

Evaluación de la capacidad degradadora de taninos por microorganismos aislados a partir de un efluente de curtiembre del municipio de Copacabana, Antioquia

Evaluation of capacity of tannin degradation with microorganisms isolated from a tannery effluent in Copacabana, Antioquia

María A. Palacio-Arango^{1*}, Isabel C. Cano-Vanegas¹, Luisa M. Múnera-Porras¹, Nancy J. Pino-Rodríguez¹, Gustavo A. Peñuela-Mesa¹

Resumen

Los taninos son el segundo grupo de compuestos fenólicos de las plantas más abundantes en la naturaleza y son usados como materia prima en diversos procesos industriales, entre los cuales el más representativo es el teñido del cuero animal. El ácido tánico, un tanino hidrolizable utilizado en éste proceso, puede degradarse por vía biológica, mediante hidrólisis enzimática por la tanasa (EC 3.1.1.20). Para evaluar la capacidad degradadora de taninos y sus condiciones óptimas utilizando microorganismos aislados del proceso de curtiembre, se siguieron técnicas de enriquecimiento y siembra directa en placa, logrando el aislamiento de microorganismos tanino-resistentes, sometidos posteriormente a ensayos de concentración mínima inhibitoria (CMI) llegando hasta 0,4% v/v de ácido tánico. Finalmente, se identificó molecularmente a *Bacillus licheniformis* como la cepa con mayor capacidad degradadora a pH 7, 35 °C y 90 r. p. m.

Palabras claves: ácido tánico, *Bacillus licheniformis*, curtiembres, biodegradación, tanasa, taninos

Abstract

Tannins are the phenolic compounds most abundant in nature, used as raw material in several industrial processes like tanning leather. Tannic acid is a hydrolyzable tannin used in tannery, which can be degraded by a biological enzymatic hydrolysis using tannase. To evaluate the capacity and optimal conditions of tannin degradation using microorganisms isolated from a tannery, we used an enrichment technique and plate culture. We obtained the isolation of tannin-resistant bacteria, that were subjected to minimum inhibitory concentration tests (MIC), retaining 0,4% v/v tannic acid. Finally, *Bacillus licheniformis* was identified as the bacteria with the major capacity of degradation in growth conditions of pH 7, 35 °C and 90 r. p. m.

Key words: tannic acid, *Bacillus licheniformis*, tannery, biodegradation, tannase, tannins

INTRODUCCIÓN

Las plantas poseen diferentes mecanismos de defensa contra insectos, entre los que se encuentra la producción de compuestos químicos secundarios de naturaleza fenólica (Junnian et al. 2007). Entre éstos compuestos se encuentran los taninos, caracterizados por ser el segundo grupo de compuestos fenólicos de las plantas más abundantes en la naturaleza (Pepi et al. 2010) y por ser también altamente tóxicos (Collazos y Ospina 2007, Orlowski et al. 2016, Traw y Gift 2010). Según van-Agteren et al. (2013),

los taninos se clasifican, de acuerdo con su diversidad estructural basada en sus características y propiedades químicas, en taninos hidrolizables, condensados y florotaninos. Los hidrolizables a su vez se dividen en elagitaninos y galotaninos; éste último grupo incluye el ácido tánico (C₇₆H₅₂O₄₆), con propiedades astringentes y antioxidantes y compuesto por glucosa y ácidos fenólicos (NCBI 2017).

El ácido tánico se obtiene de forma natural o por síntesis química (Escárcega 2001), y se usa en los sectores

¹. Grupo de Control y Diagnóstico de la Contaminación (GDCON; SIU-UdeA), Facultad de Ingeniería y Escuela de Microbiología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

* Autor para correspondencia: <maria.palacioa@udea.edu.co>

Recibido: octubre de 2017; aceptado: mayo de 2018.

farmacéutico y alimenticio como aditivo, y en la industria de curtiembres, como intermediario en la tinción del cuero mediante su unión con las proteínas de la piel animal (Kalyanaraman et al. 2015). Las curtiembres usan grandes cantidades de taninos, lo que representa un aumento en la demanda bioquímica de oxígeno (DBO), la demanda química de oxígeno (DQO) y los sólidos disueltos totales (SDT) en sus aguas residuales, que a su vez contienen álcalis, sales cloradas, sulfitos, solventes y colorantes (Kumari et al. 2016, Mosca et al. 2017, Shakir et al. 2012).

Los taninos son tóxicos y difíciles de remover por procesos convencionales de lodos activados (Kumari et al. 2016, Wang et al. 2014). Se ha demostrado que las pieles sólo absorben el 20% de los compuestos usados en el proceso de curtiembres, incluyendo los taninos, mientras lo restante es descartado directamente a los cuerpos de agua, en muchos casos sin tratamiento previo (Rabelo et al. 2016). Al concentrarse en el suelo o en el agua pueden afectar las poblaciones microbianas, retrasar los procesos biológicos de transformación de la materia orgánica y la interacción entre microorganismos y plantas. Dado que se concentran en los cuerpos de agua, su consumo puede provocar alteraciones digestivas en los humanos (Olivas-Aguirre et al. 2014). A nivel mundial no existen normas que establezcan los límites permisibles específicos para los taninos en vertimientos de industrias de curtiembres, únicamente se establecen para los compuestos polifenólicos; en Colombia, la resolución 0631 de 2015 (MADS 2015) presenta la regulación para los fenoles, más no para los taninos, de forma individual. Mantilla-Morales (2014) comparó la normatividad internacional en aguas residuales, incluyendo países como: México, Chile, Costa Rica, Guatemala, Nicaragua, Venezuela, Estados Unidos, Taiwán y países de la Comunidad Europea. En dicha comparación se evidencia que únicamente Chile, Costa Rica, Nicaragua, Venezuela y Taiwán contemplan, en alguna de sus normas, el criterio denominado "Fenoles Totales (mg/L)"; el criterio "Fenoles y Cresoles (mg/L)" solamente es incluido por Costa Rica para vertimientos al alcantarillado. Aunque los taninos pertenecen a estos grupos y por sus características de toxicidad deberían ser regulados de manera individual, no obstante, claramente a nivel mundial, así como en Colombia, la falencia se mantiene siendo necesario no sólo la reforma de las normas sino los controles y vías de degradación para éstos compuestos.

Rodríguez et al. (2010), determinaron que uno de los mecanismos de degradación de taninos más importantes y más estudiados en Latinoamérica es la degradación

por vía enzimática usando tanasa (tanino acilhidrolasa EC 3.1.1.20). La tanasa es una enzima hidrolasa con dos actividades: ácido gálico esterasa (actúa sobre los enlaces éster) y depsidasa (actúa sobre los enlaces dépsidos); esto le permite degradar los taninos hidrolizables como el ácido tánico en ácido gálico y una molécula de glucosa (Raghuwanshi et al. 2011). Aunque la tanasa también puede obtenerse de plantas y animales, la fuente más importante es la vía microbiana, ya que la enzima producida es más estable que la obtenida por vías sintéticas (Govindarajan et al. 2016).

Dependiendo del microorganismo y las condiciones como pH y temperatura (las cuales tienen efecto en la actividad y la estabilidad enzimática), la tanasa puede expresarse de forma constitutiva o inducida; la inducción por el ácido tánico promueve la expresión de esta enzima en los microorganismos considerados taninos-resistentes (Costa et al. 2008, Rodríguez et al. 2010).

Los géneros de bacterias como *Bacillus*, *Citrobacter*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Microbacterium*, *Pantoea*, *Pediococcus*, *Pseudomonas*, *Selenomonas*, *Serratia*, *Staphylococcus* y *Weissella*, se catalogan como tanino-resistentes, capaces de usar el ácido tánico como fuente de carbono (Aguilar-Zárate et al. 2014, Pepi et al. 2010). Así mismo, las especies de hongos *Aspergillus flavus*, *A. japonicus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *Fusarium* sp. y *Penicillium* sp., también han presentado esta característica (Raghuwanshi et al. 2011). Los porcentajes de degradación registrados por estos géneros demuestran la capacidad biodegradadora de taninos en un tiempo de 24 a 48 h, logrando degradar el ácido tánico en más de un 90% (Rodríguez et al. 2010).

Considerando que la vía enzimática para la biodegradación de taninos es una vía rápida y económica comparada con otros procesos de síntesis química (Raghuwanshi et al. 2011) y que las curtiembres son industrias muy contaminantes se estableció, como objetivo, evaluar la capacidad degradadora de taninos utilizando microorganismos aislados a partir de un efluente de curtiembre del municipio de Copacabana-Antioquia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y caracterización de la muestra. Se realizó un muestreo puntual, por duplicado, de las aguas residuales de los procesos de curtido y teñido de una empresa de curtiembres ubicada en el municipio de Copacabana-

Antioquia, siguiendo los procedimientos APHA (Rice et al. 2012). Durante el muestreo se determinaron los parámetros fisicoquímicos *in situ*: pH, temperatura y oxígeno disuelto, y *ex situ*: nitratos, ortofosfatos y DQO. Para el análisis microbiológico se tomaron tres muestras de 200 mL en frascos de vidrio tapa roscas estériles, las cuales se transportaron a 4 °C hasta el laboratorio para su procesamiento en menos de 24 h.

Aislamiento de microorganismos heterótrofos a partir de las muestras de teñido y curtido. Para comprobar la presencia de microorganismos heterótrofos en las muestras recolectadas se realizó una siembra directa y diluciones hasta 10^{-2} de las muestras de agua, de los procesos de curtido y teñido, en medio de cultivo Agar Trypticase Soya (TSA) (Merck and CO., Inc., USA). Los cultivos fueron incubados a 35 °C durante 24 h. Posterior a éste tiempo de incubación se verificó su crecimiento y viabilidad celular mediante repique de colonias en Agar Nutritivo (Merck and CO., Inc., USA).

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de ácido tánico. El ensayo se realizó en medio mínimo M9, para el cual se preparó una solución de sales estéril (64 g/L de Na_2HPO_4 (Sharlau S.L), 15 g/L KH_2PO_4 (Sharlau S.L), 2,5 g/L NaCl (Merck and CO., Inc., USA) y 5,0 g/L NH_4Cl (Sharlau S.L) en agua destilada); en 700 mL de agua destilada estéril se adicionaron 200 mL de ésta solución de sales, 2 mL de MgSO_4 1M (Merck and CO., Inc., USA) y 100 uL de CaCl_2 1M (Merck and CO., Inc., USA), y se aforó hasta 1 L con agua destilada estéril. Este medio fue suplementado con ácido tánico (Sigma Aldrich, USA) al 0,1% v/v e inoculado con 10% v/v de muestra (teñido y curtido), en un volumen final de 200 mL; después de 48 h de incubación a 35 °C y 90 r. p. m., se sembró 0,1 uL del cultivo por superficie en TSA. Para la siguiente concentración (0,2% v/v) se tomó como inóculo el cultivo anterior al 0,1% v/v y se incubó en las mismas condiciones para finalmente hacer la siembra en TSA. En cada pase se repitió el procedimiento descrito anteriormente hasta llegar a 0,4% v/v de ácido tánico (CMI alcanzada). Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Las colonias obtenidas se caracterizaron macroscópica y microscópicamente por tinción de Gram y pruebas bioquímicas de citrato, TSI, urea, LIA y SIM.

Las colonias seleccionadas se observaron en todos los pases a medida que la concentración de ácido tánico aumentó, teniendo en cuenta además su presencia en el aislamiento inicial de la muestra.

Degradación de ácido tánico por los microorganismos aislados. Con el fin de evaluar el porcentaje de degradación de ácido tánico por cada una de las cepas seleccionadas, los aislados se incubaron a 35 °C y 90 r. p. m. durante 48 h, en medio M9 suplementado con 0,4% v/v de ácido tánico, con pH final de 7. La concentración del inóculo en el cultivo se ajustó a 1 de densidad óptica en un espectrofotómetro (Thermo UV Vis Evolution 300, USA) a 600 nm. Un tratamiento sin inocular sirvió como control de la degradación no biológica. La concentración residual de ácido tánico se determinó por espectrofotometría a 276 nm, con previa realización de la curva de calibración.

Degradación de ácido tánico y variación de las condiciones fisicoquímicas de cultivo. Para evaluar el porcentaje de degradación de ácido tánico bajo diferentes condiciones de incubación, la cepa más eficiente se incubó en el medio de cultivo anteriormente descrito, variando las condiciones fisicoquímicas de temperatura, agitación y pH. Una temperatura de 35 °C, pH 7 y agitación de 90 r. p. m. fueron consideradas como condiciones estándar por ser las mantenidas durante el proceso industrial. Así, sólo se evaluó el efecto del cambio de una variable a la vez, manteniendo las otras dos variables constantes (tabla 1). Finalmente, el ácido tánico residual se cuantificó nuevamente por espectrofotometría a 276 nm.

Tabla 1. Tratamientos aplicados con variación de las condiciones fisicoquímicas definidas: pH, temperatura y agitación. Ensayo realizado con el microorganismo más eficiente en la degradación de ácido tánico

Tratamiento	Condiciones fisicoquímicas		
	pH (unidades de pH)	Temperatura (°C)	Agitación (rpm)
1	7	25	90
2	7	35	90
3	7	45	90
4	4	35	90
5	7	35	40
6	7	35	0

Identificación molecular del microorganismo más eficiente en la degradación de ácido tánico. La extracción de ADN bacteriano se realizó con el kit comercial GeneJET Tissue DNA (Thermo Scientific, USA) siguiendo las

instrucciones del fabricante. El ADN se cuantificó en un NanoDrop™ 2000 UV – Vis (Thermo Scientific, USA). La amplificación del gen 16S rRNA se realizó con los primers 27f y 1492r. El kit Taq DNA polymerase (Thermo Scientific #EP0402) fue usado para la PCR (TM100 Bio-Rad, USA). Cada reacción, con un volumen final de 25 µL, contenía: 2,5 µL de Taq Buffer 10X, 1,5 µL de MgCl₂ 25 mM, 0,5 µL de dNTPs (concentración final 1,25 mM), 0,5 µL de cada primer (concentración final 0,2 µM), 0,1 µL de Taq polimerasa (0,5 U/25 µL de reacción), 2 µL de ADN (~150 ng). Las condiciones de la PCR fueron: una desnaturalización inicial 3 min a 94 °C, 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 1 min a 49,5 °C y 1 min a 72 °C, y una extensión final de 5 min a 72 °C. El tamaño del fragmento se observó en gel de agarosa al 1,2% en buffer TBE (90 mM Tris-borato, 1 mM EDTA, pH 8,0), teñido con EZ-vision® in gel solution (Amresco®, USA) y visualizado en un fotodocumentador (Labnet, Enduro TM GDS).

Los productos de PCR se enviaron para su secuenciación a Macrogen (Corea del Sur). El resultado se editó en el programa libre BioEdit v7.2.5, y la secuencia consenso se comparó con otras secuencias en GenBank usando BLAST.

Análisis estadístico. Para conocer el tratamiento que más favoreció la degradación de ácido tánico por parte de la cepa seleccionada se realizó un ANOVA, dado el cumplimiento de los supuestos de normalidad, independencia y homogeneidad de varianzas. El análisis se hizo en el programa estadístico *Statistical Package for the Social Sciences* para Windows, software SPSS-IBM versión 24 ®. En todos los análisis se consideró una significancia estadística de 0,05.

RESULTADOS

La caracterización fisicoquímica de las muestras de curtido y teñido se muestra en la tabla 2. Se observó que la muestra proveniente del proceso de teñido presentó mayor concentración de nitratos, fosfatos y DQO, indicando que contiene una mayor concentración de materia orgánica respecto a la muestra del proceso de curtido. Para los parámetros *in situ* el valor de pH estuvo muy cercano entre ambas muestras, 3,55 y 3,69 para curtido y teñido respectivamente; mientras que para las variables temperatura y oxígeno disuelto los valores fueron iguales en ambas muestras.

El ensayo de CMI y siembra directa en placa de las muestras de curtido y teñido fueron la base para la selección

Tabla 2. Caracterización fisicoquímica de las muestras recolectadas del proceso de curtido y teñido

Parámetro	Muestra	
	Curtido	Teñido
Nitratos (mg NO ₃ /L)	9,95	23,6
Fosfatos (mg PO ₄ /L)	0,25	7,900
DQO (mg O ₂ /L)	8,88x10 ³	2,03x10 ⁴
pH (unidades de pH)	3,55	3,69
Temperatura (°C)	40,0	40,0
Oxígeno disuelto (mg O ₂ /L)	5,79	5,79

de tres cepas de trabajo nombradas inicialmente como AT1, AT2 y AT3. La CMI de AT1, AT2 y AT3 fue 0,4% v/v de ácido tánico. A concentraciones de ácido tánico mayores no se observó crecimiento.

En la evaluación de los porcentajes de degradación de las cepas se comprobó que AT1 fue capaz de degradar el 48,19% del ácido tánico presente en el cultivo, mientras que AT2 y AT3 degradaron el 37,16% y el 47,70% respectivamente.

Como mecanismos de verificación de la degradación se consideró que ésta puede ser por vías biológicas o no biológicas. Por lo tanto, durante toda la fase experimental se mantuvieron controles positivos y negativos, a los cuales se les midió siempre la absorbancia al principio y al final de cada ensayo, con el fin de obtener un valor neto de degradación posterior a la comparación y restarlo del valor de la absorbancia obtenida con los cultivos inoculados.

Al evaluar las diferentes condiciones de incubación para AT1, mediante los seis tratamientos, se evidenció que en cuatro de estos se obtuvieron porcentajes de biodegradación superiores al 30%, mientras que dos estuvieron por debajo de éste valor. Los tratamientos 1, 2, 3 y 5 arrojaron medidas de tendencia central de ácido tánico residual en porcentajes de 33,61%, 44,93%, 35,10% y 35,12% respectivamente, mientras que el tratamiento 4, un 27,09% y el tratamiento 6 un 26,29%. En la figura 1 se observa el gráfico de error obtenido a partir del cálculo de las medias y de la desviación estándar, con un intervalo de confianza del 95%.

La cepa AT1 fue identificada con un 97% de identidad como *Bacillus licheniformis*, lo cual también coincide con

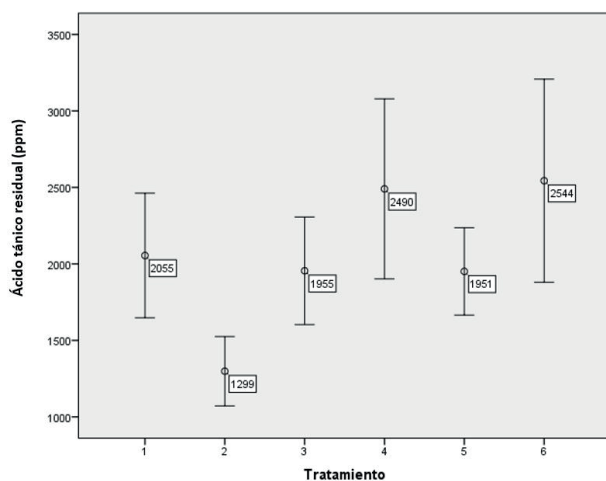


Figura 1. Gráfico de error para la determinación de diferencias significativas entre los tratamientos de pH, temperatura y agitación. (VP Levene: 0,545; VP prueba de independencia: 0,08; VP ANOVA: 0,00002).

la caracterización morfológica, bioquímica y microscópica realizada antes de la secuenciación, en donde se determinó que es una bacteria Gram positiva, anaerobia facultativa, con forma de bacilo y catalasa positiva. El crecimiento de *B. licheniformis* en TSA se observa en la figura 2.



Figura 2. Crecimiento de *Bacillus licheniformis* en TSA.

DISCUSIÓN

La caracterización fisicoquímica mostró que el proceso de teñido presenta mayor concentración de materia orgánica, nitratos y fosfatos respecto al proceso de curtido de donde fue aislado *B. licheniformis*. De acuerdo con Das Mohapatra et al. (2009), la producción de tanasa por *B. licheniformis* es influenciada por la presencia de carbono, nitrógeno, fosfato

e iones, y condiciones como temperatura y pH. Ambas muestras presentaron las características fisicoquímicas óptimas para el crecimiento de *B. licheniformis*.

Bacillus licheniformis posee una tanasa extracelular, inducida, que permite que el ácido tánico actúe no sólo como fuente de carbono sino también como inductor. Esta bacteria ha sido registrada como una cepa con alto potencial para la degradación de ácido tánico y resistente por su capacidad de esporular (Mondal et al. 2000). En la hidrólisis del ácido tánico por la tanasa producida por *B. licheniformis*, se libera una molécula de ácido gálico y glucosa, ésta última posiblemente favorece su crecimiento en el medio M9 con ácido tánico al 0,4% v/v.

El ácido tánico no presenta comportamiento recalcitrante, por lo que puede degradarse por fuentes tanto biológicas como químicas; se han realizado estudios que demuestran una fotooxidación leve a las 43 h, pero aún son escasas las investigaciones donde se demuestre la vida media del compuesto y su eliminación completa del entorno natural. A partir de los resultados obtenidos en los controles y según registros previos, puede atribuirse la eliminación del compuesto principalmente a la degradación microbiana (van Agteren et al. 2013).

Aunque en la literatura hay registros que demuestran la existencia de cepas como *Klebsiella pneumoniae* con una CMI de 6,4% p/v de ácido tánico (Tahmourespour et al. 2016) se debe tener en cuenta que las condiciones de las matrices de las cuales se han aislado (heces de cabra) son muy diferentes a las del efluente de curtiembre, incluyendo rangos extremos de pH y temperatura. Un pH neutro, 35 °C y 90 r. p. m. no son condiciones extremas, lo que explica las diferencias en la CMI alcanzada (0,4% v/v), pero concuerda con los rangos de pH y temperatura óptimos registrados para la producción de tanasa por parte de *B. licheniformis*. Sin embargo, a la fecha son pocos los registros de la actividad tanasa en ésta cepa; el primer registro publicado por Mondal et al. (2000) informa que la mayor actividad enzimática de *B. licheniformis* ocurre entre 0,5% y 1,5% p/v de ácido tánico evaluado a 40 °C y pH de 5. A pesar de haber alcanzado crecimiento sólo hasta la CMI mencionada, también se ha comprobado que la actividad enzimática está ligada a las condiciones de incubación, las cuales difieren entre los tratamientos evaluados, lo que puede explicar una CMI por debajo del rango mencionado (Das Mohapatra et al. 2009).

El tratamiento 2 resultó ser óptimo para la actividad enzimática y presenta coincidencias en las condiciones

de incubación y la naturaleza de la matriz; el pH del M9 con el ácido tánico a 0,4% v/v es neutro, y la temperatura óptima del proceso de curtido es 35 °C (del cual fue aislado *B. licheniformis*).

El aislamiento de *B. licheniformis* de esta matriz puede ser un hallazgo importante debido a que son pocos los registros sobre ésta cepa y su actividad tanasa comparada con las investigaciones de otras cepas más comunes. Las publicaciones existentes demuestran que *B. licheniformis* ha sido aislada del suelo y no de una matriz ambientalmente crítica en términos de contaminación como los efluentes de curtiembres, sugiriendo que es una cepa ya adaptada a las condiciones fisicoquímicas del agua y sus fluctuaciones. Los resultados de ésta investigación pueden ser útiles para la implementación de procesos biológicos alternativos en el manejo de aguas residuales en éste tipo de industrias, con un rendimiento superior a otras cepas registradas.

AGRADECIMIENTOS

Al Grupo de investigación Control y Diagnóstico de la Contaminación – GDCON de la Universidad de Antioquia por el financiamiento del proyecto.

REFERENCIAS

- Aguilar-Zárate P, Cruz-Hernández M, Montañez JC, Belmares-Cerda RE, Aguilar CN. 2014. Bacterial tannases: production, properties and applications. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. [fecha de acceso: marzo 22, 2016]; 13(1): 63-74. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=62031166005>
- Collazos CJ, Ospina C. 2007. Biodegradabilidad anaerobia del efluente del proceso de curtido al tanino. *Revista VirtualPro Procesos Industriales*. [fecha de acceso: marzo 25, 2016]; 62: 21-27. <https://www.revistavirtualpro.com/revista/industria-del-cuero-y-las-curtiembres/3>
- Costa A, Ribeiro W, Kato E, Monteiro A, Peralta R. 2008. Production of Tannase by *Aspergillus tamarii* in Submerged Cultures. *Brazilian archives of biology and technology*. [fecha de acceso: noviembre 20, 2016]; 51(2): 399-404. DOI:10.1590/S1516-89132008000200021
- Das Mohapatra PK, Maity C, Rao RS, Pati R, Mondal KC. 2009. Tannase production by *Bacillus licheniformis* KBR6: optimization of submerged culture conditions by Taguchi DOE methodology. *Food Research International*. [fecha de acceso: noviembre 14, 2015]; 42(4): 430–435. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.02.013>
- Escárcega S. 2001. Biodegradación de taninos de curtidurías mediante cultivos de *Aspergillus Niger*: [Tesis de maestría]. [Ciudad de México (México)]: Universidad Autónoma Metropolitana.
- Govindarajan RK, Revathi S, Ramesh kumar N, Krishnan M, Kayalvizhi N. 2016. Microbial tannase: current perspectives and biotechnological advances. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. [fecha de acceso: febrero 20, 2017]; 6: 168-175. DOI: 10.1016/j.bcab.2016.03.011
- Junnian L, Jike L, Shuanglun T. 2007. *Acta Ecológica Sinica*. [fecha de acceso: octubre 15, 2016]; 27(11): 4478-4484. [https://doi.org/10.1016/S1872-2032\(08\)60004-9](https://doi.org/10.1016/S1872-2032(08)60004-9)
- Kalyanaraman C, Kameswari SBK, Rao JR. 2015. Studies on enhancing the biodegradation of tannins by ozonation and Fenton's oxidation process. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. [fecha de acceso: septiembre 14, 2016]; 25: 329-337. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2014.11.012>
- Kumari V, Yadav A, Haq I, Kumar S, Bharagava RN, Singh SK, Raj A. 2016. Genotoxicity evaluation of tannery effluent treated with newly isolated hexavalent chromium reducing *Bacillus cereus*. *Journal of Environmental Management*. [fecha de acceso: abril 11, 2017]; 183(1): 201-211. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.08.017>
- Mantilla-Morales G. 2014. Calidad del agua residual tratada. [fecha de acceso: abril 20, 2017]. http://www.aniq.org.mx/boletines/2014/assets/img/2014/abril/secciones/20140326_aniq.pdf
- Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible (MADS). 2015. Resolución 0631 del 17 de marzo de 2015. Bogotá (Colombia): Ministerio de Ambiente y Desarrollo Sostenible de la República de Colombia. [fecha de acceso: marzo 14, 2016]. <https://www.minambiente.gov.co/index.php>
- Mondal KC, Banerjee R, Pati BR. 2000. Tannase production by *Bacillus licheniformis*. *Biotechnology Letters*. [fecha de acceso: septiembre 14, 2016]. 22(9): 767–769. <https://doi.org/10.1023/A:1005638630782>
- Mosca D, Stazi V, Daugulis AJ, Tomei MC. 2017. Treatment of synthetic tannery wastewater in a continuous two-phase partitioning bioreactor: Biodegradation of the organic fraction and chromium separation. *Journal of Cleaner Production*. [fecha de acceso: abril 15, 2017]. 152: 321–329. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.03.135>
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). PubChem Compound Database. Bethesda (USA): National Center for Biotechnology Information. [fecha de acceso: abril 22, 2017]. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid>
- Olivas-Aguirre FJ, Wall-Medrano A, González-Aguilar GA, López-Díaz JA, Álvarez-Parrilla E, de la Rosa LA, Ramos-Jimenez A. 2014. Taninos hidrolizables: bioquímica, aspectos nutricionales y analíticos y efectos en la salud. *Nutrición Hospitalaria*. [fecha de acceso: febrero 20, 2016]; 31(1): 55-66. <http://dx.doi.org/10.3305/nh.2015.31.1.7699>
- Orlowski P, Soliwoda K, Tomaszewska E, Bien K, Fruba A, Gniadek M, Labeledz O, Nowak Z, Celichowski G, Grobelny J. 2016. Toxicity of tannic acid-modified silver nanoparticles in keratinocytes: potential for immunomodulatory applications. *Toxicology in Vitro*. [fecha de acceso: marzo 14, 2017]; 35: 43-54. DOI: 10.1016/j.tiv.2016.05.009.
- Pepi M, Lampariello L, Altieri R. 2010. Tannic acid degradation by bacterial strains *Serratia* spp. and *Pantoea* sp. isolated from

- olive mill waste mixtures. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 64(1): 73-80. DOI: 10.1016/j.ibiod.2009.10.009
- Rabelo LM, Costa E Silva B, de Almeida SF, da Silva WA, de Oliveira Mendes B, Guimarães AT, da Silva AR, da Silva Castro AL, de Lima Rodrigues AS, Malafaia G. 2016. Memory deficit in Swiss mice exposed to tannery effluent. *Neurotoxicology and Teratology*, 55: 45-9. DOI: 10.1016/j.ntt.2016.03.007
- Raghuvanshi S, Dutt K, Gupta P, Misra S, Kumar R. 2011. *Bacillus sphaericus*: The highest bacterial tannase producer with potential for gallic acid synthesis. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. [fecha de acceso: mayo 14, 2015]. 111(6): 635-640. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2011.02.008
- Rice EW, Baird RB, Eaton AD, Clesceri LS, editors. 2012. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 22nd Edition. Washington (USA): American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation.
- Rodríguez L, Valdivia B, Contreras J, Rodríguez R, Aguilar N. 2010. Química y Biotecnología de la Tanasa. *Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila*. [fecha de acceso: mayo 20, 2015]. 2(4). <http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM/No.%204/AQM4quimica.html>
- Shakir L, Ejaz S, Ashraf M, Aziz N, Ahmad A, Iltaf I, Javeed A. 2012. Ecotoxicological risks associated with tannery effluent wastewater. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. [fecha de acceso: julio 15, 2016]. 34(2): 180-191. DOI:10.1016/j.etap.2012.03.002
- Tahmourespour A, Tabatabaee N, Khalkhali H, Amini I. 2016. Tannic acid degradation by *Klebsiella* strains isolated from goat feces. *Iranian Journal of Microbiology*. [fecha de acceso: mayo 14, 2016]; 8: 14-20. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4833736/>
- Traw M, Gift N. 2010. *Environmental Microbiology: Tannins and Microbial Decomposition of Leaves on the Forest Floor*. *The American Biology Teacher*. [fecha de acceso: marzo 25, 2015]; 72(8): 506-512. <http://www.bioone.org/doi/pdf/10.1525/abt.2010.72.8.9>
- van Agteren MH, Keuning S, Oosterhaven J. 2013. *Handbook on Biodegradation and Biological Treatment of Hazardous Organic Compounds*. Netherlands: Springer Netherlands. DOI:10.1007/978-94-015-9062-4
- Wang Y, Li W, Angelidaki I, Su C. 2014. Removal of organic pollutants in tannery wastewater from wet-blue fur processing by integrated Anoxic/Oxic (A/O) and Fenton: Process optimization. *Chemical Engineering Journal*. [fecha de acceso: febrero 25, 2016]; 252: 22-29. DOI: 10.1016/j.cej.2014.04.069