



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Biológicas - Programa de Magíster en Ciencias con Mención en  
Microbiología

**Bacterias degradadoras de tintas de impresión y celulosa: Una alternativa biotecnológica para tratar los residuos generados en el proceso de destintado de papel reciclado**

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias con Mención en Microbiología

MELISSA SOLANGE MONSALVES REBOLLEDO  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2021

Profesor Guía: Dr. Miguel Martínez Poblete  
Departamento de Microbiología,  
Facultad de Ciencias Biológicas,  
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesor Tutor

---

Dr. Miguel Martínez Poblete  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:

---

Dra. Allisson Astuya Villalón  
Facultad de Ciencias Naturales y  
Oceanográficas  
Universidad de Concepción



---

Dr. José Becerra Allende  
Facultad de Ciencias Naturales y  
Oceanográficas  
Universidad de Concepción

Director de Programa:

---

Dr. Víctor Campos Araneda  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

---

Dr. Gerardo González Rocha  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción



*Dedicado a mi familia,  
quienes me enseñaron que hay que ser fuerte y  
luchar, pero sin perder nunca la ternura.*

## **AGRADECIMIENTOS**

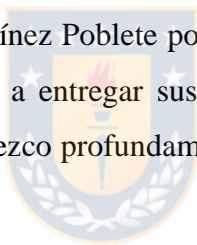
Quiero dar mis más sinceros agradecimientos...

A mi familia porque durante esta etapa siempre estuvieron apoyándome, incentivándome, confiando en mis capacidades y por sobre todo queriéndome.

A Iván, mi amado compañero, aquel que me motivó día a día, me impulso a seguir adelante y me brindó su amor incondicional.

A mis amigas, por su apoyo, sus risas, por escucharme y por siempre tener una palabra cariñosa para mí, son las mejores.

A mi profesor tutor, Dr. Miguel Martínez Poblete por su cariño, paciencia, amabilidad y gran vocación docente, siempre dispuesto a entregar sus conocimientos o una palabra de apoyo cuando las energías decaen. Le agradezco profundamente porque gran parte de lo que soy hoy día es gracias a su formación.



Al equipo del Laboratorio de Microbiología Básica y Biorremediación, especialmente a Ruth, Boris, Roberto y Paulina, por su simpatía, su sencillez, su inteligencia, y porque siempre me ayudaron muy amablemente cada vez que lo necesite.

Finalmente, agradecer a la Vicerrectoría de Investigación y Desarrollo (VRID) de la Universidad de Concepción, por financiar la presente tesis.

## INDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1. Papel.....	12
1.2. Reciclaje de papel.....	13
1.2.1. Destintado de papel reciclado.....	14
1.2.2. Efluentes del proceso de destintado.....	16
1.3. Tintas de impresión.....	17
1.4. Celulosa.....	19
1.5. Degradación bacteriana.....	20
2. HIPÓTESIS.....	23
3. OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivo(s) general(es).....	24
3.2. Objetivos específicos.....	24
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
4.1 Tintas de impresión.....	25
4.2 Medios de cultivo .....	26
4.3 Selección de bacterias con potencial para degradar tintas de impresión.....	26
4.3.1. Cepas bacterianas.....	26
4.3.2. Detección de la actividad de decoloración.....	27
4.4 Evaluación del efecto de parámetros externos en la decoloración.....	27
4.4.1. Efecto de la presencia/ausencia de glucosa o extracto de levadura.....	27
4.4.2. Efecto de la concentración de tinta.....	28
4.5. Evaluación del crecimiento bacteriano y la decoloración de las tintas de impresión .....	28
4.5.1. Crecimiento bacteriano.....	29
4.5.2. Determinación cuantitativa de la decoloración.....	29
4.6. Análisis espectroscópico UV-Vis.....	29
4.7. Selección de bacterias con potencial para degradar celulosa.....	30
4.7.1. Recolección y procesamiento de muestras.....	30

4.7.2. Aislamiento de cepas bacterianas.....	31
4.7.3. Detección de actividad celulolítica.....	31
4.8. Determinación de azúcares reductores.....	32
4.8.1. Preparación reactivo DNS.....	32
4.8.2. Preparación curva patrón de glucosa.....	32
4.8.3. Cuantificación de azúcares reductores.....	33
4.9. Identificación de las cepas bacterianas.....	33
5. RESULTADOS.....	34
5.1. Selección de bacterias con potencial para degradar tintas de impresión.....	34
5.2. Efecto de la presencia/ausencia de glucosa o extracto de levadura en la decoloración.....	36
5.3. Efecto de la concentración de tinta en la decoloración.....	37
5.4. Crecimiento bacteriano.....	37
5.5. Decoloración de tintas de impresión por <i>Cupriavidus</i> sp. VZ1-40.....	42
5.6. Análisis espectroscópico UV-Vis.....	44
5.7. Selección de bacterias con potencial para degradar celulosa.....	48
5.7.1. Aislamiento de cepas bacterianas.....	48
5.7.2. Actividad celulolítica.....	49
5.8. Cuantificación de azúcares reductores generados luego de la degradación de celulosa.....	51
5.9. Identificación de las cepas bacterianas.....	53
6. DISCUSIÓN.....	54
7. CONCLUSIONES.....	60
8. BIBLIOGRAFÍA.....	61

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Proceso de reciclaje de papel.....	14
Figura 2.	Estructura Química de la celulosa. ....	20
Figura 3.	Diseción de lombriz de tierra.....	30
Figura 4.	Decoloración de tintas de impresión por <i>Cupriavidus</i> sp.VZ1-40 luego de 24 h de incubación a 30 °C en condiciones estáticas. ....	35
Figura 5.	Recuento bacteriano viable de <i>Cupriavidus</i> sp. VZ1-40 en presencia de tintas de impresión (0,05%) a 30 ° C en MMR y condiciones estáticas.....	38
Figura 6.	Cinética de crecimiento de <i>Cupriavidus</i> sp. VZ1-40 en MMR a 30 °C y condiciones estáticas .....	39
Figura 7.	Cinética de crecimiento de <i>Cupriavidus</i> sp. VZ1-40 en MMR suplementado con tinta negra (0,05 %v/v) a 30 °C y condiciones estáticas.....	39
Figura 8.	Cinética de crecimiento de <i>Cupriavidus</i> sp. VZ1-40 en MMR suplementado con tinta amarilla (0,05 %v/v) a 30 °C y condiciones estáticas.....	40
Figura 9.	Cinética de crecimiento de <i>Cupriavidus</i> sp. VZ1-40 en MMR suplementado con tinta magenta (0,05 %v/v) a 30 °C y condiciones estáticas.....	40
Figura 10.	Cinética de crecimiento de <i>Cupriavidus</i> sp. VZ1-40 en MMR suplementado con tinta ciano (0,05 %v/v) a 30 °C y condiciones estáticas.....	41
Figura 11.	Cinética de crecimiento de <i>Cupriavidus</i> sp. VZ1-40 en MMR suplementado con una mezcla de las cuatro tintas de impresión (0,05 %v/v) a 30 °C y condiciones estáticas.....	41
Figura 12.	Decoloración de tinta negra (0,05 %v/v) por <i>Cupriavidus</i> sp. VZ1-40 en MMR a 30 °C y condiciones estáticas. ....	42
Figura 13.	Decoloración de tinta amarilla (0,05 %v/v) por <i>Cupriavidus</i> sp. VZ1-40 en MMR a 30 °C y condiciones estáticas. ....	43
Figura 14.	Decoloración de tinta magenta (0,05 %v/v) por <i>Cupriavidus</i> sp. VZ1-40 en MMR a 30 °C y condiciones estáticas.. ....	43
Figura 15.	Decoloración de tinta ciano (0,05 %v/v) por <i>Cupriavidus</i> sp. VZ1-40 en MMR a 30 °C y condiciones estáticas.....	44

Figura 16.	Decoloración de una mezcla de las cuatro tintas de impresión (0,05 %v/v) por <i>Cupriavidus</i> sp. VZ1-40 en MMR a 30 °C y condiciones estáticas.....	44
Figura 17.	Espectros de absorción UV-Vis de tinta negra (0,05%) antes y después de 24 h de incubación con <i>Cupriavidus</i> sp. VZ1-40 en MMR a 30 °C y condiciones estáticas.....	45
Figura 18.	Espectros de absorción UV-Vis de tinta amarilla (0,05%) antes y después de 24 h de incubación con <i>Cupriavidus</i> sp. VZ1-40 en MMR a 30 °C y condiciones estáticas.....	46
Figura 19.	Espectros de absorción UV-Vis de tinta magenta (0,05%) antes y después de 24 h de incubación con <i>Cupriavidus</i> sp. VZ1-40 en MMR a 30 °C y condiciones estáticas.....	46
Figura 20.	Espectros de absorción UV-Vis de tinta ciano (0,05%) antes y después de 24 h de incubación con <i>Cupriavidus</i> sp. VZ1-40 en MMR a 30 °C y condiciones estáticas.....	47
Figura 21.	Espectros de absorción UV-Vis de una mezcla de las cuatro tintas de impresión (0,05%) antes y después de 24 h de incubación con <i>Cupriavidus</i> sp. VZ1-40 en MMR a 30 °C y condiciones estáticas .....	47
Figura 22.	Aislamiento de bacterias en agar nutritivo después de 72 h de incubación a 30 °C. ....	48
Figura 23.	Actividad celulolítica por cepas bacterianas aisladas desde fecas de herbívoros (vaca y caballo) y del tracto digestivo de <i>Eisenia foetida</i> (lombrices de tierra) después de 72 h de incubación en AC a 30 °C.....	51
Figura 24.	Curva de calibración de glucosa desde 0 a 1000 mg L <sup>-1</sup> .....	52
Figura 25.	Resultado de secuenciación cepa EV1. ....	53
Figura 26.	Resultado de secuenciación cepa VZ1-40. ....	53



## INDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Clasificación y estructura química de tintas de impresión según su colorante.....	25
Tabla 2.	Volúmenes utilizados para la preparación de curva patrón de glucosa..	32
Tabla 3.	Decoloración de tintas de impresión (0,025%) por cepas bacterianas con capacidades para degradar compuestos con estructuras aromáticas después de 24 h de incubación en MMR a 30°C y condiciones estáticas .....	34
Tabla 4.	Decoloración de tintas de impresión (0,025%) por <i>Cupriavidus</i> sp. VZ1-40 en presencia o ausencia de glucosa o extracto de levadura después de 24 h de incubación a 30°C y condiciones estáticas .....	36
Tabla 5.	Decoloración de diferentes concentraciones de tintas de impresión por <i>Cupriavidus</i> sp. VZ1-40 después de 24 h de incubación en MMR a 30°C y condiciones estáticas .....	37
Tabla 6.	Recuento bacteriano viable de <i>Cupriavidus</i> sp. VZ1-40 en presencia de tintas de impresión (0,05%) a 30 ° C en MMR y condiciones estáticas .....	38
Tabla 7.	Cepas bacterianas aisladas y sus características macroscópicas .....	49
Tabla 8.	Degradación de celulosa por cepas bacterianas aisladas desde fecas de herbívoros (vaca y caballo) y del tracto digestivo de <i>Eisenia foetida</i> (lombrices de tierra) después de 72 h de incubación a 30 °C .....	50
Tabla 9.	Lecturas de absorbancia a 540 nm.....	52

## RESUMEN

Las tintas de impresión y los finos de celulosa corresponden a residuos contaminantes que se incorporan al medio ambiente principalmente durante el proceso de reciclaje del papel. Los objetivos de este trabajo fueron evaluar la biodegradación de tintas de impresión por bacterias que poseen capacidades metabólicas para degradar compuestos con estructuras aromáticas y evaluar la biodegradación de celulosa por bacterias aisladas desde fecas de herbívoros y del tracto digestivo de *Eisenia foetida* (lombriz de tierra). Los resultados mostraron que la cepa *Cupriavidus* sp. VZ1-40 fue capaz de decolorar más del 94% en 24 h, de tres tintas de impresión (negro, amarillo y magenta) en concentración de 0,05% (v/v). Su capacidad de decoloración fue dependiente de la presencia de glucosa o extracto de levadura. La tinta ciano fue la más recalcitrante y solo se logró el 15% de decoloración después de 24 h. Los análisis espectrales UV-Vis sugieren que la decoloración de las tintas negra, amarilla y magenta fue consecuencia de la biodegradación y mineralización de los colorantes, mientras que la decoloración de la tinta ciano podría ser consecuencia de la adsorción a la célula bacteriana. La exposición de *Cupriavidus* sp. VZ1-40 a una mezcla de las cuatro tintas de impresión mostró que la tinta ciano no evita la decoloración y degradación de las otras tintas. Por lo tanto, se concluye que *Cupriavidus* sp. VZ1-40 tiene potencial para ser utilizada en el tratamiento y descontaminación de tintas de impresión presentes en los efluentes de la industria del papel reciclado. Por otra parte, aunque se aislaron bacterias celulolíticas desde fecas de herbívoros (vaca y caballo) o del tracto digestivo de *Eisenia foetida* (lombriz de tierra), estas no fueron eficientes degradando celulosa en condiciones aeróbicas.

## ABSTRACT

Printing inks and cellulose fines correspond to polluting residues that are incorporated into the environment mainly during the paper recycling process. The objectives of this work were to evaluate the biodegradation of printing inks by bacteria that have metabolic capacities to degrade compounds with aromatic structures and to evaluate the biodegradation of cellulose by bacteria isolated from the feces of herbivores and from the digestive tract of *Eisenia foetida* (earthworm). The results showed that the *Cupriavidus* sp. VZ1-40 was able to discolor more than 94% in 24 h, of three printing inks (black, yellow and magenta) in a concentration of 0.05% (v / v). Its discoloration capacity was dependent on the presence of glucose or yeast extract. Cyan ink was the most recalcitrant ink and only 15% discoloration was achieved after 24 h. The UV-Vis spectral analyzes suggest that the discoloration of the black, yellow and magenta inks was a consequence of the biodegradation and mineralization of the dyes, while the discoloration of the cyan ink could be a consequence of the adsorption to the bacterial cell. The *Cupriavidus* sp. VZ1-40 at a mixture of the four printing inks showed that the cyan ink does not prevent fading and degradation of the other inks. Therefore, it is concluded that *Cupriavidus* sp. VZ1-40 has the potential to be used in the treatment and decontamination of printing inks present in wastewater from the recycled paper industry. On the other hand, although cellulolytic bacteria were isolated from the feces of herbivores (cow and horse) or from the digestive tract of *Eisenia foetida* (earthworm), they were not efficient in degrading cellulose under aerobic conditions.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Papel

El papel ha sido fundamental para la transmisión de conocimientos, costumbres y la historia de la humanidad. Se estima que la fabricación de papel tiene su origen en China hacia el año 100 d.C. en donde se utilizaban como materias primas, trapos, cáñamo, paja y hierbas (Teschke *et al.* 2008). En 1844, se obtuvo por primera vez la pasta a base de madera mediante un procedimiento mecánico y en 1852, se descubrió la celulosa, componente principal del papel que era obtenida desde la madera utilizando bisulfito de calcio (De la cruz & Fuente 2013).

En la actualidad, el papel tiene diversos usos tales como embalaje, impresión, escritura, limpieza, entre otros, lo que sumado al acelerado crecimiento de la población, sitúa a la fabricación de pasta, papel y derivados del papel entre las industrias más grandes del mundo. De hecho, su uso es tan amplio que en 2015 se utilizaron 406 millones de toneladas de papel a nivel mundial (FAO 2015).

Por otra parte, la creciente conciencia mundial entorno al impacto ambiental del plástico está llevando a la implementación de políticas públicas que reducen su uso, lo que también estimula la demanda de papel. Por ejemplo, en Chile se implementó la prohibición de la entrega de bolsas plásticas por parte del comercio nacional (Ley 21.100) (MMA, 2018), iniciativa que está impulsando un aumento significativo en la fabricación de papel, principalmente para su utilización en envases, embalajes y etiquetas en reemplazo de los plásticos derivados del petróleo.

El papel, a diferencia de los plásticos, es uno de los componentes de la basura urbana con mayor potencial de recuperación a través del proceso de reciclaje, por lo que en teoría puede reunir todos los requisitos de un producto inocuo para el ambiente: es un

producto natural, biodegradable, se fabrica a partir de fuentes renovables y puede ser reutilizado y reciclado.

## 1.2. Reciclaje de papel

El consumo *per cápita* de papel y cartón varía significativamente de un país a otro, pero en promedio, una persona usa alrededor de 60 Kg. de papel al año (Bajpai 2013). El reciclaje de papel es el proceso de recuperación de este papel, el cual ya ha sido utilizado por los consumidores, para transformarlo en nuevos productos de papel (De la cruz & Fuente 2013). Debido a sus ventajas económicas y medioambientales, el papel recuperado o reciclado, se ha convertido en una fuente cada vez más importante de fibra para la fabricación de papel (Bajpai 2013). Las tres fuentes principales de materia prima para el reciclaje son el papel de periódico, papel fotocopiado y papeles impresos por inyección de tinta (Mohandass & Raghukumar 2005).

En el proceso de reciclaje de papel (Figura 1), primero se realiza la recolección del papel reciclado (1), luego el papel recuperado se transforma en pasta mediante un proceso que utiliza principalmente agua y los pequeños trozos de metal y de plástico se separan durante o después de la reconversión en pulpa, utilizando sedimentación, filtración o centrifugación (2). Las sustancias de relleno, colas, resinas y tintas de impresión se eliminan en la fase de lavado y destintado, la cual en ocasiones involucra la adición de agentes floculantes. La espuma resultante de esta etapa retiene las sustancias químicas indeseables por lo que se retira y se consideran residuos (3). La pulpa se refina empleando una serie de lavados que pueden incluir o no el uso de reactivos químicos, para disolver las impurezas restantes, y agentes blanqueantes que aclaran la pulpa (4). Después de las operaciones de agitación y destintado de la pasta, la producción de hojas de papel continúa de una forma muy semejante a la utilizada empleando pasta de fibra virgen (Teschke *et al.* 2008).



Figura 1. Proceso de reciclaje de papel

### 1.2.1. Destintado de papel reciclado

El destintado del papel recuperado se realiza para eliminar las partículas de tinta de impresión (Marques *et al.* 2003). Este corresponde al proceso principal para obtener una nueva pasta de celulosa e incluye dos grandes etapas: la desintegración del papel impreso, en la cual se produce el desprendimiento de la tinta y otros contaminantes, y la separación de estos de la suspensión fibrosa. Las principales etapas según lo descrito por Silva (2016) y De la cruz & Fuente (2013) son:

- **Pulpeado:** En esta etapa ocurre la desintegración del papel reciclado, el desprendimiento de las partículas de tintas de impresión y la formación de una

nueva pasta de celulosa. El objetivo de esta etapa es romper los enlaces fibra-tinta, por medio de la energía mecánica (agitación), térmica (temperatura) y química, utilizando reactivos como hidróxido de sodio (NaOH) que facilita la separación de las fibras o silicato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SiO}_3$ ) que regula el pH del proceso. Aunque no se ha logrado determinar de manera precisa los tipos de enlaces que existen entre la tinta y la superficie de la fibra, se sabe que están influenciados por muchas variables como: tipo de papel, relación entre la cantidad de tinta y tipo de impresión utilizada, edad del papel impreso y las condiciones ambientales a las que ha sido expuesto antes de llegar al proceso de destintado.

- **Tamizado:** Se utilizan tamices para separar por diferencia de tamaños objetos que puedan venir en el papel reciclado como grapas, ganchos, cintas adhesivas entre otros. Partículas de tamaño  $>8$  mm.
- **Limpieza:** Se utilizan limpiadores centrífugos o hidrociclones para separar por diferencia de densidad objetos que puedan venir en el papel reciclado como grapas, ganchos, arena, vidrio, entre otros. Partículas con densidad  $>1$  g/cm<sup>3</sup>.
- **Flotación:** Se utilizan celdas de flotación para remover las partículas de tinta más grandes (10-100  $\mu\text{m}$ ) que aún queda en las fibras de celulosa. En esta etapa las partículas de tinta saponificadas y emulsionadas son arrastradas hacia la superficie por burbujas que se forma a partir de una corriente de aire inyectada en su parte inferior. Para lograr la flotación selectiva de las partículas de tinta del resto de la suspensión, es necesaria la acción de un colector. Este agente químico, agregado en la etapa de pulpeado o previo a la etapa de flotación, ayuda a la aglomeración de las partículas de tinta y modifica las características de la superficie de estas haciéndolas hidrofóbicas. De esta forma, las partículas aumentan su afinidad por las burbujas de aire y se adhieren a las mismas, lográndose un agregado de menor densidad que asciende y

forma una capa de espuma sobre la superficie de la celda. Esta nueva fase debe tener la estabilidad necesaria para evitar que las partículas de tinta vuelvan a incorporarse a la suspensión de pasta. El proceso se completa con la evacuación de la celda de dicha espuma y posterior tratamiento. Generalmente se agrega estearato de sodio como agente colector y oleína saponificada al 50% como espumante.

- **Lavados:** Se utilizan lavadoras, también llamadas washers, para eliminar las partículas pequeñas de tinta (<20  $\mu\text{m}$ ). En esta etapa se agregan surfactantes para hacer a las partículas de tinta hidrofílicas y se hace pasar la suspensión a través de tamices de dimensión de malla apropiada, que permiten el paso de las partículas de tinta y retienen las fibras. La mayoría de los sistemas de lavado comerciales se basan en el flujo de agua a contracorriente para minimizar el consumo de agua e incrementar el rendimiento en fibras. La separación fibra-partículas de tinta no es total, puesto que, en la práctica, el manto fibroso formado actúa como un filtro, reteniéndolas parcialmente (dependiendo de su tamaño, dispositivo de lavado y consistencia de descarga) y reduciendo la eficacia de la eliminación. Esta etapa exige un gran consumo de agua (hasta 100  $\text{m}^3/\text{ton}$ ).

### 1.2.2. Efluentes del proceso de destintado

El promedio aproximado de efluentes generados de la producción de papel a partir de fibra reciclada es de 120 a 180 L de agua por tonelada de pulpa recuperada (Bajpai 2004). Los principales residuos generados en el proceso de destintado corresponden a tintas de impresión que son retiradas del papel reciclado y también una carga importante de fibras cortas de celulosa, también llamados finos, los cuales se desprenden de la pulpa por efecto de la agitación mecánica (Čabalová 2011).



Debido a la presencia de estos residuos, los efluentes del destintado de papel reciclado presentan una alta carga orgánica y coloración, lo que puede provocar un daño ambiental si no son tratados (Ramos *et al.* 2019). Las fibras cortas o finos de celulosa al ser descargados en los cuerpos de agua generan un exceso de materia orgánica y aunque estos residuos son biodegradables, crean graves problemas en el ecosistema ya que consumen grandes cantidades de oxígeno en su proceso de degradación, reduciendo la probabilidad de vida acuática por falta de oxígeno disponible (Čabalová 2011). Por otra parte, la presencia de color en el agua impide el paso de la luz, afectando las actividades fotosintéticas y produciendo una reducción en la concentración de oxígeno disuelto (Kalyani *et al.* 2009). Además, se ha informado que muchos tintes sintéticos son tóxicos, cancerígenos y genotóxicos (Yesilada *et al.* 2003; Kumar *et al.* 2006; Parshetti *et al.* 2007).

Se han propuesto varios procesos físico-químicos convencionales para la decoloración de efluentes coloreados, tales como el químico, la electrocoagulación, la adsorción, la floculación, la ozonización y la ósmosis inversa (Robinson *et al.* 2001; Jadhav & Govindwar 2006). Sin embargo, estos tratamientos son poco efectivos y no evitan la descarga de los colorantes, los cuales pueden persistir en el medio ambiente debido a su alta estabilidad a la luz, temperatura, agua y productos químicos (Ghosh *et al.* 2015).

### 1.3. Tintas de impresión

Las tintas de impresión contienen principalmente colorantes, aglutinantes, soportes y aditivos (Aquino *et al.* 2014). Sin embargo, los componentes de las tintas pueden diferir dependiendo de su uso, a continuación, se presentan los más comunes según lo informado por De la cruz & Fuente (2013).

- **Cargas:** Son componentes que brindan propiedades especiales como son la porosidad, estructura adecuada para evitar la sedimentación, pintabilidad,

facilidad de lijado, además de intervenir como destacado factor en el brillo del acabado.

- **Vehículo:** Denominado también polímero resina, es el medio fluido en el que se encuentran dispersas las partículas de colorantes. Es el responsable de la formación de la película, así como de las propiedades de esta.
- **Solvente:** Se trata de un líquido volátil cuyas principales funciones son las de solubilizar el vehículo, conferir al conjunto la viscosidad adecuada para la aplicación y contribuir a su nivelación y secado, pero no interviene en la película una vez seca ya que un buen solvente no debe quedar retenido en la misma.
- **Aditivos:** Estos comprenden una variada gama de sustancias que actúan como importantes auxiliares mejorando las propiedades generales antiespumantes y regulando el secado.
- **Colorantes:** La 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.

Los colorantes son los principales compuestos de las tintas de impresión y poseen generalmente, una estructura química en forma de anillo aromático acoplada con una cadena lateral, estas estructuras de resonancia que causan desplazamiento o aparición de bandas de absorción en el espectro visible de luz son responsables del color. La síntesis de colorantes orgánicos requiere: Un cromógeno incoloro que corresponde a la estructura aromática y que puede contener anillos de benceno,

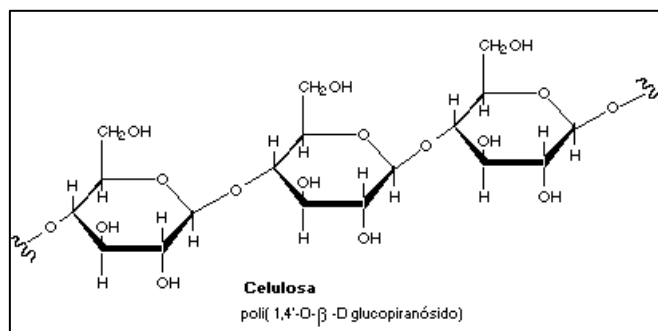
antraceno o naftaleno. Un grupo cromóforo, que es un átomo o radical portador del color y está representado por los siguientes radicales, los cuales forman la base para una clasificación química de colorantes cuando se acoplan con el cromógeno: azo ( $-N=N-$ ), carbonilo ( $=C=O$ ), carbón ( $=C=C=$ , carbón-nitrógeno ( $>C=NH$  o  $-CH=N-$ ), nitroso ( $-NO$  o  $N-OH$ ), nitro ( $-NO_2$  o  $=NO-OH$ ) y sulfuro ( $>C=S$  y otros grupos carbón-azufre). Un auxocromo es un grupo de afinidad que imparte solubilidad y causa adherencia del colorante a la fibra ayudando así a la estructura cromógeno-cromóforo. El auxocromo puede ser básico como el amino ( $-NH_2$ ), los amino sustituidos ( $-NHR$ ,  $-NR_2$ ) y el fenólico ( $-OH$ ), o ácidos como el radical  $-COOH$  y los radicales sulfónicos ( $-SO_3H$ ) o sus derivados (Salcedo 2009).

Los colorantes sintéticos son xenobióticos por definición y recalcitrantes por demanda, ya que están diseñados para ser resistentes a la luz, al agua y a agentes oxidantes, por tanto, son difíciles de degradar una vez que son liberados a los sistemas acuáticos y la compleja estructura de sus cromóforos frecuentemente los hace tóxicos (Michaels & Lewis 1985).



#### **1.4. Celulosa**

El papel está constituido principalmente por fibras vegetales, específicamente de celulosa, biopolímero lineal que forma parte de la pared celular de las plantas (Wertz *et al.* 2010) y está formado por unidades de glucosa unidas entre sí por medio de enlaces glucosídicos  $\beta$  (1-4) (Figura 2). Estas cadenas lineales de celulosa interactúan entre sí por medio de enlaces puentes de hidrógeno dando lugar a la formación de microfibrillas con regiones altamente ordenadas que le dan las características de insolubilidad, rigidez y resistencia al ataque enzimático y que se conocen como regiones cristalinas (Mejía *et al.* 2002).



**Figura 2.** Estructura Química de la celulosa (Heldt 1997).

La celulosa ( $C_6H_{10}O_5$ )<sub>n</sub> es el componente más abundante en la biomasa vegetal, el cual es degradado por una serie de microorganismos mediante la acción de un conjunto de enzimas (Ortiz-Caro *et al.*, 2010).

### 1.5. Degradación bacteriana

La decoloración y degradación microbiana es una alternativa ecológica y rentable comparado con los procesos de descomposición físico-química (Verma & Madamwar 2003). Se ha descrito que varios microorganismos pueden decolorar e incluso degradar completamente algunos colorantes y transformarlos en compuestos no tóxicos (Pandey *et al.* 2007). Bacterias como *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas luteola*, *Pseudomonas sp.* y *Kocuria rosea* tienen un alto potencial de decoloración y degradación contra colorantes sintéticos (Kalyani *et al.* 2009; Shah *et al.* 2013; Benlurvankar & Sebastian 2015). Recientemente, Cossolin *et al.* (2019) informó que *Shewanella xiamenensis* G5-03 fue capaz de decolorar cinco tipos de colorantes utilizados por la industria textil. La utilización de microorganismos para el tratamiento de aguas residuales con colorantes textiles ha sido ampliamente documentado (Sandhya *et al.* 2005; Moosvi *et al.* 2007; Jiranuntipon *et al.* 2008; Sheth & Dave 2009). Sin embargo, aún hay escasa información acerca de la metabolización bacteriana de colorantes descargados por la industria del reciclaje de papel.

La descomposición de celulosa en la naturaleza consiste en un proceso complejo que requiere de la participación de diferentes tipos de organismos en una sucesión ecológica (Ibach 2005; Thormann *et al.* 2003). La naturaleza de los residuos vegetales, compuestos de celulosa, hace necesaria la intervención de organismos capaces de producir enzimas que puedan degradar estos biopolímeros (Martínez *et al.* 2005).

Los microorganismos que habitan el suelo y el intestino de los herbívoros son los encargados en las cadenas tróficas de la descomposición de materia orgánica. Los denominados sistemas naturales de utilización de biomasa incluyen microorganismos únicos, como bacterias y hongos de pudrición, o consorcios especializados formados por múltiples organismos, siendo el caso del rumen y el intestino de insectos o lombrices de tierra (Xie *et al.* 2014). El rumen constituye un ecosistema microbiano anaeróbico único, integrado por bacterias, protozoos ciliados, hongos, arqueas y bacteriófagos. Por otro lado, el intestino de ciertos organismos, en particular el de termitas y lombrices de tierra, representa un sistema en el cual la interacción sinérgica que se establece entre el huésped y los microorganismos simbioses permite una degradación del 99% de la biomasa en 24 h, en un proceso continuo e integrado, a lo largo de todas las partes del intestino (Xie *et al.* 2014).

Dentro del dominio *Bacteria*, los principales géneros celulolíticos se distribuyen en los *phyla Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Proteobacteria*. En términos fisiológicos, los sistemas bacterianos celulolíticos más estudiados son los pertenecientes a las bacterias aeróbicas Gram positivas *Cellulomonas* y *Thermobifida* pertenecientes al *phylum Actinobacteria* y las anaerobias fermentativas del *phylum Firmicutes*, típicamente Gram positivas, como *Clostridium*, *Ruminococcus* y *Caldicellulosiruptor* y algunas Gram negativas como *Butyrivibrio* y *Acetivibrio* (Ravinovich *et al.* 2002; Lynd *et al.* 2002). Además, varias especies de los géneros *Bacillus* y *Streptomyces*, fueron reportadas como celulolíticas (Morana *et al.* 2011).

Las celulasas son hidrolasas que descomponen el polímero de celulosa en fragmentos de menor tamaño y unidades monoméricas de glucosa. Los microorganismos producen principalmente tres tipos de celulasas: endoglucanasas (1,4-D-glucan-4-glucanohidrolasas), exoglucanasas (celodextrinasas) y celobiohidrolasas (1,4-D-glucan-celobiohidrolasas) (Kader *et al.* 1999; Lynd *et al.* 2002). Las endoglucanasas cortan en sitios al azar en la celulosa amorfa, generando fragmentos de diferentes tamaños y nuevos extremos; las exoglucanasas liberan glucosa o celobiosa a partir de los extremos reductores y no reductores de las cadenas del polisacárido, y pueden actuar también en la celulosa microcristalina, estructura poco susceptible a la degradación. Las celobiohidrolasas hidrolizan los residuos de celobiosa para producir unidades de glucosa (Lynd *et al.* 2002).

Finalmente, la industria del reciclaje de papel enfrenta importantes cambios, tanto en el desempeño ambiental, como en los procesos de producción, con el propósito de satisfacer las estrictas regulaciones ambientales, mantener su rentabilidad y superar los mercados en competencia, lo que sumado a un aumento en la demanda de papel especialmente de tipo reciclado, puede incrementar la necesidad de tratamiento de los efluentes provenientes de las plantas de reciclado de papel. Ante este escenario, la biotecnología aporta alternativas eficientes y amigables con el medio ambiente empleando la degradación microbiana.

## 2. HIPÓTESIS

La degradación bacteriana es un método efectivo para la remoción de diversos compuestos orgánicos tóxicos, los cuales generalmente, están constituidos por estructuras aromáticas complejas que también se encuentran en las tintas de impresión. Por otra parte, la celulosa, el principal componente del papel reciclado, puede ser convertido enzimáticamente en azúcares reductores por bacterias celulolíticas que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. Considerando estos antecedentes, se postula que:

2.1. Las tintas de impresión pueden ser degradadas por bacterias que poseen capacidades metabólicas para degradar compuestos con estructuras aromáticas.

2.2. La celulosa puede ser degradada por bacterias aisladas desde fecas de herbívoros o del tracto digestivo de *Eisenia foetida* (lombriz de tierra).



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo(s) general(es)**

3.1.1. Evaluar la biodegradación de tintas de impresión por bacterias que poseen capacidades metabólicas para degradar compuestos con estructuras aromáticas.

3.1.2. Evaluar la biodegradación de celulosa por bacterias aisladas desde fecas de herbívoros y del tracto digestivo de *Eisenia foetida* (lombriz de tierra).

#### **3.2. Objetivos específicos**

3.2.1. Determinar, en cepas bacterianas que metabolizan compuestos con estructuras aromáticas, sus capacidades para degradar tintas de impresión.

3.2.2. Evaluar, en cepas bacterianas aisladas desde fecas de herbívoros y del tracto digestivo de *Eisenia foetida* (lombriz de tierra), sus capacidades para degradar celulosa.



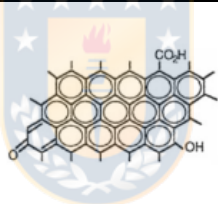
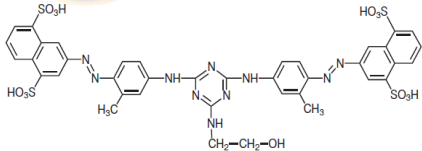
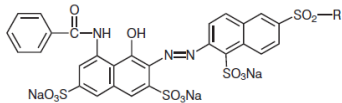
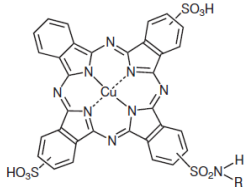
## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Tintas de impresión

Se utilizaron las tintas negra, amarilla, magenta y ciano, disponibles comercialmente para su uso en impresoras de inyección de tinta. La clasificación y estructura química de sus colorantes se muestran en la Tabla 1.

Las tintas se esterilizaron por filtración (filtros de acetato de celulosa Millipore, tamaño de poro 0,22  $\mu\text{m}$ ) y se almacenaron a 4  $^{\circ}\text{C}$  en oscuridad hasta su uso.

**Tabla 1.** Clasificación y estructura química de tintas de impresión según su colorante.

Tinta	Clasificación química	Estructura química	Referencia
Negra	Negro de carbón		(Balea <i>et al.</i> 2017)
Amarilla	Azoico (disazo)		(Fryberg 2005)
Magenta	Azoico (monoazo)		(Fryberg 2005)
Ciano	Ftalocianina de cobre		(Fryberg 2005)

## 4.2. Medios de cultivo

Se utilizó el medio mineral enriquecido (MMR) modificado de Elisangela *et al.* (2009) para la decoloración de tintas de impresión, el cual consistió en un medio con sales minerales (MM) que contenía ( $\text{g L}^{-1}$ );  $\text{NaNO}_3$  3,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  0,5,  $\text{KCl}$  0,5 y  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  0,01, a pH 7, suplementado con glucosa  $2 \text{ g L}^{-1}$  y extracto de levadura  $5 \text{ g L}^{-1}$ .

Para la selección de bacterias celulolíticas se utilizó el medio de cultivo carboximetilcelulosa (CMC) descrito por Shankar *et al.* (2011) el cual contenía ( $\text{g L}^{-1}$ );  $\text{NaNO}_3$  3,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  0,5,  $\text{KCl}$  0,5 y  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  0,01, a pH 7, suplementado con CMC  $1 \text{ g L}^{-1}$ . La solidificación del medio se realizó agregando agar-agar  $20 \text{ g L}^{-1}$ . El agar celulosa (AC) se preparó de igual manera y solamente CMC fue remplazado por fibras de celulosa.

Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 15 minutos.

## 4.3. Selección de bacterias con potencial para degradar tintas de impresión

### 4.3.1. Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas evaluadas corresponden a *Sphingopyxis chilensis* S37, *Curpiavidus* sp. PZK y *Cupriavidus* sp. VZ1-40, aisladas desde un río contaminado expuesto a la descarga de efluentes industriales (río Biobío, Chile) (Godoy *et al.* 1999; Padilla *et al.* 2000; Domínguez *et al.* 2002) y la cepa ATCC *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 (Don & Pemberton 1981).

Estas cepas fueron obtenidas desde el cepario del Laboratorio de Microbiología Básica y Biorremediación de la Universidad de Concepción y se seleccionaron debido a que en estudios anteriores demostraron capacidades metabólicas para degradar otros

compuestos con estructuras aromáticas (Clément *et al.* 1995; Aranda *et al.* 1999, 2003; Padilla *et al.* 2000; Domínguez *et al.* 2002; Godoy *et al.* 2003).

#### **4.3.2. Detección de la actividad de decoloración**

El potencial de decoloración frente a las cuatro tintas de impresión se evaluó individualmente en condiciones estáticas. Para esto, se inocularon  $1,0 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> de los cultivos bacterianos en tubos de ensayo que contenían 6 mL de caldo MMR suplementado con 0,025% (v/v) de la respectiva tinta (negra, amarilla, magenta o ciano).

Los tubos se incubaron durante 24 h a 30 °C y se observó visualmente la decoloración del medio de cultivo.

#### **4.4. Evaluación del efecto de parámetros externos en la decoloración**

##### **4.4.1. Efecto de la presencia/ausencia de glucosa o extracto de levadura**

Se realizaron ensayos en medio MM, medio mínimo con ausencia de nitrógeno (MM - N), MM -N más glucosa 2 g L<sup>-1</sup> (MM -N +G), MM más glucosa 2 g L<sup>-1</sup> (MM +G) y MM más extracto de levadura 5 g L<sup>-1</sup> (MM +EL) para evaluar la decoloración de las tintas de impresión (0,025% v/v).

La cepa bacteriana VZ1-40 fue previamente cultivada en caldo R2A (He Media) y luego el pellet celular se lavó tres veces con MM por centrifugación a 8.000 g durante 3 min, para retirar la fuente de carbono. La cepa se inoculó en tubos de ensayo conteniendo 6 mL de los diferentes medios de crecimiento mencionados anteriormente, de manera de obtener una densidad celular de  $1,0 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>.

Los tubos se incubaron durante 24 h a 30 °C y se observó visualmente la decoloración del caldo. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y se incluyeron los respectivos controles abióticos.

#### **4.4.2. Efecto de la concentración de tinta**

El efecto de diversas concentraciones de tintas de impresión en el rango de 0,025 – 5% (v/v) sobre el potencial de decoloración de la cepa VZ1-40 fue evaluado en tubos de ensayo conteniendo 6 mL de MMR.

Los tubos se inocularon con una densidad celular de  $1,0 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> y se incubaron durante 24 h a 30 °C. Se observó visualmente la decoloración del medio de cultivo en comparación con los controles abióticos. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.



#### **4.5. Evaluación del crecimiento bacteriano y la decoloración de tintas de impresión**

Se evaluó la capacidad de la cepa VZ1-40 para crecer y decolorar, individualmente y en mezcla, las tintas de impresión. Para esto, se inocularon  $1,0 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 100 mL de caldo MMR y 0,05% (v/v) de la respectiva tinta (negra, amarilla, magenta o ciano), o una mezcla con los cuatro tipos de tinta, cada una en concentración 0,05% (v/v).

Los matraces se incubaron durante 24 h a 30 °C en condiciones estáticas. A las 4, 8, 12 y 24 h de incubación, se obtuvo alícuotas de 1 mL para determinar el crecimiento bacteriano y cuantificar la decoloración como se detalla a continuación. Todos los experimentos se realizaron por triplicado e incluyeron controles abióticos y sin tinta.

#### 4.5.1. Crecimiento bacteriano

El crecimiento bacteriano se determinó mediante recuento bacteriano viable (Herbert 1990). Para esto, se sembraron por triplicado, alícuotas de 20 µl de diluciones seriadas en la superficie de placas de Petri con agar R2A (He Media) y se incubaron a 30 °C durante 48 h para el recuento de colonias.

#### 4.5.2. Determinación cuantitativa de la decoloración

La decoloración de las tintas de impresión se expresó como la relación porcentual entre la absorbancia de tinta decolorada y la absorbancia inicial.

Para esto, las alícuotas obtenidas previamente se centrifugaron a 6700 g durante 15 min y en el sobrenadante libre de células se determinó la absorbancia a longitudes de onda de absorción máxima ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) con un espectrofotómetro UV-Vis (TU-1810 Split Beam, Bausch y Lomb).

Las  $\lambda_{\text{máx}}$  se determinaron utilizando los controles abióticos y el porcentaje de decoloración se calculó de acuerdo con Ayed *et al.* (2009).

$$\% \text{ Decoloración} = \frac{(I - F)}{I} \times 100$$

Donde I = absorbancia inicial y F = absorbancia del medio decolorado.

#### 4.6. Análisis espectroscópico UV-Vis

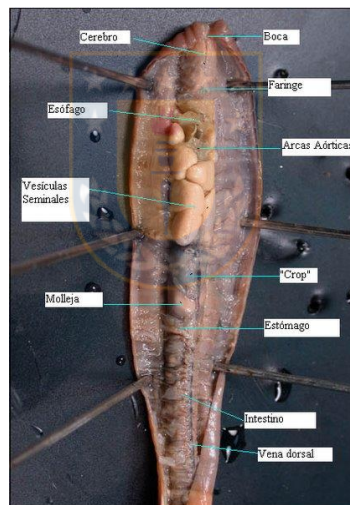
La decoloración de las tintas de impresión y biodegradación de sus colorantes se evaluó monitoreando el cambio en los espectros de absorción entre 200–800 nm

utilizando un espectrofotómetro UV-Vis (TU-1810 Split Beam, Bausch y Lomb) (Elisangela *et al.* 2009).

#### 4.7. Selección de bacterias con potencial para degradar celulosa

##### 4.7.1. Recolección y procesamiento de muestras

Se obtuvieron muestras de fecas de herbívoros (vaca y caballo) en tubos estériles de 5 mL, los cuales fueron almacenados a 4 °C hasta su uso. Además, se obtuvieron muestras del tracto digestivo de *Eisenia foetida* (lombrices de tierra) provenientes desde una vermicompostera.



**Figura 3.** Disección de lombriz de tierra

Previo a la obtención de la muestra, las lombrices fueron depositadas en un recipiente que contenía únicamente una pasta de papel (residuos de papel más agua) para su alimentación. Luego de 7 días a temperatura ambiente y en oscuridad, las lombrices fueron lavadas con agua estéril, se colocaron en placas de Petri (con hielo) y se limpió la superficie con etanol 70°.

Luego, se realizó la disección (Figura 3) y se obtuvo el contenido intestinal de las lombrices, el cual se depositó en tubos eppendorf, se le adicionó una solución estéril de NaCl 0,85% y se homogenizó por 5 min en vortex.

#### **4.7.2 Aislamiento de cepas bacterianas**

El aislamiento de las cepas se realizó a través del método de dilución en placa (modificado de Madigan, *et al.* 1998). Para esto, se extrajeron 100  $\mu$ l de muestra (sin diluir) y se depositaron en tubos eppendorf que contenían 900  $\mu$ l de solución NaCl 0,85% obteniendo una dilución  $10^{-1}$ , se agitó en vortex y a partir de esta dilución se repitió el procedimiento de manera de obtener diluciones seriadas hasta  $10^{-7}$ . Luego, se sembraron 100  $\mu$ l de cada una de las diluciones por triplicado en placas de Petri con agar nutritivo (AN) y se diseminó la muestra por toda la superficie.

Las placas se incubaron a 30 °C por 72 h y se seleccionaron colonias bacterianas aisladas, las que fueron inoculadas en tubos de ensayo con 6 mL de caldo nutritivo y se incubaron a 30 °C por 48 h para la obtención de los cultivos puros.

#### **4.7.3. Detección de actividad celulolítica**

Se evaluó la actividad celulolítica de las cepas aisladas utilizando el método de tinción con colorante Rojo Congo (Shankar *et al.* 2011). Para esto, se inocularon 20  $\mu$ L de los cultivos bacterianos en placas de agar CMC o AC y se incubaron por 72 h a 30 °C.

Las placas fueron teñidas con solución Rojo Congo 1% para lo que se agregó un volumen suficiente de manera de cubrir la superficie de las placas y se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente. Luego, fueron lavadas con solución NaCl 1M para retirar el exceso de colorante. La ausencia de color rojo alrededor de las colonias bacterianas fue indicador de degradación (halos de degradación).

## 4.8. Determinación de azúcares reductores

Los azúcares reductores fueron medidos utilizando el método del ácido dinitrosalísílico (DNS) (Miller 1959).

### 4.8.1. Preparación reactivo DNS

En un vaso precipitado de 250 mL se agregaron 50 mL de agua destilada y 1,6 g. de hidróxido de sodio (NaOH), se llevó a agitación magnética a temperatura ambiente hasta disolver. Luego, se adicionó lentamente y sin dejar de agitar, 30 g. de tartrato de sodio y potasio hasta disolver completamente. Finalmente, se agregó lentamente 1 g. de ácido DNS y se completó con agua destilada hasta conseguir un volumen de 100 mL en matraz aforado. La solución fue traspasada a un frasco schott ámbar y se dejó en agitación durante 12 h.

### 4.8.2. Preparación curva patrón de glucosa

La curva patrón de glucosa en concentraciones de 0 a 1000 mg L<sup>-1</sup> fue preparada como se indica en la Tabla 2 a partir de una solución stock de 8 g L<sup>-1</sup>.

**Tabla 2:** Volúmenes utilizados para la preparación de curva patrón de glucosa.

Concentración (mg L <sup>-1</sup> )	Solución stock (μL)	Agua destilada (μL)
0	0	5000
200	125	4875
400	250	4750
600	375	4625
800	500	4500
1000	625	4375



#### **4.8.3. Cuantificación de azúcares reductores**

La cepa bacteriana con mejor actividad celulolítica fue inoculada a una concentración de  $1,0 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> en matraces de 250 mL con 100 mL de caldo CMC, tanto en condiciones estáticas como en agitación, por 48 h a 30 °C.

Luego, se obtuvieron alícuotas de 1,5 mL de cultivo y se centrifugaron a 1.000 rpm durante 15 minutos. Se obtuvieron 400 µL del sobrenadante y se depositaron en tubos eppendorf, luego se agregaron 400 µL de reactivo DNS y se llevó a ebullición durante 5 min, inmediatamente después se pasaron a un baño de hielo en donde se le agregaron 1,2 mL de agua destilada fría y se agitó en vortex.

La absorbancia de las muestras se midió en un espectrofotómetro UV-Vis (TU-1810 Split Beam, Bausch y Lomb) a una longitud de onda de 540 nm.

#### **4.9. Identificación de las cepas bacterianas**

La identificación de las cepas con capacidades para degradar tintas de impresión y celulosa se realizó mediante análisis de secuencia de ADNr 16S. Para esto, se obtuvo el ADN genómico según protocolo de extracción fenol/cloroformo (Wright *et al.* 2017). Luego, el gen ARNr 16S fue amplificado mediante PCR utilizando los cebadores específicos, 27f y 1401r para el dominio universal bacteriano (Lane 1991). Los productos de PCR fueron enviados para su secuenciación a Macrogen, Corea.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Selección de bacterias con potencial para degradar tintas de impresión

Se evaluó el potencial de decoloración de cuatro cepas bacterianas (*Cupriavidus pinatubonensis* JMP134, *Sphingopyxis chilensis* S37, *Cupriavidus* sp. PZK y *Cupriavidus* sp. VZ1-40), frente a cuatro tintas de impresión (negra, amarilla, magenta y ciano) en concentración de 0,025% (v/v). Los resultados obtenidos a las 24 h de incubación se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Decoloración de tintas de impresión (0,025%) por cepas bacterianas con capacidades para degradar compuestos con estructuras aromáticas después de 24 h de incubación en MMR a 30°C y condiciones estáticas.

Cepas	Negra	Amarilla	Magenta	Ciano
Control (abiótico)	-	-	-	-
<i>Cupriavidus pinatubonensis</i> JMP134	+	-	-	-
<i>Sphingopyxis chilensis</i> S37	-	-	+	-
<i>Cupriavidus</i> sp. PZK	+	+	+	-
<i>Cupriavidus</i> sp. VZ1-40	++	++	++	-

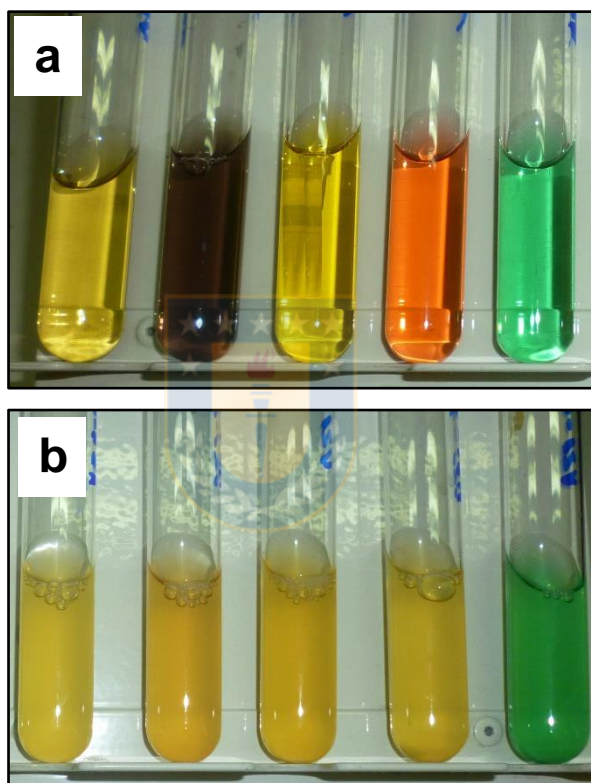
++: Decoloración completa, +: Decoloración parcial, -: Sin decoloración

Los resultados indicaron que las cuatro cepas bacterianas ensayadas crecieron en presencia de las tintas de impresión, pues se observó turbidez en todos los tubos de ensayo.

Todas las cepas presentaron actividad decolorativa para al menos una de las tintas de impresión, *C. pinatubonensis* JMP134 y *S. chilensis* S37 presentaron actividad para un solo tipo de tinta, negra y magenta, respectivamente, mientras que *Cupriavidus* sp. PZK y *Cupriavidus* sp. VZ1-40, mostraron actividad decolorativa para tres tipos de tintas en 24 h. La cepa *Cupriavidus* sp. VZ1-40 decoloró completamente las tintas negra, amarilla y magenta, mientras que *Cupriavidus* sp. PZK presentó actividad

decolorante para el mismo espectro de tintas, pero sólo de manera parcial. Por otra parte, ninguna de las cepas mostró actividad con la tinta ciano.

De acuerdo con estos resultados, se seleccionó la cepa *Cupriavidus* sp. VZ1-40 debido a su capacidad para remover por completo el color de tres de las tintas de impresión en 24 h como se observa en la Figura 4.



**Figura 4.** Decoloración de tintas de impresión por *Cupriavidus* sp. VZ1-40 luego de 24 h de incubación a 30 °C en condiciones estáticas. **(a)** control abiótico; **(b)** cultivo VZ1-40. Los tubos representan de izquierda a derecha; control (sin tinta); tinta negra; tinta amarilla; tinta magenta; tinta ciano.

## 5.2. Efecto de la presencia/ausencia de glucosa o extracto de levadura en la decoloración

Los resultados del potencial de decoloración de *Cupriavidus* sp. VZ1-40 a las 24 h de incubación en presencia/ausencia de glucosa o extracto de levadura se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Decoloración de tintas de impresión (0,025%) por *Cupriavidus* sp. VZ1-40 en presencia o ausencia de glucosa o extracto de levadura después de 24 h de incubación a 30°C y condiciones estáticas.

Medio de cultivo	Negra	Amarilla	Magenta	Cian
Control (MMR)	++	++	++	-
MM	-	-	-	-
MM -N	-	-	-	-
MM -N +G	-	-	-	-
MM +G	+	+	+	-
MM +EL	+	++	++	-

++: Decoloración completa, +: Decoloración parcial, -: Sin decoloración

Se observó que la ausencia de glucosa (MM +EL) no afectó la decoloración de las tintas amarilla y magenta, pero sí de la tinta negra obteniéndose sólo una decoloración parcial.

En medio mínimo (MM), medio mínimo con ausencia de nitrógeno (MM -N) y medio mínimo con ausencia de nitrógeno suplementado con glucosa (MM -N +G) no se observó decoloración de ninguna de las tintas, y tampoco se detectó turbidez de los cultivos, indicativo de ausencia de crecimiento bacteriano. Los tubos con tinta ciano se mantuvieron sin modificaciones en todas las condiciones.

### 5.3. Efecto de la concentración de tinta en la decoloración

El potencial de decoloración de *Cupriavidus* sp. VZ1-40 en diferentes concentraciones de tintas de impresión (0,025–5% v/v) en MMR se muestra en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Decoloración de diferentes concentraciones de tintas de impresión por *Cupriavidus* sp. VZ1-40 después de 24 h de incubación en MMR a 30 °C y condiciones estáticas.

Concentración (%v/v)	Negra	Amarilla	Magenta	Cian
0.025	++	++	++	-
0.05	++	++	++	-
0.1	+	+	++	-
0.2	-	+	++	-
0.5	-	+	+	-
1	-	-	-	-
5	-	-	-	-

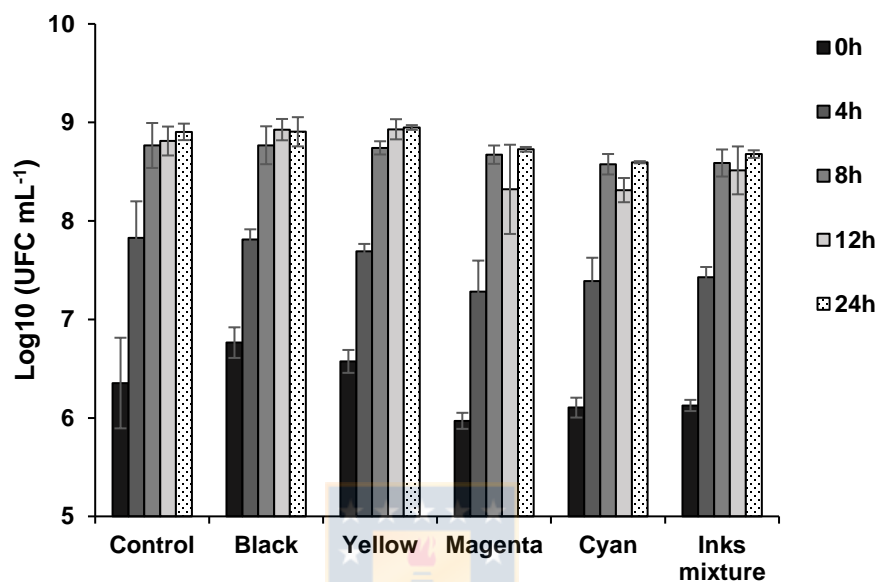
++: Decoloración completa, +: Decoloración parcial, -: Sin decoloración

A las 24 h de incubación en condiciones estáticas, se observó la decoloración completa de la tinta magenta en concentraciones desde 0,025 a 0,2%, mientras que con las tintas negra y amarilla no se detectó una remoción completa en concentraciones superiores a 0,05%. En ninguna de las concentraciones ensayadas se detectó decoloración de la tinta ciano. De acuerdo con estos resultados, se utilizó una concentración inicial de 0,05% v/v para los experimentos posteriores de decoloración.

### 5.4. Crecimiento bacteriano

El crecimiento de *Cupriavidus* sp. VZ1-40 en presencia de las tintas de impresión (0,05%) se muestra en el Figura 5 y se detallan los recuentos de bacterias viables en la Tabla 6.

Los resultados indican que las tintas de impresión no afectan el recuento bacteriano viable en comparación con el control (sin tinta) después de 24 h de incubación a 30 °C, pues no se observan diferencias significativas.

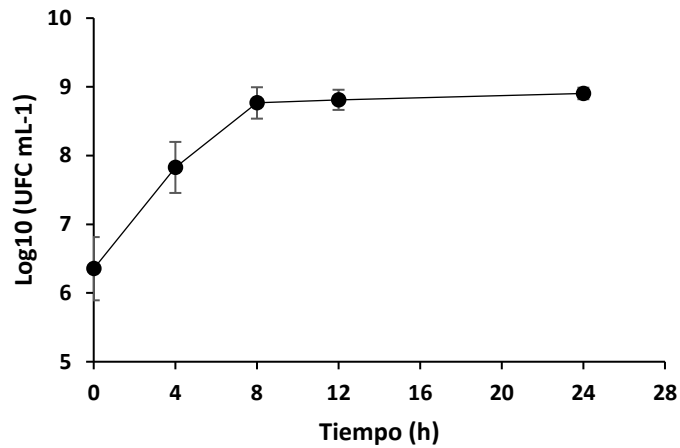


**Figura 5.** Recuento bacteriano viable de *Cupriavidus* sp. VZ1-40 en presencia de tintas de impresión (0,05%) a 30 °C en MMR y condiciones estáticas. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas.

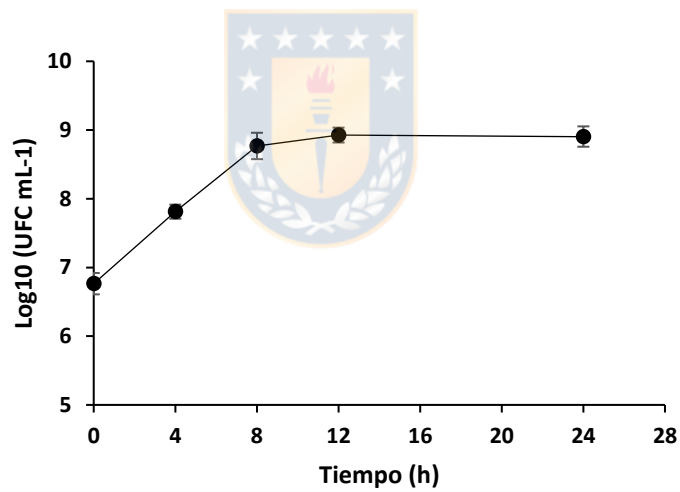
**Tabla 6.** Recuento bacteriano viable de *Cupriavidus* sp. VZ1-40 en presencia de tintas de impresión (0,05%) a 30 °C en MMR y condiciones estáticas.

Tintas	Recuento bacteriano viable* (Log <sub>10</sub> UFC mL <sup>-1</sup> )				
	0h	4h	8h	12h	24h
Control (sin tinta)	6,35 ± 0,46	7,83 ± 0,37	8,77 ± 0,23	8,81 ± 0,15	8,90 ± 0,08
Negra	6,76 ± 0,16	7,81 ± 0,10	8,77 ± 0,19	8,93 ± 0,11	8,90 ± 0,15
Amarilla	6,57 ± 0,12	7,69 ± 0,08	8,74 ± 0,07	8,93 ± 0,10	8,95 ± 0,02
Magenta	5,97 ± 0,08	7,28 ± 0,32	8,67 ± 0,09	8,32 ± 0,45	8,73 ± 0,02
Cian	6,10 ± 0,10	7,39 ± 0,24	8,58 ± 0,10	8,31 ± 0,12	8,60 ± 0,01
Mezcla tintas	6,13 ± 0,06	7,43 ± 0,10	8,59 ± 0,14	8,51 ± 0,24	8,68 ± 0,04

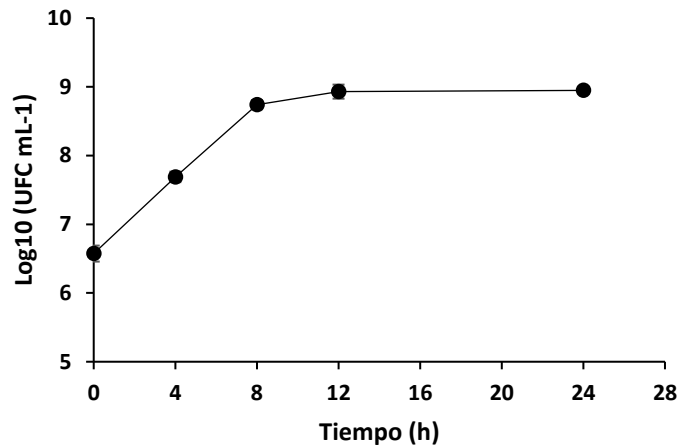
\* Los valores corresponden al promedio de tres replicas



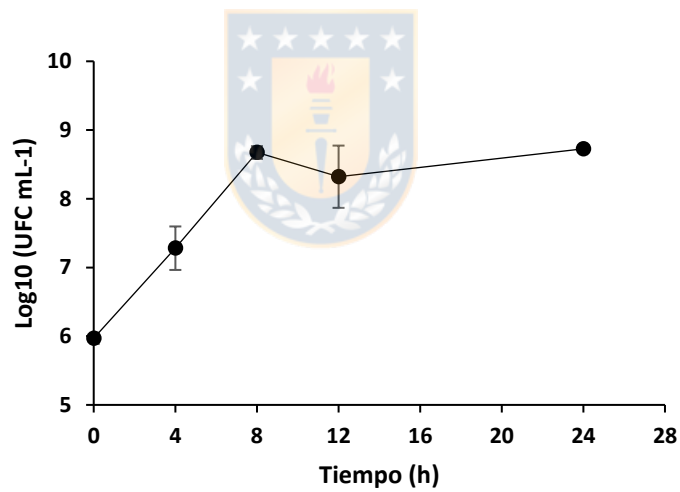
**Figura 6.** Cinética de crecimiento de *Cupriavidus* sp. VZ1-40 en MMR a 30 °C y condiciones estáticas. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas.



**Figura 7.** Cinética de crecimiento de *Cupriavidus* sp. VZ1-40 en MMR suplementado con tinta negra (0,05% v/v) a 30 °C y condiciones estáticas. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas.

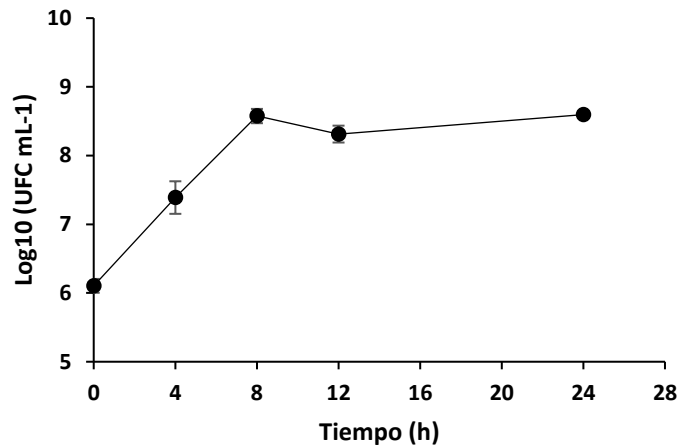


**Figura 8.** Cinética de crecimiento de *Cupriavidus* sp. VZ1-40 en MMR suplementado con tinta amarilla (0,05% v/v) a 30 °C y condiciones estáticas. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas.

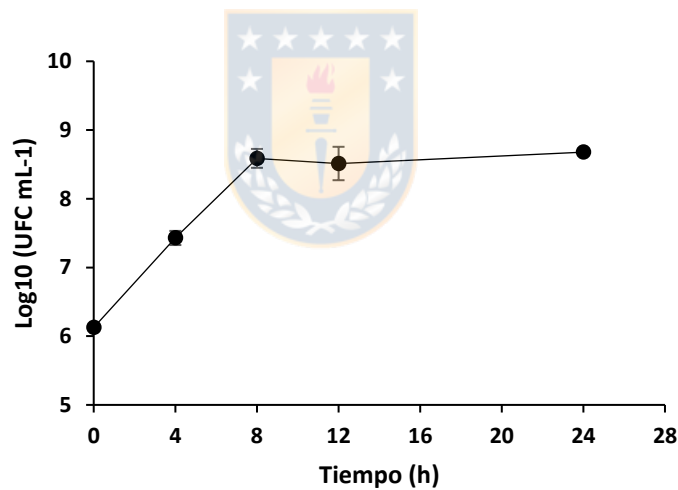


**Figura 9.** Cinética de crecimiento de *Cupriavidus* sp. VZ1-40 en MMR suplementado con tinta magenta (0,05% v/v) a 30 °C y condiciones estáticas. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas.





**Figura 10.** Cinética de crecimiento de *Cupriavidus* sp. VZ1-40 en MMR suplementado con tinta ciano (0,05% v/v) a 30 °C y condiciones estáticas. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas.



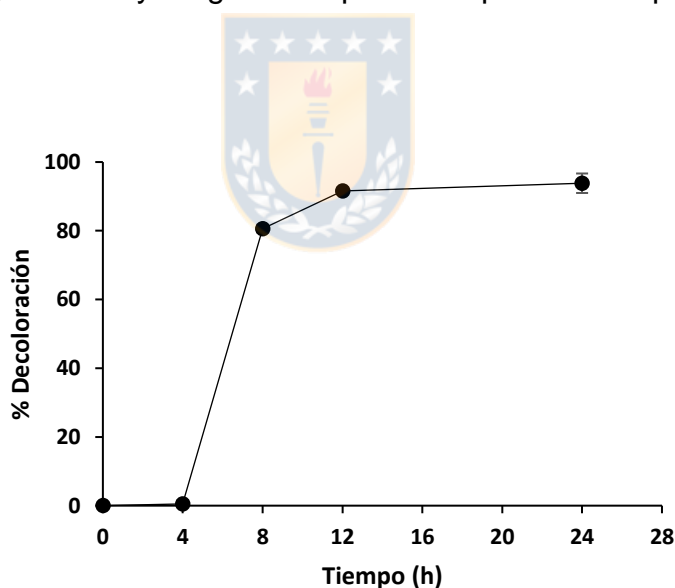
**Figura 11.** Cinética de crecimiento de *Cupriavidus* sp. VZ1-40 en MMR suplementado con una mezcla de las cuatro tintas de impresión (0,05% v/v) a 30 °C y condiciones estáticas. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas.

La cinética de crecimiento de *Cupriavidus* sp. VZ1-40 en MMR sin tinta (Figura 6) nos indicó que esta cepa crece rápidamente en las condiciones ensayadas aumentando

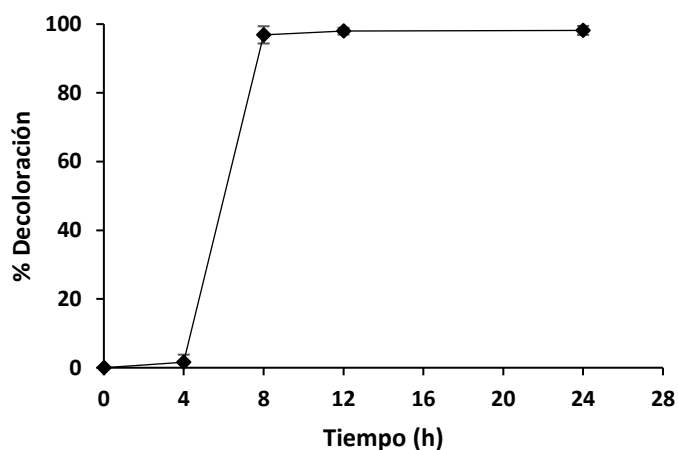
en 1 logaritmo su recuento viable en 4 h y alcanzando su fase estacionaria a las 8 h de incubación. Las cinéticas de crecimiento en presencia de la tinta negra (Figura 7), amarilla (Figura 8), magenta (Figura 9), ciano (Figura 10) o una mezcla con las cuatro tintas de impresión (Figura 11) son similares a la observada en la Figura 6.

### 5.5. Decoloración de tintas de impresión por *Cupriavidus* sp. VZ1-40

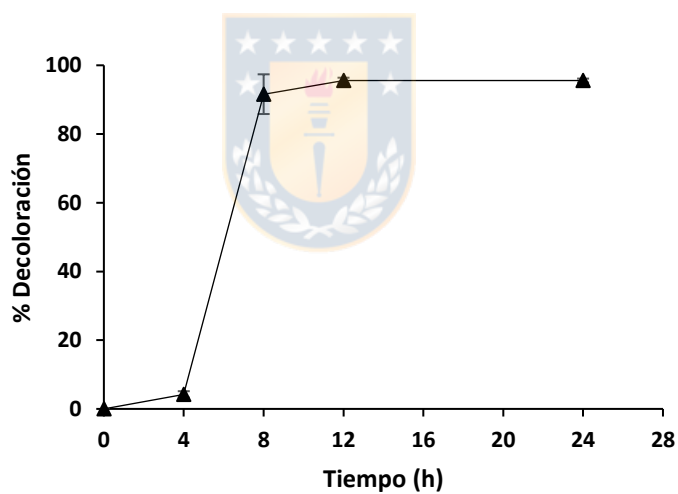
La cepa *Cupriavidus* sp. VZ1-40 presentó una mayor capacidad decolorativa frente a tres tintas de impresión en condiciones estáticas. La decoloración de la tinta negra, amarilla y magenta fue de 94%, 98% y 96%, respectivamente (Figura 12, 13 y 14), mientras que la decoloración de la tinta ciano fue de 15% (Figura 15). La exposición de *Cupriavidus* sp. VZ1-40 a la mezcla de las cuatro tintas mostró que la decoloración de las tintas negra, amarilla y magenta es posible a pesar de la presencia de la tinta ciano (Figura 16).



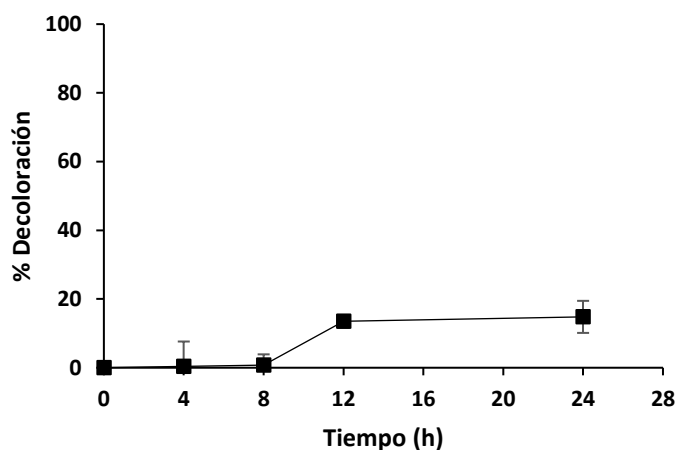
**Figura 12.** Decoloración de tinta negra (0,05% v/v) por *Cupriavidus* sp. VZ1-40 en MMR a 30 °C y condiciones estáticas. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas.



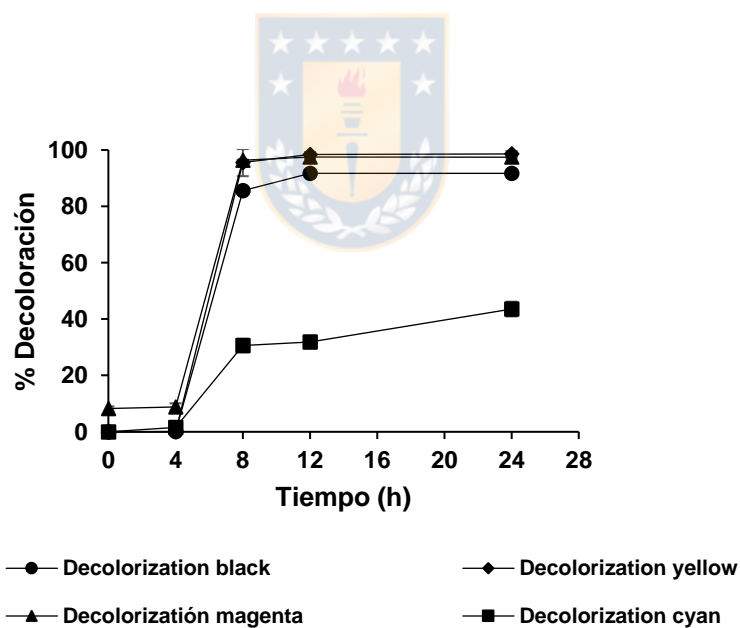
**Figura 13.** Decoloración de tinta amarilla (0,05% v/v) por *Cupriavidus* sp. VZ1-40 en MMR a 30 °C y condiciones estáticas. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas.



**Figura 14.** Decoloración de tinta magenta (0,05% v/v) por *Cupriavidus* sp. VZ1-40 en MMR a 30 °C y condiciones estáticas. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas.



**Figura 15.** Decoloración de tinta ciano (0,05% v/v) por *Cupriavidus* sp. VZ1-40 en MMR a 30 °C y condiciones estáticas. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas.



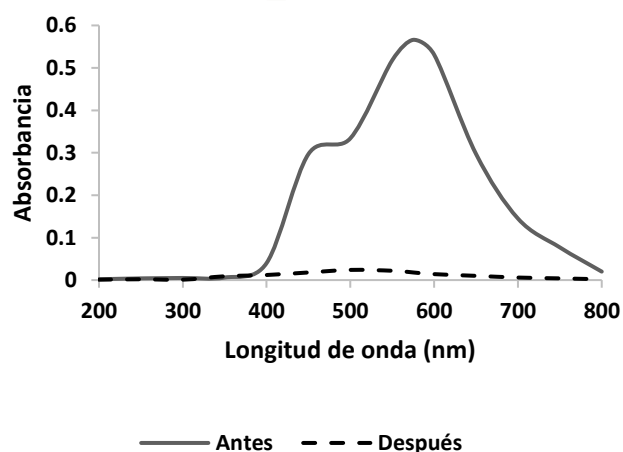
**Figura 16.** Decoloración de una mezcla de las cuatro tintas de impresión (0,05% v/v) por *Cupriavidus* sp. VZ1-40 en MMR a 30 °C y condiciones estáticas. Las barras de error representan la desviación estándar de tres réplicas.

Los resultados indican que la decoloración de las tintas de impresión comienza a las 4 h de incubación con *Cupriavidus* sp. VZ1-40, con excepción de la tinta ciano que ocurre a las 8 h. La tinta amarilla y magenta alcanzaron su máximo porcentaje de decoloración en un período de incubación de 12 h y la tinta negra en 24 h.

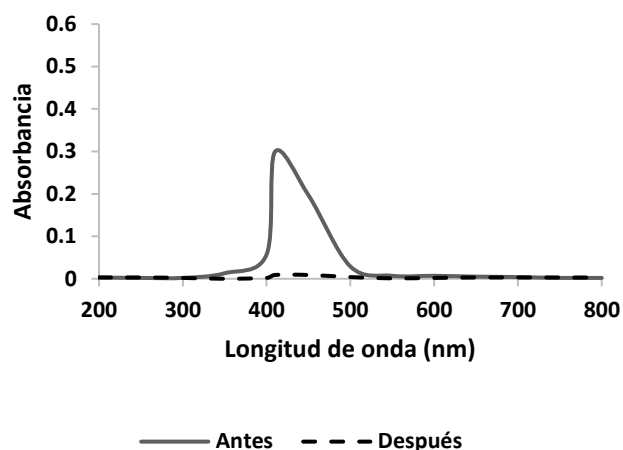
Se observó que luego de la centrifugación, el sedimento celular de los cultivos con tinta ciano adquirió el color celeste de la tinta, por el contrario, los correspondientes a las otras tintas fueron incoloros.

## 5.6. Análisis espectroscópico UV-Vis

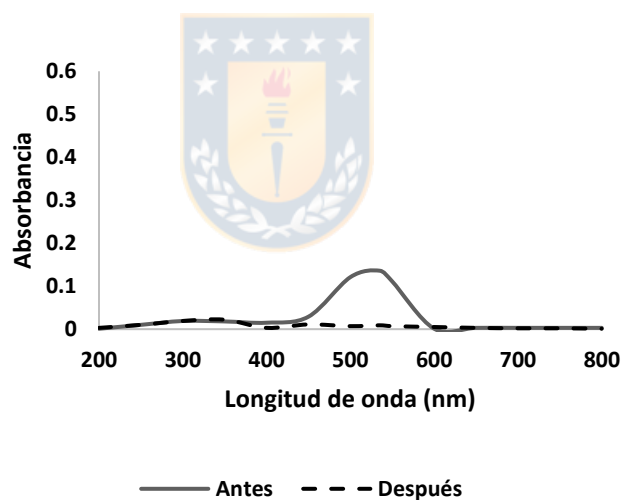
Se caracterizaron las tintas de impresión obteniendo sus espectros de absorción (200–800 nm) antes de la incubación con *Cupriavidus* sp. VZ1-40 (control abiótico) para posteriormente evaluar la biodegradación de sus colorantes a las 24 h de incubación con *Cupriavidus* sp. VZ1-40. La tinta negra, amarilla, magenta y ciano tuvieron sus picos de absorbancia a 575, 410, 535 y 625 nm, respectivamente.



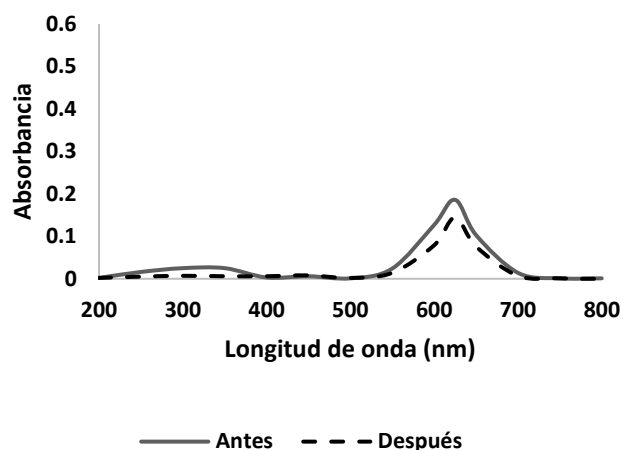
**Figura 17.** Espectros de absorción UV-Vis de tinta negra (0,05%) antes y después de 24 h de incubación con *Cupriavidus* sp. VZ1-40 en MMR a 30 °C y condiciones estáticas.



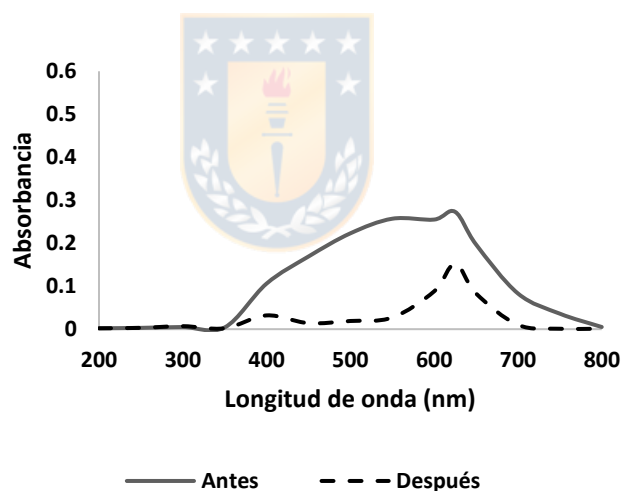
**Figura 18.** Espectros de absorción UV-Vis de tinta amarilla (0,05%) antes y después de 24 h de incubación con *Cupriavidus* sp. VZ1-40 en MMR a 30 °C y condiciones estáticas.



**Figura 19.** Espectros de absorción UV-Vis de tinta magenta (0,05%) antes y después de 24 h de incubación con *Cupriavidus* sp. VZ1-40 en MMR a 30 °C y condiciones estáticas.



**Figura 20.** Espectros de absorción UV-Vis de tinta ciano (0,05%) antes y después de 24 h de incubación con *Cupriavidus* sp. VZ1-40 en MMR a 30 °C y condiciones estáticas.



**Figura 21.** Espectros de absorción UV-Vis de una mezcla de las cuatro tintas de impresión (0,05%) antes y después de 24 h de incubación con *Cupriavidus* sp. VZ1-40 en MMR a 30 °C y condiciones estáticas.

Los análisis UV-Vis de los sobrenadantes después de 24 h de incubación con *Cupriavidus* sp. VZ1-40 mostraron una disminución en su absorbancia máxima y no se detectó la aparición de nuevos picos en otras partes de los espectros.

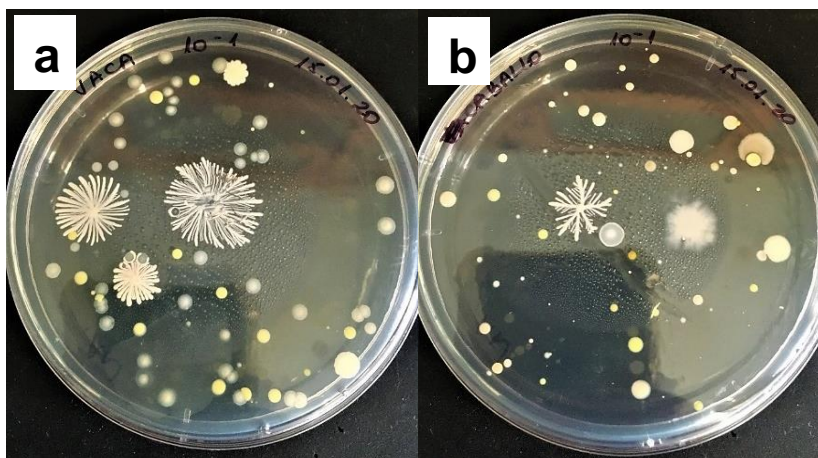
Los cambios más evidentes se observaron en los espectros de la tinta negra, amarilla y magenta, en donde los picos de absorbancia no fueron detectados después de la incubación con *Cupriavidus* sp. VZ1-40 (Figura 17, 18 y 19). En contraste, la forma del espectro de la tinta ciano no se modificó, pero si se detectó una disminución en la absorbancia a 625 nm de un 23% (Figura 20).

El espectro de absorción de *Cupriavidus* sp. VZ1-40 expuesta a la mezcla de tintas (Figura 21) mostró que luego de 24 h de incubación únicamente la tinta ciano queda en el medio de cultivo, pues es igual al espectro observado en la Figura 20.

## 5.7. Selección de bacterias con potencial para degradar celulosa

### 5.7.1. Aislamiento de cepas bacterianas

Se aislaron en total 20 cepas bacterianas, 5 cepas desde fecas de vaca (Figura 22a), 10 desde fecas de caballo (Figura 22b) y 5 desde el tracto digestivo de *Eisenia foetida* (lombrices de tierra). Las características macroscópicas de las cepas aisladas se dan a conocer en la Tabla 7.



**Figura 22.** Aislamiento de bacterias en agar nutritivo después de 72 h de incubación a 30 °C. **(a)** Fecas de vaca; **(b)** Fecas de caballo.



**Tabla 7.** Cepas bacterianas aisladas y sus características macroscópicas.

Cepas	Lugar de aislamiento	Características Macroscópicas		
		Tamaño	Forma	Color
EV1	Fecas de vaca	Grande	Roseta	Blanco
EV2	Fecas de vaca	Mediano	Irregular	Blanco
EV3	Fecas de vaca	Pequeño	Circular	Amarillo
EV4	Fecas de vaca	Mediano	Circular	SC
EV5	Fecas de vaca	Mediano	Circular	Blanco
EC1	Fecas de caballo	Grande	Rizoide	Blanco
EC2	Fecas de caballo	Pequeño	Circular	Rosado
EC3	Fecas de caballo	Pequeño	Circular	Naranja
EC4	Fecas de caballo	Pequeño	Circular	Amarillo
EC5	Fecas de caballo	Mediano	Circular	Amarillo
EC6	Fecas de caballo	Grande	Irregular	Blanco
EC7	Fecas de caballo	Mediano	Circular	Rosado
EC8	Fecas de caballo	Grande	Circular	Blanco
EC9	Fecas de caballo	Mediano	Circular	SC
EC10	Fecas de caballo	Mediano	Circular	Blanco
L1-1	Intestino de lombriz	Grande	Circular	SC
L1-4	Intestino de lombriz	Pequeño	Circular	Blanco
L1-5	Intestino de lombriz	Pequeño	Circular	Amarillo
L2-2	Intestino de lombriz	Grande	Irregular	SC
L2-4	Intestino de lombriz	Grande	Circular	Blanco

SC: Sin color aparente

### 5.7.2. Actividad celulolítica

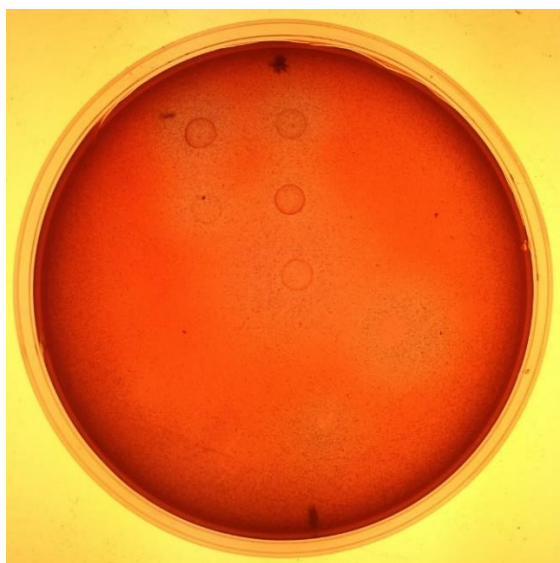
Se evaluó el potencial celulolítico de las cepas bacterianas en agar celulosa (AC), carboximetilcelulosa (CMC), CMC + soluciones trazas (CMC +ST) y CMC +ST +Vitaminas (CMC +ST +V) utilizando el método de tinción con colorante Rojo Congo. La ausencia de color rojo alrededor de las colonias bacterianas fue el indicador de que la celulosa se estaba degradando (halos de degradación) y los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Degradación de celulosa por cepas bacterianas aisladas desde fecas de herbívoros (vaca y caballo) y del tracto digestivo de *Eisenia foetida* (lombrices de tierra) después de 72 h de incubación a 30 °C.

Cepas	AC	CMC	CMC +ST	CMC +ST +V
EV-1	+	+	+	+
EV-2	+	-	-	-
EV-3	-	-	-	-
EV-4	-	-	-	-
EV-5	+	-	-	-
EC-1	+	+	+	+
EC-2	-	-	-	-
EC-3	-	-	-	-
EC-4	-	-	-	-
EC-5	-	-	-	-
EC-6	+	-	-	-
EC-7	-	-	-	-
EC-8	-	-	-	-
EC-9	-	-	-	-
EC-10	-	-	-	-
L1-1	+	-	-	-
L1-4	-	-	-	-
L1-5	-	-	-	-
L2-2	+	-	-	-
L2-4	-	-	-	-

+: Presencia halo, -: Ausencia halo

En el medio AC (Figura 23), 7 cepas bacterianas (EV1, EV2, EV5, EC1, EC6, L1-1 y L2-2) presentaron actividad celolítica en 72 h, mientras que en los medios que contenían CMC (CMC, CMC +ST y CMC +ST +V) solamente fueron 2 cepas (EV1 y EC1). Las cepas EV1 y EC1 mostraron actividad celolítica para los cuatro medios de cultivo ensayados. Sin embargo, se seleccionó la cepa EV1 debido a que sus halos de degradación fueron levemente más grandes que los de EC1.



**Figura 23.** Actividad celulolítica por cepas bacterianas aisladas desde fecas de herbívoros (vaca y caballo) y del tracto digestivo de *Eisenia foetida* (lombrices de tierra) después de 72 h de incubación en AC a 30 °C.

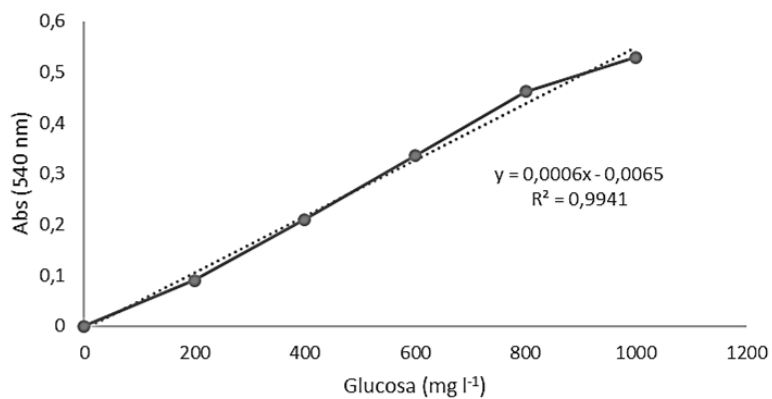
### **5.8. Cuantificación de azúcares reductores generados luego de la degradación de celulosa**

Los azúcares reductores liberados al caldo de cultivo fueron medidos utilizando el método colorimétrico con ácido dinitrosalisílico (DNS). Este es un método indirecto para cuantificar la degradación de la celulosa. Sin embargo, aunque se detectó actividad celulolítica en los ensayos realizados previamente en placa, no se detectaron azúcares reductores en los sobrenadantes, tanto en condiciones estáticas, como en agitación. En la Tabla 9 se muestran los resultados de absorbancia obtenidos y en la Figura 24 la curva de calibración.

**Tabla 9.** Lecturas de absorbancia a 540 nm.

Glucosa (mg L <sup>-1</sup> )	Absorbancia (540 nm)
0	0
200	0,09
400	0,21
600	0,335
800	0,461
1000	0,529
A-R1	0,001
A-R2	0,001
A-R3	0,004
S/A-R1	-0,001
S/A-R2	-0,002
S/A-R3	0,001

A: agitación, S/A: sin agitación, R1: replica 1, R2: replica 2, R3: replica 3



**Figura 24.** Curva de calibración de glucosa desde 0 a 1.000 mg L<sup>-1</sup>.

## 5.9. Identificación de las cepas bacterianas

Las cepas bacterianas seleccionadas como más promisorias para la degradación de tintas de impresión y celulosa correspondieron a VZ1-40 y EV1, respectivamente. La cepa EV1 fue identificada sobre la base de su secuencia de ADNr 16S como *Enterococcus faecalis* (Figura 25). En contraste, la identificación molecular de la cepa VZ1-40 no fue posible debido a la contaminación de la muestra enviada a secuenciar (Figura 26). Sin embargo, previamente fue identificada mediante pruebas bioquímicas como parte del género *Cupriavidus* (Domínguez *et al.* 2002).

Subject						Score		Identities	
Accession	Description	Length	Start	End	Coverage	Bit	E-Value	Match/Total	Pct.(%)
LN681572.1	Enterococcus faecalis	1513	1	1497	98	2752	0.0	1495/1497	99

Figura 25. Resultado de secuenciación cepa EV1

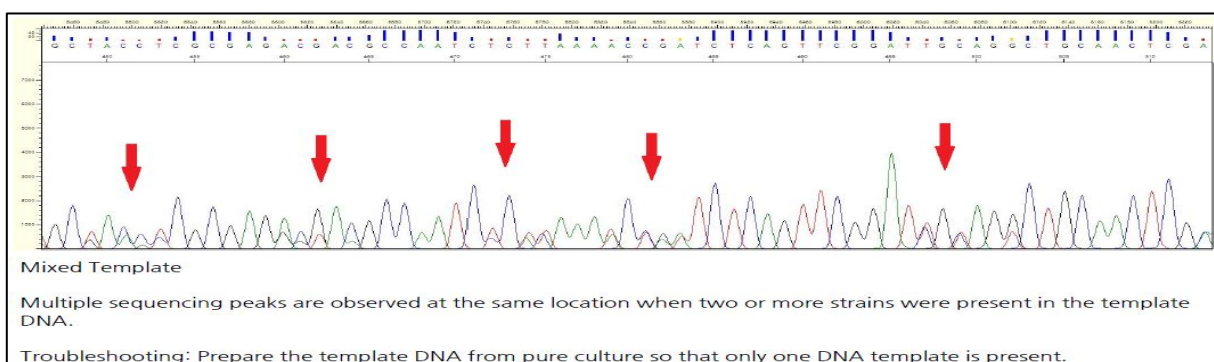


Figura 26. Resultado de secuenciación *Cupriavidus* sp. VZ1-40

## 6. DISCUSIÓN

Las tintas de impresión son tintes con estructuras aromáticas complejas que dificultan su biodegradación (Nyman & Hakala 2011). Sin embargo, estudios anteriores demostraron que las cepas bacterianas *Cupriavidus* sp. VZ1-40, *Cupriavidus* sp. PZK, *Sphingopyxis chilensis* S37 y *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 tienen capacidades metabólicas para degradar otros compuestos con estructuras aromáticas (Clément *et al.* 1995; Aranda *et al.* 1999, 2003; Padilla *et al.* 2000; Domínguez *et al.* 2002; Godoy *et al.* 2003). Según nuestros resultados, esta propiedad degradativa estaría relacionada con la capacidad para decolorar las tintas de impresión, ya que todas ellas mostraron actividad para al menos una de las tintas.

*Cupriavidus* sp. VZ1-40 y *Cupriavidus* sp. PZK mostraron un mayor potencial de decoloración en comparación con *Sphingopyxis chilensis* S37 y *Cupriavidus pinatubonensis* JMP134 al decolorar tres tipos de tintas de impresión (negro, amarillo y magenta). Sin embargo, *Cupriavidus* sp. VZ1-40 fue la cepa que mostró mayor eficiencia pues se obtuvo la eliminación completa del color de las tintas en 24 h, mientras que con *Cupriavidus* sp. PZK la decoloración en este mismo periodo fue parcial, sugiriendo que esta cepa necesita más tiempo para su metabolización.

Dado que la presencia de fuentes de carbono y nitrógeno en el medio de cultivo podría tener un efecto estimulante en los sistemas enzimáticos que intervienen en la decoloración (Jadhav *et al.* 2010), se estudió el efecto de la glucosa y el extracto de levadura en la decoloración de las tintas de impresión. La decoloración completa de la tinta negra (negro de carbón) sólo ocurrió en presencia de glucosa y extracto de levadura, mientras que las tintas amarilla y magenta (tintes azoicos) también se decoloraron en el medio mineral (MM) complementado únicamente con extracto de levadura (Tabla 4). De hecho, el extracto de levadura se ha descrito como un requisito eficaz para promover la decoloración de los tintes azoicos (Rajeswari *et al.* 2011). Muchos cultivos puros como *Pseudomonas luteola*, *Klebsiella pneumoniae* y

*Aeromonas hydrophila* han demostrado la capacidad para decolorar diferentes azocolorantes en presencia de extracto de levadura (Elisangela *et al.* 2009). Esta fuente de nitrógeno orgánico favorece la generación de NADH+H que puede transferir electrones permitiendo la reducción de los azocolorantes por parte de los microorganismos (Khehra *et al.* 2006).

Por el contrario, tanto en el MM, sin la adición de una fuente externa de carbono, como en los medios sin nitrógeno (MM -N y MM -N +G), no se detectó decoloración de las tintas, ni crecimiento de la cepa. Esto es indicativo de que *Cupriavidus* sp. VZ1-40 no puede utilizar tintas de impresión como única fuente de carbono o nitrógeno. Garg *et al.* (2020) sugieren recientemente que se requiere la aclimatación de los cultivos bacterianos para que un colorante actúe como única fuente de carbono. Sin embargo, debido a la naturaleza intrínsecamente recalcitrante de las tintas, la mayoría de los microorganismos generalmente no pueden utilizarlas como única fuente de carbono o nitrógeno (Jamee & Siddique 2019).

El efecto de la concentración de la tinta en la decoloración indicó que *Cupriavidus* sp. VZ1-40 puede decolorar completamente concentraciones más altas de tinta magenta (0,2%), que de tinta negra o amarilla (0,05%), posiblemente esto se deba a la presencia de un solo enlace azoico (N = N) en la estructura de la tinta magenta (monoazo), pues se ha descrito que un número menor de enlaces azoicos facilita la decoloración (Elisangela *et al.* 2009).

Las concentraciones más altas de tinta mostraron una disminución de la capacidad de la cepa bacteriana para decolorarlas y en concentraciones aún más altas, como 1% y el 5%, no se detectó decoloración. La menor capacidad de decoloración a medida que aumenta la concentración de tinta se debe probablemente al efecto tóxico de los tintes en las células bacterianas, mediante mecanismos de inhibición de la actividad metabólica (Sumathi & Manju 2000), la inactivación del sistema de

transporte de los tintes o el bloqueo de los sitios activos de las enzimas por las moléculas de los tintes (Vijaykumar *et al.* 2007) o por la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos (Chen *et al.* 2003; Asad *et al.* 2007).

Los experimentos de decoloración demostraron una eficiente decoloración de las tintas negra, amarilla y magenta por *Cupriavidus* sp. VZ1-40 cuando se utilizó MMR y una concentración de tinta del 0,05% (v/v). Por el contrario, en condiciones idénticas, la decoloración de la tinta ciano era baja, no superando el 15% después de 24 h de incubación. La eficacia de la decoloración microbiana depende de la supervivencia, la adaptabilidad y la complejidad de la estructura química de los tintes (Saratale *et al.* 2010; Jamee & Siddique 2019). Sin embargo, el crecimiento de *Cupriavidus* sp. VZ1-40 no se vio afectado por la presencia de la tinta ciano, pues es posible que la compleja estructura química de la ftalocianina de cobre no fuera un sustrato adecuado para las enzimas de esta cepa bacteriana, lo que explica las bajas actividades de decoloración obtenidas, de modo que la tinta ciano fue más recalcitrante a la decoloración microbiana, al igual como sugieren Camarero *et al.* (2005) y Šušla *et al.* (2007).

La decoloración bacteriana de los tintes suele atribuirse a la biodegradación, que consiste en la reducción de las moléculas de los tintes por medio de vías metabólicas que incluyen diversas enzimas (Asad *et al.* 2007; Garg *et al.* 2020). La azorreductasa es la principal enzima que interviene en la degradación microbiana de los azocolorantes y su actividad implica la escisión reductora de los enlaces azoicos (N = N) (Chang *et al.* 2001). En cambio, para la degradación de los colorantes de ftalocianina de cobre se ha descrito la participación de las lacasas (Heinfling *et al.* 1997; Wang & Yu 1998; Conneely *et al.* 1999, 2002). Nyman y Hakala (2011) observaron una decoloración del 78% del colorante de ftalocianina Direct Blue 86 utilizando lacasas disponibles en el mercado. Sin embargo, estas enzimas se han obtenido de fuentes fúngicas. Nuestros resultados sugieren que *Cupriavidus* sp. VZ1-40 sintetiza las azorreductasas responsables de la decoloración



de la tinta amarilla y magenta, pero no produce enzimas lacasas, las cuales serían las necesarias para la decoloración de la tinta ciano.

Los análisis espectrales UV-Vis (200-800 nm) después de la decoloración por *Cupriavidus* sp. VZ1-40 mostraron una disminución de los picos de absorbancia de las tintas negra, amarilla y magenta ( $\lambda_{\text{máx}}$  575, 410 y 535 nm, respectivamente). Según Chang y Kuo (2000), si la eliminación del colorante se atribuye a la biodegradación, el principal pico de absorbancia desaparecerá o aparecerá un nuevo pico en el espectro. Por lo tanto, la decoloración de las tintas negra, amarilla y magenta puede atribuirse a la biodegradación, debido a que desaparecieron los picos observados y tampoco se detectaron nuevos picos de absorbancia en los sobrenadantes. Estos resultados sugirieron que las moléculas de colorante fueron mineralizadas por *Cupriavidus* sp. VZ1-40. En cambio, el espectro UV-Vis de la tinta ciano se mantuvo de manera similar después de la incubación con *Cupriavidus* sp. VZ1-40, pero con una disminución de la absorbancia a  $\lambda_{\text{máx}}$  (625 nm), lo que sugiere podría ser consecuencia de procesos de bioadsorción, dado que esta implica la captura de los colorantes en la biomasa microbiana sin destruir el contaminante (Gunasekar *et al.* 2013) y, si ese es el caso, los picos de absorción UV-Vis disminuyen proporcionalmente (Chen *et al.* 2004; Asad *et al.* 2007). Por otro lado, esto fue evidente en el pellet de células bacterianas recogidas tras la centrifugación porque adquirieron el color azul de la tinta.

El espectro de absorción correspondiente a la mezcla de tintas indica que sólo la tinta ciano permanece en el medio de cultivo después de la incubación con *Cupriavidus* sp. V1-40, lo que demuestra que su presencia no evita la decoloración y metabolización de las demás tintas. Por lo tanto, *Cupriavidus* sp. VZ1-40 mostró una capacidad de decoloración efectiva incluso cuando se expuso a una mezcla de las tintas de impresión, a pesar de la persistencia de la tinta de ciano, ocurrió la decoloración y degradación de sus colorantes. Los resultados sugieren que la cepa *Cupriavidus* sp. VZ1-40 es muy prometedora para la implementación de sistemas

de tratamiento de efluentes que contengan tintas de impresión. Sin embargo, es necesario evaluar en detalle los productos formados luego de la biodegradación y su potencial toxicidad.

El uso de Rojo Congo como indicador de la degradación de la celulosa en un medio de agar proporciona la base para una prueba de detección rápida y sensible para las bacterias celulolíticas (Gupta *et al.* 2012). Las colonias que mostraron decoloración del colorante fueron consideradas como colonias bacterianas degradadoras de celulosa. En este trabajo detectamos bacterias celulolíticas aisladas desde el intestino de *Eisenia foetida* (lombriz de tierra). Sin embargo, dado que el intestino de la lombriz de tierra está libre de oxígeno detectable, se estima que la digestión de la celulosa se lleva a cabo principalmente por microorganismos anaerobios. Sin embargo, los anaerobios celulolíticos aún no se han aislado del intestino de la lombriz de tierra. Si bien hay muchos informes sobre el aislamiento de degradadores de celulosa en el intestino de insectos como las termitas, pocos estudios han aislado o identificado a sus homólogos en el intestino de lombriz (Fujii *et al.* 2012).

La actividad celulolítica de los microorganismos puede ser explicada por la capacidad para sintetizar enzimas, como las celulasas que llevan a cabo la hidrólisis de la celulosa y otros polisacáridos (Wierzba & Nabrdalik 2007). Las celulasas pertenecen a la familia de las hidrolasas glucosídicas, estas enzimas pueden ser producidas por hongos y bacterias (Wahono *et al.* 2015, Sekar *et al.* 2015, Wertz *et al.* 2010). Sin embargo, las propiedades celulolíticas de *Enterococcus faecalis* han sido poco informadas. La no detección de azúcares reductores en los caldos de cultivo nos sugiere la poca eficiencia de *Enterococcus faecalis* EV1 degradando la celulosa en las condiciones ensayadas en este estudio, probablemente, al ser esta una bacteria anaeróbica sea necesaria esta condición para activar su sistema enzimático. El sistema enzimático de celulasas comprende tres clases de enzimas extracelulares solubles: 1,4-  $\beta$ -endoglucanasa, 1,4-  $\beta$ -exoglucanasa y  $\beta$ -glucosidasa y sólo la

sinergia de las tres enzimas anteriores hace la hidrólisis completa de la celulosa a glucosa, o una posible mineralización completa a H<sub>2</sub>O y CO<sub>2</sub> (Gupta *et al.* 2012). Por lo tanto, sería de gran importancia profundizar en estudios posteriores que incluyan la determinación de la actividad de las celulasas, para poder determinar con mayor exactitud si las colonias bacterianas aisladas presentan un potencial en cuanto a producción de enzimas celulolíticas.



## 7. CONCLUSIONES

7.1. En este trabajo se determinó que bacterias aisladas de ambientes contaminados y que poseen capacidades para metabolizar otros compuestos tóxicos, pueden decolorar y degradar tintas de impresión. Además, se informa la eficiente decoloración, por separado y en mezcla, de tres tipos de tintas de impresión (negra, amarilla y magenta) por la cepa bacteriana *Cupriavidus* sp. VZ1-40, lo cual fue consecuencia de la biodegradación de sus colorantes. Por lo tanto, se concluye que *Cupriavidus* sp. VZ1-40 tiene potencial para ser utilizada en el tratamiento y descontaminación de tintas de impresión presentes en los efluentes de la industria del papel reciclado. Sin embargo, se requieren más estudios para evaluar sus capacidades en presencia de otros microorganismos y su comportamiento con otras variables ambientales.

7.2. Por otra parte, se aislaron bacterias celulolíticas desde fecas de herbívoros y del tracto digestivo de *Eisenia foetida* (lombriz de tierra), pero no se detectó la formación de azúcares reductores esperables a la degradación de la celulosa, sugiriendo que las bacterias celulolíticas aisladas en este trabajo no son eficientes degradando celulosa en condiciones aeróbicas. Sin embargo, es necesario evaluar otras técnicas para detectar directamente la degradación de la celulosa.

## 8. BIBLIOGRAFIA

Aquino JM, Rocha-Filho RC, Sáez C, Cañizares P, Rodrigo MA (2014) High efficiencies in the electrochemical oxidation of an anthraquinonic dye with conductive-diamond anodes. *Environ Sci Pollut Res Int* 21(14): 8442-8450.

Aranda C, Godoy F, Becerra J, Barra R, Martínez M (2003) Aerobic secondary utilization of a non-growth and inhibitory substrate 2, 4, 6-trichlorophenol by *Sphingopyxis chilensis* S37 and *Sphingopyxis-like* strain S32. *Biodegradation* 14(4): 265-274.

Aranda C, Godoy F, González B, Homo J, Martínez M (1999) Effects of glucose and phenylalanine upon 2, 4, 6-trichlorophenol degradation by *Pseudomonas paucimobilis* S37 cells in a no-growth state. *Microbios* 100(396): 73.

Asad S, Amoozegar MA, Pourbabaee A, Sarbolouki MN, Dastgheib SMM (2007) Decolorization of textile azo dyes by newly isolated halophilic and halotolerant bacteria. *Bioresour Technol* 98(11): 2082-2088.

Ayed L, Chaieb K, Cheref A, Bakhrouf A (2009) Biodegradation of triphenylmethane dye Malachite Green by *Sphingomonas paucimobilis*. *World J Microbiol Biotechnol* 25(4): 705.

Bajpai P (2013) *Recycling and deinking of recovered paper*. Elsevier, Amsterdam.

Balea A, Monte MC, De la Fuente E, Negro C, Blanco Á (2017) Application of cellulose nanofibers to remove water-based flexographic inks from wastewaters. *Environ Sci Pollut Res Int* 24(5): 5049.

Benlurvankar V, Sebastian DA (2015) Bioremoval of inkjet ink and biodeinking of inkjet ink printed paper using *Pseudomonas* sp. OWS1. *Int J Curr Res* 7(3): 13758-13763.

Čabalová I, Kačík F, Geffert A, Kačíková D (2011) The effects of paper recycling and its environmental impact 17: 329-350. InTech, Rijeka.

Camarero S, Ibarra D, Martínez MJ, Martínez ÁT (2005) Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Appl Environ Microbiol* 71(4): 1775-1784.

Clément P, Matus V, Cardenas L, Gonzalez B (1995) Degradation of trichlorophenols by *Alcaligenes eutrophus* JMP134. *FEMS Microbiol Lett* 127(1-2): 51-55.

Chang JS, Chou C, Chen SY (2001) Decolorization of azo dyes with immobilized *Pseudomonas luteola*. *Process Biochem* 36(8-9): 757-763.

Chang JS, Kuo TS (2000) Kinetics of bacterial decolorization of azo dye with *Escherichia coli* NO3. *Bioresour Technol* 75(2): 107-111.

Chen KC, Wu JY, Liou DJ, Hwang SCJ (2003) Decolorization of the textile dyes by newly isolated bacterial strains. *J Biotechnol* 101(1): 57-68.

Chen H, Wang RF, Cerniglia CE (2004) Molecular cloning, overexpression, purification, and characterization of an aerobic FMN-dependent azoreductase from *Enterococcus faecalis*. *Protein Expr Purif* 34(2): 302-310.

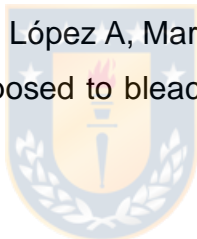
Conneely A, Smyth WF, McMullan G (1999) Metabolism of phthalocyanine textile dye ramazol Reactive blue-25 by *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol Lett* 179(2): 333–337.

Conneely A, Smyth WF, McMullan G (2002) Study of the white-rot fungal degradation of selected phthalocyanine dyes by capillary electrophoresis and liquid chromatography. *Anal Chim Acta* 451(2): 259-270.

Cossolin AS, Reis HCOD, Castro KCD, Santos BAPD, Marques MZ, Parizotto CA, Morais EBD (2019) Decolorization of textile azo dye Reactive Red 239 by the novel strain *Shewanella xiamenensis* G5-03 isolated from contaminated soil. *Rev Amb Água*, 14(6).

De la Cruz B, Fuente D (2013) Obtención de pulpa blanca a partir de papel impreso reciclado mediante el proceso de destintado electrolítico. *Obtenido de Universidad Nacional del Centro del Perú*.

Domínguez VM, Correa J, Vidal G, López A, Martínez M (2002) 2, 4, 6-Trichlorophenol degradation by river sediment exposed to bleached kraft mill discharge. *Bull Environ Cont Toxicol* 69(4): 463-470.



Don RT, Pemberton JM (1981) Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligenes paradoxus* and *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* 145(2): 681-686.

Elisangela F, Andrea Z, Fabio DG, De Menezes CR, Regina DL, Artur CP (2009) Biodegradation of textile azo dyes by a facultative *Staphylococcus arlettae* strain VN-11 using a sequential microaerophilic/aerobic process. *Int Biodeterior Biodegrad* 63(3): 280-288.

Fryberg M (2005) Dyes for ink-jet printing. *Rev Prog Colorat Relat Topics* 35: 1-30.

Fujii K, Ikeda K, Yoshida S (2012) Isolation and characterization of aerobic microorganisms with cellulolytic activity in the gut of endogeic earthworms. *Int Microbiol*, 15(3), 121-30.

Garg N, Garg A, Mukherji S (2020) Eco-friendly decolorization and degradation of reactive yellow 145 textile dye by *Pseudomonas aeruginosa* and *Thiosphaera pantotropha*. *J Environ Managem* 263: 110383.

Ghosh BK, Hazra S, Naik B, Ghosh NN (2015) Preparation of Cu nanoparticle loaded SBA-15 and their excellent catalytic activity in reduction of variety of dyes. *Powder Technol* 269: 371-378.

Godoy F, Vancanneyt M, Martinez M, Steinbüchel A, Swings J, Rehm BHA (2003) *Sphingopyxis chilensis* sp. nov., a chlorophenol-degrading bacterium that accumulates polyhydroxyalkanoate, and transfer of *Sphingomonas alaskensis* to *Sphingopyxis alaskensis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 53(2): 473-477.

Godoy F, Zenteno P, Cerda F, González B, Martínez M (1999) Tolerance to trichlorophenols in microorganisms from a polluted and a pristine site of a river. *Chemosphere* 38(3): 655-662.

Gunasekar V, Gowdhaman D, Ponnusami V (2013) Biodegradation of reactive red M5B dye using *Bacillus subtilis*. *Biodegradation* 5(1): 131-135.

Gupta P, Samant K, Sahu A (2012) Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. *International journal of microbiology*.

Heederik D (1995) Fabricas de Papel Reciclado. Cap. 72.9. *In: Teschke, K.; P. Demers* (eds.) *Industria del Papel y de la Pasta de Papel*. España. pp 1-21.



Heinfling A, Bergbauer M, Szewzyk U (1997) Biodegradation of azo and phthalocyanine dyes by *Trametes versicolor* and *Bjerkandera adusta*. *Appl Microbiol Biotechnol* 48(2): 261-266.

Heldt H (1997) *Plant Biochemistry and Molecular Biology* Oxford University Press. 7p.

Herbert RA (1990) Methods for Enumerating Microorganisms and Determining Biomass in Natural Environments. In *Methods Microbiol* 22: 1-39.

Ibach RE (2005) Biological properties, in *Handbook of wood chemistry and wood composites*, Rowell, R. M. (ed). CRC Press, Boca Raton, Florida 99-120.

Jadhav JP, Govindwar SP (2006) Biotransformation of malachite green by *Saccharomyces cerevisiae* MTCC 463. *Yeast* 23(4): 315-323.

Jadhav JP, Kalyani DC, Telke AA, Phugare SS, Govindwar SP (2010) Evaluation of the efficacy of a bacterial consortium for the removal of color, reduction of heavy metals, and toxicity from textile dye effluent. *Bioresour Technol* 101(1): 165-173.

Jamee R, Siddique R (2019) Biodegradation of synthetic dyes of textile effluent by microorganisms: An environmentally and economically sustainable approach. *Eur J Microbiol Immunol* 9(4): 114-119.

Jiranuntipon S, Chareonpornwattana S, Damronglerd S, Albasi C, Delia ML (2008) Decolorization of synthetic melanoidins-containing wastewater by a bacterial consortium. *J Ind Microbiol Biotechnol* 35(11): 1313-1321.

Kader AJ, Omar O, Feng LS (1999) Isolation of cellulolytic fungi from the Bario Highlands, Sarawak. *ASEAN Review of Biodiversity and Environmental Conservation*, 1-3.

Kalyani DC, Telke AA, Dhanve RS, Jadhav JP (2009) Ecofriendly biodegradation and detoxification of Reactive Red 2 textile dye by newly isolated *Pseudomonas* sp. SUK1. *J Hazard Mater* 163(2-3): 735-742.

Khehra MS, Saini HS, Sharma DK, Chadha BS, Chimni SS (2006) Biodegradation of azo dye CI Acid Red 88 by an anoxic-aerobic sequential bioreactor. *Dyes Pigm* 70(1): 1-7.

Kumar K, Devi SS, Krishnamurthi K, Gampawar S, Mishra N, Pandya GH, Chakrabarti T (2006) Decolorisation, biodegradation and detoxification of benzidine based azo dye. *Bioresour technol* 97(3): 407-413.

Lynd LR, Weimer PJ, Van Zyl WH, Pretorius IS (2002) Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 66(3):506-77.

Madigan M, Martinko J, Parker J (1998) *Biología de los Microorganismos*. Décima edición. Editorial Prentice Hall, Madrid, España. 145-147p.

Marques S, Pala H, Alves L, Amaral-Collaco MT, Gama FM, Girio FM (2003) Characterisation and application of glycanases secreted by *Aspergillus terreus* CCMI 498 and *Trichoderma viride* CCMI 84 for enzymatic deinking of mixed office wastepaper. *J Biotechnol* 100(3): 209-219.

Martínez AR, Ruiz-Dueñas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillén F, Martínez MJ, Gutiérrez A y Río JC (2005) Biodegradation of lignocellulosics: Microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International microbiology*, 8, 195-204.

Mejía T, Mujica F, González A, Ortega J (2002). Protínas con afinidad a celulosa: una herramienta en biotecnología. *Avance y perspectiva*. 21: 267-271.

Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* 31, 426–430.

Mohandass C, Raghukumar C (2005) Biological deinking of inkjet-printed paper using *Vibrio alginolyticus* and its enzymes. *J Ind Microbiol Biotechnol* 32(9): 424-429.

Morana A, Maurelli L, Ionata E, La Cara F y Rossi M (2011). Cellulases from Fungi and Bacteria and their Biotechnological Applications. En: Cellulase: types and action, mechanism and uses, Ed. Golan EG, Nova Science Publishers Inc., New York. pp: 1-80.

Moosvi S, Kher X, Madamwar D (2007) Isolation, characterization and decolorization of textile dyes by a mixed bacterial consortium JW-2. *Dyes Pigm* 74(3): 723-729.

Nyman K, Hakala T (2011) Decolorization of inkjet ink and deinking of inkjet-printed paper with laccase-mediator system. *Bioresources* 6(2): 1336-1350.

Ortiz-Caro M, Muñoz-Castellanos L, Ballinas-Cassarrubias L, Calvillo C & Rascón-Cruz Q (2010). Caracterización de bacterias degradadoras de celulosa. VII Congreso del noreste y III Nacional de Ciencias Alimentarias y Biotecnología. Universidad de Sonora. 98-99p.

Padilla L, Matus V, Zenteno P, González B (2000) Degradation of 2, 4, 6-trichlorophenol via chlorohydroxyquinol in *Ralstonia eutropha* JMP134 and JMP222. *J Basic Microbiol: Int J Biochem, Physiol, Genet, Morphol Ecol Microorganisms* 40(4): 243-249.

Pandey A, Singh P, Iyengar L (2007) Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. *Int Biodeterior Biodegrad* 59(2): 73-84.

Parshetti GK, Kalme SD, Gomare SS, Govindwar SP (2007) Biodegradation of Reactive blue-25 by *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146. *Bioresour Technol* 98(18): 3638-3642.

Rabinovich ML, Melnick MS, Bolobova AV (2002). The structure and mechanism of action of cellulolytic enzymes. *Biochemistry (Mosc)*. 67(8):850-71.

Rajeswari K, Subashkumar R, Vijayaraman K (2011) Biodegradation of mixed textile dyes by bacterial strains isolated from dyewaste effluent. *Res J Environ Toxicol* 5(2): 97-107.

Ramos JMP, Pereira-Queiroz NM, Santos DH, Nascimento JR, De Carvalho CM, Tonholo J, Zanta CL (2019) Printing ink effluent remediation: A comparison between electrochemical and Fenton treatments. *J Water Process Eng* 31: 100803.

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. *Bioresour technol* 77(3): 247-255.

Salcedo Martínez SM (2009) Caracterización de la actividad decolorante de cepas de basidiomicetos nativas sobre colorantes sintéticos (Doctoral dissertation, Universidad Autónoma de Nuevo León).

Sandhya S, Padmavathy S, Swaminathan K, Subrahmanyam YV, Kaul SN (2005) Microaerophilic-aerobic sequential batch reactor for treatment of azo dyes containing simulated wastewater. *Process Biochem* 40(2): 885-890.

Saratale RG, Saratale GD, Chang JS, Govindwar SP (2010) Decolorization and biodegradation of reactive dyes and dye wastewater by a developed bacterial consortium. *Biodegradation* 21(6): 999-1015.

Sekar W, Makhmudun D, Ari H (2015) The production of bioethanol fermentation substrate from *Eucaema Cottonii* seaweed through hydrolysis by cellulose enzyme. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 3, 200-205.

Senan RC, Abraham TE (2004) Bioremediation of textile azo dyes by aerobic bacterial consortium aerobic degradation of selected azo dyes by bacterial consortium. *Biodegradation* 15(4): 275-280.

Shah MP, Patel KA, Nair SS, Darji AM (2013) Microbial decolourization of methyl orange dye by *Pseudomonas* spp. *OA Biotechnol* 2(1): 10.

Shankar T, Mariappan V, Isaiarasu L (2011) Detección de bacterias celulolíticas del intestino medio de la popular lombriz de tierra de compostaje, *Eudrilus eugeniae* (Kinberg). *Revista mundial de zoología* , 6 (2), 142-148.

Sheth NT, Dave SR (2009) Optimisation for enhanced decolourization and degradation of Reactive Red BS CI 111 by *Pseudomonas aeruginosa* NGKCTS. *Biodegradation* 20(6): 827.

Silva LAR (2016) Aislamiento y selección de bacterias celulolíticas a partir de compost de residuos orgánicos. Tesis para optar al título de biólogo-microbiólogo.

Sumathi S, Manju BS (2000) Uptake of reactive textile dyes by *Aspergillus foetidus*. *Enzyme Microb Technol* 27(6): 347-355.

Šušla M, Novotný Č, Svobodová K (2007) The implication of *Dichomitus squalens* laccase isoenzymes in dye decolorization by immobilized fungal cultures. *Bioresour Technol* 98(11): 2109-2115.

Teschke K, Demers P, Teschke K, Keefe A, Teschke K, Astrakianakis G, Teschke K (2008) Industria del papel y de la pasta de papel sectores basados en recursos biológicos.

Thormann MN, Currah RS, Bayley SE (2003) Succession of microfungial assemblages in decomposing peatland plants. *Plant and Soil*, 250, 323-333.

Verma P, Madamwar D (2003) Decolourization of synthetic dyes by a newly isolated strain of *Serratia marcescens*. *World J Microbiol Biotechnol* 19(6): 615-618.

Vijaykumar MH, Vaishampayan PA, Shouche YS, Karegoudar TB (2007) Decolourization of naphthalene-containing sulfonated azo dyes by *Kerstersia* sp. strain VKY1. *Enzyme Microb Technol* 40(2): 204-211.

Wang Y, Yu J (1998) Adsorption and degradation of synthetic dyes on the mycelium of *Trametes versicolor*. *Water Sci Technol* 38(4-5): 233-238.

Wahono SK, Rosyida VT, Darsih C, Pratiwi D, Frediansyah A, Hernawan (2015) Optimization of Simultaneous Saccharification and Fermentation Incubation Time Using Cellulose Enzyme for Flores-Jarillo Mariana et al. / *Publicación Semestral Pádi* No. 11:1–55.

Wertz JL, Bédué O, Mercier JP (2010) *Cellulose Science and Technology*. 1st Ed. EPFL Press Taylor and Francis Group. Boca Ratón FL.

Wierzba S & Nabrdalik M (2007) Biodegradation of cellulose in bottom sediments of Turawa lake. *Physicochemical Problems of Mineral Processing*, 41: 227-235.

Wright MH, Adelskov J, Greene AC (2017) Bacterial DNA extraction using individual enzymes and phenol/chloroform separation. *Journal of microbiology & biology education*, 18(2).

Xie S, Syrenne R, Sun S, Yuan JS (2014). Exploration of Natural Biomass Utilization Systems (NBUS) for advanced biofuel--from systems biology to synthetic design. *Curr Opin Biotechnol*. 27:195-203.

Yesilada O, Asma D, Cing S (2003) Decolorization of textile dyes by fungal pellets. *Process Biochem* 38(6): 933-938.

