620nm, Red 141: 530nm and the three dye mix: 510nm) and bacterial growth was determined by the pour plate method. The inoculum removed 95% of color in liquid media containing three dyes in five days of incubation and manual agitation every 24 hours. This inoculum was activated and preserved in stationary phase in a minimum saline liquid medium with 5g/L of glucose. The compound bacterial inoculum removed from 83% to 95% of each of the three dyes at different concentrations (40, 70 y 100 mg/L) in 8-22 incubation days with constant agitation depending on the dye and its concentration. The color removal was obtained in liquid media amended with 5g/L of glucose. The culture medium acidification did not influence color removal. Reactive azo dyes, such as the ones used in this work, are toxic, mutagenic and carcinogenic. Textile wastewater has a concentration of 20-50% of this kind of dyes. Therefore, this compound bacterial inoculum could be useful in an aerobic textile wastewater bioremediation process.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

El alto consumo de agua para los procesos aplicados en industrias textiles es directamente proporcional a la generación de agua residual de tipo textil, el cual constituye uno de los efluentes más contaminados y difíciles de manejar ambientalmente (Mansilla *et al.*, 2001).

Uno de los principales contaminantes presentes en el agua residual textil es la alta concentración de colorantes, la mayoría de los cuales son recalcitrantes a la degradación natural, altamente tóxicos, cancerígenos y mutagénicos e impiden la fotosíntesis y la fijación de nitrógeno (Haig, 2001) y (Mansilla *et al.*, 2001). Por estas razones, es necesario aplicar tratamientos de remediación que sean beneficiosos para el medio ambiente.

La biodegradación de los colorantes en condiciones aerobias es una opción para su tratamiento y para su aplicación es necesario aislar un inóculo bacteriano compuesto que en condiciones aerobias sea capaz de remover los colorantes eficientemente para su posterior aplicación en el tratamiento industrial de aguas residuales textiles.

1.2 Justificación del problema

La industria textil a nivel mundial genera millones de litros de agua residual altamente contaminada. En Ecuador, de acuerdo al Centro Ecuatoriano de Producción Más Limpia (CEPL), en el año 2005, la industria textil y cuero consumía un 60% del consumo total de agua en el sector industrial sur de Quito (Velasco *et al.*, 2005).

El consumo de agua por parte de las empresas dedicadas a la actividad textil varía dependiendo de la materia prima utilizada; es así que cuando se utiliza colorantes dispersos en el proceso de tinturación se requiere entre 100 y 150 litros de agua por

kilogramo de producto, o entre 125 y 170 litros de agua cuando se utiliza colorantes reactivos (Mansilla *et al.*, 2001).

Uno de los principales contaminantes de los efluentes textiles es la concentración de colorante evacuado que puede alcanzar inclusive 1000 mg/L en el cauce del agua (Khalid *et al.*, 2008) con lo cual se suprimen los procesos fotosintéticos afectando a la microbiota natural de ríos y sus alrededores (Mansilla *et al.*, 2001).

En los últimos años, la industria textil ha utilizado mayoritariamente colorantes reactivos en su producción por la afinidad de los mismos a fibras como la celulosa (Cegarra, 1980). Sin embargo, su uso no es el más recomendable por las implicaciones ambientales que conlleva, pues se consume mayor cantidad de agua, entre el 80-95% de los colorantes reactivos contiene el grupo azo (-N=N-) y alrededor del 20-50% del colorante reactivo utilizado es evacuado en el efluente textil (Mansilla *et al.*, 2001).

El grupo azo es difícil de degradar bajo condiciones ambientales normales y debido a esta estructura, los productos de la degradación de la molécula colorante pueden ser tóxicos, mutagénicos y/o carcinogénicos (Haig, 2001).

Las industrias nacionales e internacionales que utilizan colorantes usan una amplia variedad de colorantes diferentes estructuralmente en una sola operación en un corto periodo de tiempo, lo cual implica que este tipo de efluentes industriales sean extremadamente variables en composición (Oranusi *et al.*, 2005). Por esta razón, es necesario el desarrollo de un proceso biológico eficiente que tenga el potencial de degradar colorantes con diferentes grupos cromofóricos.

El tratamiento biológico de los colorantes es menos costoso, más beneficioso para el ambiente y ha demostrado mayor eficiencia y efectividad en la degradación de los colorantes textiles en comparación con los tratamientos químicos y físicos aplicados comúnmente (Khalid *et al.*, 2008) como la adsorción y precipitación, degradación química y fotodegradación (Mabrouk *et al.*, 2008).

Un potencial tratamiento de bioremediación para aguas residuales contaminadas por colorantes es la combinación de procesos aeróbicos y anaeróbicos (Coughlin *et al.*,

1999). Los microorganismos aerobios pueden oxidar los colorantes reducidos por reacciones de deaminación o hidroxilación y obtener productos menos tóxicos e inclusive una mineralización completa de los colorantes. Por lo tanto, el tratamiento biológico aerobio es un método seguro para la degradación de colorantes reactivos tipo azo (Mabrouk *et al.*, 2008). Bacterias como *Sphingomonas* sp 1CX (Coughlin *et al.*, 1999), *Bacillus* sp., *Pseudomonas stutzeris* (Itoh *et al.* 2002), *Proteus mirabilis* (Chen *et al.*, 1999), entre otras, son capaces de degradar colorantes bajo condiciones controladas de laboratorio.

La realización de este proyecto de tesis es uno de los primeros pasos para la aplicación del tratamiento biológico en la degradación de los colorantes a nivel industrial en el Ecuador. El inóculo bacteriano nativo capaz de remover colorantes reactivos tipo azo en condiciones aerobias controladas a escala de laboratorio ayudaría a remediar efluentes textiles altamente coloreados. Además, se contribuiría a la disminución de los impactos ambientales y desequilibrios en ecosistemas nacionales provocados por bacterias importadas utilizadas para la remediación de este tipo de efluentes.

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Obtener un inóculo bacteriano proveniente de muestras de suelo contaminado por agua residual textil que sea capaz de degradar eficientemente colorantes tipo reactivo bajo condiciones aerobias controladas de laboratorio para su aplicación en el tratamiento biológico de efluentes textiles.

1.3.2 Objetivos específicos

1. Colectar muestras de suelo que presentan gran contaminación de un efluente textil.
2. Seleccionar el mejor inóculo bacteriano aislado de las muestras de suelo colectadas que sea capaz de degradar colorantes en conjunto.
3. Activar el inóculo bacteriano seleccionado para obtener bacterias que sobrevivan en un medio mínimo salino en presencia de los colorantes por separado.

4. Evaluar la degradación bacteriana de los colorantes reactivos por separado mediante espectrofotometría.
5. Evaluar la influencia de una fuente alterna de carbono en la degradación bacteriana de los colorantes.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Contaminación ambiental por la industria textil

La contaminación ambiental, causada por una gran variedad de compuestos producidos por la industria, se ha constituido como uno de los mayores problemas para el ambiente. El manejo de la contaminación del agua es uno de los mayores retos a cumplir actualmente (Leena *et al.*, 2008). Desde el año 1989, la industria textil fue catalogada entre las diez principales actividades generadoras de desechos tóxicos líquidos que tiene como receptor final el medio acuífero (Yonni *et al.*, 2008).

La industria textil consume grandes volúmenes de agua (Santos *et al.*, 2007 (b)). Se estima que entre 125 a 170 mL de agua residual de tipo textil se produce por kilogramo de producto coloreado (Yonni *et al.*, 2008), el cual tiene alto contenido de sustancias orgánicas, es fuertemente coloreado, deficiente en nutrientes, con una baja carga microbiana, de naturaleza alcalina y presenta altas temperaturas.

Del diagnóstico realizado en Quito-Ecuador en el año 1995 sobre uno de los sectores industriales ubicado al norte de la ciudad, el Inca, se determinó que la industria de alimentos y bebidas es la que más produce aguas residuales seguida de la industria textil que produce 3655 m³ de aguas residuales al mes (Da Ros, 1995). Se estableció que la industria textil aportaba a la descarga total en este sector (Cuadro 1.1) con un 24% de Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO), 17% de Demanda Química de Oxígeno (DQO) y 47% de Sólidos en Suspensión (SS) en comparación con los aportes de las descargas de industrias de alimentos, gráficas, químicas y metálicas (Da Ros, 1995). Por lo que se establece que los efluentes de la industria textil aportan en porcentajes considerables a la contaminación ambiental de los receptores naturales como el Río Machángara.

Para el año 2005, la industria textil se constituyó como la actividad con mayor producción en Pichincha donde se producía un 66,2% de la producción nacional. Esto implicó mayor consumo de agua en comparación con lo descrito en el año 1995, se consumían 5460 m³ de agua mensualmente en Pichincha para la actividad textil en el 2005, con lo cual se aumentó la contaminación provocada por este tipo de efluente (Bermeo, 2005).

En el cuadro 1.1 se observa que los valores de DBO, DQO, Sólidos Suspendidos y Caudal de la industrias textiles sobrepasan los parámetros máximos permisibles dispuestos para la sector textil por el Distrito Metropolitano de Quito (Cuadro 1.1) lo que permite evaluar el grado de contaminación ambiental de este tipo de industrias.

Cuadro 1.1 Valores de DBO, DQO, Sólidos Suspendidos (SS) y Caudal que presentan las descargas producidas por las Industrias Textiles en el Sector el Inca en comparación con otras industrias y con los límites permisibles para el sector textil (Da Ross, 1995).

Industrias	DBO (mg/L)	DQO (mg/L)	SS (mg/L)	Caudal (m³/mes)
Alimentos	866	3711	170	15500
Textiles	1818	3626	849	3655
Gráficas	1650	4625	157	640
Químicas	2806	7862	556	416
Metálicas	380	1615	85	113
Límites máximos permisibles para el sector textil	(A) 240 (C) 123	(A) 120 (C) 70	(A) 95 (C) 53	140

(A): Alcantarillado, (C): Cauce natural

Para entender de mejor manera las razones por las cuales el efluente residual de tipo textil es uno de los mayores contaminantes del medio ambiente, es necesario conocer los procesos que se llevan a cabo en la industria textil.

El proceso textil más común consiste de cinco pasos esenciales: Desencolamiento, Desgrasamiento, Blanqueamiento, Mercerización y Tinturación. En el desencolamiento se remueve los agentes como almidón, alcohol polivinílico y carboximetil-celulosa añadidos previamente a la tela para fortalecer sus fibras. El

desgrasamiento remueve impurezas de la tela utilizando soluciones álcali (hidróxido de sodio) para fraccionar aceites naturales, grasa, cera y surfactantes, además, para emulsificar impurezas. En el blanqueamiento se remueve color no deseado de las fibras telares utilizando Hipoclorito de Sodio y Peróxido de Hidrógeno. La mercerización es un proceso químico continuo que incrementa la habilidad de la fibra para reaccionar con el colorante, se utiliza solución alcalina concentrada y solución ácida. Finalmente, el proceso de tinturación consiste en la adición de color a la fibra, este paso requiere de grandes volúmenes de agua y otros aditivos como metales, sales, surfactantes, sulfuros y formaldehído para proveer mayor adsorción del colorante a la fibra (Saltos *et al.*, 2007 (b)).

Cada uno de los procesos textiles descritos aporta en diferentes magnitudes a la DQO, DBO y caudal del efluente residual final de la industria (Cuadro 1.2). La DQO y caudal de los cinco procesos textiles sobrepasan los límites máximos permisibles a nivel ambiental lo que indica que cada proceso por separado genera efluentes que al ser unificados son altamente contaminantes.

Cuadro 1.2 DQO, DBO y Caudal que aporta cada proceso textil en comparación con los límites permisibles para el sector textil dispuestos por la Dirección Metropolitana Ambiental de Quito (Santos *et al.*, 2007 (b)).

PROCESO	DQO (g/L)	DBO (g/L)	Caudal (L/Kg)
Desencolamiento	4,6 – 5,9	1,7 – 5,2	3 – 9
Desgrasamiento	8,0	0,1 – 2,9	26 – 43
Blanqueamiento	6,7 – 13,5	0,1 – 1,7	3 – 124
Mercerización	1,6	0,05 – 0,1	232 – 308
Tinturación	1,1 – 4,6	0,01 – 1,8	8 - 300
Límites máximos permisibles para el sector textil	(A) 0,2 (C) 0,1	(A) 0,1 (C) 0,1	140

(A): Alcantarillado, (C): Cauce natural

El agua residual textil es difícil de tratar por su alta carga orgánica debida a la presencia de grasa, sólidos suspendidos, nutrientes de los aditivos para la tinte y colorantes residuales, tiene altas concentraciones de álcalis y ácidos, producto de su utilización en los procesos de blanqueado, desencolado, desgrasado, y mercerizado, por

lo que las aguas residuales textiles tienen elevados pH y contenidos altos de sales (Buitrón *et al.*, 2004). Dependiendo de la empresa textil se pueden utilizar hasta concentraciones de 1000 mg/L de colorante, cantidad de la cual se pierde hasta el 50% en el efluente residual, específicamente si el colorante utilizado es colorante reactivo (Khalid *et al.* 2008).

1.4.2 Colorante, principal contaminante del agua residual textil

La presencia de color en el agua puede ser resultado tanto de un fenómeno natural como la presencia de iones metálicos naturales, hierro y manganeso, o plancton, como de fenómenos artificiales entre los que principalmente está la descarga de pigmentos y colorantes (Saltos *et al.*, 2007 (b)). En los procesos de tintura, entre 10 y 90% del colorante no se fija a la fibra, lo cual implica que sea desechado en el agua residual (Oranusi, 2005), que puede tener colorantes en concentraciones desde 10-1000 mg/L, es decir altamente concentrados (Pandey, 2007).

Las descargas de efluentes con altas concentraciones de colorantes sintéticos pueden causar graves daños a los cuerpos de agua receptores como la inhibición de la fotosíntesis de las plantas acuáticas, el poder tóxico y carcinogénico de los colorantes y sus productos de degradación (Leena *et al.*, 2008), impiden la penetración de la luz, imposibilitan la actividad biológica y afectan aguas subterráneas por lixiviación del suelo. Además, reduce la germinación y crecimiento de cultivos e impide la fijación del nitrógeno. Colorantes como el rojo congo tiene efectos patológicos y fisiológicos en los seres humanos como un decremento de los eritrocitos y cantidad de hemoglobina en el humano, y otros colorantes pueden causar dermatitis alérgica, irritación de la piel, cáncer y mutaciones (Manikandan *et al.*, 2009).

1.4.2.1 Características de colorantes utilizados en la industria textil

Los colorantes sintéticos tienen una amplia aplicación en industrias de alimentos, farmacéuticas, textiles, curtiembre, cosméticos y papel por su producción, rapidez de reacción y variedad de colores en comparación con los colorantes naturales (Ozdemir *et al.*, 2007).

Los colorantes se componen de un grupo de átomos denominado cromóforo que es el responsable del color del colorante y sustituyentes donadores de electrones denominados auxocromos que intensifican el color del cromóforo. Los cromóforos más importantes son azo (-N=N-), carbonil (-C=O), nitro (-NO₂), entre otros. Entre los auxocromos están amina (-NH₃), carboxil (-COOH), sulfatos (-SO₃H) e Hidroxilo (-OH).

Los grupos sulfato le confieren una alta solubilidad en agua a los colorantes y los grupos azo están generalmente conectados a anillos de benceno y naftaleno, así como a heterociclos aromáticos y grupos alifáticos que son los responsables del color característico de cada colorante (Haig, 2001).

Se clasifican de acuerdo a su aplicación y estructura química. En base a su grupo auxócromo, los colorantes son reactivos, ácidos, directos, básicos, mordantes y dispersos (Saltos *et al.*, 2007 (b)) y en base a su grupo cromóforo son azo, antraquinónicos y triazolometanos (Manikandan *et al.*, 2009).

En general se estima que alrededor de 10000 diferentes clases de colorantes son usados a nivel industrial alrededor del mundo (Oranusi, 2005). Sin embargo, se estima que alrededor del 60-70% de colorantes utilizados industrialmente son tipo azo (-N=N-) (Manjinder *et al.*, 2008) por su facilidad de síntesis, bajo costo y versatilidad (Wong *et al.*, 1998).

1.4.2.2 Colorantes reactivos tipo azo

El presente estudio se enfoca en los colorantes reactivos azo debido a que entre el 20-50% de los colorantes reactivos usados en la industria textil se pierde en el efluente residual y alrededor del 80-95% de estos colorantes tienen el grupo azo en su estructura (Haig, 2001).

Los colorantes reactivos son de carácter aniónico, solubles en agua y forman fuertes enlaces químicos covalentes con las fibras garantizando a las coloraciones obtenidas una alta solidez (Cegarra, 1980; Melnikov *et al.*, 1982). Sin embargo, tienden a hidrolizarse fácilmente por la presencia tanto de OH⁻ del agua como por los OH⁻

provenientes de la alcalinidad del medio necesarios para su reacción con la celulosa, disminuyendo la afinidad del colorante a la tela (Cegarra, 1980).

Los colorantes reactivos azo se caracterizan por tener uno o más grupos azo ($\text{N}=\text{N}-$) que pueden ser sustituidos por grupos benzoicos o naftalénicos que a su vez pueden tener muchos otros sustituyentes (Figura 1.1) como ($-\text{Cl}$) Cloro, ($-\text{CH}_3$) metil, ($-\text{NO}_2$) nitro, ($-\text{OH}$) hidroxilo, ($-\text{COOH}$) carboxilo y ($-\text{SO}_3\text{H}$) ácido sulfónicos (Tan, 2001).

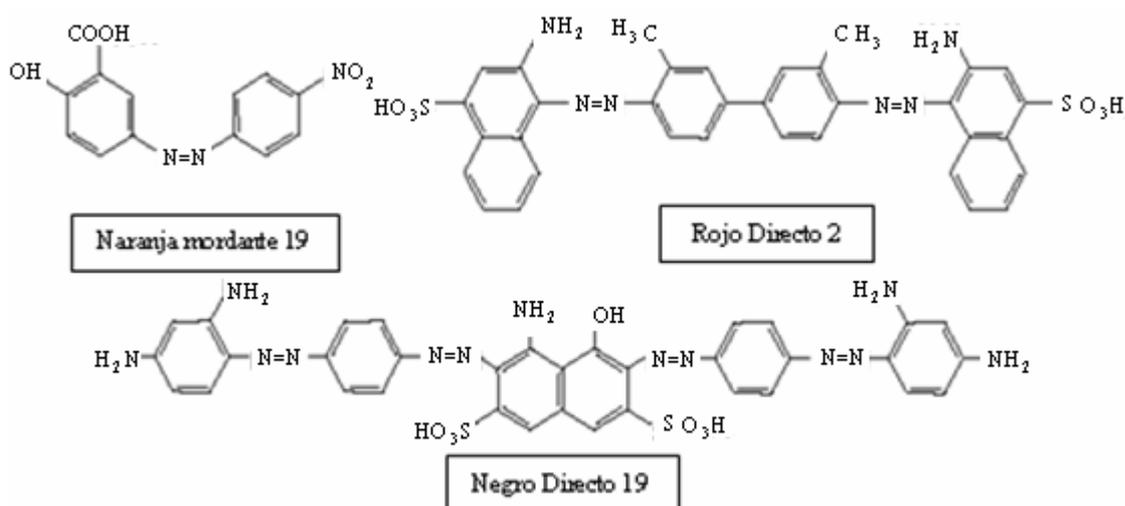


Figura 1.1 Estructura Química de algunos colorantes azo con uno o más grupos azo y sus diferentes sustituyentes (Tan, 2001).

Los colorantes tipo azo son compuestos xenobióticos (Manjinder *et al.*, 2008) cuya estabilidad les permite persistir por mucho tiempo en el ambiente sin alterarse (Leena *et al.*, 2008) y son generalmente recalcitrantes a la biodegradación (Khalid *et al.*, 2008). Además, sus productos de degradación son citotóxicos y carcinogénicos (Figura 1.2) como 1,4-fenilenediamina, 1-amino-2-naftol, y benzidina (Tan, 2001).

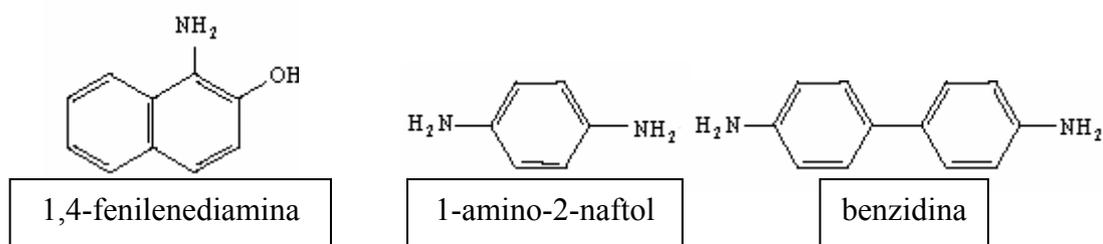


Figura 1.2 Compuestos tóxicos producto de la degradación de colorantes azo (Tan, 2001).

En este trabajo se utilizó tres colorantes reactivos tipo azo: Amarillo Reactivo 84, Azul Reactivo Navy 171 y Rojo Reactivo 141 (Figura 1.3). Los tres colorantes tienen dos fracciones reactivas conocidas como Grupo Monocloro Triazínico y son de alto peso molecular (Jagson ColorChem Limited, 2009).

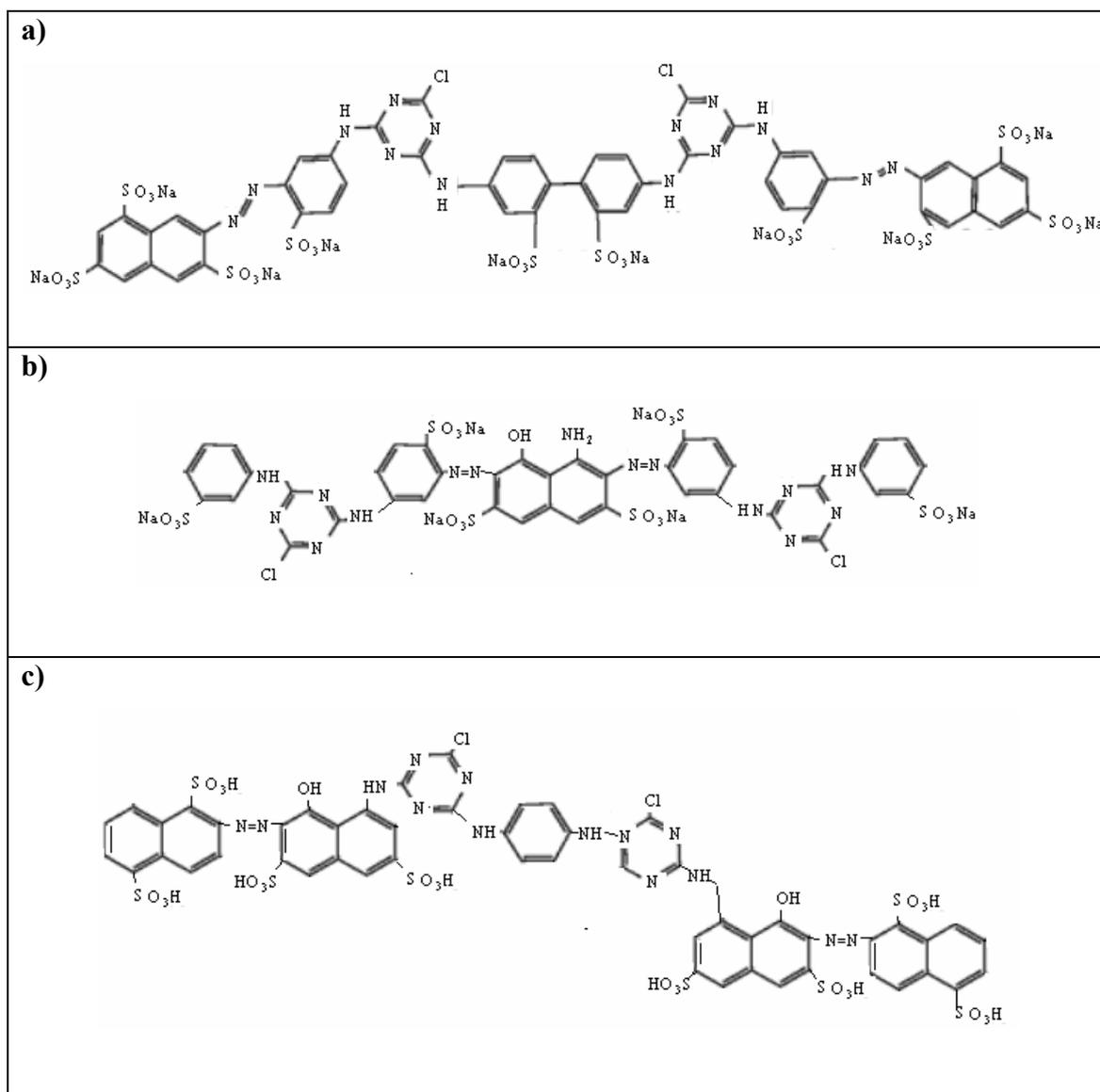


Figura 1.3 Estructura química de los colorante azo: a) Amarillo Reactivo 84 (Cserhádi, 2007). b) Azul Reactivo Navy 171 (Yuen *et al.*, 2005). c) Rojo Reactivo 141 (Vinitnantharat *et al.*, 2004)

1.4.3 Tratamientos físico-químicos de efluentes residuales con colorantes textiles

Los efluentes con altas concentraciones de color deben ser tratados antes de ser descargados en cauces naturales o suelo (Manikandan *et al.*, 2009). Sin embargo, los colorantes textiles son altamente reactivos y por esto es difícil su tratamiento (Raju *et al.*, 2007).

Se han aplicado una serie de tratamientos físico-químicos como la coagulación, floculación, ósmosis reversa, adsorción por carbón activado, adsorción con residuos industriales, arcilla, residuos agrícolas, gel polimérico, madera, entre otros. Métodos que no han demostrado alta efectividad y eficiencia en la remoción de color del efluente textil pues toman mucho tiempo, consumen grandes volúmenes de agua (Manikandan *et al.*, 2009), contribuyen a la formación de lodos concentrados que constituyen productos no disueltos de las aguas residuales y son un problema secundario a tratar (Elisangela *et al.*, 2009).

1.4.4 Tratamientos Biológicos de efluentes residuales con colorantes textiles tipo azo

Los microorganismos son conocidos por su papel crucial en la mineralización de compuestos orgánicos y la degradación de compuestos xenobióticos (Tan, 2001). Durante los últimos años se ha demostrado que una variedad de microorganismos son capaces de transformar colorantes azo en productos no coloreados e inclusive mineralizarlos bajo condiciones ambientales específicas (Blümel *et al.*, 2002).

Los compuestos aromáticos, como es el caso de los colorantes textiles reactivos azo, son susceptibles a la degradación biológica bajo condiciones aerobias y anaerobias (Santos *et al.*, 2007 (b)). Existen reportes de degradaciones biológicas aerobias por acción fúngica y bacteriana. Por ejemplo, hongos lignolíticos han demostrado capacidad para decolorar colorantes azo utilizando ligninasas, manganeso peroxidasas, o lacasas. Así mismo, bacterias del género *Flavobacterium* son conocidas por su capacidad de utilizar compuestos simples azo carboxilados como única fuente de carbono y cultivos

mixtos bacterianos se han utilizado para degradar compuestos azo complejos (Blümel *et al.*, 2002) y en menos tiempo que cultivos bacterianos puros (Manikandan *et al.*, 2009).

Dentro de los hongos con capacidad de degradar colorantes por medio de la acción de la lacasa están *Pleurotus ostreatus*, *Schizophyllum commune*, *Sclerotium rolfsii* y *Neurospora crassa*, *Phanerochaete chrysosporium* por medio de la enzima manganeso peroxidasa y *Bjerkandera adusta* con la enzima lignina peroxidasa. Sin embargo, se ha determinado que su largo ciclo de crecimiento y la complejidad del efluente textil son factores que limitan su desarrollo y por ende su efectividad en la degradación de colorantes (Raju, 2007).

La reducción bacteriana de los colorantes tipos azo es usualmente no específica y más rápida. En condiciones aerobias, se conoce la capacidad de degradación de los colorantes azo de *Xenophylus azovorans KF46F*, *Bacillus*, *Kerstersia sp. VKY1* y *Staphylococcus sp.* En condiciones anaerobias, *Sphingomonas xenophaga BN6*, *Eubacterium sp.*, *Clostridium sp.*, *Butyrivibrio sp.* y *Bacteroides sp.* son capaces de reducir el enlace azo (Blümel *et al.*, 2002).

Compuestos aromáticos como los colorantes reactivos tipo azo poseen estabilidad termodinámica, por lo cual resulta difícil su degradación. Las bacterias han desarrollado un sistema enzimático que degrada la estructura benzoica bajo condiciones aerobias y anóxicas (Pandey *et al.*, 2007).

1.4.4.1 Remoción de colorantes reactivos tipo azo por acción bacteriana en condiciones aerobias

La remoción por acción bacteriana se refiere a la reducción en la concentración de los colorantes por microorganismos mediante mecanismos de biodegradación y/o bioadsorción (Keung, 1997).

1.4.4.1.1 Biodegradación aerobia de colorantes reactivos tipo azo

La biodegradación es el proceso por el cual el colorante es convertido en su respectivo producto (Keung, 1997). La molécula de los colorantes reactivos tipo azo al

ser deficiente de electrones hace que éstos sean compuestos menos susceptibles al catabolismo oxidativo que realizan las bacterias, y como consecuencia, persisten bajo condiciones aerobias ambientales (Barragán *et al.*, 2007).

En la degradación aerobia de las aminas aromáticas, las enzimas mono y dioxigenasas catalizan la incorporación de oxígeno en el anillo aromático de compuestos orgánicos y posteriormente la ruptura del anillo pero los colorantes reactivos azo son recalcitrantes a la biodegradación aerobia debido a la resistencia del enlace azo al ataque de las oxigenasas o porque el oxígeno es un aceptor de electrones más efectivo (Barragán *et al.*, 2007; Pandey *et al.*, 2007).

El aislamiento de bacterias aerobias capaces de degradar colorantes textiles tipo azo es complicado por dos causas principales: el transporte limitado de los colorantes dentro de las células y la alta reactividad de muchos orto-aminohidroxiaromáticos formados después de la ruptura por reducción de los colorantes azo. Es posible que estos productos no puedan ser biodegradados por reacciones espontáneas de auto oxidación y sean tóxicos para las bacterias (Blümel *et al.*, 2002).

Determinados cultivos bacterianos aerobios han demostrado la capacidad de reducir el enlace azo por reacción enzimática (Tan, 2001). Overney en 1972 aisló una bacteria del género *Flavobacterium* capaz de crecer aeróbicamente en presencia del compuesto 4,4-dicarboxy-azobenceno. Trabajos posteriores (Blümel *et al.*, 2002) demostraron que inóculos bacterianos compuestos, como *Xenophilus azovorans* KF46 y *Pigmentiphaga kullae*, degradadores de 4,4-dicarboxy-azobenceno pueden ser adaptados a la degradación de otros compuestos azo como 1-(4-carboxyfenilazo)-2-naftol (carboxy-Naranja II) o 1-(4-carboxyfenilazo)-4-naftol (carboxy-Naranja I). Bacterias como *Acetobacter liquifaciens* y *Klebsiella pneumoniae* son capaces de degradar el colorante Metil Rojo a compuestos menos coloreados (Figura 1.4) como el ácido 2-aminobenzoico (ABA) y N,N'-dimetil-p-fenilendiamina (DMPD) bajo condiciones aerobias (Moutaouakkil *et al.*, 2003).

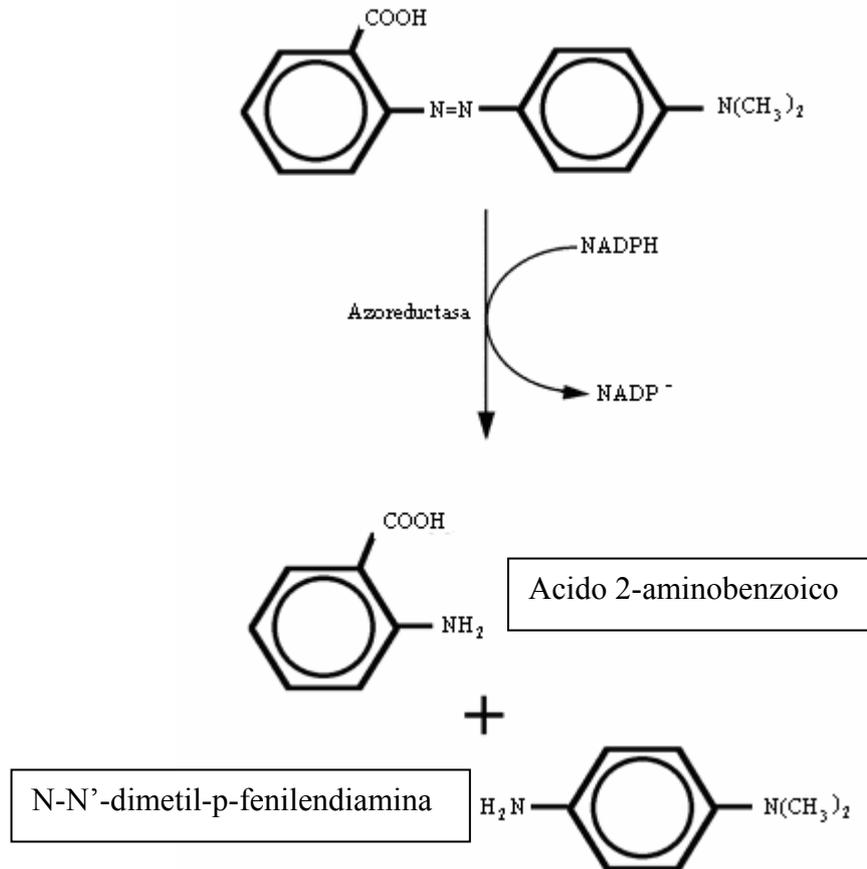


Figura 1.4 Reducción Aerobia del Colorante tipo azo Metil Rojo (Suzuki *et al.*, 2001).

El primer paso de la degradación bacteriana de colorantes reactivos azo es la reducción del enlace azo $-N=N-$, la cual puede ser mediada por enzimas, mediadores redox de bajo peso molecular, reducción química por reductores como sulfuros o la combinación de todos (Pandey *et al.*, 2007). Existen enzimas llamadas azo reductasas con las cuales algunas bacterias aerobias son capaces de reducir compuestos azo y producir aminas aromáticas, estas bacterias son conocidas como azo-reductasas oxígeno-tolerantes (Santos *et al.*, 2007 (b)). Las azo-reductasas catalizan la reducción de los colorantes azo a los correspondientes compuestos hidrazo, los mismos que pueden ser reducidos espontáneamente en la presencia de NADPH a aminas (Blümel *et al.*, 2002; Moutaouakkil *et al.*, 2003).

El segundo paso de la biodegradación completa de colorantes reactivos azo es la degradación de las aminas aromáticas producidas por la reducción del enlace azo de los colorantes. Bajo condiciones aerobias, el paso inicial de ruptura del enlace azo es

seguido por la hidroxilación y apertura del anillo del intermediario aromático (Moutaouakkil *et al.*, 2003).

Algunos estudios reportan una degradación bacteriana aerobia de colorantes azo utilizando una fuente adicional de energía y carbono para el crecimiento de las bacterias. Fuentes alternas como extracto de levadura o glucosa podrían ser consideradas como suplemento nutricional en un medio de cultivo que contenga colorantes tipo azo con el objetivo de incrementar la tasa de decoloración bacteriana aerobia (Chen *et al.*, 2002). Debido a que la adición de estos substratos alternativos puede provocar la formación de micronichos anaerobios, una reducción anaerobia del colorante no se descarta (Tan, 2008).

En relación a la especificidad de las bacterias aerobias para remover colorantes, Mabrouk y Yusef (2008) determinaron que la eficiencia de decoloración realizada por las bacterias varía dependiendo del colorante. Bacterias como *Xenophilus azovorans* KF46 y *Pigmentiphaga kullae* K24 crecen aerobiamente con Carboxy-Naranja I y II como fuente de carbono, respectivamente, pero no crecen con colorantes sulfonados como el Naranja Ácida 20 (Pandey *et al.*, 2007).

La especificidad de la degradación bacteriana de colorantes es atribuida a disimilaridad encontrada en la estructura y complejidad de los colorantes, especialmente en la naturaleza y posición del sustituyente en el anillo aromático, las interacciones resultantes con el enlace azo, la toxicidad del colorante para las bacterias a través de la inhibición de su actividad metabólica, saturación de las células con productos secundarios de la degradación de los colorantes, inactivación del sistema de transporte del colorante o bloqueo de los sitios activos de las enzimas azoreductasas por las moléculas colorantes (Mabrouk *et al.*, 2008).

Ésta información permite establecer que las bacterias aerobias poseen potencial para tratar aguas residuales que contienen una alta presencia de colorantes (Blümel *et al.*, 2002). Sin embargo, es necesario el desarrollo de un proceso biológico eficiente que tenga el potencial de degradar colorantes diferentes estructuralmente pues los efluentes industriales textiles son extremadamente variables en composición (Oranusi *et al.*, 2005).

1.4.4.1.2 Bioadsorción de los colorantes reactivos tipo azo

Una de las características que distingue a las células microbianas de las células animales es la pared celular, localizada fuera de la membrana citoplasmática de la célula, capaz de proteger a los microorganismos contra las inclemencias del ambiente, controlar el flujo entre el citoplasma y los alrededores y determinar la forma y rigidez de la célula. La pared está directamente en contacto con el ambiente externo a la célula e interacciona especialmente con las sustancias solubles en el medio líquido (Rittmann *et al.*, 2001).

La pared celular es químicamente compleja, característica de cada tipo de organismos y puede diferir entre especies del mismo género. Los microorganismos tienen una alta cantidad de grupos funcionales en la superficie de la pared celular con capacidad de unir iones como carboxilos, aminos, imidazol, fosfatos, sulfhidrilos, sulfatos, hidroxilos, entre otros. La carga neta de la pared celular del microorganismo es negativa debido a la abundancia de carboxilos y fosfatos pero los grupos imidazol y amino tienen carga positiva, por lo que las paredes celulares se consideran como polifuncionales en su capacidad de bioadsorción (Rittmann *et al.*, 2001).

La bioadsorción es el mecanismo por el cual los microorganismos captan las moléculas de colorante presentes en el medio a la pared celular. La unión del colorante a la pared celular es un proceso exocelular o pericelular que consiste en transportar la molécula colorante a la superficie de la pared en donde será captada por fuerzas intermoleculares, por lo cual el mecanismo es fácilmente reversible (Keung, 1997).

La bioadsorción es una técnica que utiliza biomasas, vivas o muertas, con origen en distintos tipos de microorganismos, para la descontaminación de efluentes líquidos. Se fundamentan en fenómenos, normalmente, de intercambio iónico sobre la superficie de la biomasa utilizada y los iones de la disolución acuosa contaminada (Ballester, 2009).

La bioadsorción requiere que los microorganismos estén en contacto con el colorante por un tiempo suficiente para reducir su concentración. El tiempo de tratamiento varía dependiendo de la cantidad y concentración del colorante en el medio,

los otros constituyentes del medio, la temperatura, pH, y la eficiencia con la que las células bacterianas son capaces de adsorber el colorante (Keung, 1997).

La biomasa de diferentes especies de bacterias, hongos y algas son capaces de concentrar en sus estructuras iones que se encuentran en ambientes acuosos (Monge *et al.*, 2009). Una variedad de microorganismos tienen la capacidad de bioadsorber colorantes como son las bacterias clasificadas dentro de las familias Bacillaceae y Micrococcaceae que son bacterias aerobias facultativas gram positivas (Keung, 1997).

El interés de la bioadsorción reside en su capacidad de eliminar contaminantes de efluentes acuosos, lo que conduce a su detoxificación y a la protección del medio ambiente (Sanz, 2008).

1.5 Sistema de hipótesis

El inóculo bacteriano compuesto aislado de muestras de suelo contaminado por efluentes textiles tiene la capacidad de remover colorantes tipo reactivo generalmente utilizados en la industria textil bajo condiciones aerobias controladas en el laboratorio.

CAPÍTULO 2

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

El trabajo de investigación fue desarrollado plenamente por la Señorita Diana Karina Ayala Muñoz, con la asesoría de la directora de tesis Alma Koch MSc. y la codirectora de la tesis Soledad Benítez PhD.

2.2 Zona de Estudio

La toma de muestras de suelo contaminado por agua residual textil se realizó en la Empresa Textil Sintofil S.A ubicada en Pifo a 30 Km al oriente de Quito.

La realización de los ensayos de investigación tuvo lugar en los laboratorios de Microbiología Ambiental de la Escuela Politécnica del Ejército, Sangolquí.

2.3 Período de tiempo de investigación

La investigación se realizó desde Febrero de 2009 hasta Agosto de 2009.

2.4 Diseño Experimental:

2.4.1 Selección inicial del Inóculo Bacteriano

Se aplicó un Diseño completamente al azar (DCA) con cuatro tratamientos y tres repeticiones más el control (Tabla 2.1).

La aplicación del diseño experimental estableció si los inóculos bacterianos compuestos aislados de las cuatro muestras colectadas de suelo contaminado por efluentes textiles tienen igual o diferente capacidad de remover una mezcla de colorantes reactivos generalmente utilizados en la industria textil bajo condiciones aerobias controladas en el laboratorio. Con lo cual se seleccionó un inóculo bacteriano compuesto que presentó mejor remoción de colorantes del medio sintético de cultivo.

Tabla 2.1. Descripción de los tratamientos del diseño experimental dispuesto para la selección inicial del inóculo bacteriano compuesto con sus respectivos unidades experimentales, controles y número de repeticiones.

Tratamiento	Descripción	Unidad Experimental	Control	Nº de repeticiones
1	Muestra de suelo 1+ medio mínimo salino+ mezcla de colorantes	Tubo de ensayo con 10 mL de medio de cultivo	Medio sin inoculación	3
2	Muestra de suelo 2 + medio mínimo salino+ mezcla de colorantes	Tubo de ensayo con 10 mL de medio de cultivo	Medio sin inoculación	3
3	Muestra de suelo 3 + medio mínimo salino+ mezcla de colorantes	Tubo de ensayo con 10 mL de medio de cultivo	Medio sin inoculación	3
4	Muestra de suelo 4 + medio mínimo salino+ mezcla de colorantes	Tubo de ensayo con 10 mL de medio de cultivo	Medio sin inoculación	3

2.4.2 Determinación de la acción bacteriana en la remoción de tres colorantes reactivos

Se aplicó un diseño experimental factorial de $3 \times 2 + 1$, tres concentraciones de colorante (40, 70 y 100 mg L⁻¹) y dos concentraciones de glucosa (0 y 5 g L⁻¹), dispuesto en un Diseño Completamente al Azar con tres repeticiones más el control (Tabla 2.2).

El diseño se aplicó para determinar si el inóculo bacteriano compuesto seleccionado tiene capacidad de remover color en presencia de glucosa o en ausencia de la misma y remover cada colorante en estudio por separado en diferentes concentraciones.

Tabla 2.2 Descripción de los tratamientos del diseño experimental dispuesto para la determinación de la acción bacteriana en la remoción de colorantes con sus respectivos unidades experimentales, controles y número de repeticiones.

Tratamiento	Descripción	Unidad Experimental	Control	N° repeticiones
T1	40 mg/L colorante + 0 mg/L glucosa + inóculo bacteriano + sales mínimas	Matraz Erlenmeyer de 500 mL con 300 mL de medio de cultivo	Medio sin inoculación	3
T2	40 mg/L colorante + 5 mg/L glucosa + inóculo bacteriano + sales mínimas	Matraz Erlenmeyer de 500 mL con 300 mL de medio de cultivo	Medio sin inoculación	3
T3	70 mg/L colorante + 0 mg/L glucosa + inóculo bacteriano + sales mínimas	Matraz Erlenmeyer de 500 mL con 300 mL de medio de cultivo	Medio sin inoculación	3
T4	70 mg/L colorante + 5 mg/L glucosa + inóculo bacteriano + sales mínimas	Matraz Erlenmeyer de 500 mL con 300 mL de medio de cultivo	Medio sin inoculación	3
T5	100 mg/L colorante + 0 mg/L glucosa + inóculo bacteriano + sales mínimas	Matraz Erlenmeyer de 500 mL con 300 mL de medio de cultivo	Medio sin inoculación	3
T6	100 mg/L colorante + 5 mg/L glucosa + inóculo bacteriano + sales mínimas	Matraz Erlenmeyer de 500 mL con 300 mL de medio de cultivo	Medio sin inoculación	3

2.5 Procedimientos

2.5.1 Selección de los Colorantes Textiles Utilizados

Los colorantes utilizados en esta investigación fueron colorantes reactivos de naturaleza azo por ser los más utilizados por la industria textil. Los colorantes reactivos azo proporcionados por la Empresa Textil Tornasol S.A corresponden a los tres colores primarios: Rojo 141, Amarillo 84 y Azul navy 171.

En el cuadro 2.1 se describe algunas de las características relevantes de los colorantes utilizados en la investigación.

Cuadro 2.1 Información de los colorantes utilizados para el estudio (JAGSON COLORCHEM LIMITED, 2009).

Nombre Comercial	Nombre Genérico	Clase química
RED HE7B	C.I. REACTIVE RED 141 CAS No. 61931-52-0	AZO
GOLDEN YELLOW HE4R	C.I. REACTIVE YELLOW 84 CAS No. 61951-85-7	AZO
NAVY BLUE HER	C.I. REACTIVE BLUE 171 CAS No. 77907-32-5	AZO

λ (nm): longitud de onda determinada en ensayos previos de laboratorio por espectrofotometría.

2.5.2 Preparación del Medio de Cultivo

El medio de cultivo basal (MB) fue modificado de Jiang *et al.*, 2004 y estuvo constituido por $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (4 g/L), NaCl (0,1 g/L), K_2HPO_4 (1 g/L), KH_2PO_4 (2 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.4 g/L), $\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0,14 g/L), Complejo Hierro-EDTA obtenido de FeSO_4 (0,001 g/L) y EDTA Sódico (0,0014 g/L) y Glucosa (5 g/L). La preparación del medio de cultivo se estandarizó por ensayos previos y consistió en la preparación soluciones madre para cada una de las sales y la glucosa. Se autoclavó el volumen requerido de cada solución por separado y una vez autoclavadas las soluciones fueron unificadas en frío en un matraz estéril.

Para la adición del colorante al medio basal se preparó una solución madre en agua de cada colorante en estudio (1 g/L). Dependiendo de la concentración requerida

por colorante para los diferentes ensayos, se calculó el volumen de colorante a tomar de las soluciones madre preparadas y se filtró en un filtro estéril de 0,2um (Oranusi *et al.*, 2005).

2.5.3 Determinación de la Remoción de Color por Espectrofotometría

Basado en la metodología recomendada por Buitrón *et al.*, 2004, una alícuota de 2 mL de los medios de cultivo no inoculados (Control) correspondientes a cada uno de los colorantes en estudio se midió en el espectrofotómetro (Scanning ThermoScientific Genesys 10UV) a diferentes longitudes de onda (Tabla 2.3). Este ensayo permitió obtener una curva patrón de absorbancias para cada colorante y realizar comparaciones posteriores con curvas de absorbancias obtenidas de los medios de cultivo de cada colorante inoculados.

Tabla 2.3 Longitudes de onda y utilizadas para medir absorbancias de los medios de cultivo con los tres colorantes en estudio (Modificado de Ferramola *et al.*, 2009).

λ : nm AMARILLO 84	λ : nm AZUL NAVY 171	λ : nm ROJO 141	λ : nm Mezcla de los 3 colorantes en estudio
410*	620*	530*	510*

* : Longitud de Onda a la que se obtiene mayor absorbancia.

De acuerdo a algunos aspectos de la metodología aplicada por Coughlin *et al.*, (1999) y Leena *et al.*, (2008) para la medición espectrofotométrica de los medios de cultivo líquidos con cada colorante e inoculados, se tomó una alícuota de 2 mL de medio después de su inoculación cada 48 horas sucesivamente durante tres semanas y cada 24 horas por dos semanas en el caso de los medios de cultivo con mezcla de colorantes. Se centrifugó la alícuota en una centrífuga Spectrofuge 24D a 10000 gravedades por 5 minutos. Se tomó 1.5ml del sobrenadante y se midió en el espectrofotómetro utilizando una cubeta de cuarzo en las longitudes de onda descritas anteriormente para cada color en estudio

Se determinó el porcentaje de remoción en base a la siguiente fórmula (Olukanni *et al.*, 2006):

$$\% RC = (Abs (i) - Abs (f)) * 100 / Abs (i)$$

Donde:

%RC = Porcentaje de Remoción de Color.

Abs (i) = Absorbancia obtenida al medir el control a una longitud de onda determinada.

Abs (f) = Absorbancia obtenida al medir la alícuota del medio de cultivo con colorante después de la incubación a la longitud de onda que se obtuvo la Abs (i).

2.5.4 Muestreo

Se aplicó un muestreo dirigido donde se seleccionó zonas de suelo que tienen una exposición constante y por largos periodos de tiempo con el efluente residual textil. Se muestreó el suelo en la planta de tratamiento biológica de agua residual con Carrizales de la Empresa Textil Sintofil S.A ubicada en Pífo a 30 Km al oriente de Quito. Se determinó la distribución del agua residual de tipo textil en la zona de muestreo con lo cual se subdividió en cuatro partes al área de muestreo y se tomó una muestra puntual de suelo de cada zona (Figura 2.1).

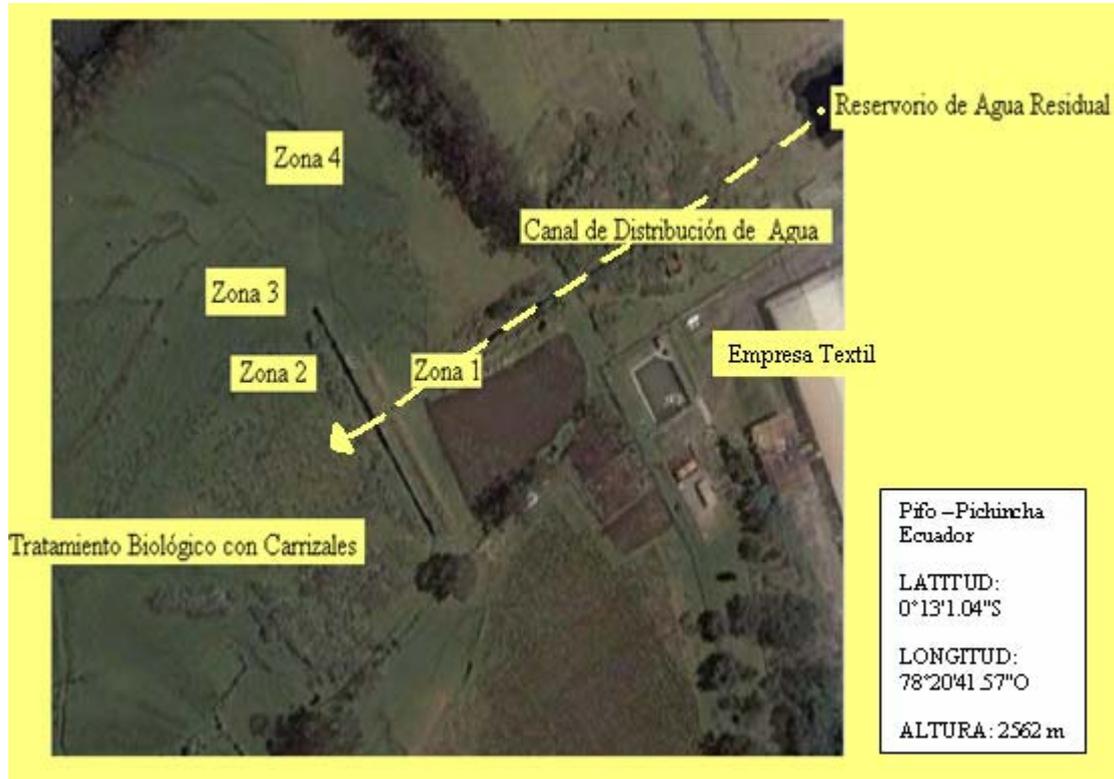


Figura 2.1 Esquema de las zonas donde se colectó las muestras del suelo contaminado por agua residual textil.

La primera zona seleccionada (Figura 2.2 (a)) fue un canal de distribución de tierra. La segunda zona seleccionada correspondió al suelo donde los carrizales están cultivados como tratamiento biológico del efluente textil. Se tomó la muestra de suelo de la parte inicial lateral derecha del carrizal. (Figura 2.2 (b)). La tercera zona seleccionada se encontró en la parte derecha del carrizal, diez metros alejada de éste (Figura 2.2 (c)). La cuarta zona seleccionada de muestreo se encontró a 50 metros de la parte inicial derecha del carrizal (Figura 2.2 (d)).

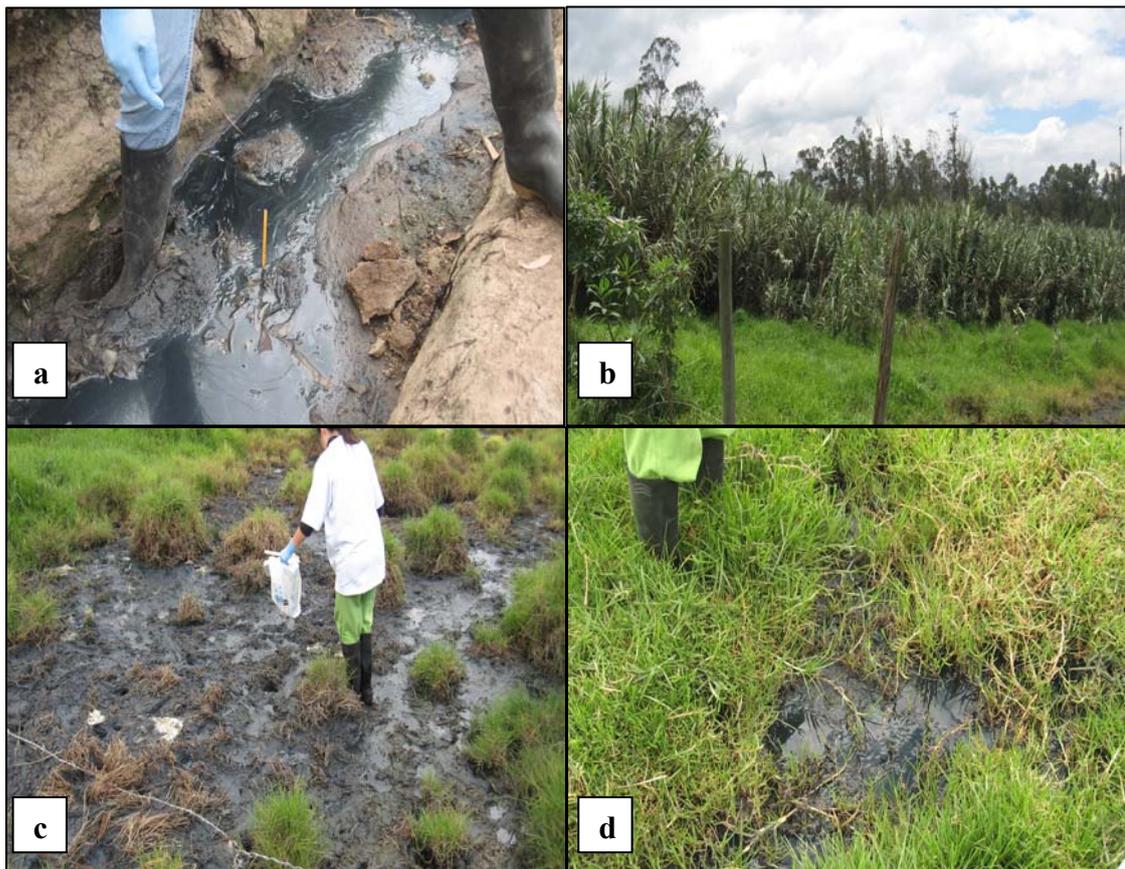


Figura 2.2 Zonas de colección de muestras de suelo contaminado por agua residual textil. Muestreos puntuales. a) Zona 1: Canal de tierra de paso de distribución de agua residual textil tratada físicamente. b) Zona 2: Carrizales utilizados como tratamiento biológico para el agua residual textil de la Empresa Sintofil S.A. c) Zona 3, junto a la zona lateral derecha del carrizal. d) Zona 4, a 20 metros de la parte inicial derecha del carrizal.

Las muestras de suelo colectadas fueron empacadas por separado en fundas Ziploc y etiquetadas, se mantuvieron en refrigeración hasta llegar al laboratorio de Microbiología Ambiental de la Escuela Politécnica de Ejército en Sangolquí, donde se

pesó, midió el pH y temperatura, siguiendo de ésta manera la cadena de custodia necesaria para la colección de muestras.

2.5.5 Medición de pH en muestras de suelo

Para la medición de pH en muestras de suelo se tomó 1 g de la muestra de suelo homogenizado con espátula estéril y se diluyó en 10 mL de agua destilada estéril, tomándose en consideración que tanto el agua como el suelo deben mantener la misma temperatura y el pH del agua destilada debe tender a la neutralidad. Se midió el pH de las diluciones realizadas con la ayuda del potenciómetro calibrado previamente.

2.5.6 Conteo Bacteriano por Siembra Profunda

El conteo bacteriano se realizó por siembra profunda en agar nutriente de diferentes diluciones en solución salina de la muestra respectiva.

De acuerdo con el Manual de Aplicaciones Microbiológicas de Benson (2001), se realizó previamente diluciones de la muestra inicial que para fines de la tesis puede ser muestras líquidas o sólidas. Las diluciones se realizaron en tubos tapa rosca con 9,9 mL de solución salina concentrada (45 g de Cloruro de Sodio (NaCl) diluido en 500 mL de agua destilada), esterilizados en un autoclave manual (All Americas Modelo No. 25X) a 121 C por 15 minutos. Cada una de las diluciones fueron homogenizadas por veinte segundos en vortex (KVM300) antes de realizar la siguiente dilución. Una vez realizadas las diluciones requeridas se inoculó la dilución respectiva en 25 mL de Agar Nutriente Estéril dispensado en matraces de 100mL y mantenidos a 45°C.

Inoculado cada uno de los matraces con agar nutriente a 45°C, se mezcló manualmente veinte veces cada matraz y se dispensó el medio con la dilución respectiva en cajas petri marcadas y esterilizadas, se incubó a 35°C por 48 horas en una incubadora bacteriológica (VWR Modelo No. 1515E).

Se realizó el conteo en las cajas que presentaron colonias completamente aisladas y separadas, y donde se obtuvo entre 30 y 300 Unidades Formadoras de Colonias.

2.5.7 Selección inicial del inóculo bacteriano compuesto de las muestras de suelo

De acuerdo a las metodologías aplicadas por Khalid, 2008, Leena *et al.*, 2008; Olukanni *et al.*, 2009 y Khadijah *et al.*, 2009, para obtener un inóculo bacteriano compuesto con capacidad de remoción de color en muestras líquidas, se realizó una fase de enriquecimiento para las bacterias encontradas en las muestras de suelo en la que se tomó 1 g de cada muestra de suelo homogenizada y se inoculó en tubos con 9 mL de caldo de cultivo estéril al 1%. Se incubó por 48 h a 35°C. Se realizó un conteo por siembra profunda de la población bacteriana obtenida en cada tubo con caldo nutriente después de 48 h de incubación y se evaluó cada inóculo por tinción Gram.

Se inoculó 0,5 mL de cada cultivo obtenido después de 48 horas de incubación en diferentes tubos con 10 mL de medio líquido de cultivo basal (MB) con una mezcla de los tres colorantes en estudio a una concentración de 40 mg/L de cada colorante. La inoculación se realizó de acuerdo al Diseño Completamente al azar aplicado en este ensayo (Tabla 2.1).

Una vez realizada la inoculación en cada tubo, se incubó a 35°C y cada 24 h se aireó manualmente, agitando 25 veces de arriba hacia abajo cada tubo. Se empezó a medir la remoción de color por espectrofotometría a los cuatro días de realizada la inoculación hasta observar remoción máxima de color por cultivo realizado.

De la evaluación estadística de este ensayo, se seleccionó dos inóculos bacterianos compuestos que demostraron altos porcentajes de remoción de color, los cuales fueron conservados por separado en medio líquido de cultivo basal con 5 g/L de glucosa sin colorante en incubación a 35°C. Para esto, se tomó 0,5 mL de cada inóculo obtenido en los tubos con medio salino, glucosa y colorante removido y se inoculó en 10 mL de medio líquido salino, con glucosa, sin colorante.

Se realizó otro ensayo para determinar el crecimiento de los inóculos bacterianos compuestos en función del tiempo y remoción de color obtenido en el medio. Se tomó 5 mL de cada cultivo bacteriano conservado y se inoculó por separado en 100 mL de medio mínimo salino con 40 mg/L de cada colorante y 5 g/L de glucosa. Se controló crecimiento bacteriano, remoción de color y pH del medio cada ocho horas después de

la inoculación. El crecimiento bacteriano fue establecido por conteo bacteriano en siembra profunda y se determinó la remoción de color espectrofotométricamente.

2.5.8 Determinación de la influencia del pH en la remoción de color del medio

Debido a que los colorantes en condiciones acuosas tienden a cambiar de estructura cuando son sometidos a cambios de pH, fue necesario demostrar que la remoción de color obtenida no era debida a cambios de pH en el medio de cultivo inoculado.

Se realizó controles de pH en los diferentes medios líquidos de cultivo durante el crecimiento de las bacterias y se determinó que la producción de metabolitos secundarios de las bacterias influyen en la variación del pH del medio pues los medios de cultivo inoculados que presentaron remoción de color tenían un pH más bajo que el medio de cultivo sin inocular.

Basados en la metodología aplicada por Moutikaikili *et al.*, 2009, se realizó dos ensayos para determinar que la remoción de color del medio no es producto de la acidez final del medio de cultivo. En el ensayo 1, se retiró la población bacteriana por filtración con filtros de 0,2 μm de los medios de cultivo después del tiempo de incubación definido para cada colorante. Se subió el pH de los medios filtrados hasta la neutralidad con NaOH 1N, se incubó por 48 h y una alícuota de 2 mL de los medios incubados se midió espectrofotométricamente para establecer cambios de coloración de los medios en estudio

En el ensayo 2 se bajó el pH de los medios de cultivo con colorantes sin inoculación con HCL 1%, se incubó por 48 h y una alícuota de 2 mL se midió espectrofotométricamente para establecer cambios de coloración del medio de cultivo en estudio.

2.5.9 Activación y preservación del inóculo bacteriano compuesto seleccionado

Para la activación del inóculo, se tomó 2,5 mL del cultivo bacteriano seleccionado y se inoculó en 197,5 mL de medio basal en ausencia de colorante. Se

realizó un control del crecimiento bacteriano cada 6 horas desde su inoculación, lo cual se obtuvo por conteo bacteriano en siembra profunda, con tres repeticiones para asegurar el resultado estadístico. Se determinó las fases de crecimiento del cultivo bacteriano activado, es decir, del cultivo bacteriano en condiciones óptimas para ser utilizado en los próximos ensayos, metodología basada en los estudios realizados por Mabrouk *et al.*, 2008, Khalid *et al.*, 2008, Khadijah *et al.*, 2009.

De acuerdo a Coughlin *et al.*, 1999 y Liakou *et al.*, 2003, para la preservación del inóculo, se consideró la curva de crecimiento de las bacterias y se determinó la reposición de 50 mL de medio nutritivo nuevo cada 72 h, asemejando el funcionamiento de un reactor continuo. Es decir, en el tiempo descrito, se extrajo 50 mL del medio, se adicionó 50 mL de medio nuevo al cultivo bacteriano conservado y se incubó por 72 h a 35°C para mantener una población bacteriana constante durante el tiempo de duración de la investigación, lo cual se comprobó al realizar un control de crecimiento bacteriano antes de cada reposición de medio.

2.5.10 Análisis de la acción del inóculo bacteriano compuesto seleccionado en medios de cultivo con los colorantes por separado a diferentes concentraciones.

Para determinar la capacidad del inóculo bacteriano compuesto en remover diferentes colorantes en diferentes concentraciones de un medio líquido sintético, se aplicó el Diseño Factorial propuesto (Tabla 2.2) para los colorantes reactivos por separado (Rojo 141, Azul navy 171, Amarillo 84). Se preparó 300 mL de medio líquido de cultivo basal con y sin glucosa y las concentraciones determinadas según el diseño (40, 70 y 100 mg/L) del respectivo colorante en matraces de 500 mL.

Basado en la metodología de Khalid *et al.*, 2008, en cada uno de los matraces, se inoculó 3mL del cultivo bacteriano seleccionado, activado y preservado, a excepción de los controles que no fueron inoculados. Se incubó los diferentes medios inoculados a 35°C en agitación a 45 rpm en una incubadora/refrigeradora con agitación orbital WiseCube. Se midió la remoción de color de los medios de cultivo por espectrofotometría, crecimiento bacteriano existente en cada medio por conteo en siembra profunda y pH del medio desde su inoculación y después de 48 h sucesivamente a lo largo del ensayo.

El ensayo realizado para cada colorante se dio por finalizado una vez que se estableció una remoción máxima de color en el medio, determinada por tres mediciones máximas de remoción de color iguales consecutivas.

2.6 Análisis de Datos

2.6.1 Selección inicial de inóculo bacteriano compuesto

Para determinar el inóculo bacteriano compuesto capaz de decolorar el medio líquido con mezcla de tres colorantes reactivos azo en 15 días o menos, se realizó la evaluación estadística de los datos obtenidos de la medición espectrofotométrica del color en los medios de cultivo cada 24 h a través del análisis de varianza ANOVA y prueba de Duncan.

2.6.2 Capacidad del inóculo bacteriano compuesto seleccionado para remover tres concentraciones de cada colorante en estudio por separado, con y sin glucosa.

Se realizó la evaluación estadística de los datos obtenidos de la medición espectrofotométrica del color en los medios de cultivo cada 48 h a través del análisis de varianza ANOVA y prueba de Duncan para determinar la capacidad del inóculo bacteriano de degradar tres concentraciones de cada colorante en presencia y ausencia de glucosa.

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Selección inicial del inóculo bacteriano compuesto

El inóculo bacteriano compuesto con capacidad de remover colorantes reactivos de medios líquidos en condiciones aerobias de laboratorio fue seleccionado de muestras de suelo contaminado por agua residual textil. Las cuatro muestras de suelo colectadas presentaron pH básico (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 pH de las cuatro muestras colectadas de suelo contaminado por agua residual textil.

Muestra	Descripción	pH
1	Canal de tierra de distribución de agua residual textil tratada físicamente	10,94
2	Al interior del carrizal	10,06
3	Junto a la zona lateral derecha del carrizal	9,9
4	A 20 metros de la parte inicial derecha del carrizal	10,15

Del enriquecimiento realizado en caldo nutriente de las muestras de suelo colectadas se observaron en su mayoría bacterias en forma de bacilos y tinción gram negativa. Los conteos por siembra profunda de cada cultivo bacteriano demostró que la muestra 3 fue la que presentó mayor crecimiento bacteriano en 48 horas de incubación, seguida en forma descendente de las muestras 1, 4 y 2 (Tabla 3.2).

Las poblaciones bacterianas obtenidas por cultivo enriquecido corresponden a las bacterias capaces de crecer en agar de conteo bacteriano, a 35°C y 48 horas de incubación, es decir son bacterias mesófilas, aerobias o facultativas heterótrofas, por lo que el valor presentado de unidades formadoras de colonias en la Tabla 3.2 no determina un valor total de las bacterias encontradas en cada muestra de suelo colectada pero representa un aproximado de la población bacteriana presente en los cultivos después del enriquecimiento.

Tabla 3.2 Conteo de la población bacteriana de los cultivos enriquecidos de las muestras de suelo contaminado por agua residual textil.

Muestra	# UFC/mL
1	78 x 10 ⁵
2	193 x 10 ⁴
3	256x10 ⁵
4	84 x 10 ⁵

Se evaluó estadísticamente los porcentajes de remoción de color obtenidos por acción bacteriana en los medios de cultivo con mezcla de los tres colorantes en conjunto con agitación manual cada 24 horas, para seleccionar el inóculo bacteriano compuesto con mejor capacidad de remoción de color en el medio. Evaluación de la cual se obtuvo un valor estadístico de Levene de 0,325 y el ANOVA mostró un valor de significancia de $3,45 \times 10^{-19}$ ($p < 0,05$), por lo que se establece que existen diferencias significativas en el porcentaje de remoción de color de alguno de los inóculos.

En la prueba de Duncan se obtuvo cuatro subconjuntos, lo que quiere decir que cada inóculo bacteriano compuesto removió en diferentes porcentajes el color del medio de cultivo (Figura 3.1). Los inóculos que presentan mayor porcentaje de remoción son los correspondientes a las muestras 1 y 3, con 94 y 96%, respectivamente.

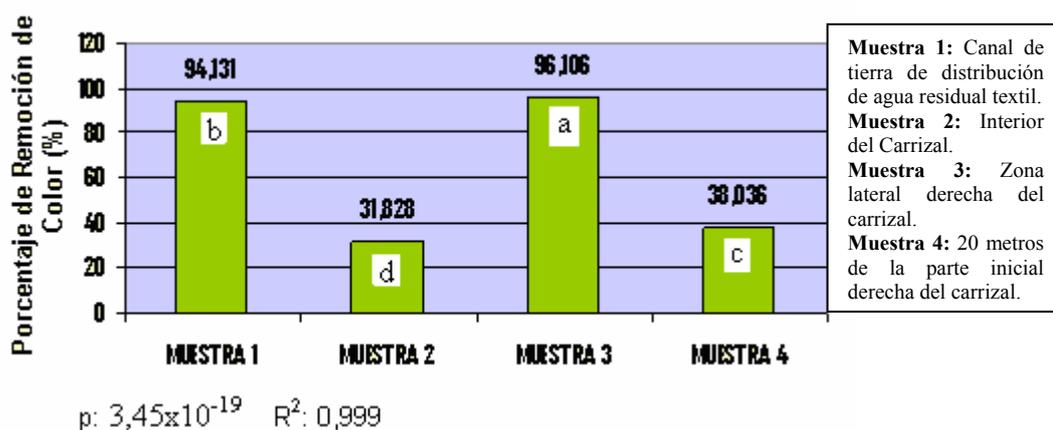


Figura 3.1 Comparación entre muestras de porcentajes de la remoción de color obtenidos por cada inóculo bacteriano compuesto en el medio de cultivo líquido con mezcla de tres colorantes reactivos azo después de siete días de incubación a 35°C y agitación manual cada 24 horas (n=3).

En la Figura 3.2 se observa las gráficas de las curvas Absorbancia a 510 nm en función del tiempo de incubación de los medios de cultivo con mezcla de colorantes que fueron inoculados con los cuatro diferentes inóculos provenientes de las muestras de suelo contaminado por agua residual textil. Las curvas representan una medición espectrofotométrica realizada cada 24 horas a partir del cuarto día de incubación del inóculo en el medio de cultivo con colorantes. La remoción de color en cada gráfica se establece en base a la comparación de la absorbancia obtenida en un tiempo cero de incubación con las absorbancias obtenidas en cada medición.

En las gráficas a y b se observa la disminución de la absorbancia del medio de 0,9 valores menores de 0,1, mientras que en las gráficas c y d, la absorbancia del medio no es menor a 0,5.

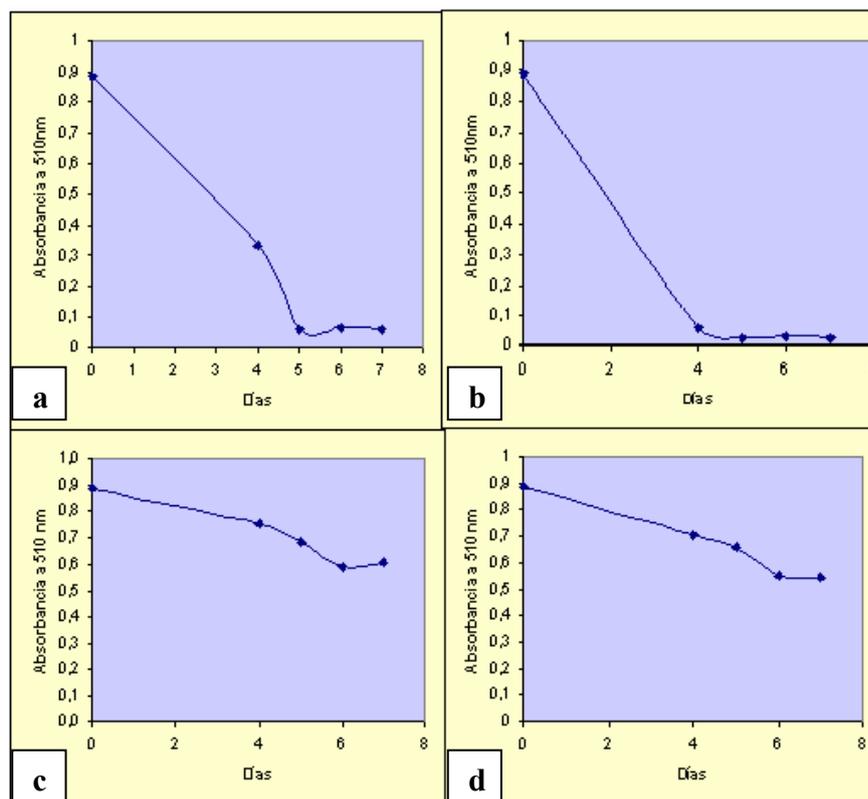


Figura 3.2 Curvas de Absorbancia a 510 nm en función del tiempo de incubación de los medios de cultivo con mezcla de colorantes inoculados con a) Inóculo Muestra de Suelo 1, b) Inóculo Muestra de Suelo 3, c) Inóculo Muestra de Suelo 2, d) Inóculo Muestra de Suelo 4 después de 7 días de incubación.

En la Figura 3.3 se presenta los cambios de coloración de los medios de cultivo por acción de cada uno de los inóculos bacterianos compuestos. El inóculo Muestra 1 cambia el color inicial del medio de cultivo, de un color rojo tinto a morado con precipitaciones de color morado después de 10 días de incubación. Los inóculos Muestra 2 y Muestra 4, después de 8 días de incubación, no cambian de color el medio de cultivo a simple vista. Finalmente, el inóculo Muestra 3 permite un cambio de color fácilmente visible en el medio de cultivo, tornándolo de rojo vino a celeste, con precipitaciones de color celeste.

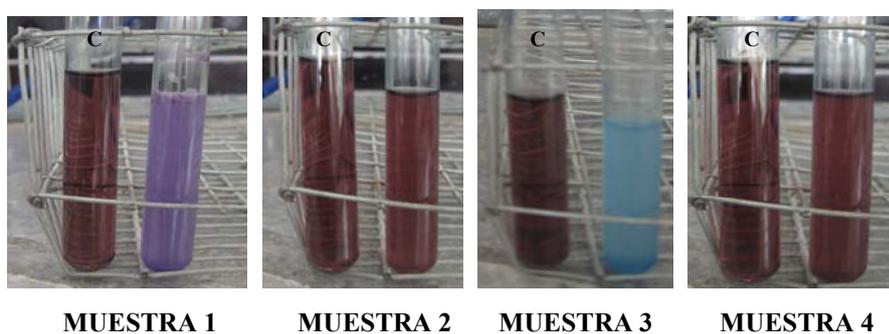


Figura 3.3 Cambio de Color del medio de cultivo por acción de cada inóculo bacteriano compuesto (muestras 1-4 comparada con su respectivo control (C)) después de 10 días de incubación.

De acuerdo al sondeo inicial realizado, tanto el inóculo de la muestra 1 como el inóculo de las muestra 3 tienen un alto potencial para remover color de un medio de cultivo líquido con mezcla de tres colorantes reactivos. Sin embargo, para cumplir con los objetivos de esta tesis, fue necesario seleccionar uno de los dos inóculos para continuar con las siguientes etapas de experimentación. Se estableció la eficiencia de cada inóculo seleccionado en función del tiempo de incubación, crecimiento bacteriano y porcentaje de remoción de color (Figura 3.4).

En la Figura 3.4 se observa que la Muestra Inóculo 3 en menos tiempo alcanza mayor remoción de color que la muestra Inóculo 1. Al cumplir las 232 horas de incubación, el inóculo 1 no removió color en un porcentaje mayor a 84%, mientras que el inóculo 3 removió 95% del color presente en el medio de cultivo con mezcla de colorantes. Al analizar las curvas de crecimiento bacteriano se observa que existe diferencia en el crecimiento de los inóculos 1 y 3.

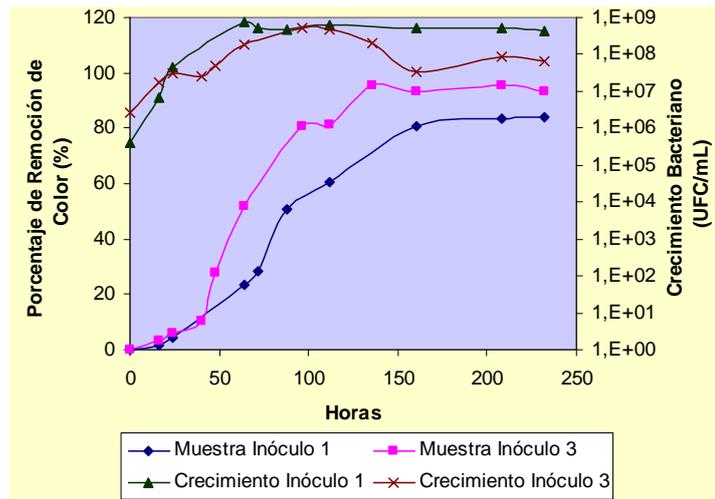


Figura 3.4 Remoción de Color y Crecimiento Bacteriano de los inóculos de las muestras 1 y 3 en función del tiempo de incubación en el medio de cultivo con mezcla de colorantes.

El inóculo 1 tiene un crecimiento exponencial de hasta 1×10^9 UFC/mL de medio durante las primeras 64 horas de incubación y se mantiene en este orden en un estado estacionario durante el tiempo restante del ensayo. El inóculo 3 crece exponencialmente hasta el orden de 1×10^7 UFC/mL en 24 horas de incubación, se mantiene estacionariamente por 16 horas más y continúa creciendo de manera exponencial hasta las 96 horas de incubación donde alcanza un orden de 1×10^9 UFC/mL a partir de lo cual decrece hasta 1×10^7 UFC/mL en 64 horas y se mantiene en ese orden durante el tiempo restante de incubación.

Se escogió el inóculo bacteriano compuesto de la muestra de suelo 3 por su eficiencia para remover un 95% color de un medio de cultivo líquido con mezcla de tres colorantes reactivos en 6 días de incubación a 35°C con agitación manual cada 24 horas.

3.1.1.1 Determinación de la acción bacteriana en la remoción de color obtenida

El inóculo bacteriano compuesto seleccionado remueve el color del medio de cultivo a medida que crece y el pH del medio baja de 6,27 a 4,14, valor de pH que aproximadamente mantiene el medio a lo largo de la incubación (Figura 3.5).

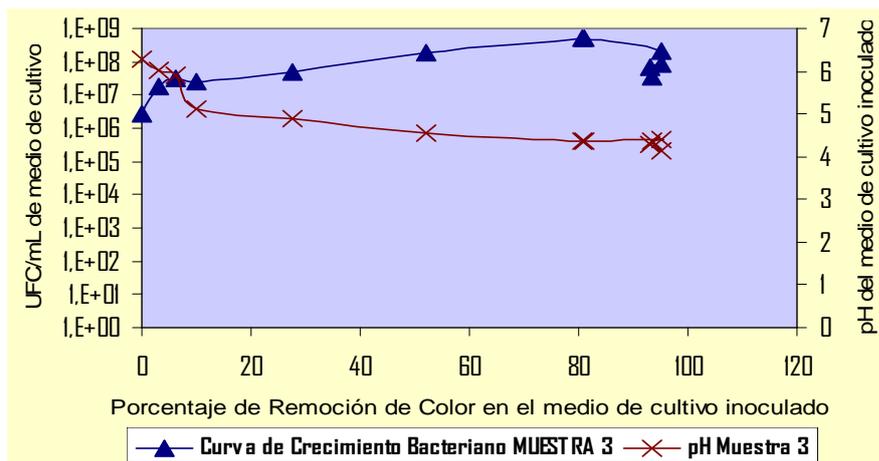


Figura 3.5 Crecimiento Bacteriano (azul) del inóculo muestra 3 y pH del medio inoculado (rojo) versus el Porcentaje de Remoción de color obtenido en el medio.

Para demostrar que la remoción de color obtenida en los medios de cultivo coloridos no es producto de la acidificación final del medio se realizaron dos ensayos que se explican en la Tabla 3.3. En el ensayo 1, los porcentajes de pérdida de color están entre 2 y 4%. Mientras que en el ensayo 2, los porcentajes de pérdida de color por acidificar el medio están entre 1 y 3%.

Tabla 3.3 Porcentaje de pérdida o ganancia de color en el medio de cultivo con mezcla de 40 mg/L de tres colorantes reactivos debido a cambios de pH. Los valores negativos correspondientes al porcentaje de pérdida de color en el medio de cultivo establecen una ganancia de coloración del medio y los valores positivos indican una pérdida de color.

Ensayo 1				
Medio Inoculado luego de 5 días de incubación (Control)		Medio Inoculado luego de 5 días de incubación con NaOH 1N		Porcentaje de Pérdida de Color por pH (%)
pH	Absorbancia (510 nm)	pH	Absorbancia (510 nm)	
4,98	0,188	6,12	0,149	4
5,25	0,240	6,15	0,217	3
5	0,192	6,09	0,173	2
Ensayo 2				
Medio sin inocular (Control)		Medio sin inocular con HCL 1N		Porcentaje de Pérdida de Color por pH (%)
pH	Abs (510nm)	pH	Abs (510 nm)	
6,27	0,853	4,9	0,826	3
6,19	0,813	5,4	0,838	-3
6,21	0,825	5,41	0,818	1

3.2 Activación y preservación del inóculo bacteriano compuesto.

El inóculo bacteriano compuesto que presentó capacidad de remoción de color en un medio de cultivo en presencia de colorantes reactivos textiles fue el inóculo obtenido de la Muestra 3 de suelo contaminado por agua residual textil. El inóculo fue conservado en un medio salino con glucosa sin colorantes para mantenerlo en condiciones óptimas y ser utilizado posteriormente en la investigación. Por tinción gram se determinó que la mayoría del conjunto bacteriano seleccionado es un cultivo de bacilos de diferente tamaño gram negativos.

En base a la curva de crecimiento (Figura 3.6) obtenida del cultivo bacteriano compuesto seleccionado, se puede determinar que el inóculo crece exponencialmente de 2×10^4 UFC/mL hasta un orden de $5,15 \times 10^6$ UFC/mL durante las primeras 24 horas de cultivo, las siguientes 42 horas se mantiene en una fase estacionaria y a partir de la hora 66 de cultivo se observó un decrecimiento de la población bacteriana hasta $7,8 \times 10^5$ UFC/mL.

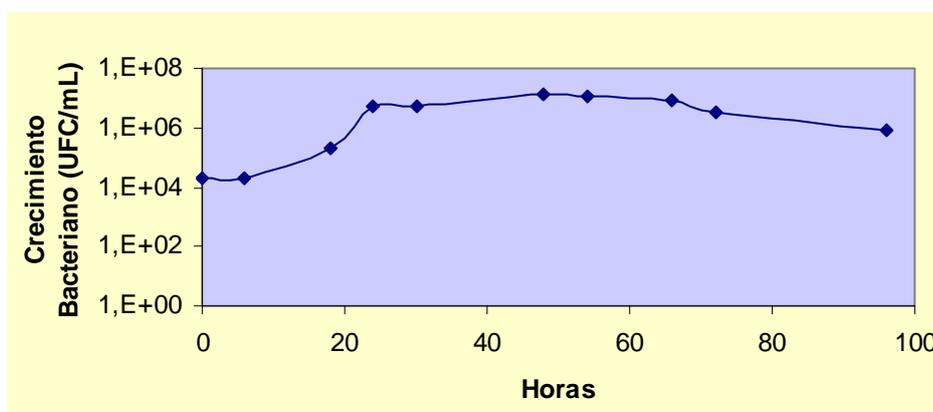


Figura 3.6 Crecimiento bacteriano del inóculo de la muestra 3 conservado en un medio salino con glucosa sin colorantes a 35°C y 45 rpm de agitación continua.

Gracias a esta curva de crecimiento bacteriano se pudo establecer una reposición del 8,33% del medio de cultivo cada 24 horas de cultivo con el fin de evitar que la población bacteriana empiece a decrecer por falta de nutrientes en el medio de cultivo y mantener la población bacteriana en un orden de 1×10^6 UFC/ml (lo que se comprobó al realizar el control del crecimiento bacteriano luego de 24 horas de cada reposición de medio).

3.3 Remoción de tres colorantes reactivos textiles por el inóculo bacteriano compuesto seleccionado

El inóculo bacteriano compuesto seleccionado, preservado en un medio de cultivo salino con 5 g/L de glucosa y sin colorantes, fue utilizado para realizar los ensayos experimentales dispuestos para cada uno de los tres colorantes y determinar la capacidad del inóculo de remover diferentes concentraciones de colorante en presencia o ausencia de glucosa. Para el análisis estadístico en esta fase de experimentación de la tesis, se evaluó por separado los datos obtenidos de la remoción de color lograda en medios con glucosa y los datos de la remoción de color obtenida en medios sin glucosa de cada uno de los ensayos realizados por colorante.

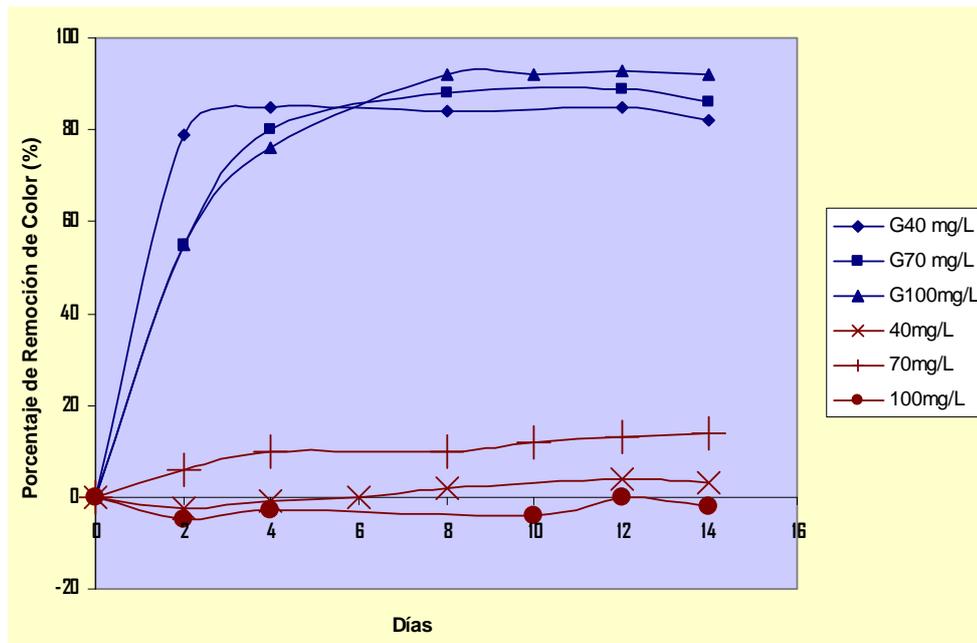
3.3.1 Remoción de colorante Azul Reactivo Navy 171

El inóculo bacteriano compuesto fue inoculado en medios de cultivo con Azul Navy 171 para determinar la capacidad de remoción del colorante en ausencia y presencia de glucosa en condiciones aerobias. En la evaluación estadística de los porcentajes de remoción de color lograda por el inóculo bacteriano compuesto en los medios con 5 g/L de glucosa y tres concentraciones de colorante Azul Navy 171 (40, 70 y 100 mg/L) en agitación de 45 rpm se observaron diferencias significativas ($p = 4,788 \times 10^{-6}$) entre tratamientos, siendo la concentración de 100mg/L de Azul Navy 141 a la que se obtuvo mayor porcentaje de remoción de color en el medio y 40 mg/L de colorante, la concentración en la que se alcanzó menor remoción de color en el medio (Tabla 3.4).

Tabla 3.4 Subconjuntos homogéneos que representan a los porcentajes de remoción de color obtenidos por concentración de colorante Azul Navy 171 en medios con 5 g/L de glucosa (n=3).

Concentración de Colorante	Porcentaje de Remoción de Color	Subconjuntos
40 mg/L	81,742	C
70 mg/L	85,626	B
100 mg/L	91,541	A
$p = 4,788 \times 10^{-6}$		

Las curvas de remoción de color del medio observadas en la Figura 3.7 demostraron que a los ocho días de incubación en medios de cultivo con 5 g/L de glucosa, el inóculo bacteriano fue capaz de remover 84% de color en los medios con 40 mg/L de colorante (G40 mg/L), 88% de color con 70mg/L de colorante en cada medio (G70 mg/L) y 92% de color en los medios con 100mg/L de colorante (G100 mg/L), porcentajes de remoción de color que se mantuvieron hasta los 14 días de incubación.



G: Medios de cultivo con 5g/L de glucosa

Figura 3.7 Remoción de color obtenido en los medios de cultivo con colorante Azul Navy 171 en función del tiempo de incubación con el inóculo bacteriano compuesto en agitación a 35°C. Las curvas de color azul corresponden al ensayo con 5g/L de Glucosa y las curvas de color rojo al ensayo con 0 g/L de Glucosa.

En la Figura 3.7 se observa que el máximo porcentaje de remoción de color obtenido en los medios de cultivo sin glucosa fue 14% a los 14 días de incubación y con 70 mg/L de colorante. En el caso de los medios de cultivo con 40 y 100 mg/L de colorante sin glucosa no se obtuvo valores considerables de remoción.

Al realizar el análisis estadístico de los porcentajes de remoción de color obtenidos en los medios con 0 g/L de glucosa y tres concentraciones de colorante en agitación, se comprobó que existe diferencia estadística entre los porcentajes de remoción de color obtenidos por tratamiento ($p = 6,051 \times 10^{-8}$). La prueba de Duncan

(Tabla 3.5) estableció que el porcentaje de remoción obtenido en 70mg/L de colorante es mayor que los porcentajes de remoción obtenidos en 100 y 40 mg/L de colorante.

Tabla 3.5 Subconjuntos homogéneos que representan a los porcentajes de remoción de color obtenidos por concentración de colorante Azul Navy 171 en medios con 0 g/L de glucosa (n=3).

Concentración de Colorante	Porcentaje de Remoción de Color	Subconjuntos
40 mg/L	3,223	b
70 mg/L	13,519	a
100 mg/L	2,429	b
p = 6,051x10⁻⁸		

En la figura 3.8 se observa la diferencia los medios con glucosa a diferentes concentraciones de colorante Azul Navy 171 y sus respectivos controles luego de 14 días de incubación. El precipitado encontrado en los tubos probablemente corresponde a la biomasa colorida del medio de cultivo.

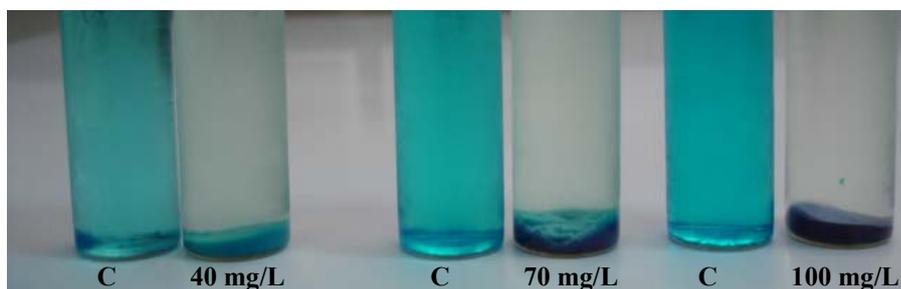


Figura 3.8 Remoción de Color Azul Navy 171 obtenida por acción bacteriana luego de 14 días de incubación en agitación de 45 rpm y 35°C. En la gráfica se muestra las 3 concentraciones del colorante en estudio (40, 70, 100 mg/L) con sus respectivos controles (C).

3.3.1.1 Determinación de la acción bacteriana en la remoción de Azul Navy 171

El seguimiento del crecimiento bacteriano y pH del medio durante la incubación se realizó para establecer la acción bacteriana en la remoción de color del medio. De los conteos bacterianos por siembra profunda, se evaluó principalmente microorganismos de crecimiento en agar de conteo a las 48 horas de incubación.

La figura 3.9 demuestra que en los medios con 40 mg/L se obtuvo un máximo de 85% de remoción de color cuando el inóculo creció hasta $8,8 \times 10^7$ UFC/mL a partir de lo cual se mantuvo en una fase estacionaria. En los medios con 70 mg/L, el inóculo logró un 55% de remoción de color cuando creció hasta $2,72 \times 10^8$ UFC/ml y aunque decreció hasta un orden de 1×10^7 UFC/ml, la remoción de color continuó hasta alcanzar un 82%. En los medios con 100 mg/L, el inóculo creció hasta $1,81 \times 10^8$ UFC/mL alcanzando un 55% de remoción de color, la población bacteriana decreció pero la remoción continuó hasta un 76%, a partir de lo cual el inóculo creció paulatinamente hasta $6,7 \times 10^8$ UFC/mL y logró un 92% de remoción de color.

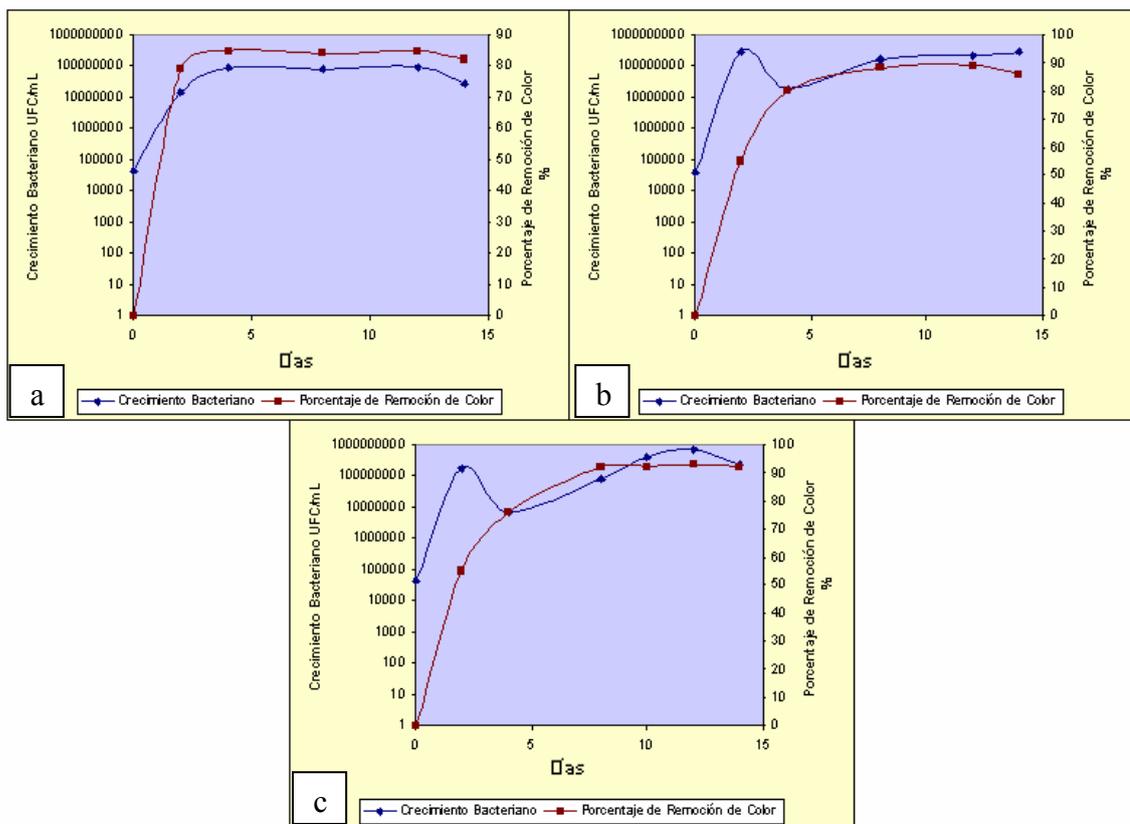
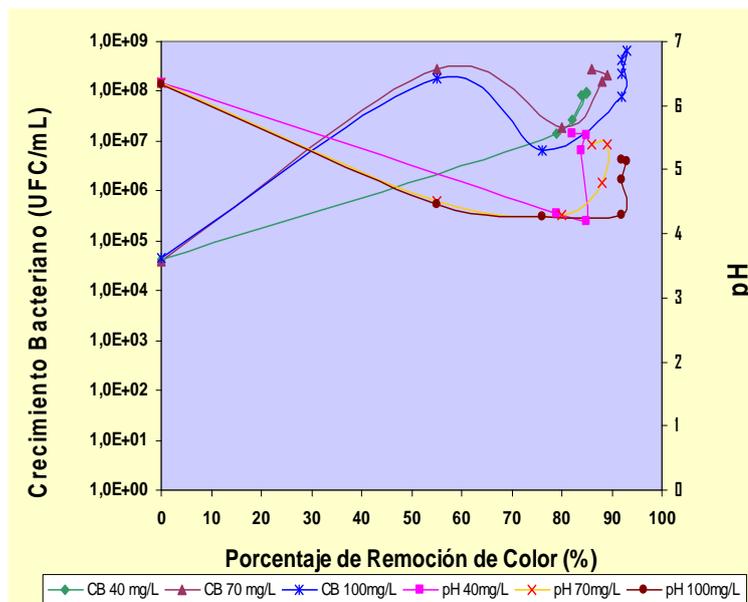


Figura 3.9 Crecimiento bacteriano y porcentaje de remoción del colorante Azul Navy 171 en medios de cultivo con 5 g/L de glucosa en función del tiempo de incubación. a) Medios con 40 mg/L de colorante. b) Medios con 70 mg/L de colorantes. c) Medios con 100 mg/L de colorante.

En relación a la variación del pH en el medio, se observa en la Figura 3.10 que a medida que el inóculo crece y remueve color, el pH disminuye hasta que el inóculo alcanza el mayor porcentaje de remoción de color.



CB: Crecimiento Bacteriano, (40, 70, 100 mg/L): Concentraciones de Colorante, pH: curva correspondiente a la medición de pH del medio respectivo.

Figura 3.10 Crecimiento del inóculo bacteriano compuesto y variación del pH del medio de cultivo con 5g/L de glucosa en función del porcentaje de remoción de color Azul Navy 171 logrado a lo largo del tiempo de incubación (14 días).

En el caso de la curva correspondiente al pH obtenido en el medio con 40 mg/L de colorante Azul Navy 171 (pH 40 mg/L) se observa que el pH disminuye hasta 4,2 cuando alcanza una remoción de 85%, a partir de lo cual empieza a subir hasta llegar a 5,54 con un 85% de remoción. El pH en los medios con 70 mg/L de colorante (curva pH 70 mg/L) disminuye hasta 4,3 cuando la remoción de color es 80%, aumenta hasta 5,4 con un 89% de remoción. En los medios con 100 mg/L (curva 100 mg/L), el pH disminuye hasta 4,29 con un 92% de remoción, a partir de lo cual el medio aumenta su pH hasta 5,16 con un 93% de remoción de color.

Los ensayos realizados para descartar una posible influencia del pH del medio en los resultados de remoción de color obtenidos en los medios de cultivo con tres concentraciones (40, 70, 100 mg/L) de Azul Navy 141 se explican en la tabla 3.6. El objetivo de los ensayos 1 y 2 fue demostrar que la remoción de color obtenida en los medios de cultivo coloridos no es producto de la acidez final del medio. En el ensayo 1, los porcentajes de pérdida de color por basificar el medio están entre 0,41 y 0,75 mientras que en el ensayo 2 se observa un porcentaje de ganancia máxima de color por acidificar el medio de 3,82%.

Tabla 3.6 Porcentaje de pérdida de Color Azul Navy 171 por variación de pH del medio de cultivo con diferentes concentraciones de colorante y glucosa. Valores negativos: ganancia de coloración del medio.

Ensayo 1			
Medios con 5 g/L de glucosa			
	Medio inoculado luego de 14 días de incubación (CONTROL)	Medio inoculado luego de 14 días de incubación con NaOH 1N	% de Pérdida de Color
Concentración de Colorante (mg/L)	100	100	0,410
Abs (620 nm)	0,065	0,058	
pH	5,163	5,660	
Concentración de Colorante (mg/L)	70	70	-0,670
Abs (620 nm)	0,077	0,080	
pH	5,440	5,820	
Concentración de Colorante (mg/L)	40	40	0,750
Abs (620 nm)	0,057	0,055	
pH	5,560	5,920	
Ensayo 2			
Medios con 5 g/L de glucosa			
	Medio inicial sin inocular CONTROL	Medio inicial sin inocular con HCl 1N	% de Pérdida de Color
Concentración de Colorante (mg/L)	100	100	-0,990
Abs (620 nm)	0,807	0,815	
pH	6,320	3,630	
Concentración de Colorante (mg/L)	70	70	-3,820
Abs (620 nm)	0,550	0,571	
pH	6,360	5,370	
Concentración de Colorante (mg/L)	40	40	-3,230
Abs (620 nm)	0,310	0,320	
pH	6,360	4,160	

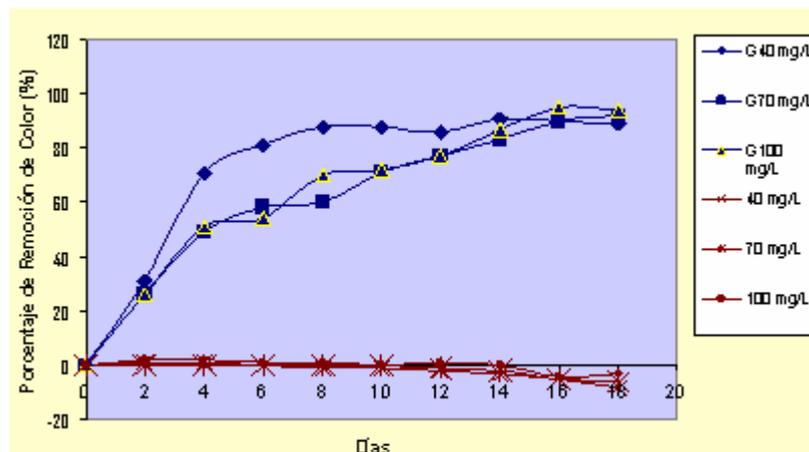
3.3.2 Remoción de colorante Amarillo Reactivo 84

El inóculo bacteriano compuesto fue inoculado en medios de cultivo con Amarillo Reactivo 84 en presencia y ausencia de glucosa para determinar la capacidad de remoción de este colorante en condiciones aerobias. La evaluación estadística de los porcentajes de remoción de color obtenidos en los medios con tres concentraciones (40, 70, 100 mg/L) de colorante Amarillo Reactivo 84 y 5 g/L de glucosa en agitación, demostró diferencias significativas entre los tratamientos ($p = 9,522 \times 10^{-5}$), siendo los medio de cultivo con 100 mg/L de colorante donde el inóculo logró mayor remoción de color y los medios de cultivo con 40 mg/L del colorante en el medio donde logró menor remoción.

Tabla 3.7 Subconjuntos homogéneos que representan a los porcentajes de remoción de color obtenidos por concentración de Amarillo Reactivo 84 en medios con 5 g/L de glucosa (n=3).

Concentración de Colorante	Porcentaje de Remoción de Color	Subconjuntos
40 mg/L	88,687	c
70 mg/L	91,241	b
100 mg/L	93,927	a
$p = 9,522 \times 10^{-5}$		

Al analizar cada curva de remoción de color en presencia de glucosa (Figura 3.11) se observó que en los medios con 40 mg/L de colorante (Curva G40 mg/L) se obtuvo un valor máximo de remoción de color de 91% a los 14 días de incubación. La curva de remoción de color en función del tiempo correspondiente a los medios con 70mg/L de colorante (Curva G70 mg/L) indica que el inóculo logró 90% de remoción de color a los 16 días de incubación y a los 18 días se obtuvo un valor máximo de remoción de 92%. En la curva correspondiente a la remoción de color obtenida en los medios con 100mg/L de colorante (G100 mg/L) se observó que a los 16 días de incubación se obtuvo 95% de remoción de color, valor máximo obtenido durante los 18 días de duración del ensayo.



G: Medios de cultivo con 5g/L de glucosa

Figura 3.11 Remoción de color obtenido en los medios de cultivo con colorante Amarillo Reactivo 84 en función del tiempo de incubación con el inóculo bacteriano compuesto en agitación a 35°C. Las curvas de color azul corresponden al ensayo con 5 g/L de Glucosa y las curvas de color rojo al ensayo con 0 g/L de Glucosa.

En la figura 3.11, las curvas de los medios con colorante sin glucosa no muestran una remoción de colorante Amarillo Reactivo 84 del medio de cultivo. Al realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos de los medios sin glucosa se observaron diferencias significativas en la remoción de color en los medios con tres concentraciones de colorante ($p = 0,018$) siendo los porcentajes de remoción obtenidos en 40 y 100 mg/L de colorante estadísticamente diferentes.

Tabla 3.8 Subconjuntos homogéneos que representan a los porcentajes de remoción de color obtenidos por concentración de Amarillo Reactivo 84 en medios de cultivo sin glucosa. Los valores negativos indican una intensificación del color en el medio de cultivo ($n=3$).

Concentración de Colorante	Porcentaje de Remoción de Color	Subconjuntos
40 mg/L	-7,6490	b
70 mg/L	-5,9689	a-b
100 mg/L	-3,7223	a
$p = 0,018$		

En el caso de los medios de cultivo con colorante sin glucosa, el máximo valor de remoción de color fue 2%. A partir de los 12 días de incubación se puede observar en la Figura 3.11 que el medio en lugar de perder color empezó a intensificar su color hasta 8% en el caso de los medios con 40 mg/L de colorante, 6 % en medios con 70 mg/L de colorante y 4% de ganancia de color en medios con 100 mg/L de colorante.

En la figura 3.12 se puede observar la diferencia de color entre los controles (medios salinos con su respectiva concentración de color y glucosa sin inoculación) y los medios inoculados con el cultivo bacteriano compuesto luego de 18 días de incubación. El precipitado que se observa en los tubos probablemente corresponde a la biomasa colorida del medio de cultivo.

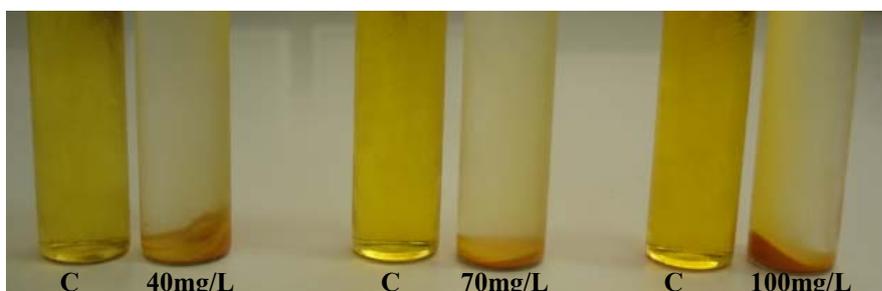


Figura 3.12 Remoción de color Amarillo reactivo 84 obtenida por acción bacteriana luego de 18 días de incubación a 35°C y 45 rpm. En la gráfica se muestra las tres concentraciones del colorante en estudio (40, 70, 100 mg/L) con sus respectivos controles (C).

3.3.2.1 Determinación de la acción bacteriana en la remoción de Amarillo Reactivo 84

Crecimiento bacteriano y pH del medio fueron dos factores medidos para determinar la acción bacteriana en la remoción de color durante la incubación. De los conteos bacterianos por siembra profunda se evaluó principalmente microorganismos de crecimiento en agar de conteo a las 48 horas de incubación.

En la Figura 3.13 se observan las curvas del crecimiento bacteriano y porcentaje de remoción de color en los medios con 5g/L de glucosa en función del tiempo de incubación. En los medios con 40 mg/L de colorante se observó un crecimiento del inóculo de un orden de 1×10^5 UFC/mL hasta $6,4 \times 10^7$ UFC/mL obteniendo 81% de

remoción de color a partir de lo cual empezó a decrecer hasta 5×10^6 UFC/mL y logró 89% de remoción de color en 18 días de incubación. En los medios con 70 mg/L se observó que el inóculo creció de $9,8 \times 10^4$ UFC/mL hasta $7,6 \times 10^7$ UFC/mL logrando 58% de remoción de color y decreció paulatinamente hasta $1,5 \times 10^7$ UFC/mL logrando 92% de remoción de color. En los medios con 100 mg/L de colorante, el inóculo creció desde $8,9 \times 10^4$ UFC/mL hasta $5,6 \times 10^7$ UFC/mL logrando 54% de remoción de color del medio de cultivo y se mantuvo en fase estacionaria hasta lograr 94% de remoción de color.

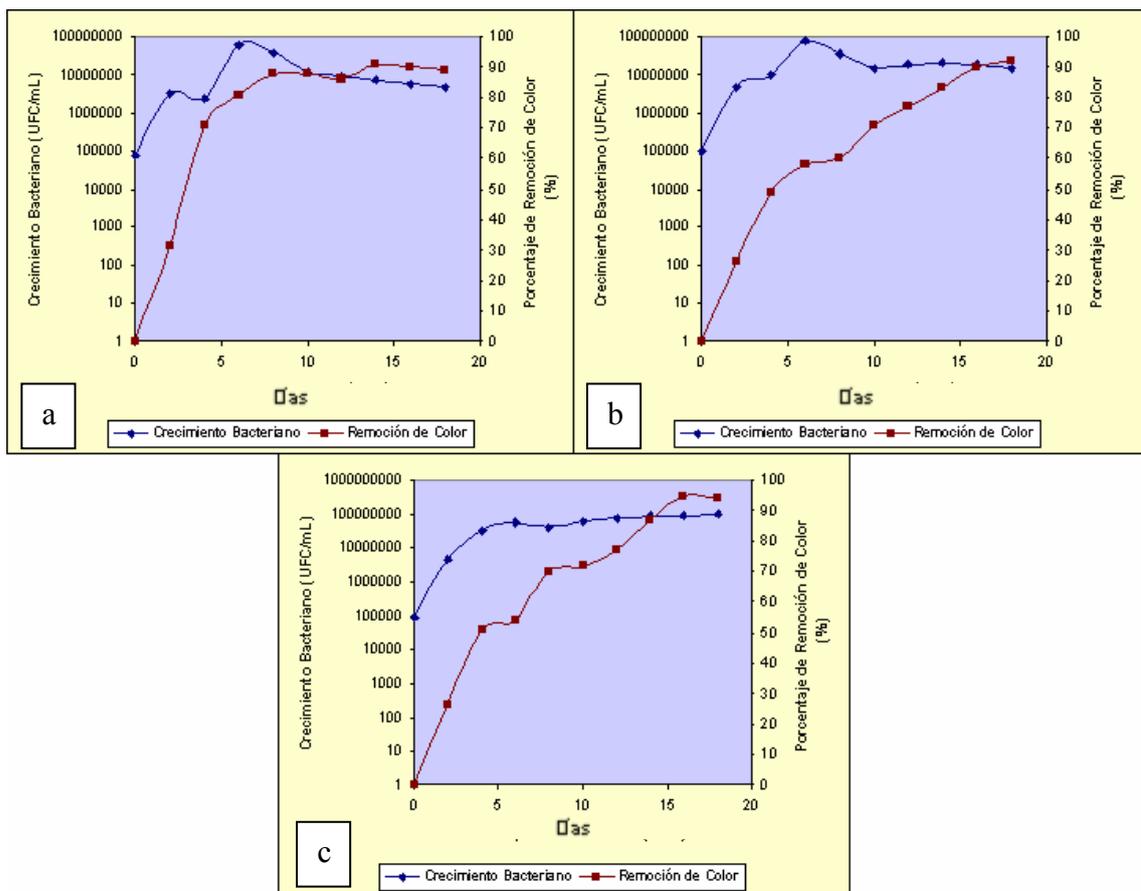
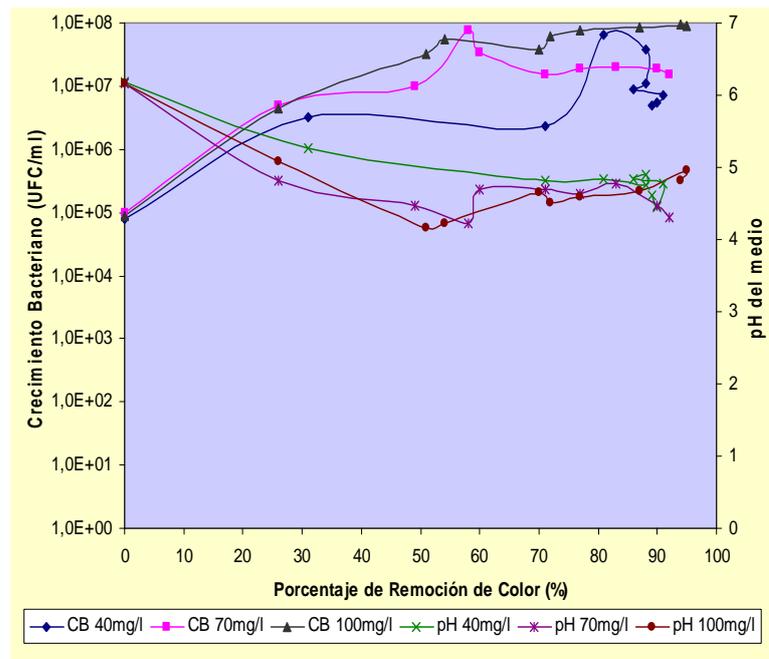


Figura 3.13 Crecimiento bacteriano y porcentaje de remoción del colorante Amarillo Reactivo 84 en medios de cultivo con 5 g/L de glucosa en función del tiempo de incubación. a) Medios con 40 mg/L de colorante. b) Medios con 70 mg/L de colorantes. c) Medios con 100 mg/L de colorante.

En la Figura 3.14, se observa que a medida que el inóculo crecía y el porcentaje de remoción del medio con 5g/L de glucosa aumentaba, el pH del medio disminuía. La curva correspondiente al pH de los medios con 40 mg/L de colorante (pH 40 mg/L) establece que el pH del medio baja hasta 4,62 cuando se logra 89% de remoción de

color. La curva de pH de los medios con 70 mg/L de colorante (pH 70 mg/L) indica que el pH baja a 4,3 cuando se logra 92% de remoción de color del medio de cultivo. La curva que describe a la variación de pH de los medios con 100 mg/L de colorante (pH 100 mg/L) destaca que a 51% de remoción de color, el medio tiene un pH de 4,17 y aumenta hasta 4,95 y 95% de remoción de color.



CB: Crecimiento Bacteriano, (40, 70, 100 mg/L): Concentraciones de Colorante-

Figura 3.14 Crecimiento del inóculo bacteriano compuesto y variación del pH del medio de cultivo con 5 g/L de glucosa en función del porcentaje de remoción de color Amarillo Reactivo 84 durante 16 días de incubación.

La Tabla 3.9 presenta resultados obtenidos de las pruebas realizadas para determinar la influencia del pH en la remoción de color del medio. Los ensayos 1 y 2 se realizaron para descartar la remoción de color debido a la acidez del medio. De los resultados observados en el ensayo 1 se destaca un valor máximo de pérdida de color de 0,33% y del ensayo 2 se observa un valor máximo de pérdida de color de 1,21 %.

Tabla 3.9 Porcentaje de Pérdida de Color Amarillo Reactivo 84 debida al cambio de pH en el medio de cultivo bacteriano. Valor Negativo: Ganancia de Color.

Ensayo 1			
Medios con 5 g/L de glucosa			
	Medio inoculado luego de 14 días de incubación (CONTROL)	Medio inoculado luego de 14 días de incubación con NaOH 1N	% de Pérdida de Color
Concentración de colorante (mg/L)	100	100	0,15
Abs (410nm)	0,080	0,078	
Ph	3,810	5,920	
Concentración de colorante (mg/L)	70	70	-0,20
Abs (410nm)	0,078	0,080	
pH	4,300	6,230	
Concentración de colorante (mg/L)	40	40	0,33
Abs (410nm)	0,068	0,066	
pH	4,620	6,700	
Ensayo 2			
Medios con 5 g/L de glucosa			
	Medio inicial sin inocular CONTROL	Medio inicial sin inocular HCl 1N	% de Pérdida de Color
Concentración de colorante (mg/L)	100	100	1,21
Abs (410nm)	1,317	1,301	
pH	6,170	4,180	
Concentración de colorante (mg/L)	70	70	0,51
Abs (410nm)	0,978	0,973	
pH	6,160	3,130	
Concentración de colorante (mg/L)	40	40	1,00
Abs (410nm)	0,601	0,595	
pH	6,190	4,580	

3.3.3 Remoción de colorante Rojo Reactivo 141

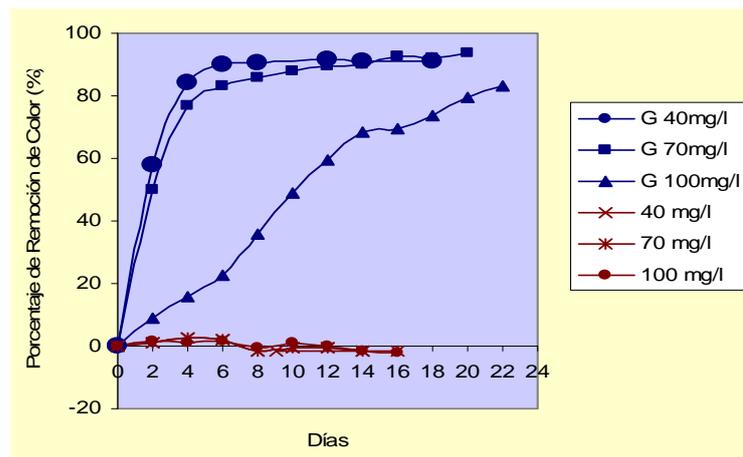
Se determinó la capacidad del inóculo bacteriano compuesto para remover Rojo Reactivo 141 del medio de cultivo en presencia y ausencia de glucosa en condiciones aerobias. La evaluación estadística de los datos de remoción de color obtenidos en los medios con tres concentraciones (40, 70, 100 mg/L) del colorante y 5 g/L de glucosa en agitación, indicó la diferencia significativa entre los tratamientos ($p = 1,637 \times 10^{-6}$) siendo los porcentajes de remoción de color obtenidos en los medios con 70 y 40 mg/L de colorante iguales entre sí y mayores que el porcentaje de remoción de color obtenido en los medios con 100 mg/L de colorante.

Tabla 3.10 Subconjuntos homogéneos que representan a los porcentajes de remoción de color obtenidos por concentración de Rojo Reactivo 141 en medios con 5 g/L de glucosa (n=3).

Concentración de Colorante	Porcentaje de Remoción de Color	Subconjuntos
40 mg/L	89,440	a
70 mg/L	87,673	a
100 mg/L	69,622	b
$p = 1,637 \times 10^{-6}$		

En la Figura 3.15 se observan las curvas que describen los porcentajes de remoción de distintas concentraciones de colorante Rojo Reactivo 141 en función del tiempo de incubación de los medios de cultivo con 5g/L de glucosa inoculados con el inóculo bacteriano compuesto en agitación. En los medios con 40 mg/L de colorante se observó 90% de remoción de color a los 6 días de incubación manteniéndose este valor con ligeras variaciones ($\pm 2\%$) durante los siguientes 12 días de duración del ensayo. En los medios con 70 mg/L se obtuvo 88% a los 10 días de incubación. Los medios con 100 mg/L de colorante presentaron una remoción de 83% de color en 22 días de incubación.

Las curvas de remoción de color indicadas en la Figura 3.15 describen que la remoción de color en ausencia de glucosa no es representativa en comparación con la remoción de color obtenida en los medios con presencia de glucosa.



G: Medios de Cultivo con 5g/L de glucosa.

Figura 3.15 Remoción de color obtenido en los medios de cultivo con colorante Rojo Reactivo 141 en función del tiempo de incubación con el inóculo bacteriano compuesto en agitación a 35°C. Las curvas de color azul corresponden al ensayo con 5 g/L de glucosa y las curvas de color rojo corresponden al ensayo con 0 g/L de glucosa.

Al realizar el análisis estadístico de los porcentajes de remoción de color obtenidos en los medios sin glucosa y tres concentraciones (40, 70, 100 mg/L) de colorante Rojo Reactivo 141, se determinó que no existe diferencia entre los tratamientos ($p = 0,174$).

Tabla 3.11 Subconjuntos homogéneos que representan a los porcentajes de remoción de color obtenidos por concentración de Rojo Reactivo 84 en medios con 0 g/L de glucosa (n=3).

Concentración de Colorante	Porcentaje de Remoción de Color	Subconjuntos
40 mg/L	-0,690	a
70 mg/L	-1,381	a
100 mg/L	-1,452	a
p = 0,174		

En la figura 3.16 se observa la diferencia entre la remoción de color obtenida en los medios con 5 g/L de glucosa y los medios con 0 g/L de glucosa. El precipitado observado en los tubos probablemente corresponda a la biomasa que adsorbió el color del medio de cultivo.

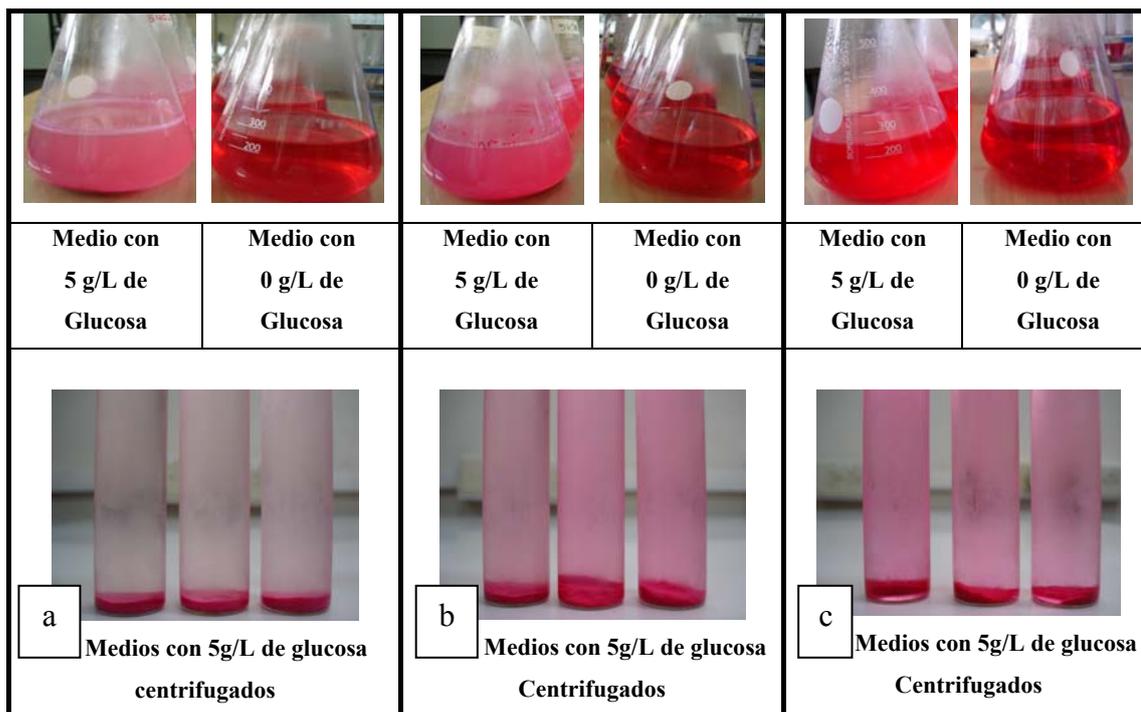


Figura 3.16 Diferencia en la coloración de los medios de cultivo con colorante Rojo Reactivo 141 en ausencia y presencia de glucosa después de 14 días de incubación a 35°C y 45 rpm de agitación. a) Medios con 40 mg/L de colorante, b) Medios con 70 mg/L de colorante, c) Medios con 100 mg/L de colorante

3.3.3.1 Determinación de la acción bacteriana en la remoción de Rojo Reactivo 141

El crecimiento bacteriano y pH del medio se evaluó para determinar la acción bacteriana en la remoción de color durante la incubación. De los conteos bacterianos por siembra profunda se evaluó principalmente microorganismos de crecimiento en agar de conteo en 48 horas de incubación.

En la Figura 3.17 se puede observar las diferentes curvas obtenidas de crecimiento bacteriano y remoción de color obtenida en los medios de cultivo con tres distintas concentraciones de colorante Rojo Reactivo 141 en presencia de glucosa y agitación en función del tiempo de incubación.

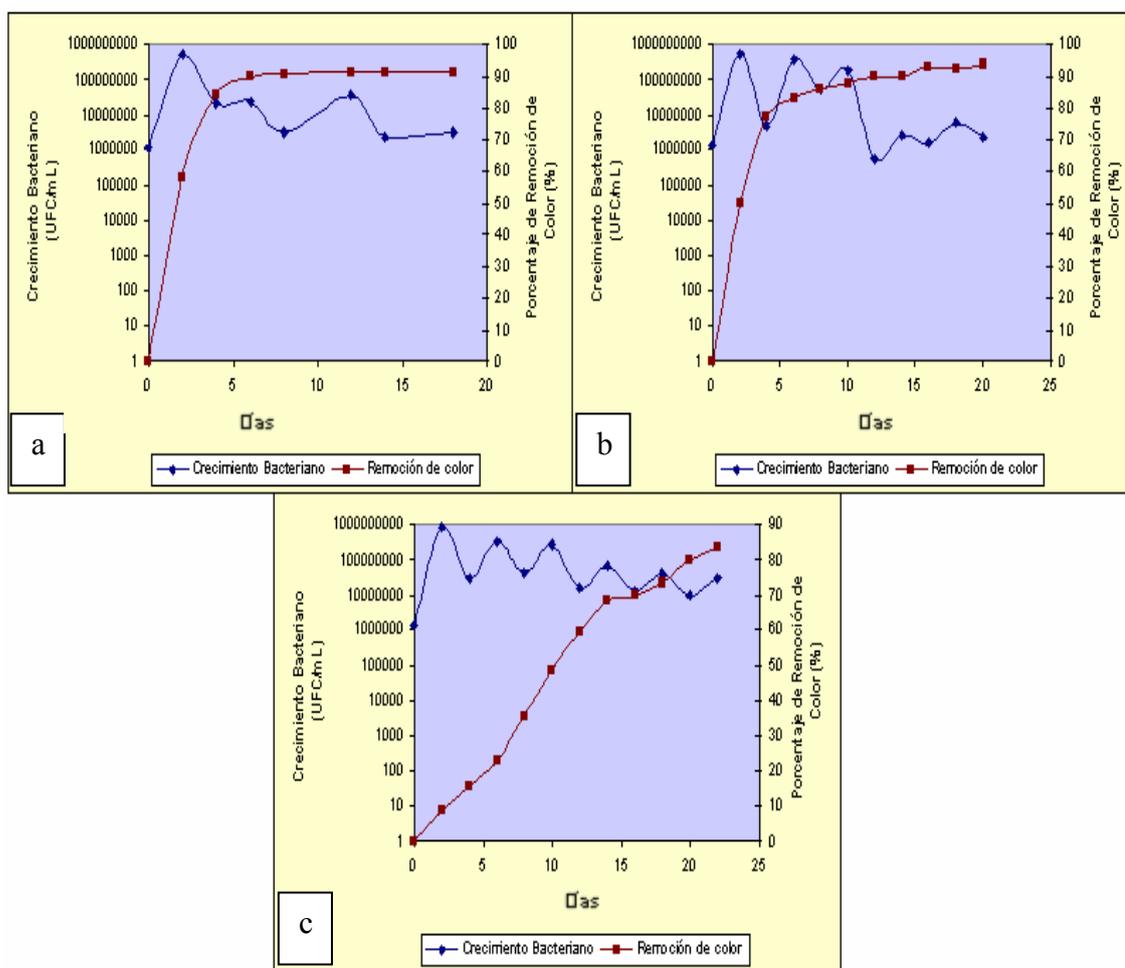
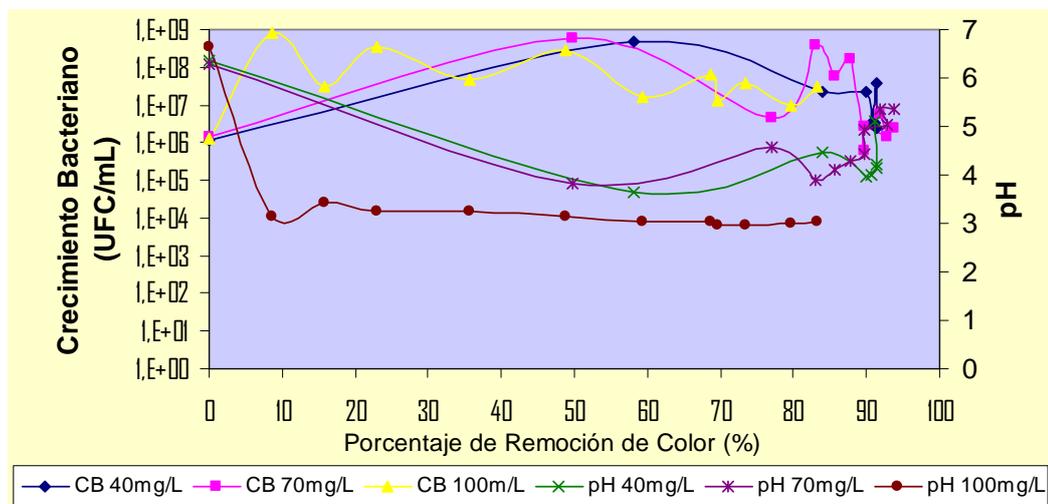


Figura 3.17 Crecimiento bacteriano y porcentaje de remoción del colorante Rojo Reactivo 141 en medios de cultivo con 5 g/L de glucosa en función del tiempo de incubación. a) Medios con 40 mg/L de colorante. b) Medios con 70 mg/L de colorantes. c) Medios con 100 mg/L de colorante.

En los medios con 40 mg/L de colorante se observó que el inóculo creció de $1,2 \times 10^6$ UFC/mL a $4,7 \times 10^8$ UFC/mL y logró 58% de remoción de color, a partir de lo cual decreció hasta hasta $3,3 \times 10^6$ UFC/mL logrando un 91% de remoción de color del medio. En los medios con 70 mg/L se observó que el inóculo creció de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL hasta $5,7 \times 10^8$ UFC/mL logrando una remoción de color de 50%, decreció hasta $2,4 \times 10^6$ UFC/mL cuando el medio tuvo 94% de remoción de color. En los medios de cultivo con 100 mg/L de colorante, el inóculo creció inicialmente desde $1,3 \times 10^6$ UFC/mL hasta 8×10^8 UFC/mL con una remoción de color de 9% y cuando el medio tuvo 83% de remoción de color, la población bacteriana estimada fue de $2,2 \times 10^7$ UFC/mL.

En la figura 3.18 se observa que a medida que se dio la remoción de colorantes Rojo reactivo 84 del medio de cultivo con 5g/L de glucosa, el inóculo bacteriano compuesto se mantuvo vivo mientras el pH del medio disminuyó. En los medios con 40 mg/L de colorante, el pH del medio bajó de 6,27 a 5,09 cuando la remoción de color alcanzada en el medio fue de 91%. En los medios con 70mg/L de colorante se observó que inicialmente el pH del medio bajó de 6,29 a 5,37 cuando la remoción de color fue de 94%. En los medios con 100mg/L de colorante, el pH del medio bajó desde 6,66 hasta 3,03 cuando tuvo 83% de remoción de color.



CB: Crecimiento Bacteriano, (40, 70, 100 mg/L): Concentraciones de Colorante.

Figura 3.18 Crecimiento del inóculo bacteriano compuesto y variación del pH del medio de cultivo con 5 g/L de glucosa en función del porcentaje de remoción de color Rojo Reactivo 141 durante 22 días de incubación.

La Tabla 3.12 presenta los resultados obtenidos de las pruebas realizadas para determinar la influencia del pH en la remoción del colorante Rojo Reactivo 141 presente en el medio de cultivo en diferentes concentraciones (40, 70, 100 mg/L) en presencia de glucosa. De los resultados observados en el ensayo 1 se destaca un valor máximo de pérdida de color de 0,29% y en el ensayo 2 se observa un valor máximo de pérdida de color de 0,51%.

Tabla 3.12 Porcentaje de pérdida de color Rojo Reactivo 141 debida al cambio de pH en el medio. Valor Negativo: Ganancia de Color.

Ensayo 1			
Medios con 5 g/L de glucosa			
	Medio inoculado luego de 14 días de incubación (CONTROL)	Medio inoculado luego de 14 días de incubación Con NaOH 1N	% de Pérdida de Color
Concentración de colorante (mg/L)	100	100	0,29
Abs (530nm)	0,461	0,456	
pH	2,973	7,680	
Concentración de colorante (mg/L)	70	70	0,17
Abs (530nm)	0,168	0,166	
pH	5,350	6,610	
Concentración de colorante (mg/L)	40	40	0,16
Abs (530nm)	0,056	0,055	
pH	5,090	6,600	
Ensayo 2			
Medios con 5g/l de glucosa			
	Medio inicial sin inocular CONTROL	Medio inicial sin inocular con HCl 1N	% de Pérdida de Color
Concentración de colorante (mg/L)	100	100	0,23
Abs (530nm)	1,737	1,733	
pH	6,660	2,730	
Concentración de colorante (mg/L)	70	70	0,51
Abs (530nm)	1,171	1,165	
pH	6,290	4,130	
Concentración de colorante (mg/L)	40	40	-0,64
Abs (530nm)	0,625	0,629	
pH	6,370	5,290	

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

Para la aplicación de un tratamiento biológico para la remediación de aguas residuales textiles cuyo mayor contaminante es su alto contenido de colorantes se debe inicialmente obtener microorganismos que sean capaces de adaptarse a los contaminantes en estudio y degradarlos. Esta investigación estuvo orientada a la obtención de un inóculo bacteriano compuesto con potencial de remover tres colorantes reactivos azo (Rojo reactivo 141, Azul navy 171 y Amarillo reactivo 84) en conjunto y por separado en un medio de cultivo sintético y líquido en presencia y ausencia de glucosa bajo condiciones aerobias.

4.1 Importancia del muestreo en la selección del inóculo bacteriano compuesto

Entre el 20-50% de los colorantes reactivos utilizados en la industria textil son evacuados directamente en su efluente, por lo que en el suelo contaminado por efluentes textiles probablemente existen microorganismos capaces de remover los colorantes que existen en el medio para su sobrevivencia. Basado en este criterio, en la presente tesis se realizó un muestreo dirigido en un área de suelo contaminado por agua residual textil dividida de acuerdo a factores como la visibilidad del área de un derrame de químicos, los cambios en el color del suelo, las áreas de perturbación física o las áreas con vegetación muerta (González, 1985). Las zonas seleccionadas de suelo en este estudio se caracterizaron por estar expuestas constantemente y por largos periodos de tiempo con el efluente residual textil y en consecuencia a una variedad de colorantes con diferentes grupos cromofóricos. Con esto, se aseguró la existencia de microorganismos con una alta probabilidad de sobrevivir en presencia de colorantes y se logró obtener inóculos de las muestras de suelo colectadas (Muestra 1 y Muestra 3) que fueron capaces de remover color de medios líquidos con colorantes reactivos azo.

De igual manera, Khadijah y colaboradores en el 2009 aislaron bacterias provenientes de suelo contaminado por agua residual textil, lodo activado de una planta de tratamiento de efluentes textiles y agua residual textil y obtuvieron cultivos bacterianos puros y consorcios con una alta capacidad de remover una variedad de

colorantes de un medio líquido en condiciones estáticas. Oranusi en el 2005 reportó bacterias aisladas de suelo capaces de remover color de medios líquidos con diferentes tipos de colorantes.

4.2 Inóculo bacteriano compuesto, un cultivo mixto.

El inóculo bacteriano compuesto, al provenir de una fuente natural de suelo, puede estar constituido por diferentes poblaciones de microorganismos que podrían interrelacionarse positivamente para remover los colorantes reactivos. En este trabajo, el inóculo bacteriano seleccionado y utilizado para la experimentación es un cultivo mixto aerobio o facultativo, mesófilo y heterótrofo aislado de una muestra de suelo contaminado por agua residual textil compuesto por la variada microbiota del medio ambiente. La capacidad de remoción de color presentada por el inóculo puede deberse a una relación sinérgica o a un cometabolismo existente entre las poblaciones bacterianas que conforman el cultivo.

En la interacción sinérgica, dos o más poblaciones se aportan mutuamente nutrientes que les son necesarios para realizar actividades que no podrían llevar a cabo por separado como la síntesis de un producto a partir de un sustrato como los colorantes, concluir una vía metabólica que de otra manera no se completaría y producir enzimas que no haría ninguna de las poblaciones por separado. Se basa en la capacidad de una población de suministrar factores de crecimiento a otra y en la capacidad de una población de acelerar la tasa de crecimiento a otra (Atlas *et al.*, 2005).

En el cometabolismo se transforma un co-sustrato, como los colorantes, en presencia obligada de un sustrato, como la glucosa, mediante secuencias metabólicas complementarias entre múltiples especies microbianas. El cosustrato no aporta con energía, carbono, o algún otro nutriente mientras que el sustrato de crecimiento actúa como un donador de electrones que proporciona poder reductor y energía para el crecimiento y mantenimiento celular. La presencia del cosustrato no induce la actividad de las enzimas involucradas en su transformación, pues es una transformación colateral a la degradación del sustrato el cual sí induce la actividad enzimática (García *et al.*, 2008).

4.3 Eficiencia del inóculo bacteriano compuesto en la remoción de colorantes

En condiciones aerobias de crecimiento, diferentes especies bacterianas tienen la capacidad de remover colorantes reactivos de un medio de cultivo sintético. Khadijah en el 2009 obtuvo un consorcio aislado de muestras de suelo y agua contaminadas por efluentes textiles y conformado por bacterias clasificadas tentativamente en el género *Chryseobacterium* y el género *Flavobacterium*, que logró un 26% de remoción de 50 mg/L de una mezcla de colorantes reactivos azo en 3 días bajo condiciones agitadas. Olukanni y colaboradores (2006) seleccionaron bacterias de suelo expuesto a descargas líquidas municipales con capacidad de remover color de un medio sintético suplementado con almidón y levadura y una concentración total de 56mg/L de mezcla de colorantes reactivos textiles. El conjunto bacteriano estaba constituido por *Bacillus* y presentó un potencial de decoloración de 43.95 ± 0.91 % en 14 días de incubación bajo condiciones aerobias.

El inóculo bacteriano compuesto en el presente proyecto de tesis demostró una capacidad de remoción de color de 95% en medios suplementados con glucosa y 120 mg/L de una mezcla de 3 colorantes reactivos azo de elevado peso molecular (40 mg/L de cada colorante) con agitación manual cada 24 horas después de 6 días de incubación. Se puede observar que el inóculo bacteriano obtenido en la presente tesis es más eficiente en tiempo, porcentaje de remoción de color y concentración de colorante removido que el consorcio obtenido por Olukanni y remueve en mayor porcentaje y concentración de colorante que el inóculo aislado por Khadijah. Estos resultados son equivalentes con lo obtenido en este proyecto de tesis por las condiciones de agitación en que la experimentación fue desarrollada, más difieren en los tipos de colorantes utilizados y las fuentes de las que se aislaron cada uno de los consorcios.

Algunos colorantes son resistentes a la degradación bacteriana debido a las diferencias en su estructura molecular (Khadijah *et al.*, 2009). Los colorantes utilizados en ésta investigación, Azul Navy 171, Rojo Reactivo 141 y Amarillo Reactivo 84, son colorantes con elevado peso molecular, alto contenido de sustituyentes y son difíciles de degradar. Sin embargo, el inóculo bacteriano fue capaz de remover, en condiciones de agitación continua, el 95% del color de un medio con 120 mg/L de mezcla de los tres colorantes y más del 90% del color de medios con concentraciones de hasta 100 mg/L

de cada colorante por separado, a excepción del colorante Rojo reactivo 141 que en 100 mg/L fue removido hasta 83%.

En el caso del colorante Rojo Reactivo 141 se puede observar que a medida que la concentración de colorante se incrementa en el medio de cultivo se obtiene un decremento de la remoción de color, lo cual se podría atribuir a la toxicidad del colorante para las bacterias por la saturación de las células con los productos de la degradación del colorante, inactivación del sistema de transporte del colorante o el bloqueo de los sitios activos de las azoreductasas por las moléculas del colorante (Mabrouk *et al.*, 2008).

4.4 Posible mecanismo de remoción de color por acción del inóculo bacteriano compuesto

Algunos factores pueden influenciar en la decoloración de un medio líquido. Sin embargo, en este trabajo, un importante factor abiótico como el pH del medio no influyó en la remoción de color obtenida por lo que probablemente la remoción de color puede deberse a biodegradación y/o bioadsorción del inóculo bacteriano compuesto. En los medio control (medio con colorante sin inocular) tanto con los colorantes en conjunto como por separado, no se observó crecimiento bacteriano ni decoloración del medio, lo cual indica que la remoción de color es debida a la actividad metabólica de los organismos y no debido a factores abióticos (Orunasi *et al.*, 2005).

De acuerdo a San Juan y colaboradores (1998), la fase estacionaria de crecimiento bacteriano probablemente represente con mayor fidelidad el estado metabólico real de los microorganismos en su ambiente natural pues es aquella en la cual las poblaciones bacterianas normalmente viven en la naturaleza. En esta fase de crecimiento, las bacterias suelen ser más resistentes a agentes físicos como el calor, frío, radiación y químicos. Esto se explica por que en la fase estacionaria de crecimiento bacteriano aunque no hay crecimiento, ocurren funciones celulares, incluyendo el metabolismo bioenergético y algunos procesos biosintéticos por lo que se produce una acumulación y liberación de metabolitos secundarios que pueden tener importancia industrial. En ésta fase, un nutriente esencial del medio de cultivo se acaba o algún producto de desecho se acumula en el medio hasta que alcanza una concentración inhibitoria de crecimiento

exponencial y generalmente las bacterias recurren a fuentes alternativas como aminoácidos utilizándolos como fuente de carbono una vez agotados los hidratos de carbono (Rittmann *et al.*, 2001) o podrían, en el caso de este trabajo, utilizar los colorantes presentes en el medio de cultivo ya sea por una relación sinérgica o cometabolismo.

En éste trabajo, en los medios suplementados con glucosa y mezcla de colorantes, 95% del colorante es removido del medio durante la fase estacionaria de crecimiento del inóculo bacteriano seleccionado (Ver Figura 3.4), que para el caso de ésta investigación se da durante los primeros cinco días de incubación con agitación manual cada 24 horas. Así mismo, al comparar los resultados de remoción de color obtenidos en los medios suplementados con glucosa y con cada colorante por separado en condiciones de agitación continua se puede observar que la mayor remoción de color se da en la fase estacionaria de crecimiento en el caso de los colorantes Amarillo Reactivo 84 (Ver Figura 3.13) y Rojo Reactivo 141 (Ver Figura 3.17). En cuanto a la remoción del colorante Azul Navy 171, más del 80% del color es removido en la fase exponencial de crecimiento bacteriano (Ver Figura 3.9).

Resultados similares obtuvieron Mabrouk y colaboradores (2008) quienes determinaron que alrededor del 25% del color fue removido del medio en las primeras 6 horas durante el crecimiento exponencial de las bacterias, mientras que el color restante fue removido durante la fase estacionaria de crecimiento. De igual manera, Oranusi y Mbah en el 2005 obtuvieron de una muestra de suelo contaminado por agua residual textil, un cultivo bacteriano capaz de remover del 56-75% de color del medio durante la fase estacionaria de crecimiento, al séptimo día de incubación.

Sin embargo, aunque es probable que la remoción de color obtenida en los medios de cultivo con los colorantes en estudio se deba al metabolismo del inóculo bacteriano no se descarta la adsorción del colorante por la biomasa celular producida en el medio a lo largo del crecimiento bacteriano. De acuerdo a Suizhou (2006), Chen (1999) y Mabrouk (2008), en la adsorción, la biomasa se convierte fuertemente coloreada por la adsorción del colorante, mientras que la biomasa que mantiene su color original describe un mecanismo biodegradativo del colorante. Por lo tanto, se puede corroborar el criterio de que un probable mecanismo utilizado por el inóculo bacteriano

en este trabajo es adsorción, pues tanto en los medios con los colorantes en conjunto como por separado, se puede observar una biomasa fuertemente coloreada a lo largo del crecimiento bacteriano y remoción del colorante.

4.5 Factores que afectan la remoción de color por acción bacteriana

4.5.1 Efecto de la concentración bacteriana en la remoción de color

La concentración del inóculo es uno de los factores más significantes en la remoción de color en un medio líquido. Mabrouk y colaboradores en el 2008 demostraron que una concentración de inóculo correspondiente a 6% del medio total era el tamaño óptimo para la degradación de colorantes y consiguieron un 99% de remoción de colorante en 6 h de incubación. Otros investigadores como Khalid (2008), con una concentración de inóculo añadido en una relación 50:1 alcanzando aproximadamente una densidad celular de 1×10^7 UFC/mL lograron una completa decoloración del medio con 100 mg/L de diferentes colorantes azo en 4 a 8 h dependiendo del colorante.

En el caso de este trabajo, la densidad celular del inóculo inicial añadido para los ensayos dispuestos para los tres colorantes es de aproximadamente 1×10^4 UFC/mL, en una relación de 1:100 con respecto al medio de cultivo, es decir 1% del medio total, con lo cual se puede decir que el tamaño de inóculo en relación a lo recomendado por bibliografía es pequeño y se obtiene un 95% de remoción de color en nueve días de incubación. Por lo tanto, se recomienda para obtener resultados de decoloración más eficientes, que la concentración del inóculo sea añadido en mayor proporción para posteriores estudios.

4.5.2 Efecto de las condiciones aerobias en la remoción de color

Las condiciones aerobias (agitación 45rpm) en las que se desarrolló este trabajo fueron adecuadas para que el inóculo bacteriano compuesto remueva eficazmente el color del medio de cultivo sintético. A los 5 días de incubación en el medio con mezcla de colorantes se obtuvo aproximadamente el 90% de remoción de color con agitación manual cada 24 horas, mientras que en los medios con los colorantes por separado con agitación continua se obtuvo aproximadamente el 90% de remoción entre los 8 y 22 días de incubación, dependiendo del colorante y su concentración en el medio. Los

resultados demuestran que la aireación continua del medio incrementa el tiempo requerido para una decoloración eficiente comparado con el tiempo requerido en condiciones de menor aireación.

Este es el caso de Chen (1999) y Khadijah (2009) quienes aislaron bacterias que alcanzaron entre 75 y 100% de remoción de los colorantes por separado y en conjunto en condiciones estáticas en 3 días de incubación, mientras que en condiciones de agitación, la remoción de color disminuyó en un 26% para todos los colorantes. Así mismo, Khalid en el 2008 determinó que en condiciones aireadas, la decoloración de colorantes después de 8 horas de incubación con *Shewanella putrefaciens* fue 14-30% menos que la decoloración lograda bajo condiciones estáticas.

Chen (2002) ha reportado que una mínima cantidad de oxígeno en cultivos aerobios facultativos es necesaria para mantener la actividad celular básica del consorcio bacteriano y así obtener una decoloración efectiva como lo obtenido en este trabajo. Khalid (2008) explica que la decoloración es mejor en condiciones bajas de oxígeno, pues existe competencia entre el oxígeno y los compuestos azo como transportadores de electrones reducidos. Por lo cual, para obtener una efectiva remoción de color, agitación y aeración vigorosa (mayor que 45 rpm) deben ser evitados pues mientras mayor agitación tenga el medio de cultivo mayor tiempo tomará el inóculo para remover color.

4.5.3 Efecto de la adición de una fuente alterna de carbono en la remoción de color

Los colorantes pueden ser utilizados como fuente de carbono y nitrógeno por los microorganismos pero una fuente alterna de carbono mejora la remoción de color por acción bacteriana. Chen (2002) determinó que la decoloración depende de la presencia de una fuente de carbono adicional, puesto que no se dio ninguna degradación detectable en presencia de colorante como única fuente de carbono. Cuando se aumentó una concentración de nutrientes adicional, la decoloración mejoró rápidamente. Zissi (1997) estableció que *Bacillus subtilis* no demostró crecimiento ni degradación en presencia de p-aminoazobenceno como única fuente de carbono por lo que fue necesaria la presencia de glucosa como fuente de carbono adicional ya que la remoción de color fue de 90% con 6 g/L de glucosa. Al igual que estos estudios, en este trabajo, la adición

de una fuente alterna como la glucosa fue necesaria para la decoloración del medio por acción bacteriana.

Estos resultados se explican por el metabolismo de la glucosa que resulta en la producción de nucleótidos reducidos (NADH, FADH) con lo cual se mejora la eficiencia en la decoloración pues son mediadores redox que intervienen en la reducción del enlace azo (Mabrouk *et al.*, 2008).

4.5.4 Efecto del pH del medio en la remoción de color

La influencia de la variación del pH del medio de cultivo en la remoción de color fue determinada para demostrar la acción bacteriana en la remoción. En las pruebas realizadas para comprobar que el pH del medio no influye en la decoloración como factor abiótico, el espectro visible de absorción de los medios sin inocular fue medido entre pH de 3 y 7, y se vio que el pH no afecta, tanto para los medios con mezcla de colorantes como con los colorantes por separado. Por lo que se sugiere que la remoción de color lograda en los medios de cultivo con los colorantes reactivos en estudio es debido a la acción del inóculo bacteriano compuesto.

Resultados equivalentes fueron obtenidos por Chen en el 2009 y Mahmoud en el 2007 quienes demostraron que el pH en un rango de prueba de 1-13 no afecta a la estabilidad y medición colorimétrica del colorante Remazol Brillante.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

- De la colección de muestras de suelo que presentaron gran contaminación de un efluente textil, se obtuvieron dos inóculos bacterianos compuestos que presentaron capacidad de remoción de color de un medio de cultivo sintético con la mezcla de 40 mg/L de cada colorante reactivo azo en estudio (Azul Navy 171, Amarillo 84 y Rojo 141) (Ver Figura 3.1).
- El inóculo bacteriano compuesto de la muestra de suelo 3 fue seleccionado por ser capaz de remover 95% de color de un medio de cultivo con mezcla de 40 mg/L de los tres colorantes en estudio a los 6 días de incubación en condiciones aerobias.
- El inóculo bacteriano compuesto fue activado y preservado en medio mínimo salino, con 5 g/L de glucosa, 35°C y agitación de 45 rpm, condiciones en las que el inóculo se caracterizó por crecer en 24 horas exponencialmente hasta $5,15 \times 10^6$ UFC/ml y mantenerse en fase estacionaria durante 42 horas, a partir de lo cual empezó su decrecimiento (Ver Figura 3.6).
- El inóculo bacteriano compuesto fue capaz de remover en condiciones aerobias diferentes concentraciones del colorante Azul Navy 141 (92% de 100 mg/L, 86% de 70 mg/L y 82% de 40 mg/L) en ocho días de incubación (Ver Figura 3.7).
- El inóculo bacteriano compuesto fue capaz de remover en condiciones aerobias diferentes concentraciones del colorante Amarillo reactivo 84 (95% de 100 mg/L en 16 días, 91% de 70 mg/L en 16 días y 91% de 40 mg/L en 14 días de incubación) (Ver Figura 3.11).
- El inóculo bacteriano compuesto fue capaz de remover en condiciones aerobias diferentes concentraciones del colorante Rojo reactivo 141 (83% de 100 mg/L en 22 días de incubación, 88% de 70 mg/L en 10 días y 90% de 40 mg/L en 6 días de incubación) (Ver Figura 3.15).

- Una fuente alterna de carbono en los medios de cultivo con los colorantes reactivos azo en estudio fue necesaria para que el inóculo bacteriano remueva el color de medios con los colorantes en estudio (Ver Figuras 3.7, 3.11 y 3.15).
- La remoción de colorantes en los medios de cultivo sintético no se debió a la acidificación del medio de cultivo en los ensayos realizados (Ver Tablas 3.3, 3.6, 3.9 y 3.12).
- Las condiciones aerobias establecidas en la experimentación fueron adecuadas para la remoción de color lograda por el inóculo bacteriano de los medios de cultivo con los tres colorantes reactivos azo.

CAPÍTULO 6

RECOMENDACIONES

- Caracterizar el inóculo bacteriano compuesto y establecer si es un cultivo puro o un cultivo mixto y las relaciones existentes entre las poblaciones bacterianas.
- Establecer el mejor tamaño de inóculo para obtener resultados de remoción de color en menor tiempo.
- Probar la capacidad del inóculo bacteriano para remover colorantes en agua residual textil.
- Determinar la mejor fuente de carbono alterna para potenciar la capacidad del inóculo en la remoción de color de medios líquidos.
- Caracterizar el posible mecanismo de remoción de color en los medios de cultivo por acción del inóculo bacteriano compuesto.
- Caracterizar los productos de la remoción de color por acción bacteriana en el medio de cultivo sintético.
- Realizar pruebas de toxicidad del medio de cultivo obtenido después de la remoción de color lograda por el inóculo bacteriano.

CAPÍTULO 7

BIBLIOGRAFÍA

Atlas R. Bartha R. 2005. Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental. Pearson Addison Wesley. Cuarta Edición. España. pp. 59-74.

Ballester A. 2009. Biohidrometalurgia aplicada a la obtención de metales y a la descontaminación de suelos y efluentes líquidos. Dpto. de Ciencia de Materiales e Ingeniería Metalúrgica Facultad de CC. Químicas. Universidad Complutense de Madrid.

Barragán B. Costa C. Márquez M. 2007. Biodegradation of azo dyes by bacteria inoculated on solid media. Dyes and Pigments. Vol. 75. pp. 73-81.

Bermeo F. 2005. Proyecto parques industriales de Quito y la región de la dinámica industrial y productiva de Quito. Conquito. Municipio del Distrito Metropolitano de Quito. Pp. 5-25.

Blümel S. Knackmuss H. Stolz A. 2002. Molecular cloning and characterization of the gene coding for the aerobic azoreductase from *Xenophilus azovorans* KF46F. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 68. No. 8. Pág 3948–3955.

Buitrón G., Quezada M., Moreno G. 2004. Aerobic degradation of the azo dye acid red 151 in a sequencing batch biofilter. Bioresource Technology. Vol. 92. pp. 143 –149

Cegarra J. 1980. Colorantes reactivos. Fundamentos Científicos y Aplicados de la Tintorería de Materiales textiles. Barcelona. Universidad Politécnica de Barcelona. pp. 499-503.

Chen (a) K. Huang W. Houg J. Wu J. 1999. Microbial decolorization of azo dyes by *Proteus mirabilis*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. Vol. 23. pp. 686-690.

Chen (b) M. Liu H. Wang J. Wang Y. 2002. Influence of supplemental nutrient on aerobic decolorization of acid red 14 in activated sludge. J.Environ.Sci.Health. Vol. A37(4). pp. 667 –678.

Coughlin M., Kinkle B., Bishol P. 1999. Degradation of azo dyes containing aminonaphtol by *Sphingomonas* sp strain 1CX. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. Vol. 23. pp. 341-346.

Cserháti T. 2007. Liquid chromatography of natural pigments and synthetic dyes. Elsevier Ed. p. 434

Da Ros Giuseppina. 1995. La contaminación de Aguas en Ecuador: Una aproximación económica. pp. 139-144.

Ferramola A. y Sancovich H. 2006. Interacciones de las radiaciones electromagnéticas y especies reactivas del oxígeno sobre la piel. Revista Argentina de Dermatología. Vol. 87. pp. 2.

García M. y Peralta M. 2008. Cometabolismo en la biodegradación de hidrocarburos. Revista Mexicana de Ingeniería Química. Vol. 7. N°001. pp 1-12.

Haig T. 2001. Biological treatment of a synthetic dye water and an industrial textile wastewater containing azo dye compounds. Master degree. Thesis. Blacksburg. Virginia. pp. 14.

Itoh K. Kitade Y. Nakanishi M. Yatome C. 2002. Decolorization of methyl red by a mixed culture of *Bacillus* sp. and *Pseudomonas stutzeri*. Journal of Environment, Science and Health. Vol. A37(3). pp. 415-421.

JAGSON COLORCHEM LIMITED. 2009. Reactive Dyes. [en línea] http://www.jagson.com/reactive_dyes.htm. [Fecha de Consulta: 19 de julio de 2009]

Jiang H. Tay J. Tay S. 2004. Changes in structure activity and metabolism of aerobic granules as a microbial response to high phenol loading. Applied Microbiology and Biotechnology. pp. 602-608.

Khadijah O. Lee K. y Mohd Faiz F. 2009. Isolation, screening and development of local bacterial consortia with azo dyes delectourising capability. Malaysian Journal of Microbiology. Vol 5(1). pp. 25-32.

Chen K. Wu J. Liou D. Hwang S. 2003. Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains. Journal of Biotechnology. Vol. 101. pp. 57-68.

Senan R. Abraham T. 2004. Bioremediation of textile azo dyes by aerobic bacterial consortium. Biodegradation. Vol. 15. pp. 275-280.

Khalid (a) A. Arshad M. Crowley D. 2008. Accelerated decolorization of structurally different azo dyes by newly isolated bacterial strains. Appl Microbiol Biotechnol. Vol. 78. pp. 361-369.

Khalid (b) A. Arshad M. Crowley D. 2008. Decolorization of azo dyes by *Shewanella* sp. Under saline conditions. Appl Microbiol Biotechnol. Vol. 79. pp.1053-1059.

Keung M. 1997. Bacterium useful in the removal of sulphur black dye from a substrate. Patent Storm. US Patent 5610064.

Kulla H. 1981. Aerobic bacterial degradation of azo dyes, in: Microbial degradation of xenobiotics and recalcitrant compounds. Leisinger R., Hutter A., Cook M., Nuesch J. (Eds.). Proc.FEMS Sym. No.12. Academic Press. London. pp. 387 –399.

Leena R. y Selva Raj D. 2008. Bio-decolourization of textile effluent containing reactive black-b by effluent-adapted and non-adapted bacteria. African Journal of Biotechnology. Vol. 7 (18). pp. 3309-3313.

Liakou S. Zissi U. Kornaros M. Lyberatos G. 2003. Combined chemical and biological treatment of azo dye-containing wastewaters. Chem.Eng.Comm. Vol. 190. pp. 645- 661

Mabrouk M. Yusef H. 2008. Decolorization of fast red by *Bacillus subtilis* HM. Journal of Applied Sciences Research. Vol. 4(3). pp. 262-269.

Mahmoud A. Ghaly A. Brooks S. 2007. Influence of Temperature and pH on the Stability and Colorimetric Measurement of Textile Dyes. American Journal of Biotechnology and Biochemistry. Vol 3 (1). pp. 33-41.

Manikandan B. Ramamurthi V. Karthikeyan R. Sundararaman T. 2009. Biobleaching of textile dye effluent using mixed culture through an immobilized packed bed bio reactor (ipbbr). Modern Applied Science. Vol 3 (5). pp. 131-135.

Manjinder K. Harvinder S. Bhupinder C. Swapandeep C. 2005. Biotreatment of synthetic textile wastewater using anoxic-aerobic sequential bioreactor. Heleco '05. India.

Mansilla H. Lizama C. Gutarra A. Rodríguez J. 2001. Tratamiento de residuos líquidos de la industria de celulosa y textil. pp. 289.

Melnikov B. Morigonov. 1982. Clasificación técnica de los colorantes. Empleo de los Colorantes. Editorial Pueblo y Educación. Ciudad de la Habana. pp. 38.

Monge O. Guerrero P. Almendáriz J. 2009. Capacidad de adsorción del cobre utilizando un consorcio bacteriano aislado del río San Pedro, sonora. XXVIII Convención Minera Internacional. AIMMGM AC. Veracruz. pp. 464.

Moutaouakkil A. Zeroual Y. Dzayri F. Talbi M. Lee K. Blaghen M. 2003. Bacterial decolorization of the azo dye methyl red by *Enterobacter agglomerans*. Annals of Microbiology. Vol 53. pp. 161-169.

Olukanni O. Osuntoki A. Gbenle G. 2006. Textile effluent biodegradation potentials of textile effluent-adapted and non-adapted bacteria. African Journal of Biotechnology. Vol. 5 (20). pp. 1980-1984.

Oranusi M. y Mbah A. 2005. Utilisation of azo and tryphenylmethane dyes as sole source of carbon, energy and nitrogen by *Bacillus sp.* African Journal of Applied Zoology & Environmental Biology. Vol. 7. pp. 87-94.

Ozdemir G. Yasa Y. Pazarbasý B. Ersoy E. Karaboz I. Basaran B. Oral Bitlisli B. Sari O. 2007. Decolorization of the leather industry dyes by newly isolated bacterial strains. Turquía. pp. 1-10.

Pandey A. Singh P. Iyengar L. 2007. Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. International Biodeterioration & Biodegradation. Vol. 59. pp. 73 –84.

Raju N. Venkatamana G. Girish S. Raghavendra V. y Shivashankar P. 2007. Isolation and evaluation of indigenous soil fungi for decolourization of textile dyes. Journal of Applied Sciences. Vol. 7 (2). pp. 298-301.

Rittmann B. McMarty P. 2001. *Biotechnología del medio ambiente. Principios i aplicaciones*. McGraw Hill.

Sanjuán N. Almirón M. Kolter R. 1998. Escherichia coli libera vesículas con DNA durante la fase estacionaria. Medicina. Volumen 58. pp. 175.

Santos (a) A. Bisschops I. Cervantes F. van Lier J. 2005. The transformation and toxicity of anthraquinone dyes during thermophilic (55 .C) and mesophilic (30 .C) anaerobic treatments. Journal of Biotechnology. Vol 115 pp. 345–353.

Santos (b) A. Cervantes F. Van Lier J. 2007. Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: Perspectives for anaerobic biotechnology. Bioresource Technology 98. pp. 2369 –2385.

Sanz J. 2008. Metales Pesados y Medio Ambiente. Microbiología Ambiental. Universidad Autónoma de Méjico. Capítulo 21.

Suizhou R. Jun G. Guoqu Z. Guoping S. (2006). Decolorization of triphenylmethane, azo, and anthraquinone dyes by a newly isolated Aeromonas hydrophila strain. Appl Microbiol Biotechnol. Vol. 72. pp. 1316–1321.

Suzuki Y. Yoda T. Ruhul A. Sugiura W. 2001. Molecular cloning and characterization of the gene coding for azoreductase from *bacillus* sp. Oy1-2 isolated from soil. J. Biol. Chem. Vol. 276. No. 12. pp. 9059-9065.

Velasco A. y Carvajal P. 2005. Consumo de agua y materias primas en el sector industrial. Producción más limpia. Vol 1. N° 2. pp. 5.

Vinitnantharat S. Chartthe W. Pinitakul A. 2004. Toxicity of Reactive Red 141 and Basic Red 14 to Algae and Waterflea. Thailand. pp. 1-7

Yonni F. Fasoli H. Giai M., Álvarez H. 2008. Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad sobre colorantes textiles. Higiene y Sanidad Ambiental. Vol. 8. pp. 332-334

Yuen C. Ku S. Choi P. Kan C. Tsang S. 2005. Determining Functional Groups of Commercially Available Ink-Jet Printing Reactive Dyes Using Infrared Spectroscopy. RJTA. Vol. 9 No. 2. pp. 26-38

Zissi U. Lyberatos G. Pavlou S. 1997. Biodegradation of p-aminoazobenzene by *Bacillus subtilis* under aerobic conditions. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. Vol. 19. pp. 49–55.

ANEXOS

ANEXO A Porcentajes de Remoción de color obtenidos por cada inóculo bacteriano correspondiente a una muestra de suelo con sus respectivas repeticiones medidas cada 24 horas a partir del cuarto día de incubación para la selección inicial del inóculo bacteriano.

MUESTRA	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Medición 4	Medición 5	Medición 6
MUESTRA 1	59,26	89,73	90,86	92,78	94,58	93,00
	64,33	90,29	92,78	93,23	96,05	92,55
	63,43		94,02	93,34	94,36	96,84
MUESTRA 2	16,59	27,54	35,89	32,62		
	15,01	20,99	33,18	32,51		
	14,67	21,22	31,26	30,36		
MUESTRA 3	92,89	97,74	95,49	96,84	95,15	97,18
	92,44	98,53	97,40	97,07	96,16	95,03
	94,81	95,60	97,40	97,74	97,97	
MUESTRA 4	20,99	22,12	38,37	38,71		
	20,77	27,54	37,47	38,15		
	19,86	27,43	37,25	38,04		

ANEXO B Análisis de Varianza de los datos obtenidos al medir el porcentaje de remoción de color en cada medio de cultivo con mezcla de colorantes para la selección inicial del inóculo bacteriano.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	14702,821(a)	2	4900,940	5708,709	,000
Intersección	67723,683	1	67723,683	78885,833	,000
Inoculo	14702,821	2	4900,940	5708,709	,000
Error	10,302	9	,859		
Total	82436,807	12			
Total corregida	14713,123	11			

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

ANEXO C Datos de la Absorbancia (abs), Crecimiento bacteriano (UFC/ml), pH del medio y Porcentaje de Remoción de Color (%) de los dos mejores inóculos bacterianos seleccionados.

Muestra	Horas	Abs	UFC/ml	pH	%
Inóculo 1	0	0,722	390000	6,27	0
	16	0,711	6500000	6,07	2
	24	0,692	45666666,7	5,92	4
	64	0,552	753333333	4,44	24
	72	0,517	513333333	4,07	28
	88	0,356	450000000	3,73	51
	112	0,286	650000000	3,71	60
	160	0,139	513333333	3,79	81
	208	0,119	523333333	3,94	84
	232	0,117	430000000	4,26	84
Inóculo 3	0	0,722	2613333,33	6,27	0
	16	0,699	18133333,3	6,04	3
	24	0,677	30666666,7	5,9	6
	40	0,649	26000000	5,12	10
	48	0,523	51000000	4,91	28
	64	0,347	189666667	4,57	52
	96	0,139	526666667	4,35	81
	112	0,137	486666667	4,36	81
	136	0,034	199666667	4,39	95
	160	0,048	34666666,7	4,36	93
	208	0,034	85333333,3	4,14	95
	232	0,05	65333333,3	4,3	93

ANEXO D Datos utilizados para realizar la curva de crecimiento del inóculo de la muestra 3 en medio de cultivo utilizado para la Activación del Inóculo.

Tiempo	UFC/ml
0	20000
6	20000
18	200000
24	5150000
30	5100000
48	12970000
54	11930000
66	8970000
72	3270000
96	780000

ANEXO E Porcentajes de Remoción de Color (Azul Navy 171) obtenidos por el inóculo bacteriano cada 48 horas después de la inoculación inicial con 5g/l de glucosa.

Con 5g/l de Glucosa							
MUESTRA	MEDICIÓN1	MEDICIÓN2	MEDICIÓN3	MEDICIÓN4	MEDICIÓN5	MEDICIÓN6	MEDICIÓN7
540	79,03	83,23	95,48	82,58	91,94	85,16	80,65
	77,42	86,13	88,06	81,94	90,00	84,52	80,32
	81,94	85,48	92,90	86,77	90,97	83,87	83,55
570	49,64	72,36	88,55	87,82	92,18	88,91	86,55
	49,45	81,82	92,55	88,36	91,64	89,09	84,73
	66,18	85,64	91,64	88,00	92,91	89,64	86,91
5100	64,56	84,01	92,57	91,33	92,81	92,69	91,70
	41,76	55,51	87,98	89,96	91,08	94,18	92,19
	59,36	87,98	94,67	94,05	92,19	93,18	91,82

ANEXO F Análisis de Varianza realizado para los porcentajes de remoción de color (Azul Navy 171) obtenidos por el inóculo bacteriano cada 48 horas después de la inoculación inicial con 5g/l de glucosa.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	194,795(a)	2	97,398	63,955	,000
Intersección	89377,538	1	89377,538	58688,578	,000
Colorante	194,795	2	97,398	63,955	,000
Error	13,706	9	1,523		
Total	89586,039	12			
Total corregida	208,501	11			

a R cuadrado = ,934 (R cuadrado corregida = ,920)

ANEXO G Porcentajes de Remoción de Color (Azul Navy 171) obtenidos por el inóculo bacteriano cada 48 horas después de la inoculación inicial con 0g/l de glucosa.

Con 0g/l Glucosa							
MUESTRA	MEDICIÓN1	MEDICIÓN2	MEDICIÓN3	MEDICIÓN4	MEDICIÓN5	MEDICIÓN6	MEDICIÓN7
40	-1,98	0,00	1,98	3,96	17,82	4,29	4,62
	-2,64	-0,99	-0,99	0,66	-0,99	2,64	2,64
	-2,64	-0,66	-1,65	0,99	0,66	3,63	1,98
70	5,80	10,61	11,44	11,61	11,28	13,93	14,76
	4,98	9,62	9,95	9,95	11,94	13,93	13,60
	7,46	10,61	10,45	9,12	11,61	12,60	13,27
100	-5,70	-2,65	-8,21	-4,11	-3,44	1,59	-1,59
	-4,64	-3,58	-5,03	-4,90	-4,11	-2,12	-2,52
	-3,71	-4,24	-4,37	-4,24	-3,05	-0,53	-2,65

ANEXO H Análisis de Varianza realizado para los porcentajes de remoción de color (Azul Navy 171) obtenidos por el inóculo bacteriano cada 48 horas después de la inoculación inicial con 0g/l de glucosa.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	306,172(a)	2	153,086	176,324	,000
Intersección	489,999	1	489,999	564,381	,000
Colorantes	306,172	2	153,086	176,324	,000
Error	7,814	9	,868		
Total	803,985	12			
Total corregida	313,986	11			

a R cuadrado = ,975 (R cuadrado corregida = ,970)

ANEXO I Porcentajes de Remoción de Color (Amarillo Reactivo 84) obtenidos por el inóculo bacteriano cada 48 horas después de la inoculación inicial con 5g/l de glucosa.

Con 5g/l de Glucosa									
MUESTRA	MEDICIÓN1	MEDICIÓN2	MEDICIÓN3	MEDICIÓN4	MEDICIÓN5	MEDICIÓN6	MEDICIÓN7	MEDICIÓN8	MEDICIÓN9
540	30,78	68,89	79,70	90,02	88,52	85,86	90,85	90,02	89,35
	30,45	88,02	87,35	89,52	87,85	80,37	91,35	91,18	89,68
	30,28	72,88	82,20	86,69	86,52	86,86	90,18	88,69	87,02
570	38,24	48,88	71,98	59,10	77,51	85,79	87,63	91,41	92,02
	31,70	51,74	56,03	64,21	72,49	78,22	84,25	90,90	92,02
	21,27	46,11	60,33	56,03	69,22	75,66	82,31	88,85	89,67
5100	27,94	50,65	53,83	67,27	69,17	76,54	87,40	94,46	93,62
	31,81	50,65	55,13	73,42	75,09	84,59	91,19	95,14	94,15
	24,98	46,17	48,82	60,14	70,39	76,61	86,26	94,91	94,00

ANEXO J Análisis de Varianza realizado para los porcentajes de remoción de color (Amarillo Reactivo 84) obtenidos por el inóculo bacteriano cada 48 horas después de la inoculación inicial con 5g/l de glucosa.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	54,928(a)	2	27,464	30,723	,000
Intersección	99994,542	1	99994,542	111861,446	,000
Colorante	54,928	2	27,464	30,723	,000
Error	8,045	9	,894		
Total	100057,515	12			
Total corregida	62,973	11			

a R cuadrado = ,872 (R cuadrado corregida = ,844)

ANEXO K Porcentajes de Remoción de Color (Amarillo Reactivo 84) obtenidos por el inóculo bacteriano cada 48 horas después de la inoculación inicial con 0g/l de glucosa.

Con 0g/l Glucosa									
MUESTRA	MEDICIÓN1	MEDICIÓN2	MEDICIÓN3	MEDICIÓN4	MEDICIÓN5	MEDICIÓN6	MEDICIÓN7	MEDICIÓN8	MEDICIÓN9
40	1,68	1,17	0,50	-0,84	-0,50	-2,18	-3,02	-6,53	-7,20
	0,34	-0,50	-1,34	-1,01	-3,02	-4,36	-4,02	-4,19	-10,55
	2,01	1,68	1,01	-0,34	0,00	-0,50	-1,17	-4,52	-5,19
70	-0,42	0,10	1,05	-0,21	-0,94	-0,94	-1,78	-6,18	-5,24
	1,36	0,63	0,63	0,21	-0,21	-1,26	-2,83	-5,24	-6,60
	0,52	-0,52	-0,31	-0,10	-0,31	-1,78	-2,51	-4,71	-6,07
100	2,98	2,46	1,49	0,45	1,19	1,64	-0,67	0,82	-5,66
	2,46	1,79	1,49	0,45	-0,15	0,45	-1,19	-5,81	-2,98
	2,01	1,79	1,49	0,97	0,07	1,04	0,45	-3,87	-2,53

ANEXO L Análisis de Varianza realizado para los porcentajes de remoción de color (Amarillo Reactivo 84) obtenidos por el inóculo bacteriano cada 48 horas después de la inoculación inicial con 0g/l de glucosa

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	31,060(a)	2	15,530	6,553	,018
Intersección	400,934	1	400,934	169,174	,000
Colorante	31,060	2	15,530	6,553	,018
Error	21,329	9	2,370		
Total	453,324	12			
Total corregida	52,390	11			

a R cuadrado = ,593 (R cuadrado corregida = ,502)

ANEXO M Porcentajes de Remoción de Color (Rojo Reactivo 141) obtenidos por el inóculo bacteriano cada 48 horas después de la inoculación inicial con 5g/l de glucosa.

Con 5g/l de Glucosa								
MUESTRA	MEDICIÓN1	MEDICIÓN2	MEDICIÓN3	MEDICIÓN4	MEDICIÓN5	MEDICIÓN6	MEDICIÓN7	MEDICIÓN8
540	57,76	81,28	90,88	90,40	84,00	93,44	90,88	88,96
	57,44	84,80	90,56	90,72	90,24	89,60	92,48	90,88
	58,88	85,92	88,16	91,04	86,72	91,04	90,56	88,48
570	51,32	77,63	88,39	92,91	91,29	94,71	90,95	91,72
	60,89	76,43	87,36	92,83	92,66	92,83	88,39	87,79
	48,33	71,22	83,69	91,37	87,28	87,87	89,67	83,52
5100	9,67	16,75	24,29	34,72	50,55	61,49	69,83	72,71
	8,23	17,27	21,42	35,46	47,27	57,92	66,44	67,24
	8,23	13,64	22,86	37,02	48,30	58,55	69,37	68,91

ANEXO N Análisis de Varianza realizado para los porcentajes de remoción de color (Rojo Reactivo 141) obtenidos por el inóculo bacteriano cada 48 horas después de la inoculación inicial con 5g/l de glucosa.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	962,351(a)	2	481,175	82,390	,000
Intersección	81170,702	1	81170,702	13898,574	,000
Colorante	962,351	2	481,175	82,390	,000
Error	52,562	9	5,840		
Total	82185,615	12			
Total corregida	1014,913	11			

a R cuadrado = ,948 (R cuadrado corregida = ,937)

ANEXO O Porcentajes de Remoción de Color (Rojo Reactivo 141) obtenidos por el inóculo bacteriano cada 48 horas después de la inoculación inicial con 0g/l de glucosa.

Con 0g/l Glucosa							
MUESTRA	MEDICIÓN1	MEDICIÓN2	MEDICIÓN3	MEDICIÓN4	MEDICIÓN5	MEDICIÓN6	MEDICIÓN7
40	2,39	5,25	3,03	0,16	1,27	0,96	-0,80
	2,71	2,55	2,87	0,32	1,91	-1,11	-1,43
	2,23	3,82	2,55	-0,32	1,57	1,59	0,16
70	0,68	1,27	1,86	-1,10	-0,68	-0,76	-0,51
	1,27	3,97	2,11	-1,10	0,51	-1,18	-1,44
	1,61	2,28	2,37	-2,03	-0,68	0,00	-2,20
100	1,45	1,45	1,22	-0,52	1,51	0,58	-1,57
	1,98	0,76	1,63	-0,87	1,98	0,23	-1,05
	0,93	1,69	1,98	-0,87	-0,17	-0,87	-1,74

ANEXO P Análisis de Varianza realizado para los porcentajes de remoción de color (Rojo Reactivo 141) obtenidos por el inóculo bacteriano cada 48 horas después de la inoculación inicial con 0g/l de glucosa.

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	1,417(a)	2	,708	2,138	,174
Intersección	16,544	1	16,544	49,933	,000
Colorante	1,417	2	,708	2,138	,174
Error	2,982	9	,331		
Total	20,943	12			
Total corregida	4,399	11			

a R cuadrado = ,322 (R cuadrado corregida = ,171)

ANEXO Q Datos obtenidos del diseño experimental dispuesto para las muestras con colorante azul navy 171. Todos los valores presentados corresponden a los promedios de los datos obtenidos en las repeticiones de cada ensayo.

Muestra	TIEMPO (días)	pH	Crecimiento Bacteriano (UFC/ml)	% de Remoción de Color
540	0	6,36	42000	0
	2	4,327	14200000	79
	4	4,2	88000000	85
	8	5,3	83000000	84
	12	5,54	95000000	85
	14	5,56	27300000	82
40	0	6,36	40000	0
	2	6,31	8600000	-2
	4	6,28	11100000	-1
	6	6,26	11500000	0
	8	6,37	11900000	2
	12	6,36	3700000	4
	14	6,34	5500000	3
570	0	6,36	40000	0
	2	4,5	272000000	55
	4	4,3	19000000	80
	8	4,8	162000000	88
	12	5,4	217000000	89
	14	5,4	276000000	86
70	0	6,5	36000	0
	2	6,4	23500000	6
	4	6,4	45000000	10
	8	6,5	40000000	10
	10	6,5	156000000	12
	12	6,5	148000000	13
	14	6	102000000	14
5100	0	6,32	44000	0
	2	4,47	181000000	55
	4	4,27	6700000	76
	8	4,29	78000000	92
	10	4,85	420000000	92
	12	5,12	670000000	93
	14	5,16	227000000	92
100	0	6,2	33000	0
	2	6,1	94000000	-5
	4	6,1	116000000	-3
	10	6,2	38000000	-4
	12	6,1	35000000	0
	14	6,2	17200000	-2

ANEXO R Datos obtenidos del diseño experimental dispuesto para las muestras con colorante amarillo 84. Todos los valores presentados corresponden a los promedios de los datos obtenidos en las repeticiones de cada ensayo.

Muestra	TIEMPO (días)	pH	Crecimiento Bacteriano (UFC/ml)	% de Remoción de Color
540	0	6,19	77000	0
	2	5,26	3300000	31
	4	4,81	2360000	71
	6	4,84	6400000	81
	8	4,75	3900000	88
	10	4,89	1120000	88
	12	4,83	900000	86
	14	4,77	710000	91
	16	4,45	560000	90
	18	4,62	500000	89
40	0	6,17	101000	0
	2	6,24	300000	1
	4	6,23	300000	1
	6	6,22	470000	0
	8	6,27	810000	-1
	10	6,44	300000	-1
	12	6,39	234000	-2
	14	6,46	167000	-3
	16	6,29	156000	-5
	18	6,27	149000	-8
570	0	6,16	98000	0
	2	4,81	500000	26
	4	4,46	1000000	49
	6	4,23	7600000	58
	8	4,7	3500000	60
	10	4,7	1520000	71
	12	4,63	1880000	77
	14	4,78	1960000	83
	16	4,47	1920000	90
	18	4,3	1500000	92
70	0	6,41	98000	0
	2	6,48	62000	0
	4	6,46	980000	0
	6	6,46	300000	0
	8	6,49	560000	0
	10	6,66	320000	0
	12	6,63	430000	-1
	14	6,7	450000	-2
	16	6,35	500000	-5
	18	6,52	540000	-6
5100	0	6,17	89000	0
	2	5,08	440000	26
	4	4,17	3200000	51
	6	4,22	5600000	54
	8	4,65	3800000	70

	10	4,51	62000000	72
	12	4,6	76000000	77
	14	4,67	85000000	87
	16	4,95	90000000	95
	18	4,81	93000000	94
100	0	6,24	79000	0
	2	6,3	2800000	2
	4	6,36	5000000	2
	6	6,3	5300000	1
	8	6,37	2060000	1
	10	6,48	860000	0
	12	6,45	530000	1
	14	6,48	189000	0
	16	6,52	190000	-4
	18	6,37	182000	-3

ANEXO S Datos obtenidos del diseño experimental dispuesto para las muestras con colorante rojo reactivo 141. Todos los valores presentados corresponden a los promedios de los datos obtenidos en las repeticiones de cada ensayo.

Muestra	TIEMPO (días)	pH	Crecimiento Bacteriano (UFC/ml)	% Remoción de Color
540	0	6,370	1200000	0,000
	2	3,66	470000000	58,03
	4	4,45	21900000	84
	6	3,98	23000000	89,87
	8	4	3200000	90,72
	12	4,13	36000000	91,36
	14	4,23	2340000	91,307
	18	5,09	3300000	91,04
40	0	6,09	1150000	0
	2	5,43	50000000	2,44
	4	6,08	300000	3,88
	6	6,07	99000000	2,81
	8	6,120	7500000	0,050
	10	5,94	6700000	0,478
	12	5,99	470000	-0,69
	14	6,05	780000	-3,82
570	0	6,290	1460000	0,000
	2	3,810	570000000	49,829
	4	4,570	4700000	77,028
	6	3,900	380000000	82,921
	8	4,120	56000000	85,653
	10	4,270	174000000	87,874
	12	4,430	590000	89,667
	14	4,940	2650000	89,752
	16	5,040	1490000	92,869
	18	5,350	5700000	91,973
	20	5,370	2370000	93,766
70	0	6,29	830000	0,000
	2	5,710	45000000	1,183
	4	6,310	560000	2,508
	6	6,290	32000000	2,113
	8	6,330	43000000	-1,409
	10	6,270	5400000	-0,282
	12	6,180	6700000	-0,648
	14	6,200	520000	-1,381
	16	6,160	248000	-1,691
5100	0	6,66	1340000	0,000
	2	3,130	800000000	8,712
	4	3,420	30000000	15,889
	6	3,260	340000000	22,855
	8	3,240	45000000	35,732
	10	3,160	268000000	48,705
	12	3,040	15900000	59,317
	14	3,030	67000000	68,547
	16	2,960	12800000	69,622

	18	2,970	39000000	73,479
	20	3,003	9400000	79,735
	22	3,030	29000000	83,362
100	0	6,62	690000	0,000
	2	6,080	37000000	1,453
	4	6,610	285000	1,298
	6	6,650	13300000	1,608
	8	6,650	340000	-0,755
	10	6,580	15900000	1,104
	12	6,490	520000	-0,019
	14	6,500	340000	-1,453
	16	6,480	590000	-2,150