



7th INTERNATIONAL WORKSHOP ADVANCES IN CLEANER PRODUCTION Academic

“CLEANER PRODUCTION FOR ACHIEVING SUSTAINABLE DEVELOPMENT GOALS”

Estudio del Efecto de la Temperatura Sobre el Proceso de Biorremoción del Colorante Azul de Metileno Utilizando *Galactomyces geotrichum* KL20A

CONTRERAS MERCADO, M. ^{A*}; VALLEJO LOZADA, W.; CHAVES LÓPEZ C.; GRANDE TOVAR C. D. ^{A*}

a. Grupo de Investigación en Fotoquímica y Fotobiología, Universidad del Atlántico, Kilómetro 7, Via Puerto Colombia

b. Faculty of Bioscience and Technology for Food, Agriculture and Environment, University of Téraamo, Via R. Balzarini 1, 64100 Téraamo (TE), Italy,

*Autor de Correspondencia: carlosgrande@mail.uniatlantico.edu.co

Resumen

La contaminación del recurso hídrico es una preocupación mundial, debido al uso de una variedad de sustancias, tóxicas y recalcitrantes. Los colorantes, son una de las sustancias que afectan la calidad del agua y son utilizados en una amplia gama de actividades industriales como la de textiles, que hace uso de más de 100.000 tintes azoicos. Estos colorantes son indeseables en el medio ambiente, debido a su toxicidad y riesgo mutagénico, además, causan cambios de pH, salinidad, aumento de la cantidad de carbono en los diferentes ecosistemas acuáticos y la consecuente reducción de la transparencia acuática que afecta la actividad fotosintética y la vida acuática.

Varios métodos físicoquímicos, como la adsorción, coagulación, precipitación, filtración y oxidación, han sido usados para el tratamiento de los efluentes con colorantes, sin éxito, debido a que generan productos secundarios altamente tóxicos. Actualmente, los procesos que emplean microorganismos, se perfilan como una de las mejores técnicas de biodegradación de tintes azo, ya que no solo degradan los colorantes, sino que los transforman en productos inocuos, o en su defecto, menos tóxicos, que posteriormente podrán integrarse a los ciclos biogeoquímicos de la naturaleza y causar un menor impacto ambiental. En este trabajo, se empleó una cepa de la levadura *Galactomyces geotrichum* KL20A aislada de muestras de kumis tradicionales recogidos de centro de producción en el Valle del Cauca con el fin de evaluar su capacidad de remoción del colorante azul de metileno, uno de los más contaminantes en la industria textil.

Palabras Claves: Biorremoción, colorantes azoicos, *Galactomyces geotrichum*.

1. Introducción

La mayor parte de los efluentes industriales están cargados de compuestos xenobióticos, como es el caso de los colorantes, los cuales, son sustancias recalcitrantes y de difícil biodegradación, tóxicos para especies acuáticas, animales y también para las personas. La mayoría de los tintes utilizados son estables, resistentes al ataque por métodos biológicos, físicos y químicos, por lo que su total remoción es difícil, además, debido a su alta solubilidad en agua, causan contaminación en sistemas acuáticos locales cuando son vertidos directamente sin previo tratamiento (Krishnan, J., et al., 2016)

“CLEANER PRODUCTION FOR ACHIEVING SUSTAINABLE DEVELOPMENT GOALS”

Barranquilla - Colombia - June 21st and 22nd - 2018

Los colorantes azoicos son la clase química sintética más grande de colorantes y se caracterizan por la presencia de uno o más enlaces azo (-N=N-); se utilizan en gran parte en la industria textil, farmacéutica, cuero, alimentos, cosmética, pintura e impresión industrial debido a su facilidad de síntesis y estabilidad.

Dadas las características de solubilidad y estabilidad de los colorantes azoicos, los métodos tradicionales de floculación, sedimentación o absorción no son útiles en la remoción de estos compuestos (Mancilla, et al., 2015). Actualmente los métodos fisicoquímicos son los más utilizados para el tratamiento de las aguas residuales de la industria textil y su resultado son efluentes de aceptable calidad en la mayoría de los casos, pero debido a sus altos costos, especificidad y generación de productos de desecho con altos niveles de toxicidad en muchas ocasiones estos efluentes son vertidos en cuerpos de agua sin ningún tipo de tratamiento, de allí que en los últimos años se ha ahondado en los procesos biológicos aplicados a la degradación de colorantes y se consideran como una alternativa menos costosa y agresiva con el ambiente (Robinson, et al., 2001).

El colorante azul de metileno o 3,7-bis (dimethylamino)-cloruro de Phenothiazin-5-*iu* es un heterocíclico aromático con fórmula molecular $C_{16}H_{18}N_3SCl$ es utilizado en diferentes aplicaciones de la química y la biología, Entre sus características esta que es un elemento compuesto de cristales, de un color verde oscuro brillante, no tiene olor y no se altera con el aire.

Kamlesh Shah (2014) hace referencia a los procesos biológicos como una de las mejores técnicas de biodegradación de tintes azo. Este método llamado también biorremediación, utiliza microorganismos como bacterias, hongos y levaduras con capacidades catalíticas para degradar y transformar contaminantes en productos inocuos, o en su defecto, menos tóxicos, que posteriormente podrán integrarse a los ciclos biogeoquímicos de la naturaleza y causar un menor impacto ambiental. (Sánchez., Rodríguez-Gallego, 2003).

En este sentido, las levaduras tienen muchas ventajas, en comparación a las bacterias y hongos filamentosos, no sólo crecen rápidamente como bacterias, sino, que como los hongos filamentosos tienen la capacidad de resistir ambientes desfavorables (Jadhav ET AL., 2008).

Por tanto, la aplicación de procesos biológicos para la degradación de colorantes tipo azo es una alternativa innovadora, eficiente, económica, segura, indicada para vencer las limitaciones que enfrenta los procesos fisicoquímicos. Este campo de la biorremediación requiere de más investigación y experimentación, con el propósito de comprender mejor los procesos que en ella ocurre, al igual que explorar nuevas condiciones y microorganismos que optimicen la degradación de colorantes, especialmente en efluentes reales.

El *Geotrichum* spp. es un hongo filamentosos (Filum Ascomycota, Orden Saccharomycetales) que se caracteriza por la formación de esporas transparentes mediante la segmentación de los filamentos vegetativos. *G. geotrichum* es un organismo holomorfo, es decir, en él coexisten las dos formas de reproducción (sexual y asexual): la forma de multiplicación asexuada da origen al anamorfo (*Geotrichum Candidum*) o estado imperfecto, y la asexuada al teleomorfo (*Galactomyces geotrichum*) (Layla Fernandez Torres, 2005) o estado perfecto. Estas especies fúngicas son capaces de alternar una fase unicelular (con crecimiento levaduriforme) con otra micelial (con producción de hifas) en respuesta a cambios en diversos factores ambientales (nutrientes, tensión de CO_2 , potenciales de oxidación-reducción, temperatura). Se denominan "hongos dimórficos" y suelen proliferar a manera de levaduras en los tejidos, pero, sin embargo, asumen formas filamentosas a temperatura ambiente en el entorno, (Noelia Sacristán Vega, 2015).

Este hongo se encuentra presente en diversos hábitats. Se encuentra como componente de la flora natural de la leche y se usa como agente madurador de quesos suaves y fuertes. Es encontrado como microbiota en humanos, en personas severamente inmunosuprimidas, provoca casos de infecciones pulmonares, las micosis oportunistas ocasionadas por el género *Geotrichum*, se debe a las especies *G. Candidum* y *G. capitatum* (Larone, 2011. Arenas, 2008). Presenta colonias de rápido crecimiento (4 días de maduración), de tamaño ilimitado, crecen mejor a 25°C, es de color blanco y apariencia húmeda, levaduriforme, de fácil obtención. En la periferia de la colonia, se generan hifas sumergidas en el medio, lo que se observa como vidrio esmerilado (Larone, 2011. Bonifaz, 2012). Se caracteriza por sus hifas verdaderas, gruesas (macrosifonadas), que se tabican formando numerosos

artroconidios, hialinos, rectangulares. La ausencia de blastoconidios, lo diferencia del género *Trichosporon spp.* (Larone, 2011). Sus lipasas y proteasas producen liberación de ácidos grasos y péptidos que pueden ser metabolizados por otras poblaciones microbianas promoviendo el desarrollo de diferentes aromas, entre otras propiedades.

El *G. geotrichum* puede ser considerado el hongo con más aplicaciones en la biotecnología, el 38% de las publicaciones que hacen referencia a este organismo, su capacidad de biodegradar compuestos tóxicos y su aplicación en procesos de biorremediación en el tratamiento de aguas residuales para el mejoramiento del medio ambiente (Grygier A., et al 2017). El *Galactomyces geotrichum* presenta cualidades para la degradación de xenobióticos, dentro de las cuales se pueden mencionar el DDT (1,1,1 trichloro 2,2 bis (4-chlorophenyl) el etano), (Tian et al., 2015) al igual que los tintes tipo azo

Por todo lo anterior, en el presente trabajo se propone la remoción del colorante azul de metileno con esta levadura, con el fin de buscar métodos alternativos de tratamiento de aguas, ambientalmente amigables y seguros.

2. Métodos

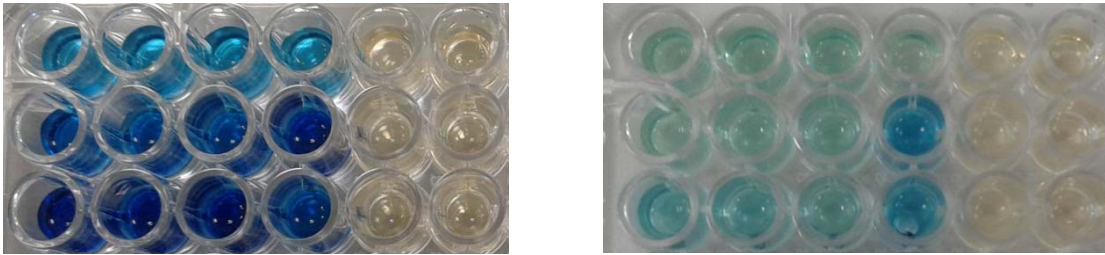
La levadura *G. geotrichum* KL20A fue aislada de muestras de Kumis tradicionales recogidos de 13 diferentes centros de producción en el Valle del Cauca (suroeste de Colombia) (C. Chaves-López., et al.(2012)), sometidos a RAPD-PCR, seguido de un análisis de conglomerados. Posteriormente, se secuenciaron y se compararon con los disponibles en la base de datos de secuencia de nucleótidos EMBL. La levadura fue mantenida en cajas de petri que contenían 12mL de medio YPD sólido, reactivadas en cajas de petri con extracto de levadura (10 g/L), dextrosa (20g/L), peptona (20 g/L), agar (20 g/L) e incubada por 24 horas a 30°C. Posteriormente, se preparó una solución de esporas en medio líquido y se realizó conteo en cámara Neubauer para comprobar la concentración deseada de la levadura ($3,2 \times 10^7$ cel/mL) a utilizar en las pruebas de biorremoción. El colorante azul de Metileno (Azul de metileno C.I. 52015 Merck KGaA * 64271 Darmstadt * Alemania) se utilizó para preparar una solución stock de 1000 ppm disolviendo la cantidad requerida del colorante en agua destilada estéril, a partir de la cual se realizaron diluciones hasta obtener concentraciones de 50, 100 y 200 ppm para los ensayos de biorremoción.

Para las pruebas de biorremoción, se utilizaron erlemmeyer de 100 mL con 80 mL de una solución compuesta por 72 mL de YPD líquido, 4 mL de colorante de la concentración requerida (50, 100 y 200 ppm) y 3,2 mL de la levadura *Galactomyces geotrichum* en concentración de $3,2 \times 10^7$ cel/mL. Esta solución se llevó a una incubadora Memmert IN55 a temperaturas de 24°C, 30°C y 35°C respectivamente. La medición de la absorbancia se realizó en lector de microplacas para Elisa SPR-960, tomando alícuotas de 160µL a la 0, 12, 24 y 48 horas respectivamente a una longitud de onda de 620nm. Los ensayos de biorremoción se realizaron tres réplicas con sus respectivos blancos.

Figura 1. *Galactomyces geotrichum* KL20A (24 horas de incubación a 30°C)



Figura 2. Ensayo de biorremoción de AM 50 ppm a 30°C después de 24 horas



3. Efecto de la Temperatura

En este trabajo se estudió el efecto de la temperatura sobre la biorremoción de Azul de metileno en una concentración de 50 ppm por acción de la levadura *G. geotrichum* KL20A. La tabla 1 muestra el factor temperatura y los niveles de estudio que se analizaron. Cada ensayo de biorremoción se realizó por triplicado para garantizar la validez estadística de los resultados. Finalmente, se realizó un estudio de la cinética de remoción durante 40 horas y se utilizó el modelo de primer orden para simular los datos y obtener la constante de velocidad del proceso de biorremoción, con un estudio de tres niveles de acuerdo a los valores reportados en la tabla 1.

Tabla 1. Niveles de estudio de la variable temperatura

Variable	Estudio bajo	Estudio medio	Estudio alto
Temperatura (°C)	24	30	35

4. Resultados

Proceso De Biorremoción

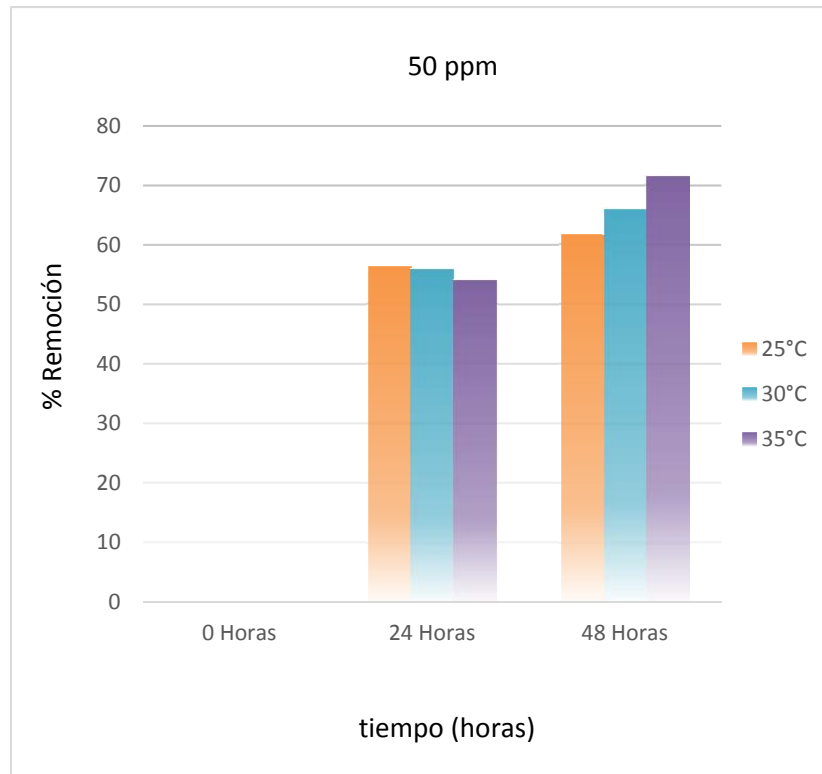
La figura 1 muestra los valores de biorremoción de Azul de metileno en una concentración inicial de 50 ppm por acción de la levadura *G. geotrichum* KL20A para las tres temperaturas evaluadas. Los resultados muestran que para las primeras 24 horas los porcentajes de biorremoción son comparables, ya que los porcentajes de degradación se encuentran en valores cercanos, sin embargo, después de 48 horas el mejor resultado se obtiene con la mayor temperatura (35°C). Durante las primeras 24 horas se logra una rápida biorremoción bajo irradiación visible, alcanzándose valores cercanos al 50% en las tres temperaturas; después de las 24 horas y hasta las 48 horas, el incremento es solo del 14%, este resultado es relevante, ya que indica que durante las primeras 24 horas se presenta el mayor porcentaje de biorremoción. Es posible, que el proceso de biorremoción se esté favoreciendo por el crecimiento de la levadura. (Acsu, 2005; Das y Charumathi, 2012), ya que en conteo de células en cámara de Neubauer a las 24 horas se presentó un aumento en la concentración de la levadura en la solución de estudio, la cual pasó de $3,2 \times 10^7$ cel/mL a $7,1 \times 10^8$ cel/mL.

Las levaduras tienen la capacidad de adaptar su metabolismo a diferentes fuentes de carbono y nitrógeno, esto es posible, debido a la producción de una variedad de enzimas intra y extracelulares capaces de degradar numerosos tipos de contaminantes orgánicos (McMullan et al., 2001). Por otra parte, además de la producción de estas enzimas, los hongos filamentosos como el *Galactomyces geotrichum* KL20A pueden secretar una amplia variedad de metabolitos primarios y secundarios y

realizar complejas conversiones como la hidroxilación de hidrocarburos poliaromáticos, residuos orgánicos, efluentes con colorantes, entre otros (McMullan et al., 2001).

La biorremoción del colorante azul de metileno aumenta en directa proporción a la temperatura y el tiempo. Al aumentar el tiempo aumentó la remoción de color, sin embargo, después de un determinado periodo de tiempo, la remoción tiende a ser constante con respecto al tiempo de contacto. La tasa de biorremoción se ve afectada por la estructura, el tipo de colorante y su concentración. En general, los investigadores coinciden en que a bajas concentraciones de colorante se obtienen mejores remociones (Sponza e Işik, 2005; Kapdan y Oztekin, 2003; Panswad et al., 2001; Luangdilok y Panswad, 2000; Ragajuru et al., 2000; O'Neill et al., 2000).

Figura 1. Porcentajes de biorremoción de Azul de metileno en una concentración inicial de 50 ppm por acción de la La levadura *G. geotrichum* KL20A a 3 temperaturas de estudio



Varios estudios han sugerido que la degradación de sustancias orgánicas complejas como es el caso de los colorantes azoicos son producidos por mecanismos enzimáticos de lacasa, tirosinasa (Zhang y Flurkey, 1997), hexano oxidasa (Saratale et al., 2009), entre otras. El mecanismo de la degradación y biodegradación de colorantes azoicos sufre una reacción de reducción de los enlaces azo ($-N = N-$) por acción de la azo-reductasa en condiciones anaeróbicas, en las que se produce una transferencia de cuatro electrones (reducción de los equivalentes), que se presenta en dos etapas en las que dos electrones se transfieren al colorante azo, que actúa como un aceptor final de electrones, lo que se traduce en una decoloración del colorante y la formación de soluciones incoloras. (Dos Santos et al., 2004)

Los metabolitos intermedios resultantes como las aminas aromáticas, se degradan en mayor porcentaje en condiciones anaeróbicas que aeróbicas (Chang et al., 2000). De tal manera que en presencia de oxígeno, normalmente se inhibe la actividad de reducción de enlaces azo, ya que desde la condición aeróbica puede dominar la acción del NADH; impidiendo así la transferencia de electrones desde NADH a enlaces azoicos (Chang et al., 2000). Por esta razón, se considera que la disminución de la absorbancia a 620 nm, se debe a estas reacciones enzimáticas involucradas en condiciones anaeróbicas.

Cinética de Procesos de Biorremoción

Con el ánimo de determinar un parámetro fisicoquímico cuantitativo, que permita realizar una comparación con otros reportes sobre procesos de remoción de colorantes de muestras de agua, se procedió a estudiar la cinética del proceso de biorremoción del colorante durante 48 horas. La figura 2 muestra los resultados del estudio cinético y los porcentajes de biorremoción de Azul de metileno en una concentración inicial de 50 ppm por acción de la levadura *G. geotrichum* KL20A a 35°C. Se observa una gran pendiente para las primeras 24 horas, indicando mayor velocidad en la remoción del azul de metileno, la pendiente cambia después de 24 horas, y tiende a un valor constante cercano a la máxima biorremoción. Es conocido que la cinética de remoción se hace más eficiente a bajas concentraciones y alta temperatura, por lo que se establece entonces que las condiciones óptimas para la biorremoción del colorante azo azul de metileno se ubican a una temperatura entre 30°C y $3,2 \times 10^7$ cel/mL de concentración de la levadura (Jadhav et al., 2008).

Utilizando el modelo de cinética de Langmuir-Hinshelwood (L-H), se realizó la simulación de los datos obtenidos en la figura 2 y se realizó la linealización respectiva. La figura 3 muestra los resultados después de aplicar el modelo (L-H) sobre los resultados obtenidos:

Figura 2. Cinética de biorremoción de Azul de metileno en una concentración inicial de 50 ppm por acción de la La levadura *G. geotrichum* KL20A a 35 oC

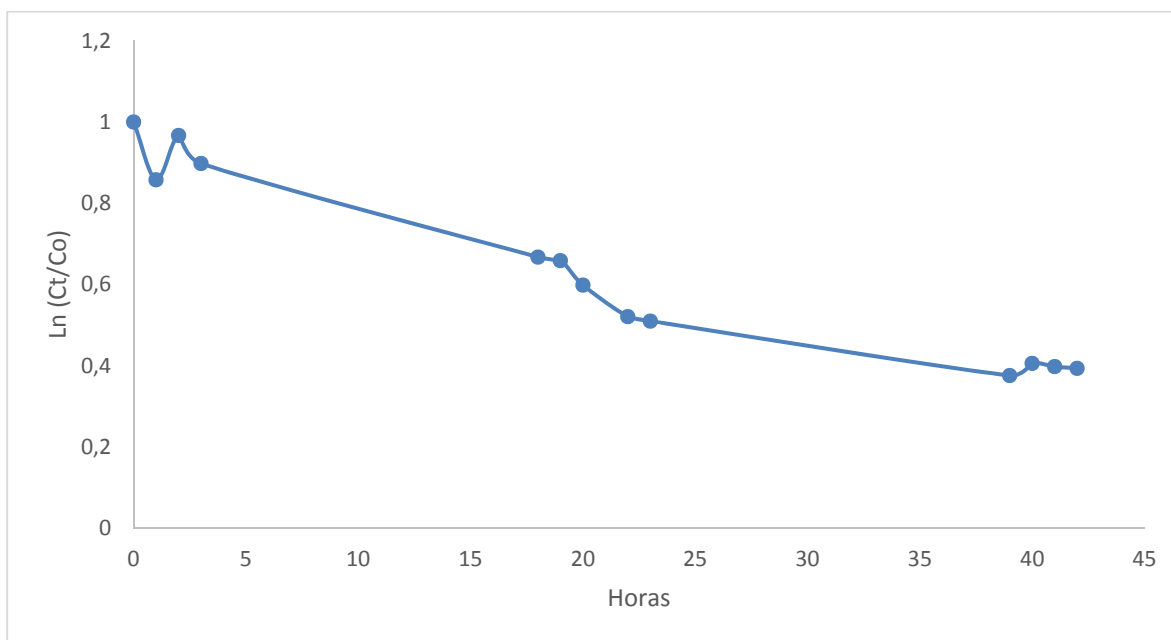
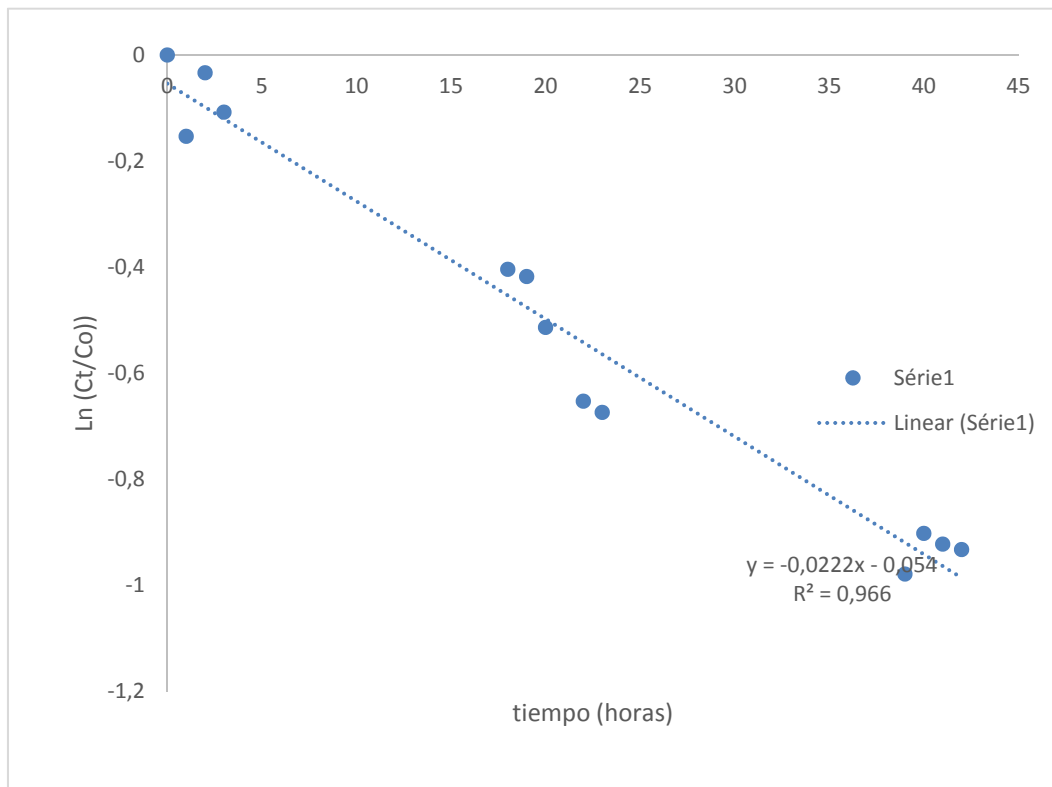


Figura 3. Modelo L-H sobre datos cinéticos de biorremoción de Azul de metileno en una concentración inicial de 50 ppm por acción de la La levadura *G. geotrichum* KL20A a 35 °C



5. Conclusión

En este trabajo se logró comprobar una alta capacidad de biorremoción de azul de metileno por acción de la levadura *Galactomyces geotrichum* KL20A en condiciones anaerobias. Se verificó que la mayor tasa de biorremoción se obtiene a las 24 horas de exposición, después de este tiempo y hasta las 48 horas se tiene a un valor máximo cercano al 70%. La metodología utilizada se presenta como una alternativa de bajo costo y eficiente para biorremoción del colorante azo azul de metileno, colorante ampliamente utilizado en la industria textil.

6. Bibliografía

- Arenas, R. (2008) MICOLOGÍA MÉDICA ILUSTRADA, Capitulo 31: Hialohifomicosis y feohifomicosis, McGrawHill: México, DF. Pag 316 – 317, 403 p.
- Black Carbon-Organic Carbon and Black Carbon-PM2.5 Ratios of the Major Emissions Sources in Monterrey, Mexico (PDF Download Available). Available from: https://www.researchgate.net/publication/298787121_Black_Carbon-Organic_Carbon_and_Black_Carbon-PM25_Ratios_of_the_Major_Emissions_Sources_in_Monterrey_Mexico [accessed Mar 15 2018].
- Bonifaz, A. (2012) Micología Médica Básica, Capitulo 5: Hongos Contaminantes, 4 edición, McGrawHill: México. pag 64, 600p.
- C. Chaves-López et al. / International Journal of Food Microbiology (2012) 159 39–46

- Dos Santos, A., M. De Madrid, F. de Bok, J.M. Stams, F. Cervantes, JB. Van Lier. (2004) (A). The contribution of acidogenic bacteria and methanogenic archaea to azo dye reduction by a thermophilic anaerobic consortium. Doctoral thesis. Wageningen University. The Netherlands
- Grygier A., Myszka K., Rudzińska M. (2017). *Galactomyces geotrichum* – moulds from dairy products with high biotechnological potential. Acta Sci. Pol. Technol. Aliment. 16 (1), 5-16. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.17306/J.AFS.2017.0445> Jadhav, S. U., S. D. Kalme, and S. P. Govindwar, "Biodegradation of Methyl Red by *Galactomyces geotrichum* MTCC 1360," Int. Biodeterior. Biodegrad., 62, 135 (2008).
- Kamlesh Shah. Biodegradation of azo dye compounds International Research Journal of Biochemistry and Biotechnology Vol. 1(2), October, 2014.
- Krishnan, J., et al., Effect of pH, inoculum dose and initial dye concentration on the removal of azo dye mixture under aerobic conditions, International Biodeterioration & Biodegradation (2016)
- Larone, D. (2011) Medically Important Fungi: A Guide To Identification, Yeast and Yeastlike Organisms, ASM Press: Washington, Dc. pag 154, 485p
- Layla Fernandez Torres, 2005 Clonación, expresión y evolución molecular de la lipasa I de *Galactomyces geotrichum*. Editorial de la Universidad de Granada Mancilla, Y., Mendoza, A., Fraser, M. P., and Herckes, P.: Organic composition and source apportionment of fine aerosol at Monterrey, Mexico, based on organic markers, Atmos. Chem. Phys., 16, 953-970, <https://doi.org/10.5194/acp-16-953-2016>, 2016.
- Mancilla, Y., Mendoza, A., Fraser, M., and Herckes, P. (2015). Chemical Characterization of Fine Organic Aerosol for Source Apportionment at Monterrey, Mexico. Atmospheric Chemistry and Physics Discussion, 15, 17967-18010.
- McMullan G, Meehan C, Conneely A, Kirby N, Robinson T, Nigam P, Banat IM, Marchant R, Smyth WF. Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. Appl Microbiol Biotechnol. 2001
- Nilanjan Das, D. Charumathi. Remediation of synthetic dyes from wastewater using yeast - An overview. Indian Journal of Biotechnology, Vol 11, October 2012, pp 369 – 380
- Noelia Sacristán Vega. Selección de cepas de *Geotrichum candidum* aisladas de quesos artesanales con vistas a la obtención de co-cultivos de interés tecnológico para la elaboración de quesos. universidad de león 2015
- Robinson T, Chandran B, Nigan P (2001). Studies on the production of enzymes by white-rot fungi for the decolorization of textile dyes. Enzyme and Microbiol. Technology. 29: 575-579.
- Sánchez, M. J., Rodríguez, G. J. 2007. Biorremediación: Fundamentos y Aspectos Microbiológicos. Industria y Minería 351:12-16.
- Saratale RG, Saratale GD, Parshetti GK, Chang JS, Govindwar SP (2009). Outlook of bacterial decolorization and degradation of azo dyes: a review. International Journal of Environmental Research and Public Health. 11-59.
- Sponza DT DT impidiendo así la transferencia de electrones desde NADH a enlaces azoicos (Chang et al., 2000)
- Tian, H., Chen, J., He, J., Liu, F. (2015). Pd-loaded magnetic mesoporous nanocomposites: A magnetically recoverable catalyst with effective enrichment and high activity for DDT and DDE removal under mild conditions. J. Colloid Interf. Sci., 457, 195-202. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2015.07.024>