

Biodegradación de los Colorantes Indigo y Verde presentes en un Efluente

DE LA INDUSTRIA TEXTIL, UTILIZANDO HONGO LIGNINOLÍTICOS

MC. Norma Angélica Chávez Vela ¹
 Dr. Juan Jáuregui Rincón ¹
 Biól. Bulmaro Saucedo Castañeda ²

INTRODUCCIÓN

En la actualidad México enfrenta serios problemas ambientales, en un contexto económico que no le permite aplicar en forma generalizada las soluciones de control de contaminación ambiental que son utilizadas en países desarrollados. Sin embargo existe una gran preocupación e interés por los efectos nocivos que una gran diversidad de compuestos orgánicos tóxicos producen sobre los recursos hídricos, suelo y en la atmósfera (SEDUE, 1991).

Los colorantes industriales pueden ser liberados en el medio ambiente de dos principales fuentes: como efluentes de plantas de síntesis y de industrias que usan colorantes, tales como fábricas textiles. Se ha estimado que entre el 10 y 15% del total de colorante usado en el proceso de tinción puede ser encontrado en aguas residuales. Muchos de estos colorantes son muy estables en presencia de luz, temperatura y al ataque microbiano, haciéndolos compuestos recalcitrantes. Cerca del 50% de los colorantes producidos en el mundo son colorantes azos. Estos pueden ser transformados a compuestos carcinogénicos bajo condiciones anaeróbicas (Rodríguez, y col. 1999.)

Las propuestas de solución a la problemática actual implican la implementación de nuevas estrategias basadas en innovaciones y

aplicaciones biotecnológicas que permitan eliminar, reducir o reciclar los compuestos orgánicos tóxicos. Esto con la finalidad de transformarlos a formas más compatibles con el ecosistema y puedan ser asimilados en los ciclos naturales. A este respecto se tiene conocimiento de que la flora natural presente en aguas y suelos contaminados es capaz de degradar ciertos compuestos orgánicos aunque lentamente debido a su alta concentración y toxicidad. Considerando esta capacidad de la flora natural, se han realizado estudios enfocados a la selección de microorganismos capaces de metabolizar rápidamente estos compuestos como fuente de carbono y energía (SEDUE, 1991).

Los hongos ligninolíticos son degradadores activos de los complejos aromáticos de la lignina a CO₂, así como de compuestos tóxicos con diferentes estructuras (insecticidas, pesticidas, colorantes, fenoles, BPCs, etc.), la degradación se lleva a cabo mediante reacciones de oxidación por radicales libres. (Field, 1997).

La acción degradativa de estos hongos se realiza por medio del grupo hemo contenido en peroxidasas secretadas al medio de cultivo. Estas enzimas se generan en respuesta a los bajos niveles de carbono, nitrógeno o azufre, condiciones que frecuentemente son referidas como ligninolíticas. Existen cuatro tipos de enzimas implicadas en el rompimiento de la lignina; Lacasa, Lignino peroxidasa (LiP), Manganese peroxidasa (MnP) y enzimas productoras de peróxido H₂O₂ (peroxidasas) (Ruiz, 1997; Gold y Alic, 1993)).

Rodríguez y col. (1999) midieron la actividad de lacasa, manganese peroxidasa, lignina

¹ Departamento de Ing. Bioquímica, Centro de Ciencias Básicas, Tel. 910 84 10, Universidad Autónoma de Aguascalientes, e-mail: nachavez@yahoo.es, jjaureg@correo.uaa.mx

² Departamento de Biología, Centro de Ciencias Básicas

peroxidasa y aril alcohol oxidasa en extractos ordinarios de cultivos sólidos de 16 diferentes cepas de hongos maduros en avena entera. Todas las cepas de *Pleurotus ostreatus* exhibieron una gran actividad de lacasa y manganeso peroxidasa, pero la mayor actividad volumétrica de lacasa fue encontrada en *Trametes hispida*., la cual se relacionó con la decoloración de distintos colorantes textiles.

En otro estudio realizado por Swandy y Ramsay (1999), encontraron que de cinco especies de hongos ligninolíticos, evaluados por su habilidad para decolorar en cajas de petri con agar a los colorantes: Amaranto, Negro B ramazol, naranja ramazol, tropaeolina O, las especies *Bjerkandera sp.* BOS55, *Phanerochaete chrysosporium*, y *Trametes versicolor* presentaron la más alta extensión de decoloración.

Debido a la problemática que existe en el Estado de Aguascalientes, en lo que se refiere a la contaminación del agua por los colorantes, y debido a la gran actividad de la industria textil, se propone la realización de un proyecto que podría contribuir a la aportación de datos que se apliquen en la ejecución de técnicas destinadas a la disminución de la contaminación por colorantes, atenuándolos con el uso de hongos ligninolíticos.

Mediante la aplicación de hongos ligninolíticos, en condiciones óptimas de producción y degradación es posible eliminar el colorante y el color del agua residual de industrias textiles, disminuyendo así el grado de toxicidad del efluente.

Para la degradación de los colorantes índigo y verde presentes en el agua residual de la industria textil de la empresa CYDSA San Marcos, utilizando hongos ligninolíticos, se llevó a cabo una selección de éstos y se establecieron las condiciones óptimas de biodegradación de los colorantes empleados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Medio de cultivo Papa-dextrosa-agar (PDA) (marca comercial), Estufa de incubación (marca), incubadora con agitación orbital, balanza analítica, medidor de pH, espectrofotómetro, Dremel Multipro de 5,000 a 35,000 rpm.

a) Mantenimiento y selección de hongos ligninolíticos biodegradadores de colorante.

Se trabajó con 19 cepas de hongos ligninolíticos donadas por el Instituto de Biotecnología de la UNAM (Cuadro I). Las cepas se mantuvieron en medio agar papa dextrosa (PDA).

Las muestras de agua residual de la industria textil se les ajustaron el pH a 6.0, se les adicionó agar-agar (8 g/l), posteriormente se inocularon cada una de las cepas de hongos y se incubaron a 28°C. El área de decoloración se midió con respecto al tiempo, y de estas cepas se seleccionaron las que mayor velocidad de decoloración presentaron. Estas cepas se cultivaron en un medio de cultivo líquido a base de glucosa-extracto de levadura-extracto de malta (GYM) y estos cultivos de hongos se inocularon al agua con colorante a pH 6.0 y absorbancia de 1.0 con la finalidad de seleccionar las cepas con mayor actividad decolorativa.

b) Efecto del pH y Temperatura

Los hongos seleccionados se sometieron a ensayos de biodecoloración en los que se varió el pH, y la temperatura, esto con el fin de encontrar los parámetros más adecuados de tales factores, de tal modo que se obtuviera la máxima biodegradación del colorante.

c) Efecto de la concentración de inóculo y de colorante

Una vez que se determinaron las condiciones óptimas de biodegradación, se probó con

CUADRO I. Cepas de hongos probadas en la biodegradación de colorantes.

1) <i>Bjerkandera adusta</i> 8258	7) <i>P. ostreatus</i> 7992	13) <i>P. chrysosporium</i> 3642
2) <i>B. adusta</i> 7308	8) <i>P. ostreatus</i> 7988	14) <i>P. chrysosporium</i> 452
3) <i>B. adusta</i> 4312	9) <i>P. ostreatus</i> 7980	15) <i>P. chrysosporium</i> ATCC
4) <i>Pleurotus ostreatus chiapas</i>	10) <i>P. ostreatus</i> 7982	16) <i>Trametes versicolor</i>
5) <i>P. ostreatus</i> 7964	11) <i>P. ostreatus</i> ATCC58053	VAMH 8272
6) <i>P. ostreatus</i> 7972	12) <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	17) <i>Corialopsis galica</i> 8260
	3641	18) <i>Sporotichum</i>
		<i>pulverulentum</i> 4521

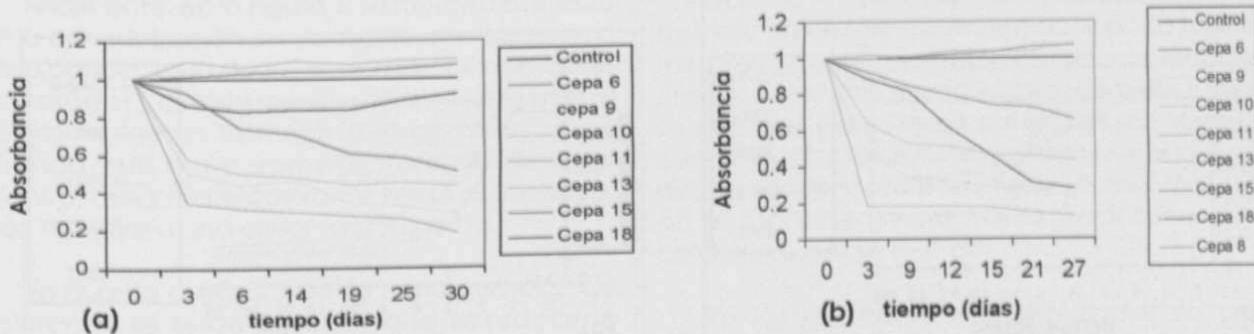


Figura 1. Cinética de degradación del colorante índigo (a) y del colorante verde (b) por el diferentes cepas de hongos a 28°C.

diferentes concentraciones de hongo (biomasa) y de colorante.

RESULTADOS

a) Selección de las cepas biodegradadoras de colorante

De las 19 cepas de hongos con las que se trabajó, la que mejor resultados presentó después de 30 días fue la de *Pleurotus ostreatus* ATCC 58053 (Cepa 11).

De las 19 cepas de hongos probadas en la decoloración de los colorantes índigo y verde, se observó que *Pleurotus ostreatus* ATCC58053 fue la que mejor decoloración de ambos colorantes presentó (Fig. 6), también se pudo constatar que algunas cepas no presentaban degradación de los colorantes nula, mientras que otras presentaban biodegradación, aunque menor a *P. ostreatus* ATCC58053. Estas diferencias se deben quizá a los complejos enzimáticos responsables de la biodegradación de los colorantes y las condiciones bajo las cuales ellos son expresados, que varían entre las diferentes cepas. Es también necesario tomar en cuenta, como lo mencionan Rodríguez y col. 1999, que aunque las enzimas de las diferentes cepas de hongos tengan las mismas propiedades, pueden variar en cuanto al peso molecular, número de isoenzimas presentes, y esto hace que su acción degradativa varíe de acuerdo con la cepa utilizada.

b) Efecto del pH y Temperatura

Una vez seleccionada la cepa, se procedió a determinar el pH de mejor actividad y se determinó que a pH de 6.0 se tuvo mayor degradación del colorante verde, mientras que el colorante índigo se degradó mejor a pH de 5.5 (Figura 2).

Es evidente que en ambos casos, más en el índigo se tendió hacia un pH ligeramente ácido, ello es por que la mayoría de las enzimas, según lo reporta Field . 1997, presentan sus pH óptimos en éstos rangos de acidez e incluso más ácidos.

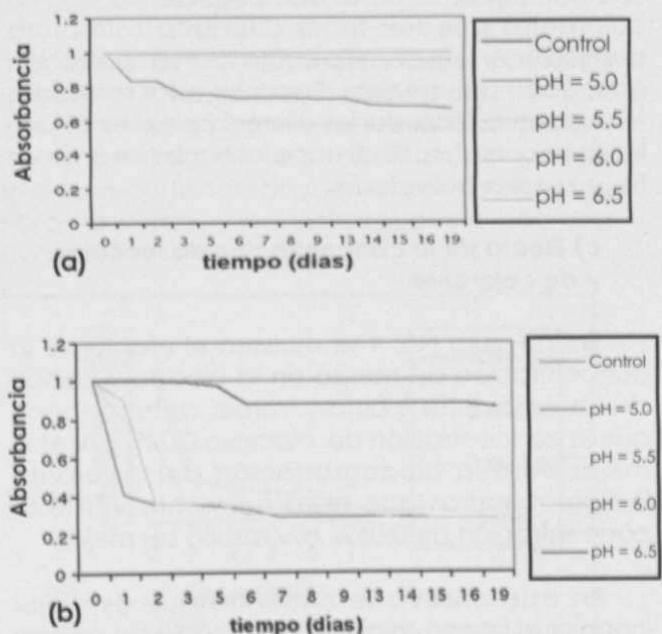


Figura 2. Cinética de degradación del colorante índigo (a) y del colorante verde (b) por el hongo *Pleurotus ostreatus* ATCC58053, utilizando diferente pH.

En la Figura 3 se observa que el hongo *Pleurotus ostreatus* ATCC 58053, presenta diferentes temperaturas óptimas de biodegradación para los colorantes índigo (32 °C) y verde (28 °C).

El hecho de que *Pleurotus ostreatus* ATCC58053, presenta diferentes temperaturas óptimas de

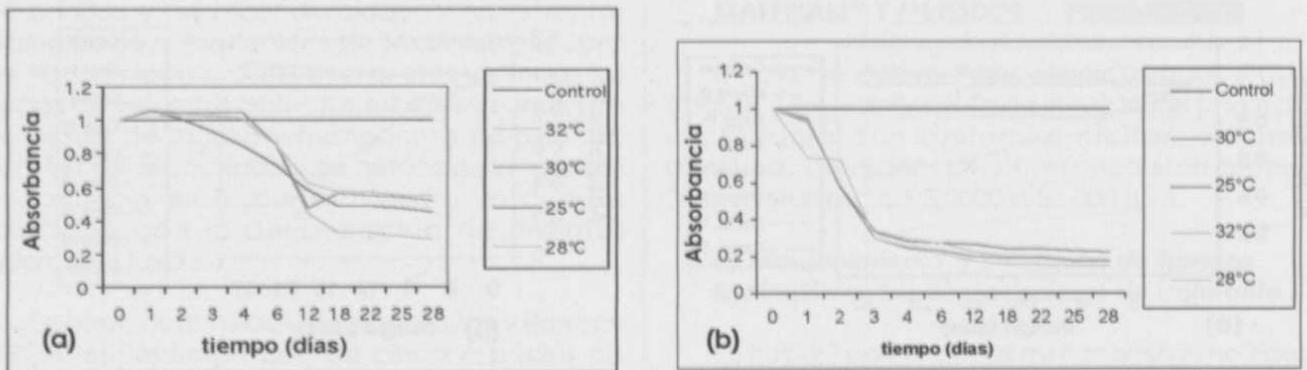


Figura 3. Cinética de degradación del colorante índigo (a) y del colorante verde (b) por el hongo *Pleurotus ostreatus* ATCC58053, utilizando diferentes Temperaturas (°C).

biodegradación para los colorantes índigo (32 °C) y verde (28 °C), se debe probablemente a que dependiendo del sustrato presente, se activan diferentes sistemas enzimáticos responsables de la decoloración, así lo indican Bumpus y Brock, 1988. Este comportamiento es comprensible ya que los colorantes pueden tener diferente estructura química y con ello cambia la ruta de metabolización para cada uno de ellos. También, estos resultados se pueden explicar por las diferencias existentes entre las temperaturas óptimas a las cuales las enzimas tienen mayor actividad.

c) Efecto de la concentración de inóculo y de colorante

En la Figura No. 4 se muestra el efecto de la concentración de hongo en la biodecoloración de los colorantes índigo y verde, determinando que la concentración de biomasa 0.04% p/v es la mejor para la biodegradación del colorante índigo, mientras que para colorante verde la concentración de 0.05% p/v resultó ser mejor.

En este ensayo se encontró que es mejor inocular el hongo (biomasa) sin medio de cultivo, que inocularlo junto con éste, ello se debe a que el hongo en el medio (GMV) al ser inoculado en el colorante, interfiere al alterar las absorbancias reales del colorante en el proceso de biodegradación, esto provocado por la dilución del colorante por el medio de cultivo, y por otra parte el proceso de biodegradación se retarda por tener el hongo más disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo, así que el hongo emplea su actividad enzimática tanto en el medio de cultivo como en el colorante. De otro modo al aplicar solamente la biomasa del hongo en el colorante, no hay dilución y el hongo utiliza todo

su potencial enzimático para la biodegradación del colorante, lo que acelera este proceso. También es necesario recalcar que al probar con diferentes concentraciones de biomasa, se pudo apreciar que llega un punto en el que no importa si se añade más biomasa del hongo, la biodegradación no se incrementará, inclusive se observó que puede llegar a ser menos eficiente, esto puede obedecer al hecho de que la capacidad de biodegradación del hongo llega a un punto máximo y luego se estabiliza.

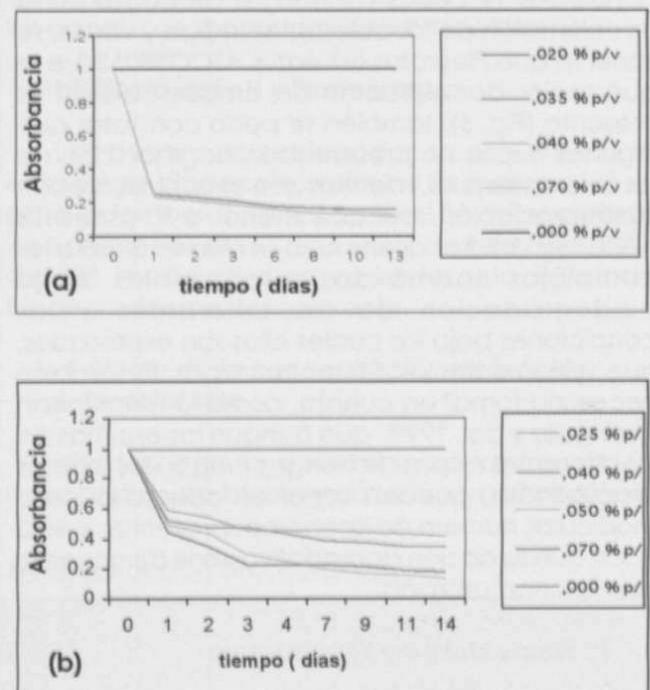


Figura 4. Cinética de degradación del colorante índigo (a) y del colorante verde (b) por el hongo *Pleurotus ostreatus* ATCC58053, utilizando diferente concentraciones de inóculo.

Finalmente, en la Figura 5, se muestra el efecto de la concentración de colorante, medida como absorbancia, en la degradación de los colorantes trabajados, donde se observó que para el colorante índigo la mejor degradación se da cuando este tiene una absorbancia de 0.75, mientras que para el colorante verde la decoloración es mejor a una absorbancia de 0.5.

En cuanto al efecto de la concentración de colorante, se pudo apreciar que al reducir la absorbancia de 1 a 0.500, se aceleró la velocidad de biodegradación, esto tal vez por haber una menor cantidad de sustrato (colorante) sobre el cual actuaron las enzimas más eficientemente, sin embargo las diferencias de los % de biodegradación total no parecen ser muy significativas (84 - 91.2% para el colorante verde y 90.6 - 75.3% para el índigo), por lo tanto para fines prácticos se puede sugerir la utilización de la concentración más alta (1.00), así se podría evitar el gasto innecesario de agua para diluir el colorante.

Conjuntando todas las variables probadas, se obtuvieron finalmente las mejores condiciones para la biodegradación por hongos ligninolíticos de los colorantes índigo y verde, las que se muestran el cuadro 2. El cambio de color se puede apreciar en la Figura 6.

Durante la aplicación de todas las condiciones óptimas en un solo experimento se pudo lograr altos niveles de decoloración en tiempos reducidos, comparados con los obtenidos en otras pruebas individuales para un determinado parámetro, lo cual indica que la unión de todos los parámetros adecuados encontrados, tiene un efecto positivo en el incremento de biodegradación de los colorantes índigo y verde.

En los experimentos realizados se pudo constatar que la biodegradación de los colorantes índigo y verde es más eficiente manteniendo las muestras en movimiento, que dejándolas estáticas, esto se puede explicar, según Swamy y Ramsay, 1999, porque el movimiento mantiene elevados los niveles de oxígeno, permitiendo una adecuada producción de enzimas y su actividad óptima, aunando a esto que los hongos presentan un mayor crecimiento, por lo tanto se incrementa la superficie de biomasa que puede actuar en la degradación del colorante.

En todas las pruebas realizadas, el colorante verde siempre mostró mayor biodegradación que el colorante índigo, tal vez las enzimas del hongo, tienen más afinidad y especificidad de sustrato, como lo reportan Rodríguez, y col. 1999, en el colorante verde, y en consecuencia hay una mayor actividad enzimática.

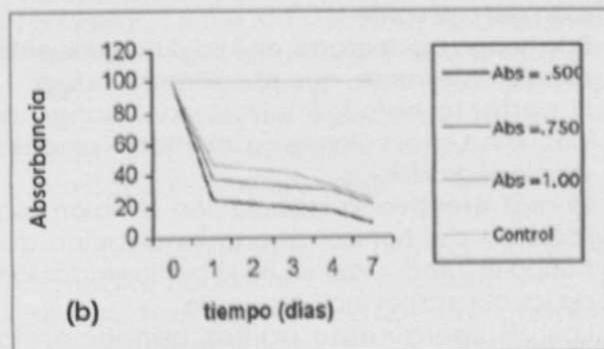
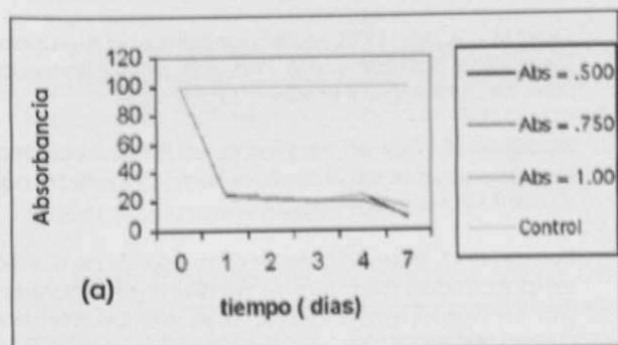


Figura 5. Cinética de degradación del colorante índigo (a) y del colorante verde (b) por el hongo *Pleurotus ostreatus* ATCC58053, utilizando diferentes concentraciones (Absorbancias) de colorante.

CUADRO 2. Condiciones óptimas de biodegradación para los colorantes índigo y verde.

Colorante	Hongo	T (°C)	pH	Concentración de biomasa %p/v	Concentración de colorante (Absorbancias)
Verde	<i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC58053	28	6.0	0.040	0.500
Índigo	<i>Pleurotus ostreatus</i> ATCC58053	32	5.5	0.050	0.500

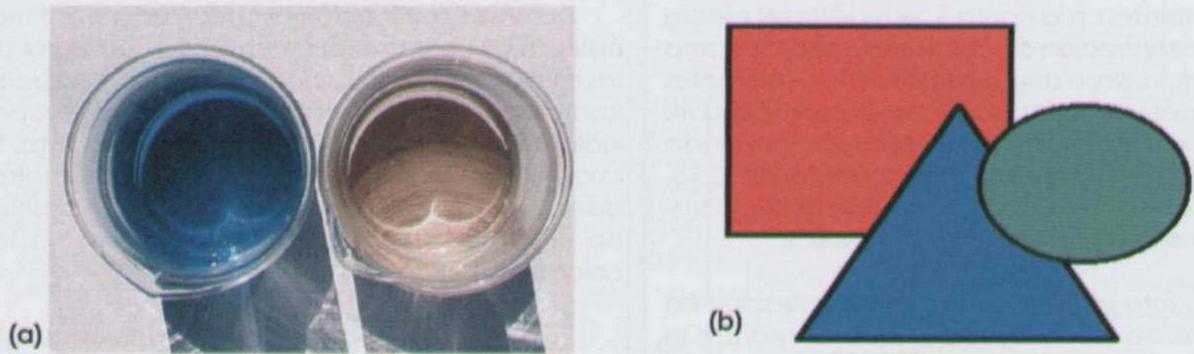


Figura 6. Muestras de colorante índigo (a) y verde (b) antes y después de ser biodegradadas por el hongo *Pleurotus ostreatus* ATCC58053.

Es necesario mencionar que el perfecto homogeneizado del hongo permite que haya un mejor desarrollo del mismo tanto en el medio de cultivo líquido (GMY), como en el colorante, ello es porque la mayoría de las células están expuestas al medio, y tienen más intercambio de oxígeno con el mismo, lo que les permite tener un adecuado crecimiento y una eficiente actividad enzimática.

CONCLUSIONES

- La aplicación de agitación al hongo *Pleurotus ostreatus* ATCC 58053 en el medio de cultivo y en el colorante, es de vital importancia para el adecuado crecimiento y óptima biodegradación del colorante.
- Este hongo biodegrada en forma más eficiente el colorante verde, que el colorante índigo.
- El perfecto homogeneizado del hongo al inocularse en el colorante eficientiza el proceso de biodegradación.
- Es más efectiva la inoculación de biomasa (células) del hongo, que la inoculación del hongo en medio líquido, en la biodegradación de los colorantes índigo y verde.
- Los pH ligeramente ácidos benefician la actividad enzimática del hongo.
- La mayoría de las condiciones óptimas de biodegradación de *Pleurotus ostreatus* ATCC58053, excepto la concentración de colorante, son diferentes para los colorantes índigo y verde.
- Los complejos enzimáticos de las cepas utilizadas, presentan especificidad de sustrato (colorante).
- En condiciones de baja concentración de colorante, la velocidad de biodegradación es mayor.
- La aplicación de todos los parámetros óptimos

de decoloración en un solo experimento tiene un efecto positivo en el incremento de biodegradación de los colorantes índigo y verde.

BIBLIOGRAFÍA

- Bumpus, J.A. and Brock B. J. 1988. Biodegradation of Crystal Violet by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. 54: 1143-1150
- Field J. 1997. Optimization of Manganese peroxidase Production by the White Rot Fungus *Bjerkandera* sp. Strain BOS55. *Fems Microbiology Letters*. 155: 161-168
- Gold M y A. Alic. 1993. Molecular Biology of the Lignin-Degrading *Basidiomycete Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiological Reviews*. 57:605-622
- Rodríguez, E., Pickard, M. y Vázquez, R. 1999. Industrial Dye Decolorization by Laccases from Ligninolytic Fungi. *Current Microbiology*. 38: 27-32.
- Ruíz, G. 1997. Influencia de las Condiciones de Cultivo en la Actividad Degradativa de Bifenilos Policlorados por Hongos Ligninolíticos. Tesis de Doctorado. CINVESTAV IPN: 37-39.
- SEDUE. 1991. Subsecretaría Ecológica. Aguas residuales. Dirección General de Planeación y Control de la Contaminación Ambiental.
- Swamy J. y Ramsay A. 1999. The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. *Enzyme and Microbial Technology*. 24: 130-137.

Parte de este trabajo se presentó en el VIII Congreso Nacional de Micología, celebrado los días 15, 16 y 17 de octubre del 2003, en la ciudad de Toluca, México, en el tema "Evaluación de diferentes cepas fungales en la decoloración de colorantes de efluentes textiles".