

# INFLUENCIA DE LA FUENTE DE NITRÓGENO EN EL MEDIO DE CULTIVO, EN EL CRECIMIENTO DE *RHODOTORULA SP.* DE ORIGEN LÁCTEO.

Autores: M. A. G. Liboa<sup>1</sup>, M. E. Guerín<sup>1</sup>, L. Pegoraro<sup>2</sup>

Tutores: Mg. Lic. Silvia Moyano<sup>3</sup>, Mg. Ing. José M. Peralta<sup>4</sup>.

Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Villa María. Av. Universidad 450, X5900HLR, Villa María, Córdoba, Argentina.

Email: [aleliboa5@hotmail.com](mailto:aleliboa5@hotmail.com)

<sup>1</sup>Estudiantes de Ingeniería Química. <sup>2</sup>Analista de Laboratorio de Química y Microbiología. <sup>3</sup>Jefe de Laboratorio de Química y Microbiología. <sup>4</sup>Profesor Adjunto Dedicación Exclusiva.

---

## Resumen:

El objetivo de este estudio fue determinar la influencia de las fuentes de nitrógeno, utilizadas en medios de cultivos específicos, de levaduras de la especie *Rhodotorula mucilaginosa* aislada de la materia grasa de efluentes lácteos. Las cepas de estos microorganismos han demostrado la capacidad de degradar los componentes grasos en las aguas residuales de producción de biodiesel. El propósito fue definir un medio de cultivo apropiado para el crecimiento de un número elevado de levaduras (aproximadamente  $10^7$ - $10^8$  ufc/ml) para ser utilizado en ensayos de degradación de efluentes lácteos o de otro origen, con alto contenido graso. Los ensayos fueron planeados utilizando un diseño de experimentos de 1 factor con 4 niveles (1 representativo del medio de cultivo básico y 3 con el agregado de una fuente extra de nitrógeno), con réplicas. Los ensayos se realizaron en 2 bloques usando urea, sulfato de amonio y cloruro de amonio como fuentes de nitrógeno extra. En estos experimentos, el crecimiento neto de microorganismos se evaluó midiendo la población de *Rhodotorula sp.* en el tiempo 0 y después de 24 horas de incubación a 30 °C. Los resultados se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) que se complementó con un análisis de residuos para evaluar los supuestos del ANOVA. El número promedio de levaduras alcanzado en los distintos ensayos fue de entre  $10^5$  y  $10^6$  ufc/ml después de 24 horas de incubación. El estudio reveló que no hubo efectos significativos sobre el crecimiento neto de las levaduras en los medios de cultivos utilizados a un nivel de confianza del 95%. Los análisis microbiológicos se realizaron en los laboratorios de la Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Villa María.

## Palabras claves:

Cepas de levadura *Rhodotorula sp.*, degradación de grasas, fuentes de nitrógeno, efluentes lácteos y de biodiesel, diseño de experimentos, ANOVA.

## Abstract:

The aim of this study was to determine the influence of the nitrogen sources in culture media used for the growth of yeast strains of the species *Rhodotorula mucilaginosa*, isolated from fat of dairy effluents. These microorganisms have shown the ability to degrade the fat components in biodiesel wastewaters by what we are looking to define a suitable culture medium for the growth of a number of yeasts (approximately  $10^7$ - $10^8$  cfu/ml) for use in degradation testing of dairy effluent, or other source wastewater, with high fat content. The trials were planned using design of experiments with 1 factor with 4 levels (3 sources of nitrogen enrichment and 1 with no enrichment), with replicas. In these experiments, the net growth of these microorganisms was evaluated by measuring the population of *Rhodotorula sp.* at time 0 and after 24 hours of incubation at 30 °C. The average number of yeasts reached in the experiments was between  $10^5$  y  $10^6$  cfu/ml after 24 hours of incubation. The results were subjected to an analysis of variance (ANOVA), supplemented by a residual analysis to evaluate the assumptions of ANOVA. The study revealed that no significant effect of the nitrogen source was found on the net growth of yeasts in the culture media used, at a

confidence level of 95%. Microbiological analyses were performed in the laboratories of the Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Villa Maria.

### Keywords:

*Rhodotorula sp.* yeast strains, fat degradation, nitrogen sources, dairy and biodiesel effluents, design of experiments, ANOVA.

### Introducción:

Las levaduras son importantes por su capacidad de realizar la descomposición mediante fermentación de diversos cuerpos orgánicos; principalmente los azúcares o hidratos de carbono, produciendo distintas sustancias. Son oxidativas, fermentativas, o bien su actividad metabólica es a la vez de ambos tipos; produciendo enzimas capaces de descomponer diversos sustratos, teniendo gran relevancia en el sector biotecnológico e industrial, ya que son esenciales en la producción de algunos alimentos y bebidas [1, 2]. Para su crecimiento necesitan fuentes de carbono orgánico y nitrógeno mineral u orgánico. El carbono se puede suministrar en forma de azúcares, aldehídos, sales de algunos ácidos orgánicos, glicerina o etanol y ocasionalmente en otra forma dependiendo del tipo de levadura. Todas las levaduras son capaces de utilizar nitrógeno en forma de amonio. Los iones amonio pueden ser aportados en el medio por el cloruro de amonio, el nitrato de amonio, el fosfato amónico y sobre todo el sulfato amónico que es el mejor compuesto ya que aporta al mismo tiempo azufre necesario para la síntesis de ciertos aminoácidos. También se puede utilizar urea, peptona u otros derivados proteicos solubles [3, 4].

Entre las levaduras con capacidad de producir lipasas se resaltan *Candida*, *Rhodotorula* y *Hansenula* [5, 6, 7]. Por otro lado, las levaduras pertenecientes a la especie *Rhodotorula mucilaginosa* demostraron la capacidad de degradar grasas en efluentes de restaurantes [8] y en efluentes de biodiesel [9, 10], lo cual hace que las levaduras pertenecientes a este género, desde el punto de vista biotecnológico, podrían tener aplicación en la degradación de la materia grasa de otros efluentes industriales como los efluentes lácteos. Las levaduras del género *Rhodotorula* crecen rápidamente, son suaves, mucosas, de color rosado y/o rojo anaranjado cremoso o rugoso, color que se manifiesta por su riqueza en carotenoides y facilita su identificación, no fermenta azúcares y produce ureasa [11]. Por su gran composición en carotenoides, este tipo de levaduras puede ser utilizado para la obtención de los mismos por vía biológica [12, 13]



**Figura 1:** Cepas aisladas de *Rhodotorula sp.*

El objetivo de este trabajo fue determinar la influencia de la fuente de nitrógeno (se realizaron ensayos utilizando tres fuentes de nitrógeno extra: urea, sulfato de amonio y cloruro de amonio) en el crecimiento de las mismas aisladas de efluente lácteo, con el propósito de definir un medio de cultivo para obtener un número elevado de levaduras por ml (aproximadamente  $10^7$ -  $10^8$  ufc/ml) que permita realizar posteriormente ensayos de degradación de efluentes lácteos o de biodiesel.

El estudio fue realizado a través de un diseño de experimentos. Esta técnica es aplicable a todos aquellos estudios y situaciones en las que se necesita ensayar hipótesis sobre una posible causa-efecto, donde el experimentador escoge ciertos factores para su estudio, los altera deliberadamente de forma controlada y después observa el efecto resultante. En este caso la hipótesis a probar fue si el crecimiento neto de las levaduras es el mismo para las distintas fuentes de nitrógeno utilizadas.

Para confirmar o rechazar la hipótesis inicial, se hace uso del ANOVA. El objetivo del ANOVA es el de comparar las diferencias debidas a los tratamientos, con las diferencias debidas a los errores. Esta decisión se toma en función de un factor numérico  $F_c$ , conocido como valor de contraste o el valor-p que corresponde al nivel de significación más pequeño posible que puede escogerse, para el cual todavía se aceptaría la hipótesis alternativa con las observaciones actuales. Cualquier nivel de significación inferior al valor-p escogido (en este caso  $p=0.05$ ) lleva a aceptar la hipótesis nula [14, 15, 16].

## **Materiales y Métodos:**

*Aislamiento de las levaduras del género Rhodotorula:* Se efectuó a partir de muestras de efluente de una industria mantequera y una productora de queso. Ambas se procesaron realizando un recuento de hongos y levaduras [17, 18] con 4 diluciones, utilizando ágar de glucosa-extracto de levaduras-cloramfenicol. Las placas se incubaron aproximadamente a  $25 \pm 2$  °C, durante 72 horas. Para la caracterización de las levaduras desarrolladas se tuvo en cuenta la clasificación según su coloración característica propuesta por [11, 19, 20]. Los resultados obtenidos fueron 4 colonias típicas en dilución  $10^{-4}$  de cada muestra.

*Análisis microbiológicos:* Se realizaron dos experiencias en diferentes fechas. En los ensayos para determinar la influencia de la fuente de nitrógeno en el desarrollo de las levaduras del género *Rhodotorula sp.* se utilizó un medio base compuesto por: glucosa 20 g, extracto de levadura 1 g, fosfato monopotásico 0.2 g, sulfato de magnesio 0.2 g, agua destilada c.s.p. 200 ml. Como fuente de enriquecimiento de nitrógeno se adicionó a cada muestra cloruro de amonio, fosfato ácido de amonio o urea, para obtener una concentración final de 0.02 g/l de nitrógeno.

Para cada experiencia se utilizaron 200ml del medio base enriquecido con la fuente de nitrógeno correspondiente, cada uno sembrado con dos colonias de levadura *Rhodotorula sp.* aisladas anteriormente. El número de microorganismos fue determinado al comienzo y luego de 24 hs de la incubación a  $30 \pm 1$ °C. En las experiencias realizadas también se tuvo en cuenta el crecimiento en un medio no enriquecido en fuente nitrogenada, para evaluar si la misma realiza un efecto importante en la curva de crecimiento de la levadura.

*Diseño de experimentos:* Para el estudio se utilizó un experimento de 1 factor con 4 niveles (uno por cada fuente de nitrógeno y un control negativo sin enriquecimiento), con 2 réplicas. Se evaluó el incremento en la población de *Rhodotorula sp* luego de 24hs de incubación, determinando el crecimiento neto de este microorganismo. Estos datos fueron sometidos a un ANOVA. Dado que se trabajó en 2 bloques (cada bloque es una experiencia realizada en un determinado momento bajo condiciones uniformes de trabajo), se evaluará en el momento del análisis si existe algún efecto sobre los resultados debido a este factor de ruido. Este análisis se complementó con un análisis de residuos, donde se comprobó la correlatividad de estos últimos con la prueba de normalidad para evaluar los supuestos del análisis de la varianza. Como alternativa, en el caso de no cumplimiento de los supuestos para el ANOVA, se propone la prueba de Kruskal-Wallis (que compara las medianas de los niveles en lugar de las medias). Esta prueba es mucho menos sensible a la presencia de valores atípicos que un ANOVA y debe usarse siempre que el supuesto de normalidad dentro de los niveles no sea razonable.

## **Resultados:**

En la Tabla 1 se muestran los datos de los recuentos totales obtenidos para cada experimento ordenados por bloques. En la Tabla 2 se observan los valores obtenidos en el ANOVA de  $p=0.0976$  para el factor y  $p=0.0764$  para los bloques evidencian que la hipótesis nula de medias iguales para los distintos niveles no se rechaza al nivel de significancia del 5% y que no tiene un efecto estadísticamente significativo sobre la variable, ( $p > 0.05$ ).

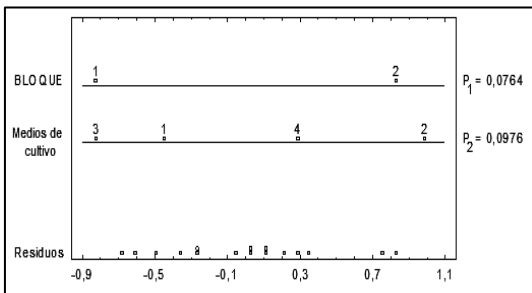
**Tabla 1:** Recuento de levaduras del género *Rhodotorula*. Incubación a 30°C, 24 horas

Bloque	Medio sin enriquecimiento	PO <sub>4</sub> H(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	CINH <sub>4</sub>	Urea
1	3.2 x 10 <sup>5</sup>	2.4 x 10 <sup>6</sup>	5.9 x 10 <sup>5</sup>	4.5 x 10 <sup>5</sup>
1 (duplicado)	2.6 x 10 <sup>5</sup>	1.8 x 10 <sup>6</sup>	7.3 x 10 <sup>5</sup>	6.2 x 10 <sup>5</sup>
2	7.1 x 10 <sup>4</sup>	4.7 x 10 <sup>5</sup>	5.0 x 10 <sup>2</sup>	4.2 x 10 <sup>5</sup>
2 (duplicado)	8.5 x 10 <sup>4</sup>	4.4 x 10 <sup>5</sup>	7.0 x 10 <sup>2</sup>	3.9 x 10 <sup>5</sup>

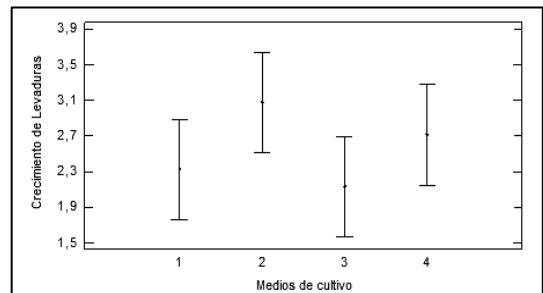
**Tabla 2:** Análisis de Varianza para el crecimiento de las levaduras

Fuente	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Razón-Fc	Valor-p
Entre Niveles	2.1114	0.7038	2.69	0.0976
Entre Bloques	1.0	1.0	3.82	0.0764
Residuos	2.8775	0.261591		

Esto puede evaluarse gráficamente a través de la Figura 2. En dicha figura se observa que al escalonar los efectos de cada factor y de cada bloque, la varianza natural de los puntos del diagrama son comparables a la de los residuales, existe una gran dispersión, demostrando la inexistencia de significancia estadística, al no observarse agrupaciones o tendencias puntuales. Los datos utilizados fueron afectados por el logaritmo para que estén correctamente representados y así poder apreciar la real diferencia entre los mismos. Al graficar las medias de los niveles junto a sus intervalos de confianza en la Figura 3, los intervalos comparados de a pares se traslapan en dirección vertical, confirmando con una confianza del 95% del nivel de confianza lo expuesto en la figura anterior.

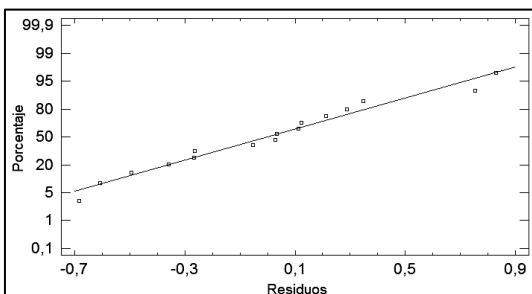


**Figura 2:** Análisis gráfico de ANOVA

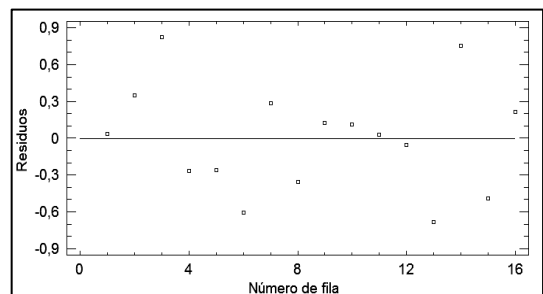


**Figura 3:** Intervalos de confianza de las medias (95% de confianza)

El gráfico de probabilidad normal de la Figura 4, realizado sobre los valores residuales, muestra el ajuste a una distribución normal. En el gráfico de la Figura 5 puede observarse una distribución aleatoria de los residuos por encima y por debajo de la línea del cero y la ausencia de tendencias que muestren desajustes a la normalidad de los datos. La prueba de Shapiro-Wilk en la que se obtiene un valor  $p=0.718094$ , confirma estas observaciones.



**Figura 4:** Gráfico de probabilidad normal de los residuos



**Figura 5:** Gráfico de dispersión de los residuos

## Conclusiones:

El estudio revela que no existen diferencias significativas entre los distintos niveles analizados, es decir, no se aprecian variaciones notables a un nivel del 95% de confianza, lo que demuestra que el crecimiento de la levadura no depende de la fuente de nitrógeno; así como tampoco se observa un incremento mayor del número de colonias de levadura del género *Rhodotorula* en presencia o ausencia del enriquecimiento. El crecimiento alcanzado por la cepa *Rhodotorula sp.* con el nitrógeno aportado por el extracto de levadura del medio base fue suficiente para alcanzar un número significativo de levaduras.

Debido a que se obtuvo en promedio  $4.23 \times 10^5$  ufc/ml de levaduras del género *Rhodotorula* luego de 24 horas de incubación, se propone que para la realización de ensayos posteriores de degradación de efluentes grasos, el medio de cultivo base se debería incubar durante 48 horas para obtener un número de levaduras cercano a  $10^7$  ufc/ml.

## Referencias:

- [1] Senses-Ergul, S; Ágoston, R; Belák, Á; Deák, T. *Characterisation of some yeasts isolated from foods by traditional and molecular tests*. Turkey. International Journal of Food Microbiology. 2006. Vol.108. pág. 120-124
- [2] Uribe Gutiérrez, L. A. *Caracterización Fisiológica de Levaduras aisladas de la Filósfera de Mora*. Colombia. Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá, Facultad de Ciencias, Microbiología Industrial. 2007. Trabajo de Grado- Cap. 2. pág. 32-35.
- [3] Sarmiento, A; Herrera, J. *Obtención y Caracterización de un Banco de Levaduras con Potencial Aplicación Probiótica*. Colombia. Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá, Microbiología Industrial. 2003. Trabajo de Grado- pág. 103
- [4] Villamil, Y; Zapata, Y. *Caracterización de Levaduras Fermentadoras Aisladas de Frutas en Descomposición con Potencial Aplicación Productora de Etanol*. Colombia. Pontificia Universidad Javeriana de Bogotá, Microbiología Industrial. 1999. Trabajo de Grado.
- [5] Mendoza Canales L. I. *Aislamiento y selección de hongos lipolíticos a partir de aceites vegetales de desecho (proveniente de frituras) utilizados en la elaboración de biodiesel*. Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Ciencias Biológicas. 2010. Trabajo de Grado.
- [6] Li, M; Liu, G. L; Chi, Z; Chi, Z. M. *Single Cell Oil Production from Hydrolysate of Cassava Starch by Marine-Derived Yeast *Rhodotorula Mucilaginosa**. China . Journal of Biomass and Bioenergy. 2009. Vol. 34 (1).
- [7] Zhao, C. H; Zhang, T; Li, M; Chi, Z. M. *Single Cell Oil Production from Hydrolysates of Inulin and Extract of Tubers of Jerusalem Artichoke by *Rhodotorula Mucilaginosa**. China. Journal of Process Biochemistry. 2010. Vol. 47 (7).
- [8] Fujii, E; Tunematsu, T; Kamimoto, Y; Kohda, J; Suehara, K; Nakano, Y; Yano, T. *Microbial Treatment of Oil Contained Wastewater Discharged from Industrial Kitchen*. Japan. Forestry and Fisheries Research Information Technology Center The Agriculture. Journal of Food Engineering. 2003. Vol. 4. pág. 123-129.
- [9] Suehara, K; Kawamoto, Y; Fujii, E; Kohda, J; Nakano, Y; Yano, T. *Biological Treatment of Wastewater Discharged from Biodiesel Fuel Production Plant with Alkali-Catalyzed Transesterification*. Japan. The Society for Biotechnology. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2005. Vol. 100 (4). pág. 437-442.

- [10] PFA; UDEA. *Tecnologías avanzadas de oxidación aplicadas a la descontaminación de los efluentes líquidos asociados a la producción actual de biodiesel en Colombia*. Colombia. Universidad de Antioquia. Ministerio de agricultura y desarrollo rural. 2001. Proyecto de investigación 188
- [11] Carrillo, L. *Los Hongos de los Alimentos y Forrajes*. Argentina. Universidad Nacional de Salta. 2003. Cap. 9. pág. 91-98.
- [12] Akzu, Z; Tugba Eren, A. *Carotenoids Production by the Yeast Rhodotorula Mucilaginosa: Use of Agricultural Wastes as a Carbon Source*. Turkey. Journal of Process Biochemistry. 2005. Vol. 40 (9).
- [13] Bonaly, R; Malenge, J.P. *The Biosynthesis of Cyclic Carotenoids in Rhodotorula Mucilaginosa and Rhodotorula Aurantiaca*. France. Journal of Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism. 2002. Vol. 164 (2).
- [14] Fundibeq. *Diseño de experimentos*. www.Fundibeq.org. Última consulta 10/04/2012.
- [15] Kuehl, R. O. *Diseño de experimentos*. 2ª ed. Thompson Learning. 2001.
- [16] Montgomery, D. C. *Diseño y Análisis de Experimentos*. 2ª ed. Limusa-Wiley. 2002.
- [17] ICMSF. *Técnicas de Análisis microbiológico*. Microbiología de los Alimentos. Acribia, 1982.
- [18] Subcommittee on microbiological criteria. *An evaluation of the role of microbiological criteria for foods and food ingredients*. United States. Committee on Food Protection, Natl. Research Council, National Academy Washington. 1985. pág 256.
- [19] Pitt, J.I; Hocking, A.D. *Fungi and Food Spoilage*. 2da ed. London. Blackie Academic & Professional, 1997. Cap 4.
- [20] Pemán, J; Martín-Mazuelos, E; Rubio Calvo, M.C. *Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micología Clínica. " Identificación de Levaduras"*. 2ª ed. España. Revista Iberoamericana de Micología de Bilbao. 2007. Cap. 11.