

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN - TACNA

FACULTAD DE CIENCIAS

Escuela Profesional de Biología Microbiología

**“BIODECOLORACIÓN DE TINTES SINTÉTICOS INDUSTRIALES POR
BACTERIAS TERMÓFILAS CON ACTIVIDAD ENZIMÁTICA TIPO
LACASA”**

TESIS

Presentada por:

Bach. Fiorela Virginia Salazar Torreblanca

Para optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

TACNA – PERÚ

2017

UNIVERSIDAD NACIONAL JORGE BASADRE GROHMANN
FACULTAD DE CIENCIAS

TESIS N° 303

TÍTULO PROFESIONAL DE:
BIÓLOGO MICROBIÓLOGO

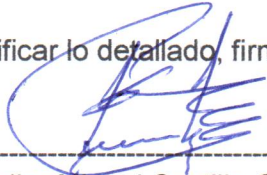
El Secretario Académico Administrativo de la Facultad de Ciencias certifica que con la Resolución de Facultad N° 8925-2017-FACI/UNJBG, ha designado como jurados para la sustentación de la tesis: "BIODECOLORACIÓN DE TINTES SINTÉTICOS INDUSTRIALES POR BACTERIAS TERMÓFILAS CON ACTIVIDAD ENZIMÁTICA TIPO LACASA", el mismo que está conformado por:

PRESIDENTE : Dr. Daladier Miguel Castillo Cotrina
MIEMBRO : Dr. César Cevallos Columbus
SECRETARIO : MSc. Angela Choque Miranda

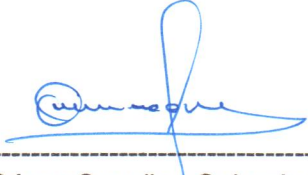
Para examinar y calificar el trabajo de Tesis, sustentado en acto público el día lunes 04 de setiembre del 2017, presentado por el bachiller **IORELA VIRGINIA SALAZAR TORREBLANCA** de la Escuela Profesional de Biología Microbiología.

El jurado calificador, en forma individual y secreta, emitió su calificación, con el siguiente resultado: **APROBADO** por **UNANIMIDAD**, con el calificativo de bueno, con tres votos a favor y promedio de dieciséis (16).

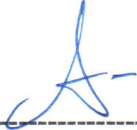
Para ratificar lo detallado, firman:



Dr. Daladier Miguel Castillo Cotrina
PRESIDENTE



Dr. César Cevallos Columbus
MIEMBRO



MSc. Angela Choque Miranda
SECRETARIO

DEDICATORIA

A Dios, por ser mi luz en este camino;

y a mi familia, el motor de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Al Mgr. Roberto Castellanos Cabrera, mi asesor, por su confianza y apoyo incondicional, guiándome en el desarrollo de la presente investigación y todas sus enseñanzas.

A todos los integrantes del grupo de investigación INCIBIOL, que me acogieron desde el primer día en el laboratorio y con quienes compartí momentos hermosos en estos dos años de camino: Nesstor, Luis, Leylla, Helena, Cristina, Sergio y especialmente a Julissa, Ariadna, Israel, Mirella, José y Heber por estar siempre ahí dispuestos a escucharme y brindarme una palabra de aliento cuando más lo necesitaba.

A los profesores de los laboratorios de Biología, Química Inorgánica, Biotecnología, por permitirme hacer uso de su establecimiento y brindarme las facilidades durante la etapa experimental.

A la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann de Tacna, por brindarme el co-financiamiento de tesis para optar el título de pregrado con fondos del Canon, Sobre canon y regalías mineras en la Convocatoria 2015-I.

Al proyecto: “TRATAMIENTO BIOTECNOLÓGICO CON ENZIMAS TERMOESTABLES BACTERIANAS PARA EL DESTINTADO DEL PAPEL PERIÓDICO Y DE OFICINA EN SU PROCESO DE RECICLADO” con Convenio de Subvención N° 099-2015-FONDECYT, del cual forma parte la presente tesis.

CONTENIDO

DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
CONTENIDO	iii
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Planteamiento del problema	3
1.2. Hipótesis	4
1.3. Justificación	4
1.4. Objetivos	5
1.4.1. Objetivo general	
1.4.2. Objetivos específicos	
1.5. Marco teórico	6
1.5.1. Tintes sintéticos	6
1.5.2. Efluentes del destintado de papel reciclado	9
1.5.3. Tratamientos biológicos	10
1.5.4. Bacterias termófilas	13
1.5.5. Actividad enzimática tipo lacasa	15
II. MATERIALES Y MÉTODOS	
2.1 Materiales	
2.1.1 Material biológico	20
2.1.2 Reactivos	20
2.1.3 Material de laboratorio	21
2.1.4 Material de aseo y limpieza	22

2.1.5	Material de escritorio	22
2.1.6	Equipos	23
2.2	Métodos	
2.2.1	Ubicación y delimitación del área de estudio	24
2.2.2	Población y muestra	24
2.2.3	Diseño de investigación	25
2.2.4	Evaluación de la actividad enzimática tipo lacasa de las bacterias termófilas	26
2.2.5	Selección del cultivo bacteriano termófilo con el mayor potencial para la decoloración de tintes sintéticos en pruebas de tubos de ensayos	30
2.2.6	Caracterización bioquímica e identificación molecular del cultivo seleccionado	32
2.2.7	Determinación de las cinéticas de remoción durante el tratamiento con la bacteria termófila seleccionada	35
2.2.8	Determinación de la cinética de decoloración del efluente simulado durante el tratamiento con la bacteria termófila seleccionada	38
III.	RESULTADOS	
3.1	Evaluación de la actividad enzimática tipo lacasa	40
3.2	Selección del cultivo bacteriano termófilo con el mayor potencial para la decoloración de tintes sintéticos	45
3.3	Caracterización bioquímica e identificación molecular del cultivo seleccionado	50
3.4	Determinación de las cinéticas de remoción durante el tratamiento con la bacteria termófila seleccionada	52

3.5 Cinética de remoción del efluente simulado durante el tratamiento con la bacteria termófila seleccionada	62
IV. DISCUSIÓN	66
V. CONCLUSIONES	75
VI. RECOMENDACIONES	76
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
VIII. ANEXOS	85

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Operacionalización de las variables	25
Tabla 2. Tintes textiles y tintas de impresión utilizadas en el ensayo del potencial de decoloración	31
Tabla 3. Principios y componentes del sistema RapID STR	34
Tabla 4. Condiciones del tratamiento biológico según el tinte sintético utilizada	35
Tabla 5. Porcentajes del tinte sintético utilizado	36
Tabla 6. Tinción Gram de las bacterias termófilas con potencial para la decoloración de tintes sintético	41
Tabla 7. Características macroscópicas de las colonias de bacterias termófilas seleccionadas	43
Tabla 8. Actividad enzimática tipo lacasa de bacterias termófilas en medio sólido	44
Tabla 9. Selección del cultivo bacteriano termófilo con mayor potencial de decoloración de tintes sintéticos a las 24 horas	46
Tabla 10. Resultados del sistema RapID STR para la bacteria termófila TM-12	49

Tabla 11. Resultados del reporte del BlastN para el secuenciamiento del ARN 16S de la bacteria termófila TM-12	51
Tabla 12. Análisis de varianza de los tratamientos para la decoloración de la tinta ciano por la bacteria TM-12	55
Tabla 13. Pruebas de múltiples rangos para las concentraciones de tinta de impresión ciano según el método de Fisher	56
Tabla 14. Resultados de remoción de tintes sintéticos obtenidos por decoloración con bacteria termófila TM-12	61
Tabla 15. Resultados de remoción del efluente mixto simulado por decoloración con la bacteria termófila TM-12	66
Tabla 16. Características de la cepa TM-12- frente a las especies relacionadas del género Geobacillus	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo catalítico de la lacasa, tomada de Baldrian, 2006	18
Figura 2. Oxidación del 2,6 – dimetoxifenol catalizada por una lacasa en su correspondiente quinona, tomada de Sanchez-Amat y Solano, 1997	19
Figura 3. Gráfico de porcentajes de las categorías de la evaluación de la actividad enzimática tipo lacasa en medio sólido	45
Figura 4. Gráfico de barras de la selección del cultivo bacteriano termófilo con mayor potencial de decoloración de tintes sintéticos	50
Figura 5. Curva de remoción del tratamiento biológico con la bacteria termófila TM-12 para rojo de Congo	52
Figura 6. Curva de remoción del tratamiento biológico con la bacteria termófila TM-12 para la tinta de impresión magenta	53
Figura 7. Curva de remoción del tratamiento biológico con la bacteria termófila TM-12 para la tinta de impresión negra	54
Figura 8. Curvas de remoción del tratamiento biológico con la bacteria termófila TM-12 para la tinta de impresión ciano a tres concentraciones (0,1; 0,05 y 0,025 % v/v)	54

Figura 9. Espectros de absorción del tratamiento biológico con la bacteria termófila TM-12 para el rojo de Congo	58
Figura 10. Espectros de absorción del tratamiento biológico con la bacteria termófila TM-12 para la tinta de impresión magenta	58
Figura 11. Espectros de absorción del tratamiento biológico con la bacteria termófila TM-12 para la tinta de impresión negra	59
Figura 12. Espectros de absorción del tratamiento biológico con la bacteria termófila TM-12 para la tinta de impresión ciano	60
Figura 13. Curva de crecimiento de la bacteria termófila TM-12 durante el tratamiento biológico para el efluente simulado	62
Figura 14. Curva de remoción del tratamiento biológico con la bacteria termófila TM-12 para el efluente simulado	63
Figura 15. Espectros de absorción del tratamiento biológico con la bacteria termófila TM-12 para el efluente simulado	65

RESUMEN

En este trabajo se investigó la capacidad de decoloración de las bacterias termófilas del cepario del Laboratorio de Bioquímica con actividad enzimática tipo lacasa sobre tintes sintéticos industriales especialmente tintas de impresión que se liberan en los efluentes industriales en el momento del destintado del papel reciclado.

Por tal motivo, se seleccionaron los cultivos bacterianos termófilos CB-13, CB-25, FT-6 y TM-12, que presentaron mayor actividad enzimática tipo lacasa en medio sólido para los cuatro sustratos evaluados (2-MP; 2,6 – DMP; ABTS y SRG). Y entre ellos, se eligió a TM-12 por presentar el mayor potencial para la decoloración de tintes sintéticos en pruebas de tubos de ensayo, el cual fue identificado bioquímica y molecularmente como *Geobacillus* sp.

Durante el estudio de las cinéticas de remoción del tratamiento biológico con *Geobacillus* sp. TM-12, se alcanzó un porcentaje de decoloración superior al 75 % para los tintes azoicos en periodos de tiempo menores a las 24 horas; además, se observó cambios en los espectros de absorción señalando la degradación química del tinte. De la misma forma, el tratamiento del efluente de destintado simulado se logró el 60 % de decoloración a las 14 horas. Concluyendo que sí es posible la biodecoloración de tintes sintéticos durante el tratamiento biológico con bacterias termófilas con actividad enzimática tipo lacasa.

I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad existen más de diez mil diferentes tintes sintéticos que se utilizan en diversos procesos industriales, desde la coloración de alimentos o cosméticos hasta la imprenta e industria textil, cuyas propiedades físicas y químicas son mejoradas para que sean más estables a los factores ambientales y permanezcan por más tiempo en el producto final. Sin embargo, se ha originado un grave problema ambiental debido al incremento de la resistencia de estos tintes sintéticos a los métodos convencionales de degradación por agentes químicos y biológicos (Robinson et al., 2001; Chacko & Subramaniam, 2011), lo que ocasiona que permanezcan durante largos periodos de tiempo en el medio ambiente sin poder controlar las consecuencias adversas para los seres vivos y el ecosistema por su naturaleza tóxica y mutagénica (Chung & Cerniglia, 1992; Ratna & Padhi, 2012).

La presencia de estos tintes en los vertidos industriales se debe a las ineficiencias en el teñido, se pierde alrededor del 15% de estos compuestos en los efluentes textiles (Wesenberg et al., 2003; Zaharia & Suteu, 2011) y al realizar el destintado del papel reciclado se contaminan los efluentes de las papeleras con pigmentos y colorantes de las tintas de impresión (Sulbarán, Turrado, Delgado, Rojas & Venditti, 2014), generándose cada año cientos de toneladas de estos efluentes contaminados con tintes sintéticos.

A su vez, en el contexto empresarial nacional actual se solicitan estándares internacionales de compromiso con el ambiente para obtener certificaciones de calidad (ISO 14001) y cumplir con los valores máximos

admisibles de las descargas de aguas residuales no domésticas en el sistema de alcantarillado sanitario (D.S. N° 021-2009-VIVIENDA), a fin de evitar el deterioro de las instalaciones y asegurar su adecuado funcionamiento; por lo que se requieren aplicar tecnologías viables sin realizar grandes inversiones.

Las propiedades recalcitrantes de los tintes sintéticos han llevado a formular varios tratamientos físicos y químicos para removerlos de los efluentes. A pesar de que muchos de los tratamientos físicos y químicos empleados son efectivos, resultan demasiado costosos por las grandes cantidades de reactivos y catalizadores que se emplean o requieren una disposición final de los residuos peligrosos que originan con gastos adicionales de operación (Ghoreishi & Haghghi, 2003; Crini, 2006).

Frente a este reto, la biotecnología aporta alternativas eficientes y amigables con el medio ambiente empleando la degradación biológica, (Verma & Madamwar, 2003). En este campo, los hongos, son los organismos más estudiados ya que degradan compuestos aromáticos complejos a través del sistema enzimático lignolítico conformado por peroxidasas y lacasas. No obstante, el tratamiento con hongos requiere condiciones de acidez, para la actividad óptima de sus enzimas y periodos largos de retención hidráulica para la decoloración completa (Banat, Nigam, Singh & Marchantl, 1996; Swamy & Ramsay, 1999); además, pueden inhibir el crecimiento de otros microorganismos útiles. Por estas desventajas, las aplicaciones a gran escala decoloración de hongos han sido limitadas y se han hecho evidentes las ventajas ofrecidas por las bacterias con actividad oxidorreductora productoras de lacasas que actúan en medios neutros o alcalinos y en menor

tiempo, favoreciendo su empleo a escala industrial por los amplios rangos de pH que presentan dichos efluentes y teniendo en cuenta que los microorganismos termófilos presentan propiedades fisicoquímicas óptimas para el uso industrial como amplios rangos de pH y termoestabilidad (Sheikhi, Ardakani, Naeimeh & Rodriguez-Couto, 2012). Este trabajo propone aprovechar las ventajas metabólicas de las bacterias termófilas estudiando la biodecoloración de los tintes sintéticos presentes en las tintas de impresión como una estrategia en el tratamiento de los efluentes procedentes del destintado industrial.

1.1. Planteamiento del problema

Frente a la búsqueda de nuevas tecnologías eficaces y económicamente rentables para la disminución de la contaminación de los tintes sintéticos presentes en los efluentes industriales, se plantea la siguiente interrogante: **¿Es posible la biodecoloración de tintes sintéticos industriales mediante un tratamiento con bacterias termófilas con actividad enzimática tipo lacasa?**

1.2. Hipótesis

De acuerdo al problema planteado, se presenta la siguiente hipótesis:

La biodecoloración de los tintes sintéticos industriales mediante un tratamiento con bacterias termófilas con actividad enzimática tipo lacasas sí es posible en un periodo de incubación determinado.

1.3. Justificación

Al seleccionar una bacteria termófila con actividad enzimática tipo lacasa y determinar la cinética de degradación de cuatro tintes sintéticos presentes en los efluentes de la industria papelera, así como la cinética de un efluente simulado, se aportará información básica necesaria para cumplir con el objetivo final del proyecto: "TRATAMIENTO BIOTECNOLÓGICO CON ENZIMAS TERMOESTABLES BACTERIANAS PARA EL DESTINTADO DEL PAPEL PERIÓDICO Y DE OFICINA EN SU PROCESO DE RECICLADO" (N° 099-2015-FONDECYT), del cual forma parte la presente tesis.

Además se podrá extrapolar los datos obtenidos a volúmenes mayores en biorreactores contribuyendo con una alternativa que tiene grandes posibilidades en su aplicación a escala industrial por ser un tratamiento biológico amigable con el medio ambiente y de bajo costo económico.

Asimismo, la identificación y caracterización de la bacteria termófila seleccionada permitirá que el grupo de investigación INCIBIOL continúe estudiando la producción de enzimas oxidorreductoras tipo lacasas con antecedentes y una metodología adaptada a la cepa nativa aislada.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Evaluar la biodecoloración de tintes sintéticos por bacterias termófilas con actividad enzimática tipo lacasa.

1.4.2. Objetivos específicos

- Determinar la actividad enzimática tipo lacasa de las bacterias termófilas del cepario del Laboratorio de Bioquímica.
- Seleccionar el cultivo bacteriano con el mayor potencial para la decoloración de tintes sintéticos en pruebas de tubos de ensayo.
- Caracterizar e identificar molecularmente el cultivo seleccionado.
- Determinar las cinéticas de remoción de tintes sintéticos durante el tratamiento con la bacteria termófila seleccionada
- Determinar la cinética de remoción de un efluente de destintado simulado durante el tratamiento con la bacteria termófila seleccionada.

1.5. Marco teórico

1.5.1. Tintes sintéticos

La Sociedad de Tintoreros y Coloristas (SDC) y la Asociación Americana de Químicos Textiles y Coloristas (AATCC) publican desde 1924 el Colour Index, la guía mundial definitiva para los tintes esenciales, definidos como los colorantes o pigmentos responsables de otorgar color a un producto en ausencia de aditivos.

En esta guía se explica, además, que existen diferencias fundamentales entre colorante y pigmentos acordando a nivel internacional sus definiciones a través de diversas organizaciones. ETAD (The Ecological and Toxicological Association of Dyes and Organic Pigment Manufacturers) define como “colorante” a las sustancias orgánicas intensamente coloreadas o fluorescentes, que imparten color a un sustrato por absorción selectiva de la luz. Son solubles y/o pasan a través de un proceso de aplicación que, al menos temporalmente, destruye cualquier estructura cristalina por absorción, solución, y retención mecánica, o por enlaces químicos covalentes o iónicos. Así, mismo, CPMA (Color Pigments Manufacturers Association), define que “pigmentos” son los sólidos orgánicos o inorgánicos de partículas de color, negro, blanco o fluorescente que generalmente son insolubles y se dispersan generalmente en sustratos para su aplicación.

Siguiendo estas definiciones y considerando el origen de estas sustancias, en el presente trabajo se le denomina “tinte sintético” a toda sustancia que imparte color a un sustrato por absorción selectiva de la luz y que han sido obtenidas por síntesis química de otras sustancias como el benceno, naftaleno, antraceno, sosa cáustica, ácidos inorgánicos, aminas aromáticas, quinonas, etc.

El color de los tintes sintéticos es debido a la estructura cromógeno-cromóforo (aceptor de electrones), y la capacidad de afinidad a las fibras es debido a grupos auxócromos ionizables (donantes de electrones). El cromógeno se constituye a partir de una estructura aromática normalmente basada en anillos de benceno, naftalina, o antraceno, a la que están vinculados cromóforos que contienen enlaces conjugados dobles con electrones deslocalizados representados por los grupos azo, etileno, metino, carbonilo, carbono-nitrógeno, carbono-azufre, nitro o nitroso. En cambio, los grupos auxócromos son ionizables y habitualmente son: -NH_2 (amino), -COOH (carboxilo), $\text{-SO}_3\text{H}$ (sulfonato) y -OH (hidroxilo) (Suteu, Zaharia, & Malutan, 2011; Welham, 2000).

1.5.1.1. Tintes azoicos

Aquellos en que las configuraciones cromóforas están representadas por el grupo azo con uno o más enlaces (-N=N-).

Representan del 65-70 % de la producción total de los colorantes, debido a que son los tintes más utilizados industrialmente en una amplia gama de colores (rojo, azul, naranja, negro, amarillo); además, poseen alta estabilidad y su porcentaje de fijación es superior al 98 %. En la imprenta, los tintes azoicos están presentes principalmente en las tintas de impresión de color magenta y amarillo.

El litol rojo es uno de los colorantes azoicos que se utiliza normalmente como color estándar del magenta en los procesos de impresión a color. Su popularidad se debe a su gran intensidad de color, buenas propiedades de trabajo, sombra brillante y muy bajo precio, por lo que se continúa utilizando fórmulas mejoradas del mismo.

El rojo de Congo es la sal de sodio de benzidinediazo-bis-1-naftilamina-4-sulfónico. Es un colorante secundario diazoico que se utilizó en la década pasada para la coloración de productos de papel y para colorear textiles y madera pulpa. Rojo Congo es recalcitrante a la mayoría de los tratamientos y por lo tanto se encuentra en los efluentes de muchas industrias, en particular de las fábricas de papel. El tinte también actúa como un potente carcinógeno y mutágeno debido a la presencia de grupos aminoaromáticos.

1.5.1.2. Tintes ftalocianinas

Son una familia de tintes sintéticos que pertenece a al grupo de las cianinas de cadena cerrada en el que dos átomos de nitrógeno están unidos por una cadena polimetina. Los dos nitrógenos son cada parte independientemente de un heteroaromático, tales como pirrol (Kim & Bum, 2010).

Los tintes ftalocianinas de cobre y sus derivados son los pigmentos azules y verdes más utilizados y fabricados. Debido a su color único y propiedades de los que son difíciles de reproducir en otros pigmentos, fueron ingresados al mercado desde 1935 conservándose las dos formas de síntesis sin modificaciones (Peters & Freeman, 1995).

1.5.2. Efluentes del destintado de papel reciclado

El proceso de reciclaje de papel necesita eliminar el material impreso y recubierto del papel para formar una nueva pasta utilizable en la elaboración de distintos tipos de productos, incluyendo papel fino, pañuelos, cartón de cajas, papel periódico, etc; por lo tanto, la etapa más importante es el destintado, en el cual, la limpieza de los aditivos empleados en el proceso primario de fabricación genera efluentes difíciles de tratar con un impacto negativo sobre el ambiente.

El promedio aproximado de efluentes generados de la producción de papel gráfico a partir de fibra reciclada de papel de oficina es de 32 – 46 galones de agua por tonelada de pulpa recuperada (Bajpai, 2004). Esta cantidad dependen principalmente de la calidad del papel reusado empleado como materia prima y el destino final de la fibra recuperada.

Estos efluentes se caracterizan por sus valores elevados de DBO, sólidos suspendidos y pH debido a que contienen fibras perdidas, arcilla, material de recubrimiento, y otros productos químicos como hidróxido sódico, silicato sódico, carbonato sódico, hipoclorito sódico), junto a partículas dispersas de tinta de impresión (Hodge & Morgan, 1947; Nemerow & Dasgupta, 1998).

1.5.3. Tratamientos biológicos para la decoloración de tintes sintéticos

Generalmente, la tecnología que se aplica a los efluentes que contienen tintes sintéticos como los provenientes del destintado de papel reciclado son sedimentación sencilla, o clarificación ascendente para separar fango y efluente líquido o la coagulación química; sin embargo, estos métodos fisicoquímicos tienen costos elevados de implementación sin ser accesibles para todas las industrias y sólo permiten la separación de los

contaminantes orgánicos del agua, mas no la degradación final de estos y la decoloración del efluente.

Por otra parte, los métodos biológicos son una alternativa ambiental y económicamente sostenible para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con tintes sintéticos, las cuales se depositan en lagunas de oxidación o biorreactores de membrana aerobios en las que se mantienen cultivos microbianos en suspensión agrupados en flóculos, tras un tiempo de retención, la biomasa generada pasa a un sedimentador secundario, cuya función es separar el efluente depurado de los lodos. Parte de los lodos se recirculan de nuevo al reactor, con objeto de mantener una concentración determinada de microorganismos y el resto, denominados lodos en exceso, se purgan periódicamente (Zaharia & Suteu, 2011).

En los efluentes provenientes del destinado del papel reciclado, puesto que la parte principal de la DBO se encuentra en forma disuelta, se vienen desarrollando variantes al método biológico tradicional como la aeración prolongada. En este proceso, el agua de rebose de las lagunas de oxidación es aireada en presencia del floculo (Nemerow & Dasgupta, 1998). El sistema de aireación, además de oxigenar, permite la homogenización de los microorganismos evitando la sedimentación de los lodos.

La aireación suministra el oxígeno necesario para que se produzcan las reacciones de oxidación realizadas por los microorganismos, lográndose de este modo descomponer los compuestos orgánicos a su forma inorgánica en un proceso conocido como mineralización, obteniéndose como productos finales al dióxido de carbono, agua, nitrógeno amoniacal o nitratos, ortofosfatos y sulfuros característicos de la oxidación aeróbica de carbohidratos y lípidos; sin embargo, no se aplica a muchos compuestos aromáticos que tienen masa molecular alta, estado de oxidación alto y son estables bioquímicamente como los compuestos azoicos, antraquinónicos o ftalocianinos presentes en los tintes sintéticos.

Muchos estudios sobre la degradación biológica de tintes sintéticos afirman que se requiere de un sistema integrado aerobio y anaerobio o viceversa, dependiendo de las capacidades oxidorreductoras de los microorganismos presentes en los flóculos, el tipo de tinte sintético desechado y el producto final deseado.

Los compuestos azoicos están presentes en la gran mayoría de efluentes con tintes sintéticos; por lo tanto, los tratamientos biológicos estudiados sobre su decoloración distinguen dos rutas metabólicas. La primera es la reducción anaerobia de los compuestos azoicos a las aminas correspondientes con la escisión de los enlaces azoicos por azorreductasas bacterianas (Pricelius et al., 2007) y la segunda,

es la oxidación aerobia de los compuestos azoicos con la escisión de los radicales disponibles como hidroxilo (-OH), amino (NH_2), metilo ($-\text{CH}_3$) o metoxilo ($-\text{OCH}_3$) por lacasas y lignina-peroxidasas fúngicas o bacterianas a su correspondiente quinona o peróxidos (Chivukula & Renganathan, 1995; Abadulla et al., 2000). Esta última vía se considera como la más óptima, ya que las aminas aromáticas generadas por reducción tienen un alto potencial cancerígeno y mutagénico causando un daño mayor que el tinte sintético inicial (Raffi, Franklin & Cerniglia, 1990; Chung & Cerniglia, 1992). Por lo tanto, la oxidación por lacasas podría desintoxicar la decoloración de los tintes sintéticos porque los enlaces azo se rompen liberando nitrógeno molecular, lo cual impide que se formen las aminas aromáticas.

Se ha reportado que la estabilidad celular y la capacidad catalítica de los microorganismos pueden decrecer considerablemente debido a las características de los efluentes industriales que presentan tintes sintéticos (Deivea et al., 2010). Por esta razón, se requiere la presencia de microorganismos que prosperen en condiciones extremas.

1.5.4. Bacterias termófilas

Los microorganismos termófilos están entre los extremófilos más estudiados y han adquirido un amplio interés industrial y biotecnológico por el hecho de que son muy adecuados para resistir condiciones adversas, lo cual promueve la búsqueda de

nuevas especies con rutas metabólicas con la capacidad de degradar compuestos xenobióticos y contaminantes como los colorantes y lograr superar el enorme desafío un tratamiento biológico completo.

Existe una subclasificación dentro de este grupo donde los termófilos crecen a una temperatura óptima de 45-70 °C como *Bacillus acidocaldarius* y *Bacillus stearothermophilus*, los termófilos extremos entre 70-80 °C como *Thermus aquaticus* y *Thermoanaerobacter ethanolicus*; mientras que la temperatura óptima de los hipertermófilos es por encima de los 80 °C como *Thermotoga marítima* y *Pyrococcus furiosus* (Pedroza, 2001).

La habilidad de los microorganismos termófilos para vivir en altas temperaturas está basada en el metabolismo, la estructura y la función celular de sus componentes celulares (Stetter, 1999); principalmente, la membrana celular, la cual tiene un alto porcentaje de ácidos grasos insaturados con elevados puntos de fusión dependiendo de la temperatura de crecimiento, lo que les confiere gran flexibilidad y estabilidad térmica a la membrana celular (Pedroza, 2001).

Además, los termófilos contienen proteínas que son termoestables y más resistentes a la desnaturalización y proteólisis que sus homólogos en microorganismos mesófilos (Stetter, 1999). Para lograrlo utilizan unos complejos proteicos (chaperoninas) y unas proteínas (chaperonas), también

conocidas como proteínas del choque térmico; son producidas por estos microorganismos, las cuales ayudan, después de su desnaturalización, a replegar las proteínas a su forma nativa y restaurar sus funciones (Haki & Rakshit, 2003).

1.5.5. Actividad enzimática tipo lacasa

Las lacasas son enzimas oxidorreductasas (EC 1.10.3.2, p-difenol:oxígeno-oxidoreductasa) que se caracterizan por su baja especificidad de sustrato y amplio rango de compuestos susceptibles de ser oxidados por estas enzimas, así se incluye a mono y polifenoles, aminofenoles o fenoles sustituidos con grupos metilo, metoxilo así como poliaminas aromáticas y algunos iones metálicos (Giardina et al., 2010).

Lo que dificulta definir la actividad lacasa es el solapamiento de sustratos en la oxidación de los ortodifenoles junto a otras dos enzimas fenoloxidasas: la tirosinasa (EC 1.18.14.1, cresolasa, monofenol o monooxigenasa,) y la catecol oxidasa (EC 1.10.3.1, o-difenol:oxígeno-oxidoreductasa), por lo cual, se han realizado diversos estudios para diferenciar dichas enzimas. Algunos autores afirman que la oxidación de L-tirosina es una actividad única para tirosinasas y catecol oxidasas además se ha argumentado que solo las enzimas lacasas tienen la capacidad para oxidar a la siringaldazina (3,5-Dimetoxi-4-hidroxibenzalazino) (Thurston, 1994).

Lo que llevó a considerar la oxidación de la siringaldazina junto a la incapacidad para oxidar la tirosina como indicadores de la actividad enzimática de las lacasas. Sin embargo, en el estudio de su actividad enzimática se recomienda incluir como sustratos específicos a la siringaldazina, ABTS o catecol, para los que la lacasa tiene una alta afinidad, y algunos para el que ella tiene poca o ninguna afinidad como tirosina (Edens, Goins, Dooley & Henson, 1999; Shin & Lee, 2000).

1.5.5.1. Estructura físico-química

Estas oxidasas multicobre son generalmente glicoproteínas monoméricas que contienen aproximadamente 500 aminoácidos dispuestos en 3 dominios tipo β -barril ensambladas para modelar tres distintos sitios de unión catalíticos espectroscópicamente distintos (Ferraroni et al., 2007).

Generalmente las lacasas contienen un centro mononuclear tipo-1 (T1) de cobre que se encarga de la oxidación del sustrato, un centro tipo-2 (T2) y dos centros tipo-3 (T3) con Cu_2 y Cu_3 dispuestos en un centro trinuclear, el cual se encarga de reducir el oxígeno molecular (Claus, 2004; Baldrain, 2006)

En la última década se ha descubierto la existencia de dos tipos de lacasas, las azules y amarillas o blancas.

La diferencia entre ambas se presenta en la carencia de absorción alrededor de 610 nm de las lacasas amarillas/blancas que siempre se encuentra en las azules, también, lacasas amarillas/blancas oxidan sustratos no fenólicos en ausencia de moléculas mediadoras que se requieren en casos de lacasas azules. Por lo tanto, muchos autores afirman que las lacasas amarillas/blancas, son mejores biocatalizadores que las azules (Kumar, Lata & Kumar, 2013).

1.5.5.2. Mecanismo de acción

La teoría de Messerschmidt (1997) señala que al oxidarse los sustratos por el cobre T1, los electrones extraídos se transfieren, probablemente a través de un motivo tripéptido fuertemente conservado His-Cis-His hacia al sitio T2/T3, para que el oxígeno molecular sea reducido a agua (Figura 1).

En el caso de las lacasas, estas se acoplan a la oxidación de un solo electrón del sustrato donante de hidrógeno. Por lo que se requieren cuatro etapas de oxidación de un solo electrón del sustrato para la reducción de cuatro electrones del agua (Thurston, 1994; Barriere & Rochefort, 2004).

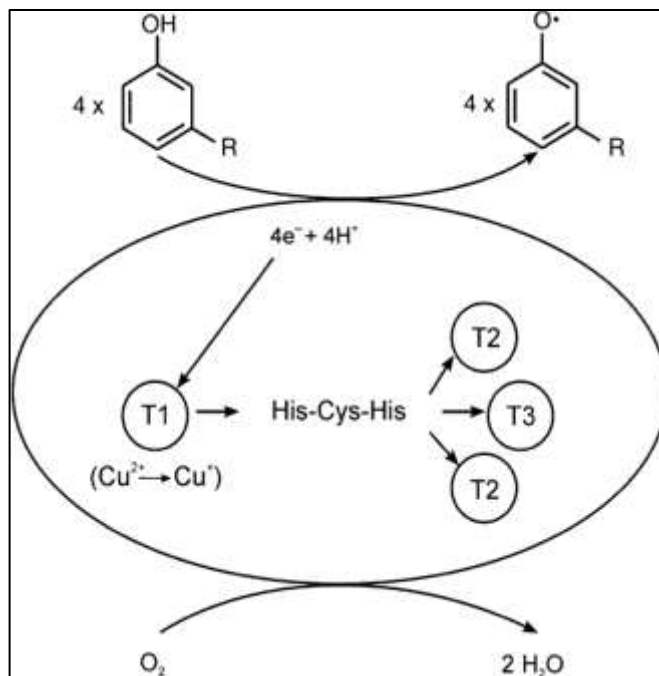


Figura 1. Ciclo catalítico de la lacasa, tomada de Baldrian, 2006.

Los sustratos fenólicos que presentan grupos funcionales metoxilo (-O-CH₃), al ser oxidados por lacasas, catalizan la remoción del átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo del monofenol sustituido con metoxilos (Giardina et al., 2010). Generalmente, 2,6 - dimetoxifenol sufre la oxidación de un solo electrón y produce especies de para-radicales de 2,6-dimetoxifenoxilo; entonces, se produce una recombinación de dos moles de la especie para-radical formando la quinona, 2,6-dimetoxiciclohexa-2,5-dieno-1-uno (Figura 2-A), demostrando la capacidad de las lacasas de acoplar radicales libres.

Mientras que en la oxidación del 4,4'-[azinobis (metanilalidina)]bis(2,6- dimetoxifenol) (siringaldazina) a su correspondiente quinona, 4,4'-[azinobis(metanilalidina)] bis(2,6-dimetoxiciclohexa- 2,5 dien-1-uno), se observa su capacidad de reorganizar sistemas electrónicos conjugados (Figura 2–B).

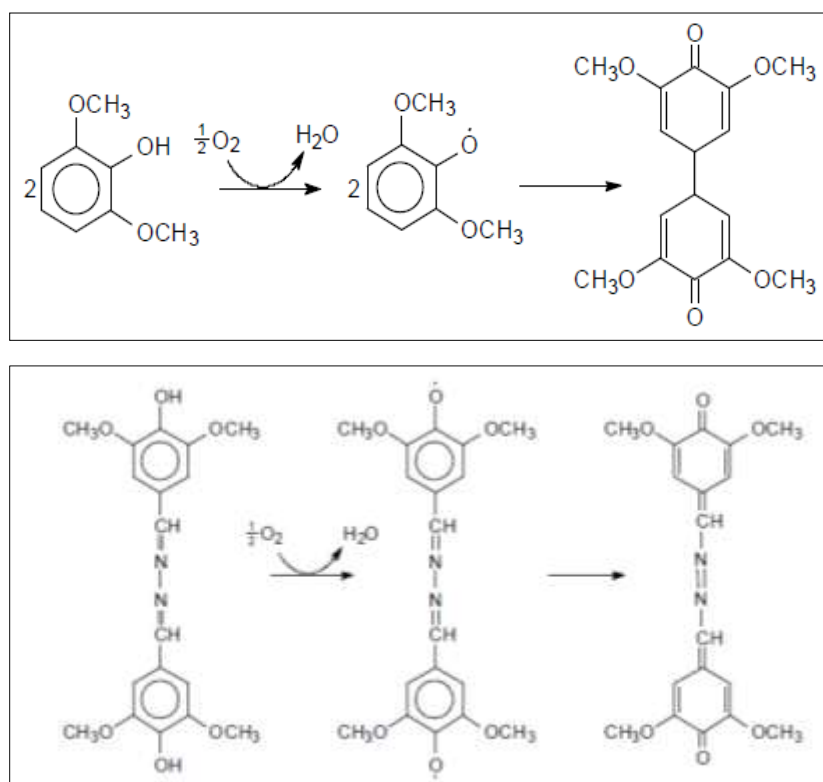


Figura 2. Oxidación catalizada por una lacasa del 2,6 – DMP (A) y siringaldazaina (B) en su correspondiente quinona (Tomada de Sanchez-Amat & Solano, 1997).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

2.1.1. Material biológico

Las cepas bacterianas termófilas estudiadas fueron aisladas de los Geiseros de Calientes ubicados a 4300 msnm en la provincia de Candarave, departamento de Tacna; por el grupo técnico del Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann.

2.1.2. Reactivos

- 2-metoxifenol (2-MP o guayacol)
- 2,6 - dimetoxifenol (2,6 – DMP o Siringol)
- 2,2'- azinobis - bis-(3-etilbenzotiazolinosulfonato) (ABTS)
- 3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzalazino (Siringaldazina)
- Acetato de sodio
- Ácido acético glacial
- Agar base
- Alcohol etílico de 96°
- Azul brillante de remazol R (RBBR)
- Azul de toluidina
- Cristal violeta
- Fosfato dibásico de sodio anhidro ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$)
- Fosfato monobásico de sodio anhidro (NaH_2PO_4)
- Kit de tinción Gram

- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)
- Reactivo Bradford
- Rojo de Congo
- Sulfato de cobre (Cu₂SO₄)
- Sulfato de amonio (NH₄)₂SO₄
- Verde malaquita

2.1.3. Material de laboratorio

- Algodón hidrofílico
- Asa de Kolle metálica con mango de baquelita
- Caja para puntas de plástico de 100 ul
- Caja para puntas de plástico de 1000 ul
- Cámara de conteo Petroff Haussen
- Espátula doble
- Fiolas de vidrio fusible de 25 ml y 50 ml
- Frascos de polietileno con tapa rosca
- Gradilla de polipropileno para tubos de ensayo, 15 ml
- Gradilla de polipropileno para microtubos de base cónica de 2 y 1,5 ml
- Guantes de látex
- Mascarilla N90 desechable
- Matraces de vidrio Erlenmeyer de 50, 100 y 250 ml
- Mechero bunsen
- Micropipetas de volumen variable de 5 a 50 ul
- Micropipetas de volumen variable de 100 a 1000 ul
- Microtubos de centrifuga de 1,5 ml y 2 ml

- Membrana de ultrafiltración PM 10
- Rollo de polietileno aislante
- Papel aluminio
- Placas Petri
- Probetas de vidrio graduadas de 20, 50 y 100 ml
- Puntas de plástico para micropipetas de 10 ul
- Puntas de plástico para micropipetas de 100 ul
- Puntas de plástico para micropipetas de 1000 ul
- Táperes de plástico cuadrado de 1,8 L
- Táperes de plástico rectangular de 3 L
- Tubos cónicos de centrífuga de 15 ml y 50 ml
- Tubos de ensayo de 13 x 100 mm

2.1.4. Materiales de aseo y limpieza

- Detergente líquido
- Desinfectante de ácido fosfórico
- Escobillas
- Jabón bacteriológico
- Lejía (Hipoclorito de sodio)
- Papel toalla

2.1.5. Material y útiles de oficina

- Marcadores permanentes
- Cintas masking tape (24 mm x 40 m)
- Cuaderno de notas
- Lapiceros de tinta seca

2.1.6. Equipos

- Agitador magnético
- Autoclave
- Balanza analítica, precisión 0,001 gramos
- Cámara de recuento Petroff Haussen, HAUSSER SCIENTIFI, Modelo 3900- 3298S22
- Centrífuga para tubos de 15 ml
- Espectrofotómetro UV – Vis, UNICO Modelo 2102
- Estereoscopio con aumento 10X WF
- Horno esterilizador, GEMMY Modelo YCO-010
- Incubadora bacteriológica, GEMMY Modelo IN – 010
- Microcentrífuga EPPENDORF 5418
- Microscopio óptico
- Microondas
- ph-metro digital de bolsillo
- Refrigeradora
- Vortex Mixer LABNET

2.2. Métodos

2.2.1. Ubicación y delimitación del área de estudio

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Bioquímica de la Escuela Profesional de Biología Microbiología de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna – Perú.

2.2.2. Población y muestra

2.2.2.1. Población

La población la constituye las 120 cepas bacterianas termófilas aisladas en los Géiseres de Calientes, Candarave – Tacna, en los años 2014 y 2015 que pertenecen al cepario del Laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias. De estas cepas se obtuvieron 12 cultivos que mostraron actividad tipo lacasa con las que se trabajó en la presente tesis.

2.2.2.2. Muestra

Es una investigación descriptiva sin técnica de muestreo, por lo que no se define una muestra estadística.

La muestra quedará representada por las 11 cepas bacterianas termófilas que han mostrado tener actividad tipo lacasa sobre los sustratos utilizados en el presente estudio.

n: Cepas CB-13, CB-16, CB-25, BT-16, CTB-13, CTB-16, CTB-19, CTB-21, FT-6, FT-9, TM-12.

2.2.3. Diseño de la investigación

En el presente trabajo se realizó una investigación básica – descriptiva para llevar a cabo los objetivos específicos planteados, en la cual cada cultivo bacteriano termófilo corresponde a una unidad experimental de la cual se evaluó como respuesta la biodecoloración de tintes sintéticos (Tabla 1).

Tabla 1. Operacionalización de las variables

	Variable	Definición	Indicadores	Escala de medición
Independiente	Cultivo bacteriano termófilo	Cepa aislada del Geiser de Calientes, Candarave, Tacna	Caracterización y Secuencia de nucleótidos del gen ARNr 16S	
Dependiente	Biodecoloración de tintes sintéticos	Capacidad de la enzima para remover tintes sintéticos.	Absorbancia por espectrofotometría	Porcentaje de biodecoloración

Fuente: Elaboración propia

De los resultados obtenidos al estudiar la capacidad de decoloración de la tinta de impresión ciano, se evaluó el efecto de la concentración de la tinta sobre el porcentaje de decoloración, para lo cual se desarrollaron tres tratamientos con

concentraciones de tinta diferentes empleando un diseño completamente al azar y se determinó si existe diferencia significativa entre los tratamientos. Los tres tratamientos se aplicaron a nueve unidades experimentales, de tal forma que a tres unidades experimentales les correspondió un tipo de tratamiento, siendo la variable respuesta a medir la decoloración del tinte.

La hipótesis nula (H_0) fue que los efectos de las concentraciones de tinta (tratamientos, β) son todos iguales, mientras que la hipótesis alterna (H_1) planteó que hay al menos un efecto de tratamiento que es diferente a los demás.

Lo que se expresó como:

$$H_0: \beta_1 = \beta_2 = \beta_3$$

$$H_1: \beta_1 \neq \beta_2 \neq \beta_3$$

2.2.4. Evaluación de la actividad enzimática tipo lacasa de las bacterias termófilas

2.2.4.1. Reactivación de las bacterias termófilas del cepario del Laboratorio de Bioquímica

Se trabajó con once bacterias termófilas seleccionadas previamente por el grupo técnico del Laboratorio de Bioquímica por ensayos de crecimiento en microplacas en medio Luria Bertani con guayacol (2-metoxifenol), las cuales fueron reactivadas en caldo Luria

Bertani (10 g de peptona, 5 g levadura y 5 g de cloruro de sodio en 1 L de agua destilada), se incubaron durante 18 horas a 60 °C.

2.2.4.2. Caracterización microscópica y macroscópica de las bacterias termófilas

Las bacterias termófilas reactivadas en caldo Luria Bertani fueron caracterizados microscópicamente, para lo cual se realizó tinción Gram registrando el carácter tintorial, la morfología y la disposición de cada una de las bacterias reactivadas por observación en el microscopio con aceite de inmersión con aumento de 1000X.

Además, se realizó la caracterización macroscópica de las bacterias a través de la inspección de las colonias sobre la superficie de placa. Se tomó como inóculo 50 µl de cada una de las bacterias termófilas reactivadas y se sembraron por agotamiento por estría en agar nutritivo (5 g de peptona, 3 g extracto de carne, 8 g de cloruro de sodio y 15 g de agar en 1 L de agua destilada), se incubó a 60 °C por 24 horas y posteriormente se determinaron las características generales de las colonias bajo iluminación directa brillante utilizando un estereoscopio con aumento de 10X WF. Para la descripción de las colonias bacterianas, se utilizaron los términos e ilustraciones de Koneman (2008).

Luego las bacterias fueron sembradas en viales con agar LB inducido sulfato de cobre 0.15 mM para su conservación bajo refrigeración a - 4 °C.

2.2.4.3. Evaluación de la actividad enzimática tipo lacasa en medios sólidos

Los ensayos de placa son una determinación rápida de la producción de la enzima lacasa en los microorganismos, por lo cual, se siguió el método de Sheiki, Ardakani, Naeimeh & Rodriguez-Couto (2012), el cual consistió en sembrar por estriado las bacterias termófilas en agar Luria Bertani con 0.08 % v/v de guayacol (2-metoxifenol o 2-MP) y sulfato de cobre (Cu_2SO_4 , 0.25 mM). Después de 48 horas de incubación a 60 °C en cámara húmeda, se evaluó la coloración de las colonias registrándose la coloración marrón oscuro como resultado positivo, el que fue valorizado en una escala cualitativa (alta, intermedia y baja).

La segunda prueba se realizó según el método de Ambika (2015, comunicación personal) empleando siringol (2,6 dimetoxifenol o 2,6-DMP). En este ensayo, los inóculos bacterianos se sembraron por estriado en agar Luria Bertani inducido con sulfato de cobre (Cu_2SO_4 , 0.25 mM). Luego de 48 horas de incubación a 60 °C, se

vertió sobre las colonias, una solución de tampón fosfato 100 mM con 0,2 % v/v de siringol a pH 7. Luego de 20 minutos de reacción, se registró como resultado positivo a todas las colonias que revelaron coloración anaranjada y se valorizó la intensidad de la coloración en una escala de alta actividad enzimática tipo lacasa (4 y 5), intermedia (3), baja (1 y 2) o nula (0).

Además los cultivos bacterianos termófilos de la escala alta fueron evaluados en la oxidación de ABTS (1, 2, 2'-azino bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)) y siringaldazina (3,5-Dimetoxi-4-hidroxibenzalazino), para ello según la metodología de Nazareno, Bucsinszky, Tournier, Cabello & Arambarri (2000). Se añadieron 250 mg de ABTS por litro del medio de cultivo Luria Bertani luego de la esterilización; y se evaluó la intensidad de la coloración del medio con la aparición de halos verdes (oxidación de ABTS). Mientras que el ensayo con siringaldazina se realizó modificando el protocolo del 2-6 DMP (siringol) vertiendo solución tampón fosfato 100 mM pH 6,5 con 0,2 % v/v de solución de siringaldazina en metanol absoluto sobre colonias crecidas en Agar Luria Bertani inducido con sulfato de cobre (Cu_2SO_4 , 0.25 mM) y se monitoreó el cambio de coloración de las colonias a violeta durante 2 horas.

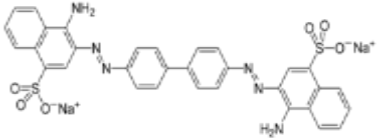
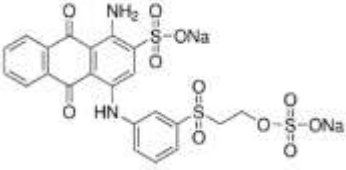
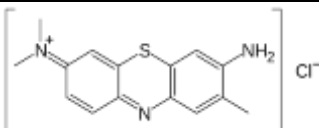
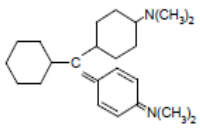
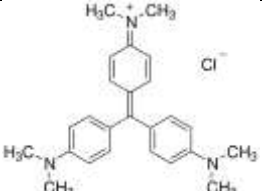
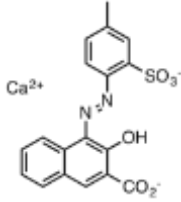

2.2.5. Selección del cultivo bacteriano termófilo con mayor potencial para la decoloración de tintes sintéticos

Se evaluó la capacidad de decoloración de 5 tintes sintéticos puros (rojo de Congo, azul brillante de remazol R, azul de toluidina, verde malaquita y cristal violeta) junto a 4 tintas de impresión Epson® color negro, amarillo, magenta y ciano; la clasificación y estructura química de cada uno, se da a conocer en la tabla 2.

Se utilizó caldo cerebro-corazón (Brain heart Infusion, BHI, Merck Millipore, 10 g/l tejido animal digerido enzimáticamente, 17.5 g/l extracto cerebro-corazón, 2 g/l D(+)-Glucosa, 5 g/l NaCl, Na₂HPO₄, anhidro 2.5 g/l) inducido con 0,25 mM de MnSO₄.5H₂O y 0,25 mM de CuSO₄ al cual se le añadió cada tinte sintético a 0,025 % v/v luego de la esterilización a 1 atm y 120 °C por 20 minutos.

El medio de cultivo fue distribuido en condiciones estériles en tubos de ensayo para cada cultivo bacteriano preseleccionado (CB-13, CB-25, FT-6 y TM-12), los cuales previamente fueron reactivados en caldo Luria Bertani por 24 horas y se inocularon al 10 % v/v en el BHI modificado e incubaron a 60 °C, registrando las observaciones del crecimiento y decoloración cada 24 horas.

Tabla 2. Tintes sintéticos del ensayo del potencial de decoloración

Tinte sintético	Clasificación	Estructura química
Rojo de Congo	diazoico	
Azul brillante de Remazol R	antraquinónico	
Azul de toluidina	fenotiazina	
Verde malaquita	trifenilmetano	
Cristal violeta	trifenilmetano	
Tinta magenta (Epson)	monoazoico Ej: Litol rojo	
Tinta cian (Epson)	ftalocianina	

Fuente: Elaboración propia

2.2.6. Caracterización bioquímica e identificación molecular del cultivo seleccionado

2.2.6.1. Caracterización bioquímica

Se utilizó el micrométodo cualitativo RapID™ SRT System (Remel, Oxoid), especializado en la identificación de *estreptococos* de importancia médica y otras bacterias Gram positivas relacionadas. Las pruebas bioquímicas de este sistema se basan en la degradación microbiana de sustratos específicos detectados por varios indicadores, que se describen en la tabla 3.

Se empleó un cultivo bacteriano de 24 horas, el cual se resuspendió en el líquido de inoculación RapID (1 ml) para conseguir una turbidez visual igual a la del estándar de turbidez N° 1 de McFarland. Luego se realizó la inoculación simultánea de todos los pocillos del panel de pruebas bioquímicas y se incubó a 60 °C por 4 horas. Luego se realizó la lectura de resultados según el manual y se añadió el reactivo a los pocillos bifuncionales (7 al 10). Además se realizó la prueba de la catalasa, colocando un par de gotas de agua oxigenada en un portaobjeto limpio con ayuda de una micropipeta, sobre la cual, se suspendió una muestra del cultivo termófilo TM-12 y se esperó la formación de burbujas para considerar catalasa positivo.

2.2.6.2. Identificación molecular

La cepa seleccionada fue cultivada en placa Petri con agar Luria Bertani y luego de 24 horas de incubación a 60 °C utilizando una asa de Drigralsky se lavaron las colonias bacterianas con solución salina fisiológica, para luego conservar la suspensión celular en crioviales con glicerol al 30% v/v a – 20 °C para su posterior envío a la empresa MacroGen Inc. en Seúl - Corea del Sur, la cual realizó el servicio de extracción del ADN genómico, la amplificación por PCR del ARN ribosomal 16S y la secuenciación del ADN, producto del PCR, por el método de Sanger, Nicklen & Coulson (1977).

Posteriormente para analizar la similitud de la secuencia de nucleótidos obtenidos, se utilizó la herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST) frente a secuencias de referencia disponibles en el National Center for Biotechnology Information GenBank (NCBI GenBank).

Tabla 3. Principios y componentes del sistema RapID STR

N° de pocillo	Prueba bioquímica	Ingredientes de los reactivos	Interpretación
Antes de la adición del reactivo:			
1	ARG	L-arginina	La hidrólisis de la arginina libera productos alcalinos que aumentan el pH y cambian el color.
2	ESC	Esculina	La hidrólisis de este glucósido libera esculetina, que reacciona con el ion férrico formando un compuesto de color negro.
3	MNL	Manitol	La utilización del hidrato de carbono como sustrato da lugar a productos ácidos que bajan el pH e inducen el cambio del indicador.
4	SBL	Sorbitol	
5	RAF	Rafinosa	
6	INV	Inulina	
7	GAL	p-nitrofenil- α -D-galactósido	La hidrólisis del glucósido incoloro p-nitrofenil-sustituido o fosfoéster libera p-nitrofenol amarillo.
8	GLU	p-nitrofenil- α -D-glucósido	
9	NAG	p-nitrofenil-n-acetil- β -D-glucosamina	
10	PO ₄	p-nitrofenil fosfato	
Después de añadir el reactivo:			
7	TYR	Tirosina- β -naftilamina	La hidrólisis de la arilamida libera β -naftilamina que se detecta con el reactivo RapID STR.
8	HPR	Hidroxiprolina- β -naftilamina	
9	LYS	Lisina- β -naftilamina	
10	PYR	Pirrolidina- β -naftilamina	

Fuente: Manual RapID System, REMEL, OXOID

2.2.7. Determinación de las cinéticas de decoloración de cada tinte sintético durante el tratamiento con la bacteria termófila seleccionada

En matraces Erlenmeyer de 250 mL se prepararon 50 ml de caldo cerebro corazón autoclavado a 1 atm, 121 ° C durante 20 min que luego fue inducido con 0,25 mM de Sulfato de manganeso ($MnSO_4 \cdot 5H_2O$) y 0,25 mM de sulfato de cobre ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), y finalmente se le añadió cada tinte sintético según la tabla 4, por triplicado.

Tabla 4. Condiciones del tratamiento biológico según el tinte sintético utilizado

Tinte sintético	Porcentaje inicial (% v/v)	Tiempo de incubación (horas)	Intervalo de muestreo (horas)
Rojo de Congo	0,1*	48	12
Tinta Magenta (Epson)	0,05	24	4
Tinta Negro (Epson)	0,05	24	4
Tinta Cian (Epson)	0,025 0,05 0,1	48	12

Nota: * % w/v

Fuente: Elaboración propia

La inoculación se realizó al 10 % (v/v), empleando 5 ml de cultivo bacteriano termófilo TM-12 reactivado en caldo BHI por 18 horas con una absorbancia aproximada de 0,4 a 600 nm. La incubación se llevó a cabo a 60 °C en estático. El tiempo de incubación e intervalos de muestreo varían según el tinte sintético utilizado tal como se ha indicado en la tabla 4.

Todos los tratamientos biológicos se realizaron por triplicado a acompañados de un control abiótico, que mantenía las mismas condiciones en el medio de cultivo, porcentaje de tinte e incubación.

El control abiótico se utilizó además para calcular la longitud de absorbancia máxima de cada uno de los tintes sintéticos empleados realizando un barrido espectrofotométrico desde 200 a 900 nm con intervalos de 12 nm de longitud de onda utilizando el espectrofotómetro de luz UV-visible UNICO 2102.

Luego de ocho horas de incubación, se iniciaron los muestreos tomando alícuotas de 1,5 ml en microtubos estériles, los que se centrifugaron por 10 min a 10 000 rpm y el sobrenadante se traspasó a nuevos microtubos.

2.2.7.1. Curvas de remoción

Se registraron las unidades de absorbancia a la longitud de onda máxima de cada tinte sintético cada dos

horas y se graficó la curva de remoción de cada tinte sintético tratado para conocer el tiempo de la decoloración.

2.2.7.2. Espectro de absorbancia

Además con cada sobrenadante obtenido en los periodos de tiempo determinado también se realizó un barrido espectrofotométrico desde 200 a 900 nm con intervalos de 12 nm de longitud de onda para comprobar los cambios en la estructura química en las alícuotas.

2.2.7.3. Porcentajes de decoloración

El porcentaje de decoloración se determina espectrofotométricamente como la disminución relativa en la absorbancia a la longitud de onda de absorbancia máxima de cada tinte sintético utilizado calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Decoloración (\%)} = \frac{(A_0 - A_t)}{(A_0) \times 100}$$

Donde:

A_t = absorbancia del tinte de la muestra medido a una hora específica

A_0 = absorbancia del tinte del control a las mismas horas que la muestra.

2.2.8. Determinación de la cinética de decoloración del efluente simulado durante el tratamiento con la bacteria termófila seleccionada

Se siguió la misma metodología que el tratamiento de tintes sintéticos puros, solo que se combinó las cuatro tintas de impresión (magenta, amarillo, negro y ciano) según la tabla 5. Del mismo modo se realizó la inoculación al 10 % (v/v) del cultivo bacteriano TM-12 reactivado y la incubación se llevó a cabo a 60 °C en estático por 24 horas.

Tabla 5. Porcentajes del tinte sintético utilizado

Tinte sintético	Porcentaje inicial
Tinta magenta (Epson)	0,05 % v/v
Tinta amarillo (Epson)	0,05 % v/v
Tinta negro (Epson)	0,05 % v/v
Tinta cian (Epson)	0,025 % v/v

Fuente: Elaboración propia

Primero se realizó el recuento bacteriano hasta la formación de la biopelícula, El recuento de bacterias se realizó utilizando una cámara Petroff Haussen, por ser un método directo de medida del número de células por unidad de volumen de una

suspensión bacteriana. La excavación mide 0,02 mm (1/50 mm) y está dividida en 25 cuadrados grandes, subdivididos a su vez en 16 pequeños, con un área total de 1 mm² y un volumen total de 0,02 mm³.

Por lo tanto, se aplicó la siguiente fórmula para calcular el número de células por ml de muestra:

$$\text{Número de células/ml} = \text{N}^{\circ} \text{ de células} \times 25 \times 50 \times 10^3$$

Para ello se tomó una alícuota de 500 µl de cada medio de cultivo al inicio y cada cuatro horas hasta la formación de la biopelícula. De las alícuotas muestreadas se utilizaron 2 µL para el recuento de bacterias utilizando la micropipeta graduable de hasta 5 µL. Se realizó el recuento considerando las cuatro celdas de las esquinas y la central, realizando diluciones de 10⁻¹, 10⁻² o 10⁻³ cuando la cantidad de bacterias por cuadrantes era mayor a 20.

Luego se realizó el monitoreo del espectro de absorción para determinar la curva de remoción y el porcentaje de decoloración, tal como se señaló en la anterior sección.

III. RESULTADOS

3.1 Evaluación de la actividad enzimática tipo lacasa de las bacterias termófilas del cepario del Laboratorio de Bioquímica

3.1.1. Reactivación de las bacterias termófilas

La reactivación de las 11 bacterias termófilas aisladas y seleccionadas en el Laboratorio de Bioquímica se logró exitosamente, elaborando un nuevo cepario codificado con fecha del 18 de enero del 2016, el cual se mantuvo bajo refrigeración a 4 °C para los ensayos posteriores.

3.1.2. Caracterización de las bacterias termófilas

Las características microscópicas observadas se dan a conocer en la tabla 6. El 100 % de las bacterias termófilas reactivadas fueron Gram positivos y su morfología corresponde a bacilos de diferentes longitudes con presencia de esporas terminales deformantes o ausencia de ellas. Además, se observó agrupaciones en forma de cadenas rectas y cortas o filamentosas largas y ondulados según la cepa evaluada.

No se registró contaminación en las tinciones verificando la pureza de cada cultivo bacteriano (Anexo 1).

Tabla 6. Tinción Gram de las bacterias termófilas con potencial para la decoloración de tintes sintético

Bacteria	Gram	Características morfológicas
CB-13	Positivo	Bacilos cortos, delgados, algunos forman cadenas y se observa espora terminal deformante.
CB-16	Positivo	Bacilos medianos, algunos forman filamentos y se observa espora terminal deformante.
CB-25	Positivo	Bacilos largos, delgados, forman filamentos y no se aprecia formación de esporas.
BT-16	Positivo	Bacilos medianos y cortos, gruesos, algunos en parejas, sin espora.
CTB-13	Positivo	Bacilos medianos y cortos, gruesos, algunos con esporas terminal deformantes.
CTB-16	Positivo	Bacilos medianos y cortos, delgados, algunos con espora terminal deformante.
CTB-19	Positivo	Bacilos largos, gruesos, algunos forman cadena, forman esporas terminales deformante,
CTB-21	Positivo	Bacilos cortos y medianos, delgados, forman cadenas y algunos con espora terminal deformante.
FT-6	Positivo	Bacilos cortos y medianos, delgados, algunos presentan espora terminal.
FT-9	Positivo	Bacilos medianos, algunos en parejas y tienen espora terminal deformante.
TM-12	Positivo	Bacilos medianos, algunos forman cadenas cortas, no forman esporas

Fuente: Elaboración propia

Los resultados de la caracterización macroscópica se describen en la tabla 7, luego de 24 horas de incubación a 60 °C las colonias fueron observadas en estereoscopio con aumento 10X; las dos formas predominantes fueron circulares e irregulares, junto al borde, la elevación y las demás observaciones registradas como un halo o punto central, se logró distinguir cada bacteria termófila como una cepa diferente.

3.1.3. Evaluación de la actividad enzimática tipo lacasa de las bacterias termófilas en medio sólido

Se evaluó la capacidad de 11 bacterias termófilas para la actividad enzimática tipo lacasas sobre el guayacol (2-metoxifenol), siringol (2,6-dimetoxifenol), ABTS y sirigaldazina; en medio sólido, logrando valorizar cualitativamente la actividad enzimática por la intensidad de las coloraciones de las colonias, correspondientes a la oxidación de cada sustrato empleado. Los resultados se dan a conocer en la tabla 8 y el anexo 3.

Del total de cepas evaluadas, las bacterias termófilas CB-13, CB-25, FT-6 y TM-12 presentaron intensidad alta para la oxidación del guayacol y siringol, mientras que la actividad enzimática de CB-16, BT-16, CTB-21 y FT-9 se valorizaron como intermedia; representando ambas categorías el 73 % del total (Figura 01).

Tabla 7. Características macroscópicas de las colonias de bacterias termófilas seleccionadas

Bacteria	Forma	Borde	Elevación	Consistencia	Color	Observaciones	Tamaño (mm)
CB-13	Irregular	Irregular	Elevada	Cremosa	Crema	Halo gris en el centro de la colonia	3 – 5
CB-16	Irregular	Ondulado	Elevada	Cremosa	Crema	Superficie con elevaciones irregulares como verrugas	5
CB-25	Irregular	Entero	Elevada	Cremosa	Crema	Borde y punto en el centro más oscuros	2
BT-16	Circular	Entero	Cóncava	Cremosa	Crema	Centro marrón oscuro	3
CTB-13	Circular	Entero	Elevada	Viscosa	Crema	Punto central con un halo blanco alrededor	2
CTB-16	Circular	Entero	Elevada	Cremosa	Crema	Superficie lisa	2
CTB-19	Circular	Irregular	Plana	Cremosa	Crema	Superficie lisa con punto central	3
CTB-21	Circular	Entero	Cóncava	Cremosa	Crema	Superficie lisa	2
FT-6	Irregular	Entero	Convexa	Cremosa	Crema	Superficie lisa con punto central	1
FT-9	Circular	Irregular	Plana	Cremosa	Crema	Superficie lisa	4
TM-12	Irregular	Irregular	Elevada	Cremosa	Crema	Centro opaco con halo gris	1

Fuente: Elaboración propia

Tabla 8. Actividad enzimática tipo lacasa de bacterias termófilas en medio sólido

Bacteria	Guaiacol (2-MP)	Siringol (2,6-DMP)	ABTS	Siringaldazina	Categoría
CB-13	5	5	0	0	Alta
CB-16	3	3	-	-	Intermedia
CB-25	4	5	0	0	Alta
BT-16	3	3	-	-	Intermedia
CTB-13	1	1	-	-	Baja
CTB-16	1	2	-	-	Baja
CTB-19	1	2	-	-	Baja
CTB-21	3	4	-	-	Intermedia
FT-6	4	5	0	0	Alta
FT-9	2	3	-	-	Intermedia
TM-12	4	4	0	0	Alta

Leyenda: Alta=4 y 5, Intermedia=3, Baja=1 y 2, Reacción negativa=0 y No se evaluó= –

Fuente: Elaboración propia

A las bacterias CB-13, CB-16, BT-16, CTB-13 y TM-12 se les asignaron el mismo puntaje en la valorización para guaiacol y siringol; sin embargo, el resto de bacterias tienen mayor puntaje en el ensayo con siringol (2,6-DMP), ya que se observó un aumento en la intensidad de la coloración.

Sin embargo, la reacción fue negativa en la evaluación de la oxidación del ABTS y siringaldazina para las bacterias termófilas CB-13, CB-25, TM-12 y FT-6 al no observarse cambios en la coloración de las colonias de las bacterias termófilas.

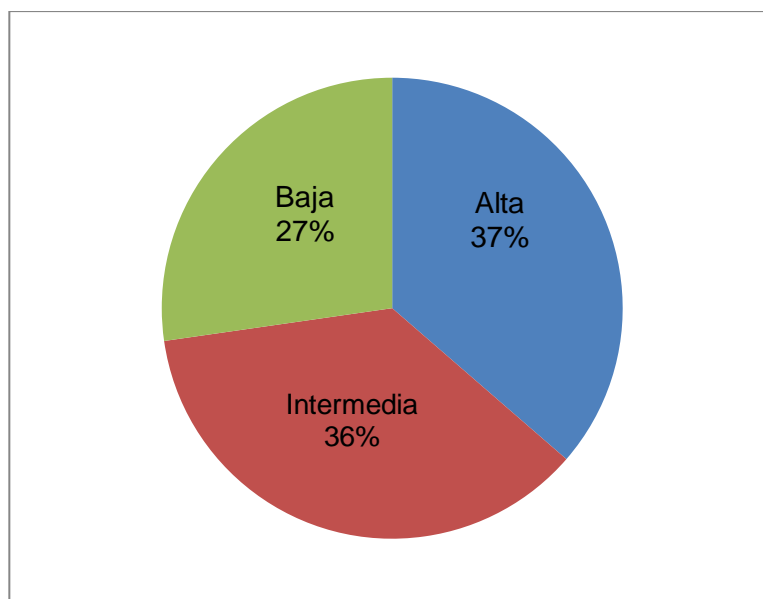


Figura 3. Gráfico de porcentajes de las categorías de la evaluación de la actividad enzimática tipo lacasa en medio sólido

Según los criterios de cribado para la detección de la actividad enzimática tipo lacasa en medio sólido con diferentes sustratos fueron elegidas para los posteriores estudios de decoloración de tinte sintéticos en pruebas de tubos de ensayo las bacterias termófilas CB-13, CB-25, TM-12 y FT-6

3.2 Selección del cultivo bacteriano termófilo con mayor potencial para la decoloración de tintes sintéticos

Se evaluó la capacidad de decoloración de los cuatro cultivos bacterianos previamente seleccionados (CB-13, CB-25, FT-6 y TM-12) frente a cinco tintes textiles puros: rojo de Congo, azul brillante de remazol (RBBR), azul de toluidina, verde malaquita y

crystal violeta y cuatro tintas de impresión de color magenta, amarillo, ciano y negro en caldo BHI. Los resultados obtenidos del potencial de decoloración a las 24 horas se dan a conocer en la tabla 9 y el anexo 4.

Tabla 9. Selección del cultivo bacteriano termófilo con mayor potencial de decoloración de tintes sintéticos a las 24 horas

Tinte sintético <i>(Clasificación)</i>	CB-13	CB-25	TM-12	FT-6
Rojo de Congo <i>(diazóico)</i>	++	++	+++	C
Azul brillante remazol R <i>(antraquinona)</i>	++	CI	++	CI
Azul de toluidina <i>(fenotiazina)</i>	C	CI	C	C
Verde malaquita <i>(trifenilmetano)</i>	CI	CI	CI	CI
Cristal violeta <i>(trifenilmetano)</i>	CI	CI	CI	CI
Negro (Epson) <i>(carbón negro)</i>	+	+++	++	V
Amarillo (Epson) <i>(monoazoico)</i>	+++	+++	+++	V
Magenta (Epson) <i>(monoazoico)</i>	+++	+++	+++	V
Ciano (Epson) <i>(ftociano)</i>	C	C	C	CI

Leyenda: El número de cruces (+ a +++) indica la intensidad de la decoloración; (C) denota crecimiento sin cambio de color; (V) indica variables en los resultados; (CI) denota inhibición en el crecimiento.

Fuente: Elaboración propia

Al evaluar la capacidad para decolorar tintes sintéticos puros, la bacteria termófila TM-12 decoloró totalmente el rojo de Congo en 24 horas seguida de CB-13 y CB-25, las cuales, decoloraron con menor intensidad observándose un color anaranjado (Anexo 4.1).

En los ensayos de las bacteria termófilas CB-13 y TM-12 con azul brillante de remazol R, se observó disminución en el color inicial del medio de cultivo de azul oscuro a verde azulado con abundante biomasa bacteriana; por lo que se consideró una decoloración incompleta (++) (Anexo 4.2). También, las bacterias termófilas CB-13 y TM-12 junto a FT-6 crecieron en el medio de cultivo con azul de toluidina, observándose turbidez, pero el color inicial se mantuvo; por lo tanto, no hubo decoloración (Anexo 4.3). En las pruebas con los otros tintes sintéticos, como cristal violeta y verde de malaquita, el crecimiento microbiano fue inhibido.

Los tres cultivos bacterianos termófilos, CB-13, CB-25 y TM-12, lograron decolorar completamente los medios de cultivo con tinta de impresión magenta y amarillo a las 24 horas (Anexo 4.4 y 4.5); mientras que para el medio de cultivo con tinta negra, sólo la bacteria CB-25 alcanzó la decoloración completa, seguida de TM-12 a las 48 horas (Anexo 4.6). Sin embargo, ninguna de las bacterias decoloró completamente el medio con tinta ciano, por lo tanto, estas dos cepas son las que muestran mayor capacidad para decolorar tintas de impresión.

Según los resultados obtenidos de la decoloración de tintes sintéticos y tintas de impresión graficados en la figura 4, se seleccionó a la bacteria termófila TM-12 por presentar un rango más amplio de decoloración que el resto de cultivos bacterianos.

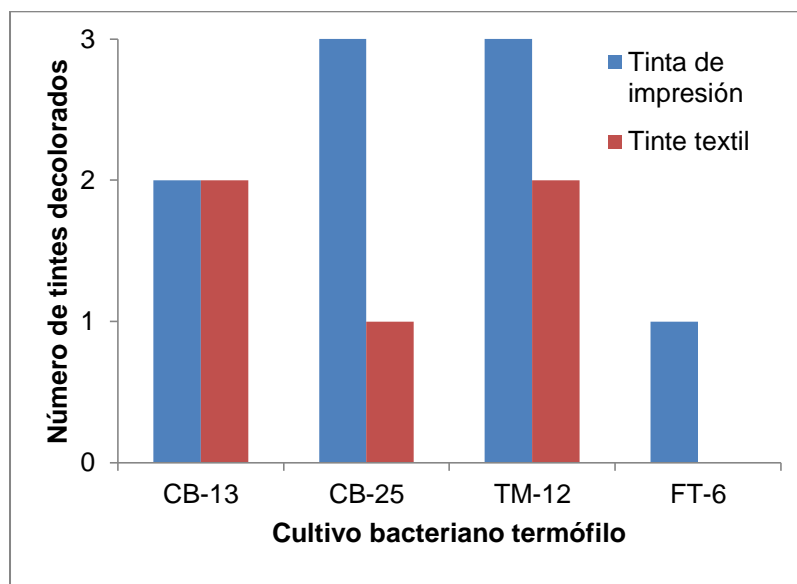


Figura 4. Gráfico de barras de la selección del cultivo bacteriano termófilo con mayor potencial de decoloración de tintes sintéticos.

3.3 Caracterización bioquímica e identificación bacteriana

3.3.1 Caracterización bioquímica

Se logró examinar la reactividad de los pocillos de reacción del sistema RapID STR observándose el desarrollo del color y su interpretación según las indicaciones del manual, cuyos resultados se muestran en la Tabla 10.

Adicionalmente, la prueba de la catalasa dio como resultado positivo, indicando la liberación del O_2 que comprueba la presencia de la enzima.

Tabla 10. Resultados del sistema RapID STR para la bacteria termófila TM-12

Prueba bioquímica	Resultado	Interpretación
ARG	Amarillo	Negativo
ESC	Crema	Negativo
MNL	Rojo guinda	Negativo
SBL	Rojo guinda	Negativo
RAF	Rojo guinda	Positivo
INV	Guinda	Positivo
Gal	Amarillo	Positivo
Glu	Amarillo	Positivo
Nag	Amarillo	Positivo
PO ₄	Amarillo	Positivo
TYR	Morado	Positivo
HPR	Transparente	Negativo
LYS	Rosado	Negativo
PYR	Transparente	Negativo

Fuente: Elaboración propia

Por lo tanto la bacteria termófila TM12, es capaz de utilizar como fuentes de hidratos de carbono a la rafinosa y la inulina, además presenta las enzimas β -galactosidasa y β -glucosidasa para hidrólisis de los glucósidos y la enzima tirosina hidrolasa para oxidar a la tirosina.

3.3.2 Identificación molecular

El algoritmo BLAST se utilizó para recuperar las secuencias homólogas en GenBank a la secuencia de ARNr

16S de 1518 nucleótidos obtenida de la bacteria termófila TM-12. El aislamiento bacteriano reveló un 99 % de identidad con cuatro especies del género *Geobacillus*. Estas fueron *G. kaustophilus*, *G. thermoparaffinivorans*, *G. thermoleovorans* y *G. stearothermophilus* (Tabla 11).

La identificación microbiana basada en las características morfológicas, bioquímicas y moleculares, permitió que el aislamiento fuera identificado como una cepa del género *Geobacillus*.

3.4 Cinéticas de decoloración de los tintes sintéticos durante el tratamiento con la bacteria termófila seleccionada

Para determinar las cinéticas de remoción de los tintes sintéticos durante el tratamiento con la bacteria termófila TM-12, se obtuvo primero el espectro de absorbancia del control abiótico de cada tinte sintético para conocer la longitud de onda con máxima absorbancia, lo que permitió graficar las curvas de remoción y determinar los porcentajes de decoloración bajo condiciones controladas.

Además, durante todo el proceso se llevó a cabo la cinética de un control abiótico, el cual tenía la misma cantidad de tinte textil o tinta de impresión, pero sin microorganismo inoculado.

Tabla 11. Resultados del reporte del BlastN para el secuenciamiento del ARN 16S de la bacteria termófila TM-12

Especimen (Descripción)	Código de acceso	Identidad		
		Igualdad	Total	Pct (%)
<i>Geobacillus kaustophilus</i> cepa BGSC 90A1 gen ARN ribosomal 16S, secuencia complete	NR_115285.1	1514	1518	99
<i>Geobacillus kaustophilus</i> HTA426 cepa HTA426 90A1 gen ARN ribosomal 16S, secuencia completa	NR_074989.1	1513	1518	99
<i>Geobacillus kaustophilus</i> cepa G2 gen ARN ribosomal 16S, secuencia parcial	JX522539.1	1509	1512	99
<i>G. thermoparaffinivorans</i> cepa IT-12, gen ARN ribosomal 16S, secuencia parcial	EU214615.1	1514	1518	99
<i>G. thermoleovorans</i> cepa CCB_US3_UF5, genoma completo	CP003125.1	1512	1518	99
<i>G. stearothermophilus</i> cepa BGSC 9A19 gen ARN ribosomal 16S, secuencia parcial	AY608941.1	1512	1518	99

Fuente: Reporte de BlastN

3.4.1 Curvas de remoción

Los resultados obtenidos se grafican en la curva de remoción del rojo de Congo (Figura 5) que demuestra el avance de la disminución de la absorbancia a 500 nm cada 12 horas.

La decoloración de la tinta de impresión magenta se monitoreó a partir de las 8 horas de incubación a 60 °C cada dos horas; la decoloración se completó a las 14 horas observándose el color inicial del caldo cerebro-corazón, dicha cinética se representa en la curva de remoción de la figura 6.

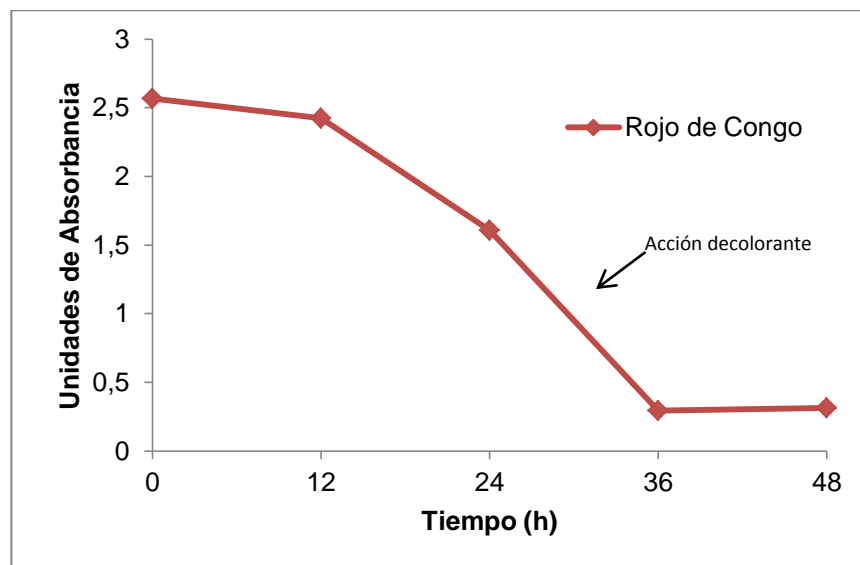


Figura 5. Curva de remoción del tratamiento biológico con la bacteria termófila TM-12 para rojo de Congo.

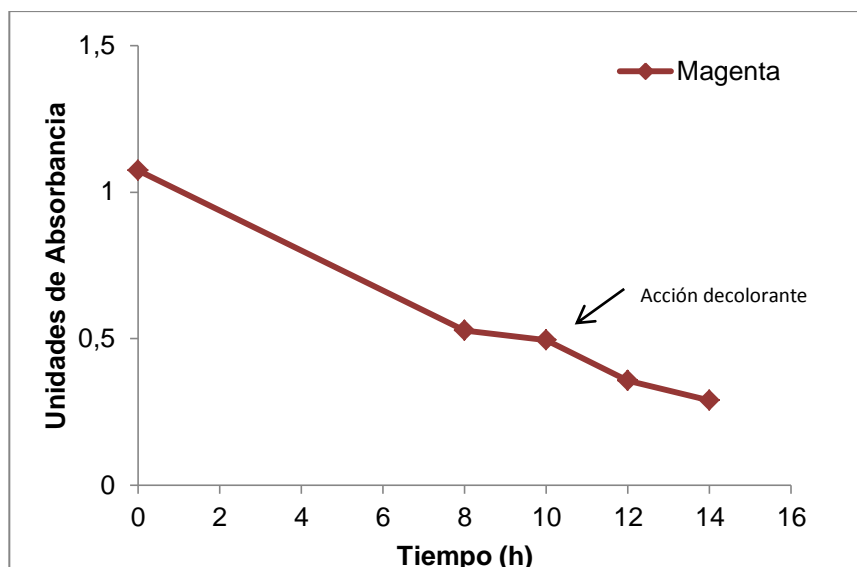


Figura 6. Curva de remoción del tratamiento biológico con la bacteria termófila TM-12 para la tinta de impresión magenta.

Del mismo modo se monitoreó la decoloración de la tinta de impresión de color negro, la cual, demoró 16 horas, luego de este tiempo se observó la desaparición completa del color en el medio de cultivo; la curva de remoción se grafica en la figura 7.

La decoloración de la tinta de impresión cian fue evaluada cada 12 horas para tres diferentes concentraciones por triplicado (Figura 8).

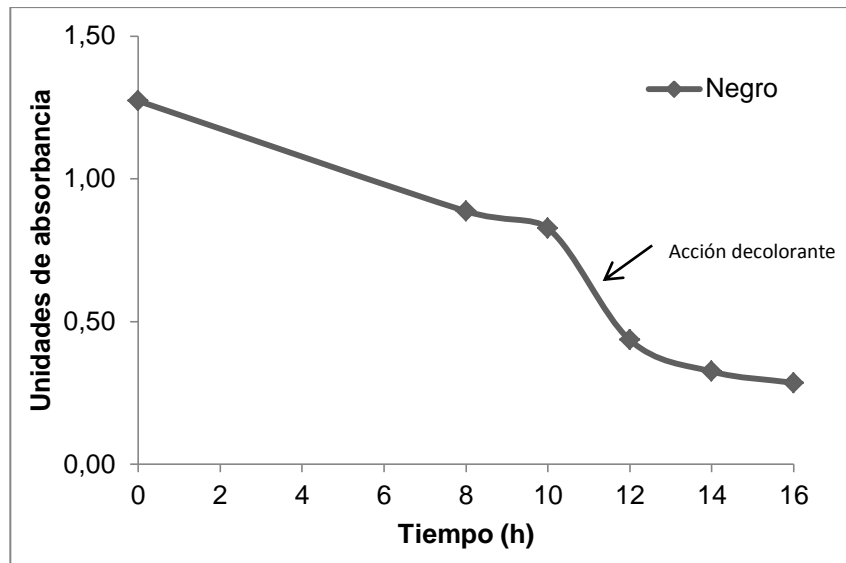


Figura 7. Curva de remoción del tratamiento biológico con la bacteria termófila TM-12 para la tinta de impresión negra.

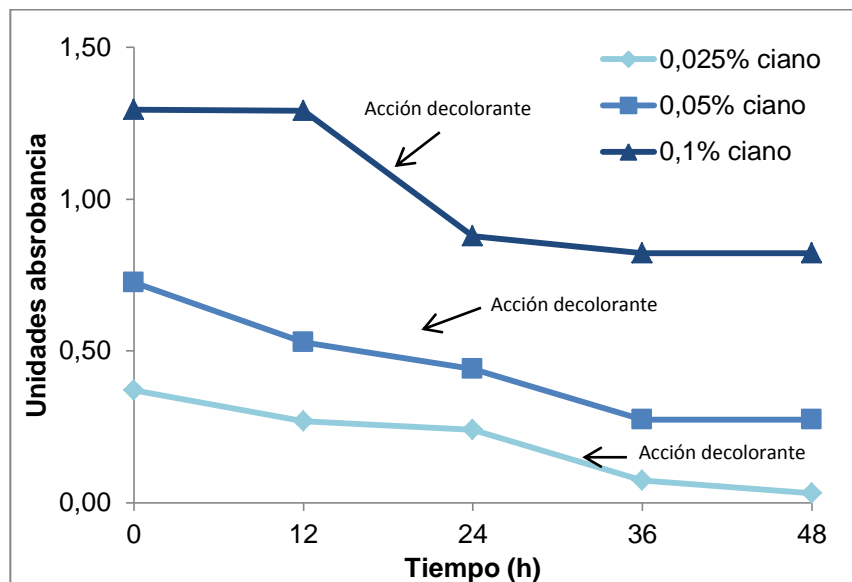


Figura 8. Curvas de remoción del tratamiento biológico con la bacteria termófila TM-12 para la tinta de impresión ciano a tres concentraciones (0,1; 0,05 y 0,025 % v/v).

Tabla 12. Análisis de varianza de los tres tratamientos para la decoloración de la tinta ciano por la bacteria termófila TM-12.

	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón -F	Valor -P
Tratamiento	940.222	2	470.111	33.05	0.0006
Error	85.3333	6	14.2222		
Total (Corr.)	1025.56	8			

Fuente: Elaboración propia

Del análisis de varianza (ANOVA), empleando la prueba F a un nivel de 0,05 de probabilidad, para la variable concentración de tinta de impresión, se observa que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05; por lo tanto, existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de la decoloración de la tinta de impresión ciano entre una concentración y otra, con un nivel de confianza del 95 %. Por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la alterna, es decir, que en al menos una de las tres concentraciones de tinta de impresión tiene un efecto diferente en la decoloración del tinte durante el tratamiento con la bacteria TM-12.

Para determinar cuál es la concentración más favorable para una mejor decoloración de la tinta de impresión se procedió a realizar la prueba de múltiples rangos al 95 % de confiabilidad cuyos resultados se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Pruebas de múltiples rangos para las concentraciones de tinta de impresión ciano según el método de Fisher.

Tratamiento	Casos	Media	Grupos Homogéneos
1	3	33.6667	X
2	3	45.0	X
3	3	58.6667	X

Fuente: Elaboración propia

En la tabla 13 se aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. Se han identificado tres grupos homogéneos según la alineación de las X's en columna empleando el procedimiento de diferencia mínima significativa de Fisher.

Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Por lo tanto, la decoloración de la tinta de impresión ciano depende la concentración inicial de la tinta y se obtiene mayor decoloración al utilizar la concentración tres de 0,025 % v/v correspondiente al valor más bajo.

3.4.2 Espectros de absorbancia

Con el fin de obtener más datos que permitieran afirmar que efectivamente los tintes sintéticos estaban sufriendo cambios químicos a causa del tratamiento biológico a los que se sometieron con la bacteria termófila TM-12, se midió el espectro de absorción de los tintes tratados en cada intervalo de muestreo.

El espectro de absorción del rojo de Congo a las 0 horas presenta un pico elevado entre los 500 nm que se mantiene a las 12 horas pero desaparece a las 24 horas junto a la disminución de todo el rango de absorbancias desde los 400 a 600 nm (Figura 9). Durante el tratamiento con TM-12 para la tinta de impresión magenta su espectro de absorción también presentó cambios; se observó como este disminuyó progresivamente llegando a un mínimo a las 14 horas (Figura 10).

De la misma manera, el espectro de absorción de la tinta de impresión negra presentó cambios en cuanto a la desaparición total de los picos máximos de absorción entre los 500 nm y la aparición de picos a los 400 nm (Figura 11).

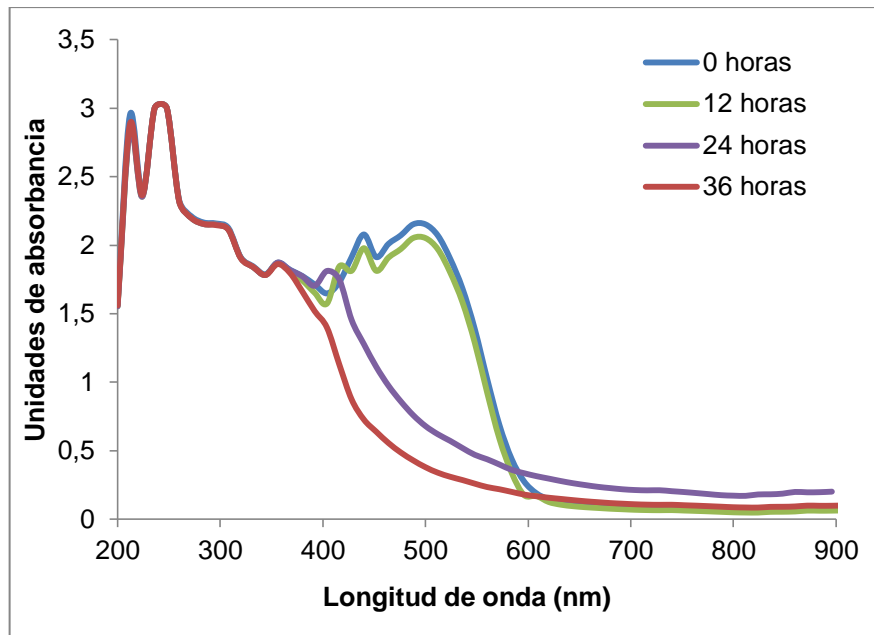


Figura 9. Espectros de absorción del tratamiento biológico con la bacteria termófila TM-12 para el rojo de Congo.

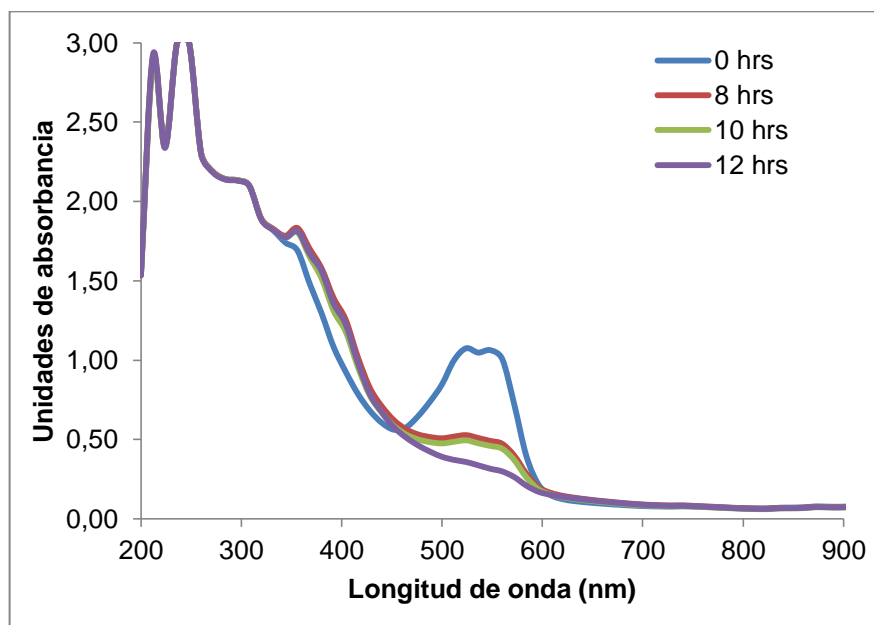


Figura 10. Espectros de absorción del tratamiento biológico con la bacteria termófila TM-12 para la tinta de impresión magenta.

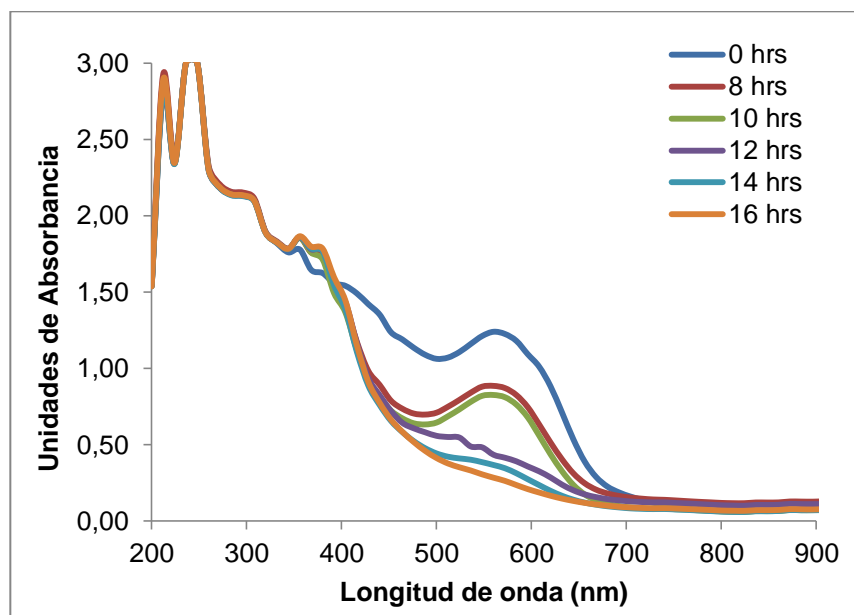


Figura 11. Espectros de absorción del tratamiento biológico con la bacteria termófila TM-12 para la tinta de impresión negra.

La tinta de impresión ciano presentó una disminución constante en las unidades de absorción del rango visible, con una máxima disminución a las 36 horas. Sin embargo no se presentaron cambios en el espectro UV para las concentraciones de 0,1 y 0,05 % v/v, sólo a 0,025 % v/v desaparición el pico de absorbancia. (Figura 12). Sin embargo, este resultado podría deberse a un proceso de adsorción del tinte por las paredes de las bacterias cuyas biopelículas presentaron color azulado.

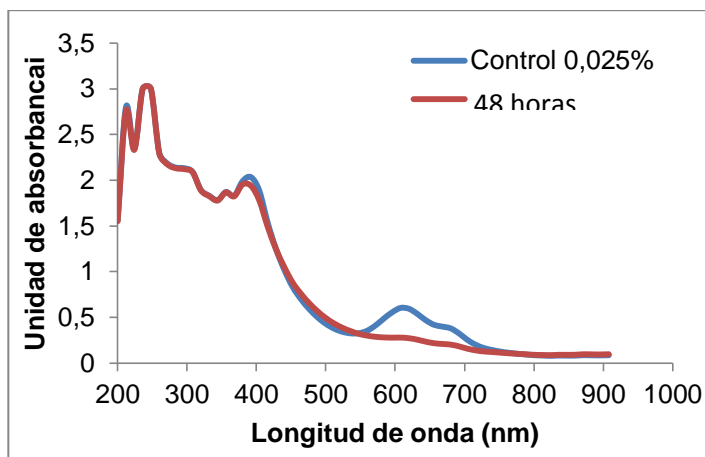
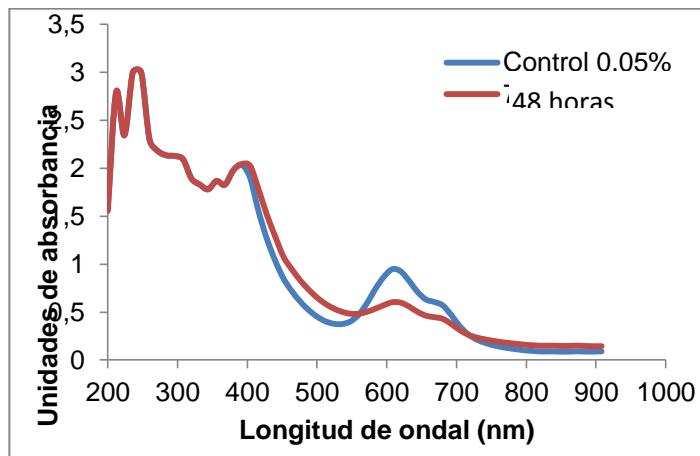
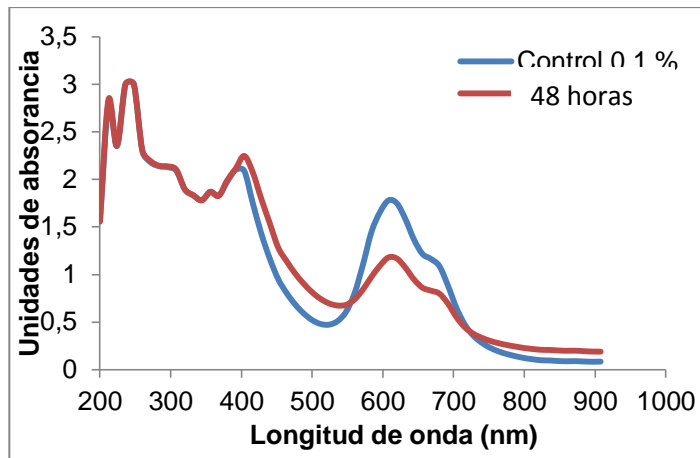


Figura 12. Espectros de absorción del tratamiento biológico con la bacteria termófila TM-12 para la tinta de impresión ciano.

3.4.3 Porcentajes de decoloración

Según los resultados obtenidos se aprecia que los tratamientos para el rojo de Congo y la tinta de impresión de color negro fueron totalmente efectivos con porcentajes de decoloración cercanos al 80 %, cuya absorbancia final corresponde al color amarillo inicial del medio de cultivo cerebro-corazón, demostrando la capacidad de la bacteria termófila TM-12 para la degradación de estos tintes sintéticos.

Tabla 14. Resultados de remoción de tintes sintéticos obtenidos por decoloración con bacteria termófila TM-12.

Tinte usado	Long. de onda (nm)	Abs. inicial	Abs. final	Porcentaje de decoloración
Rojo de Congo	500	2,152	0,340	84 %
Tinta magenta	524	1,075	0,289	73 %
Tinta negra	560	1,273	0,285	78 %
Tinta ciano	605	1,294	0,822	36 %

Fuente: Elaboración propia

A diferencia, el porcentaje de decoloración de la tinta de impresión ciano alrededor del 40 %, indica que la bacteria termófila TM-12 no es una alternativa eficaz para la degradación de este tipo de tinte ftociano.

3.5 Cinética de remoción del efluente simulado durante el tratamiento con la bacteria termófila seleccionada

3.5.1 Recuento de bacterias

Se monitoreó el crecimiento bacteriano hasta la formación de una biopelícula sobre el medio de cultivo, los resultados se muestran en la figura 13. Hasta las 8 horas de incubación se alcanzó una concentración aproximada de $2,17 \times 10^8$ células/ml.

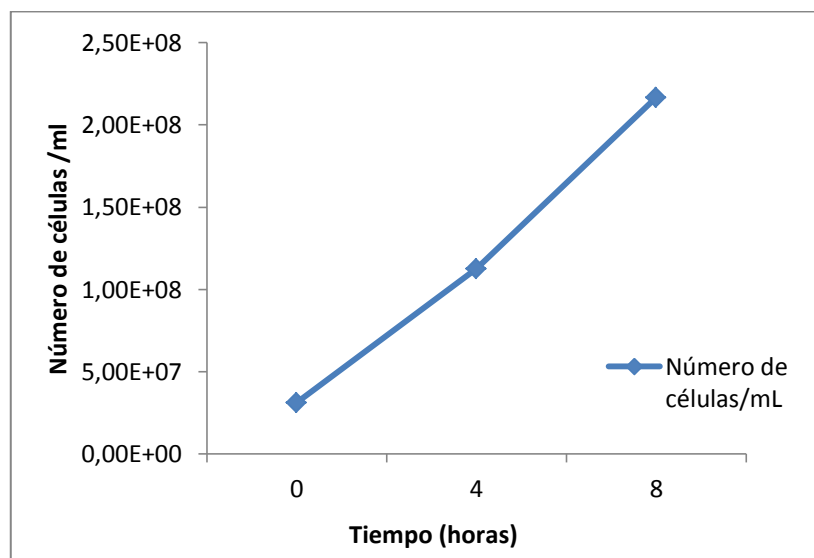


Figura 13. Recuento de la bacteria termófila TM-12 durante el tratamiento biológico para el efluente simulado de un destintado.

El recuento bacteriano permitió conocer que el crecimiento bacteriano se realizaba con normalidad y que no se presentó ningún factor de inhibición.

3.5.2 Curva de remoción

A 560 nm, se registraron las más altas unidades de absorbancia en el tiempo inicial (1,019) y durante el monitoreo a partir de las 10 horas, se pudo observar que la absorbancia se mantiene constante alrededor de la unidad, hasta las 16 horas que disminuyó hasta 0,412 (Figura 14).

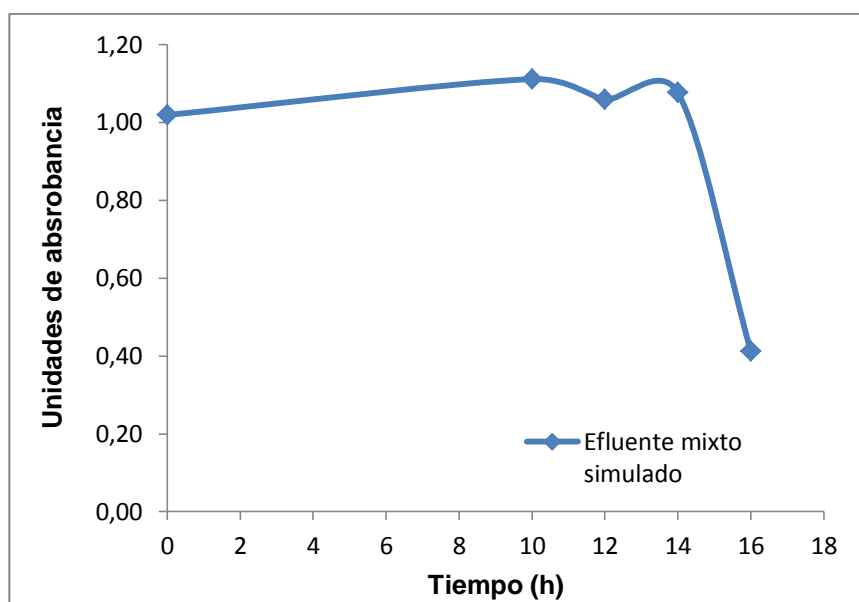


Figura 14. Curva de remoción del tratamiento biológico con la bacteria termófila TM-12 para el efluente simulado de un destintado.

El gráfico de la curva de remoción permite diferenciar el avance continuo de la decoloración en periodos de 2 horas hasta que se observó la desaparición total del color en el medio de cultivo entre las 14 y 16 horas.

3.5.3 Espectro de absorbancia

A partir de las 10 horas del tratamiento biológico con la bacteria termófila TM-12 a 60 °C, se monitoreó la absorbancia a diferentes longitudes de ondas cada 2 horas hasta la remoción del color.

El espectro de absorción grafica curvas de unidades de absorbancia iguales desde el inicio (0 horas) hasta las 14 horas, seguido de la disminución brusca que se muestra en líneas punteadas celestes de la figura 15. Los resultados del espectro de absorción no concuerdan con los cambios progresivos del color, el cual, disminuyó constantemente hasta las 14 horas llegando a observarse finalmente un color verde olivo claro.

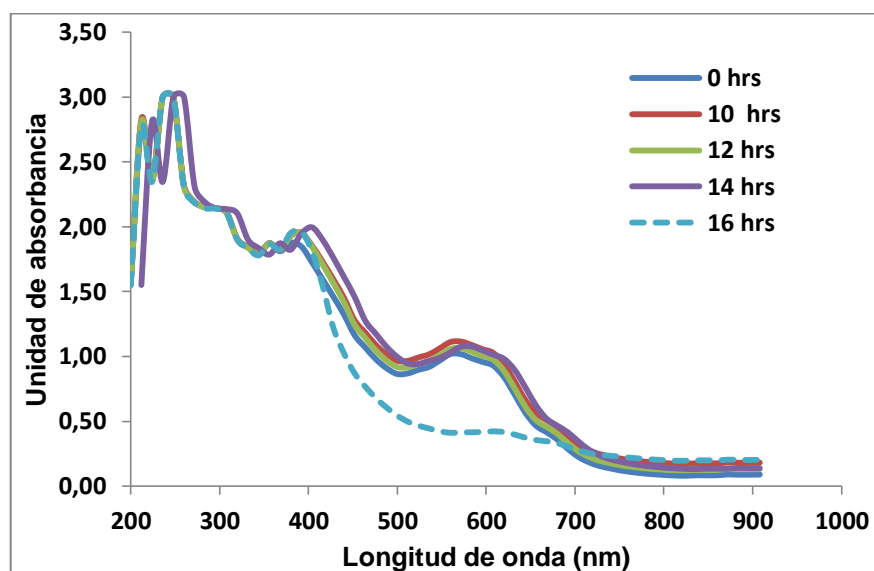


Figura 15. Espectros de absorción del tratamiento biológico con la bacteria termófila TM-12 para el efluente simulado de un destintado.

3.5.4 Porcentaje de decoloración

El resultado obtenido del tratamiento biológico con la bacteria termófila TM-12 del efluente simulado de un destintado con un aproximado 60 % del porcentaje de decoloración (Tabla 15) concuerda con los datos antes mencionados en la decoloración de tintes sintéticos, incluso la presencia de la tinta de impresión ciano, no impide que se decolore el resto de tintas de impresión.

Tabla 15. Resultados de remoción del efluente mixto simulado por la bacteria termófila TM-12.

Efluente simulado	Long. de onda (nm)	Abs. inicial	Abs. final	Porcentaje de decoloración
04 Tintas de impresión Epson	560	1,019	0,412	59,6 %

Fuente: Elaboración propia

IV. DISCUSIÓN

➤ **Caracterización microscópica y macroscópica de los cultivos bacterianos estudiados**

La tinción Gram permitió diferenciar a las bacterias termófilas estudiadas clasificándolas en el grupo de bacterias Gram positivas, por lo que posiblemente compartan las propiedades estructurales atribuidas a este grupo, una pared celular gruesa con elevado contenido de mureína. Coincidiendo con otros estudios realizados sobre la diversidad de bacterias cultivables aisladas de fuentes termales en Turquía (Adiguzel *et al.*, 2009) o en Manikaran, India (Kumar *et al.*, 2013).

Además las características morfológicas reportadas de bacilos Gram positivos, permiten aproximarse a la clasificación taxonómica de estos cultivos como miembros del filo Firmicutes. En las últimas décadas, diversos estudios con bacilos termófilos han reportado los siguientes géneros para este filo: *Bacillus*, *Amphibacillus*, *Alicyclobacillus*, *Paenibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Brevibacillus*, *Halobacillus*, *Virgibacillus*, *Gracilibacillus*, *Sulfobacillus*, *Salibacillus*, *Anoxybacillus*, *Coprobacillus*, *Thermobacillus*, *Filobacillus*, *Geobacillus*, *Ureibacillus*, *Jeotgalibacillus*, *Sulfobacillus* y *Marinibacillus*; basados en los datos de análisis de la secuencia del ARNr 16S (Adiguzel *et al.*, 2009; Zeigler, 2001). Dentro de los géneros mencionados, el único bacilo termófilo con actividad enzimática de lacasas ha sido reportado por Ambika y Shirkot (2014), quienes caracterizaron y purificaron la lacasa termoestable de *Geobacillus thermocatenulatus* MS5 aislado de las fuentes termales de Manikaran en India con una baja temperatura óptima de 55-60 °C.

El tamaño de las bacterias no se registró, ya que no se cuenta con un micrómetro, sin embargo, se aproxima de 5 a 8 μm de largo por 1,5 μm de ancho para los bacilos.

Al respecto de la caracterización macroscópica, existe variedad en la descripción de las colonias bacterianas, siendo la forma irregular y circular dominante y el color crema; sin embargo estos dos caracteres pueden cambiar según la composición del medio de cultivo empleado, lo que se debe tener en cuenta para ensayos posteriores. Resalta también la consistencia viscosa de CTB-13 y la observación de puntos centrales en BT-16, FT-6 y CTB-13.

Esta caracterización microscópica y macroscópica nos sirvió como base de datos para próximos ensayos y se tuvo en cuenta para la búsqueda y elección de metodologías sobre bacterias productoras de lacasas de similar origen y características. Asimismo, es muy importante para confirmar la pureza de los ceparios y poder conservar las cepas aisladas libres de contaminantes ambientales o del cruce de cepas.

➤ **Evaluación de la actividad enzimática tipo lacasa**

Sheikhi *et al.* (2012), fueron los primeros en aislar bacterias productoras de lacasas intracelulares utilizando 0.5 mM guayacol (2-metoxifenol) en el medio de cultivo. A partir de los resultados obtenidos, se puede afirmar que el Laboratorio de Bioquímica y Nutrición ha logrado aislar bacterias termófilas con actividad tipo lacasa que oxidan al guayacol desarrollando colonias de color marrón.

Aunque el guayacol es un sustrato apropiado para el cribado de microorganismos productores de lacasas, ha sido reportado que las lacasas tienen la capacidad para oxidar ácidos metoxifenólicos a diferentes grados (Bar, 2001), lo que llevó a utilizar un segundo método de selección cualitativa con siringol (2,6 dimetoxifenol) lográndose observar mejor la intensidad del cambio de color de las colonias anaranjadas distinguiendo la cobertura total o parcial del color.

Se asignaron puntajes más altos para la oxidación del 2,6-DMP que 2-MP. Probablemente estos resultados reflejan lo antes mencionado en el trabajo de Guillén *et al.* (2000), en el que 2,6-dimetoxi-1,4-benzohidroquinona se oxidó más eficientemente por la lacasa de *Pleurotus eryngii*, correlacionándose con la mayor afinidad por siringol (2,6-DMP) que para guayacol (2-MP). Al respecto, Robles (2000) informó que la inferior actividad de la lacasa hacia monofenoles, como el guayacol, se deba posiblemente a la inactivación de la enzima lacasa por los productos de reacción.

Generalmente las lacasas se combinan con una alta afinidad por el ABTS y siringaldazina, mientras que la oxidación de guayacol es considerablemente más lenta. Sin embargo, no se detectó actividad oxidorreductora sobre ABTS o siringaldazina, estos resultados se asemejan a lo reportado por la lacasa amarilla de *Bacillus* sp. ADR que oxida o-tolidina, 2,6-DMP, guayacol, hidroquinona y L - DOPA, pero no ABTS, siringaldazina, catecol, benidina, p-cresol, pirogalol, ácido cafeico y tirosina (Telke A., *et al.*, 2011). Además, la lacasa fúngica de *Aspergillus nidulans* fue incapaz de oxidar al ABTS y siringaldazina (Scherer & Fischer, 1998), así como, la lacasa de *Agaricus bisporus* que tampoco oxidó siringaldazina, catecol, pirogalol y L-DOPA (Miller *et al.*, 1997).

Por lo tanto, debido al amplio rango de sustratos y diversidad de afinidad, la determinación inequívoca de la actividad oxidorreductora de las lacasas se logra mediante la purificación de la proteína hasta la homogeneidad electroforética y la determinación de KM con múltiples sustratos y así poder diferenciar la actividad de otras fenoloxidasas.

Sin embargo, el color amarillo-anaranjado formado por la quinona producto de la oxidación del 2,6-DMP que se observó en la coloración de las colonias confirman la presencia de enzimas con capacidad de oxidar compuestos fenólicos sustituidos con radicales metoxilo; por lo cual, se afirma que las bacterias termófilas CB-13, CB-25, FT-6 y TM-12 presentan actividad enzimática tipo lacasa.

➤ **Selección del cultivo bacteriano termófilo con mayor potencial para la decoloración de tintes sintéticos**

La selección del cultivo bacteriano termófilo con mayor potencial para la decoloración de tintes sintéticos se basó en los resultados obtenidos de las pruebas realizadas en tubos de ensayo con nueve tintes sintéticos distintos a las 24 horas. En general, a los tintes sintéticos azoicos ensayados (tinta amarilla, tinta magenta y rojo de Congo), les corresponde mayor intensidad de decoloración frente al resto de tintes estudiados. Esta diferencia en la eficiencia puede estar relacionada a la complejidad de la estructura química del tinte sintético, ya que la presencia del azufre en los anillos de las fenotiazina o en los grupos sulfóxidos de los tintes de antraquinona que no facilitan su degradación microbiana; una observación similar en la investigación de la degradabilidad de diferentes estructuras de colorantes por Garzón (2009).

Además, los colorantes a base de antraquinona son considerados como los más resistentes a la degradación debido a sus propiedades estructuras aromáticas fundidas que permanecen coloreadas durante períodos de tiempo (Banat *et al.*, 1996).

Por otra parte, los tintes de trifenilmetano como el cristal violeta o el verde malaquita por sus propiedades antibacterianas, probablemente ocasionaron la inhibición total del crecimiento de las bacterias cultivadas, a diferencia de los estudios realizados con hongo como *Fomitopsis feei*, el cual presentaba altos porcentajes de decoloración de tintes de trifenilmetano correlacionado a la actividad enzimática de trifenilmetano reductasas, mas no a la actividad enzimática de lacasas (Nidadavolu *et al.*, 2013).

Por lo tanto, en cuando a la eficacia de los cuatro aislados bacterianos termófilos en decolorar estos tintes sintéticos se puede afirmar que depende de la complejidad de la estructura de los tintes, en particular sobre la naturaleza, la posición de los sustituyentes en los anillos aromáticos y las interacciones resultantes con estos enlaces.

➤ **Identificación microbiana**

El termófilo *Geobacillus* sp. TM-12 es un bacilo aerobio, Gram positivo, formador de esporas, capaz de crecer a altas temperaturas (50-75 °C), con un crecimiento óptimo de 65 °C. Bioquímicamente puede utilizar como fuente de carbono a la rafinosa e inulina, pero no al manitol ni sorbitol, y es capaz de hidrolizar p-nitrofenil- sustituido o fosfoéster.

Los resultados obtenidos se comparan en la tabla 16 con los algunos reportes encontrados para *G. kaustophilus* SBS-4S (Tayya, Rashid & Akhtar, 2011), *G. thermoleovorans* ID-1 (Lee et. al., 2001) *G. stearothermophilus* (Nazina, 2001).

Tabla 16. Características diferenciadoras de la cepa TM-12- de las especies estrechamente relacionadas del género *Geobacillus*

Prueba	TM-12	1	2	3
bioquímica				
Arginina	-	-	ND	ND
Esculina	-	ND	ND	ND
Manitol	-		ND	ND
Sorbitol	-	-	-	-
Rafinosa	+	+	ND	ND
Inulina	+	ND	ND	ND
Gal	+	+	ND	ND
Glu	+	ND	ND	ND
Nog	+	ND	ND	ND
PO ₄	+	ND	ND	ND
Tirosina	+	ND	ND	ND
Hidroxiprolina	-	ND	ND	ND
Lisina	-	-	ND	ND
Pirimida	-	ND	ND	ND

Leyenda: Los números dados en la parte superior de cada columna corresponden a *G. kaustophilus* (1), *G. thermoleovorans* (2), *G. stearothermophilus* (3). Los símbolos son: +, crecimiento/actividad observada; -, no se observó crecimiento / actividad; ND, no determinado; V, Variable dentro del grupo.

➤ **Decoloración de los tintes sintéticos**

El cultivo bacteriano termófilo evaluado presenta mejores resultados de remoción para el colorante rojo de Congo (84 %), seguida de la tinta de impresión negra y magenta (78 % y 73 %), contrario a la tinta de impresión Ciano en bajas concentraciones (59 %); lo cual refleja como la remoción de cada uno de los tinte sintético varía de acuerdo a la estructura química del tinte sintético logrando decolorar compuestos azoicos, pero no ftalocianinas.

Geobacillus sp. TM-12 ha superado la toxicidad inherente a los compuestos azoicos. Esta capacidad se ha relacionado a la producción de enzimas oxidasas como las lacasas y enzimas reductasas como las azoreductoras. Por las condiciones de cultivo estático puede estar ocurriendo la producción de ambas enzimas para la degradación de los tintes. Al haber confirmado la actividad enzimática tipo lacasa previamente con ensayos en medio sólido, se puede tener la seguridad que dichas enzimas están participando en el tratamiento biológico de los tintes sintéticos en condiciones estáticas; por lo cual, se estarían liberando productos no tóxicos que permiten que la biomasa bacteriana continúe en aumento. Al respecto, Duraó et al. (2008) mostraron que la incubación estática mejoró el contenido de cobre celular, produciendo así una población totalmente cargada de proteína de cobre, lo cual favorece la producción de las lacasas en este tipo de tratamientos biológicos favorables con el medio ambiente.

La comprobación de la degradación del compuesto también se ve en las figuras 9,10 y 11 que muestra los espectros UV-visible después de 12 h de incubación con el aislamiento.

Comparando con otros estudios, Olukanni, et al. (2013), reportaron la decoloración del rojo de Congo (0,1 g/L) por *Bacillus thuringiensis* RUN1 en 72,84 % a las 12 horas, en comparación nuestros resultados son más eficientes en porcentaje (84,02 %) y en una concentración 10 veces superior de tinte a las 24 horas.

En el caso del rojo de Congo, magenta y negro se pueden ver aparecer nuevos picos en la regiones próximas a los 350 nm, lo que indica que el tinte se ha descompuesto en nuevos compuestos intermedios que absorben la luz en esta región, y los picos que desaparecen en las regiones de los 450 nm indica que el compuesto inicial está siendo degradado.

El mecanismo en que las lacasas oxidan un electrón del anillo fenólico de los compuestos azoicos para generar un radical fenoxi indica Moreno y Ospina, (2008) que se debe oxidar una vez más por la enzima para producir un ion carbonio en el que la carga está localizada en el anillo fenólico que lleva el carbono azo y lograr que el ataque nucleofílico por el agua forme 4-sulfofenildiazeno y una benzoquinona perdiendo el color del compuesto

No se observan estos nuevos picos con el tinte ciano. Esto, junto con los sedimentos bacterianos altamente coloreados indican que la disminución de las concentraciones de colorante con ciano, se debe a adsorción. Al igual que en el estudio de Zhou y Zimmermann (1993) quienes lograron el 52.3 % de decoloración de un efluente con tintes a los 14 días de incubación en medio líquidos utilizando cepas de actinomicetos, sin embargo se le atribuye a una absorción del tinte a las células en lugar de una degradación del tinte,

➤ **Decoloración del efluente de destintado simulado**

La decoloración del efluente alcanzada demuestra que la presencia del tinte ciano no inhibe el crecimiento de *Geobacillus sp.* TM-12. Los colorantes azoicos contienen generalmente uno o más grupos sulfónico-ácido en los anillos aromáticos, que podría actuar como detergentes para inhibir el crecimiento de microorganismos pero no ha sido este un problema al emplear las tintas de impresión magenta y amarillo en el efluente simulado.

En el trabajo realizado por Cristóvão, Tavares, Ferreira, Loureiro, Bouventura y Macedo (2009), se estudió la degradación de una mezcla de tres tintes textiles reactivos (Reactive black 5, Reactive yellow 15 y Reactive Red 239), simulando un efluente textil real, por una lacasa comercial en un reactor discontinuo, logrando una alta decoloración, lo que indica la aplicabilidad de este método para tratamiento de aguas residuales textiles a través del desarrollo de modelos matemático para simular la cinética de la catálisis de la lacasa.

Sin embargo, hasta el término del presente trabajo, no se han publicado informes sobre procesos de decoloración de tintas de impresión por lo que es importante continuar con los estudios de selección de microorganismos que podrían decolorar eficazmente un efluente que contiene dichos tintes modelos en condiciones aerobias como *Geobacillus sp.* TM-12.

V. CONCLUSIONES

Se logró evaluar la biodecoloración de tintes sintéticos durante el tratamiento biológico con la bacteria termófila, *Geobacillus* sp. TM-12 con actividad enzimática tipo lacasa a 60 °C.

Se determinó que las bacterias termófilas codificadas como CB-13, CB-25, FT-6 y TM-12 del cepario del Laboratorio de Bioquímica, presentan mayor actividad enzimática tipo lacasa para los cuatro sustratos evaluados (2-MP; 2,6 – DMP; ABTS y SRG) en medio sólido

El cultivo bacteriano termófilo TM-12 fue seleccionado por tener el mayor potencial para la decoloración de los nueve tintes sintéticos evaluados en las pruebas de tubos de ensayo.

La bacteria TM-12 se caracteriza por ser un bacilo Gram positivo, identificado molecularmente como *Geobacillus* sp con un porcentaje de homología del 99 % en su secuencia de ARNr 16 S.

Las cinéticas de remoción de los tintes sintéticos azoicos durante el tratamiento biológico con *Geobacillus* sp. TM-12 demuestran un alto porcentaje de decoloración superior al 75 % en periodos de tiempo menores a las 24 horas.

En el tratamiento del efluente de destintado simulado con la bacteria termófila *Geobacillus* sp. TM-12, a pesar de estar presente el tinte ciano, se logró la decoloración en un 60 % a las 14 horas.

VI. RECOMENDACIONES

Optimizar el medio de cultivo para el tratamiento de tintes sintéticos con bacterias termófilas evaluando el efecto de la aireación o agitación midiendo la cantidad de oxígeno disuelto.

Medir la actividad enzimática tipo lacasa intracelular de *Geobacillus* sp. TM-12 con un amplio rango de sustratos fenólicos y no fenólicos.

Se debe evaluar la inmovilización de las bacterias en mallas inertes para el tratamiento de decoloración de tintes sintéticos, ya que puede dar mayor estabilidad y resistencia a las concentraciones más elevadas de los contaminantes y un efecto de protección debido a las altas densidades celulares que se alcanzan.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abadulla, E. Tzanov, T., Costa, S., Robra, K., Cavaco-paulo, A. & Gubitz, G. (2000) Decolorization and Detoxification of Textile Dyes with a Laccase from *Trametes hirsuta* *Applied and Environmental Microbiology*. 66(8): 3357–3362.
- Adiguzel, A., Ozkan, H., Baris, O., Inan, K., Gulluce, M. & Sahin, F. (2009). Isolation and characterization of the thermophilic bacteria from geothermal areas in Turkey and preliminary research on biotechnological enzyme potentials. *Journal of Microbiological Methods* 79, 321–328.
- Ambika, V., & Shirkot. P. (2014). Purification and characterization of thermostable laccase from thermophilic *Geobacillus thermocatenulatus* MS5 and its applications in removal of textiles dyes. *Sch. Acad. J. Biosci.* 2(8):479-485.
- Bajpai, P. (2014) Generation of Waste in Pulp and Paper Mills. En: *Management of Pulp and Paper Mill Waste*. Springer.
- Baldrian, P. (2006). Fungal laccases , occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev* 30: 215–242.
- Banat, I., Nigam, P., Singh, D., & Marchant, R. (1996) Microbial decolorization of textile-dyecontaining effluents: a review *Bioresource Technology* 58, 217-227.
- Bar, M. (2001). Kinetics and physico-chemical properties of white-rot fungal laccases. Tesis para Magister en ciencias. Facultad de Ciencias naturales y agricultura, Departamento de Microbiología y Bioquímica. Universidad de Estado de Bloemfontein.
- Barrière, F. & Rochefort, L. (2004). Targetting redox polymers as mediators for laccase oxygen reduction in a membrane-less biofuel cell. *Electrochemistry Communications* 6 237–241.

- Claus, H. (2003). Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Arch Microbiol* vol. 179.145–150.
- Chacko, J. & Subramaniam, K. (2011). Enzymatic Degradation of Azo Dyes - A Review. *International Journal of Environmental Sciences*. 1(6): 1250-1260.
- Crini, G. (2006). Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: a review. *Bioresource technology*. 97(9), 1061-85.
- Chivukula, M. & Renganathan, V. (1995). Phenolic azo dye oxidation by laccase from *Pyricularia oryzae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 61 (12) 4374–4377.
- Chivukula, M., Spadaro, J. & Renganathan, V. (1995). Lignin peroxidase catalyzed oxidation of sulfonated azo dyes generates novel sulfophenyl hydroperoxides. *Biochemistry*, 34, 7765–7772.
- Chung, K. & Cerniglia, C. (1992). Mutagenicity of azo dyes: structure activity relationships. *Mutat. Res.* 277, 201–220.
- Cortazar, A., González, C., Coronel, C., Escalante, J., Castro, J. & Villagómez, J. (2012). Biotecnología aplicada a la degradación de colorantes de la industria textil. *Universidad y ciencia*. 28(2), 187-199.
- Cristóvão, R., Tavares, A., Ferreira, L., Loureiro, J., Bouventura, R. & Macedo, E. (2009). Modeling the discoloration of a mixture of reactive textile dyes by commercial laccase. *Bioresour. Technol.* 100: 1094- 1099.
- Deive, F., Domínguez, A., Barriola, T., Moscosoa, F., Morán, P., Longoa M.A. & Sanromán, M.A. (2010) Decolorization of dye Reactive Black 5 by newly isolated thermophilic microorganisms from geothermal sites in Galicia (Spain). *Journal of Hazardous Materials* 182 735–742.

- Edens, W., Goins, T., Dooley, D. & Henson, J. (1999). Purification and characterization of a secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis var. tritici*. *Appl Environ Microbiol* 65: 3071–3074.
- Ferraroni, M., Myasoedova, N., Schmatchenko, V., Leontievsky, A., Golovleva, L. & Scozzafava, A. (2007). Crystal structure of a blue laccase from *Lentinus tigrinus*: evidences for intermediates in the molecular oxygen reductive splitting by multicopper oxidases. *BMC Structural Biology*. 7: 1-13.
- Garzón, R. (2009). Cinética de degradación de colorantes textiles de diferentes clases químicas por hongos y bacterias inmovilizados sobre fibra de *Agave tequilana Webber* var. Azul. Tesis de grado para optar el título de Microbiólogo Industrial. Facultad de ciencias. Pontificia Universidad Javeriana Bogota.D.C., Colombia.
- Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S. & Sannia, G. (2010). Laccases: a never-ending story. *Cell. Mol. Life Sci.* 67:369–385.
- Ghoreishi, M. & Haghghi, R. (2003). Chemical catalytic reaction and biological oxidation for treatment of non-biodegradable textile effluent. *Chemical Engineering Journal*. 95: 163-169.
- Guillén, F., Muñoz, C., Gómez-Toribio, V., Martínez, A., & Martínez, M. J. (2000). Oxygen activation during oxidation of methoxyhydroquinones by laccase from *Pleurotus eryngii*. *Applied and Environmental microbiology*. 66 (1), 170–175.
- Haki, G. & Rakshit, S. (2003). Developments in industrially important thermoestable enzymes: a review. *Bioresource technology*. 89,17-34.
- Hodge, W. & Morgan P. (1947), Characteristics and Methods for Treatment of Deinking Wastes. *Sewage Works Journal*, Vol. 19, No. 5 pp. 830-862.

- Kanagaraj, J., Senthilvelan, T. & Panda, R.C. Clean Techn Environ Policy (2015) 17: 1443. doi:10.1007/s10098-014-0869-6.
- Kim, Eunha; Parque, Seung Bum (2010). El descubrimiento de nuevos tintes sintéticos: Síntesis selectiva o enfoque combinatorio?. En Demchenko, Alexander P. avanzadas de fluorescencia reporteros en Química y Biología I: Fundamentos y Diseño Molecular volumen 8 de la serie Springer en la fluorescencia . Berlín: Springer. pag. 172. ISBN 9783642047022.
- Koneman Diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color/ Elmer W. Koneman et al. 6ta ed. Buenos Aires. 1698 p. Médica panamericana (2008).
- Kumar, P., Lata, S. & Kumar, S. (2013). Comparative Studies on the Blue and Yellow Laccases. Research in Plant Sciences. 1(2) 32-37.
- Kumar, M., Nath A., Tiwari, R., Prasanna R., & Kumar, A. (2014) *Deciphering the diversity of culturable thermotolerant bacteria from Manikaran hot springs* Ann Microbiol 64:741–751. DOI 10.1007/s13213-013-0709-7.
- Lee, D., Kim, H., Lee, K, Kim, B., Choe, E., Lee, H., Kim, D. & Pyun, Y (2001). Purification and characterization of two distinct thermostable lipases from the Gram-positive thermophilic bacterium *Bacillus thermoleovorans* ID-1, Enzyme Microb. Technol. 29, 363–371.
- Miller, R., Kuglin, J., Gallagher, S., Flurkey, W., (1997). A spectrophotometric assay for laccase using o-tolidine. J. Food Biochem. 21, 445–459.
- Moreno, N. & Ospina, X. (2008). Evaluación de inductores metálicos y co-sustratos para la remoción de Negro Reactivo 5 aplicando *Pleurotus ostreus* inmoviado en fique. Tesis para optar el título de Microbiólogo Industrial. Universidad Pontificia Javeriana.

- Nazareno, M., Bucsinszky, A., Tournier, H., Cabello, M. & Arambarri, A. (2000). Extracellular ABTS-oxidizing activity of autochthonous fungal strains from Argentina in solid medium . *Rev Iberoam Micol* 17: 64-68
- Nazina, T., Tourova, T., Poltarau, A., Novikova, E., Grigoryan, A., Ivanova, A., Lysenko, A., Petrunyaka, V., Osipov, G. & Belyaev, S. (2001). Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: description of *Geobacillus subteaneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovolans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglusidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovolans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglusidasius* and *G. thermodenitrificans*, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51, 433–446
- Nemerow N. & Dasgupta A. (1998). *Tratamiento de vertidos industriales y peligrosos*. (1a ed.) Díaz de santos. Madrid
- Nidadavolu, H., Gudikandula, K., Pabba, S. & Maringanti, S. (2013) Decolorization of triphenyl methane dyes by *Fomitopsis feei* *Natural Science*. 5, 30-35.
- Olukanni, O., Osuntoki A, Awotula A, Kalyani D, Gbenle, G & Govindwar S. (2013). Decolorization of Dyehouse Effluent and Biodegradation of Congo Red by *Bacillus thuringiensis* RUN1. *J. Microbiol. Biotechnol.* 23(6), 843–849.
- Pedroza, A. (2001). Aislamiento y caracterización de dos cepas de *Thermus* sp. con actividad amilolítica termoestable. Tesis de Maestría, Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Departamento de microbiología: Bogotá, Colombia.
- Peters, A. & Freeman, M.((1995). *Modern Colorants; Synthesis and structure*. 1 Ed. Vol 3. Blackie academic and profesional.

- Pricelius, S. Held, C., Murkovic, M., Bozic, M., Kokol, V., Cavaco-Paulo, A. & Guebitz, G. (2007). Enzymatic reduction of azo and indigoid compounds. *Appl Microbiol Biotechnol.* 77(2):321-327.
- Rafii, F., Franklin, W. & Cerniglia, C. (1990). Azoreductase activity of anaerobic bacteria isolated from human intestinal microflora. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2146-2151.
- Ratna, Padhi, B. (2012). Pollution due to synthetic dyes toxicity & carcinogenicity studies and remediation. *International Journal of Environmental Sciences.* 3(3), 940 – 955.
- Robinson, T; McMullan, G; Marchant, R; Nigam, P. 2001. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology.* 77(3): 247-255.
- Robles, A., Lucas, R., Cienfuegos, G., & Galvez, A. (2000) Phenoloxidase (laccase) activity in strains of the hyphomycete *Chalaraparadoxa* isolated from olive mill wastewater disposal ponds. *Enzyme Microb Technol* 26, 484–490.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 74 (12), 5463–5467.
- Sanchez-Amat, A. & Solano F. (1997). A Pluripotent Polyphenol Oxidase from the Melanogenic Marine *Alteromonas* sp Shares Catalytic Capabilities of Tyrosinases and Laccases *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **240**: 787-792.
- Swamy, J. & Ramsay, J. (1999). The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes *J. Enzyme Microb. Technol.* 24, 130–137.
- Scherer, M. & Reinhard, Fischer (1998). Purification and characterization of laccase II of *Aspergillus nidulans*. *Arch Microbiol* 170, 78–84.

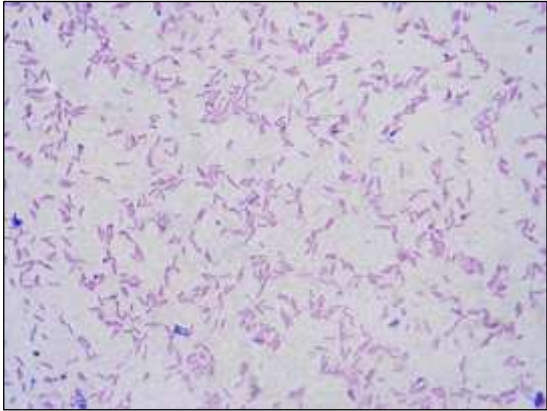
- Sheikhi, F., Ardakani M., Naeimeh, E. & Rodriguez-Couto Susana. (2012) The Determination of Assay for Laccase of *Bacillus subtilis* WPI with Two Classes of Chemical Compounds as Substrates. *Indian J Microbiol* 52(4), 701–707.
- Shin, K. & Lee, Y. (2000). Purificación y caracterización de un nuevo miembro de la familia lacasa de la podredumbre blanca basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *Arco Biochem Biophys* 384 : 109
- Stetter, K. (1999). Extremophiles and their adaptation to hot environments. *FEBS Letters*, 452, 22 – 25.
- Strong, P. & Burgess, J. (2008). Treatment methods for wine-related and distillery wastewaters: A review. *Bioremediation Journal*, 12, 70-87.
- Sulbarán, B., Turrado, J., Delgado, E., Rojas, O. & Venditti, R. (2014). Destintado en medio neutro de papel reciclado aplicando mezclas de enzimas celulasa y α -amilasas. *European Scientific Journal* edition 10 (12), 1857 – 7881.
- Suteu, D.; Zaharia, C y Malutan, T. 2011a. Biosorbents Based On Lignin Used In Biosorption Processes From Wastewater Treatment (chapter 7). In: *Lignin: Properties and Applications in Biotechnology and Bioenergy*, Ryan J. Paterson (Ed.), *Nova Science Publishers*, 27 pp., ISBN 978-1-61122-907-3, New York, U.S.A.
- Tayya M. Rashid, N & Akhtar, M (2011). Isolation and identification of lipase producing thermophilic *Geobacillus* sp. SBS-4S: Cloning and characterization of the lipase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 111 (3), 272–278.
- Telke, A. A.; Ghodake, G. S.; Kalyani, D. C.; Dhanve, R. S. & Govindwar, S. P. (2011) Biochemical characteristics of a textile dye degrading extracellular laccase from a *Bacillus* sp. ADR. *Bioresource Technology* 102, 1752–1756.

- Thurston, C. (1994). La estructura y función de las lacasas fúngicas. *Microbiología*, 140, 19 – 26.
- Verma, P. & Madamwar, D. (2003). Decolourization of synthetic dyes by a newly isolated strain of *Serratia marcescens*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 19: 615-618.
- Welham, A. (2000). The theory of dyeing (and the secret of life). *Journal of the Society of Dyers and Colourists*, Vol.116, pp.140-143
- Wesenberg, D., Kyriakides, I., Agathos, S.N. 2003. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances*. 22(1-2):161-187.
- Zaharia, C. & Suteu, D. (2011). Organic Pollutants Ten Years After the Stockholm Convention - Environmental and Analytical Update. Tomasz Puzyn (Ed.), Capítulo 3: Textile Organic Dyes - Characteristics, Polluting Effects and Separation / Elimination Procedures from Industrial Effluents - A Critical Overview. Editorial Intech.
- Zeigler, D. (2001). *Bacillus* Genetic Stock Center Catalog of Strains, The Genus *Geobacillus* Ed. 7.
- Zhou, W. & Zimmermann, W.(1993). Decolorization of industrial effluents containing reactive dyes by actinomycetes. *FEMS Microbiology Letters* 107 (1993) 157-162

VII. ANEXOS

Anexo 1. Fotografías de la tinción Gram de las bacterias termófilas con potencial para la decoloración de tintes sintético.

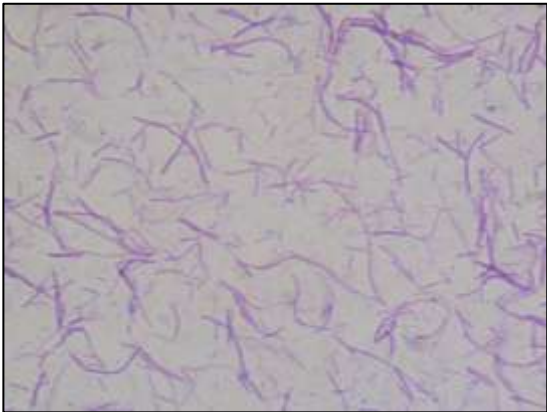
1. 1. Tinción Gram de la bacteria CB-13.



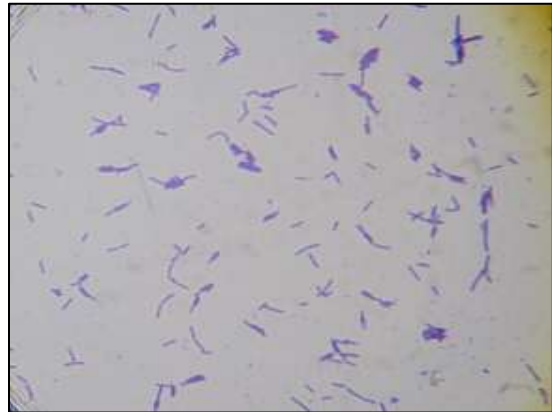
1.2. Tinción Gram de la bacteria CB-16.



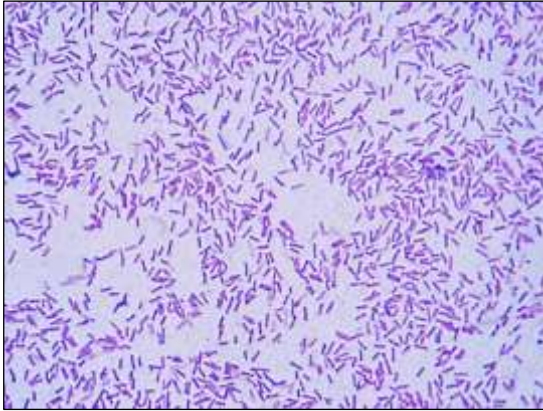
1.3. Tinción Gram de la bacteria CB-25.



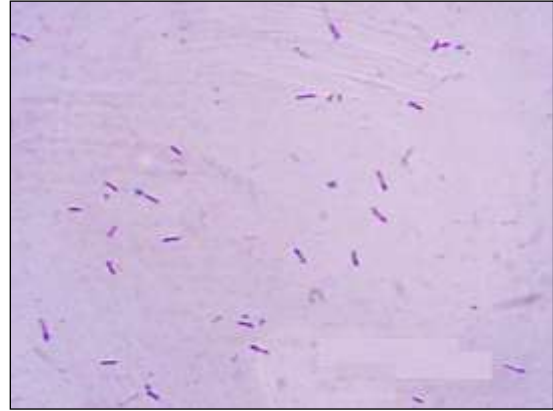
1.4. Tinción Gram de la bacteria BT-16.



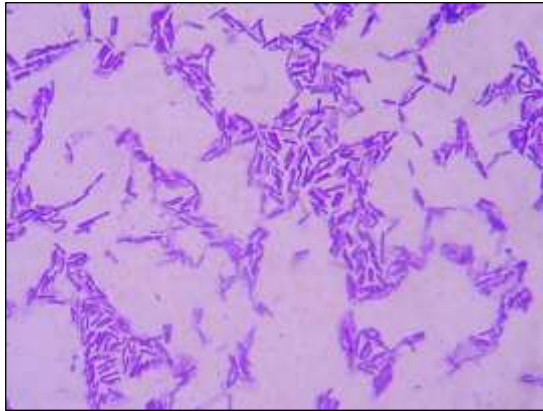
1.5. Tinción Gram de la bacteria CTB-13



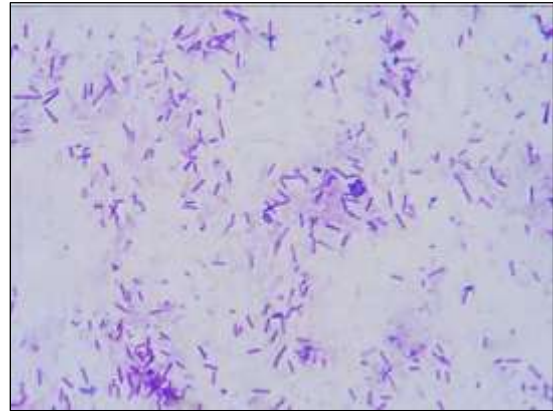
1.6. Tinción Gram de la bacteria CTB-16



1.7. Tinción Gram de la bacteria CTB-19



1.8. Tinción Gram de la bacteria CTB-21



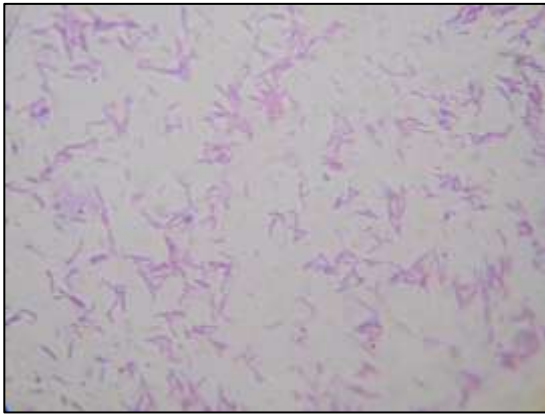
1.9. Tinción Gram de la bacteria FT-6.



1.10. Tinción Gram de la bacteria FT-9.

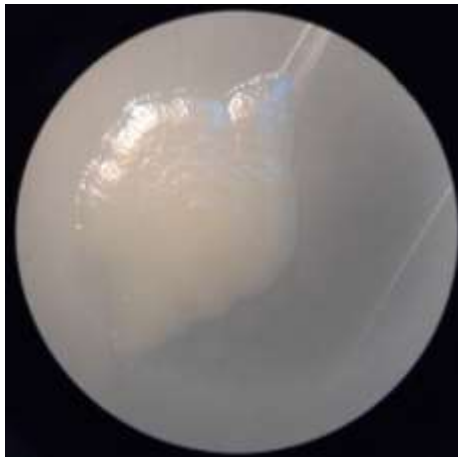


1. 11. Tinción Gram de la bacteria TM-12.



Anexo 2. Fotografías de las colonias de las bacterias termófilas en estereoscopio con AUMENTO 10X.

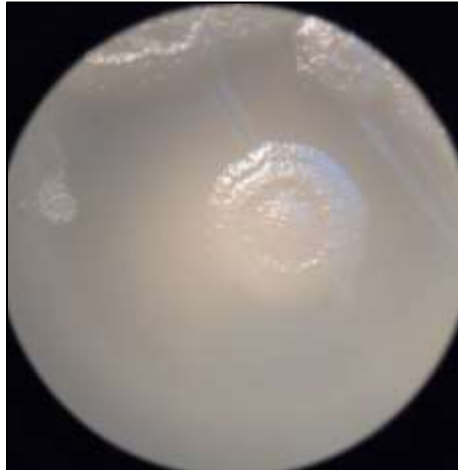
2.1. Colonia de la bacteria CB-13



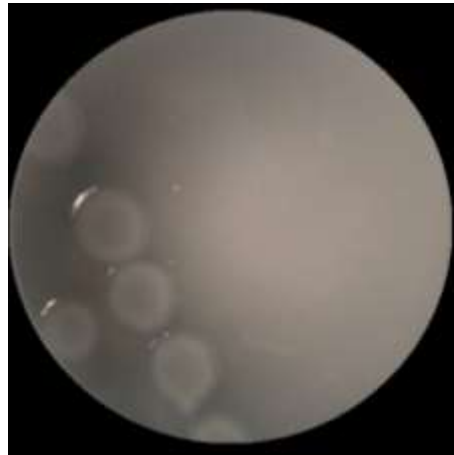
2.2. Colonia de la bacteria CB-16



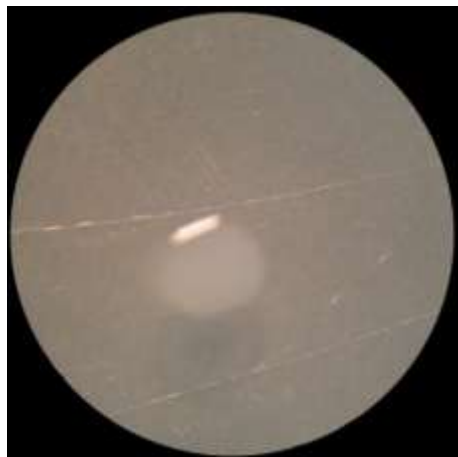
2.3. Colonia de la bacteria CB-25



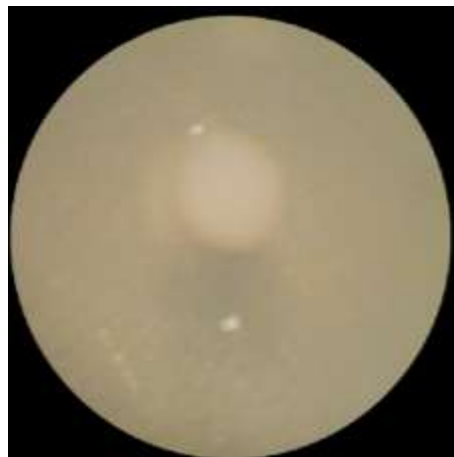
2.4. Colonia de la bacteria BT-16



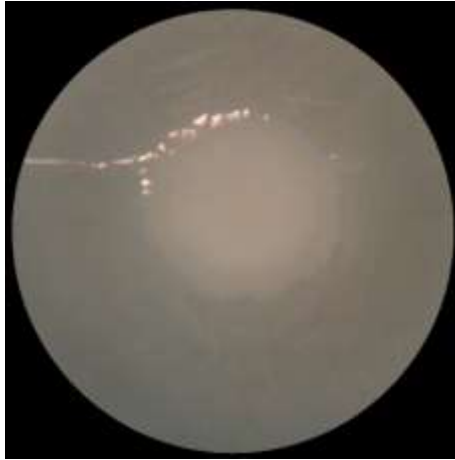
2.5. Colonia de la bacteria CTB-13



2.6. Colonia de la bacteria CTB-16



2.7. Colonia de la bacteria CTB-19



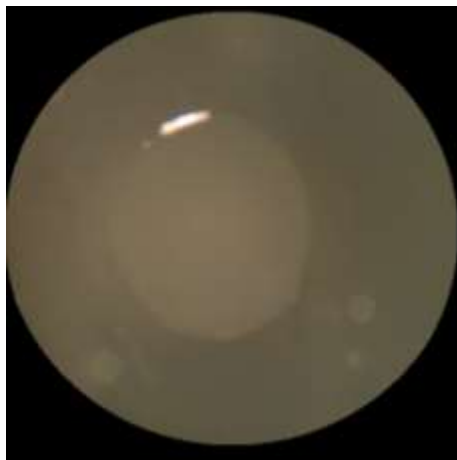
2.8. Colonia de la bacteria CTB-21



2.9. Colonia de la bacteria FT-6



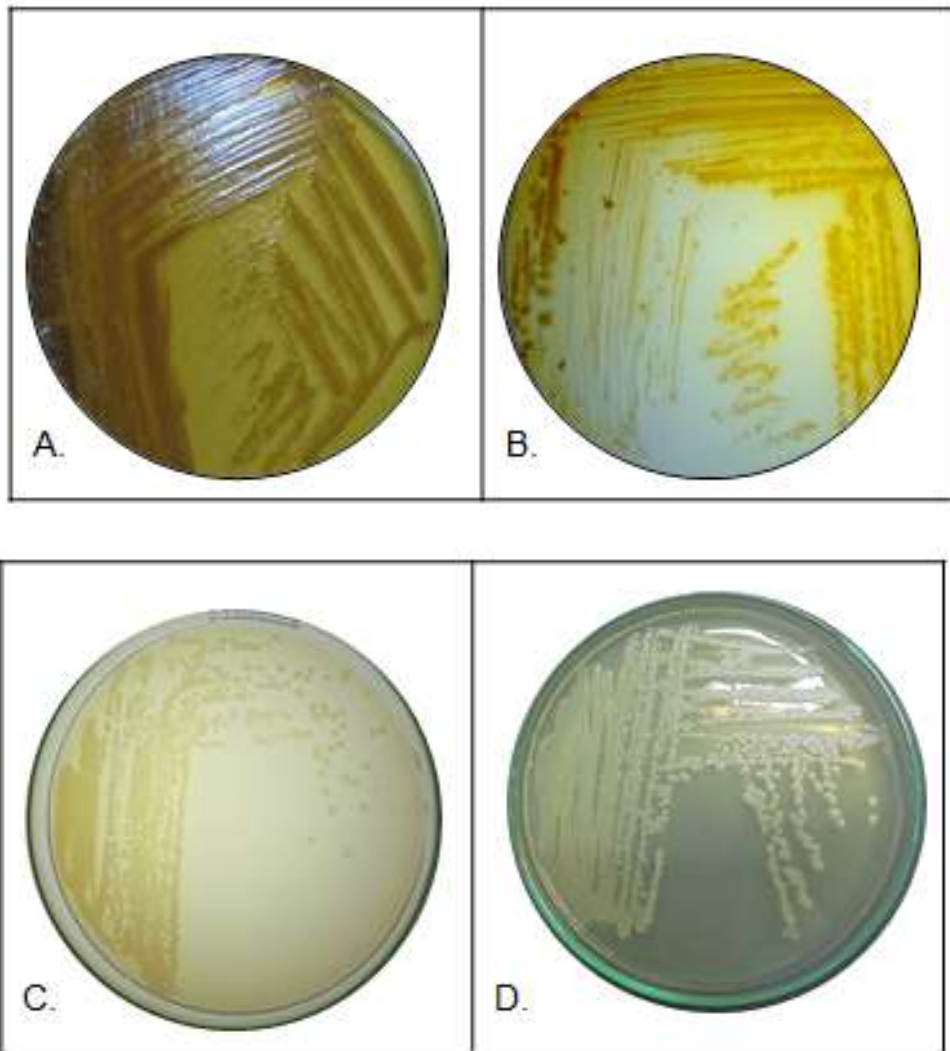
2.10. Colonia de la bacteria FT-9



2.10. Colonia de la bacteria TM-12

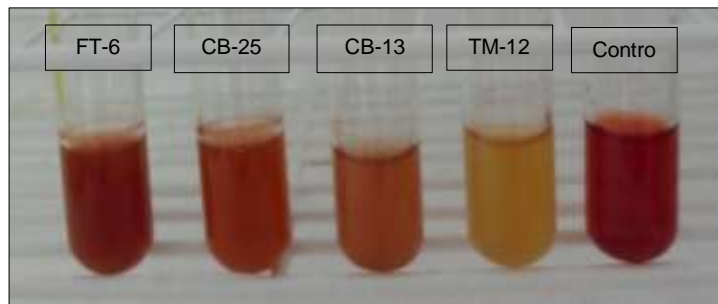


Anexo 3. Fotografías de los resultados de la evaluación de la actividad enzimática tipo lacasa de la bacteria termófila TM-12 en medio sólido con diferentes sustratos (A: Guayacol, B: Siringol, C: ABTS y D: Siringaldazina).

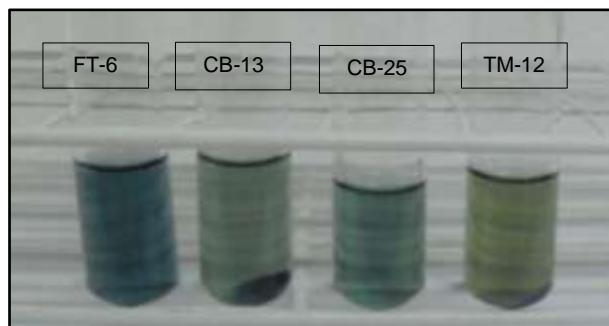


Anexo 4. Fotografías de los resultados de la selección del cultivo bacteriano termófilo con mayor potencial para la decoloración de tintes sintéticos en pruebas de tubos de ensayo

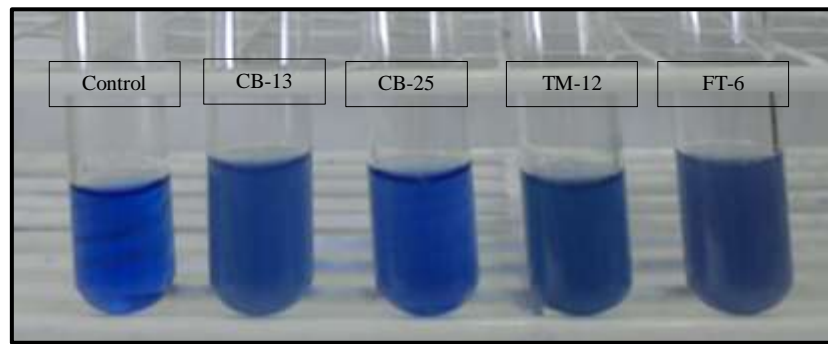
4.1. Decoloración del Rojo de Congo de menor a mayor intensidad: FT-6, CB-25, CB-13 y TM-12



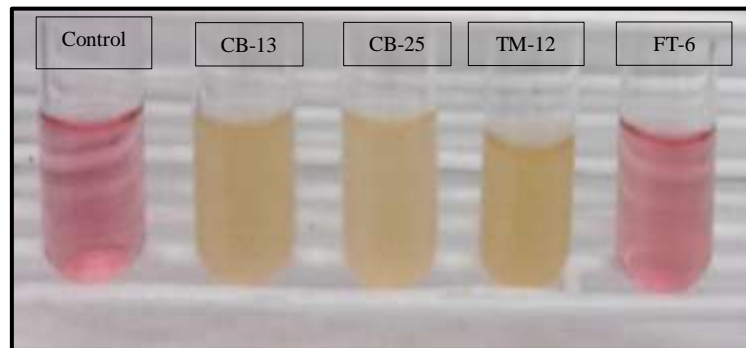
4.2. Decoloración del Azul brillante de remazol R de menor a mayor intensidad: FT-6, CB-25, CB-13 y TM-12



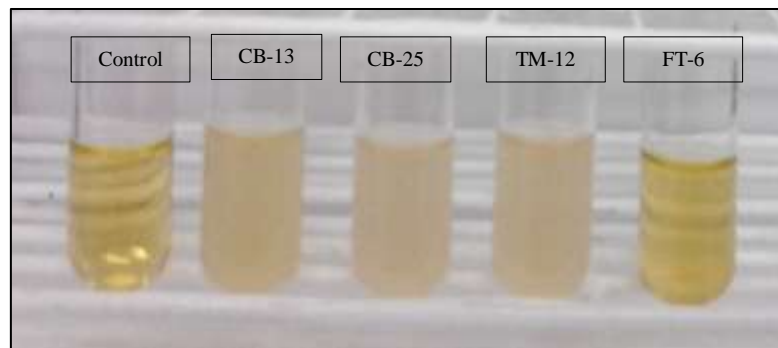
4.3. Decoloración del Azul de toluidina con crecimiento de CB-13 y TM-12 y FT-6



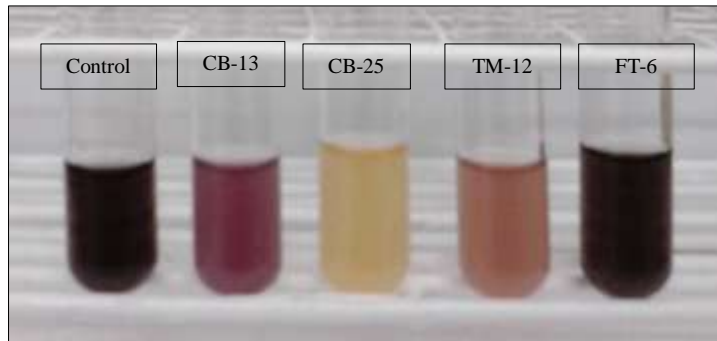
4.4. Decoloración de la tinta magenta con crecimiento de CB-13, CB-25 y TM-12.



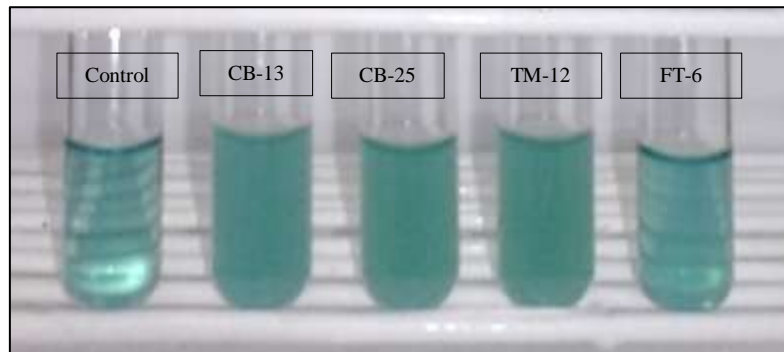
4.5. Decoloración de la tinta amarillo con crecimiento de CB-13, CB-25 y TM-12.



4.6. Decoloración de la tinta Negra de menor a mayor intensidad: FT-6, CB-25, CB-13 y TM-12



4.7. Decoloración de la tinta ciano con crecimiento para CB-25, CB-13 y TM-12



.....
Msc. Roberto Castellanos Cabrera
ASESOR

.....
Bach. Fiorela Salazar Torreblanca
TESISTA