



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología

**“Biodegradación de colorante azul directo por
consorcios bacterianos aislados de un efluente textil de
Lima, Perú”**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo, Microbiólogo
Parasitólogo

AUTOR

Karen Lisette OROZCO ROMERO

ASESOR

Pablo Sergio RAMÍREZ ROCA

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Orozco K. “Biodegradación de colorante azul directo por consorcios bacterianos aislados de un efluente textil de Lima, Perú” [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología; 2018.

76 Pr A



Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGA MICROBIÓLOGA PARASITÓLOGA
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

Siendo las 17:15 horas del 28 de agosto de 2018, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga de KAREN LISETTE OROZCO ROMERO.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 005-EPMP-2018, el titulado expuso su tesis: “BIODEGRADACIÓN DE COLORANTE AZUL DIRECTO POR CONSORCIOS BACTERIANOS AISLADOS DE UN EFLUENTE TEXTIL DE LIMA, PERÚ”, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota, calificativo: ...satisficiente... con... mención honorífica...

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Microbiología y Parasitología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Bióloga Microbióloga Parasitóloga a KAREN LISETTE OROZCO ROMERO y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

Siendo las 18:45 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 28 de agosto de 2018.

Dr. ÁBAD FLORES PAUCARIMA
(PRESIDENTE)

Dr. PABLO RAMIREZ ROCA
(ASESOR)

Mg. FERNANDO MERINO RAFAEL
(MIEMBRO)

Mg. TITO SANCHEZ ROJAS
(MIEMBRO)

21 SEP 2018

Dedico este trabajo de manera especial a mi madre, Reyna, por sentar las bases de mi vida profesional, por su apoyo incondicional, por su amor y virtudes infinitas que me llevan a admirarla cada día más.

A mi padre, Manuel, y mis hermanos, Kattia, Manuel y Maricielo, por su calidez, comprensión y por darme la fuerza para seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

A Innóvate Perú N°390-PNICP-PIAP-2014, por el financiamiento parcial de esta tesis en el proyecto a cargo del Ing. Oscar Tinoco.

Al fondo del Programa de Promoción de Tesis de Pregrado del Vicerrectorado de investigación (VRI) de la UNMSM, por el co-financiamiento de este estudio.

A la empresa Kansas Jeans, por otorgarnos el permiso para el muestreo de la presente investigación.

Al Ing. Oscar León, por facilitarnos el contacto con la empresa Kansas Jeans y proporcionarnos los colorantes azoicos utilizados en el estudio.

Al Proyecto VRIP B17100191, Análisis genómico completo de una cepa bacteriana nativa con capacidad de degradación de colorantes azoicos para su aplicación en biorremediación.

Al Ph.D. Pablo Ramírez Roca, mi asesor, por la confianza depositada en mi desempeño, sus consejos y apoyo para la realización de la presente tesis.

A la M.Sc. Ruth García de la Guarda, por sus consejos y apoyo en las gestiones de los requerimientos de esta investigación.

Al Blgo. Fernando De la Cruz, por la ayuda prestada en la extracción del material genómico.

A Ivette Fuentes, Piere Durán, Sebastián Barrutia, Gabriela Monsefú, Gustavo Mormontoy y Mac Pholo, mis compañeros de laboratorio, por su apoyo, críticas constructivas y crear un buen entorno de trabajo.

A Jordan Bernaldo-Agüero, por acompañarme durante este arduo camino y compartir alegrías y fracasos, por creer en mí siempre y motivarme a continuar.

A mi familia, por su amor, apoyo incondicional y por ser el estímulo para seguir mejorando día a día.

ÍNDICE

	Pág.
1. Introducción	1
2. Marco teórico	3
2.1 Empresa textil “Kansas Jeans”	3
2.2 Colorantes azoicos	3
2.3 Tratamiento biológico de descontaminación de colorantes	5
2.3.1 Principales enzimas involucradas en la biodegradación de colorantes azo	7
2.3.1.1 Azoreductasas	7
2.3.1.2 Lacasas	8
2.3.1.3 Mn Peroxidasas	9
2.4 Factores que afectan la decoloración microbiana	9
2.5 Secuenciamiento por Illumina MiSeq®	10
2.5.1 Flujo de trabajo en plataforma de Illumina®	11
3. Hipótesis	14
4. Objetivos	14
4.1 Objetivo general	14
4.2 Objetivos específicos	14
5. Materiales y métodos	15
5.1 Muestreo y análisis fisicoquímico	15
5.2 Evaluación del colorante azo: Azul Directo	15
5.2.1 Preparación de solución stock	15
5.2.2 Obtención de longitud de onda máxima ($\lambda_{\text{máx}}$)	16
5.2.3 Construcción de curva de calibración	16
5.3 <i>Screening</i> cualitativo de degradación de colorante	16
5.4 Aislamiento de cepas bacterianas	17
5.4.1 Pre-enriquecimiento	17
5.4.2 Enriquecimiento	17
5.4.3 Selección primaria	17
5.4.4 Selección secundaria	17
5.5 Identificación de cepas bacterianas seleccionadas	18
5.5.1 Caracterización morfológica	18
5.5.2 Identificación molecular	18
5.5.2.1 Extracción de DNA genómico	18
5.5.2.2 Electroforesis y cuantificación del DNA	18
5.5.2.3 Secuenciamiento	19
5.5.2.4 Ensamblaje de genomas	19
5.5.2.5 Filogenómica	19
5.6 Diseño de consorcios	20
5.7 Bioensayos de decoloración	20
5.7.1 <i>Screening</i> de aislados seleccionados	20
5.7.2 <i>Screening</i> de los consorcios diseñados	20

5.7.3	Evaluación del proceso de decoloración	21
5.8	Cinética de crecimiento de bacterias seleccionadas y consorcio diseñado	22
5.9	Optimización de condiciones de degradación	22
5.9.1	de cultivo	22
5.9.1.1	Efecto de las fuentes de carbono y nitrógeno como co-substratos	22
5.9.1.2	Fuentes de carbono	23
5.9.1.3	Fuentes de nitrógeno	23
5.9.1.4	Concentraciones de la fuente de carbono y nitrógeno seleccionadas	23
5.9.2	Optimización por parámetros físico-químicos	23
5.9.2.1	Tamaño de inóculo	23
5.9.2.2	Temperatura	24
5.9.2.3	pH inicial	24
5.9.2.4	Concentración inicial de colorante	24
5.10	Versatilidad del consorcio seleccionado en la degradación de colorantes azo	25
5.11	Análisis estadístico	25
6.	Resultados	27
6.1	Muestreo y análisis fisicoquímico	27
6.2	Colorante Azoico	29
6.2.1	Curva de calibración de Azul Directo	29
6.3	<i>Screening</i> cualitativo de degradación de colorante	29
6.4	Aislamiento de cepas bacterianas	32
6.5	Diseño de consorcios y bioensayos de decoloración	35
6.6	Cinética de crecimiento del consorcio CP23 y de las cepas PL y LS	37
6.7	Identificación molecular de cepas bacterianas PL y LS	39
6.8	Optimización de los requerimientos nutricionales del consorcio CP23	42
6.9	Optimización de parámetros físico-químicos del consorcio CP23	48
5.10	Versatilidad del consorcio CP23 en la degradación de colorantes azo	54
7.	Discusión de resultados	58
8.	Conclusiones	64
9.	Recomendaciones	65
10.	Referencias Bibliográficas	66
11.	Anexos	74

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Relación entre color y longitud de onda de luz absorbida/observada	5
Tabla 2. Tecnologías de tratamiento actuales para la eliminación del color que implican procesos físicos y/o químicos.	6
Tabla 3. Factores que influyen en la biodegradación de colorantes azoicos	10
Tabla 4. Coordenadas georreferenciadas de la fábrica textil “Kansas Jeans”	28
Tabla 5. Parámetros físico-químicos de las muestras de efluente textil	28
Tabla 6. <i>Screening</i> de degradación cualitativa de cultivos mesófilos y termófilos	30
Tabla 7. <i>Screening</i> de degradación cualitativa de cultivos a diferentes pHs	31
Tabla 8. <i>Screening</i> de degradación cualitativa de cultivos en condiciones estáticas y de agitación	31
Tabla 9. Caracterización macroscópica y microscópica y coloración Gram de los cinco aislados seleccionados.	33
Tabla 10. Eficiencia de decoloración de Azul Directo a las 24 horas por las cepas aisladas	35
Tabla 11. Eficiencia de decoloración de Azul Directo a las 24 horas por los consorcios construidos a partir de nuestros aislados	36
Tabla 12. Velocidades de crecimiento y tiempos generacionales del consorcio CP23 y las cepas bacterianas LS23 y PL23	38
Tabla 13. Parámetros y estadísticos del ensamblaje del genoma de <i>S. maltophilia</i> LS23 y <i>E. gallinarum</i> PL23.	40
Tabla 14. Porcentajes (%) de decoloración del consorcio CP23 en distintas modificaciones del medio de cultivo ZZ.	43
Tabla 15. Porcentajes (%) de decoloración del consorcio CP23 en distintas fuentes de carbono del medio de cultivo ZZ	44
Tabla 16. Porcentajes (%) de decoloración del consorcio CP23 en distintas fuentes de nitrógeno del medio de cultivo ZZ.	45
Tabla 17. Porcentajes (%) de decoloración del consorcio CP23 en distintas concentraciones de glucosa y extracto de levadura.	47
Tabla 18. Porcentaje de decoloración a distintas temperaturas y combinaciones de concentraciones de glucosa y extracto de levadura.	48

Tabla 19. Porcentajes (%) de decoloración del consorcio CP23 a distintas concentraciones de inóculo.	49
Tabla 20. Porcentajes (%) de decoloración del consorcio CP23 a distintos pH	50
Tabla 21. Porcentajes (%) de decoloración del consorcio CP23 a distintas concentraciones de colorante Azul Directo.	52
Tabla 22. Medidas de Longitud de onda máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) de los siete colorantes azoicos adicionales.	54
Tabla 23. Cinética de decoloración (%) de siete colorantes azo, por el consorcio CP23.	55
Tabla S1. Datos de Absorbancias medidas a 583nm en diferentes concentraciones de colorante Azul Directo.	74

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Grupo cromóforo Azo	4
Figura 2. Componentes del colorante Azul Directo	4
Figura 3. Mecanismo propuesto para la reducción de colorantes azoicos por células bacterianas enteras	8
Figura 4. Descripción química de Secuenciamiento de Próxima Generación	13
Figura 5. Zona de muestreo	27
Figura 6. Curva de calibración del colorante Azul Directo	29
Figura 7. Cepas bacterianas aisladas en Agar Nutricio	34
Figura 8. Degradación de Azul Directo a las 24 horas por los consorcios construidos (CP1-CP27) y las cepas aisladas (PL-BM); además se muestra en la parte inferior derecha el control negativo y el blanco.	37
Figura 9. Cinética de crecimiento del consorcio CP23 y las dos cepas que lo conforman. El consorcio CP23 presentó una velocidad de crecimiento mayor que las cepas LS y PL, por separado.	38
Figura 10. Árbol tipo cladograma agrupando los <i>core-genome</i> de las cepas con identidades mayores a <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> LS23.	41
Figura 11. Árbol tipo cladograma agrupando los <i>core-genome</i> de las cepas con identidades mayores a <i>Enterococcus gallinarum</i> PL23.	42
Figura 12. Cinética de decoloración del consorcio CP23 en distintas modificaciones del medio ZZ suplementado con 100 ppm de colorante Azul Directo.	43
Figura 13. Cinética de decoloración del consorcio CP23 sometido a distintas fuentes de carbono en el caldo ZZ con 100 ppm de colorante Azul Directo.	44
Figura 14. Cinética de decoloración del consorcio CP23 sometido a distintas fuentes de nitrógeno en el caldo ZZ con 100 ppm de colorante Azul Directo.	45
Figura 15. Cinética de decoloración del consorcio CP23 sometido a distintas concentraciones de glucosa en el caldo ZZ con 100 ppm de colorante Azul Directo.	46

Figura 16. Cinética de decoloración del consorcio CP23 sometido a distintas concentraciones de extracto de levadura en el caldo ZZ con 100 ppm de colorante Azul Directo.	47
Figura 17. Cinética de decoloración del consorcio CP23 en distintas concentraciones de inóculo en el medio ZZ suplementado con 100 ppm de colorante Azul Directo.	49
Figura 18. Cinética de decoloración del consorcio CP23 en distintos pH's del medio ZZ suplementado con 100 ppm de Azul Directo.	50
Figura 19. Cinética de decoloración del consorcio CP23 en el medio ZZ suplementado a distintas concentraciones de Azul Directo.	51
Figura 20. (A) Medio de cultivo Zhou y Zimmerman (ZZ) modificado. (B) Caldo ZZ suplementado con 100 ppm de colorante Azul Directo.	52
Figura 21. Cinética de decoloración del consorcio CP23 en el medio ZZ suplementado a distintas concentraciones (ppm) de Azul Directo (A: 100), (B: 150), (C: 200), (D: 250) y (E: 300).	53
Figura 22. Cinética de degradación de siete colorantes azo por el consorcio CP23 en medio ZZ suplementado con 100 ppm de cada colorante.	55
Figura 23. Proceso de decoloración de Amarillo Drimaren por el consorcio CP23 en medio ZZ suplementado con 100 ppm de este colorante.	56
Figura 24. Proceso de decoloración de Rojo Drimaren por el consorcio CP23 en medio ZZ suplementado con 100 ppm de este colorante.	56
Figura 25. Proceso de decoloración de Azul marino Remazol por el consorcio CP23 en medio ZZ suplementado con 100 ppm de este colorante.	56
Figura 26. Proceso de decoloración de Azul Remazol por el consorcio CP23 en medio ZZ suplementado con 100 ppm de este colorante.	56
Figura 27. Proceso de decoloración de Amarillo oro Remazol por el consorcio CP23 en medio ZZ suplementado con 100 ppm de este colorante.	57
Figura 28. Proceso de decoloración de Azul turquesa Remazol por el consorcio CP23 en medio ZZ suplementado con 100 ppm de este colorante.	57
Figura 29. Proceso de decoloración de Rojo Remazol por el consorcio CP23 en medio ZZ suplementado con 100 ppm de este colorante.	57
Figura S1. Curva de calibración colorante azo Amarillo Drimaren	74
Figura S2. Curva de calibración colorante azo Rojo Drimaren	75
Figura S3. Curva de calibración colorante azo Azul marino Remazol	75

Figura S4. Curva de calibración colorante azo Azul Remazol	75
Figura S5. Curva de calibración colorante azo Amarillo oro Remazol	76
Figura S6. Curva de calibración colorante azo Azul turquesa Remazol	76
Figura S7. Curva de calibración colorante azo Rojo Remazol	76

RESUMEN

La industria textil anualmente genera 280 000 toneladas de efluentes contaminados con colorantes azoico, que son tóxicos, cancerígenos y mutagénicos; por ende, requiere soluciones eficientes de descontaminación. El presente estudio tuvo como objetivo diseñar y caracterizar un consorcio microbiano con excelente capacidad de degradación de Azul Directo, que podría ser usado para la descontaminación de efluentes. Se colectaron en total 12 muestras: 6 de aguas residuales y 6 de fango acumulado en el punto de confluencia del efluente, ambas colectadas de una fábrica textil ubicada en la región de Lima. Se seleccionaron 2 cultivos debido a su mejor respuesta a la decoloración *in vitro* en medio Zhou y Zimmerman (ZZ). Se aislaron 5 cepas bacterianas, y con ello se construyeron 27 consorcios. Se seleccionó el consorcio CP23, pues resultó tener mejor rendimiento promedio. Se extrajo el DNA genómico de las 2 cepas bacterianas que conformaban el consorcio CP23, y se secuenciaron mediante tecnología de Illumina MiSeq®. Las cepas fueron identificadas como *Enterococcus gallinarum* PL23 y *Stenotrophomonas maltophilia* LS23. Se evaluaron las cinéticas de crecimiento de las cepas puras y cuando conformaban el consorcio CP23 en medio ZZ suplementado con 100 ppm de Azul Directo a través del recuento en cámara Petroff-Hausser. Se obtuvo una mayor velocidad de crecimiento (μ) de parte del consorcio, siendo esta de $2.6 \pm 0.05 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, y un menor tiempo de duplicación, el cual fue de $26.5 \pm 0.5 \text{ min}$. Se optimizaron los parámetros más importantes de biodegradación *in vitro* cuantificados mediante espectrofotometría UV-Vis, estos fueron 0,5% de glucosa, 1% de extracto de levadura, pH 8, 37°C, $2 \times 10^6 \text{ UFC} \times \text{ml}^{-1}$ de inóculo inicial y 100 ppm de colorante, obteniéndose un rendimiento promedio de 91.53% a las 6 horas. Además, se evaluaron cinéticas de decoloración del consorcio CP23 con otros colorantes azo: Amarillo Drimaren, Rojo Drimaren, Azul Marino Remazol, Azul Remazol, Amarillo Oro

Remazol, Azul Turquesa Remazol y Rojo Remazol, con rendimientos de más del 95% en su mayoría. Nuestros resultados representan el primer estudio en el país sobre el diseño y caracterización de consorcios microbianos con capacidad de degradación de colorantes azo, aislados de efluentes textiles en Perú con potencial uso en biorremediación de aguas residuales.

Palabras clave: Biodegradación, azo, consorcio bacteriano CP23, decoloración.

ABSTRACT

The textile industry generates annually 280 000 tons of effluents contaminated with azo dyes, which are toxic, carcinogenic and mutagenic; therefore, it requires efficient decontamination solutions. The objective for this study was to design and characterize a microbial consortium with excellent Direct Blue degradation capacity, which could be used for effluent treatment. A total of 12 samples were collected, 6 of wastewater and 6 of accumulated mud at the effluent confluence point, in a textile factory located in Lima. Two cultures were selected because of their better response to *in vitro* decolorization within the medium of Zhou and Zimmerman (ZZ). Five bacterial strains were isolated, and 27 consortiums were built. The CP23 consortium was selected within its best average performance. Genomic DNA was extracted from the 2 bacterial strains that made up the CP23 consortium, and they were sequenced using Illumina MiSeq® technology. Strains were identified as *Enterococcus gallinarum* PL23 and *Stenotrophomonas maltophilia* LS23. The growth kinetics for pure strains and CP23 consortium were evaluated in ZZ medium supplemented with 100 ppm of Direct Blue through the Petroff-Hausser chamber count, and a higher growth rate was obtained, this being $2.6 \pm 0.05 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, and a shorter doubling time, which was $26.5 \pm 0.5 \text{ min}$. The most important *in vitro* biodegradation parameters quantified by UV-Vis spectrophotometry were optimized, these were 0.5% glucose, 1% yeast extract, pH 8, 37 °C, $2 \times 10^6 \text{ CFU} \times \text{ml}^{-1}$ initial inoculum and 100 ppm of dye, obtaining an average yield of 91.53% at 6 hours. In addition, the CP23 consortium bleaching kinetics were evaluated with other azo dyes: Drimaren Yellow, Drimaren Red, Remazol Navy Blue, Remazol Blue, Remazol Gold Yellow, Remazol Turquoise Blue and Remazol Red, with yields for over 95% mostly. Our results represents the first study in the country on the design and

characterization of microbial consortiums with degradation capacity for azo dyes of textile effluents in Peru, with potential use in wastewater bioremediation.

Keywords: biodegradation, azo, microbial consortium CP23, decolorization.

1. INTRODUCCIÓN

La degradación de colorantes azo por consorcios microbianos aplicados al tratamiento de efluentes de la industria textil, constituye un método eficiente, de bajo costo y respetuoso del ambiente ya que puede conducir a la mineralización completa de los colorantes; sin embargo, la principal desventaja es que la descontaminación demora más tiempo en comparación a la generación de los efluentes; se estima que alrededor de 100 L de aguas residuales son descargadas por kg de tela teñida (Couto, 2009). Debido a la toxicidad y carcinogenicidad de los colorantes presentes en estas aguas, se plantea un peligro potencial para la salud de todas las formas de vida (Forgacs *et al.*, 2004), incluyendo la afectación de la fotosíntesis en plantas acuáticas (Roy *et al.*, 2010) y la contaminación de suelos agrícolas.

El principal colorante empleado en la empresa textil “Kansas Jeans”, pionera en el Perú, es el Azul Directo, un compuesto xenobiótico de tipo azo, principal grupo utilizado a escala mundial debido a la facilidad y rentabilidad de su síntesis; no obstante, difícil de biodegradar por su alta estabilidad a la luz y resistencia al ataque microbiano (Lade *et al.*, 2012; Oranusi y Ogugbue, 2005).

La eficacia de descontaminación de efluentes textiles, depende de factores ambientales, biológicos y físico-químicos como temperatura, pH y oxígeno, debido a que afectan directamente el desarrollo de los microorganismos y por ende, su actividad (Kumar y Tripathi, 2016). La inmunidad de las bacterias tiene razones obvias para hacernos reconocer los mecanismos de adaptación desarrollados por ellas y colonizar hasta los más extremos y diversos ecosistemas (Lorenzo, 2001). Esta adaptación les ha ayudado a canalizar compuestos xenobióticos antropogénicos o sus productos transformados hacia vías metabólicas centrales; sin embargo, las bacterias en su nicho natural rara vez se encuentran como especies puras; más bien, comúnmente existen en las comunidades como consorcios dinámicos de especies microbianas (Allen y Banfield,

2005). Además, estos cultivos puros en general no llegan a degradar completamente los colorantes, generando aminas aromáticas, descritas también como nocivas y tóxicas, lo que hace que el proceso de tratamiento para obtener un efluente sin contaminantes se alargue y eleve los costos por tener que necesitar tratamientos de descontaminación ulteriores; no obstante, los consorcios pueden atacar una molécula compleja de colorante en diferentes posiciones y/o utilizar los metabolitos producidos por las otras cepas del sistema (Saratale *et al.*, 2009).

El uso de herramientas moleculares ha facilitado la identificación de los géneros y especies microbianas que participan en la biodegradación de colorantes, logrando resultados más confiables y de mayor precisión. La tecnología del secuenciamiento masivo o Next-generation sequencing (NGS), ha experimentado notables avances durante la última década, y está más al alcance de la comunidad científica. El presente trabajo aprovechó dicha disponibilidad sumado a la tecnología de Illumina, como parte de una identificación bacteriana más rigurosa, siendo también, el inicio de futuros análisis genómicos exhaustivos.

La presente investigación tuvo como principal objetivo, a través de pruebas de laboratorio, la degradación del colorante Azul Directo, de tal forma que al aplicarse al efluente industrial, el agua pueda ser descontaminada y pueda ser reutilizada nuevamente en el proceso productivo, y solucionar con eso el alto consumo que necesita la industria textil y el problema de la disposición de sus efluentes (Punzi, 2015). Los estudios se realizaron con microorganismos nativos para preservar la ecología del lugar, obteniendo resultados prometedores.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Empresa textil “Kansas Jeans”

La fábrica de Kansas Jeans se ubica en el Jirón Gran Pajatén, San Juan de Lurigancho, Lima, 36, Perú. Las coordenadas de su ubicación exacta son Latitud: -12.02187, Longitud: -76.98616. Esta empresa es la pionera en el Perú en su industria y sigue manteniéndose vigente hasta la actualidad. El principal colorante en uso para el teñido de sus prendas, es el Azul Directo.

2.2 Colorantes azoicos

Un colorante es un compuesto capaz de impartir su color a un sustrato dado, tal como pintura, papel o algodón; esta capacidad está casi exclusivamente definida por su estructura química (Gürses *et al.*, 2016). Se entiende convencionalmente que se refieren a moléculas orgánicas disueltas, como cromóforos moleculares, en el medio de aplicación (Zhang *et al.*, 2010).

Los colorantes azoicos comprenden una de las clases más grandes de colorantes sintéticos basados en derivados de hidrocarburos que son ampliamente utilizados en la industria textil. Representan aproximadamente el 80% de los colorantes comerciales producidos en el mundo, con una producción anual de más de 7×10^5 toneladas métricas (Das y Mishra, 2016), y por ende, los más comunes liberados al ambiente (Zhao y Hardin, 2007). En los últimos años, el interés por el control de colorantes ha aumentado, debido al peligro a la salud que representan por contener carcinógenos como bencidina y otros compuestos aromáticos (Singh, 2006).

La característica general de los colorantes azoicos es la presencia en las estructuras de uno o más grupos azo (Iqbal 2008) (Figura 1).

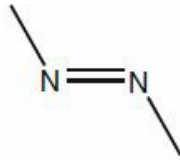


Figura 1. Grupo cromóforo Azo (Iqbal 2008).

Las moléculas de colorantes orgánicos tienen como componente principal al cromógeno, un compuesto químico que podría ser de color o coloreado por la unión de un sustituyente adecuado. Está compuesto por el cromóforo y auxocromo. El cromóforo es un grupo químico responsable de la aparición del color en los compuestos donde se encuentra, sin embargo, el propio grupo cromóforo no es capaz de determinar un color o matiz (Marsden, 1982); para ello necesita del auxócromo (auxiliar del color), un grupo sustituyente que influye en el desplazamiento del color en el espectro y se utiliza con mayor influencia en la solubilidad del colorante; por ejemplo: ácidos carboxílicos, ácido sulfónico, amino, e hidroxilo (Kumar, 2013). Los componentes de la molécula del Azul Directo, se describen en la Figura 2 (fórmula molecular: $C_{40}H_{23}N_7Na_4O_{13}S_4$).

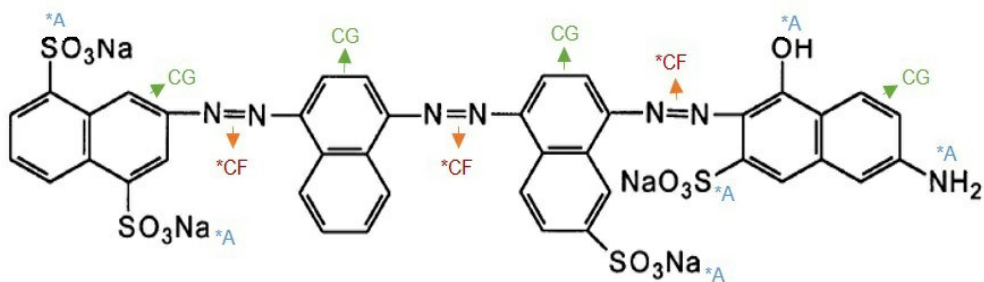


Figura 2. Componentes del colorante Azul Directo. *CF: cromóforo. *A: auxocromo. CG: cromógeno.

A diferencia de la mayoría de los compuestos orgánicos, los colorantes poseen color porque (Zhao y Hardin, 2007):

- a) Absorben luz en el espectro visible (400-700 nm).

- b) Tienen al menos un grupo cromóforo.
- c) Tienen un sistema conjugado, es decir, una estructura con alternancia de enlaces dobles y simples.
- d) Exhiben resonancia de electrones, que es una fuerza estabilizadora en compuestos orgánicos (Hossain 2014).

Cuando la estructura molecular carece de cualquiera de estas características, el color se pierde.

En la Tabla 1 se muestran las relaciones entre el color absorbido y observado respecto a un rango determinado de longitud de onda (Zhao y Hardin, 2007).

Tabla 1. Relación entre color y longitud de onda de luz absorbida/observada.

Wavelength absorbed (nm)	Color absorbed	Color observed
400–435	Violet	Yellow-Green
435–480	Blue	Yellow
480–490	Green-Blue	Orange
490–500	Blue-Green	Red
500–560	Green	Purple
560–580	Yellow-Green	Violet
580–595	Yellow	Blue
595–605	Orange	Green-Blue
605–700	Red	Blue-Green

Fuente: (Zhao y Hardin, 2007).

2.3 Tratamiento biológico de descontaminación de colorantes

Actualmente, los principales métodos de tratamiento de aguas residuales textiles son los químicos y/o físicos, en la Tabla 2 (Pearce *et al.*, 2003) se muestran algunos ejemplos; sin embargo, estos métodos suelen ser muy costosos y generan lodos concentrados que crean un nuevo problema de contaminación (Chang y Lin, 2000), siendo de esta manera un efluente que no podría ser reutilizado en el proceso productivo, generando la nulidad del vertimiento cero. Una alternativa a este problema

esencialmente no resuelto, es el método biológico. Este método resulta ser ecológico y tener una buena eficiencia a un bajo costo (Robinson *et al.*, 2001).

La diversidad genética y versatilidad metabólica de los microorganismos, los convierte en la opción biológica adecuada para remediar la contaminación causada por colorantes. Una de sus mayores ventajas es la capacidad que tienen de mineralizarlos, generando efluentes descontaminados y reutilizables (Harshad *et al.*, 2015).

Tabla 2. Tecnologías de tratamiento actuales para la eliminación del color que implican procesos físicos y/o químicos.

Métodos físicos y/o químicos	Ventajas	Desventajas
Oxidación	Proceso rápido	Elevados costos de energía y formación de sub-productos.
Adsorción	Buena remoción de amplio rango de colorantes.	Absorbente requiere regeneración o eliminación.
Tecnología de membranas	Remoción de todo tipo de colorantes.	Producción concentrada de lodos.
Coagulación/floculación	Económicamente factible	Elevada producción de lodos.

Fuente: (Pearce *et al.*, 2003)

El uso de cepas bacterianas puras, por lo general no puede degradar colorantes azo completamente y los productos intermedios son a menudo aminas aromáticas cancerígenas que deben ser descompuestas (Joshi *et al.*, 2008). Si bien es cierto, garantiza la interpretación de los mecanismos de degradación del colorante, el grado más alto de biodegradación y mineralización, se realiza a nivel de poblaciones microbianas, con actividades metabólicas sinérgicas de comunidad (Khehra *et al.*, 2005a). En el consorcio microbiano, las cepas individuales pueden atacar la molécula de colorante en diferentes posiciones o pueden utilizar metabolitos producidos por las cepas coexistentes para una mayor descomposición (Forgacs *et al.*, 2004).

Desafortunadamente, la mayoría de estos compuestos altamente complejos son químicamente estables y resistentes al ataque microbiano; es por ello que es importante el aislamiento de nuevas cepas o la adaptación de las existentes a la descomposición de los colorantes azoicos.

2.3.1 Principales enzimas involucradas en la biodegradación de colorantes azoicos

En los últimos años se ha descrito que los microorganismos que degradan colorantes azoicos producen una variedad de enzimas incluyendo azoreductasa, lacasa, peroxidasas, tirosinasa, NADH-DCIP reductasa, MG reductasa y aminopirina N-desmetilasa (Asgher *et al.*, 2012; Miranda *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2014). Entre estas, las azoreductasas, lacasas y peroxidasas son las principales enzimas responsables de la degradación de los colorantes azoicos (Chacko y Subramaniam, 2011), y en las que nos centraremos.

2.3.1.1 Azoreductasas

Las azoreductasas son flavoproteínas en estructuras muy diversas, de naturaleza citoplasmáticas y extracelulares (Chen y Chen, 2011), y función (Ryan *et al.*, 2014). En su mayoría se expresan constitutivamente; sin embargo, a veces también se han encontrado inducidas en presencia de colorante. Estas enzimas catalizan el clivaje reductor de enlaces azo ($-N = N-$), produciendo aminas aromáticas incoloras que luego se degradan en CO_2 y H_2O en condiciones aerobias (Chang y Kuo 2000; Chang *et al.*, 2001). El principal mecanismo de acción descrito para las azoreductasas, es mediante la reducción de colorantes azo por transferencia de electrones a un mediador redox (NADH, NADPH, FAD, etc.) en la superficie celular (Myers y Myers, 1992) que sirve como transportador de electrones ubicado en la membrana externa (en el caso de bacterias Gram negativas) y la molécula de colorante (Dafale *et al.*, 2008). Los mediadores redox dentro de la célula, aceptan electrones de la cadena respiratoria,

transfiriéndolo a la molécula de colorante azo para romper el enlace (Imran *et al.*, 2015) (Figura 3).

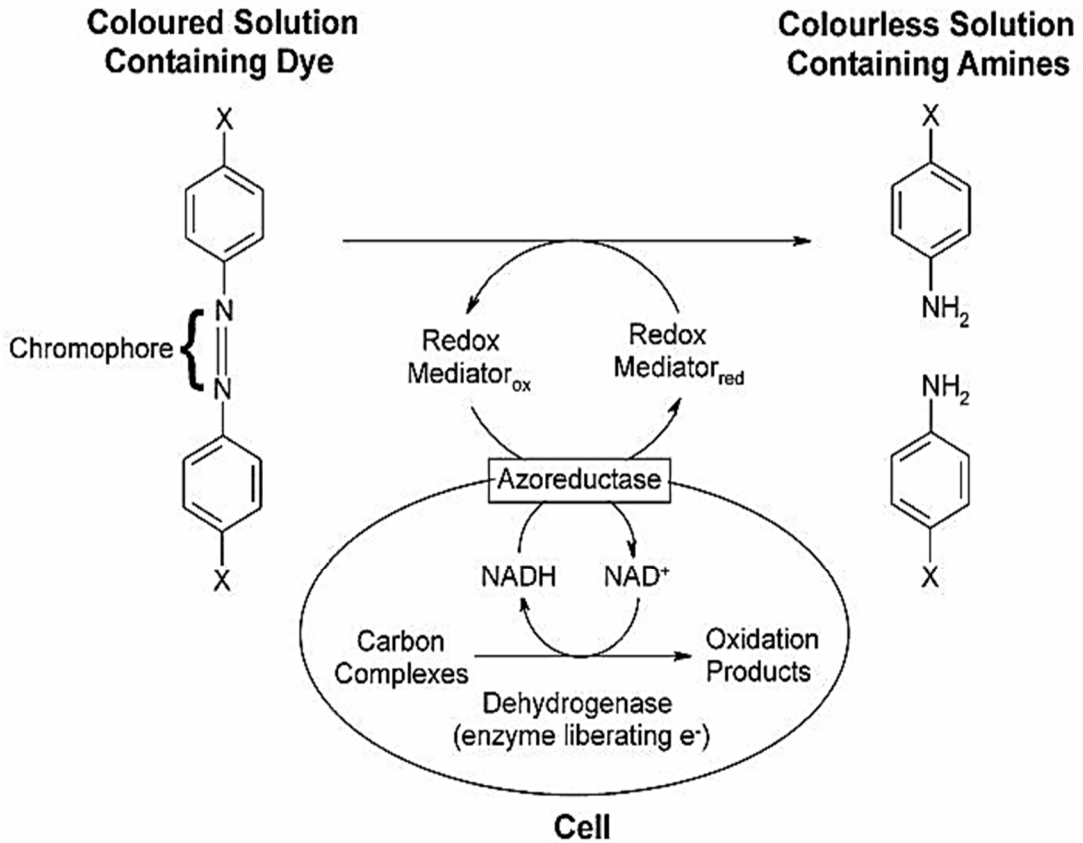


Figura 3. Mecanismo propuesto para la reducción de colorantes azoicos por células bacterianas enteras (Keck *et al.*, 1997, modificación de Pearce *et al.*, 2003).

2.3.1.2 Lacasas

Enzimas de degradación de colorantes dependientes de Cu^{2+} que catalizan oxidación de compuestos aromáticos como colorantes (Hoegger *et al.*, 2006). Estas enzimas son en su mayoría extracelulares y a diferencia de las azoreductasas, decoloran sin producir aminas aromáticas; además que también las degradan. Las lacasas tienen un amplio rango de sustratos (Saparrat *et al.*, 2006), por lo que son muy utilizadas para fines industriales y/o procesos de biorremediación. Estas enzimas

degradan al colorante azoico a través de un radical libre no específico para formar compuestos fenólicos y de este modo evitar la formación de aminas aromáticas (Chivukula *et al.*, 1995). El mecanismo de la lacasa se da mediante la oxidación del grupo fenólico del colorante azoico, por un ataque nucleofílico del agua en el carbono del anillo fenólico que contiene los enlaces azo (Camarero *et al.*, 2005). Estas son enzimas constitutivas, pero la presencia de colorante en agua también ha sido reportado como estímulo de su secreción (D'Souza *et al.*, 2006).

2.3.1.3 Mn Peroxidasas

Estas enzimas son también conocidas por su papel en la degradación de colorantes azo (Shedbalkar y Jadhav, 2011). El ciclo catalítico de esta enzima procede a través de una oxidación por H_2O_2 a un compuesto intermedio que a su vez es promovido por la oxidación de Mn^{2+} a Mn^{3+} (Gold *et al.*, 2000). Mn^{3+} se estabiliza mediante ácidos orgánicos y se forma un complejo entre ambos compuestos que actúa como un oxidante activo de la molécula de colorante (Schlosser y Hofer, 2002). Al igual que las lacasas, tampoco producen aminas aromáticas (Imran *et al.*, 2015).

2.4 Factores que afectan la decoloración microbiana

Existen algunos factores que afectan indirectamente el proceso de decoloración por verse involucrados en el metabolismo de las bacterias utilizadas para la descontaminación de colorantes azoicos. *In vitro*, dichos factores van desde los co-substratos utilizados en el medio de cultivo como fuentes de carbono y nitrógeno, a factores físico-químicos como oxígeno, temperatura, tamaño de inóculo, pH y concentración inicial del colorante (Tabla 3); estos deben ser optimizados para producir la tasa máxima de biodegradación y hacer el proceso más eficiente, rápido y prácticamente aplicable (Khan *et al.*, 2013).

Tabla 3. Factores que influyen en la biodegradación de colorantes azoicos.

Factores	Descripciones
Fuentes de carbono y nitrógeno	Los colorantes azoicos son deficientes en fuentes de carbono y nitrógeno, y la biodegradación de colorantes sin suplemento de estas fuentes es muy difícil (Sani y Banerjee, 1999).
Temperatura	Este factor es asociado a la vitalidad microbiana (Dos Santos et al., 2007). La tasa de decoloración de colorantes azoicos aumenta hasta la temperatura óptima, en otros rangos, existe una reducción marginal (Saratale <i>et al.</i> , 2009).
Oxígeno	Las condiciones ambientales pueden afectar el proceso de biodegradación de colorantes azo directamente, en función del estado reductor u oxidativo del medio ambiente, e indirectamente, influir en el metabolismo microbiano (Khan <i>et al.</i> , 2013).
Tamaño de inóculo	Afecta la eficiencia global del proceso, pues en un volumen pequeño disminuye la velocidad global de reacción biológica, que conduce a una disminución en la velocidad de decoloración; sin embargo, el volumen del inóculo mayor que el valor óptimo, resulta en el agotamiento temprano de nutrientes y los microorganismos alcanzan la fase de muerte, lo que conduce a una disminución en la velocidad de biodegradación del colorante (Das y Mishra, 2016).
pH	Tiene un efecto importante en la eficiencia de degradación del colorante. Generalmente se encuentra en el rango de 6-10; sin embargo, esta eficiencia se reduce sustancialmente en condiciones ácidas y alcalinas más altas, ya que el ambiente extremo del pH inhibe el crecimiento bacteriano (Guo <i>et al.</i> , 2007).
Concentración inicial de colorante	El aumento de la concentración de colorante, disminuye gradualmente la tasa de decoloración, probablemente debido al efecto tóxico de los tintes con respecto a la concentración de biomasa inadecuada, como bloqueo de sitios activos de azoreductasa (Tony <i>et al.</i> , 2009).

2.5 Secuenciamiento por Illumina MiSeq®

La tecnología de secuenciamiento de Illumina®, secuenciamiento por síntesis (SBS) o también llamada de alto rendimiento, es una tecnología de secuenciamiento de próxima generación (NGS) ampliamente adoptada a nivel mundial, responsable de

generar más del 90% de los datos de secuenciación del mundo, porque ofrece una alta precisión de lecturas sin errores. Por otro lado, el sistema MiSeq® ofrece la primera solución de secuenciamiento de punta a punta, integrando generación de clúster, amplificación, secuenciación, que puede ser visualizada en tiempo real a través de internet mediante el sitio web de Illumina®: BaseSpace. Finalmente, los datos generados se convierten automáticamente a formatos de archivo estándar para su análisis posterior.

2.5.1 Flujo de trabajo en plataforma de Illumina®

El flujo de trabajo se puede dividir en 4 pasos básicos que se encuentran esquematizados en la Figura 4.

1° Preparación de la biblioteca

La biblioteca de secuenciación se prepara mediante fragmentación aleatoria de la muestra de ADN o ADNc, seguida por ligadura de adaptadores de 5' y 3' (Figura 4A). Alternativamente, la tagmentación combina las reacciones de fragmentación y ligadura en un solo paso que aumenta en gran medida la eficiencia del proceso de preparación de la biblioteca. Los fragmentos ligados al adaptador luego son amplificados por PCR. Terminado el proceso, se verifica la calidad de la librería mediante un gel de agarosa.

2° Generación de Clúster

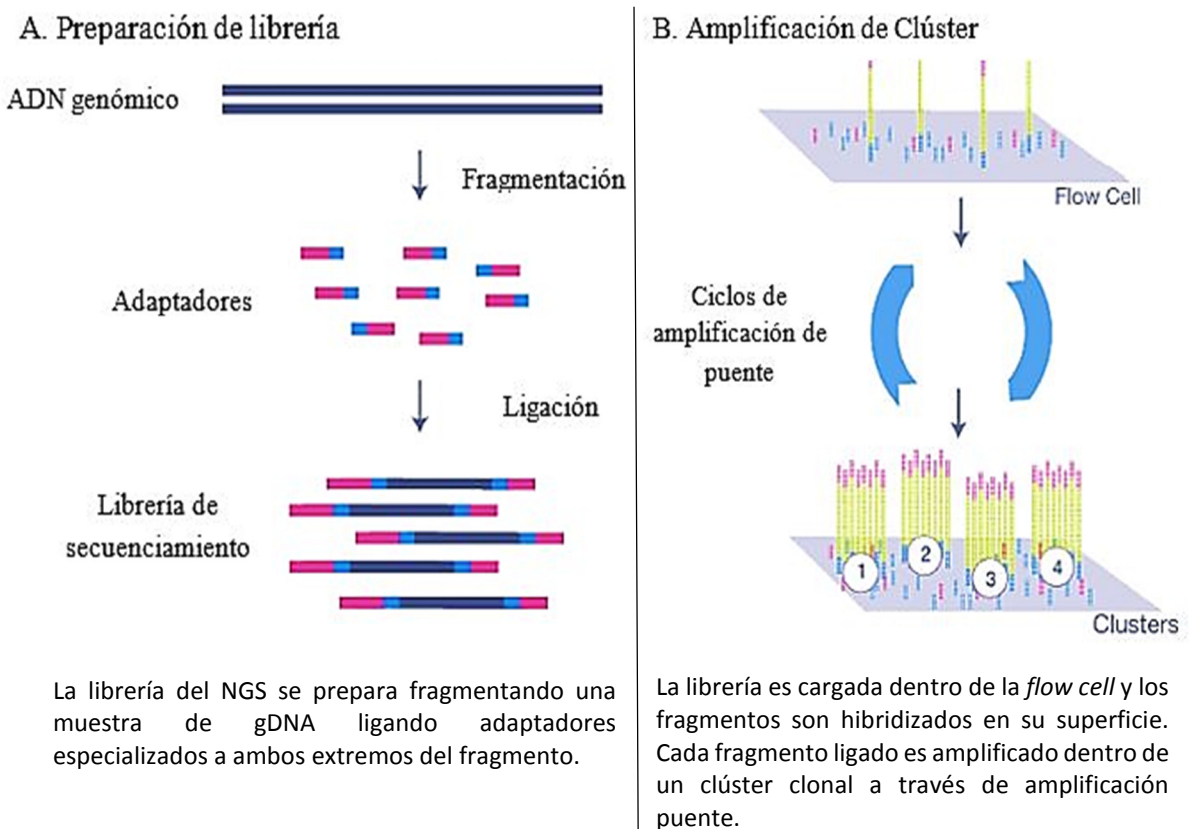
La biblioteca se carga en una celda de flujo *flow cell* donde los fragmentos se capturan en un "césped" de oligonucleótidos complementarios unidos a la superficie a los adaptadores de la biblioteca. Cada fragmento se amplifica luego en *clusters* clonales distintos a través de un puente de amplificación (Figura 4B). Cuando se completa la generación de clúster, las plantillas están listas para la secuencia.

3° Secuenciamiento por síntesis (SBS)

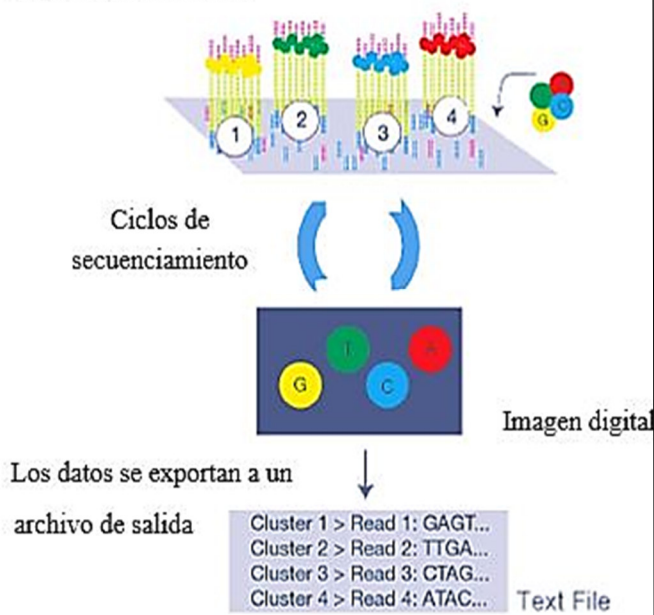
Utiliza un método patentado de “terminador reversible” que detecta bases individuales ya que están incorporados en hebras de placas de ADN (Figura 4C). El resultado es una secuencia base por base altamente precisa que prácticamente elimina errores específicos, incluso dentro de regiones de secuencias repetitivas y homopolímeros.

4° Análisis de datos

Durante el análisis de datos y la alineación, las lecturas de secuencia recién identificadas se alinean con un genoma de referencia (Figura 4D). Después de la alineación, son posibles muchas variaciones del análisis, tales como métodos ARN, filogenéticos, análisis metagenómico, y más.

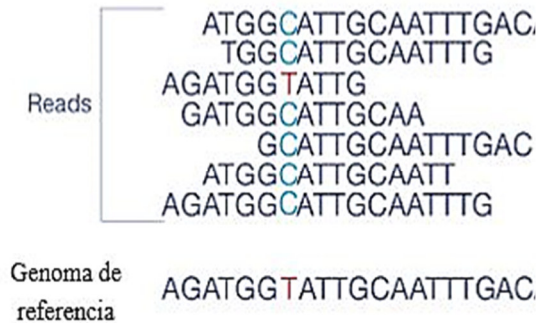


C. Secuenciamiento



Los reactivos de secuenciación, incluidos los nucleótidos marcados con fluorescencia, se añaden y se incorporan a la primera base. Se toma una imagen de la celda de flujo y se registra la emisión de cada grupo. La longitud de onda de emisión y la intensidad son necesarias para identificar la base. Este ciclo se repite “n” veces para crear una longitud de lectura de “n” bases.

D. Alineamiento y análisis de datos



Las lecturas están alineadas con una secuencia de referencia con un software de bioinformática. Después del alineamiento, se pueden identificar las diferencias entre el genoma de referencia y las lecturas recientemente secuenciadas.

Figura 4. Descripción química de Secuenciación de Próxima Generación- NGS, incluye cuatro pasos: (A) preparación de la biblioteca, (B) generación de clúster, (C) secuenciación, y (D) alineación y análisis de datos. Adaptado de Illumina®.

3. HIPÓTESIS

Existen consorcios bacterianos que actúan sinérgicamente en efluentes de la industria textil que permiten una biodegradación efectiva de Azul Directo, uno de los principales colorantes azoicos usados en la industria textil peruana, causante de contaminación a nivel mundial.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general:

Diseñar y seleccionar un consorcio bacteriano con eficiente capacidad de degradación de Azul Directo a partir de cepas nativas aisladas de un efluente textil industrial.

4.2 Objetivos específicos:

1. Aislar y seleccionar cepas nativas de bacterias a partir de un efluente industrial procedente de una planta textil en San Juan de Lurigancho – Lima.
2. Diseñar y evaluar la eficiencia de consorcios microbianos para la degradación de Azul Directo.
3. Identificar molecularmente las cepas seleccionadas y realizar un análisis bioinformático.
4. Optimizar condiciones fisicoquímicas de degradación de Azul Directo, a nivel de laboratorio.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Muestreo y análisis fisicoquímico

Las muestras de efluente se colectaron de la empresa textil “Kansas Jeans”, ubicada en el distrito de San Juan de Lurigancho, Lima – Perú. Se tomaron 6 puntos uniformemente distribuidos en el lugar de confluencia de los efluentes generados por dicha empresa. De cada uno de estos puntos, se colectaron 100 mL de muestra de agua y 100 mL de fango en envases limpios y estériles debidamente rotulados. En total se colectaron 12 muestras, las cuales fueron conservadas a una temperatura de refrigeración (4°C), disponiendo para ello de un *cooler* con Gel Packs. Estas fueron transportadas inmediatamente al Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología para ser procesadas de acuerdo al protocolo pre-establecido por Ponraj *et al.*, (2011).

Se colectó además, muestras de agua para realizar el análisis fisicoquímico del efluente del lugar mediante el laboratorio de ensayo acreditado por el Organismo Peruano de Acreditación INACAL-DA con registro N° LE-047, SAG.

5.2 Evaluación del colorante azo: Azul Directo

5.2.1 Preparación de solución stock

El Azul Directo utilizado en este estudio es el colorante en uso de la empresa textil “Kansas Jeans”, este fue proveído por ellos mismos.

Se pesó 1 gramo de colorante en polvo y se disolvió en 100 ml de dimetilsulfóxido (DMSO). Homogenizada la solución, se filtró en un envase estéril debidamente rotulado. Se obtuvo una solución stock de 10000 ppm, la cual se usó posteriormente para suplementar al medio de cultivo.

5.2.2 Obtención de longitud de onda máxima ($\lambda_{\text{máx}}$)

Para hallar la longitud de onda máxima se hizo un barrido en el rango probable en el que se podría encontrar la molécula de colorante de acuerdo a la literatura (Silverstein *et al.*, 1994). De acuerdo al comportamiento de la curva, se fue afinando el barrido a unidades puntuales de longitudes de onda, hasta hallar la longitud máxima.

5.2.3 Construcción de curva de calibración

- a. Después de identificar la longitud de onda máxima del grupo cromóforo de la molécula de colorante; se procedió a determinar la absorbancia mínima y máxima que puede leer el equipo. Para ello se prepararon las siguientes concentraciones de colorante (mg/L): 10, 50, 100, 150, con la finalidad de precisar el rango de concentración de colorante (mg/L), que no sature la lectura de absorbancia. La muestra blanco fue el caldo ZZ sin colorante.
- b. Con las condiciones óptimas de medición, se prepararon 10 concentraciones de colorante (mg/L): 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100. Estas fueron medidas al espectrofotómetro.

Con los valores obtenidos, se diseñó la curva standard de la concentración de colorante vs absorbancia por el método estadístico de los mínimos cuadrados.

5.3 **Screening** cualitativo de degradación de colorante

A partir de las muestras de agua y fango, se sembraron cultivos por triplicado que estuvieron expuestos a distintas condiciones para determinar cuáles favorecen mejor el proceso de decoloración de las bacterias presentes en el efluente muestreado y determinar las condiciones de trabajo.

Se tomaron alícuotas de 1 ml para el caso de las muestras de agua y 1 gramo para el caso de fango, transferidas por separado en condiciones asépticas a matraces de vidrio de 250ml conteniendo 100ml de caldo Zhou & Zhimmerman (ZZ) modificado

(Aruna *et al.*, 2015a) que contiene (g/L): glucosa 0.5%, extracto de levadura 0.5%, 0.5 de $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, 2.66 de KH_2PO_4 , 5.415 de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y colorante 100 ppm. El medio fue ajustado con HCl 1N y NaOH 1N, a tres diferentes pHs: 4.5, 5.5 y 7.5 e incubados a 30°C y 50°, en condiciones estáticas y de agitación.

Las condiciones iniciales a las que fueron sometidas las bacterias presentes en el efluente colectado fueron, temperatura de 30 y 50°C, pH de 4.5, 5.5 y 7.5 a concentración de 100 ppm de colorante en cultivos a condiciones estáticas y en agitación (180 rpm).

5.4 Aislamiento de cepas bacterianas

5.4.1 Pre-enriquecimiento

A partir de los cultivos que tuvieron un mejor rendimiento en el *screening* cualitativo, se tomaron alícuotas y se replicaron en el mismo medio, en las mismas condiciones con el objetivo de eliminar el material grueso de la muestra.

5.4.2 Enriquecimiento

De acuerdo a los cultivos obtenidos en el pre-enriquecimiento, se tomaron inóculos y se hicieron pasajes en el mismo caldo de cultivo (ZZ) con colorante, para poder trabajar con microorganismos activos.

5.4.3 Selección primaria

Según los resultados en el *screening* primario a diferentes pH's, se decidió el pH, temperatura y la cantidad de oxígeno a trabajar y a partir de ello se procedió a la selección de los microorganismos.

5.4.4 Selección secundaria

Los cultivos seleccionados fueron sembrados en placas con agar Zhou & Zimmerman (ZZ) modificado (Aruna *et al.*, 2015a) y partir de ello se seleccionaron colonias en base a su morfología. Las colonias fueron sembradas en tubos de vidrio

conteniendo 3 ml de caldo ZZ modificado suplementado con 100 ppm de colorante. De acuerdo a la medición cualitativa de degradación del colorante, fueron seleccionadas. Para asegurar la pureza del aislado se volvió a sembrar en placas y se hicieron ceparios.

5.5 Identificación de cepas bacterianas seleccionadas

5.5.1 Caracterización morfológica

La evaluación macroscópica constó de la descripción de la morfología de la colonia en aspectos como tamaño, pigmentación, elevación, borde (Benson, 2002), y la evaluación microscópica de la descripción de la morfología celular y la tinción observada al microscopio a través de coloración Gram.

5.5.2 Identificación molecular

5.5.2.1 Extracción de DNA genómico

Las cepas fueron cultivadas en medio ZZ modificado hasta alcanzar una elevada densidad, las células fueron centrifugadas y el *pellet* resultante fue utilizado para la extracción de DNA genómico por medio del kit Miniprep de Wizard Genomic Purification (Promega®) siguiendo las indicaciones del fabricante.

5.5.2.2 Electroforesis y cuantificación del DNA

Después de realizar la extracción del DNA total, este fue cuantificado en el espectrofotómetro NanoDrop Lite® (absorbancia 260/280 nm) y en el fluorómetro Invitrogen® Qubit, para cumplir con las especificaciones técnicas requeridas por la empresa GenLab del Perú SAC, para el secuenciamiento del genoma de nuestros aislados. Además, se realizó una electroforesis en gel de agarosa ultrapura al 1% para poder visualizar la presencia de nuestro ADN cromosómico de buena calidad.

5.5.2.3 Secuenciamiento

El secuenciamiento fue realizado por la empresa GenLab del Perú SAC utilizando tecnología de próxima generación de Illumina®, *Next-Generation Sequencing* (NGS).

Para secuenciar el genoma completo de las bacterias seleccionadas, se envió 5 µg/µL de material genómico de cada bacteria. La librería fue preparada usando el *library prep kit: Nextera XT* produciendo tamaños promedio de 300 pb para luego ser secuenciados por el sistema MiSeq® de Illumina®.

5.5.2.4 Ensamblaje de genomas

La calidad de los *reads* obtenidos en el secuenciamiento, fue verificada usando el programa FastQC (Babraham Institute, Bioinformatics). Se realizó el ensamblaje de *novo* con el programa SPAdes (Bankevich *et al.*, 2012). Se utilizó la herramienta CAP3, programa que permite ensamblar secuencias contiguas (contigs) superpuestas con la finalidad de reducir su número (Huang y Madan, 1999). Adicionalmente, se utilizaron los programas ABACAS (Assefa *et al.*, 2009) e IMAGE (Swain *et al.*, 2012) para extender los contigs y reparar gaps. A partir de ello, se realizaron búsquedas de similitud empleando BLASTn contra la base de datos del GenBank con fines de identificación.

5.5.2.5 Filogenómica

Se utilizó el conjunto de herramientas de alineación y visualización del *core-genome Harvest*, para el análisis rápido y simultáneo de miles de cepas microbianas intraespecíficas. *Harvest* incluye Parsnp, un multi-alineador rápido de genoma central, y Gingr, una plataforma visual dinámica. Juntos proporcionan alineamientos interactivos del *core-genome*, llamadas variantes, detección de recombinación y árboles filogenéticos (Treangen *et al.*, 2014).

5.6 Diseño de consorcios

Para poder realizar el análisis comparativo de degradación, se sembraron cepas puras y consorcios en las mismas condiciones, a fin de no alterar el recuento inicial de bacterias (Maulin, 2014). Las cepas individuales se inocularon al 5% (v/v) en cultivos de 18 h por separado. Los consorcios se desarrollaron mediante la transferencia aséptica de un inóculo 5% (v/v) de cultivos de 18 h de cada una de las cepas individuales en diferentes combinaciones, cultivadas en matraces Erlenmeyer de 150 ml que contenían 50 ml de medio Zhou & Zimmermann (ZZ) modificado y la solución de 100 mg/L de colorante en óptimas condiciones (Valli y Suseela, 2003).

5.7 Bioensayos de decoloración

La selección de los cultivos y cepas inicialmente se realizó por las características cualitativas de degradación del colorante azul directo. Luego de hacer esta selección inicial, se realizó la evaluación de degradación de manera cuantitativa usando espectrofotometría UV-Vis.

5.7.1 *Screening* de aislados seleccionados

De acuerdo al método descrito por Nigam y col. (1996a), cada aislado seleccionado fue sembrado en un inóculo del 5% (v/v) en 100 ml de medio ZZ conteniendo azul directo (100 ppm) e incubado a la temperatura seleccionada. El monitoreo de la decoloración se realizó espectrofotométricamente en lecturas secuenciales cada 4 h.

5.7.2 *Screening* de los consorcios diseñados

El *screening* para la degradación del colorante se llevó a cabo en matraces de 250 ml que contenían 50 ml de medio ZZ suplementado con 100 mg/L de colorante. El medio se inoculó al 5% (v/v) de un cultivo 18 h de crecimiento y se incubó a 30°C (Maulin,

2014). La degradación del azul directo se monitoreó mediante espectrofotometría por lecturas secuenciales cada 4 h.

5.7.3 Evaluación del proceso de decoloración

Para la evaluación de la decoloración se usó un espectrofotómetro UV-Vis y se estandarizaron ciertos parámetros:

a. $\lambda_{m\acute{a}x}$

Por el análisis de absorción del espectro del colorante azul directo en el rango visible, la longitud de onda máxima del grupo cromóforo es 583 nm según Silverstein y col. (1994). Esta longitud de onda fue corroborada mediante mediciones al espectrofotómetro.

b. Concentración estándar del colorante

La concentración estándar del colorante, es un factor clave pues todos los experimentos de degradación se basaron en un valor de concentración, según Aruna *et al.* (2015a), Maulin (2014), Aruna *et al.* (2015b) la concentración óptima es 100 ppm; no obstante, posteriormente también se realizó una prueba de concentración óptima de colorante.

Una vez definidos los valores anteriores ($\lambda_{m\acute{a}x}$ y concentración estándar del colorante), se realizó los ensayos de decoloración propiamente dichos. Para ello se utilizó un control negativo que fue el medio de cultivo preparado de la misma forma, pero sin inocular. El ensayo se realizó por triplicado y se inició desde el momento de sembrar el inóculo en cada medio de cultivo. Las mediciones se realizaron a partir de ese momento y cada 4 h por un período de 30 h.

Se retiró una alícuota de 10 ml por cultivo paralelo para cada medición e inmediatamente los cultivos siguieron el proceso de incubación a la temperatura

seleccionada hasta el término del experimento. Dichas alícuotas fueron centrifugadas a 7000 rpm por 15 min a 4°C, para tener una buena separación de células y sobrenadante. El sobrenadante fue leído al espectrofotómetro UV-Vis a 583 nm.

El porcentaje de decoloración fue determinado usando la siguiente fórmula (Zimmermann *et al.*, 1982):

$$\text{Decoloración (\%)} = \frac{A_o - A_c}{A_o} \times 100$$

Donde,

Ao: Absorbancia del control

Ac: Absorbancia del medio conteniendo el cultivo aislado

5.8 Cinética de crecimiento de bacterias seleccionadas y consorcio diseñado

Se realizó la cinética de crecimiento del consorcio con mejor perfil de degradación de colorante, y de las cepas bacterianas que lo conforman a través del recuento en cámara Petroff-Hausser. El medio de cultivo utilizado fue caldo ZZ suplementado con colorante Azul Directo a concentración de 100 ppm.

5.9 Optimización de condiciones de degradación

5.9.1 Optimización por composición del medio de cultivo

5.9.1.1 Efecto de las fuentes de carbono y nitrógeno como co-sustratos

Para evaluar los requerimientos mínimos que debía tener nuestro medio de cultivo para que se favorezca el proceso de decoloración, se prepararon cuatro de medios de cultivo, el Medio 1 contenía solo sales: sulfato de amonio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, fosfato de potasio monobásico - KH_2PO_4 y fosfato monosódico dihidratado - $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. El Medio 2 contenía los componentes del Medio 1 más extracto de levadura. El Medio 3 contenía los componentes del Medio 1 más glucosa, y el Medio 4 contenía las 3 sales del Medio 1 más glucosa y extracto de levadura como co-sustratos.

5.9.1.2 Fuentes de carbono

Se trabajó con tres diferentes fuentes de carbono adicionales en el medio de cultivo: glucosa, maltosa y lactosa; las cuales fueron evaluadas al 1% (p/v) de inóculo (Aruna *et al.*, 2015a; Initha *et al.*, 2014). El medio ZZ modificado con colorante y sin inóculo, sirvió como control negativo. Todos los cultivos se mantuvieron a 30°C en condiciones estáticas, sin embargo, se fueron monitoreando al espectrofotómetro cada 4 h durante 24 h.

5.9.1.3 Fuentes de nitrógeno

Se utilizaron tres distintas fuentes de nitrógeno adicionales en el medio de cultivo: extracto de levadura, peptona y cloruro de amonio; las cuales fueron incluidas en la preparación del medio en porcentaje del 1% (p/v) (Aruna *et al.*, 2015a; Initha *et al.*, 2014). El medio ZZ modificado con colorante y sin inóculo, sirvió como control negativo. Todos los cultivos se mantuvieron a 30°C en condiciones estáticas y se monitorearon al espectrofotómetro cada 4 h durante 24 h.

5.9.1.4 Concentraciones de la fuente de carbono y nitrógeno seleccionadas

Determinadas las fuentes de carbono y nitrógeno, se evaluaron sus concentraciones óptimas para la actividad de decoloración en el medio de cultivo. Las concentraciones a evaluar fueron 0,1%, 0,5%, y 1% (p/v) con 5% de inóculo, el medio ZZ modificado con colorante y sin inóculo, sirvió como control negativo. Todos los cultivos se mantuvieron a 30°C en condiciones estáticas; sin embargo, se monitorearon al espectrofotómetro cada 4 h durante 24 h.

5.9.2 Optimización por parámetros físico-químicos

5.9.2.1 Tamaño de inóculo

A fin de determinar la concentración óptima del inóculo en la decoloración de azul directo, se evaluaron las siguientes concentraciones de inóculos en medio ZZ

modificado conteniendo 100 ppm de colorante: 1%, 3%, 5%, 8% y 10%, un matraz con medio ZZ modificado pero sin inóculo fue usado como control negativo. Todos los matraces fueron incubados a 30°C durante 24 h y fueron monitoreados al espectrofotómetro cada 4 h.

5.9.2.2 Temperatura

Los medios de cultivo con colorante fueron preparados como está descrito anteriormente con un inóculo de 5%. Se evaluaron 3 diferentes temperaturas: 25°C, 30°C y 37°C, las cuales fueron monitoreadas espectrofotométricamente por un periodo de 24 h. El medio ZZ modificado con colorante y sin inóculo, sirvió como control negativo.

5.9.2.3 pH inicial

Para hallar el pH óptimo para la degradación microbiana del colorante azul directo, se utilizó medio ZZ suplementado con el colorante antes descrito, con inóculo y temperaturas determinadas, donde se evaluaron los siguientes valores de pH: 6, 6.5, 7.0, 7.5 y 8. De igual manera, el medio ZZ modificado con colorante y sin inóculo sirvió como control negativo. Este proceso también fue monitoreado espectrofotométricamente cada 4 h durante 24 h.

5.9.2.4 Concentración inicial de colorante

Con el objetivo de determinar la concentración límite del colorante que podrían soportar nuestros aislados para realizar un proceso eficiente de degradación del colorante azul directo, se evaluó el efecto de las siguientes concentraciones iniciales: 100ppm, 150ppm, 200ppm, 250ppm y 300ppm las cuales fueron adicionadas al medio ZZ modificado antes descrito, con el inóculo determinado y como control negativo, el medio a la misma concentración de colorante, pero sin inocular.

5.10 Versatilidad del consorcio seleccionado en la degradación de colorantes

Además del Azul Directo, principal colorante de este estudio, se evaluó la capacidad degradativa que posee el consorcio diseñado, con respecto a otros colorantes azo: Amarillo Drimaren, Rojo Drimaren, Azul Marino Remazol, Azul Remazol, Amarillo Oro Remazol, Azul Turquesa Remazol y Rojo Remazol. Todos estos utilizados en menor medida en la industria textil y proveídos por la empresa “Kansas Jeans”. El procedimiento que se siguió con cada uno de estos colorantes, fue similar al descrito para el Azul Directo, excepto que el solvente para la preparación de la solución stock, en todos estos casos, fue agua bidestilada.

5.11 Análisis estadístico

Los datos generados de las mediciones de cada parámetro en el proceso de degradación del consorcio CP23, se evaluaron por análisis unidireccional de varianza (ANOVA) con la prueba de comparaciones multiple Tukey-kramer.

Para cada parámetro se partió de la premisa:

¿Existe diferencia estadísticamente significativa en las repeticiones de los porcentajes de decoloración en un punto del experimento?

Definimos los estadísticos:

- Nivel de significancia: $\alpha = 0.05$
- Nivel de confianza del 95%

Hipótesis nula (H_0): Los valores de los porcentajes de decoloración de las tres repeticiones en un punto, son iguales con 95% de confiabilidad.

Hipótesis alternativa (H_1): Los valores de los porcentajes de decoloración de las tres repeticiones en un punto, son distintas con 95% de confiabilidad.

Si el P-value es $\leq 0.05 \Rightarrow$ se rechaza la hipótesis nula.

A partir de los resultados confiables al 95%, se hallaron los porcentajes de decoloración promedio y se construyeron todas las gráficas de las cinéticas de decoloración.

Para el caso de los parámetros de optimización, se evaluó el análisis unidireccional de varianza (ANOVA), y así estipular si existía diferencia significativa entre el grado de decoloración de las variantes de los parámetros: fuentes de carbono, nitrógeno, temperatura, pH, tamaño de inóculo y concentración inicial de colorante. Se utilizaron los mismos estadísticos que para las repeticiones de los experimentos, siendo la premisa:

¿Existe diferencia estadísticamente significativa en los porcentajes de decoloración de las variantes del parámetro en cuestión?

Hipótesis nula (H_0): No existe diferencia estadísticamente significativa de los porcentajes de decoloración para cada variante del parámetro, con un nivel de confianza del 95%.

Hipótesis alternativa (H_1): Existe diferencia estadísticamente significativa de los porcentajes de decoloración para cada variante del parámetro, con un nivel de confianza del 95%.

Si el P-value es $\leq 0.05 \Rightarrow$ se rechaza la hipótesis nula.

6. RESULTADOS

6.1 Muestreo y análisis fisicoquímico

Las 12 muestras, 6 de agua (C1-C6) y 6 de fango (C7-C12), fueron tomadas de la fábrica de la empresa textil Kansas Jeans, las cuales forman parte de las aguas residuales que confluyen en una canaleta (Figura 5A) que se encuentra en la parte posterior de la fábrica. Las aguas eran de color azul, con presencia de fangos azules y pequeñas plantas en las paredes de la canaleta. El lugar era cercano al río Rímac.

En la Figura 5B se puede apreciar mejor el color de las aguas y los bordes con fango a los costados de la canaleta. En la Figura 5C se muestra el fango resultante del raspado de los bordes de la canaleta, el cual fue colectado como se indicó previamente. En la Figura 5D se muestra el procedimiento de recolección de aguas. Para todos los procedimientos de toma de muestra, se utilizaron envases estériles debidamente rotulados.

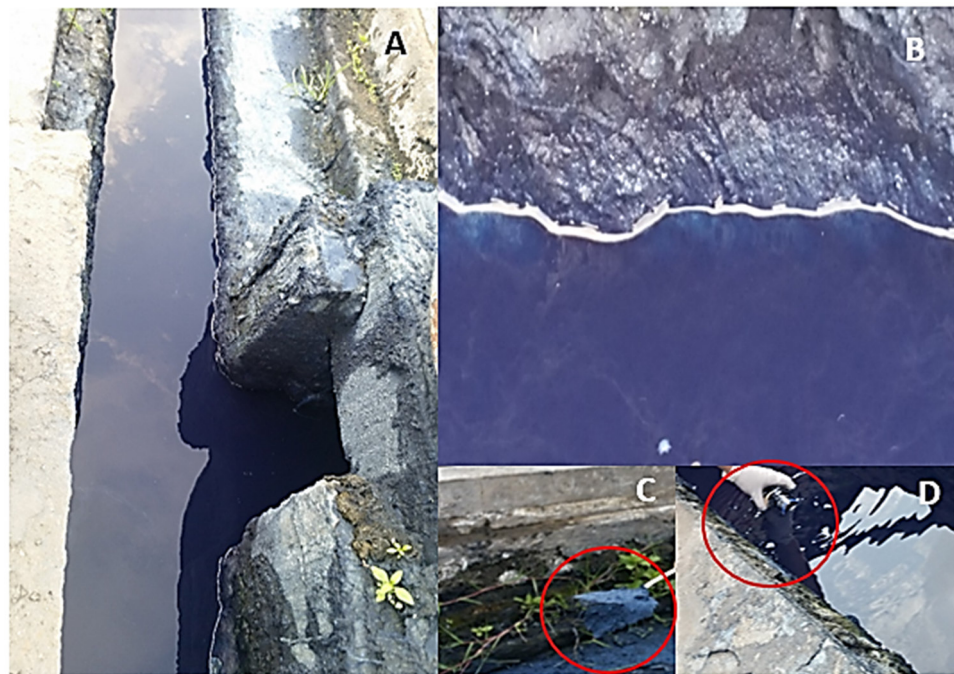


Figura 5. Zona de muestreo (A) Canaleta de confluencia de aguas residuales, (B) Zoom del borde de la canaleta, (C) toma de muestra de fango, y (D) toma de muestra de agua.

A continuación, se presenta en la Tabla 4 la georreferenciación del punto de muestreo y en la Tabla 5 el consolidado de datos de muestreo y resultados del análisis fisicoquímico, en el cual se midieron valores de pH, Demanda Bioquímica de oxígeno (DBO), Demanda química de oxígeno (DQO), Turbidez, Sólidos suspendidos totales (TSS) y Recuento de Bacterias Heterotróficas por incorporación.

Tabla 4. Coordenadas georreferenciadas de la fábrica textil “Kansas Jeans”

Producto	Efluente industrial textil
Coordenadas UTM WGS 84	0285899E
	8671699N
Altitud (m.s.n.m.)	331
Descripción del punto de muestreo	Punto de unión de todas las descargas

Tabla 5. Parámetros físico-químicos de las muestras de efluente textil

Ensayo	Unidades	Resultados
pH (medición en campo)	Unid. pH	6.82
Demanda Bioquímica de oxígeno ₅ (DBO ₅)	mg/L	857.0
Demanda Bioquímica de oxígeno (DQO)	mg/L	1622.0
Turbidez	NTU	>800
Sólidos suspendidos totales (TSS)	mg/L	147.00
Recuento de Bacterias Heterotróficas por incorporación	Ufc/mL	20

6.2 Colorante Azoico

La longitud de onda máxima ($\lambda_{\text{máx}}$), fue de 583nm (datos no mostrados). Con este dato establecido, se determinó la absorbancia mínima y máxima del Azul Directo, como indica la Tabla S1 (Anexos). Estos valores serán referenciales para la construcción de la curva standard.

6.2.1 Curva de calibración de Azul Directo

De acuerdo al método de los mínimos cuadrados, la curva de calibración de Azul Directo obtuvo un índice de correlación $R^2 = 0.9983$ (Figura 6) y tiende a ser una línea casi perfecta, cumpliéndose de esta manera la ley de Lambert-Beer.

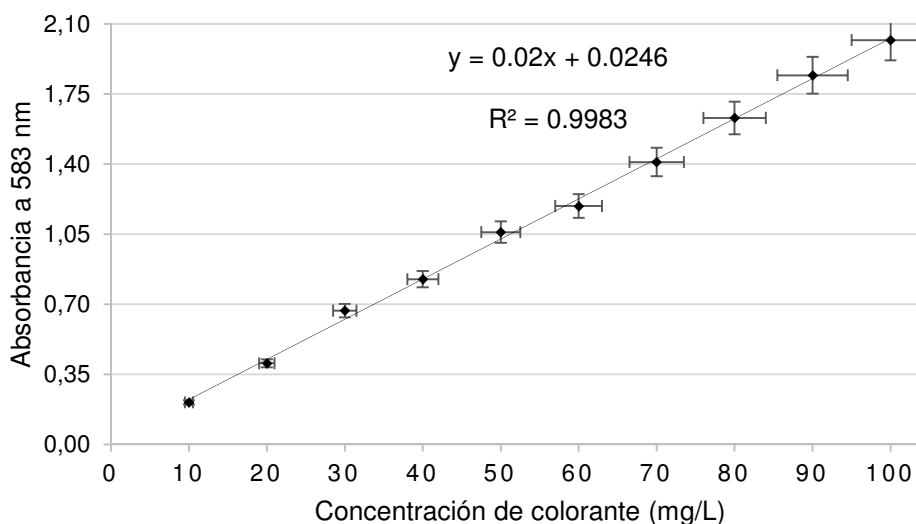


Figura 6. Curva de calibración del colorante Azul Directo.

6.3 *Screening* cualitativo de degradación de colorante

De las 12 muestras que se colectaron, se sembró un cultivo por muestra, por triplicado. A partir de ello, se realizó el *screening* cualitativo de los parámetros temperatura, pH y disponibilidad de oxígeno. La intensidad de degradación de colorante ha sido clasificado mediante "+", donde "-" nos indica que no hubo degradación por parte

de los consorcios naturales, y “++++”, nos indica una máxima decoloración de Azul Directo.

Inicialmente se evaluaron dos temperaturas de trabajo, para organismos mesófilos (30° C) y termófilos (50° C). El control negativo para todas las evaluaciones fue caldo ZZ suplementado con colorante a 100 ppm. En la Tabla 6, se muestra la intensidad de decoloración que tuvieron los cultivos después de 24 horas, en la cual se muestra la presencia de dos cultivos mesófilos que tuvieron máxima decoloración a las 24 horas: C12 y C3, y ningún cultivo con esa característica para el caso de termófilos. Para nuestros fines, solo nos enfocamos en los cultivos que tienen decoloración máxima (++++), por lo que la temperatura de trabajo escogida fue la de 30° C.

Tabla 6. *Screening* de degradación cualitativa de cultivos mesófilos y termófilos.

Mesófilos (30°C)			Termófilos (50°C)	
Intensidad de decoloración	N° de Cultivos	Código cultivos	N° de Cultivos	Código cultivos
-	2	C9, C10	1	C9
+	2	C2, C11	8	C2, C11, C3, C7, C5, C1, C10, C6
++	3	C6, C7, C1	3	C12, C4, C8
+++	3	C4, C5, C8	-	-
++++	2	C12, C3	-	-

- : Sin decoloración
 + : Decoloración mínima
 ++++ : Decoloración máxima

Con la temperatura de trabajo elegida, se realizó el testeó a 3 diferentes pHs: 4.5, 5.5 y 7.5, teniendo en cuenta solo la decoloración máxima (++++) a las 24 horas. En la tabla 6 se puede observar que el único pH en el que hubo cultivos con decoloración máxima (C12 y C3) fue el de 7.5, por lo cual, fue escogido como pH de trabajo.

Tabla 7. *Screening* de degradación cualitativa de cultivos a diferentes pHs.

pH	N° de Cultivos	Código del cultivo
4.5	-	-
5.5	-	-
7.5	2	C12, C3

De igual modo, se determinó la degradación cualitativa de Azul Directo en condiciones estáticas y de agitación (180 rpm) (Tabla 8). Este experimento se realizó con las condiciones determinadas anteriormente, temperatura de 30°C y pH 7.5.

Tabla 8. *Screening* de degradación cualitativa de cultivos en condiciones estáticas y de agitación.

Cultivos	N° de Cultivos	Código cultivos
En agitación	-	-
Estáticos	2	C12, C3

De la Tabla 8 se puede apreciar que la condición de decoloración máxima la cumplieron dos cultivos en condiciones estáticas: C12 y C3. Por lo cual, el parámetro de disponibilidad de oxígeno, quedó establecido para las condiciones de trabajo.

6.4 Aislamiento de cepas bacterianas

En el *screening* cualitativo se establecieron las condiciones de trabajo: medio de cultivo ZZ a pH 7.5, incubación a temperatura de 30° C en condiciones estáticas; sin embargo, también se seleccionaron los mejores cultivos: C12 y C3. A partir de ello, se procedió al aislamiento de cinco cepas bacterianas en Agar Nutricio. Se realizó la siembra por estriado en placas con medio sólido y se hicieron repiques hasta obtener colonias puras (Figura 7). Las cepas se caracterizaron morfológicamente de manera macroscópica y microscópica, incluida la coloración Gram (Tabla 9). Además, se realizaron ceparios de los aislados caracterizados.

Tabla 9. Caracterización macroscópica y microscópica (morfología de colonia y morfología celular, respectivamente), y coloración Gram de los cinco aislados seleccionados.

Características Morfológicas												
Código cepas aisladas	Tamaño relativo	Pigmentación	Elevación	Borde	Forma	Superficie	Aspecto	Luz reflejada	Luz transmitida	Consistencia	Coloración Gram	Morfología celular
PL	Pequeño	Blanca	Elevada	Entero	Circular	Convexa	Húmedo	Brillante	Opaca	Cremosa	+	Cocos
LS	Mediano	Crema	Elevada	Entero	Circular	Convexa	Húmedo	Brillante	Translúcida	Cremosa	-	Bacilos
BM	Mediano	Blanca	Plana	Filamentoso	Irregular	Plana	Seco	Mate	Opaca	Seca	+	Bacilos
CG	Grande	Crema	Elevada	Entero	Circular	Convexa	Húmedo	Brillante	Translúcida	Cremosa	-	Bacilos
AP	Pequeño	Amarilla	Elevada	Entero	Circular	Convexa	Húmedo	Brillante	Opaca	Cremosa	-	Cocobacilos

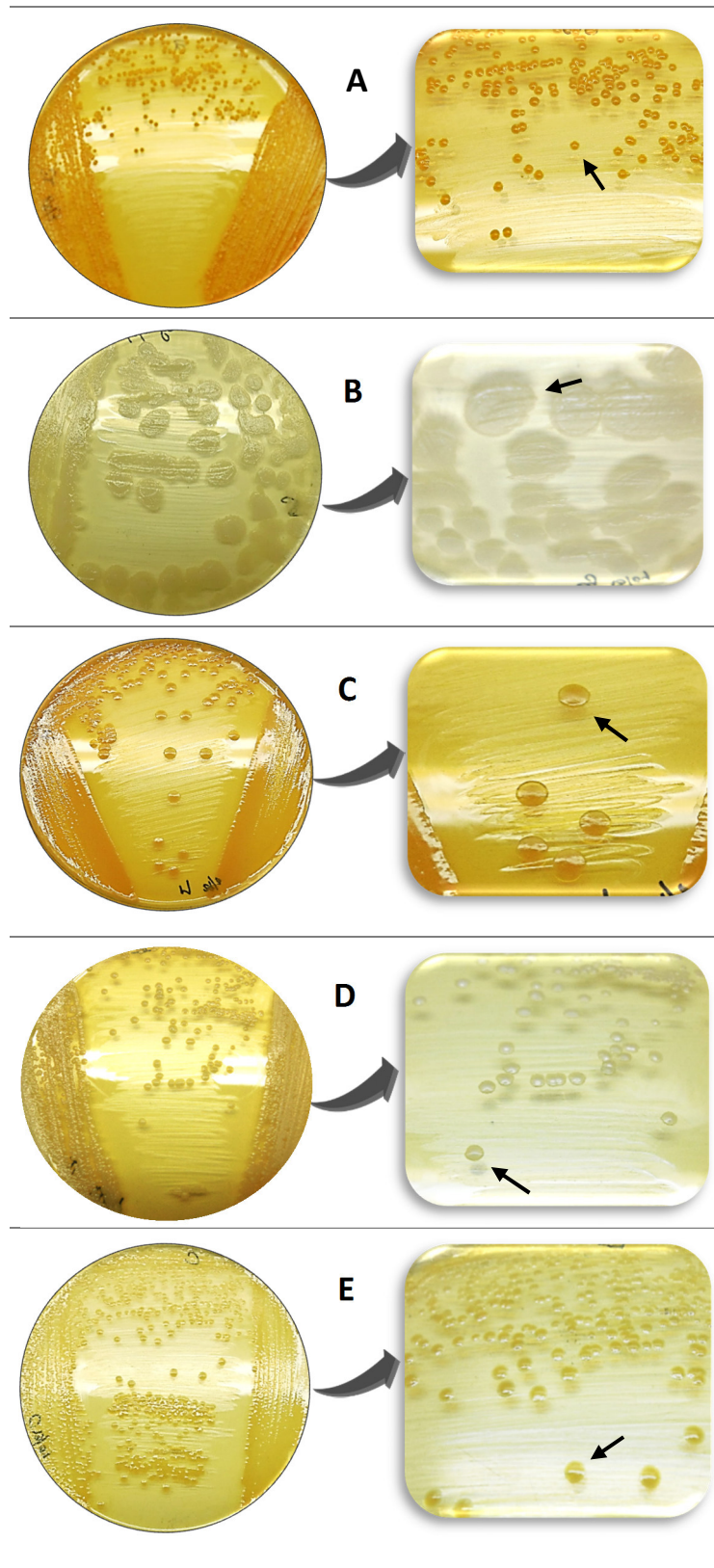


Figura 7. Cepas bacterianas aisladas en Agar Nutricio. En la fila izquierda se muestra cultivos en placa. En la fila derecha se presenta el detalle de las colonias. (A) Cepa AP, (B) Cepa BM (C) Cepa LS (D) Cepa PL (E) Cepa CG.

6.5 Diseño de consorcios y bioensayos de decoloración

Se realizaron combinaciones con las cinco cepas aisladas en medio ZZ suplementado con 100 ppm de colorante Azul Directo dando como resultado, 27 consorcios. Se determinó el porcentaje de decoloración a las 24 horas que tuvo cada consorcio (Tabla 11 y Figura 8); estos valores fueron evaluados según el análisis unidireccional de varianza (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples Tukey-kramer para evaluar su significancia. La lectura se consideró significativa cuando $P \leq 0.05$. El consorcio CP23 resultó tener una mayor eficiencia de decoloración, con un porcentaje promedio de 93.91%; por lo cual fue escogido para los subsiguientes experimentos. Además, se realizó la medición de las cepas individuales (Tabla 10 y Figura 8) que fueron aisladas de los cultivos seleccionados C12 y C3 para comparar el grado de eficiencia que tenían como aislados puros.

Tabla 10. Eficiencia de decoloración de Azul Directo a las 24 horas por las cepas aisladas.

Cepas bacterianas	% Decoloración (\bar{x})
PL	77.68
LS	8.38
CG	7.41
AP	25.44
BM	2.63

Tabla 11. Eficiencia de decoloración de Azul Directo a las 24 horas por los consorcios construidos a partir de nuestros aislados.

Consortio	Cepas bacterianas	% Decoloración (\bar{x})
CP1	PL, CG, LS, AP, BM	93.57
CP2	PL, CG, LS, AP	93.47
CP3	CG, LS, AP, BM	6.14
CP4	LS, AP, BM, PL	93.27
CP5	AP, BM, PL, CG	92.11
CP6	BM, PL, CG, LS	93.27
CP7	PL, CG, LS	93.03
CP8	CG, LS, AP	9.41
CP9	LS, AP, BM	5.56
CP10	AP, BM, PL	72.86
CP11	BM, PL, CG	58.63
CP12	PL, BM, LS	82.60
CP13	PL, LS, AP	84.26
CP14	PL, CG, BM	73.93
CP15	CG, AP, BM	4.68
CP16	LS, CG, BM	77.83
CP17	PL, CG, AP	87.38
CP18	PL, CG	84.99
CP19	CG, LS	9.16
CP20	LS, AP	10.38
CP21	AP, BM	3.80
CP22	BM, PL	84.41
CP23	PL, LS	93.91
CP24	PL, AP	82.85
CP25	CG, AP	10.28
CP26	CG, BM	7.94
CP27	BM, LS	19.74

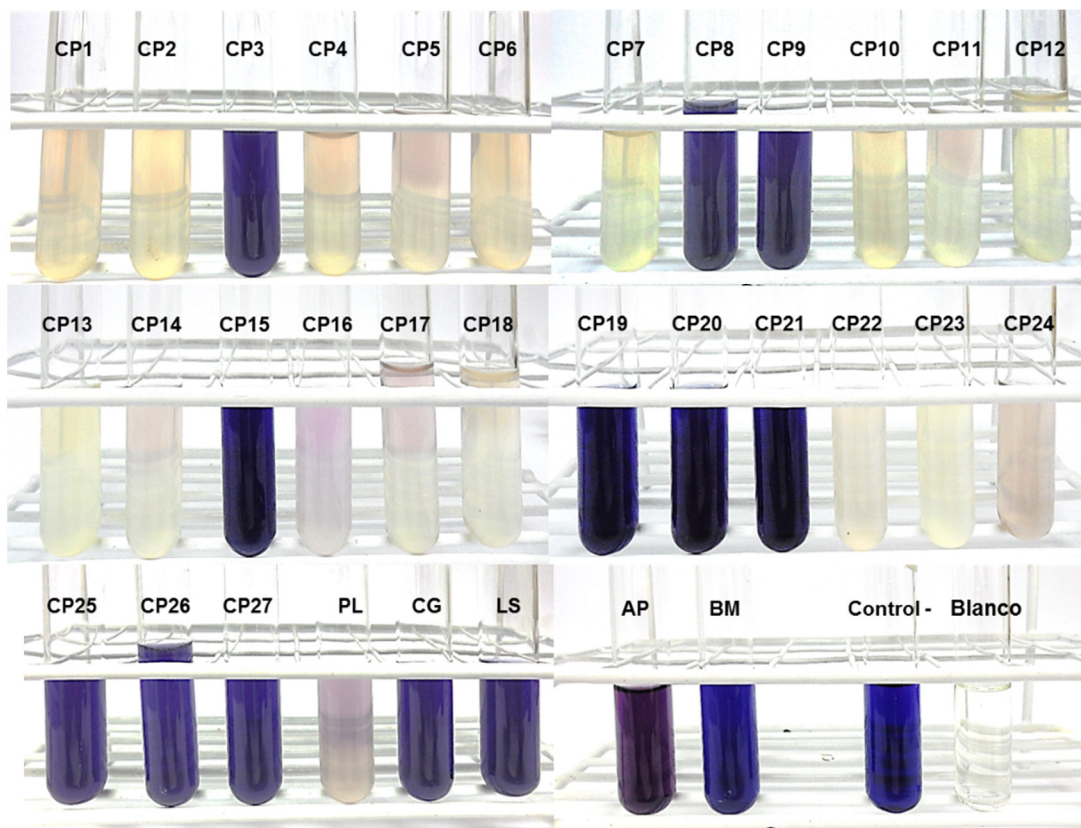


Figura 8. Degradación de Azul Directo a las 24 horas por los consorcios construidos (CP1-CP27) y las cepas aisladas (PL-BM); además se muestra en la parte inferior derecha el control negativo y el blanco.

6.6 Cinética de crecimiento del consorcio CP23 y de las cepas PL23 y LS23

Se evaluó el crecimiento microbiano del consorcio seleccionado por su mayor capacidad de decoloración: CP23, y las dos cepas bacterianas con las que fue diseñado: PL y LS. De la Figura 9 se puede destacar que cuando las cepas microbianas se encuentran en calidad de consorcio, mantienen una sinergia positiva respecto a su tasa de crecimiento. Asimismo, se construyeron curvas logarítmicas (datos no mostrados) para determinar las velocidades de crecimiento y tiempos generacionales promedios de las cepas PL y LS y del consorcio CP23 (Tabla 12).

En el consorcio CP23 se obtuvo como resultado un aumento en la velocidad de crecimiento (μ), la cual fue de $2.6 \pm 0.05 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$, y un menor tiempo generacional de $26.5 \pm 0.5 \text{ min}$, a comparación de los aislados puros.

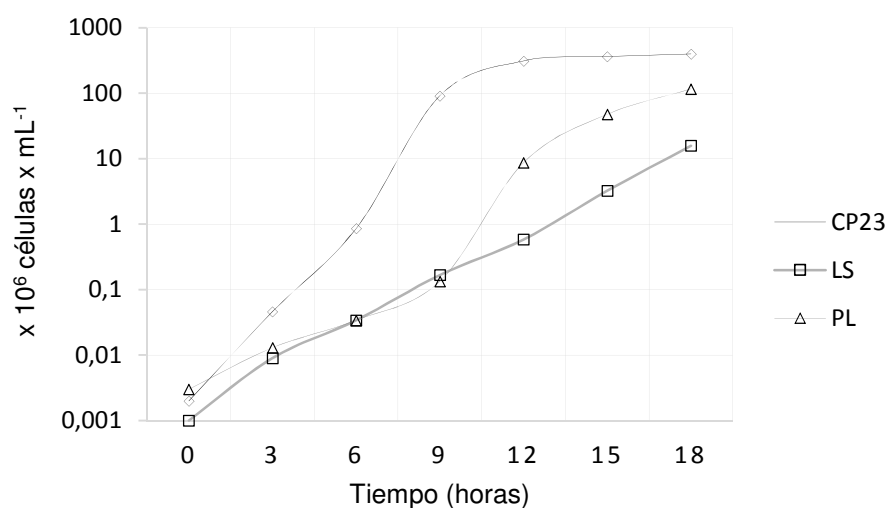


Figura 9. Cinética de crecimiento del consorcio CP23 y las dos cepas que lo conforman. El consorcio CP23 presentó una velocidad de crecimiento mayor que las cepas LS y PL, por separado.

Tabla 12. Velocidades de crecimiento y tiempos generacionales del consorcio CP23 y las cepas bacterianas LS y PL cultivadas en medio ZZ suplementado con colorante.

Medio ZZ con colorante a 100 mgL^{-1}		
Cepa/Consortio	Velocidad de Crecimiento μ $\times 10^{-2} (\text{min}^{-1})$	Tiempo Generacional (minutos)
CP23	2.6 ± 0.05	26.5 ± 0.5
LS	0.9 ± 0.07	78.4 ± 0.7
PL	2.3 ± 0.06	29.8 ± 0.6

6.7 Identificación molecular de cepas bacterianas PL y LS

El consorcio microbiano CP23 se construyó utilizando las cepas PL y LS, aisladas de aguas residuales textiles de una fábrica ubicada en Lima, Perú. Se secuenció el genoma completo de ambos aislados, se ensamblaron y se realizaron búsquedas de similitud empleando BLASTn contra la base de datos del GenBank. Se determinó una similitud de secuencia del 99% de la cepa PL con la cepa *Enterococcus gallinarum* BM4174 y una similitud del 99% también para el caso de la cepa LS con respecto a la cepa *Stenotrophomonas maltophilia* K279a.

La cepa nativa LS fue denominada *Stenotrophomonas maltophilia* LS23, y presentó un genoma de 4907979 pb distribuidas en 221 *contigs* mediante el programa SPAdes; sin embargo, el número de *contigs* fue reducido a 169 mediante la herramienta CAP3, con un N50 de 68325 pb. Del mismo modo, la cepa nativa PL denominada *Enterococcus gallinarum* PL23, presentó un genoma de 3365117pb distribuidas en 86 *contigs* mediante el programa SPAdes, reducidos a 37 mediante CAP3, con un N50 de 320245 pb (Tabla 13).

En la construcción del árbol basado en el análisis del *core-genome*, de acuerdo a los genomas completos reportados en la base de datos del Genbank en el *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), se obtuvo que la cepa *Stenotrophomonas maltophilia* LS23, es una cepa cercana a *Stenotrophomonas rhizophila* QL-P4 (Figura 10), y *Enterococcus gallinarum* PL23 tiene cercanía a *Enterococcus casseliflavus* EC20 (Figura 11).

Tabla 13. Parámetros y estadísticos del ensamblaje del genoma de *S. Maltophilia* LS23 y *E. gallinarum* PL23.

Parámetros y Estadísticos	<i>S. maltophilia</i> LS23	<i>E. gallinarum</i> PL23
# <i>Contigs</i>	169	37
# <i>Contigs</i> (>= 0 pb)	154	65
# <i>Contigs</i> (>= 1000 pb)	129	37
Longitud total	4907979	3365117
Longitud total (>= 1000 pb)	4902782	3362602
<i>Contig</i> más largo	160856	522713
GC (%)	66.24	40.37
N50	68325	320245
N75	40728	131018
# N's	0	0
# N's per 100 kpb	0	0

*Estadísticos basados sobre *contigs* de tamaño >= 500 bp.

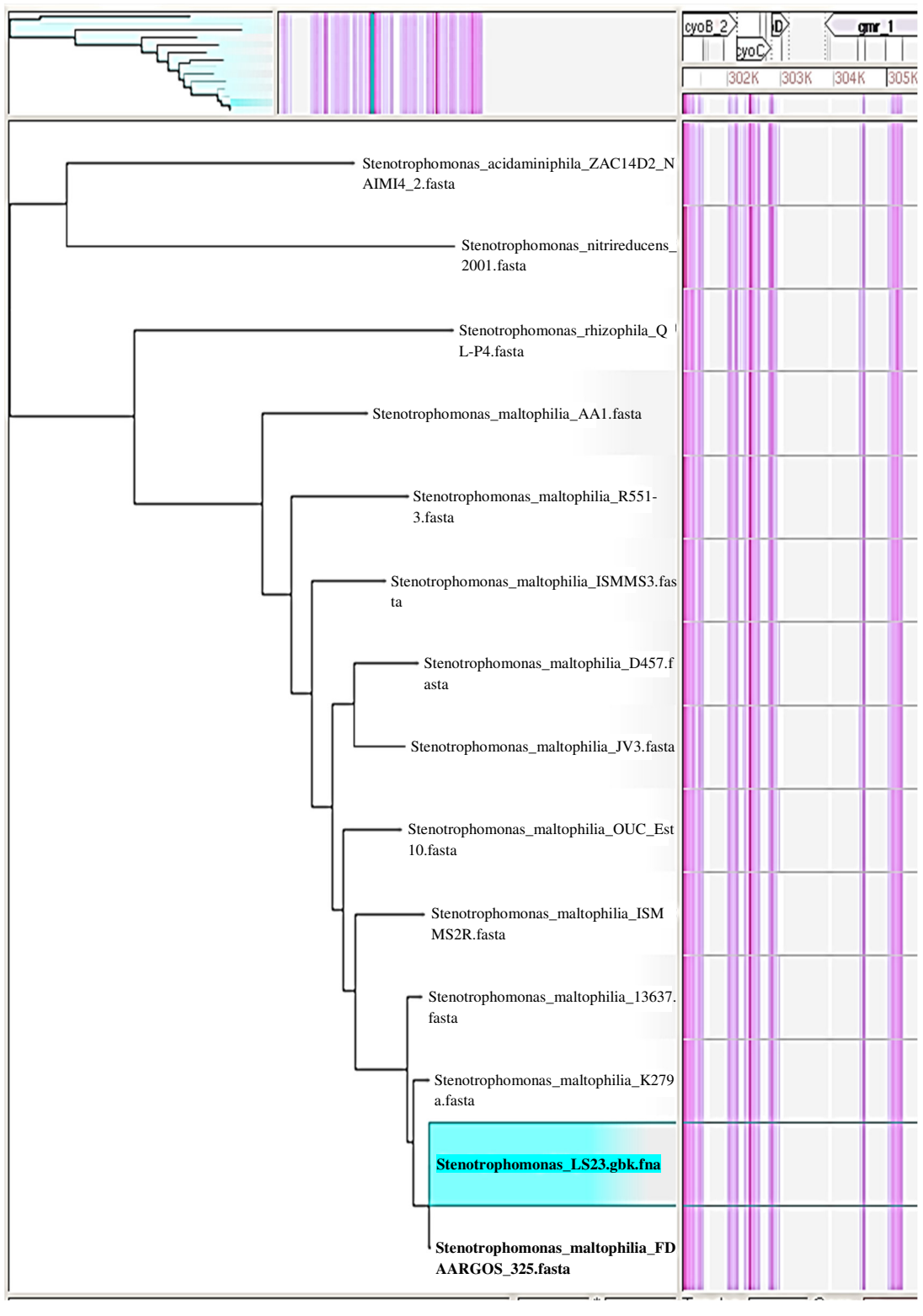


Figura 10. Árbol tipo cladograma agrupando los *core-genome* de las cepas con identidades mayores a *Stenotrophomonas maltophilia* LS23.

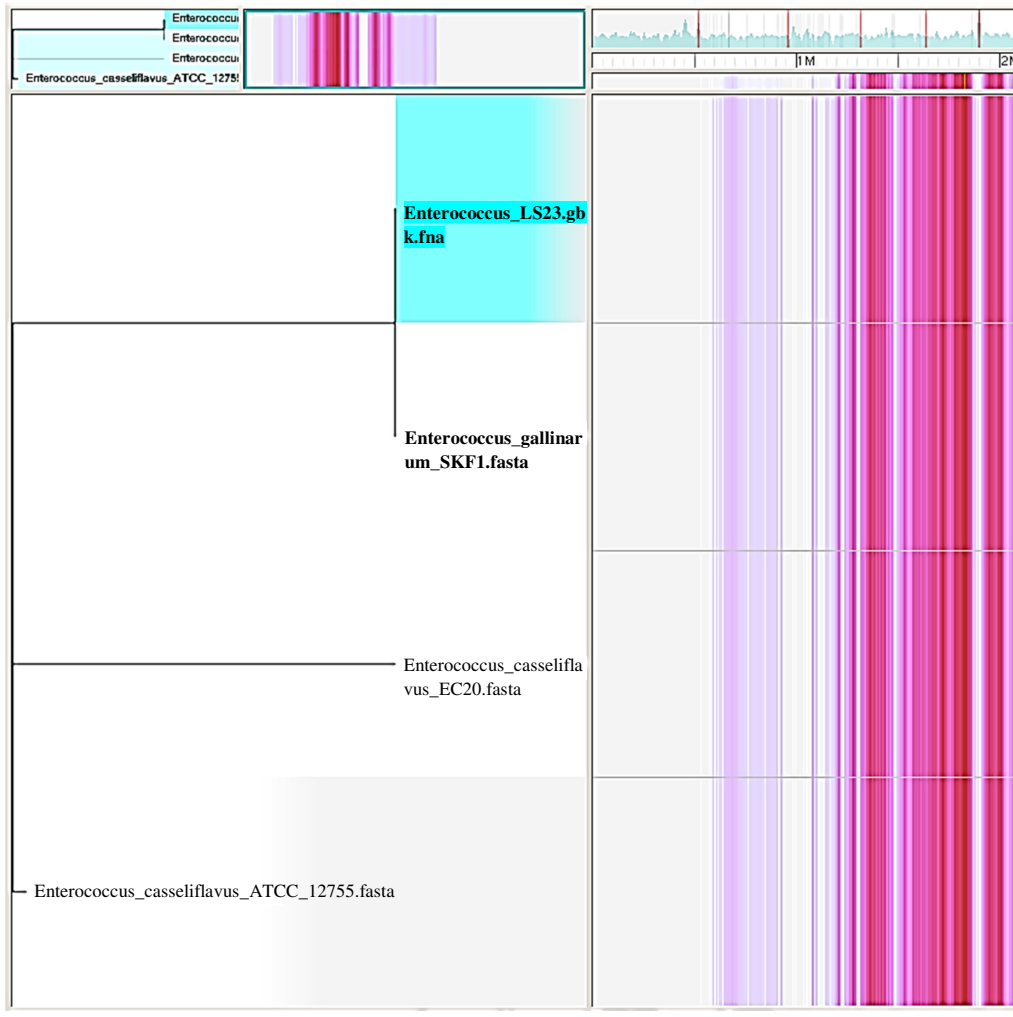


Figura 11. Árbol tipo cladograma agrupando los *core-genome* de las cepas con identidades mayores a *Enterococcus gallinarum* PL23.

6.8 Optimización de los requerimientos nutricionales del consorcio CP23

Se prepararon cuatro medios de cultivo, el Medio 1 contenía solo sales: sulfato de amonio - $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, fosfato de potasio monobásico - KH_2PO_4 y fosfato monosódico dihidratado - $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; por lo que la fuente de carbono y nitrógeno debía ser proporcionada únicamente por la molécula de colorante. El Medio 2 contenía los componentes del Medio 1 más extracto de levadura. El Medio 3 contenía los componentes del Medio 1 más glucosa, y el Medio 4 contenía las 3 sales del Medio 1 más glucosa y extracto de levadura como co-sustratos.

En la Tabla 14 se detalla el resultado de la eficiencia de decoloración del consorcio CP23 con respecto a cada uno de estos cuatro medios de cultivo. Estas lecturas también fueron evaluadas mediante ANOVA y Tukey-kramer. Del análisis se obtuvo que el tipo de medio de cultivo utilizado, afectaba significativamente el grado de decoloración ($p < 0.05$). En la Figura 12 se observa que el mejor perfil de decoloración lo obtuvo el consorcio CP23 en el Medio 4 que contenía fuente de carbono y nitrógeno adicional en el medio de cultivo.

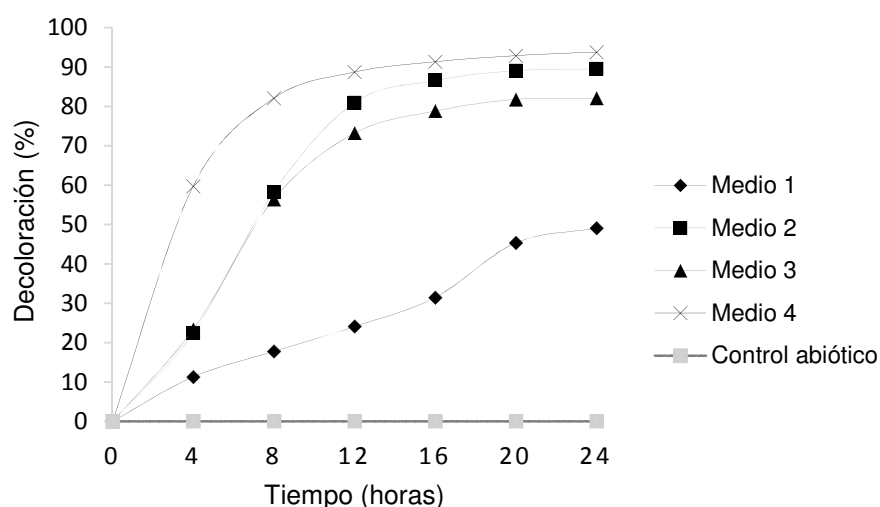


Figura 12. Cinética de decoloración del consorcio CP23 en distintas modificaciones del medio ZZ suplementado con 100 ppm de colorante Azul Directo.

Tabla 14. Porcentajes (%) de decoloración del consorcio CP23 en distintas modificaciones del medio de cultivo ZZ.

Medios \ Horas	0	4	8	12	16	20	24
1	0	11.29	17.78	24.09	31.46	45.35	49.11
2	0	22.48	58.28	80.96	86.61	89.09	89.59
3	0	23.38	56.39	73.21	78.86	81.81	82.13
4	0	59.70	82.08	88.76	91.34	92.95	93.82
Control abiótico	0	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01

Se evaluó el crecimiento del consorcio CP23 en el medio de cultivo ZZ con diferentes fuentes de carbono: glucosa, maltosa y lactosa (Figura 13); para evaluar la eficiencia de decoloración con cada una de ellas. A las 24 horas, la glucosa resultó con un porcentaje de decoloración promedio de 93.82%, mientras que la maltosa obtuvo un 91.11% y la lactosa un 88.57% (Tabla 15). Se aplicó ANOVA de un factor para analizar si el porcentaje de decoloración promedio se veía afectado por estas fuentes de carbono, y se obtuvo que sí se afectaban significativamente el proceso ($p < 0.05$). Siendo la glucosa la fuente de carbono más aprovechable (93.82%) para la degradación de colorantes, fue la escogida para las subsiguientes pruebas.

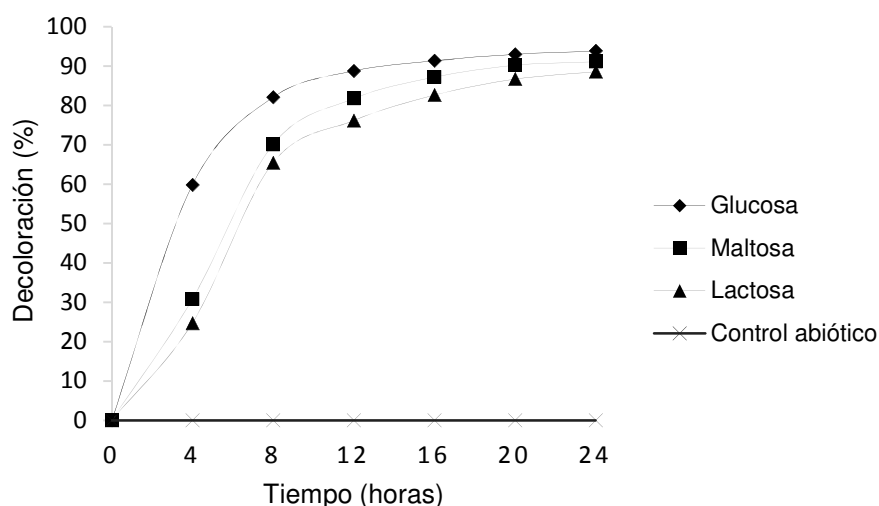


Figura 13. Cinética de decoloración del consorcio CP23 sometido a distintas fuentes de carbono en el caldo ZZ con 100 ppm de colorante Azul Directo.

Tabla 15. Porcentajes (%) de decoloración del consorcio CP23 en distintas fuentes de carbono del medio de cultivo ZZ.

Fuentes de carbono	Horas						
	0	4	8	12	16	20	24
Glucosa	0	59.75	82.06	88.76	91.36	93.00	93.82
Maltosa	0	30.77	70.05	81.73	87.16	90.22	91.11
Lactosa	0	24.69	65.40	76.15	82.61	86.69	88.57
Control abiótico	0	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00

Con la fuente de carbono establecida en el medio de cultivo, se prosiguió a evaluar la fuente de nitrógeno; estas fueron el extracto de levadura, la peptona y el cloruro de amonio (NH_4Cl). Como se muestra en la Figura 14, de estos tres tipos de fuentes de nitrógeno, cabe destacar que el extracto de levadura tuvo un porcentaje de decoloración de 93.81% a las 24 horas, sobre un 89.63 y 85.59% de la peptona y cloruro de amonio, respectivamente (Tabla 16). En el análisis de ANOVA de un factor para los tipos de fuentes de nitrógeno, se obtuvo que cada uno afectaba significativamente el proceso de decoloración ($p < 0.05$).

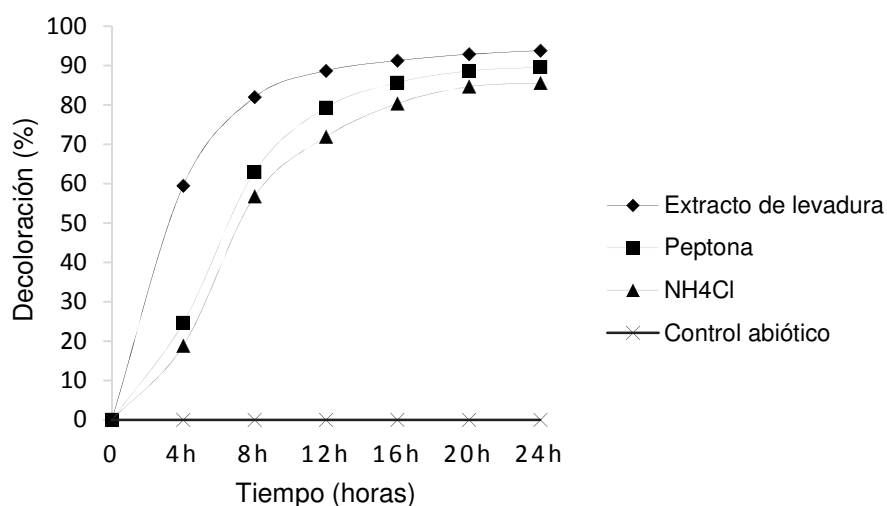


Figura 14. Cinética de decoloración del consorcio CP23 sometido a distintas fuentes de nitrógeno en el caldo ZZ con 100 ppm de colorante Azul Directo.

Tabla 16. Porcentajes (%) de decoloración del consorcio CP23 en distintas fuentes de nitrógeno del medio de cultivo ZZ.

Fuentes de nitrógeno	Horas						
	0	4	8	12	16	20	24
Extracto de levadura	0	59.44	81.97	88.69	91.28	92.91	93.81
Peptona	0	24.67	62.96	79.33	85.68	88.64	89.63
NH_4Cl	0	18.83	56.78	71.88	80.38	84.65	85.59
Control abiótico	0	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00

Después de haber sido elegidas la glucosa y extracto de levadura como fuentes de carbono y nitrógeno, respectivamente; se evaluaron sus concentraciones. En la Figura 15 se muestra la gráfica de la cinética de decoloración de las tres concentraciones de glucosa: 0.1, 0.5 y 1% (p/v), con porcentajes de degradación de 93.85, 96.92 y 95.89%, respectivamente (Tabla 17), determinados a las 24 horas de incubación. En el análisis de ANOVA de un factor, se obtuvo que las concentraciones de glucosa no afectaban significativamente el proceso de degradación ($p > 0.05$); sin embargo, se consideró la concentración de glucosa que generaba ligeramente un mayor porcentaje de decoloración. Esta concentración de glucosa fue del 0.5% (p/v).

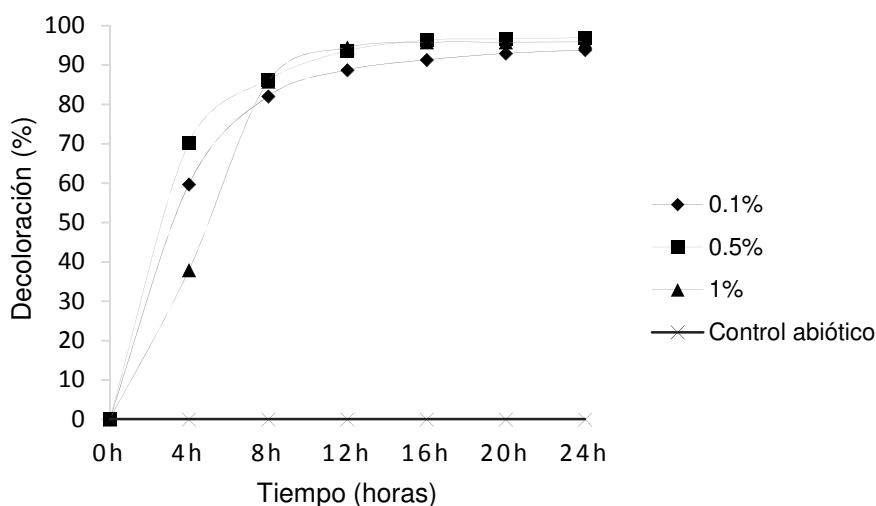


Figura 15. Cinética de decoloración del consorcio CP23 sometido a distintas concentraciones de glucosa en el caldo ZZ con 100 ppm de colorante Azul Directo.

En la Figura 16 se presentan los porcentajes de decoloración de las concentraciones de extracto de levadura a las 24 horas: 93.70, 96.41 y 97.30% para concentraciones de 0.1, 0.5 y 1% (p/v), respectivamente (Tabla 17). En el análisis de ANOVA de un factor, se obtuvo que las concentraciones de extracto de levadura no afectaban significativamente el proceso de degradación ($p > 0.05$); sin embargo, se consideró la concentración de extracto de levadura que generaba ligeramente un mayor

porcentaje de decoloración. La concentración de extracto de levadura al 1% (p/v) fue elegida como condición de trabajo para continuar con el proceso de optimización.

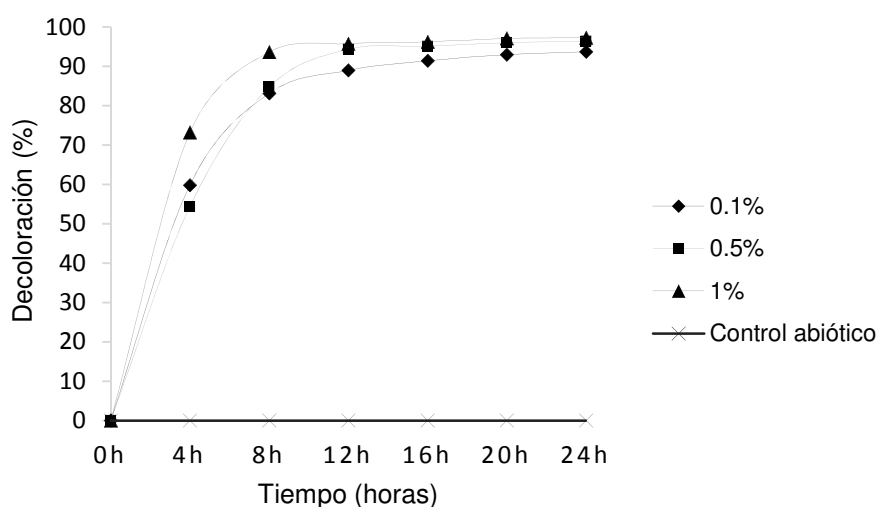


Figura 16. Cinética de decoloración del consorcio CP23 sometido a distintas concentraciones de extracto de levadura en el caldo ZZ con 100 ppm de colorante Azul Directo.

Tabla 17. Porcentajes (%) de decoloración del consorcio CP23 en distintas concentraciones de glucosa y extracto de levadura.

	% Decoloración						
	0h	4h	8h	12h	16h	20h	24h
Glucosa							
0.1%	0	59.70	82.08	88.76	91.34	92.95	93.85
0.5%	0	70.23	86.31	93.60	96.33	96.68	96.92
1%	0	37.88	85.83	94.48	95.77	95.80	95.89
Control abiótico	0	0.00	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00
Extracto de levadura							
0.1%	0	59.80	83.13	88.98	91.39	93.00	93.70
0.5%	0	54.37	84.72	94.33	95.08	96.01	96.41
1%	0	73.18	93.61	95.75	96.23	97.08	97.30
Control abiótico	0	0.01	0.00	0.01	0.00	0.01	0.00

6.9 Optimización de parámetros físico-químicos del consorcio CP23

Se evaluaron tres temperaturas: 25, 30 y 37°C, asimismo, cada temperatura tuvo dos tipos de medios, con concentraciones distintas de glucosa y extracto de levadura. El medio C1 contenía 1% de glucosa y 1% de extracto de levadura. El medio C2 contenía 0.5% de glucosa y 1% de extracto de levadura. La medición final del porcentaje de decoloración fue a las 12 horas, obteniendo como resultado una mejor decoloración a la temperatura de 37°C en la combinación C2, con 0.5% de glucosa y 1% de extracto de levadura (Tabla 18). En el análisis de ANOVA de un factor, se obtuvo que para el caso de la combinación C1, el valor de p fue > 0.05 , por lo que no se consideró afecto significativamente al proceso de decoloración; sin embargo, la combinación C2 obtuvo un valor de $p < 0.05$, considerándose que la combinación C2 sí ejercía diferencia significativa en la degradación del colorante en las distintas temperaturas de incubación. La temperatura óptima del proceso fue 37°C en presencia de 0.5% de glucosa y 1% de extracto de levadura en el medio de cultivo.

Tabla 18. Porcentaje de decoloración a distintas temperaturas y combinaciones de concentraciones de glucosa y extracto de levadura.

		Decoloración (%)			
		0h	4h	8h	12h
25°C	C1	0	47.49	92.36	94.54
	C2	0	52.98	93.55	95.53
30°C	C1	0	54.69	94.34	95.78
	C2	0	56.13	96.18	96.95
37°C	C1	0	73.82	95.83	96.20
	C2	0	90.02	97.30	97.59

Otro parámetro importante, fue el del tamaño del inóculo, establecido en porcentajes: 1, 3, 5, 8 y 10% que contenían respectivamente 4×10^5 , 10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 y

4x10⁶ UFC/mL. En el análisis de ANOVA de un factor, se determinó que el tamaño de inóculo afectaba significativamente la decoloración ($p < 0.05$). De la Figura 17 se puede observar que el inóculo con mejor perfil de decoloración fue el de 10% con 2x10⁶ UFC/mL, mostrando eficiencia del 98.09%, con respecto a los otros valores: 84.12, 96.53, 97.54 y 97.84% de los tamaños de inóculo de 1, 3, 5 y 8% correspondientemente (Tabla 19).

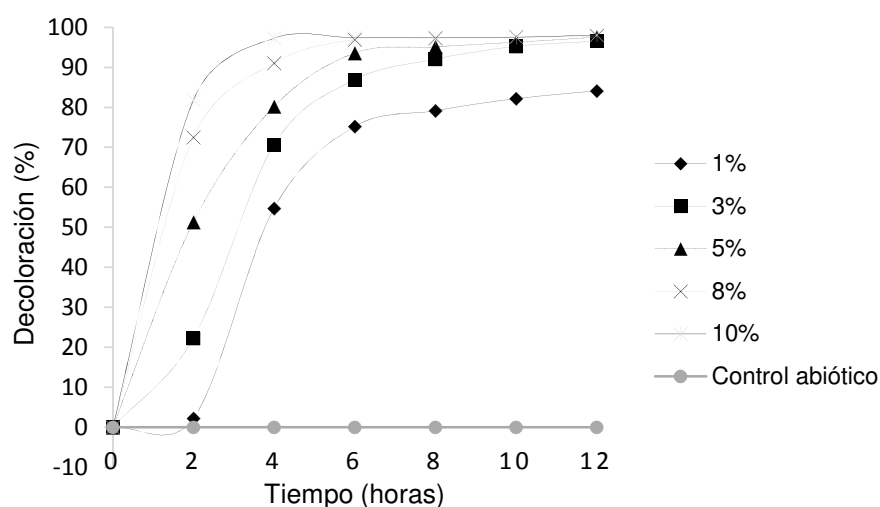


Figura 17. Cinética de decoloración del consorcio CP23 en distintas concentraciones de inóculo en el medio ZZ suplementado con 100 ppm de colorante Azul Directo.

Tabla 19. Porcentajes (%) de decoloración del consorcio CP23 a distintas concentraciones de inóculo.

Inóculo (%) \ Horas	Horas						
	0	2	4	6	8	10	12
1	0	2.18	54.69	75.19	79.16	82.13	84.12
3	0	22.21	70.60	86.87	92.03	95.24	96.53
5	0	51.27	80.15	93.55	95.09	96.28	97.54
8	0	72.46	91.07	96.92	97.27	97.57	97.84
10	0	81.81	97.25	97.37	97.42	97.52	98.09
Control abiótico	0	0.01	0.00	0.01	0.00	0.10	0.00

Como parámetro vital, el pH inicial del medio de cultivo también fue optimizado. Los valores con los que se trabajó fueron 6, 6.5, 7, 7.5 y 8, y de ellos se obtuvo porcentajes de decoloración de 95.55, 96.65, 97.58, 98.0 y 98.51%, respectivamente, a las 12 horas (Tabla 20). En el análisis de ANOVA de un factor, se determinó que el pH afectaba significativamente la decoloración ($p < 0.05$). El mejor perfil de degradación de colorante se logró a pH 8 (Figura 18), con un porcentaje final a las 12 horas de 98.51%.

Tabla 20. Datos de la cinética de decoloración (%) del consorcio CP23, a distintos pH.

pH	Horas							
	0	2	4	6	8	10	12	
6.0	0	66.46	84.27	90.51	92.51	94.56	95.55	
6.5	0	72.53	88.76	93.96	95.10	96.55	96.65	
7.0	0	63.11	93.71	97.00	97.13	97.45	97.58	
7.5	0	79.45	94.91	97.18	97.50	97.65	98.00	
8.0	0	96.06	97.37	97.75	98.02	98.17	98.51	
Control abiótico	0	0.00	0.01	0.0	0.00	0.01	0.00	

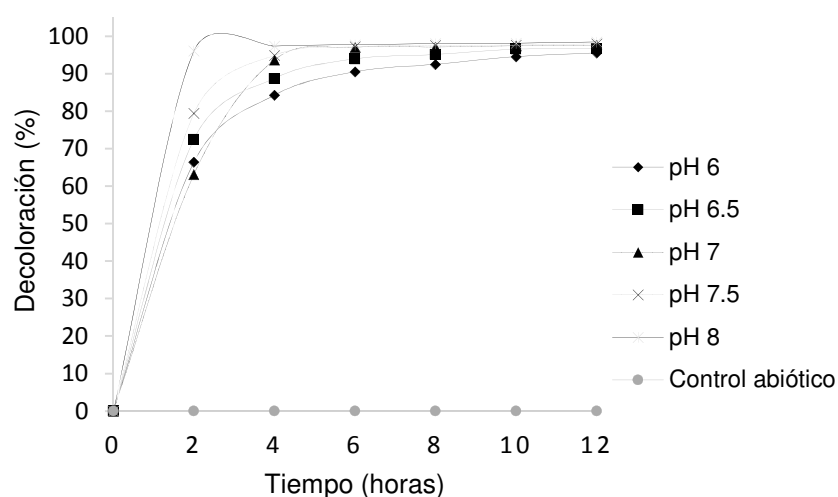


Figura 18. Cinética de decoloración del consorcio CP23 en distintos pH's del medio ZZ suplementado con 100 ppm de Azul Directo.

El parámetro concentración de colorante, suele ser determinante con respecto al tiempo de degradación y la saturación del sistema biológico de descontaminación, por lo que se establecieron cinco distintas concentraciones de colorante en ppm: 100, 150, 200, 250 y 300 en el medio de cultivo. En la Figura 20 se muestran el contraste del caldo ZZ y el caldo suplementado con colorante. Los resultados de decoloración obtenidos fueron muy cercanos (Figura 19). En la Figura 21 se nota que en todos los casos a las 6 horas de incubación, la mayoría de colorante ya había sido degradado, por lo que en el análisis de ANOVA de un factor con 3 grados de libertad, se obtuvo que la concentración de colorante no afectaba significativamente la decoloración ($p < 0.05$); sin embargo, a la concentración de 100ppm se obtuvo un valor más elevado de degradación (98.56%) de Azul Directo (Tabla 21).

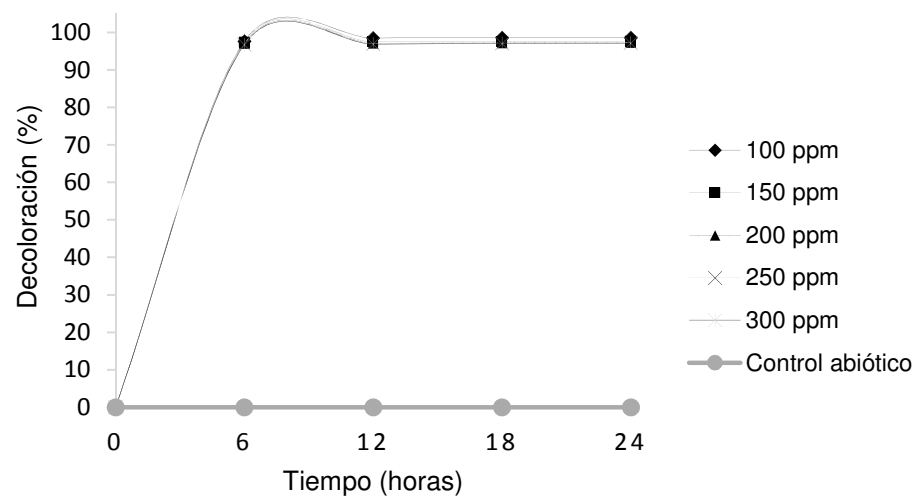


Figura 19. Cinética de decoloración del consorcio CP23 en el medio ZZ suplementado a distintas concentraciones de Azul Directo.

Tabla 21. Porcentajes (%) de decoloración del consorcio CP23 a distintas concentraciones de colorante Azul Directo.

Colorante (ppm)	Horas				
	0	6	12	18	24
100	0	97.65	98.49	98.54	98.56
150	0	97.42	97.50	97.57	97.65
200	0	97.02	97.12	97.22	97.27
250	0	96.82	96.99	97.09	97.21
300	0	96.74	96.90	97.01	97.10
Control abiótico	0	0.00	0.10	0.01	0.00

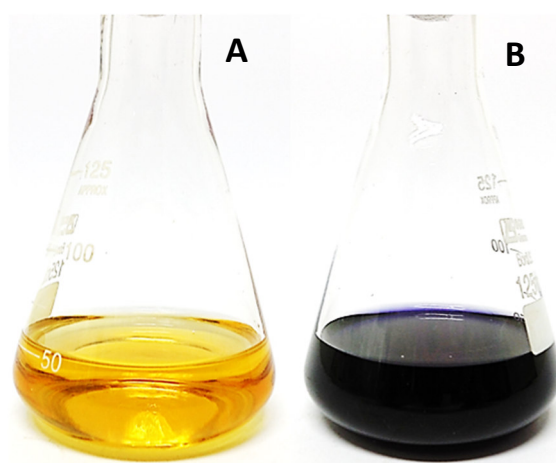


Figura 20. (A) Medio de cultivo Zhou y Zimmerman (ZZ) modificado. (B) Caldo ZZ suplementado con 100 ppm de colorante Azul Directo.

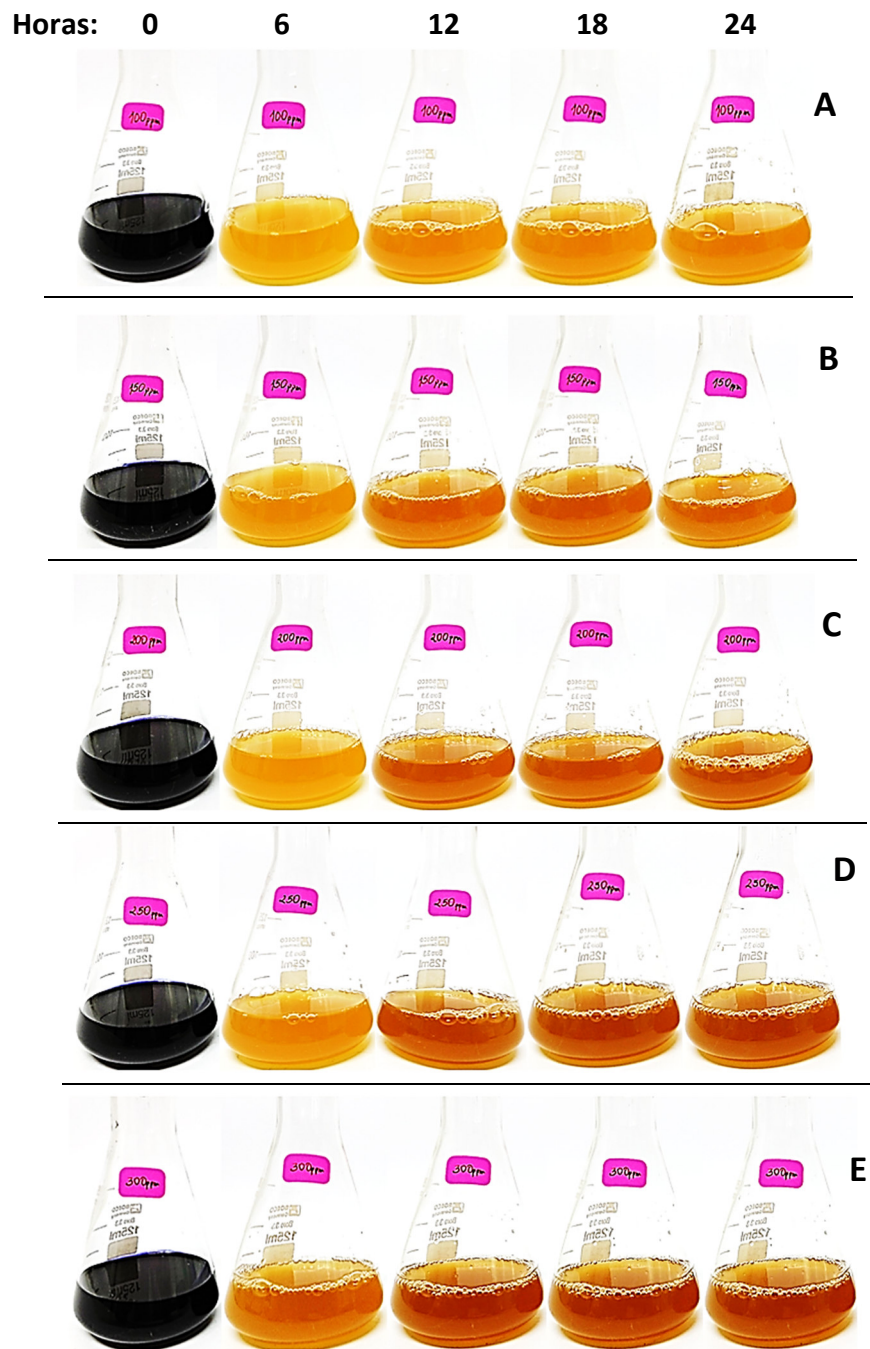


Figura 21. Cinética de decoloración del consorcio CP23 en el medio ZZ suplementado a distintas concentraciones (ppm) de Azul Directo (A: 100), (B: 150), (C: 200), (D: 250) y (E: 300).

6.10 Versatilidad de degradación de colorantes azo por el consorcio CP23

Para probar la eficacia de degradación de nuestro consorcio CP23, se evaluaron 7 colorantes azo adicionales: Amarillo Drimaren, Rojo Drimaren, Azul marino Remazol, Azul Remazol, Amarillo oro Remazol, Azul turquesa Remazol y Rojo Remazol. Al igual que con el Azul Directo, primero se identificó la longitud de onda máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) del grupo cromóforo de cada molécula de colorante (Tabla 22). Luego se prepararon concentraciones de colorante para determinar el rango de lectura de absorbancias al espectrofotómetro (mg/L): 10, 50, 100, 150. Finalmente, con las condiciones óptimas de medición, se prepararon 10 concentraciones de colorante (mg/L): 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100. Estas fueron medidas al espectrofotómetro (datos no mostrados).

De acuerdo al método de los mínimos cuadrados, todas las curvas de calibración de los colorantes azo trabajados: Amarillo Drimaren, Rojo Drimaren, Azul marino Remazol, Azul Remazol, Amarillo oro Remazol, Azul turquesa Remazol y Rojo Remazol; con índices de correlación $R^2 = 0.9979, 0.9981, 0.9977, 0.9978, 0.9983, 0.9982$ y 0.998 , respectivamente, tienden a ser líneas perfectas, cumpliéndose de esta manera la ley de Lambert-Beer (Figura S1-S7).

Tabla 22. Medidas de Longitud de onda máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) de los siete colorantes azo adicionales.

Colorante	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
Amarillo Drimaren	447
Rojo Drimaren	541
Azul Marino Remazol	589
Azul Remazol	610
Amarillo oro Remazol	418
Azul Turquesa Remazol	622
Rojo Remazol	522

Se realizaron cinéticas de degradación de los colorantes azo adicionales. Los resultados de decoloración a las 12 horas fueron en su mayoría de más del 95% (Tabla 23 y Figuras 23-29). Se realizó ANOVA de un factor y la prueba de comparaciones múltiples Tukey-kramer para evaluar la significancia de los valores leídos. La lectura se consideró significativa cuando P era ≤ 0.05 . Los perfiles de decoloración se muestran en la Figura 22.

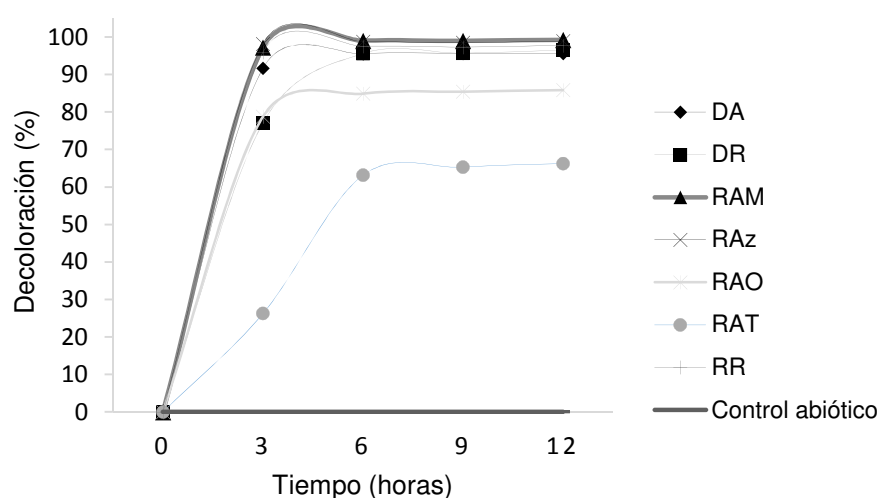


Figura 22. Cinética de degradación de siete colorantes azo por el consorcio CP23 en medio ZZ suplementado con 100 ppm de cada colorante.

Tabla 23. Cinética de decoloración (%) de siete colorantes azo, por el consorcio CP23.

Colorante	Horas				
	0	3	6	9	12
Amarillo Drimaren	0	91.71	95.50	95.60	95.60
Rojo Drimaren	0	77.10	95.60	95.71	96.52
Azul marino Remazol	0	97.25	99.02	99.00	99.28
Azul Remazol	0	98.20	98.77	98.48	98.93
Amarillo oro Remazol	0	78.76	84.92	85.43	85.84
Azul turquesa Remazol	0	26.24	63.14	65.31	66.24
Rojo Remazol	0	95.98	97.56	97.34	97.78
Control abiótico	0	0.01	0.00	0.10	0.00

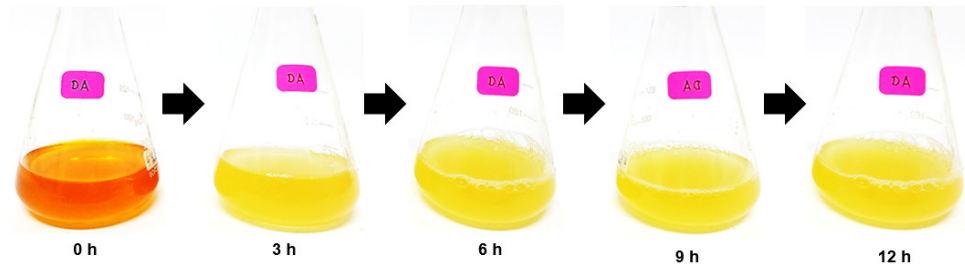


Figura 23. Proceso de decoloración de Amarillo Drimaren por el consorcio CP23 en medio ZZ suplementado con 100 ppm de este colorante.

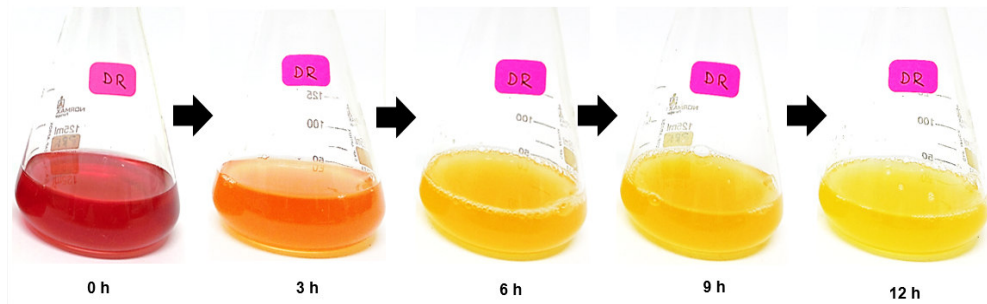


Figura 24. Proceso de decoloración de Rojo Drimaren por el consorcio CP23 en medio ZZ suplementado con 100 ppm de este colorante.

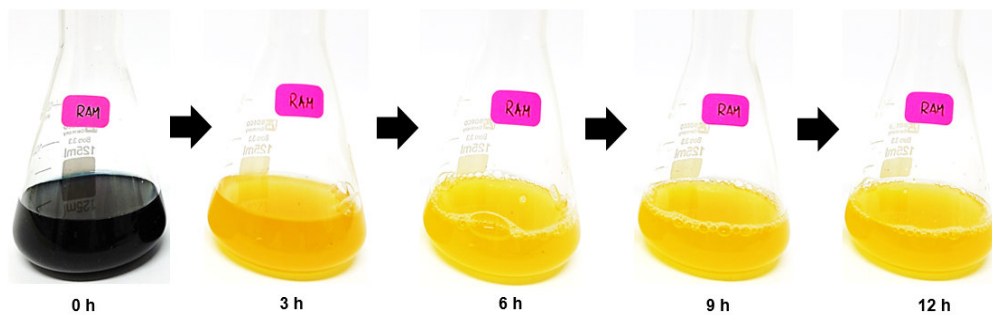


Figura 25. Proceso de decoloración de Azul marino Remazol por el consorcio CP23 en medio ZZ suplementado con 100 ppm de este colorante.

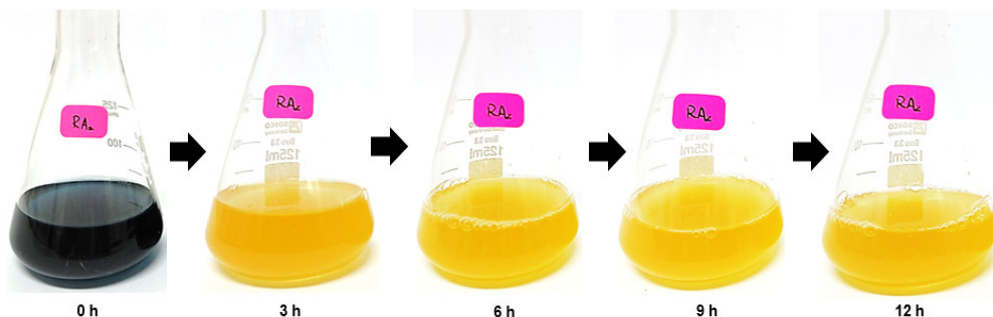


Figura 26. Proceso de decoloración de Azul Remazol por el consorcio CP23 en medio ZZ suplementado con 100 ppm de este colorante.

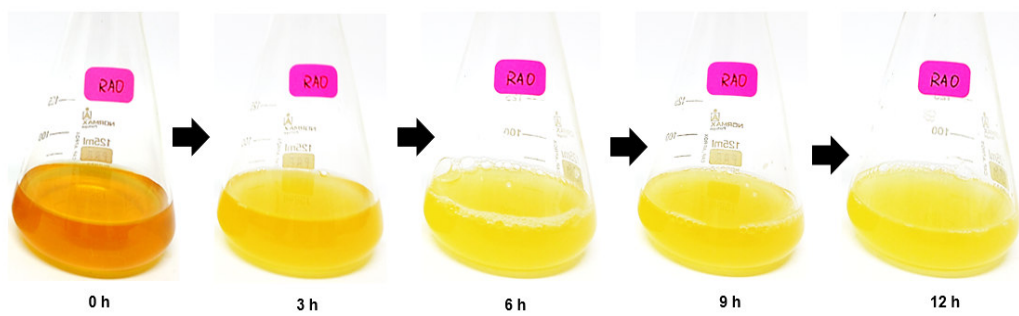


Figura 27. Proceso de decoloración de Amarillo oro Remazol por el consorcio CP23 en medio ZZ suplementado con 100 ppm de este colorante.

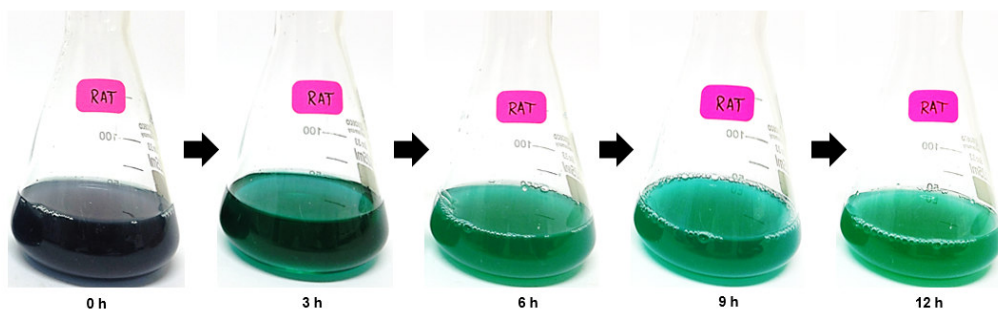


Figura 28. Proceso de decoloración de Azul turquesa Remazol por el consorcio CP23 en medio ZZ suplementado con 100 ppm de este colorante.

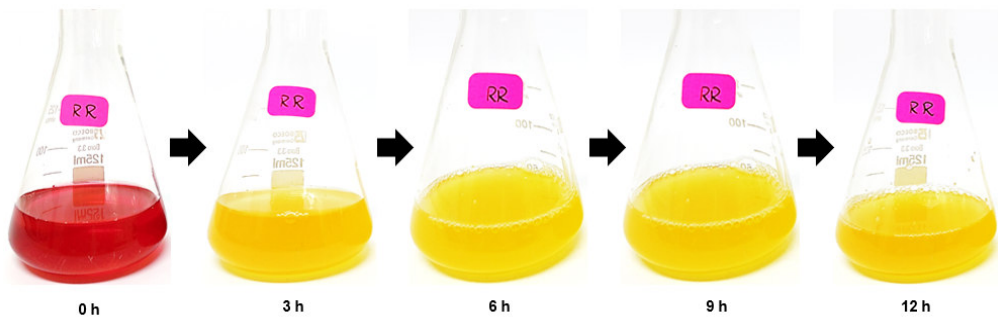


Figura 29. Proceso de decoloración de Rojo Remazol por el consorcio CP23 en medio ZZ suplementado con 100 ppm de este colorante.

7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Muchos de los efluentes que se generan en la industria textil, son liberados directamente a drenajes públicos, ríos y cuerpos de agua en general, sin ningún tratamiento previo, o sin el tratamiento adecuado; sin embargo, la Ley de Recursos Hídricos (Ley N° 29338, Artículos 79°, 80° y 83°), prohíbe el vertimiento de aguas residuales sin autorización, señalando que la Autoridad Nacional del Agua (ANA), autoriza el vertimiento previa opción técnica favorable del MINAM y/o los organismos que conforman el Sistema de Gestión Ambiental sobre el cumplimiento de los Límites Máximos Permisibles (LMP) y Estándares de Calidad Ambiental (ECA), asegurando de esta manera un impacto recuperable por el cuerpo receptor, y que no represente riesgo significativo para la salud de personas ni del ambiente (Ley General del Ambiente, art. 31°).

En el análisis cualitativo de selección de parámetros iniciales, se produjo una reducción en el número de cultivos que respondían mejor a la degradación de Azul Directo. A partir de ello, solo se encontraron cinco tipos de colonias, por lo que se obtuvo poca diversidad de bacterias cultivables. Resultados similares se obtuvieron en estudios de Khehra y col. (2005b), en el que solo lograron aislar cuatro cepas bacterianas, y en el caso de Hamid y col. (2015), que en la diferenciación morfológica de colonias individuales en placa, solo encontraron un tipo de cepa bacteriana. En nuestro estudio, a partir de las cinco cepas obtenidas, se construyeron veintisiete consorcios. Los rendimientos promedio obtenidos en decoloración, con un nivel de confianza del 95%, fueron comparados. El consorcio CP23, resultó tener el mayor grado de decoloración con el 93.91% a las 24 horas, por lo que fue nuestro consorcio elegido para la posterior caracterización.

El consorcio CP23, está conformado por dos cepas bacterianas identificadas como *Stenotrophomonas maltophilia* LS23 y *Enterococcus gallinarum* PL23. La conformación entre estas cepas, resultó ser más eficiente incluso que la agrupación entre los cinco aislados encontrados. Esto podría deberse a la capacidad complementaria de las cepas para atacar moléculas de colorantes azo en diferentes posiciones y/o utilizar los metabolitos producidos por la otra cepa del sistema, optimizando recursos (Chang *et al.*, 2004; Jadhav *et al.*, 2008).

La sinergia entre las dos cepas seleccionadas, se evidencia con los resultados de decoloración a las 24 horas; pues los rendimientos promedio de los aislados puros fueron de 77.68 y 8.38% pertenecientes a *Enterococcus gallinarum* PL23 y *Stenotrophomonas maltophilia* LS23, respectivamente. El resultado del rendimiento promedio de las cepas en consorcio (CP23), fue de 93.91%. Podemos observar en los rendimientos de decoloración, una diferencia significativa. La cepa *Stenotrophomonas maltophilia* LS23, tiene un rendimiento muy bajo; a pesar de ello, es un buen complemento de la cepa *Enterococcus gallinarum* PL23, que tiene un porcentaje de decoloración regularmente bueno, pero cuando estas conforman el consorcio CP23, potencian su actividad de decoloración. Resultados similares encontró Saratale y col. (2009), con una diferencia significativa de las cepas puras, respecto a su consorcio.

Además, se observó que el consorcio CP23 tiene una activación del metabolismo más rápida, que acelera su velocidad de crecimiento ($\mu = 2.6 \pm 0.05 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$) y disminuye su tiempo generacional (26.5 \pm 0.5 min). Si bien es cierto, la decoloración no está asociada directamente al crecimiento, sí está relacionada con el metabolismo, por lo que es importante el mantenimiento de la viabilidad celular y un metabolismo básico óptimo para tener alta expresión de actividad azoreductasa, y con ello, eficiente decoloración (Chen, 2002). Adicionalmente, en ninguno de los casos se evidenció

degradación abiótica de los colorantes azo, por lo que la decoloración se debió solo a mecanismos biológicos.

Para cualquier proceso de decoloración microbiana, los componentes del medio de cultivo como fuente de carbono y nitrógeno, concentración de colorante, tamaño de inóculo, pH y temperatura, son los más importantes parámetros que afectan el proceso (Khehra *et al.*, 2005b). Los colorantes azoicos son deficientes en fuentes de carbono y nitrógeno (Sani y Banerjee 1999), por lo que en los resultados encontramos que la biodegradación de colorantes azo se dificulta sin ningún suplemento de estas fuentes. De los medios de cultivo que diseñamos, el Medio 1, que contenía solo sales, tuvo un porcentaje de decoloración de 49.11% a las 24 horas; en contraste con el Medio 4, que contenía glucosa y extracto de levadura, además de las mismas sales, que a las 24 horas obtuvo un 93.82% de decoloración promedio; es decir, las fuente de carbono y nitrógeno adicional en el medio de cultivo, mejoraron de manera importante los resultados de biodegradación *in-vitro* de colorantes azo.

Demostrado que se necesitan fuentes orgánicas complejas para una biodegradación eficiente, como el extracto de levadura y carbohidratos como la glucosa, un monosacárido que por su simplicidad en la molécula, es más fácilmente disponible y efectiva para el metabolismo microbiano. Del mismo modo, la fuente de nitrógeno orgánico adicional, el extracto de levadura, es importante debido a que sirve como fuente para la regeneración de NADH, que actúa como un donador de electrones para la reducción de colorantes azo por microorganismos, y por tanto, permite una decoloración efectiva (Chang *et al.*, 2000). Por otra parte, en concordancia con los estudios de Mohana y col. (2008), obtuvimos que la adición de glucosa debe ser menor que la de extracto de levadura, para que se favorezca el rendimiento de decoloración.

La concentración de oxígeno es especialmente importante en este tipo de estudios por estar relacionada con la actividad enzimática bacteriana. Para la determinación de los parámetros de trabajo, se evaluaron condiciones estáticas y de agitación. Se encontró que en condición de agitación, la biodegradación es fuertemente inhibida; por el contrario, en un cultivo estático, se favorece. Esto podría deberse a que en condiciones de agitación, el cultivo recibe constantemente oxígeno, lo que impide que las enzimas azoreductasas actúen (Xu *et al.*, 2007).

Se evaluó la temperatura, asociada a procesos vitales microbianos e involucrada con la energía de activación que permite el proceso de degradación de colorantes azoicos (Dos Santos *et al.*, 2007). Por lo que una alteración en la energía de activación, se refleja en la disminución de la tasa de crecimiento y el rendimiento (Blaga *et al.* 2008). La temperatura óptima de nuestro consorcio microbiano CP23 resultó ser 37°C, una temperatura media reportada por muchos investigadores, mostrando un rendimiento de 97.59% a las 12 horas de incubación. En nuestro estudio se observó que la tasa de decoloración aumentó con la temperatura hasta el punto óptimo; asimismo, a temperaturas elevadas (50°C), existe una reducción marginal de la actividad de decoloración, como fue en el caso de nuestro *screening* inicial. La decoloración disminuyó de manera sustancial, posiblemente por la pérdida de actividad catalítica de las enzimas azo y por la pérdida de viabilidad celular (Saratale *et al.*, 2009).

Encontrar el volumen de inóculo idóneo, también es un paso crítico para la biodegradación. Un volumen de inóculo pequeño, ralentiza la tasa global de reacción biológica, que conduce a la disminución en la tasa de degradación del colorante. Por el contrario, un volumen de inóculo mayor que el valor óptimo, da como resultado un agotamiento temprano de los nutrientes y los microorganismos alcanzan la fase de muerte. Esto conduce a una disminución en la velocidad de decoloración (Das y Mishra, 2016). En nuestro proceso de optimización, encontramos que una adecuada activación

del sistema enzimático de las bacterias, se daba a un volumen del 10%, conteniendo un inóculo de 2×10^6 UFC/mL. Diversos estudios como los de Saratale y col. (2009), también obtuvieron como óptimo el mismo porcentaje de inóculo con una concentración similar de células bacterianas, 4.9×10^6 UFC/mL.

Otro parámetro físico-químico importante, es el pH. Se obtuvo el pH 8 como óptimo para el consorcio CP23, debido a que logró una decoloración del 91.53% a las 6 horas. Este resultado, está apoyado en otros trabajos que aseguran que el rango de pH óptimo para la biodegradación de colorantes es un rango medio, pues en condiciones ácidas y alcalinas altas, se inhibe el crecimiento bacteriano (Guo *et al.*, 2007, Kilic *et al.*, 2007). Sin embargo, el efluente textil tiende a ser alcalino debido a los procesos que facilitan el mecanismo de adición y sustitución entre las fibras de algodón y los colorantes azoicos (Walters *et al.*, 2005). En esta investigación encontramos que la eficiencia de decoloración disminuía sustancialmente en condiciones ácidas, probablemente por el entorno alcalino de los efluentes.

La resistencia a distintas concentraciones de un contaminante, en este caso, Azul Directo, es un factor decisivo del funcionamiento de un sistema biológico. En este estudio se trabajaron concentraciones de colorante de 100 a 300 ppm, y se encontró un perfil de decoloración muy similar, por lo que en el análisis ANOVA de un factor con 3 grados de libertad, se obtuvo que la concentración de colorante no afectaba significativamente la decoloración; no obstante, diversos estudios como el de Saratale *et al.*, (2011) muestran lo contrario, debido a la inhibición enzimática ocurrida por muerte celular a causa de la alta toxicidad del colorante. Entonces, la toxicidad del colorante se muestra directamente proporcional a su concentración. De lo anteriormente mencionado, derivamos que nuestro consorcio CP23, tiene una buena resistencia a la toxicidad del colorante, incluso a una concentración elevada de 300 ppm.

El consorcio CP23, después del proceso de optimización, llegó a obtener un rendimiento promedio de decoloración de 91.53% a las 6 horas de incubación, a una concentración de 100 ppm de colorante azo. Estos resultados son bastante alentadores pues usando cepas puras tales como *Pseudomonas sp.* SUK1, se tiene un rendimiento promedio inferior al 50% a la misma concentración de colorante, a las 24 horas. (Lade *et al.*, 2012). Y en el caso de otro tipo de consorcios, como el de Dafale y col. (2008), se tiene un rendimiento promedio del 80%, a la misma concentración de 100 ppm, después de 48 horas de incubación.

Para ampliar el rango de degradación de colorantes azo de nuestro consorcio ya optimizado, evaluamos siete colorantes azo adicionales, también ampliamente utilizados en la industria textil: Amarillo Drimaren, Rojo Drimaren, Azul marino Remazol, Azul Remazol, Amarillo oro Remazol, Azul turquesa Remazol y Rojo Remazol. Los resultados de rendimiento de decoloración a las 12 horas fueron muy favorables con más del 95% en su mayoría. La complejidad del consorcio microbiano, nos da versatilidad de acción sobre una variedad de contaminantes, esa es una de las principales ventajas respecto a cultivos puros. Si bien es cierto, el número de colorantes azo adicionales es escaso, este es un buen indicio que nuestro consorcio CP23, no solo es eficiente en la descontaminación de Azul Directo, sino con otros colorantes azo, por lo se podría extrapolar a otros tipos de efluentes. Por otro lado, la variación en la decoloración de diferentes tintes, puede deberse a la diversidad estructural de los colorantes utilizados en el estudio (Chen *et al.*, 2003). Colorantes con estructuras más simples y de bajo peso molecular, exhiben mayores tasas de eliminación de color, respecto a colorantes con estructuras más complejas y de alto peso molecular (Hsueh *et al.*, 2009).

8. CONCLUSIONES

1. Se diseñó por primera vez en Perú, un consorcio bacteriano con excelente capacidad de degradación de colorantes azoicos, con potencial aplicación en procesos de biorremediación de aguas residuales que contienen este tipo de contaminantes.
2. Se optimizaron los parámetros más importantes en el proceso de decoloración *in vitro*. Estos fueron 0,5% de glucosa, 1% de extracto de levadura, pH 8, 37°C, 2×10^6 UFC x ml⁻¹ de inóculo inicial y 100 ppm de colorante.
3. Se logró obtener un excelente rendimiento promedio de 91.53% a las 6 horas de incubación, lo que significaría una ventaja de tiempo importante debido a la excesiva generación de efluentes textiles.

9. RECOMENDACIONES

1. Desarrollar el análisis genómico de las cepas bacterianas *Stenotrophomonas maltophilia* LS23 y *Enterococcus gallinarum* PL23, para poder descifrar sus posibles rutas de biodegradación, y los genes que mejorarían aún más este proceso.
2. Identificar los productos intermedios formados durante la biodegradación de colorantes azoicos, con la finalidad de respaldar lo encontrado en el análisis genómico.
3. Realizar pruebas en campo para estandarizar el cultivo y escalar el consorcio CP23 para fines industriales.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allen E. y J. Banfield (2005). Community genomics in microbial ecology and evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 489–498.

Aruna B., Rathna S., Shiva K., Srinu R., Rani V. y D. Prasad (2015a). Biodecolorization of anthraquinone textile (acid blue 25) dye by *Klebsiella sp.* *Int J Recent Sci Res. Vol. 6, Issue, 3, pp.3216-3222, March.*

Aruna B., Rathna S., Shiva K., Srinu R., Rani V. y D. Prasad (2015b). Bacterial consortia for effective decolorization and bio degradation of Anthraquinone dyes. *Int J Recent Sci Res. 2 (11): 14–21.*

Asgher M., Jamil F. y H. Iqbal (2012) Bioremediation potential of mixed white rot culture of *Pleurotus ostreatus* IBL-02 and *Coriolus versicolor* IBL-04 for textile industry wastewater. *J Bioremed Biodegrad: S1:007.*

Blaga A., Tatyana A., Lilyana S. y M. Sava (2008). Temperature effect on bacterial azo bond reduction kinetics: an arrhenius plot analysis. *Biodegradation*, 19(3):387-93.

Camarero S., Ibarra D., Martinez M. y T. Angel (2005) Lignin- Derived Compounds as efficient Laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes., *Appl Environ Microbiol*, 1775-1784.

Chacko J. y K. Subramaniam (2011) Enzymatic degradation of azo dyes- A review. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 1: 1250-1260.

Chang J., Bor Ch. y L. Yung (2004) Stimulation of Bacterial Decolorization of an Azo Dye by Extracellular Metabolites from *Escherichia coli* strain NO3. *Bioresource Technology* 91 (3): 243–48.

Chang J. y T. Kuo (2000) Kinetics of bacterial decolorization of azo dye with *Escherichia coli* NO3. *Bioresour Technol* 75:107–111.

Chang J. y. Lin (2000) Fed-batch bioreactor strategies for microbial decolorization of azo dye using a *Pseudomonas luteola* strain. *Biotechnology Progress*. 16:979–85.

Chang J. y T. Kuo (2000) Kinetics of bacterial decolorization of azo dye with *Escherichia coli* NO3. *Bioresour Technol* 75:107–111.

Chang J., Chou C., Lin Y., Lin P., Ho J y T. Hu (2001) Kinetic characteristics of bacterial azo-dye decolorization by *Pseudomonas luteola*. *Water Res. Aug*; 35 (12):2841-50.

Chen B. (2002) Understanding decolorization characteristics of reactive azo dyes by *Pseudomonas luteola*: toxicity and kinetics. Volume 38, Issue 3, November, 437-446.

Chen G. y L. Chen (2011) A batch decolorization and kinetic study of reactive black 5 by a bacterial strain *Enterobacter sp.* GY-1. *Int Biodeterior Biodegrad* 65:790–796.

Chen K., Wu, J., Liou, D. y S. Hwang (2003) Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains. *J. Biotechnol.*, 101(1), 57–68.

Chivukula M. y V. Renganathan (1995) Phenolic azo dye oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae*. *Appl Environ Microbiol.* 61, 4347-4377.

Couto, S. (2009). Dye removal by immobilized fungi. *Biotechnology Advances*, 27, 227–235.

Dafale N., Rao N., Meshram S. y S. Wate (2008) Decolorization of azo dyes and simulated dye bath wastewater using acclimatized microbial consortium–biostimulation and halo tolerance. *Bioresour Technol* 99:2552–2558.

Das A. y S. Mishra (2016) Decolorization of Different Textile Azo Dyes using an Isolated Bacterium *Enterococcus durans* GM13. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 5(7): 676-686.

Dos Santos A., Cervantes F. y J. Van (2007) Review paper on current technologies for decolourisation of textile wastewaters: Perspectives for anaerobic biotechnology. *Bioresour. Technol.*, 98: 2369-2385.

D'Souza D., Tiwari R., Shah A. y R. Chandralata (2006) Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. *Enzyme and Microb. Technol.* 38, 504-511.

Forgacs E., Cserhádi T. y G. Oros (2004) Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Environ. Int.* 30, 953–971.

Gold M., Youngs H. y M. Gelpke (2000) Manganese peroxidase. In: Sigel A, Sigel H (eds) Metal ions in biological systems. *Marcel Dekker Inc.*, New York, pp 559–586.

Guo J., Zhou J., Wang D., Tian C., Wang P., Salah M. y H. Yu (2007) Biocalalyst effects of immobilized anthraquinone on the anaerobic reduction of azo dyes by the salt-tolerant bacteria. *Water Res.*, 41(2), 426–432.

Gürses A., Açıkyıldız M., Güneş K. y M. Gürses (2016) Dyes and Pigments. *SpringerBriefs in Green Chemistry for Sustainability*, doi 10.1007/978-3-319-33892-7_2.

Hamid B., Kaushik G., Chawla J. y Z. Ahmad (2015) Isolation and Development of Efficient Bacterial Consortia for Bioremediation of Textile Dye Effluent. *J Pollut Eff Cont* 3: 142.

Harshad L., Avinash K., Diby P. y G. Sanjay (2015) Biodegradation and detoxification of textiles azo dyes by bacterial consortium under sequential microaerophilic/aerobic processes. *EXCLI Journal*; 14:158-174 – ISSN 1611-2156.

Hoegger P., Kilaru S., James T., Thacker J. y U. Kues (2006) Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. *FEBS J* 273:2308–2326.

Hossain I. (2014). Investigation into cotton knit dyeing with reactive dyes to achieve right first time (RFT) shade. Master Thesis. *Daffodil International University*, Bangladesh.

Hsueh C., Chen B. y C. Yen (2009) Understanding effects of chemical structure on azo dye decolorization characteristics by *Aeromonas hydrophila*. *J Hazard Mater* 167:995–1001.

Imran M., Crowley D., Khalid A., Hussain S., Mumtaz M. y M. Arshad (2015) Microbial biotechnology for decolorization of textile wastewaters. *Rev Environ Sci Biotechnol.* 14:73–92.

Initha C., Rajan S. y A. Murugesan (2014). Biodegradation of Indigo Blue Dye using the Soil and Sludge Isolate of the Effluent Run off Site. *World j. pharm. biotechnol.*, 1(2): 51–55.

Iqbal M. (2008) Textile dyes. Rehbar Publishers, *Karachi*, pp. 65-70, 2008.

Jadhav S., Jadhav U., Dawkar V. y S. Govindwar (2008). Biodegradation of Disperse Dye Brown 3REL by Microbial Consortium of *Galactomyces Geotrichum* MTCC 1360 and *Bacillus Sp.* VUS. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 13 (2): 232–39.

Joshi T., Iyengar L., Singh K. y S. Garg (2008). Isolation, identification and application of novel bacterial consortium TJ-1 for the decolourization of structurally different azo dyes. *Bioresour. Technol.* 99, 7115–7121.

Khan R., Bhawana P. y M. Fulekar (2013) Microbial decolorization and degradation of synthetic dyes: a review. *Rev Environ Sci Biotechnol* (2013) 12:75–97.

- Keck A., Klein J., Kudlich M., Stolz A., Knackmuss H. y R. Mattes** (1997) Reduction of azo dyes by redox mediators originating in the naphthalenesulfonic acid degradation pathway of *Sphingomonas sp.* strain BN6, *Appl Environ Microbiol*; 63(9) pp 3684–90.
- Khehra M., Saini H., Sharma D., Chadha B. y S. Chimni** (2005a) Decolorization of various azo dyes by bacterial consortium. *Dyes Pigments* 67, 55–61.
- Khehra M., Saini H., Sharma D., Chadha B. y S. Chimni** (2005) Comparative studies on potential of consortium and constituent pure bacterial isolates to decolorize azo dyes. *Water Research* 39. 5135–5141.
- Kilic N., Nielsen J., Yüce M., y G. Dönmez** (2007) Characterization of a simple bacterial consortium for effective treatment of wastewaters with reactive dyes and Cr(VI). *Chemosphere*, 67(4), 826–831.
- Kumar A.** (2013) Adsorptive removal of Rhodamine B (dye) using low cost adsorbents. Master Thesis. National Institute of Technology, Rourkela, India.
- Kumar S. y M. Tripathi** (2016) Microbial Strategies for Discoloration and Detoxification of Azo Dyes from Textile Effluents. *Res. J. Microbial.*, 12: 1-19.
- Lade H., Waghmode T., Kadam A. y S. Govindwar** (2012) Enhanced biodegradation and detoxification of disperse azo dye Rubine GFL and textile industry effluent by defined fungal-bacterial consortium. *Int Biodeterior Biodegradation* 72. 94-107.
- Lorenzo V.** (2001). The potential of genetically modified bacteria to break down toxic pollutants in the environment. *EMBO Reports*, 2, 357-359.
- Marsden R.** (1982) The synthesis and examination of azo dyes derived from novel coupler. Ph. D. Thesis, *University of Leeds, UK*.

Maulin P. (2014) "Microbial Degradation of Acid Blue Dye by Mixed Consortium." *Int J Environ Bioremediat Biodegrad.*, vol. 2, no. 3: 125-132.

Miranda R., Gomes E., Pereira N., Marin-Morales M., Machado K. y N. Gusma (2013) Biotreatment of textile effluent in static bioreactor by *Curvularia lunata* URM 6179 and *Phanerochaete chrysosporium* URM 6181. *Bioresour Technol* 142:361–367.

Mohana S., Shrivastava S., Divecha J. y D. Madamwar (2008) Response surface methodology for optimization of médium for decolorization of textile dye Direct Black 22 by a novel bacterial consortium. *Bioresour Technol.* 99. 562-569.

Myers C. y J. Myers (1992) Localization of cytochromes to the outer membrane of anaerobically grown *Shewanella putrefaciens* MR-1. *Journal of Bacteriology* 1992;174 (11):3429–38.

Nigam P., Banat I., Singh D. y R. Marchant (1996). Microbial process for the decolorization of textile effluent containing azo, diazo and reactive dyes. *Process Biochem*, 31, 435–42.

Oranusi N. y C. Ogubre (2005) Effect of pH and Nutrient Starvation on Biodegradation of Azo Dyes by *Pseudomonas sp.* *J. Appl. Sci. Environ. Mgt.* Vol. 9 1) 39 – 43.

Pearce C., Lloyd J. y J. Guthrie (2003) The removal of color from textile wastewater using whole bacterial cells: a review. *Dyes and Pigments* 58:179–196.

Ponraj M., Gokila K y V. Zambare (2011) Bacterial decolorization of textile dye-orange 3R. *Inter. J. Adv. Biotechnol. Res.*, 3(5): 2660-2671.

Punzi, M. (2015) Treatment of textile wastewater by combining biological processes and advanced oxidation. Organization Lund University, Department of Biotechnology.

Robinson T, McMullan G., Marchant R. y P. Nigam (2001) Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology*; 77:247–55.

Ryan A., Kaplan E., Nebel J., Polycarpou E. y V. Crescente (2014) Identification of NAD(P)H Quinone Oxidoreductase Activity in Azoreductases from *P. aeruginosa*: Azoreductases and NAD(P)H Quinone Oxidoreductases Belong to the Same FMN-Dependent Superfamily of Enzymes. *PLoS ONE* 9(6): e98551.

Saparrat N., Carlos M. y E. Hammer (2006) Decolorization of synthetic dyes by the deuteromycete *Pestalotiopsis guepinii* CLPS no. 786 strain. *J Basic Microbiol* 46:28–33.

Saratale R., Saratale G., Chang J. y S. Govindwar (2011) Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review. *J Taiwan Inst Chem Eng.* 42 (2011) 138–157.

Saratale R., Saratale G., Kalyani D., Chang J. y S. Govindwar (2009) Enhanced decolorization and biodegradation of textile azo dye Scarlet R by using developed microbial consortium-GR. *Bioresour Technol* 100:2493–2500.

Sani R. y U. Banerjee (1999) Decolorization of triphenylmethane dyes and textile and dyestuff effluent by *Kurthia sp.* *Enzyme Microb Technol* 24:433–437.

Schlosser D. y C. Hofer (2002) Laccase-catalyzed oxidation of Mn⁺² in the presence of natural Mn⁺² chelators as a novel source of extracellular H₂O₂ production and its impact on manganese peroxidase. *Appl Environ Microbiol* 68:3514–3521.

Sharma D., Saini H., Singh M., Chimni S. y B. Chadha (2004) Isolation and characterization of microorganisms capable of decolorizing various triphenylmethane dyes. *J. Basic Microbiol.* 44, 59–65.

- Shedbalkar U. y J. Jadhav** (2011) Detoxification of malachite green and textile industrial effluent by *Penicillium ochrochloron*. *Biotechnol Bioprocess Eng* 16:196–204.
- Silverstein R., Bassler G. y T. Morrill** (1994) Espectrofotometria identificação de compostos orgánicos. *Quinta edición Rio de Janeiro. Guanabara Koogan*.
- Singh, H.** (2006). Fungal decolorization and degradation of dyes. In H. Singh (Ed.), *Mycoremediation: Fungal bioremediation* (pp. 420–483). *Hoboken: Wiley*.
- Tony B., Goyal D. y S. Khanna** (2009) Decolorization of textile azo dyes by aerobic bacterial consortium. *Int Biodeterior Biodegradation* 63:462–469.
- Walters A., Santillo D., y P. Johnston** (2005) An overview of textiles processing and related environmental concerns. *Greenpeace Research Laboratories*, Department of Biological Sciences, *University of Exeter*, Exeter EX4 4PS, UK.
- Xu M., Guo J. y G. Sun** (2007) Biodegradation of textile azo dye by *Shewanella decolorationis* S12 under microaerophilic conditions. *Appl Microbiol Biotechnol* 76:719–726.
- Zhang M., Chen W., Chen B., Chang C., Hsueh C., Ding Y., Lin K. y H. Xu** (2010) Comparative study on characteristics of azo dye decolorization by indigenous decolorizers. *Bioresour Technol. Apr*; 101(8):2651-6.
- Zhao X., y I. Hardin** (2007). HPLC and spectrophotometric analysis of biodegradation of azo dyes by *Pleurotus ostreatus*. *Dyes and Pigments*, 73, 322–325.
- Zheng M., Chi Y., Yi H. y S. Shao** (2014) Decolorization of Alizarin Red and other synthetic dyes by a recombinant laccase from *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett* 36:39–45.

11. ANEXOS

Tabla S1. Datos de Absorbancias medidas a 583nm en diferentes concentraciones de colorante Azul Directo

Concentración de colorante (mg/L)	Absorbancia promedio (\bar{X}_A)
10	0.210 +- 0.015
50	1.060 +- 0.016
100	2.019 +- 0.015
150	2.096 +- 0.017

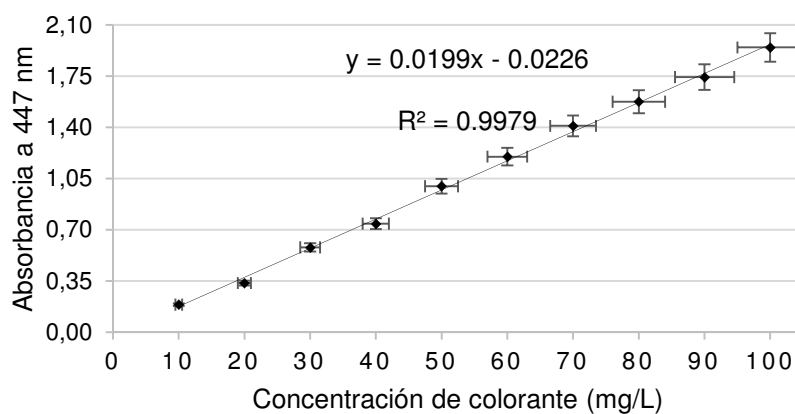


Figura S1. Curva de calibración del colorante azo Amarillo Drimaren

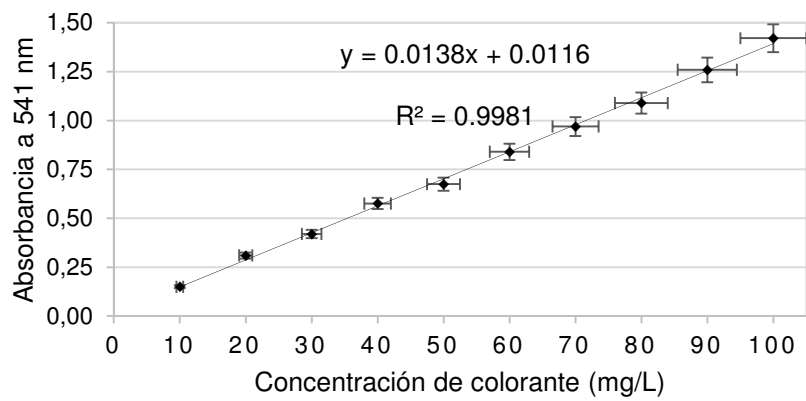


Figura S2. Curva de calibración colorante azo Rojo Drimaren

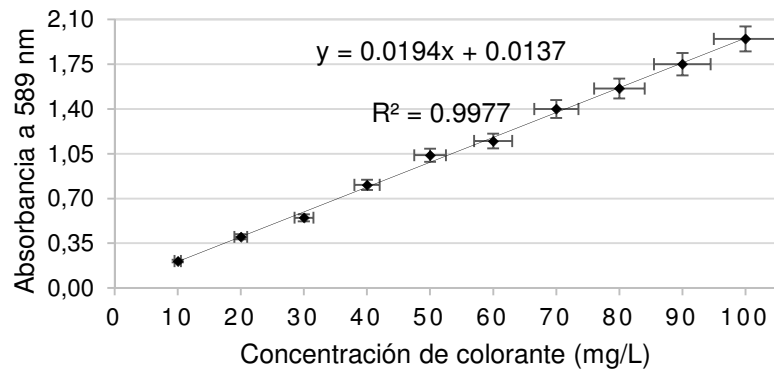


Figura S3. Curva de calibración colorante azo Azul marino Remazol

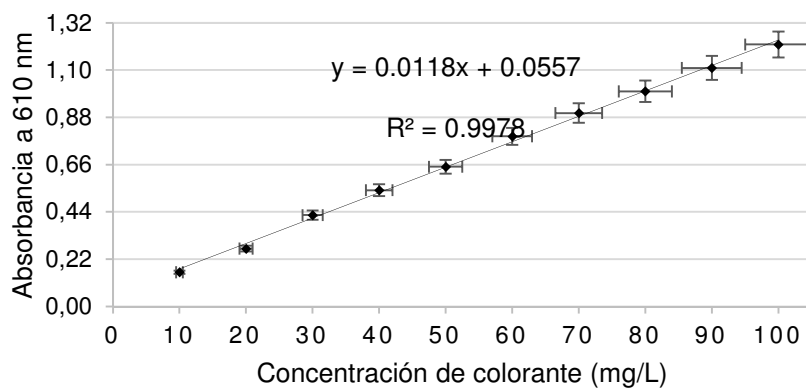


Figura S4. Curva de calibración del colorante azo Azul Remazol

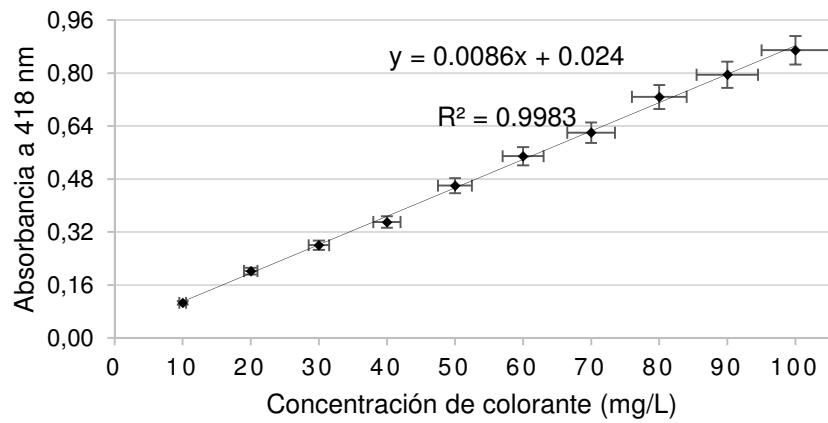


Figura S5. Curva de calibración del colorante azo Amarillo oro Remazol

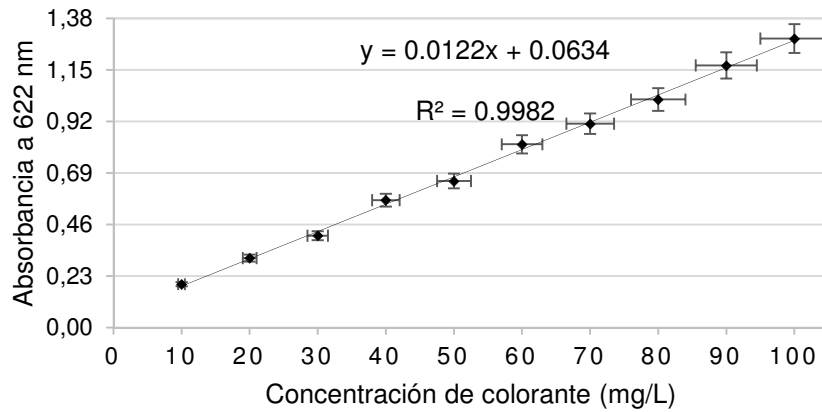


Figura S6. Curva de calibración del colorante azo Azul turquesa Remazol

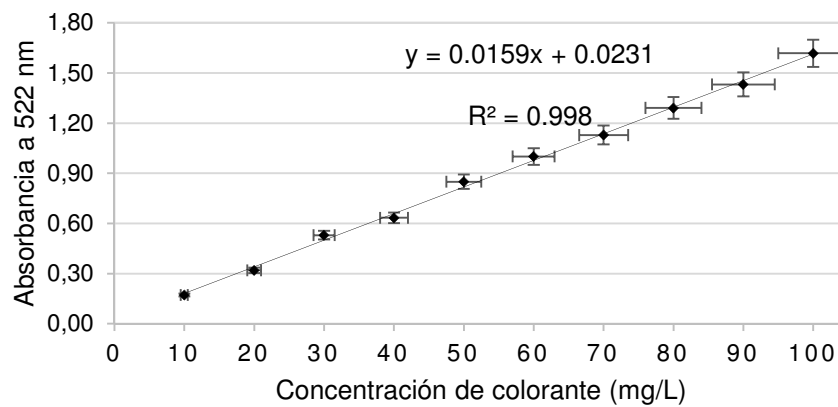


Figura S7. Curva de calibración del colorante azo Rojo Remazol