

Evaluación del potencial de levaduras nativas aisladas de aguas residuales industriales para la remoción de colorantes azoicos

Assessment of the potential of native yeast isolated from industrial residual waters in the removal of azoic dyes

Manuela Bolívar–Correa¹, Ana María Gaviria–Villa¹, Lina María López–de Ávila^{1*}

Resumen

Los colorantes azoicos son ampliamente utilizados en la industria textil, liberando efluentes contaminados que afectan a diferentes organismos por su toxicidad y carácter recalcitrante. Reconociendo el papel de las levaduras en la biorremediación de diferentes ambientes contaminados, el objetivo de este estudio fue evaluar el potencial de levaduras nativas aisladas de fuentes hídricas contaminadas en la remoción del colorante azoico azul Novasyn luz BLR. Se aislaron 15 colonias de levaduras con capacidad de crecer en presencia del colorante, con éstas se realizaron ensayos de remoción en medio sintético en los que se obtuvieron porcentajes de remoción superiores al 60%. La colonia MA011 identificada como *Hanseniaspora opuntinae* fue seleccionada para evaluar el efecto de la composición del medio de cultivo, el pH y la concentración del colorante en su capacidad de remoción. Los resultados demostraron que la concentración de colorante y el pH tienen un efecto significativo sobre el porcentaje de remoción; además se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de colorante sobre el crecimiento y la capacidad de remoción de *H. opuntinae* y no se evidenció un efecto tóxico del colorante hasta 2000 ppm; sin embargo, se observó que a concentraciones más altas del colorante disminuye la capacidad de remoción. Finalmente se evaluó la capacidad de remoción de *H. opuntinae* en aguas residuales y no se observaron cambios en el perfil espectrofotométrico del colorante antes y después de la interacción con la levadura, lo que permite sugerir que la remoción del colorante por *H. opuntinae* se da por biosorción.

Palabras clave: biorremediación, biosorción, *Hanseniaspora*

Abstract

Azo dyes, widely used in the textile industry, release contaminating effluents that affect different organisms due to their toxicity and recalcitrant nature. Recognizing the role of yeasts in the bioremediation of different contaminated environments, the objective of this study was to evaluate the potential of native yeasts isolated from contaminated water sources in the removal of the azo dye Novasyn blue light BLR. We isolated 15 yeast colonies able to grow in the presence of Novasyn blue light BLR dye and determined their ability to remove the dye in a synthetic medium, obtaining colonies with removal percentages greater than 60%. We selected one colony, MA011, identified as *Hanseniaspora opuntinae*, to evaluate the effect of the culture media composition, pH, and dye concentration on the removal capacity of the yeast. The results showed that dye concentration and pH have a significant effect on the removal percentage. In addition, differing dye concentrations on the growth and removal capacity of *H. opuntinae* were evaluated, with a toxic effect of the dye not observed up to 2000 ppm. However, we found that high dye concentrations decreased the removal capacity of the yeast. Finally, we evaluated the removal capacity of *H. opuntinae* in wastewater,

¹. Grupo de Biotransformación, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

* Autor para correspondencia: <linam.lopez@udea.edu.co>

Recibido: abril 2022; aceptado: agosto 2022.

observing no changes in the spectrophotometric profile of the dye before and after the interaction with the yeast, suggesting that dye removal by *H. opuntinae* occurs by biosorption.

Keywords: bioremediation, biosorption, *Hanseniaspora*

INTRODUCCIÓN

Los colorantes son sustancias orgánicas fluorescentes o de tonalidad intensa que imparten color a una sustancia incolora o a un sustrato mediante la absorción selectiva de la luz, estos compuestos pueden clasificarse según su estructura química, su aplicación al tipo de fibra o dependiendo de su solubilidad. Entre los tintes más usados se encuentran los azoicos, que son compuestos aromáticos con uno o más enlaces (-N=N-) y representan entre el 65–70 % de la producción total de colorantes. Su gran demanda se debe a que ofrecen una amplia gama de colores, presentan alta estabilidad y resistencia a la degradación por luz, temperatura y pH (Zuleta, 2013). El compuesto Novasyn Luz Azul BRL es un colorante diazoico, comúnmente utilizado en la industria textil para dar una coloración azul marino a materiales como algodón, cuero, entre otros (Posada y Pulido, 2011).

Se ha reportado que cerca del 15 % de los colorantes empleados en la industria textil se pierden en el proceso de teñido y en la mayoría de los casos son vertidos en cuerpos de agua sin ningún tratamiento previo, generando contaminación en los ecosistemas acuáticos (Pazarlioglu et al., 2005). Cantidades mínimas de colorante, incluso en una concentración de 1 ppm es suficiente para ocasionar un impacto negativo debido a que afectan de forma directa los procesos fotosintéticos por disminución de la penetración de la radiación solar, perjudicando la biota acuática en general. Además, múltiples estudios (Barreda et al., 2015; Chequer et al., 2009) han demostrado que los efluentes de este tipo tienen efectos nocivos en diversos organismos, que pueden llegar a ser carcinogénicos, mutagénicos o teratogénicos, impactando incluso en la salud humana (Sarmiento, 2017).

Debido a las múltiples desventajas que presentan estos tintes, se ha hecho necesario desarrollar metodologías efectivas para su remoción (Martínez y

Brillas, 2009; Saratale et al., 2011), entre las cuales se encuentran métodos físicos como adsorción, filtración, radiación y métodos químicos como el uso de hipoclorito de sodio o la ozonización, los cuales son costosos y causan contaminación secundaria (Joshi et al., 2004). En comparación, los métodos biológicos, utilizando microorganismos como bacterias, hongos y algas en los procesos de remoción, son más atractivos debido a sus menores costos (Gomi et al., 2011; Saratale et al., 2009).

Se ha encontrado que las levaduras tienen un amplio potencial en la biorremediación de ambientes contaminados, debido a que son microorganismos tolerantes que exhiben una mejor respuesta a condiciones extremas como la presencia de metales pesados, altas concentraciones de sales, pH ácido y altos niveles de xenobióticos (Al-Tohamy et al., 2020; Carballo et al., 2012; Giovanella et al., 2019), sumada a su capacidad para remediar cuerpos de agua con colorantes sintéticos azoicos producidos por la industria textil. En este sentido, Bankole et al. (2017) demostraron que levaduras como *Diutina rugosa* puede ser una alternativa económica, eficiente y respetuosa con el ambiente en la remoción de colorantes tipo índigo, logrando una remoción completa (99,97 %) de este colorante (10 mg/L) en 5 días. Adicionalmente, otras levaduras como *Pichia occidentalis* y *Candida tropicalis* han demostrado la capacidad de degradar más del 98 % del colorante Acid Red B (ARB) en 16 h (Song et al., 2017) y de decolorar de manera eficiente (80–90 %) aguas contaminadas con colorantes azoicos en condiciones aeróbicas (Tan et al., 2013; Qu et al., 2012), respectivamente. Asimismo, Aksu y Dönmez (2005) reportaron una cepa de *C. tropicalis* con la capacidad de remover los colorantes Remazol Black B y Remazol Blue (85,8 y 90,3 %, respectivamente) en un período de 15 días.

Teniendo en cuenta la capacidad de remoción de levaduras aisladas de fuentes contaminadas con co-

lorantes, es de esperar que efluentes industriales sean reservorio de levaduras con gran potencial biotecnológico. En este sentido, el objetivo de este trabajo fue aislar y caracterizar levaduras nativas aisladas de aguas residuales contaminadas con colorantes y evaluar su potencial para remover el colorante diazoico Azul Novasyn BLR. El resultado más relevante de este trabajo fue el aislamiento de una cepa de *H. opuntinae* que alcanzó una remoción del colorante superior al 90 % a través de un mecanismo de biosorción, y que soportó concentraciones de hasta 2000 ppm sin efectos inhibitorios en su crecimiento. Estos resultados demuestran que la utilización de levaduras en la recuperación de agua contaminada es un proceso biotecnológico eficiente.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de levaduras nativas

Las levaduras fueron aisladas de cuerpos de agua en 2 lugares cercanos a vertimientos de industrias textiles a lo largo del Valle de Aburrá (6° 19' 44.4" N, 75° 33' 28.8" W; 6° 05' 41.1" N, 75° 38' 14.7" W). Las muestras fueron recolectadas en frascos estériles de 250 ml y llevadas al laboratorio para su procesamiento. Se sembraron 100 µl de cada muestra en medio YM (Glucosa 10 g/L, extracto de levadura 3 g/L, extracto de malta 3 g/L, peptona 5 g/L y agar 20 g/L) suplementado con cloranfenicol (25 ppm) y se incubó a 35 °C durante 72 horas. Posteriormente, se seleccionaron las colonias con características morfológicas macro y microscópicas compatibles con levaduras. Para evaluar la tolerancia de las colonias aisladas al colorante azul Novasyn Luz BLR, se sembraron por agotamiento en agar YM suplementado con el colorante (100 ppm) y se incubaron a 35 °C por 72 horas.

Evaluación de la capacidad de remoción del colorante

Las levaduras con la capacidad de crecer en presencia del colorante fueron evaluadas en caldo YM para determinar su capacidad de remoción. Se determinó el porcentaje de remoción a diferentes concentraciones del colorante (250 y 500 ppm) y a diferentes temperaturas de incubación (25 °C y 35 °C) con

pH de 4,0 y agitación constante (120 rpm) durante 120 horas. Se realizaron controles sin levadura para evaluar factores abióticos asociados a la decoloración y controles sin colorante para evaluar la viabilidad de las levaduras. Posterior a las 120 horas de incubación se tomó 1 ml del cultivo, se centrifugó a 12.000 x g durante 10 minutos, la biomasa fue resuspendida en agua destilada estéril y se midió su absorbancia a 600 nm y la del sobrenadante a 560 nm y se determinó el porcentaje de remoción, calculado a partir de la siguiente fórmula (Bankole et al., 2017):

$$\% \text{decoloración} = \frac{\text{Absorbancia inicial} - \text{Absorbancia final}}{\text{Absorbancia inicial}} * 100$$

Identificación bioquímica y molecular

Para la identificación bioquímica se seleccionaron los aislados con un porcentaje de remoción superior al 90 %. A partir de cultivos de 24 horas, se realizó la identificación bioquímica empleando la galería API® 20 C AUX siguiendo las instrucciones del fabricante (bioMérieux ®). La identificación molecular se realizó por secuenciación de la región ITS 5.8S. La extracción de ADN incluyó la eliminación de la pared celular con la enzima liticasa (Sigma), lisis celular, purificación con fenol:cloroformo y finalmente precipitación con isopropanol. Para la amplificación de la región ITS 5.8S se utilizaron los cebadores ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT GAA TGC-3') (White et al., 1990). El perfil de temperatura de la PCR fue el siguiente: 95 °C durante 10 minutos, seguido de 30 ciclos a 94 °C por 30 s, 53 °C por 30 s, 72 °C por 1 min y finalmente a 72 °C durante 5 minutos. Los productos de PCR fueron purificados y enviados a secuenciar en Macrogen (Corea del Sur). Las secuencias fueron analizadas utilizando la herramienta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Influencia del medio de cultivo en la remoción del colorante

Para evaluar el efecto de la composición del medio de cultivo en el porcentaje de remoción se seleccionó el aislado con el mayor porcentaje de remoción. Se evaluaron diferentes concentraciones de glucosa (2, 6 y 10 g/L), extracto de levadura (0; 0,1 y 0,2



g/L), sulfato de amonio (0; 0,5 y 1 g/L) y del colorante azul Novasyn luz BLR (250, 500 y 750 ppm); además, se evaluaron diferentes pH (3, 5 y 7). Las concentraciones del sulfato de magnesio y el fosfato dipotásico se mantuvieron en 0,5 g/L y 1 g/L, respectivamente. Los cultivos fueron incubados a 35 °C con agitación continua (120 rpm) por 24 horas y se tomaron muestras cada 3 horas. Las muestras fueron centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos, para determinar la concentración de biomasa producida y la concentración residual del colorante. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

Toxicidad del colorante

Para evaluar el efecto inhibitorio del colorante en el crecimiento de la cepa de levadura con mejor desempeño en la remoción del colorante, se incubó en caldo YM con diferentes concentraciones de colorante (500, 1000, 1500, 2000 ppm). Los ensayos fueron realizados a 35 °C en agitación continua (120 rpm) durante 24 horas. Se tomaron muestras al inicio y al final del ensayo. Las muestras fueron centrifugadas a 12000 x g por 10 minutos, para determinar la biomasa producida y la concentración residual del colorante. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado.

Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por duplicado. El diseño experimental para determinar la influencia del medio de cultivo fue superficie de respuesta. El análisis estadístico se llevó a cabo con un análisis

de varianza (ANOVA) de un factor utilizando el Software Design Expert 11.

RESULTADOS

Aislamiento e identificación de levaduras con potencial decolorante

A partir de las muestras de aguas residuales recolectadas en el Área Metropolitana del Valle de Aburrá, se aislaron 22 colonias de levaduras con características morfológicas diferentes, de las cuales se seleccionaron 15 colonias en función de su capacidad de crecer en presencia del colorante Azul Novasyn BLR a una concentración de 100 ppm. La principal característica macroscópica diferencial en los aislados fue la coloración de las colonias, algunas crecieron como colonias blancas sin cambios en el color del medio de cultivo, otras crecieron como colonias violetas con decoloración del medio (figura 1). La identificación bioquímica y molecular de las cepas con mayor porcentaje de remoción (>90 %) evidenció la presencia de *Candida* sp., *Hanseniaspora* sp. y *Pichia* sp. (tabla 1).

Ensayo de remoción del colorante

Las cepas que crecieron en presencia del colorante fueron sometidas a un ensayo de remoción en medio líquido. Se evaluaron diferentes concentraciones del colorante (250 y 500 ppm) a dos temperaturas de incubación (25 °C y 35 °C). La mayoría de las

Tabla 1. Clasificación taxonómica de levaduras aisladas de aguas residuales industriales y porcentaje de remoción de colorante

Aislado	Identificación taxonómica		Porcentaje de remoción a 25 °C		Porcentaje de remoción a 37 °C	
	Bioquímica	ITS 5.8S	250 ppm	500 ppm	250 ppm	500 ppm
4	<i>Candida rugosa</i>	<i>Candida catenulata</i>	100,0	100,0	100,0	98,4
5	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Candida intermedia</i>	47,0	43,7	95,8	99,5
8	<i>Kloeckera</i> spp.	<i>Hanseniaspora opuntinae</i>	91,7	86,6	100,0	99,1
11	<i>Kloeckera</i> spp.	<i>Hanseniaspora opuntinae</i>	98,3	98,1	100,0	99,5
14	<i>Geotrichum klebahnii</i>	<i>Pichia kluyveri</i>	98,8	90,9	98,4	97,7

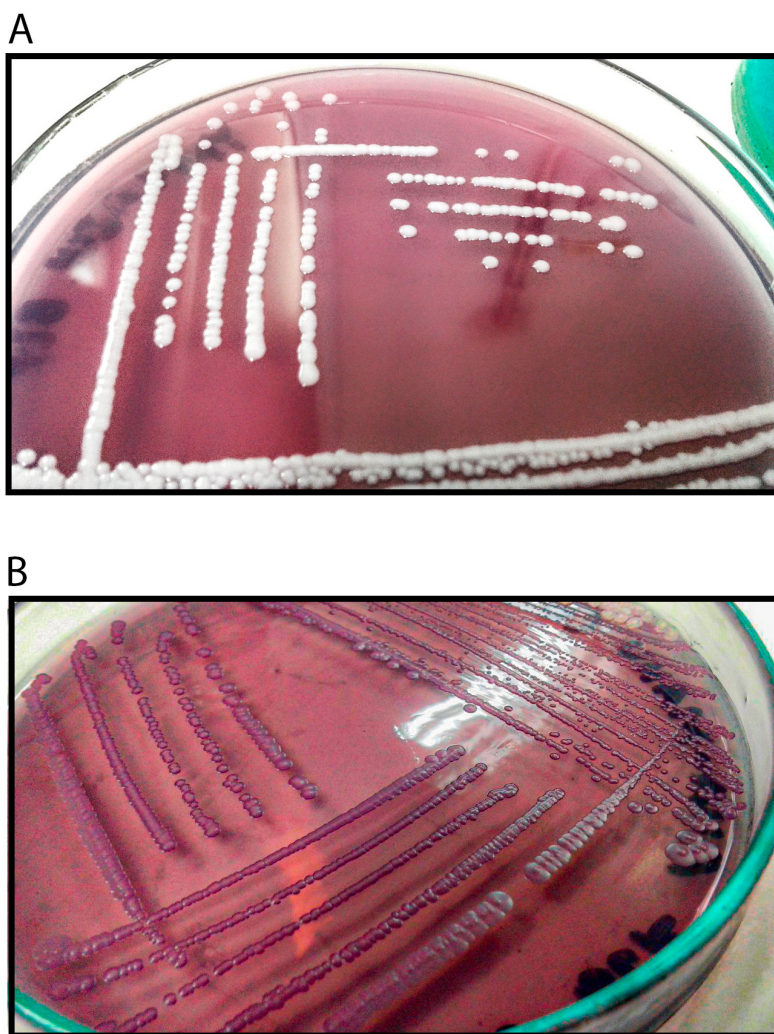


Figura 1. Crecimiento en medio YM + Azul Novasyn Luz BLR de levaduras aisladas de aguas residuales industriales.

colonias aisladas exhibieron porcentajes de remoción similares en las concentraciones del colorante evaluadas, siendo superiores al 60 % a 25 °C y 35 °C (figuras 2A y 2B). Los ensayos realizados a 35 °C exhibieron una mayor remoción del colorante, donde 9 de las 15 colonias evaluadas lograron porcentajes superiores al 90 % y solo dos colonias presentaron mayor remoción a la concentración más baja del colorante; mientras que a 25 °C se obtuvo mayor producción de biomasa (figuras 2C y 2D). Adicionalmente, algunas colonias presentaron un comportamiento contrario en la remoción del colorante, mientras que las colonias 6 y 13 lograron mayor remoción a 500 ppm, las cepas 7

y 15 mostraron mayor remoción a 250 ppm. Sin embargo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la remoción del colorante a 25 y 35 °C ($p > 0,05$).

Influencia del medio de cultivo en la remoción del colorante Azul Novasyn Luz BLR

De acuerdo con el comportamiento exhibido por las levaduras en el ensayo de remoción, se seleccionó el aislado 11 identificado como *Hanseniaspora opuntiae* para evaluar el efecto de la composición del medio de cultivo en la remoción. Se evaluaron diferentes

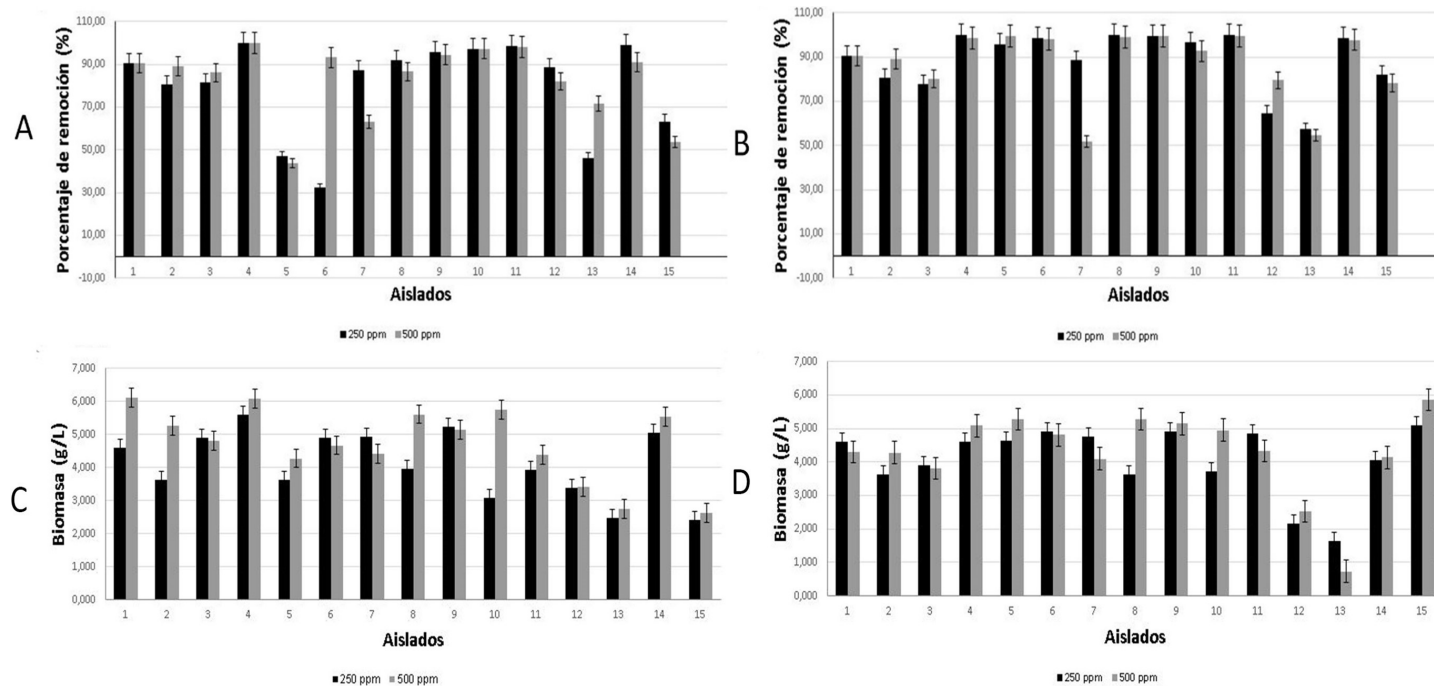


Figura 2. Porcentaje de remoción de colorante a 25 °C (A) y 35 °C (B) y crecimiento de biomasa a 25 °C (C) y 35 °C con 250 y 500 ppm del colorante.

concentraciones de glucosa, extracto de levadura, sulfato de amonio y colorante a diferentes condiciones de pH, observándose que la composición del medio de cultivo no influyó en la remoción del colorante ni en el crecimiento de la levadura y la biomasa no se vio favorecida a mayores concentraciones de glucosa o extracto de levadura ($p > 0,05$) (figura 3A). Sin embargo, la concentración del colorante y el pH fueron los parámetros que influyeron significativamente en la remoción ($p < 0,05$) (figuras 3B y 3C), demostrando que un ambiente ácido en el medio favorece la remoción del colorante a concentraciones bajas del colorante (250 ppm) por *H. opuntiae*.

Ensayo de toxicidad

Para determinar el efecto de la concentración del colorante sobre el crecimiento de *H. opuntiae*, se evaluaron concentraciones entre 500 y 2000 ppm. Los resultados obtenidos confirman que el porcentaje de remoción y la formación de biomasa disminuyen a medida que aumenta la concentración del colorante; sin embargo, en concentraciones hasta 2000 ppm no se observa un efecto inhibitorio sobre el crecimiento

de *H. opuntiae*. Las altas concentraciones del colorante pueden representar una situación de estrés, pero no resultan tóxicas, ni inhiben el crecimiento de *H. opuntiae*.

Ensayo de remoción en aguas residuales

Para realizar el ensayo de remoción del colorante de efluentes textiles, las condiciones de cultivo establecidas fueron: colorante a 250 ppm, temperatura a 35 °C y pH de 3.0 con agitación constante a 120 rpm. Luego de 24 horas de incubación, el porcentaje de remoción fue menor al 30 %. Con respecto a la producción de biomasa se observa que fue menor cuando hay presencia del colorante en el medio (0,1 g/L de biomasa en el medio con colorante, 0,43 g/L de biomasa en el medio sin colorante); aunque en ambas condiciones la producción de biomasa fue mucho menor que la obtenida en el medio de cultivo (3,96 g/L) (figura 4A).

Finalmente, se evaluó el espectro de absorción del sobrenadante del cultivo en el rango de luz visible (400–700 nm). El medio coloreado sin inocular presentó un pico de absorbancia máxima a 560 nm,

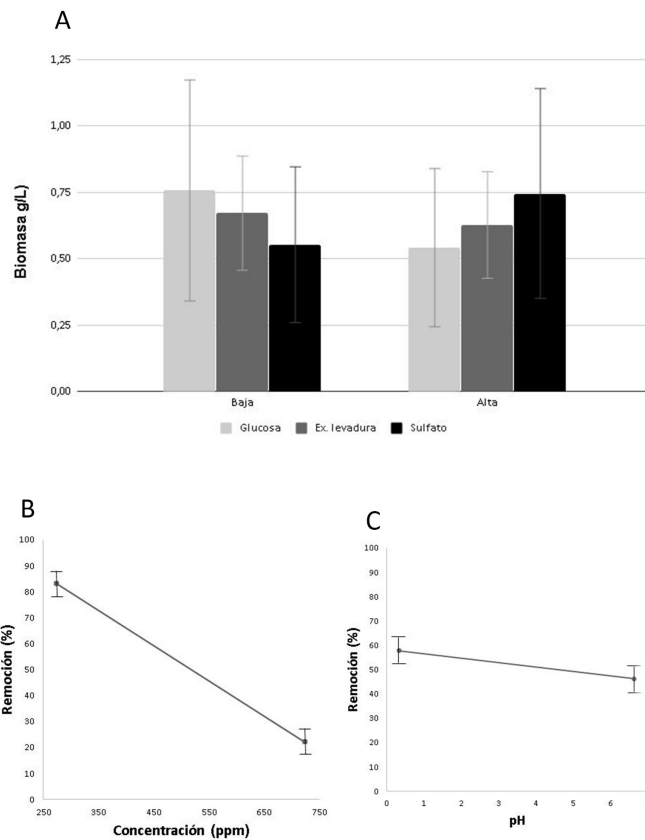


Figura 3. Efecto de la composición del medio de cultivo, la concentración de colorante y el pH en el crecimiento y remoción del colorante por *H. opuntinae*. **A.** Crecimiento de la levadura en medio sintético con glucosa (2, 6 y 10 g/L), extracto de levadura (0; 0,1 y 0,2 g/L) y sulfato de amonio (0; 0,5 y 1 g/L). **B.** Porcentaje de remoción a 250, 500 y 750 ppm del colorante. **C.** Porcentaje de remoción a pH de 3, 5 y 7.

después del tratamiento de 24 horas con *H. opuntinae* se observa una disminución sustancial en la absorbancia del medio indicando decoloración, aunque sin cambios en el pico de absorción ni la aparición de otros picos que sugieran cambios en la estructura química del colorante (figura 4B).

DISCUSIÓN

Los colorantes azoicos son los más utilizados en la industria textil, sin embargo, las aguas residuales coloreadas son de difícil tratamiento por métodos

convencionales y la liberación de estos efluentes al ambiente tiene grandes repercusiones por su naturaleza tóxica, carcinogénica y su bioacumulación a lo largo de la cadena trófica (Sathishkumar et al., 2019). Existen tratamientos físicos y químicos para tratar esta clase de efluentes, pero son costosos o generan compuestos tóxicos, por lo tanto, la decoloración biológica puede ser considerada el método más viable y efectivo para el tratamiento de este tipo de efluentes (Jafari et al., 2013). Aunque se ha estudiado el comportamiento de muchos microorganismos en la remoción de colorantes, las levaduras han sido poco exploradas, pero algunas cepas de *Candida* sp., *De-*

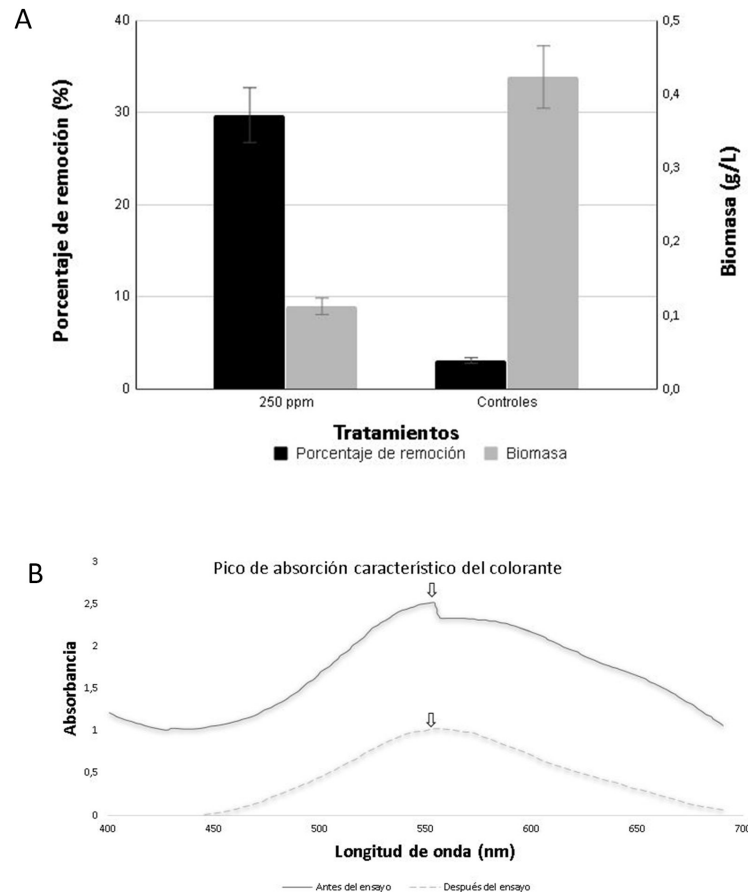


Figura 4. Comportamiento de *H. opuntinae* en aguas residuales contaminadas con colorante. **A.** Crecimiento y porcentaje de remoción de colorante en agua residual. **B.** Espectro del colorante antes y después de la decoloración.

baryomyces sp., *Issatchenkia* sp., y *Magnusiomyces* sp., han sido reportadas como potenciales candidatas para la remoción de colorantes azoicos (Sinha et al., 2018).

En este estudio, la remoción del compuesto Azul Novasyn Luz BLR en el medio YM fue superior al 60% con todas las cepas aisladas de efluentes industriales, demostrando mayor capacidad de decoloración a 35 °C. Se ha reportado la influencia positiva de la temperatura en la remoción debido a que se disminuye la

viscosidad de la solución coloreada, aumentando la velocidad de difusión de las moléculas del colorante a través de la pared celular microbiana, favoreciendo así su remoción (Zhou et al., 2019). Estudios realizados con levaduras como *Scheffersomyces spartinae* y *Pichia kudriavzevii* demostraron una mayor capacidad de decoloración (98–100%) a temperaturas por encima de 30 °C (Tan et al., 2016; Rou et al., 2018), que estaría asociada con la temperatura óptima de crecimiento de las levaduras y el mecanismo de decoloración utilizado (Khan et al., 2012). Los

resultados obtenidos en este estudio no demuestran una relación directa entre la producción de biomasa y la remoción del colorante, donde no se encontraron diferencias significativas en la decoloración en los cultivos crecidos a 25 °C y 35 °C; por lo tanto, el mecanismo empleado por las levaduras aisladas en este estudio puede estar asociado a otros factores.

Las levaduras con una mayor capacidad de remoción del colorante Azul Novasyn Luz BLR, fueron identificadas como *Candida catenulata*, *C. intermedia*, *H. opuntiae* y *Pichia kluyveri*. Múltiples especies de *Candida* sp. han sido reportadas en el tratamiento de aguas residuales de procesos fermentativos (Liu et al., 2019), granjas porcícolas (Martínez y Brillas, 2009) y en la decoloración de efluentes textiles, principalmente por mecanismos de biosorción (Pajot et al., 2014). Algunas especies de *Pichia* sp. han demostrado capacidad para la biodegradación de colorantes azoicos por la producción de enzimas tipo lacasas y la hidroxilación del colorante (Wang et al., 2020). Para los experimentos posteriores se seleccionó la levadura *H. opuntiae* teniendo en cuenta su alto porcentaje de remoción en todas las condiciones evaluadas (25 y 35 °C, 250 y 500 ppm de colorante). Esta levadura se ha reportado principalmente como parte de la microbiota responsable de la fermentación del cacao y en la cofermentación de bebidas alcohólicas como vinos, cervezas y destilados (Figuerola et al., 2019; Gschaedler, 2017). En medio YM crece como células apiculadas o elongadas con gemación bipolar y las colonias son cremosas de coloración blanca a beige.

La producción de biomasa se ha descrito como un factor importante en la capacidad de remoción de colorantes con levaduras y la modificación de factores que influyen en el crecimiento microbiano puede afectar la eficiencia de decoloración (Zabocka y Przysta, 2020). En un estudio realizado con *C. tropicalis* se determinó la relación directa entre el crecimiento de la biomasa y la capacidad de decoloración, necesitando un inóculo del 6 % para lograr una remoción total del 90 % en 24 horas (Tan et al., 2014). Esta asociación pudiera ser más relevante con altas concentraciones de colorante (>100 mg/L) (Chen y Ting, 2015). Sin embargo, en este estudio no se pudo establecer una relación directa entre el crecimiento de biomasa y la remoción del colorante, aún con concentraciones de

colorante hasta 500 ppm.

Al evaluarse el efecto de componentes del medio de cultivo en la producción de biomasa y la remoción del colorante, no se evidenció ningún efecto de las concentraciones evaluadas (glucosa 2–10 g/L; extracto de levadura 0–0,2 g/L; sulfato de amonio 0–1 g/L) sobre la remoción del colorante y la formación de biomasa; resultados que no concuerdan con otros estudios que reportan que la adición de extracto de levadura favoreció la decoloración de *Pichia occidentalis* G1 en un 96 %, relacionado con la promoción del crecimiento celular (Song et al., 2017). Un estudio realizado por Tan et al. (2014), demostró que el exceso de sulfato de amonio no afectó la decoloración, aunque concentraciones de glucosa por encima de 4 g/L disminuyeron considerablemente la capacidad de remoción del colorante azoico Rojo Acido B.

Por otro lado, la concentración de colorante y el pH si tuvieron efecto sobre el porcentaje de remoción por *H. opuntiae*, donde se observó una relación inversamente proporcional entre estas variables y el porcentaje de remoción. El aumento en la concentración del colorante Azul Novasyn Luz BLR resultó en la disminución de la eficiencia de decoloración de la levadura (80 % a 250 ppm y 30 % a 500 ppm), resultados que concuerdan con estudios anteriores en los que concentraciones por encima de 100 mg/L causan efectos negativos sobre la decoloración (Tan et al., 2013; Guo et al., 2019) debido a la saturación de los sitios de sorción en la levadura a medida que aumenta la concentración del colorante. Otros estudios respaldan estos resultados, Aksu (2003) reportó que todas las especies de levadura evaluadas fueron capaces de eliminar más del 90 % del colorante a 100 ppm; sin embargo, por encima de 400 ppm, este porcentaje disminuyó considerablemente debido a que habían alcanzado su capacidad de saturación. La composición de la pared celular puede influir considerablemente en la capacidad de unión al colorante porque los grupos funcionales capaces de unir moléculas de colorante, como los grupos amino, carboxílico, sulfhidrido, fosfato y tiol, difieren en su afinidad y especificidad por la unión del colorante (Volesky y May, 1995; Aksu y Dönmez, 2001; Fu y Wang, 2011). El pH es otro factor crítico en la remoción de colorantes, siendo favorecida en condiciones de pH bajo.



La fuerza de atracción electrostática de la membrana celular biosorbente y el colorante es mucho mayor en condiciones ácidas, resultando en un poder de remoción mucho mayor. Mahmoud (2016), reportó decoloración total cuando el pH de la solución estaba entre 1.0 y 2.0; además, la disminución considerable de la remoción del colorante a medida que el pH aumentaba (70 % de remoción a pH 3.0 y 20 % a pH 6.0). Estos resultados concuerdan con lo encontrado en este estudio, demostrando un efecto significativo del pH en la capacidad de remoción de colorante por levaduras.

Luego de determinar la disminución en la decoloración del colorante Azul Novasyn Luz BLR en altas concentraciones, se evaluó la toxicidad de este compuesto para *H. opuntiae*. Se evaluaron concentraciones hasta 2000 ppm de colorante, evidenciando una disminución de la capacidad de remoción proporcional al aumento en la concentración del colorante (77,5 hasta 24,7 %) (figura 3). Aunque no se encontró una relación directa entre la producción de biomasa y la decoloración, concentraciones más altas del colorante afectaron también la producción de biomasa, aunque sin alcanzar a inhibir por completo el crecimiento de la levadura. La presencia del colorante es detectada por *H. opuntiae* como una condición de estrés y una mayor concentración puede afectar procesos celulares no relacionados con la viabilidad celular. Algunos estudios sugieren que un aumento en la concentración del colorante conlleva a un aumento en la cantidad de tiempo requerido para la remoción del colorante y, por lo tanto, disminuye el potencial de eliminación de color (Surwase et al., 2013).

Una vez comprobada la capacidad de remoción de *H. opuntiae* y su tolerancia a altas concentraciones de colorante, se llevó a cabo un ensayo de decoloración en aguas residuales de un efluente textil en el que se evidenció disminución en el porcentaje de remoción (figura 4A). Las aguas residuales pueden contener sales, metales y otros compuestos para mejorar la adherencia del colorante a las fibras; sin embargo, estos compuestos no son biodegradables y pueden ser tóxicos para el microorganismo (Imran et al., 2014). Cationes como Na^+ , K^+ , Cu^{2+} y Ca^{2+} son los iones más comunes en aguas residuales textiles y la presencia estos iones conduce a una alta fuerza iónica, lo

que puede afectar significativamente el rendimiento de procesos de remoción como el de biosorción, debilitando la atracción electrostática entre la biomasa y el colorante (Yu et al., 2009). Los resultados de este ensayo muestran porcentajes de remoción más bajos que otros estudios, lo que pudiera estar relacionado con diferentes condiciones operacionales, puesto que, Sinha et al. (2018) reportaron remoción de colorante del 65 % en aguas residuales con *Candida* sp. luego de 96 horas de exposición. La inmovilización de las levaduras ofrece una barrera entre el efluente a decolorar y las células, protegiéndolas de los efectos tóxicos de los compuestos presentes en las aguas residuales, alcanzando altos porcentajes de remoción (95 %) entre 48 y 60 horas (Kurade, et al., 2019).

De acuerdo con los espectros UV-VIS del sobrenadante decolorado (figura 4B), el pico de absorbancia del colorante Azul Novasyn Luz BLR disminuye considerablemente luego de 24 horas de contacto con *H. opuntiae*, sin observar la aparición de nuevos picos asociados con la degradación del anillo azoico. La disminución del pico de absorción del colorante sin pigmentación de la biomasa sugiere que el mecanismo de decoloración es por biodegradación (Song, et al., 2017). Sin embargo, se hace necesario el análisis de los sobrenadantes con técnicas cuantitativas como HPLC-MS y FT-IR para determinar la degradación del colorante.

Las principales enzimas involucradas en la biodegradación de colorantes azoicos son azoreductasas y enzimas ligninolíticas tipo lacasas y peroxidasas. Diversos estudios han evaluado la actividad enzimática bajo diferentes condiciones, demostrando que no existe una única ruta de degradación de los colorantes y resalta la importancia del aislamiento y caracterización de nuevas cepas fúngicas (Guo, et al., 2019).

Como conclusión, los nichos contaminados como las aguas residuales son una fuente importante de microorganismos con características biotecnológicas superiores que contribuyen en los procesos de biorremediación, seleccionando poblaciones con la capacidad de soportar y remover los agentes contaminantes del medio. En este estudio se logró aislar una levadura capaz de degradar el colorante Azul Novasyn Luz

BLR en 24 horas, que fue identificada como *H. opuntiae*. Aunque esta levadura no ha sido reportada en la decoloración de compuestos empleados en la industria textil, demostró una gran capacidad de remoción y alta tolerancia a grandes concentraciones del colorante en medio sintético. Los resultados de este estudio demuestran la complejidad del procesos fisiológicos asociados a la remoción de colorantes, que involucran no solo la concentración del compuesto sino otros factores como la temperatura y el pH del medio, además de otros factores presentes en las aguas residuales que no pudieron ser identificados. Por lo tanto, son necesarios más estudios para identificar el mecanismo específico de degradación y las enzimas involucradas en este proceso para optimizar su desempeño en efluentes textiles.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen el apoyo financiero otorgado por la Escuela de Microbiología de la Universidad de Antioquia y al grupo de investigación Biotransformación de la Universidad de Antioquia por su apoyo y discusiones enriquecedoras.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Aksu, Z. (2003). Reactive dye bioaccumulation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochemistry*, 38(10), 1437–1444. DOI:10.1016/s0032-9592(03)00034-7
- Aksu, Z., & Dönmez, G. (2001). Comparison of copper (II) biosorptive properties of live and treated *Candida* sp. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 36(3), 367–381. DOI:10.1081/ese-100102928
- Aksu, Z., & Dönmez, G. (2005). Combined effects of molasses sucrose and reactive dye on the growth and dye bioaccumulation properties of *Candida tropicalis*. *Process Biochemistry*, 40(7), 2443–2454. DOI:10.1016/j.procbio.2004.09.013
- Al-Tohamy, R., Kenawy, E. -R., Sun, J., & Ali, S. S. (2020). Performance of a Newly Isolated Salt-Tolerant Yeast Strain *Sterigmatomyces halophilus* SSA-1575 for Azo Dye Decolorization and Detoxification. *Frontiers in Microbiology*, 11, 1163. DOI:10.3389/fmicb.2020.01163
- Bankole, P. O., Adekunle, A. A., Obidi, O. F., Olukan- ni, O. D., & Govindwar, S. P. (2017). Degradation of indigo dye by a newly isolated yeast *Diutina rugosa* from dye wastewater polluted soil. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5(5), 4639–4648. DOI:10.1016/j.jece.2017.08.050
- Barreda, K. L., Ortega, J., Ortega, A. E., Santiago, L. A., & Netzahuatl, A. R. (2015). Remoción de azul brillante de remazol R de soluciones acuosas empleando biomasa de levadura. *Revista Cubana de Química*, 27(2), 182–196.
- Carballo, M. E., Martínez, A., Salgado, I., Maldener, I., Alvarez, M., Boza, A., & Arias, M. C. (2012). Capacidad de captura de cadmio y cinc por bacterias, microalgas y levaduras. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 1(1), 34–43.
- Chen, S. H., & Ting, A. S. (2015). Biodecolorization and biodegradation potential of recalcitrant triphenylmethane dyes by *Corioloropsis* sp. isolated from compost. *Journal of Environmental Management*, 150, 274–280. DOI:10.1016/j.jenvman.2014.09.014
- Chequer, F. M., Angeli, J. P., Ferraz, E. R., Tsuboy, M. S., Marcarini, J. C., Mantovani, M. S., & de Oliveira, D. P. (2009). The azo dyes Disperse Red 1 and Disperse Orange 1 increase the micronuclei frequencies in human lymphocytes and in HepG2 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 676(1–2), 83–86. DOI:10.1016/j.mrgentox.2009.04.004
- Figuroa, C., Mota, J., Ferrocino, I., Hernández, Z., González, O., Cocolin, L., & Suárez, M. L. (2019). The challenges and perspectives of the selection of starter cultures for fermented cocoa beans. *International Journal of Food Microbiology*, 301, 41–50. DOI:10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.002
- Fu, F., & Wang, Q. (2011). Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. *Journal of Environmental Management*, 92(3), 407–418. DOI:10.1016/j.jenvman.2010.11.011
- Giovanella, P., Vieira, G. A. L., Ramos Otero, I. V., Pellizzer, E., de Jesus Fontes, B., & Sette, L. D. (2019). Metal and organic pollutants bioremediation by extremophile microorganisms. *Journal of Hazardous Materials*, 382, 121024. DOI:10.1016/j.jhazmat.2019.121024
- Gomi, N., Yoshida, S., Matsumoto, K., Okudomi, M., Konno, H., Hisabori, T., & Sugano, Y. (2011). Degradation of the synthetic dye amaranth by the fungus *Bjerkandera adusta* Dec 1: inference of the degradation pathway from an analysis of decolorized products. *Biodegradation*, 22(6), 1239–1245. DOI:
- Gschaedler, A. (2017). Contribution of non-conventional yeasts in alcoholic beverages. *Current Opinion in Food Science*, 13, 73–77. DOI:
- Guo, G., Tian, F., Zhao, Y., Tang, M., Liu, w., Liu, C., Xue, S., Kong, W., Sun, Y., & Wang, S. (2019). Aerobic decolorization and detoxification of Acid Scarlet GR by a newly isolated salt-tolerant yeast strain *Galactomyces geotrichum* GG. *International Biodeterioration Biodegradation*, 145, 104818. DOI:10.1016/j.ibiod.2019.104818
- Imran, M., Crowley, D. E., Khalid, A., Hussain, S., Mumtaz, M. W., & Arshad, M. (2014). Microbial biotechnology for decolorization of textile wastewaters. *Reviews in En-*

- Environmental Science and Bio/Technology*, 14(1), 73–92. DOI:10.1007/s11157-014-9344-4
- Jafari, N., Kasra-Kermanshahi, R., & Souidi, M. R. (2013). Screening, identification and optimization of a yeast strain, *Candida palmiophila* JKS4, capable of azo dye decolorization. *Iranian journal of microbiology*, 5(4), 434–440.
- Joshi, M. (2004). Colour removal from textile effluents. *Indian Journal of Fibre and Textile Research*, 29(2), 239–259.
- Khan, R., Bhawana, P., & Fulekar, M. H. (2012). Microbial decolorization and degradation of synthetic dyes: a review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 12(1), 75–97. DOI:10.1007/s11157-012-9287-6
- Kurade, M. B., Waghmode, T. R., Xiong, J. -Q., Govindwar, S. P., & Jeon, B.-H. (2019). Decolorization of textile industry effluent using immobilized consortium cells in upflow fixed bed reactor. *Journal of Cleaner Production*, 213, 884–891. DOI:10.1016/j.jclepro.2018.12.218
- Liu, J., Shi, P., Ahmad, S., Yin, C., Liu, X., Liu, Y., Zhang, H., Xu, Q., Yan, H., & Li, Q. (2019). Co-culture of *Bacillus coagulans* and *Candida utilis* efficiently treats *Lactobacillus* fermentation wastewater. *AMB Express*, 9(1), 15. DOI:10.1186/s13568-019-0743-3
- Mahmoud, M. S. (2016). Decolorization of certain reactive dye from aqueous solution using Bakers Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) strain. *HBRC Journal*, 12(1), 88–98. DOI:10.1016/j.hbrj.2014.07.005
- Martínez, C. A. & Brillas, E. (2009). Descontaminación de aguas residuales que contienen colorantes orgánicos sintéticos por métodos electroquímicos: una revisión general. *Catálisis aplicada B: Ambiental*, 87(3–4), 105–145.
- Pajot, H. F., Martorell, M. M., & de Figueroa, L. I. (2014). Ecology of Dye Decolorizing Yeasts. *Bioremediation in Latin America* (223–240). Springer, Cham. DOI:10.1007/978-3-319-05738-5_14
- Pazarlioglu, N. K., Urek, R. O., & Ergun, F. (2005). Biodecolorization of Direct Blue 15 by immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochemistry*, 40(5), 1923–1929. DOI:10.1016/j.procbio.2004.07.005
- Posada, M. L., & Pulido, J. A. (2011). *Evaluación de la degradación de un colorante directo utilizado en la industria textil usando la tecnología de oxidación fotocatalítica heterogénea*. [Tesis de Pregrado] Universidad de La Salle, Bogotá. https://ciencia.lasalle.edu.co/ing_ambiental_sanitaria/502
- Qu, Y., Cao, X., Ma, Q., Shi, S., Tan, L., Li, X., & Zhou, J. (2012). Aerobic decolorization and degradation of Acid Red B by a newly isolated *Pichia* sp. TCL. *Journal of Hazardous Materials*, 223–224, 31–38. DOI:10.1016/j.jhazmat.2012.04.034
- Roşu, C. M., Vochia, G., Miha, M., Avdanei, M., Miha, C. T., & Gherghel, D. (2018). Performances of *Pichia kudriavzevii* in decolorization, biodegradation, and detoxification of C.I. Basic Blue 41 under optimized cultural conditions. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 431–445. DOI:10.1007/s11356-018-3651-1
- Saratale, R. G., Saratale, G. D., Chang, J. S., & Govindwar, S. P. (2009). Ecofriendly degradation of sulfonated diazo dye C.I. Reactive Green 19A using *Micrococcus glutamicus* NCIM-2168. *Bioresource Technology*, 100(17), 3897–3905. DOI:10.1016/j.biortech.2009.03.051
- Saratale, R. G., Saratale, G. D., Chang, J. S., & Govindwar, S. P. (2011). Bacterial decolorization and degradation of azo dyes: A review. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 42(1), 138–157. DOI:10.1016/j.jtice.2010.06.006
- Sarmiento, M. D. (2017). *Construcción y optimización de soportes bioactivos sostenibles para la degradación de colorantes*. [Tesis de pregrado] Universidad Miguel Hernández, Elche, España. <http://dspace.umh.es/handle/11000/3545?mode=full>
- Sathishkumar, K., AlSalhi, M. S., Sanganyado, E., Devanesan, S., Arulprakash, A., & Rajasekar, A. (2019). Sequential electrochemical oxidation and bio-treatment of the azo dye Congo red and textile effluent. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 200, 111655. DOI:10.1016/j.jphotobiol.2019.111655
- Sinha, A., Lulu, S., Vino, S., Banerjee, S., Acharjee, S., & Osborne, W. J. (2018). Degradation of reactive green dye and textile effluent by *Candida* sp. VITJASS isolated from wetland paddy rhizosphere soil. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(4), 5150–5159. DOI:10.1016/j.jece.2018.08.004
- Song, L., Shao, Y., Ning, S., & Tan, L. (2017). Performance of a newly isolated salt-tolerant yeast strain *Pichia occidentalis* G1 for degrading and detoxifying azo dyes. *Bioresource Technology*, 233, 21–29. DOI:10.1016/j.biortech.2017.02.065
- Surwase, S. V., Deshpande, K. K., Phugare, S. S., & Jadhav J. P. (2013). Biotransformation studies of textile dye Remazol Orange 3R. *3 Biotech*, 3(4): 267–275. DOI: 10.1007/s13205-012-0093-1.
- Tan, L., Ning, S., Zhang, X., & Shi, S. (2013). Aerobic decolorization and degradation of azo dyes by growing cells of a newly isolated yeast *Candida tropicalis* TL-F1. *Bioresource Technology*, 138, 307–313. DOI:10.1016/j.biortech.2013.03.183
- Tan, L., Li, H., Ning, S., & Xu, B. (2014). Aerobic decolorization and degradation of azo dyes by suspended growing cells and immobilized cells of a newly isolated yeast *Magnusiomyces ingens* LH-F1. *Bioresource Technology*, 158, 321–328. DOI:10.1016/j.biortech.2014.02.063
- Tan, L., He, M., Song, L., Fu, X., & Shi, S. (2016). Aerobic decolorization, degradation and detoxification of azo dyes by a newly isolated salt-tolerant yeast *Scheffersomyces spartinae* TLHS-SF1. *Bioresources Technologies*, 203, 287–294. DOI:10.1016/j.biortech.2015.12.058.
- Volesky, B., & May-Phillips, H. A. (1995). Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 42(5), 797–806. DOI:10.1007/BF00171964
- Wang, X., Wang, Y., Ning, S., Shi, S., & Tan L. (2020). Improving azo dye decolorization performance and halotolerance of *Pichia occidentalis* A2 by static magnetic field and possible mechanisms through comparative transcriptome analysis. *Frontiers in Microbiology*, 11, 712. DOI:10.3389/fmicb.2020.00712.7/bf00171964
- Yu, J. -X., Li, B. -H., Sun, X. -M., Yuan, J., & Chi, R. (2009). Polymer modified biomass of bakers yeast for enhancement adsorption of methylene blue, rhodamine



- B and basic magenta. *Journal of Hazardous Materials*, (2-3), 1147–1154. DOI:10.1016/j.jhazmat.2009.02.144
- Zabłocka, E., & Przysaś, W. (2020). Fed-Batch Decolourization of Mixture of Brilliant Green and Evans Blue by Bacteria Species Applied as Pure and Mixed Cultures: Influence of Growth Conditions. *Water, Air, Soil Pollution*, 231(2). DOI:10.1007/s11270-020-4441-1
- Zhou, Y., Lu, J., Zhou, Y., & Liu, Y. (2019). Recent advances for dyes removal using novel adsorbents: A review. *Environmental Pollution*, 252, 352–365. DOI:10.1016/j.envpol.2019.05.072
- Zuleta, A. (2013). *Evaluación del proceso de degradación de un colorante sintético tipo azo mediante un sistema de fermentación en estado sólido*. [Tesis de doctorado] Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/20933>