

BIODEGRADACIÓN DE LOS FENOLES PRESENTES EN EL EXTRACTO DE
GUARANGO (*Caesalpinia spinosa*) Y EN LOS COLORANTES ÍNDIGO CARMÍN,
NARANJA II Y ROJO FENOL A TRAVÉS DE *Trametes versicolor* Y *Aspergillus niger*

GUARANGO EXTRACT (*Caesalpinia Spinosa*) AND INDIGO CARMINE, ORANGE II, AND RED
DYES PHENOL BIODEGRADATION THROUGH *Trametes Versicolor* AND *Aspergillus Niger*

Laura Huachi¹, Ángela Macas² y Gabriela Méndez²

¹ Maestría en Sistemas Integrados de Gestión de calidad, ambiente y seguridad. Universidad Politécnica Salesiana, Av. 12 de Octubre N42-22 y Wilson, Telf. 3962 800, Quito, Ecuador.

² Centro de Investigación y Valoración de la biodiversidad, CIVABI, Universidad Politécnica Salesiana, Av. 12 de Octubre N42-22 y Wilson, Telf. 3962900, Quito, Ecuador.

Autor para correspondencia: hluachi@ups.edu.ec

Manuscrito recibido el 18 de junio de 2013. Aceptado, tras revisión, el 20 de noviembre de 2013.

Resumen

Esta investigación se la realizó con el fin de evaluar la capacidad de biodegradación de los fenoles presentes en el extracto de tánico de guarango (*Caesalpinia spinosa*) y en los colorantes índigo carmín, naranja II y rojo fenol, presentes en los desechos de la industria textil. Se utilizaron dos tipos de hongos, el de podredumbre blanca *Trametes versicolor* y filamentoso *Aspergillus niger*. Los tratamientos biológicos se aplicaron por triplicado, realizados por el método espectrofotométrico UV por 15 días; los resultados obtenidos al aplicar el hongo *Trametes versicolor* en el extracto tánico fue del 69,45% de degradación; y en el colorante índigo carmín fue del 100% de decoloración. Los resultados de la degradación con el hongo *Aspergillus niger* sobre el extracto tánico fue del 63,45% y en el colorante naranja II fue del 32,78%. En la aplicación de *Trametes versicolor* y *Aspergillus niger* sobre el colorante rojo fenol se obtuvieron porcentajes de decoloración no mayores al 26%. Los hongos aplicados en los tratamientos biológicos presentaron tolerancia tanto a la composición del extracto tánico como a las concentraciones de cada uno de los colorantes usados, esto fue comprobado con la cinética de crecimiento para cada hongo.

Palabras claves: hongo, biodegradación, aguas residuales, depuración, enzimas lignolíticas, taninos, fenoles, colorantes.

Abstract

This research was done to evaluate phenol biodegradation capacity in Guarango (*Caesalpinia spinosa*) tannic extract phenols and in indigo carmine, orange II and red phenols, common residues in the textile industry. Two types of fungi were used, white-rot *Trametes versicolor* fungus and the filamentous *Aspergillus niger*. Biological treatments were applied in triplicate through the spectrophotometric UV method for 15 days. When applying the *Trametes versicolor* fungus to the tannic extract, there was 69.45% degradation, and a 100% discoloration in the indigo carmine. When applying the *Aspergillus niger* fungus to the tannic extract and orange II dye, there was a 63.45% and 32.78% degradation, respectively. There was a discoloration no greater than 26% when applying *Trametes versicolor* and *Aspergillus niger* to the red phenol. The fungi applied during the biological treatment presented tolerance to both the tannic extract composition as well as the concentration of each dye used, verified through growing kinetics of each fungus.

Keywords: fungus, biodegradation, ligninolytic enzymes, tannics, phenols, dyes.

Forma sugerida de citar: Huachi, L., A. Macas y G. Méndez. 2014. **Biodegradación de los fenoles presentes en el extracto de guarango (*Caesalpinia spinosa*) y en los colorantes índigo carmín, naranja II y rojo fenol a través de *Trametes versicolor* y *Aspergillus niger***. La Granja: Revista de Ciencias de la Vida. Vol. 20(2): 29-35. ISSN: 1390-3799.

1. Introducción

En este estudio de investigación se trató con el extracto de *Caesalpinia spinosa* como una solución de curtiembre coloreada de alto contenido en taninos y

colorantes sintéticos alternativos índigo carmín, naranja II y rojo fenol, los cuales presentan un anillo aromático en su estructura química (Ver Figura 1). Estos colorantes tanto el natural como los tres colorantes sintéticos fueron sustratos para las cepas de *Trametes versicolor* y *Aspergillus niger*.

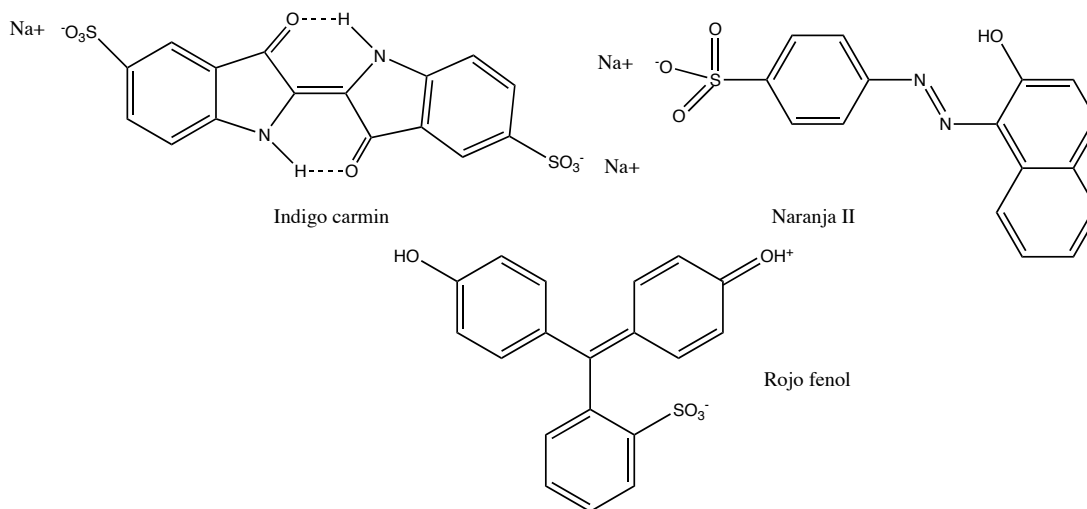


Figura 1. Colorantes utilizados en este estudio: índigo carmín, naranja II y rojo fenol.

El fenol es un anillo aromático presente en colorantes y curtiembres de la industria textil; este se encuentra naturalmente en materiales vegetales como raíces, troncos, vainas y hojas, este es metabolizado a partir de 1-metiletibenceno (cumeno), en cambio los fenoles sintéticos son originados a partir de la oxidación del tolueno, fusión de sodio, benceno sulfonato con hidróxido de sodio o calentando monoclorobenceno con hidróxido de sodio a baja presión (Robinson *et al.*, 2001).

Los fenoles son compuestos de alta toxicidad con efectos adversos sobre la biota y los seres humanos, tanto por su acumulación en la cadena alimentaria como por su persistencia en su entorno; por ello es necesario su tratamiento antes de ser liberados al medio ambiente, a través de la aplicación de diferentes técnicas de tratamiento de efluentes, como la biorremediación que se basa en la capacidad biotransformadora de diversos tipos de hongos como aquellos de la podredumbre blanca (*Trametes versicolor*) y filamentosos (*Aspergillus niger*). Estos organismos muestran una clara tendencia al uso de mecanismos basados en la acción de sus enzimas purificadas e

inmovilizadas en columnas, la acción biológica del micelio puesto en contacto con los residuos contaminantes, o el uso del micelio inmovilizado en soportes sintéticos o naturales.

La selección de los hongos *Trametes versicolor* (Ver Figura 2) y *Aspergillus niger* para la aplicación de los tratamientos biológicos en esta investigación, se debe a su capacidad de degradación de compuestos ligninolíticos, lo que permite estimar una posible degradación de compuestos fenólicos presentes en colorantes que químicamente son menos complejos que la estructura de la lignina.

La finalidad de este trabajo es evaluar la actividad de biodegradación de fenoles a través de la aplicación de cepas de *Trametes versicolor* y *Aspergillus niger*, recolectadas en el Oriente ecuatoriano (Tena) y facilitadas por el Centro de Investigación y Valoración de la Biodiversidad (CIVABI) respectivamente, con los cuales se pretende aplicar procesos de biotecnología ambiental como biorremediación sobre un extracto tánico obtenido de *Caesalpinia spinosa* (guarango) y soluciones de colorantes índigo carmín, naranja II y rojo fenol tratadas con *Trame-*

tes versicolor y *Aspergillus niger* mediante un análisis cuantitativo de espectrofotometría, para establecer un método de reducción o remoción de fenoles a nivel de laboratorio, que sea aplicable, como medida correctora de los impactos ambientales de las aguas residuales provenientes de industrias textiles.

2. Materiales y métodos

2.1 Conservación de las cepas y preparación de los inóculos

La cepa del hongo basidiomiceto de podredumbre blanca *Trametes versicolor* fue aislada en Tena (Oriente ecuatoriano), cultivadas en el medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) con 2ppm de cloranfenicol a 30 °C por 15 días, y se purificó mediante resiembras periódicas en PDA; la identificación y caracterización de los micelios se realizó mediante la comparación bibliográfica descrita por Rajchenberg (1996). La cepa de *Aspergillus niger* se revitalizó en medio PDA a 30°C por 15 días.



Figura 2. *Trametes versicolor*, (Macas y Méndez, 2011).

Los micelios de *Trametes versicolor* y *Aspergillus niger* se conservaron en 1ml de glicerina a -70°C.

2.2 Preparación del extracto tánico

Las vainas de *Caesalpinia spinosa* fueron recolectadas en su estado natural/silvestre al nororiente de Quito (Oyacoto), dadas las propiedades industriales de esta planta; posteriormente se realizó el secado, la

molienda y el macerado del material vegetal en una solución, hidroalcohólica al 50 %, y se realizó el análisis de Folín según Miranda y Cuéllar (2001).

2.3 Preparación de los medios de cultivo con colorantes

Se prepararon varias concentraciones de los colorantes índigo carmín, rojo fenol y naranja II: 120ppm, 100ppm (muestra en estudio), 80ppm, 40ppm, y de 10ppm; para realizar las curvas de calibración utilizando el espectrofotómetro UV a 611nm, 366nm y 480nm respectivamente.

2.4 Diseño experimental

Los tratamientos de aplicación analizados en esta investigación fueron: *Trametes versicolor* inoculado en medio sólido PDA (Potato Dextrose Agar) para extracto tánico y colorantes. Micelio de *Trametes versicolor* en medio líquido PDB (Potato Dextrose Broth) para extracto tánico y colorantes. *Aspergillus niger* inoculado en medio sólido PDA (Potato Dextrose Agar) para extracto tánico y colorantes. Micelio de *Aspergillus niger* en medio líquido PDB (Potato Dextrose Broth) para extracto tánico y colorantes.

Consorcio *Trametes versicolor* y *Aspergillus niger* (micelios) para extracto tánico.

3. Resultados y discusión

3.1 Evaluación enzimática de degradación sobre el extracto tánico

La aplicación de los 5 tratamientos biológicos, fundamentada en la actividad ligninolítica por parte de los hongos *Trametes versicolor* y *Aspergillus niger*, presentan disminución de la concentración de partida para el extracto tánico en todos los casos. Según la Figura 3 y Tabla 1, el tratamiento con el mejor porcentaje de degradación es el extracto tánico tratado con *Trametes versicolor* (discos sólidos) con un 69,45 % que equivale a 2,84ppm, seguido de *Aspergillus niger* (discos sólidos) con un 63,45 %. Estos resultados confirman la actividad ligninolítica estudiada y recopilada en el Libro de Biotecnología Ambiental de Marín *et al.* (2005), donde se presenta la estabilidad de la enzima madura lacasa que está es-

trechamente relacionada con compuestos fenólicos que son sustrato de la lacasa incrementando eficientemente la vida media de la misma.

Se estima a que la presencia de compuestos aromáticos como los taninos actúen como inductores de la actividad lacasa en los hongos basidiomicetos incrementando eficazmente la producción de la enzima. Se ha demostrado la inducción del ácido tánico sobre la producción de lacasa y sobre la transcripción del gen *cg1cc1* del hongo *Coriolopsis gallica*, mostrando su potencial aplicación en la obtención de mayores cantidades de la enzima (Marín *et al.*, 2005).

3.2 Evaluación enzimática de decoloración sobre el colorante índigo carmín

Para evaluar el porcentaje de remoción de los colorantes por los hongos en estudio se transformaron

las absorbancias obtenidas a través de la ley de Beer y se comparó con las curvas de calibración para conocer la concentración inicial y final.

En la Figura 4 se puede observar la decoloración del colorante índigo carmín en función de la disminución de las absorbancias del colorante, las mismas que fueron tomadas cada 24 horas luego de la fecha de inoculación con los hongos.

La decoloración que se presenta en las curvas de remoción mostró un cambio de color a través del tiempo de azul oscuro a amarillo, debido a una modificación del complejo autócrómico cromóforo asociado a un posible ataque enzimático del grupo hidroxilo de la molécula del colorante. La lacasa reacciona con el colorante porque se da una interacción electrostática entre las fracciones aniónicas del colorante (grupos sulfónicos) y los aminoácidos cargados de la enzima (Moreno y Ospina, 2008).

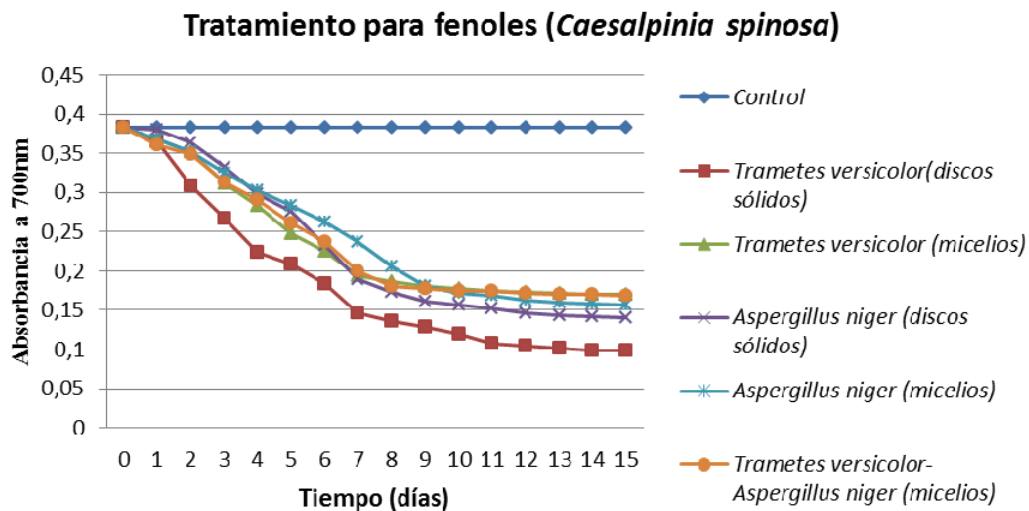


Figura 3. Tratamientos sobre extracto tánico con *Trametes versicolor* y *Aspergillus niger*

Tabla 1. Tratamiento biológico en extracto tánico

Sustrato	Tratamiento por 15 días	% de Degradación
POLFENOLES	<i>Trametes versicolor</i> (discos sólidos)	69,45
	<i>Trametes versicolor</i> (biomasa)	55,61
	<i>Aspergillus niger</i> (discos sólidos)	63,45
NATURALES	<i>Aspergillus niger</i> (biomasa)	59,01
	<i>Trametes versicolor-Aspergillus niger</i> (biomasa)	55,87

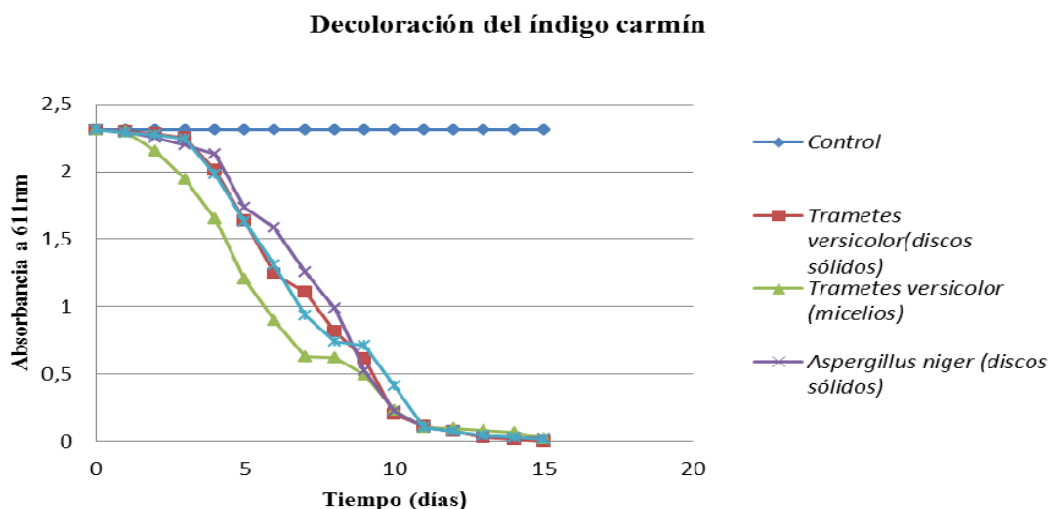


Figura 4. Decoloración índigo carmín

3.3 Evaluación enzimática de decoloración sobre los colorantes naranja II y rojo fenol

En la Figura 5 se observa la disminución de la absorbancia del colorante naranja II, en la que se da a notar que el mejor tratamiento para este colorante fue con el hongo filamentoso *Aspergillus niger* en discos sólidos presentando un porcentaje de degradación el 32,78 % que se reflejó en la disminución de la absorbancia desde 2,959 hasta 1,989 lo que equivale a 38ppm en un período de 15 días.

El tratamiento con el hongo *T. versicolor* tanto en micelio como en discos sólidos fue bajo con un porcentaje de decoloración de 10,98 % y 8,45 % respectivamente, presentándose una diferencia de degradación de un 22,1 % en relación con el mejor tratamiento.

Según la figura 5 en la decoloración del colorante rojo fenol se evidenció un resultado significativamente superior a los demás con la aplicación de micelios en medio de cultivo con *Aspergillus niger* con un porcentaje de remoción del 26 %; desde 1,931 hasta 1,429 de absorbancia lo equivale a 75ppm.

A partir de los 15 días de incubación del hongo, sobre los colorantes no se observó ningún cambio

significativo del porcentaje de decoloración, manteniéndose como mayor valor el 26 % al día quince.

Los bajos porcentajes de degradación pueden deberse a que compuestos aromáticos como los colorantes reactivos tipo azo poseen estabilidad termodinámica, por lo cual resulta difícil su degradación, es también necesario tomar en cuenta, como lo mencionan Rodríguez y Aguilar (2009), 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.

En las investigaciones realizadas con los hongos de podredumbre blanca *P. ostreatus* y *T. versicolor* han sido estudiados ampliamente en la remoción de colorantes textiles, principalmente de colorantes tipo azo. Pese a que estos hongos no han sido reportados para los colorantes usados en este ensayo específicamente, sí han sido reportados para la degradación de colorantes de una misma clase (azo, trifenilmetano y antraquinona) por medio de la acción de enzimas peroxidasas, y lacasas, logrando porcentajes de degradación de 90 %, incluso 100 % para algunos colorantes, en tiempos que varían de 7 a 20 días (Garzón, 2009).

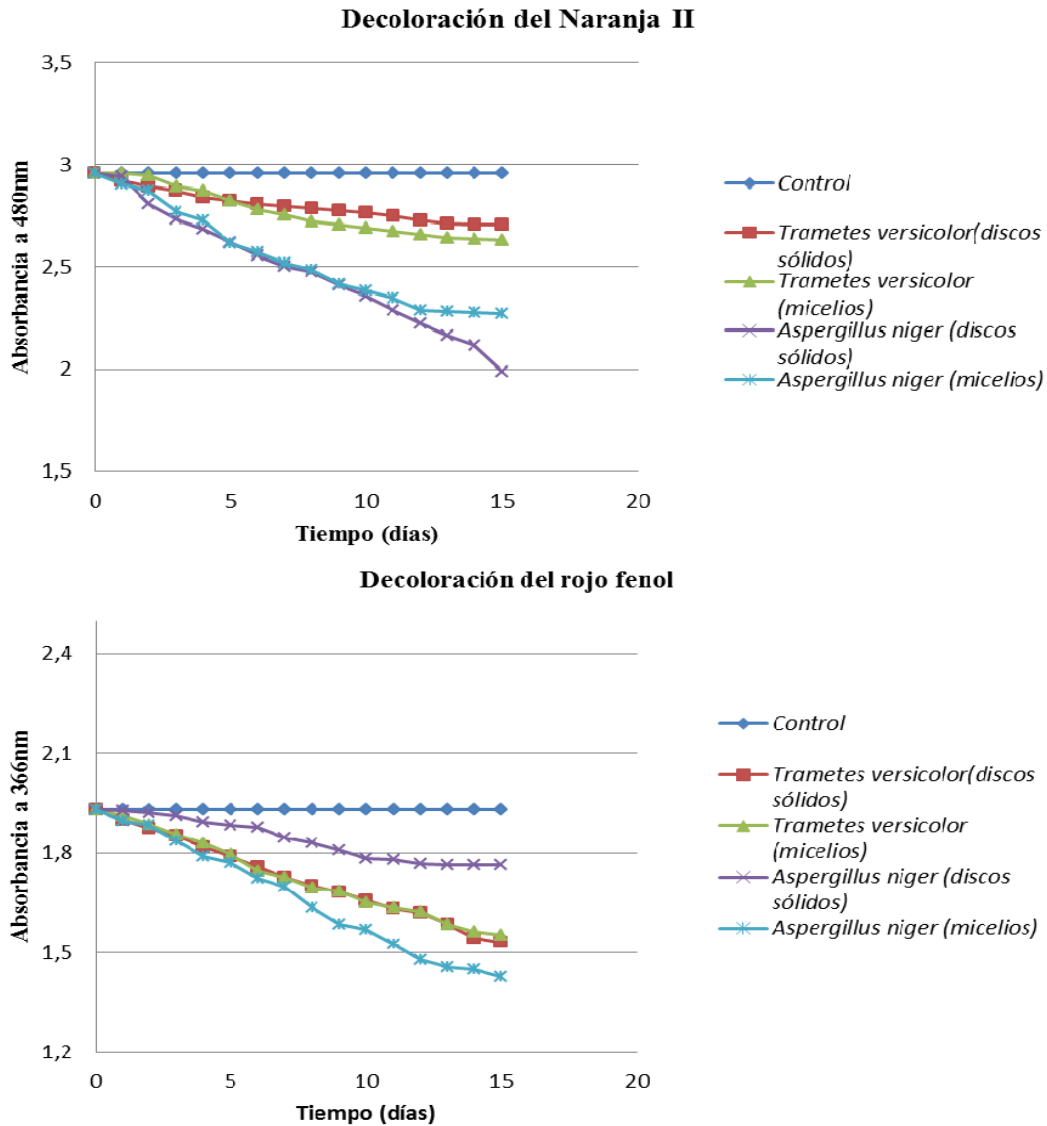


Figura 5. Decoloración de los colorantes: a) Naranja II y b) Rojo fenol

4. Conclusiones

La recolección, purificación e identificación de *Trametes versicolor* permitió la aplicación de sus micelios para los respectivos tratamientos tanto para la remoción de polifenoles totales como para la decoloración de los colorantes.

La revitalización, siembra e identificación de *Aspergillus niger* permitió la aplicación de sus conidios sobre los tratamientos biológicos mencionados.

El extracto tánico obtenido a partir de las vainas de *Caesalpinia spinosa* presentó una concentración de polifenoles aplicable como sustrato inductor para cada uno de los tratamientos biológicos aplicados.

Con la aplicación de los tratamientos para la remoción de polifenoles naturales en el extracto tánico se obtuvo un porcentaje de remoción del 69,45 % con *Trametes versicolor* y del 63,45 % con *Aspergillus niger*.

Esta degradación se debe a que al existir una mayor concentración de compuestos aromáticos aumenta la actividad de la lacasa, que le da mayor estabilidad y un mayor tiempo de vida a la enzima producida por este hongo, pero cabe recalcar que existen muchos compuestos aromáticos como el 1-hidroxibenzotriazol, entre otros pueden actuar como inductores de la actividad lacasa incrementando eficazmente la actividad de la enzima, sin embargo la naturaleza aromática de estos los hace muy tóxicos, lo que dificulta su aplicación industrial; es por ello que en esta investigación se utiliza compuestos que están presentes en la naturaleza y en teoría de más baja toxicidad como los taninos presentes en el Guarango.

La decoloración de cada uno de los colorantes varía de acuerdo al tratamiento por 15 días; siendo *Trametes versicolor* el que presentó los mejores porcentajes de remoción para el extracto tánico y de decoloración para el colorante índigo carmín con un porcentaje de 100 %.

El tratamiento realizado con *Aspergillus niger* presentó mayor decoloración de los colorantes naranja II y rojo fenol con un 32,78 % y 26 % respectivamente.

Se presume que un factor muy importante en el alto porcentaje de degradación del *Trametes versicolor* se debe a que el pH óptimo del medio es de 5.5, que según reportó Field (1997) a este pH las enzimas presentan un mayor índice de biodegradación.

La decoloración que se presenta en las curvas de remoción obtenidas mostró un cambio de color a través del tiempo, debido a una modificación del complejo autóromo cromóforo asociado a un posible ataque enzimático del grupo hidroxilo de la molécula del colorante. La lacasa reacciona con el colorante porque se da una interacción electrostática entre las fracciones aniónicas del colorante (grupos sinfónicos) y los aminoácidos cargados de la enzima.

La cinética de crecimiento de los dos hongos en estudio no fue afectado por el extracto tánico ni por

las concentraciones de los colorantes empleados para esta investigación. Esto indica que tanto *Trametes versicolor* y *Aspergillus niger* presentaron un nivel de tolerancia óptimo para los tratamientos aplicados.

Referencias

- Garzón, R. 2009. **Cinética de degradación de colorantes textiles de diferentes clases químicas por hongos y bacterias inmovilizados sobre fibra de Agave tequilano Webber var. Azul.** Bogotá, págs. 4–5.
- Marín, I., J. Sanz y R. Amils. 2005. **Biotecnología y medioambiente.** Editorial Ephemera, Madrid, España, págs. 60, 63.
- Miranda, M. y A. Cuéllar. 2001. **Farmacognosia y Productos Naturales.** Editorial "Félix Varela", La Habana, Cuba.
- Moreno, N. y X. Ospina. 2008. **Evaluación de inductores metálicos y co-sustratos para la remoción de negro 5 empleando *Pleurotus ostreatus* inmovilizado en fique.** Pontificia Universidad Javeriana.
- Rajchenberg, M. 1996. **Los hongos pudridores de nothofagus pumilio (lenga): identificación de cultivos puros.** Universidad Austral de Chile, 17: 97–98.
- Robinson, T., G. McMullan, R. Marchant y N. P. 2001. **Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative.** Bioresource Technology, págs. 77, 247–255.
- Rodríguez, R. y C. Aguilar. 2009. **Biodegradación de taninos.** Universidad Autónoma de Coahuila, URL <http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/CienciaCierta/CC17/cc17taninos.html>, obtenido el 11 de Enero de 2011.