

Efecto del tiempo previo de crecimiento sobre la biodegradación fúngica del verde de malaquita

Ávila Jiménez Miguel*, González Arias Erika, Castañeda Briones María Teresa, Cruz Colín María del Rocío, Chávez Martínez Margarita, 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: miaj@correo.azc.uam.mx

Recibido:

27/julio/2017

Aceptado:

2/agosto/2017

Palabras clave

Verde de Malaquita,
hongos filamentosos,
proceso de decoloración

Keywords

Malachite Green,
filamentous fungi,
decoloration process

RESUMEN

Se estudió la capacidad de tres hongos filamentosos para degradar el colorante Verde de Malaquita (VM), previamente desarrollados a diferentes tiempos, antes de ser expuestos al colorante. Las cepas de los hongos utilizados se denominaron H1, HA y SA. El VM se probó a una concentración de 6 ppm. Para el primer tratamiento, el colorante se agregó al mismo tiempo que el inóculo. Para el segundo y tercer tratamiento, el colorante se agregó a los biorreactores después de una semana y después de dos semanas de incubación, respectivamente. El proceso de decoloración se realizó en cultivo estático, a temperatura ambiente durante 15 días. Los resultados indican que el tiempo de crecimiento de los hongos previo a la exposición con el VM, es un factor importante para mejorar su actividad degradativa.

ABSTRACT

The study was focused on three filamentous fungi to degrade Malachite Green dye (MG), previously grown at different times, before being exposed to the dye. The fungi strains used were named H1, HA and SA. The MG was probed at a 6 ppm concentration. For the first treatment, the dye was added with the inoculum. For the second and third treatments, the dye was added to the biorreactors one and two weeks after incubation, respectively. The decoloration process was executed on a static crop at room temperature for 15 days. The results show that the growing time of the fungi prior the MG exposition is an important factor in order to improve its degrading activity.

Introducción

En la actualidad existen más de 100,000 colorantes sintéticos comerciales disponibles con una producción anual de más de 7×10^5 toneladas/año que son de importancia primordial para la fabricación de textiles (McMullan et al., 2001). Estos colorantes están principalmente asociados con la contaminación del agua, ya que se estima que el 2% de la producción anual son descargados en los efluentes provenientes de operaciones de manufactura, mientras que el 10% de las descargas está relacionado con la industria textil (Allen y Koumanova, 2005).

Las aguas residuales de la industria textil son difíciles de tratar debido a que los colorantes contienen estructuras moleculares aromáticas complejas, que los hacen estables en el ambiente y difíciles de degradar. Los hongos de la podredumbre blanca de la madera se han empleado para el tratamiento de efluentes textiles debido a que las enzimas inespecíficas que sintetizan, asociadas con la degradación de lignina, son capaces de oxidar una amplia variedad de compuestos orgánicos contaminantes como colorantes e hidrocarburos poliaromáticos. (Vasdev, 2011; Przystas et al., 2015; Chmelová y Ondrejovič, 2016).

El Verde de Malaquita (VM) es un colorante catiónico soluble en agua que aparece como polvo cristalino verde y pertenece a la categoría de trifenilmetano (Raval et al., 2016), este colorante es un compuesto orgánico que se utiliza extensamente para colorear papel y productos de cuero, teñir algodón, lana, seda y yute, así como en impresión, en destilerías y otras industrias. (Khattri y Singh, 1999; Joshi y Mhatre, 2015). Entre todos los otros tintes de su categoría, el VM tiene propiedades que hacen que sea difícil de eliminar de soluciones acuosas, sin embargo, se han aplicado muchas tecnologías de tratamiento para decolorar VM a partir de medio acuoso, tales como adsorción (Allen y Koumanova, 2005; Raval et al., 2016), biodegradación (Du et al., 2013; Olukanni et al., 2013; Verma et al., 2017) y decoloración (Daneshvar et al., 2007; Vasdev, 2011). Si las aguas residuales contaminadas con el colorante VM, son desechadas a las aguas nacionales sin ningún tratamiento, pueden afectar la vida acuática, además de llegar a perjudicar a la salud humana, con daños en el hígado, branquias, riñón e intestino (Daneshvar et al., 2007), por lo tanto, es conveniente la eliminación eficaz de este colorante de las aguas residuales.

Ávila y colaboradores (2014), reportaron que el VM en cultivo sólido tuvo un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de hongos ligninolíticos. Con el propósito

de mejorar los procesos de decoloración, en el presente trabajo se estudió el efecto del tiempo de crecimiento de tres hongos previo a la exposición de colorante, sobre la capacidad de decoloración del VM.

Metodología

Preparación del inóculo

Se utilizaron tres cepas de hongos, las cuales fueron previamente aisladas de bagazo de caña (Sotelo, 2011) y se identificaron como H1, HA y SA (Figura 1).

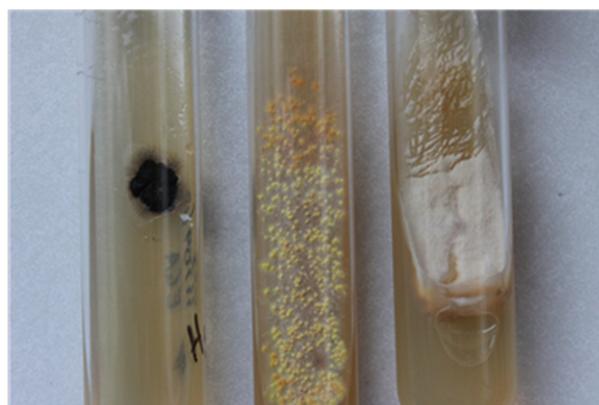


Figura 1. Imagen de las cepas de los hongos. De izquierda a derecha: H1, HA y SA.

Las cepas se mantuvieron en cultivo inclinado de agar extracto de malta (AEM). Para su propagación, se inocularon en botellas Roux con AEM y se dejaron desarrollar a temperatura ambiente durante 6 semanas. Posteriormente, se les agregaron 350 mL de medio salino estéril para obtener una suspensión de esporas de cada hongo, la cual fue utilizada como inóculo en las pruebas de decoloración del VM. La composición por litro del medio salino fue: 5.0 g glucosa, 2.0 g KH_2PO_4 , 0.5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g CaCl_2 , 0.5 g de tartrato de amonio y 0.04 g de $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

Efecto del tiempo de incubación

Las unidades de experimentación fueron pequeños biorreactores a los cuales se les agregaron 90 mL del medio salino más 10 mL de la suspensión de esporas o inóculo de cada uno de los hongos. El colorante VM a una concentración de 6 ppm, se agregó después de tres diferentes tiempos: 0, 1 y 2 semanas de desarrollo a temperatura ambiente en cada biorreactor. Adicionalmente, se prepararon testigos sin colorante y testigos sin inóculo. Las pruebas se realizaron por

triplicado. El proceso de decoloración se llevó a cabo en condiciones estáticas y a temperatura ambiente durante 15 días. La concentración de colorante remanente en los biorreactores se determinó espectrofotométricamente a 617 nm utilizando un espectrofotómetro *Shimadzu UV1800*. A diferentes tiempos de tratamiento se tomaron muestras de 1 mL de cada biorreactor y previo a la determinación de la concentración de colorante se realizó un centrifugado a 7000 rpm durante 5 minutos para separar la biomasa.

Cinética de los procesos de decoloración

Los datos experimentales de concentración remanente de VM en los biorreactores y tiempo fueron correlacionados con las ecuaciones cinéticas integradas de primer y segundo orden (Fogler, 2001) para determinar el orden de reacción del proceso de decoloración (Tabla 1). Posteriormente, se calculó el valor de la constante cinética a partir del ajuste de los datos experimentales con la respectiva ecuación cinética integrada.

Tabla 1. Dependencia de la concentración con la constante de velocidad.

Orden de reacción	Función de la concentración
Primer orden	$kt = -\ln \frac{C_A}{C_{A,0}}$
Segundo orden	$kt = -\left(\frac{1}{C_A} - \frac{1}{C_{A,0}}\right)$

Resultados y discusión

Efecto del tiempo de incubación

En la Figura 2, se presentan los resultados de la decoloración del VM por las cepas cuando la adición del colorante y la inculación se realizaron al mismo tiempo. Se observa una clara decoloración del VM con la cepa de hongo H1, el proceso se llevó a cabo hasta la casi completa eliminación del colorante en un periodo de 15 días, obteniéndose un 95.0% de decoloración. Por el contrario, los hongos HA y SA prácticamente no mostraron capacidad para realizar la decoloración del VM en estas condiciones.

Con una semana de incubación previa a la adición del colorante (Figura 3) se observa la decoloración del VM con las tres cepas, encontrando la mayor decoloración con el hongo H1, seguido del hongo SA y finalmente con el hongo HA, que fue el que presentó la menor decoloración. El proceso con el hongo H1 comparado con el observado en la figura 2, mostró una mayor velocidad de decoloración de tal forma que se alcanzó un 95.7% decoloración en un periodo de 11 días de tratamiento y la casi completa eliminación del colorante a los 15 días (99.3%). La eliminación del VM que se alcanzó con los hongos SA y HA, después de 15 días fue del 95.8 y 65.7%, respectivamente.

En la figura 4 se presentan los procesos de la eliminación del colorante cuando las cepas tuvieron 2 semanas de crecimiento antes de su exposición al colorante. Los porcentajes de decoloración que se obtuvieron con los hongos H1, SA y HA fueron de 98.8, 82.6 y 69.8%, respectivamente, en el mismo periodo de 15 días.

Los resultados anteriores indican que el tiempo de crecimiento de los hongos previo a la exposición con el colorante es un factor importante a considerar para mejorar su actividad decolorante (Tabla 2). Con 1 y 2 semanas de crecimiento previo a la adición de VM, los tres hongos mejoraron su capacidad para eliminar el colorante, hecho que no sucedió con las cepas SA y HA cuando el colorante fue agregado al mismo tiempo que el inóculo.

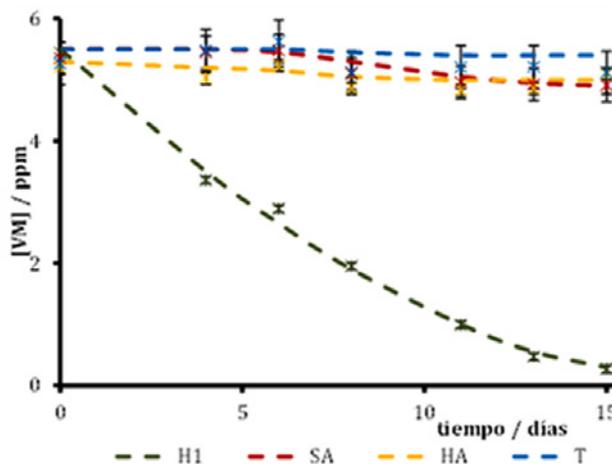


Figura 2. Decoloración del VM por las cepas con la adición de colorante al mismo tiempo que el inóculo.

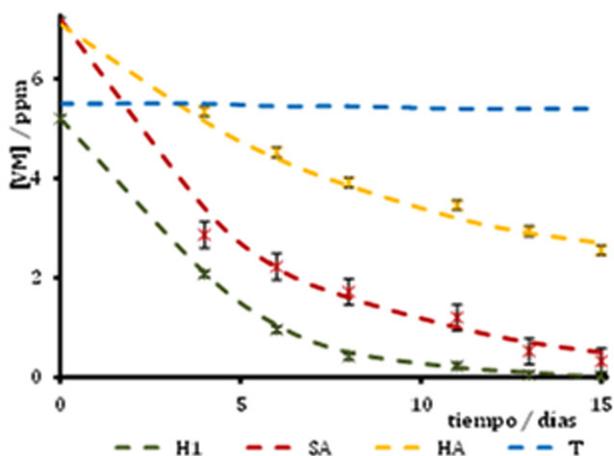


Figura 3. Decoloración del VM por las cepas con 1 semana de crecimiento previo a la adición de colorante.

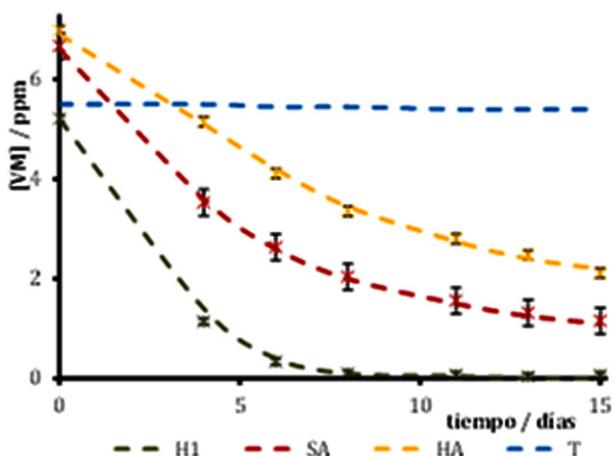


Figura 4. Decoloración del VM por las cepas con 2 semanas de crecimiento previo a la adición de colorante.

El hongo H1 mostró la mejor capacidad para llevar a cabo la decoloración del VM con: 95.0, 99.3 y 98.8%, seguido por el hongo SA con 8.3, 95.8 y 82.6% y el hongo HA presentó la menor capacidad para realizar este proceso con 2.0, 65.7 y 69.8% de decoloración, a los tiempos de 0, 1 y 2 semanas de incubación al momento de agregar el colorante, respectivamente. Los resultados obtenidos muestran una mejora en la capacidad de decolorar al VM de los tres hongos cuando hay un tiempo de desarrollo previo a la adición del VM comparado con el tratamiento en el cual se adiciona el colorante al mismo tiempo que se inocula.

Tabla 2. Efecto del tiempo de crecimiento previo a la adición de colorante sobre el % de decoloración.

Tiempo de crecimiento previo/semana	% de decoloración de VM		
	H1	SA	HA
0	95.0	8.3	2.0
1	99.3	95.8	65.7
2	98.8	82.6	69.8

Cinética de los procesos de decoloración

La correlación de los datos experimentales con las ecuaciones cinéticas integradas de primer y segundo orden mostró un mejor ajuste con la ecuación de primer orden para todos los procesos de decoloración observados. En la figura 5 se observa el ajuste de los datos experimentales de cada una de las cepas con la ecuación integrada de primer orden para los procesos con una semana de crecimiento previo a la adición del colorante. Los coeficientes de correlación del ajuste de los datos experimentales con la ecuación de primer orden fueron: 0.9808, 0.9803 y 0.6909 para los procesos con las cepas H1, SA y HA, respectivamente.

En la figura 6 se presentan los ajustes de los datos experimentales de las tres cepas con la ecuación integrada de primer orden para los procesos con dos semanas de crecimiento previo a la adición del colorante. Los coeficientes de correlación que resultaron del ajuste de los datos experimentales con la ecuación de primer orden fueron: 0.9633, 0.9815 y 0.6658 para los hongos H1, SA y HA, respectivamente. El valor del coeficiente de correlación calculado para la cepa HA resultó menor debido al comportamiento de una réplica notoriamente diferente.

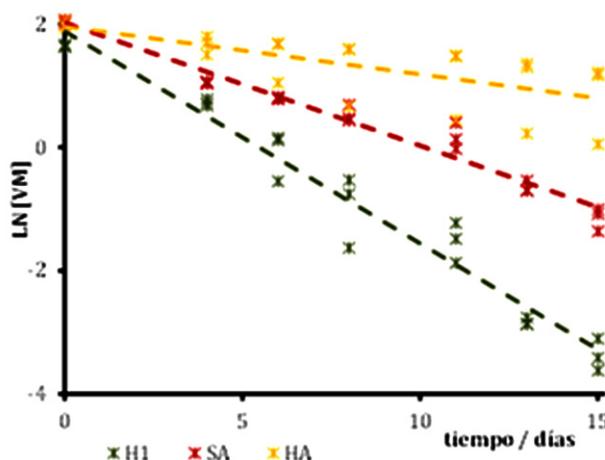


Figura 5. Ajuste de datos experimentales con la ecuación cinética integrada de primer orden, cuando el colorante se agrega después de una semana de crecimiento.

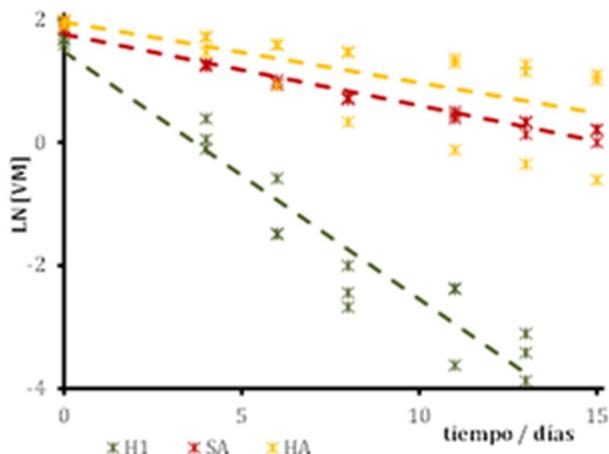


Figura 6. Ajuste de datos experimentales con la ecuación cinética integrada de primer orden, cuando el colorante se agrega después de dos semanas de crecimiento.

Las constantes de velocidad que resultaron de los ajustes, así como los coeficientes de correlación para cada uno de los hongos cuando se adiciona el colorante con una y dos semanas de crecimiento, pueden observarse en las tablas 3 y 4, respectivamente. En estas condiciones el hongo H1 fue el que mostró mejor capacidad para llevar a cabo la decoloración del VM ($k = 0.3439$ y 0.4018 días^{-1}), seguido por el hongo SA ($k = 0.1995$ y 0.1157 días^{-1}), y el hongo HA presentó la menor capacidad para realizar este proceso ($k = 0.0777$ y 0.0986 días^{-1}). Los valores de la constante cinética calculados con la ecuación de primer orden confirman que el tiempo de crecimiento de los hongos antes de la adición del colorante es un factor importante para mejorar el proceso de decoloración. Los valores de la constante cinética del proceso de decoloración son mayores cuando se da un tiempo de crecimiento a los hongos antes de ser expuestos al colorante.

Tabla 3. Valores de la constante de velocidad para la prueba cuando se adiciona el colorante con una semana de crecimiento.

Hongo	$k / \text{días}^{-1}$	Coefficiente de correlación (R)
H1	0.3439	0.9808
SA	0.1995	0.9803
HA	0.0777	0.6909

Tabla 4. Valores de la constante de velocidad para la prueba cuando el colorante se adiciona con dos semanas de crecimiento.

Hongo	$k / \text{días}^{-1}$	Coefficiente de correlación (R)
H1	0.4018	0.9633
SA	0.1157	0.9815
HA	0.0986	0.6658

Conclusiones

Los resultados mostraron que el tiempo de crecimiento de los hongos previo a la exposición con el colorante es un factor importante para mejorar su actividad decolorante. Los tres hongos fueron capaces de eliminar la mayor cantidad de colorante, cuando tuvieron 1 y 2 semanas de crecimiento antes de la adición de VM, hecho que no sucedió para los hongos SA y HA cuando el colorante fue agregado al mismo tiempo que el inóculo. En estas condiciones el hongo H1 mostró la mejor capacidad para llevar a cabo la decoloración del VM (99.3 y 98.8% decoloración), seguido por el hongo SA (95.8 y 82.6% decoloración) y el hongo HA presentó la menor capacidad para realizar este proceso (65.7 y 69.8% decoloración).

Los valores de las constantes de velocidad obtenidos confirman lo anterior. El hongo H1 mostró la mayor velocidad para llevar a cabo la decoloración del VM ($k = 0.3439$ y 0.4018 días^{-1}), seguido por el hongo SA ($k = 0.1995$ y 0.1157 días^{-1}), y el hongo HA presentó la menor velocidad para realizar este proceso ($k = 0.0777$ y 0.0986 días^{-1}).

Referencias

Allen S. J., Koumanova B. (2005). Decolourisation of water/wastewater using adsorption. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 40: 175–192.

Ávila J. M., Sotelo N. P. X., Castañeda B. M. T., Cruz C. M. R., Vázquez H. J., Álvarez Z. J. C. (2014). Inhibición del crecimiento de tres hongos ligninolíticos debido a la concentración de Verde de Malaquita. *Contribuciones a las Ciencias Aplicadas en Latinoamérica*, 44–49.

- Chmelová D., Ondrejovič M. (2016). Purification and characterization of extracellular laccase produced by *Ceriporiopsis subvermispora* and decolorization of triphenylmethane dyes. *Journal of Basic Microbiology*, 56: 1173–1182.
- Daneshvar N., Ayazloo M., Khataee A. R., Pourhassan M. (2007). Biological decolorization of dye solution containing Malachite Green by microalgae *Cosmarium* sp., *Bioresource Technology*, 98: 1176–1182.
- Du L. N., Zhao M., Li G., Xu F. C., Chen W. H., Zhao Y. H. (2013). Biodegradation of malachite green by *Micrococcus* sp. strain BD15: Biodegradation pathway and enzyme analysis. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 78: 108–116.
- Fogler H. S. (2001). Elementos de Ingeniería de las reacciones químicas. 3ª Ed. Pearson, p. 235–237.
- Joshi P. A., Mhatre K. J. (2015). Microbial efficiency to degrade Carbol fuchsin and Malachite green dyes. *Advances in Applied Science Research*, 6: 85–88.
- Khattri S. D., Singh M. K. (1999). Colour removal from dye wastewater using sugar cane dust as an adsorbent. *Adsorpt. Sci. Technol.*, 17: 269–282.
- McMullan G., Meehan C., Conneely A., Kirby N., Robinson T., Nigam P., Banat I. M., Marchant R., Smyth W. F. (2001). Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56: 81–87.
- Olukanni O. D., Adenopo A., Awotula A. O., Osuntoki A. A. (2013). Biodegradation of Malachite Green by Extracellular Laccase Producing *Bacillus thuringiensis* RUN1. *Journal of Basic & Applied Sciences*, 9: 543–549.
- Przystas W., Zablocka-Godlewska E., Grabinska-Sota E. (2015). Efficacy of fungal decolorization of a mixture of dyes belonging to different classes. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46: 415–424.
- Raval N. P., Shah P. U., Shah N. K. (2016) Nanoparticles Loaded Biopolymer as Effective Adsorbent for Adsorptive Removal of Malachite Green from Aqueous Solution. *Water Conserv Sci Eng.*, 1: 69–81.
- Sotelo N. P. X. (2011). Evaluación de la capacidad ligninolítica de dos hongos aislados de bagazo de caña de azúcar para su potencial aplicación en la obtención de celulosa. Proyecto Terminal de Ingeniería Ambiental. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Azcapotzalco. México.
- Vasdev K. (2011). Decolorization of Triphenylmethane Dyes by Six White-Rot Fungi Isolated from Nature. *J Bioremed. Biodegrad.*, 2: 128–132.
- Verma A., Dhiman K., Shirkot P. (2017). Biodegradation of Malachite Green by Extracellular Bacterial Laccase and Its Phytotoxicity Studies. *Int. J. Pure App. Biosci.* 5: 913–922.