

Remoción de colorantes textiles aplicando hongos ligninolíticos inmovilizados en turmalina

Mendoza Santamaría Luis Octavio, Cruz Colín María del Rocío*, Chávez Martínez Margarita, Ávila Jiménez Miguel, Castañeda Briones María Teresa, Espinoza-Castañeda Marisol

Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Ciencias Básicas. Av. San Pablo No. 180, Azcapotzalco, Ciudad de México, C.P. 02200. México.

*Autor para correspondencia: ccmr@azc.uam.mx

Recibido:

13/marzo/2020

Aceptado:

30/octubre/2020

Palabras clave:

Remoción,
hongos inmovilizados,
turmalina

Keywords:

Removal,
immobilized fungus,
tourmaline

RESUMEN

En este trabajo se estudió la remoción del colorante textil Azul-F-Oro, por los hongos ligninolíticos *Phanerochaete chrysosporium* y *Pycnoporus cinnabarinus*, dos géneros importantes por sus eficientes sistemas enzimáticos degradadores de compuestos orgánicos. El soporte de inmovilización fue turmalina, mineral borosilicato con alto contenido de hierro y otros metales que actúan como cofactores de las enzimas, mejorando su actividad. La inmovilización de los hongos por separado, se realizó inoculando caldo extracto de malta (conteniendo la turmalina estéril) con una suspensión de esporas e incubando a temperatura ambiente durante 5 días. Los hongos inmovilizados se agregaron por duplicado en matraces con 150.0 mL conteniendo una solución acuosa del colorante a una concentración de 50 ppm y se incubaron en cultivo estático durante 24 días. La decoloración se determinó por el método espectrofotométrico a 564 nm. Los porcentajes de remoción del colorante fueron del 96.7% con *P. chrysosporium* y del 99.7% con *P. cinnabarinus*.

ABSTRACT

In this paper, the removal of Blue-F-Gold textile dye by ligninolytic fungi was studied. *Phanerochaete chrysosporium* and *Pycnoporus cinnabarinu* are two important genera due to their efficient enzymatic systems that degrade organic material. The immobilization solution was tourmaline, a borosilicate mineral high in iron and other metals that act as cofactors of enzymes, improving their activity. Immobilization of the fungi was performed separately whereby inoculating malt extract broth (containing sterile tourmaline) with a spore suspension and incubating at room temperature for 5 days. The immobilized fungi were added in duplicate to 150.0 mL flasks containing an aqueous solution of the dye at a 50 ppm concentration and incubated in static cultivation for 24 days. Discoloration was determined by spectrophotometric method at 564 nm. The dye removal percentages were 96.7% with *P. chrysosporium* and 99.7% with *P. cinnabarinus*.

Introducción

Las aguas residuales textiles son difíciles de tratar, ya que los colorantes que contienen poseen estructuras aromáticas complejas, estables en el ambiente y muy recalcitrantes, que pueden ser grupos cromóforos tipo azo, carbonilo, metilo, nitro y quinoide (Christie, 20019). En la actualidad existen variados procesos para la remoción de colorantes en aguas residuales, los cuales pueden ser tratamientos físicos, químicos y biológicos. La biorremediación es un tipo de tratamiento biológico donde se utilizan bacterias y hongos para la eliminación de colorantes en agua, por la acción de enzimas microbianas. Los basidiomicetos conocidos como hongos de pudrición blanca poseen un importante sistema enzimático para degradar lignina que además pueden oxidar una gran variedad de sustratos entre los cuales se encuentran los colorantes textiles, por tener una estructura similar a las subunidades de fenil propano que conforman al polímero de lignina, por lo que logran su mineralización (Cardona et al., 2009; Fernández et al, 2009). El sistema enzimático de los hongos ligninolíticos está constituido por tres enzimas inespecíficas llamadas: Lignina Peroxidasa (LiP) (E.C.1.11.1.14), Manganese Peroxidasa (MnP) (E.C.1.11.1.13) y la Lacasa (Lac) (1.10.3.2), las cuales están clasificadas como oxidasas (Battaner, 2013). La producción de biomasa fúngica es un factor importante para la degradación de colorantes, ya que se relaciona con la capacidad de adsorción en la pared celular, compuesta en un 70% por polisacáridos con carga negativa como la quitina, a los que se pueden unir por intercambio iónico una gran variedad de moléculas de colorantes. Por otro lado, si la biomasa se inmoviliza en soportes inorgánicos y porosos, se desarrollan eficientes portadores bifásicos, que combinan las propiedades físicas de la matriz sólida con el potencial bioquímico de las enzimas del hongo inmovilizado (Gómez et al., 2008). Existen muchos y muy variados tipos de soportes, entre los cuales la turmalina sobresale por sus propiedades eléctricas, magnéticas y caloríficas, que pueden estimular el crecimiento y metabolismo de los hongos. Además, la turmalina contiene altas concentraciones de metales como el hierro que las enzimas de los hongos lo utilizan como cofactores para la activación de su sitio activo (Wang et al., 2014).

Metodología

La experimentación de este trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ambiental de la UAM-Azcapotzalco. Se removió el colorante Azul F-oro de una solución acuosa utilizando los hongos *Phanerochaete chrysosporium* (Ph) y *Pycnoporus cinnabarinus* (Py). La cepa de *P. chrysosporium* (N° de clasificación: ATCC 34540 y CDBB-H-686) fue donada por la Colección de

Cultivos Microbianos (CDBB-500) del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN). De la cepa de *P. cinnabarinus* no se cuenta con los datos de clasificación. La turmalina utilizada provino de la mina Verónica II, localizada en el Municipio de Suaqui Grande, en el estado mexicano de Sonora. Dicho mineral fue caracterizado por las técnicas de Difracción de Rayos X (DRX), Espectroscopía de Infra Rojo por Transferencia de Fourier (FITR), Microscopía Electrónica de Barrido (MEB) y Espectroscopía Electrónica de Energía Dispersiva (EDS), encontrándose que pertenecía al grupo de los ciclosilicatos con formas de prismas romboedrales, con una composición microanalítica de los siguientes elementos químicos: Na, Mg, Ca, Al, Si, Ti, Cr, Mn, Fe y Ni (Chávez et al., 2016).

Preparación de la solución del colorante

La solución del colorante Azul F-oro, fue preparada con los componentes que se indican en la tabla 1. Cabe hacer notar que esta solución contenía las sales básicas necesarias para el desarrollo de los hongos propiciando la utilización del colorante como sustrato principal.

Tabla 1. Composición de la solución del colorante Azul F-oro.

Componente	Concentración (g/L)
Glucosa (C ₆ H ₁₂ O ₆)	10.0
Fosfato monopotásico (KH ₂ PO ₄)	2.0
Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO ₄ *7H ₂ O)	0.5
Cloruro de calcio (CaCl ₂)	0.1
Tartrato de amonio ((NH ₄) ₂ C ₄ H ₄ O ₆)	0.5
Colorante Azul F-oro	0.05
Agua desionizada	cpb

Se elaboró una curva de calibración para determinar la concentración de colorante en la solución. Se prepararon diluciones que iban de 0 a 50 ppm de colorante y se obtuvo el espectro de absorción para cada dilución en un intervalo de longitud de onda de 200 a 700 nm mediante un espectrofotómetro Shimadzu UV-1800. Se determinó la longitud de onda con la absorbancia máxima y se hizo el tratamiento de datos generando así la relación de la absorbancia con la concentración de colorante.

Preparación de los inóculos

Se desarrollaron cultivos de agar inclinado de las dos cepas de hongos utilizadas Ph y Py, durante cinco días a 28°C, utilizando el agar Extracto de Malta (AEM) de la marca Difco. Para la realización de la "cosecha" por barrido de las esporas maduras, se agregó a los tubos de cultivos, 1.0 mL de una solución salina (NaCl 0.15M) estéril, para obtener las suspensiones de esporas que se utilizaron como inóculo.

Acondicionamiento de la turmalina

La turmalina fue triturada para obtener un tamaño de partícula menor y una mayor superficie de contacto para el crecimiento de los hongos. Después se tamizó con una malla de 2 mm. La turmalina tamizada se muestra en la figura 1. Para determinar el grado de porosidad de la turmalina, se le tomaron micrografías utilizando el Microscopio Electrónico de Barrido ZEISS Modelo SUPRA 55VP perteneciente a la División de Ciencias Básicas e Ingeniería (DCBI) de la UAM Azcapotzalco.



Figura 1. Imagen de la turmalina tamizada utilizada para la inmovilización de los hongos *Ph* y *Py*.

Inmovilización de los hongos en la turmalina

Para realizar la inmovilización de los hongos, se colocaron 10.0 g de turmalina en cajas Petri chicas agregando 10.0 mL de caldo extracto de malta marca Difco y fueron sometidas a dos procesos de esterilización. La primera esterilización fue en autoclave durante 15 minutos a 121°C y la segunda exponiéndolas 15 minutos a la luz UV directa en una campana de flujo laminar Thermo Scientific 1300 Series A2. Una vez estériles, las cajas con el caldo de cultivo y la turmalina, se inocularon con 1.0 mL de la suspensión de esporas y se dejaron desarrollar durante 5 días a 28°C. En la figura 2, se observa el desarrollo de este proceso.

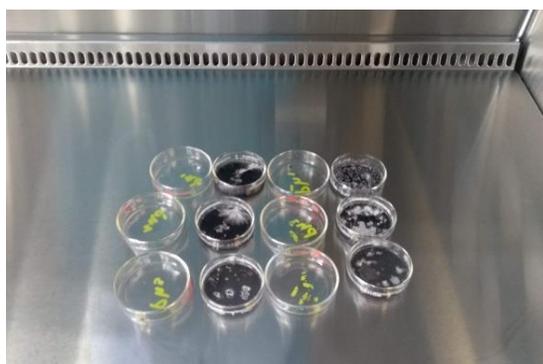


Figura 2. Cajas Petri de donde se realizó el proceso de inmovilización de los hongos en la turmalina.

Tratamiento de remoción del colorante

Para el proceso de remoción del colorante Azul F-oro, se prepararon por duplicado biorreactores en matraces Erlenmeyer de 250 mL, a los que se les agregaron 150.0 mL de la solución del colorante antes mencionada y el correspondiente hongo ya inmovilizado en la turmalina. Para evaluar la remoción del colorante por los hongos sin inmovilizar, se prepararon biorreactores agregando solo los inóculos sin la turmalina. Asimismo, para saber si hubo adsorción del colorante en el micelio de cada uno de los hongos, se prepararon los biorreactores con el hongo desarrollado en la turmalina y posteriormente esterilizado. Como testigo para todos los tratamientos, se preparó un biorreactor con turmalina sin inocular y se procedió a incubar de la misma manera que los demás, a temperatura ambiente y en condiciones estáticas. En la tabla 2, se presentan los tratamientos realizados.

Tabla 2. Condiciones en los biorreactores para la remoción del colorante Azul F-oro.

Biorreactor	Condición
Biorreactor 1	Turmalina + <i>P. chrysosporium</i>
Biorreactor 2	Turmalina + <i>P. cinnabarinus</i>
Biorreactor 3	Turmalina
Biorreactor 4	<i>P. chrysosporium</i>
Biorreactor 5	<i>P. cinnabarinus</i>
Biorreactor 6	Turmalina + <i>P. chrysosporium</i> (micelio estéril)
Biorreactor 7	Turmalina + <i>P. cinnabarinus</i> (micelio estéril)

Resultados y discusión

Acondicionamiento de la turmalina

Al observar las micrografías de la turmalina (figuras 3 y 4) se comprueba que la turmalina no funciona como matriz fibrilar ya que no se observó porosidad en los diferentes aumentos. Al no funcionar como matriz fibrilar el hongo solamente se desarrolló por encima de su superficie y no por dentro de la turmalina.

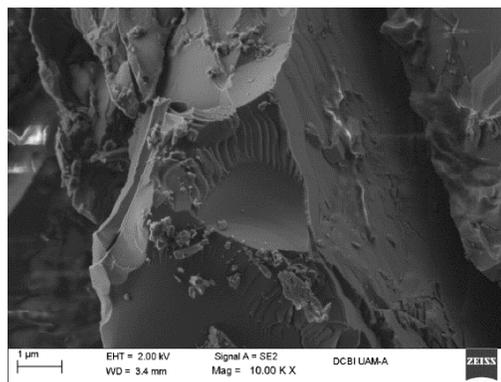


Figura 3. Micrografía de la turmalina a 10,000 aumentos.

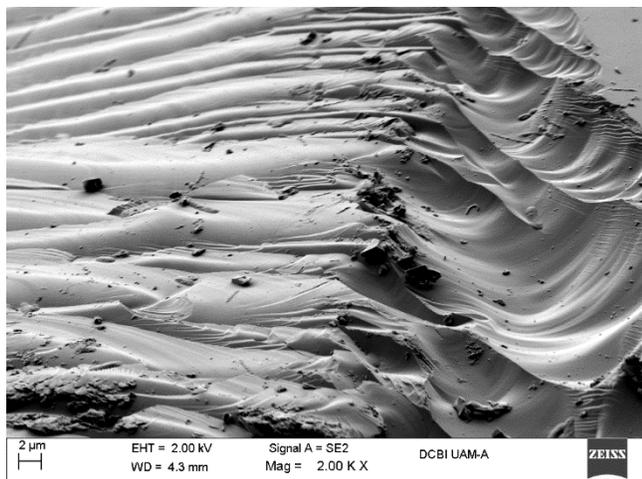


Figura 4. Micrografía de la turmalina a 2,000 aumentos.

Curva de calibración del colorante

Los espectros de absorción de las diluciones del colorante presentaron una absorbancia máxima a 564 nm. La curva de calibración mostrada en la figura 5 mostró un coeficiente de correlación de 0.99914, esto indica que la absorbancia y la concentración de colorante se relacionan de manera lineal en el intervalo de 0 a 50 ppm.

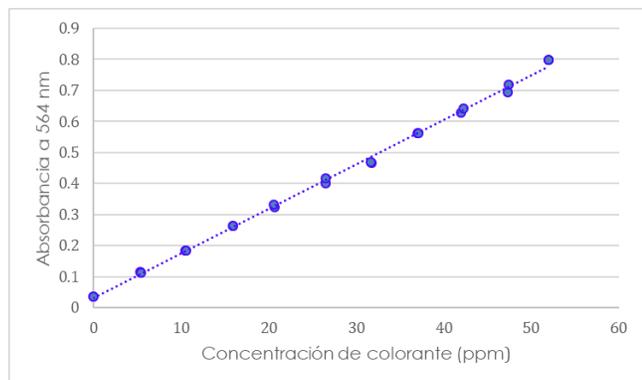


Figura 5. Curva de calibración del colorante Azul F-oro.

Tratamientos de decoloración

Turmalina + *P. chrysosporium*

En la figura 6 se muestra la variación del espectro de absorción con respecto al tiempo, observándose una disminución de la absorbancia en todo el intervalo de longitud de onda y la misma forma del espectro conforme pasa el tiempo. Finalmente, a partir del día 21 la absorbancia registrada a 564 nm para el colorante tiende a ser constante y muy cercana a cero por lo que el día 24 se detuvo el tratamiento de decoloración.

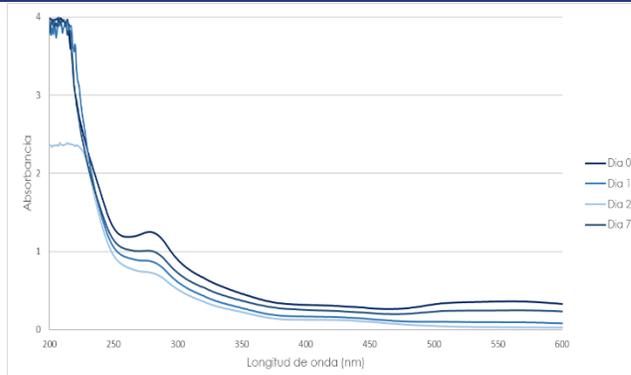


Figura 6. Espectro de absorción del tratamiento Turmalina + Ph.

La figura 7 muestra la tendencia de remoción del colorante, observándose que a partir del día 3 se comienza a remover constantemente hasta el día 10 donde la concentración se acerca cada vez más al cero. A partir del día 14 la remoción de colorante comenzó a mostrarse constante. El biorreactor 1 "*Phanerochaete* + turmalina" obtuvo remociones de colorante del 96.7% después de los 24 días de tratamiento.

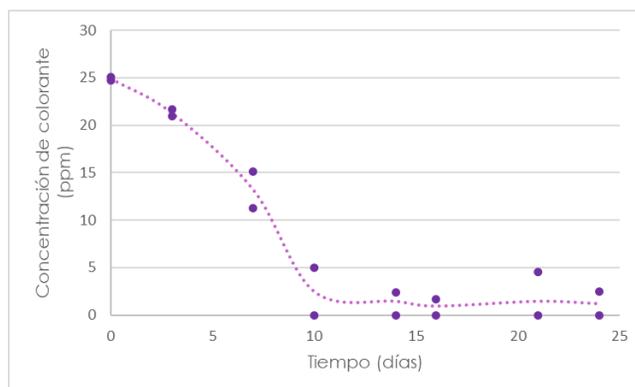


Figura 7. Variación de la concentración del colorante en el tratamiento Turmalina + Ph.

Turmalina + *P. cinnabarinus*

En la figura 8 se muestran los espectros de absorción obtenidos en el biorreactor 2 con respecto al tiempo, observándose que a partir del día 10 la absorbancia de la región ultravioleta comienza a aumentar en 280 nm mientras que en la región visible comienza a ser constante cercana a cero. Se mantiene la teoría de que el hongo primero transforma el colorante en moléculas menos complejas y después asimila estas moléculas.

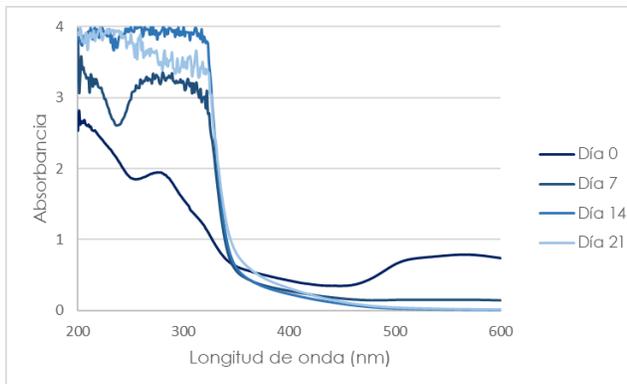


Figura 8. Espectro de absorción del tratamiento Turmalina + Py.

En la figura 9 se muestra el comportamiento de la concentración de colorante para el reactor 2. Se observa que desde el día cero comienza a remover el colorante y a partir del día 10 los valores son constantes, cercanos a cero. Por otro lado, la absorbancia a 280 nm referente a los subproductos comienza a aumentar hasta el día 10 y disminuye conforme pasa el tiempo. En este tratamiento se obtuvo una remoción del colorante del 99.7%, es importante resaltar que este hongo removió el colorante desde el día 10.

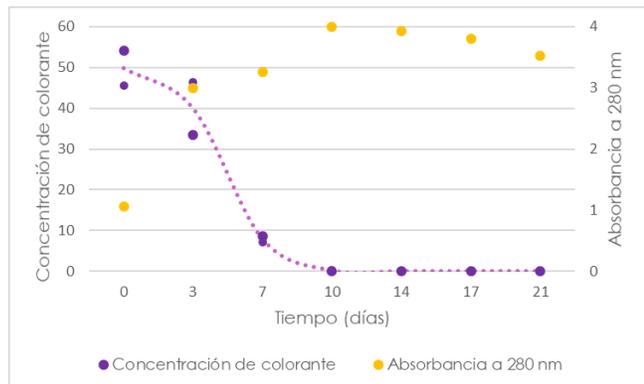


Figura 9. Variación de la concentración del colorante en el tratamiento Turmalina + Py.

Phanerochaete chrysosporium

En la figura 10 se presentan los espectros de absorción durante el tratamiento utilizando el hongo *P. chrysosporium* sin inmovilizar, observando que a partir del día 7 comienza a ser constante la absorbancia máxima de la región visible. Al igual que el reactor 1 los espectros de absorbancia para este reactor decrecen de manera constante siguiendo la teoría de que *P. chrysosporium* degrada con eficiencia al colorante.

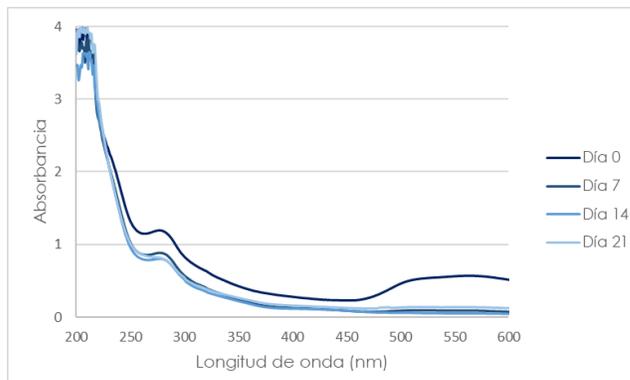


Figura 10. Espectros de absorción del tratamiento solo con *Phanerochaete chrysosporium*.

En la figura 11 se observa la biodegradación del colorante solo con *Phanerochaete chrysosporium*, la velocidad de decoloración fue mayor en comparación del reactor 1. Al final del tratamiento se alcanzó un 98.2% de remoción de colorante.

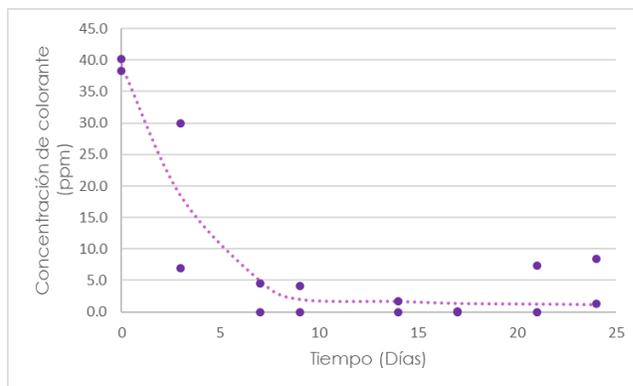


Figura 11. Variación de la concentración del colorante del tratamiento solo con *Phanerochaete chrysosporium*.

Pycnoporus cinnabarinus

En la figura 12 se muestra los espectros de absorción del tratamiento con *Pycnoporus cinnabarinus*.

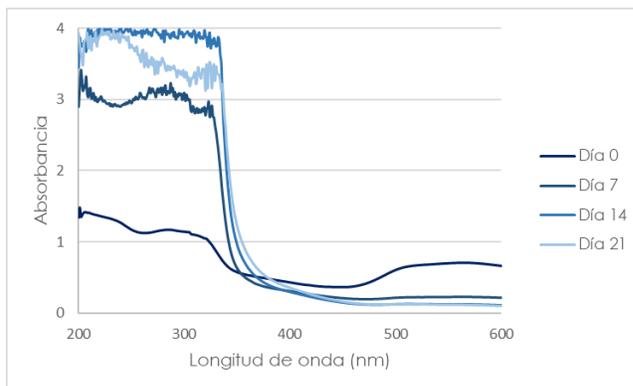


Figura 12. Espectros de absorción del tratamiento solo con *Pycnoporus cinnabarinus*.

Se presentan los espectros de absorción durante el tratamiento utilizando el hongo *P. cinnabarinus* sin inmovilizar, observando que la transformación del colorante produce varios subproductos que también son transformados al final del tratamiento.

La remoción del colorante en este tratamiento fue del 84.8%. La figura 13 muestra la disminución de la concentración de colorante con respecto del tiempo.

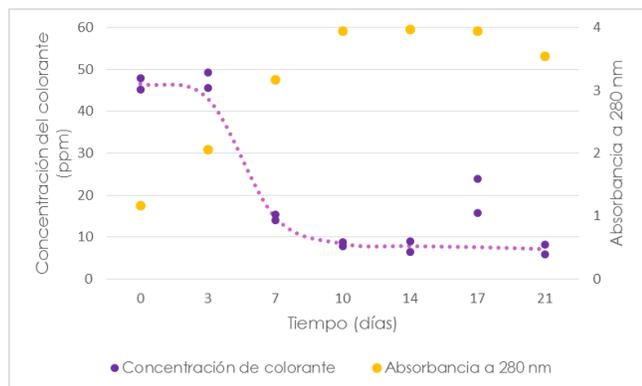


Figura 13. Variación de la concentración del colorante del tratamiento solo con *Pycnoporus cinnabarinus*.

Los biorreactores 3, 6 y 7, que se colocaron como testigos para determinar si se presentaba la desaparición del colorante solo en el soporte y por adsorción en los micelios inertes de los hongos, presentaron contaminación y no fue posible sacar conclusiones.

En la tabla 2, se presentan los porcentajes de degradación del colorante Azul F-oro en los tratamientos realizados

Tabla 2. Porcentajes de degradación obtenidos en los tratameintos realizados.

Tratamiento	% de Remoción
Turmalina + <i>P. chrysosporium</i>	96.7
Turmalina + <i>P. cinnabarinus</i>	99.7
Turmalina	-----
<i>P. chrysosporium</i>	98.2
<i>P. cinnabarinus</i>	84.2
Turmalina + <i>P. chrysosporium</i> (micelio estéril)	-----
Turmalina + <i>P. cinnabarinus</i> (micelio estéril)	-----

Conclusiones

De acuerdo a las micrografías de la turmalina, se concluye que no funciona como matriz fibrilar al no poseer una superficie porosa.

P. chrysosporium removió al colorante a partir del día 14 del tratamiento, por lo que se concluye que degrada directamente a la molécula de colorante, mientras que *P. cinnabarinus* lo hizo desde el día 7, por lo que se propone que este hongo primero transforma el colorante en moléculas menos complejas y después las metaboliza.

Comparando los porcentajes de remoción del colorante de cada hongo inmovilizado en la turmalina, se tiene que el *P. cinnabarinus* fue más eficiente que *P. chrysosporium*. Por otro lado, al comparar los porcentajes de remoción del colorante de cada hongo sin inmovilizar, se concluye que *P. chrysosporium* fue mas eficiente que *P. cinnabarinus*.

Finalmente se tiene que, en este trabajo, el mejor tratamiento de remoción de colorante textil Azul-F-Oro fue *P. cinnabarinus* inmovilizado en la turmalina.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la DCBI por permitirnos utilizar el Microscopio Electrónico de Barrido ZEISS Modelo SUPRA 55VP ubicado en la planta baja del edificio W, para la caracterización de la turmalina utilizada.

Referencias

Battaner A.E. (2013). Compendio de Enzimología. Ediciones de la Universidad de Salamanca. España.

Cardona M., Osorio J., Quintero J. (2009). Degradación de colorantes industriales con hongos ligninolíticos. *Revista de la Fac. de Ing. Universidad de Antioquia*. 48: 27-37.

Chávez M.M., Salcedo L.M.C., Naranjo C.F.A., Hernández M.L., Cruz C.M.R., Ávila J.M. (2016). Estudio y caracterización de turmalina de Suaqui Grande, Sonora México. *Revista Tendiq. 2*, 2: QM157-166.

Christie R.M. (2001). *Color Chemistry*. Cambridge: Royal Society of Chemistry. United Kingdom.

Fernández J.A., Henao, L.M., Pedroza-Rodríguez, A.M., Quevedo-Hidalgo B. (2009). Inmovilización de hongos ligninolíticos para la remoción del colorante negro reactivo 5. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 11: 59-72.

Gómez-Bertel S., Amaya-Bulla D., Maldonado-Saavedra C., Martínez-Salgado M.M., Quevedo-Hidalgo B., Soto-Guzmán A., Pedroza-Rodríguez A.M. (2008). Evaluación de *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger* como alternativa para el tratamiento de aguas residuales del curtido de pieles. *Rev. Int. Cont. Amb.* 24: 93-106.

Wang C., Yu L., Zhang Z., Wang B., Sun H. (2014). Tourmaline combined with *Phanerochaete chrysosporium* to remediate agricultural soil contaminated with PAHs and OCPs. *Journal of Hazardous Materials*. 264: 439-448.