Aislamiento de hongos ligninolíticos con capacidad decolorante del azul índigo

Isolation of ligninolytic fungi with indigo blue bleaching capacity

Dallany Urrego García[1]

RESUMEN

En la actualidad existe una preocupación constante y necesidad urgente por la preservación del ambiente, especialmente de los recursos hídricos, pues estos se ven afectados por diferentes industrias como la agrícola, la petrolera, la farmacéutica y la textil; siendo esta última una de las que genera mayor cantidad de aguas residuales con colorantes químicos en sus procesos, convirtiéndose en un problema ambiental grave. Los hongos de la podredumbre blanca de la madera han mostrado un gran potencial para degradar estos colorantes ya que poseen un importante grupo de enzimas con capacidad para oxidar diversos sustratos entre ellos una amplia variedad de contaminantes ambientales (Cardona, Osorio, & Quintero, 2009) . En la presente investigación se evaluaron seis cepas de hongos ligninolíticos aislados de cuatro árboles diferentes; determinando la función para decolorar el colorante azul índigo. De las seis cepas obtenidas en el aislamiento sólo cuatro presentaron actividad enzimática y fue evidenciada en el medio suplementado con el ABTS, por lo tanto, se realizó la prueba de decoloración del azul índigo con estas cepas tanto en medio sólido (cualitativamente) como en medio líquido (cuantitativamente). La cepa con mayor actividad enzimática fue del género Gliocladium sp.

Palabras clave: Hongos ligninolíticos, biorremediación, azul índigo, actividad enzimática.

ABSTRACT

At present there is a constant concern and urgent need for the preservation of the environment, especially water resources, as these are affected by different industries such as agriculture, oil, pharmaceuticals and textiles; the latter being one of those that generates the greatest amount of wastewater with chemical colorants in its processes, becoming a serious environmental problem. Wood rot fungi have shown great potential to degrade these colorants since they have an important group of enzymes with the ability to oxidize various substrates including a wide variety of environmental pollutants (Cardona, Osorio, & Quintero, 2009). In the present investigation, six strains of ligninolytic fungi isolated from four different trees were evaluated; determining the function for decolorizing the indigo blue dye. Of the six strains obtained in the isolation, only four presented enzymatic activities and it was evidenced in the medium supplemented with ABTS, therefore, the indigo blue discoloration test was performed with these strains both in solid medium (qualitatively) and in medium. liquid (quantitatively). The strain with the highest enzymatic activity was of the genus Gliocladium sp.

Keywords: Ligninolytic fungi, bioremediation, indigo blue, enzymatic activity, Gliocladium sp.

1. Microbióloga industrial y Ambiental, durregog@sena.edu.co, Sena, Medellín

1. INTRODUCCIÓN

En Colombia existen muchas variedades de industrias textiles, este es el sector industrial de la economía dedicado a la producción de fibras (fibra natural y sintética), hilados, telas y productos relacionados con la confección de ropa; en Medellín - Antioquia se concentra el 38% de la producción textil; la empresa DENIM, emplea grandes cantidades de agua potable para su proceso de teñido empleando como materia prima el colorante índigo (Ruiz Balaguera., 2011). El colorante azul índigo (FD&C Blue Nº 2), es uno de los más contaminantes generado por las industrias textiles y por sus características químicas son difíciles de degradar.

Existen varios métodos para la biorremediación de colorantes, entre los cuales se encuentran el método enzimático, la bioabsorción y la biodegradación, este último consiste en el aprovechamiento de microorganismos con capacidad de degradar diversas sustancias y disminuir su grado de toxicidad (Cortázar et al.,2012); entre los microorganismos usados en la biorremediación, se encuentran los hongos de la podredumbre blanca de la madera. Estos hongos poseen un importante grupo de enzimas con capacidad para oxidar diversos sustratos entre ellos una amplia variedad de contaminantes ambientales, lo que hace a este tipo de microorganismos potencialmente útiles los procesos de en biorremediación.

El mecanismo principal de degradación empleado por este grupo de hongos, es el sistema enzimático de degradación de la lignina compuestos por enzimas extracelulares como lo son: Peroxidasa dependiente de Mn+2 (MnP), ligninoperoxidasas (LiP) y lacasas (Lac) que producen ataque oxidativo a contaminantes ambientales (Cardona et al., 2009). En la presente investigación se evaluó la capacidad decolorante de hongos ligninolíticos aislados de 4 árboles, ubicados en zonas industriales dónde se emplea el colorante azul índigo.

2. METODOLOGÍA

2.1 Recolección de la muestra:
Se extrajo material vegetal con notable presencia fúngica de la corteza de árboles de la empresa textil CINTATEX S.A.S. en Guarne - Antioquia. Las muestras se almacenaron en bolsas estériles y se transportaron al laboratorio de Biotecnología de Tecnoacademia Medellín – SENA.

2.2 Aislamiento e identificación de hongos ligninolíticos nativos con actividad enzimática:
Se realizó un lavado de las muestras con agua desionizada estéril, y se tomaron submuestras de un tamaño de 1x1cm^2, para posteriormente realizar un lavado con una solución de hipoclorito de sodio al 4% (v/v) por 30 segundos.

Las muestras se sembraron en cajas Petri en medio de cultivo Aagar Papa Dextrosa (PDA) previamente preparado y esterilizado en autoclave marca Tuttnauer a 121°C, 15 lb de presión, por 15 min y se le adicionó estreptomicina (30ppm); las muestras se incubaron a 28°C por un periodo de 7 días, en incubadora marca BIOexpert Dynamica realizando observaciones constantes hasta obtener buen crecimiento para el posterior aislamiento y obtención de cultivos puros.

Para determinar la actividad enzimática de los hongos obtenidos, se utilizó para la siembra agar con extracto de malta y se le adicionó 0.5mM de ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid), como indicador de actividad enzimática. Las muestras se incubaron a 30°C por 7 días hasta observar la acción enzimática que se evidenció por la formación de halos morados en la parte posterior de las cajas Petri.

Adicionalmente se hicieron montajes de microcultivo para identificar mejor la morfología del hongo y su posterior caracterización e identificación en microscopio óptico marca Zeiis - Primo Start.

2.3 Capacidad decolorante fúngica sobre el colorante azul índigo determinada en medio sólido y líquido
Para la evaluación en medio sólido, las cepas fúngicas se sembraron en agar extracto de malta suplementado con el colorante azul índigo a diferentes concentraciones (de 60 y 120 ppm) se incubaron a 27°C durante 5 días.

La capacidad decolorante se determinó por la formación de halos de decoloración o decoloración total alrededor del crecimiento del hongo, esta evaluación fue netamente cualitativa. La evaluación en medio líquido se llevó a cabo para cuantificar la degradación de colorante. Los experimentos para estudios de decoloración se realizaron en erlenmeyers de 250 mL con 120 mL de medio de cultivo extracto de malta suplementado con el colorante azul índigo en concentraciones de 60 y 120 ppm. Los Erlenmeyers se inocularon cada uno con 6 trozos de agar colonizado previamente, tomados de los cultivos caracterizados. Posteriormente se incubaron a 25ºC y 150 rpm durante 6 días y se tomaron muestras periódicas (1, 2, 3 y 6 días) para determinar la concentración de colorante.

Para determinar la decoloración en el tratamiento con azul índigo se determinó los perfiles de espectrofotométricos de cada muestra en los rangos de absorbancia de 500 nm a 700 nm y abarcar las logitudes de onda del colorante, en un espectrofotómetro UV-VIS marca Thermo Scientific - Genesys 20.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Identificación y caracterización del cultivo fúngico.

Las observaciones macrocóspicas en medio PDA, mostraron crecimiento blanquecino, filamentoso, que se torna verde durante la esporulación. En cuanto a la caracterización microscópica se presentan hifas hialinas y septadas, transparentes. Fiálides ramificadas, en las cuales, en sus puntas se encuentran los conidios, formando agrupaciones similares a un círculo apretado. Como resultado se determinó la presencia del género Gliocladium sp. En la figura 1 se observan en detalle sus estructuras.

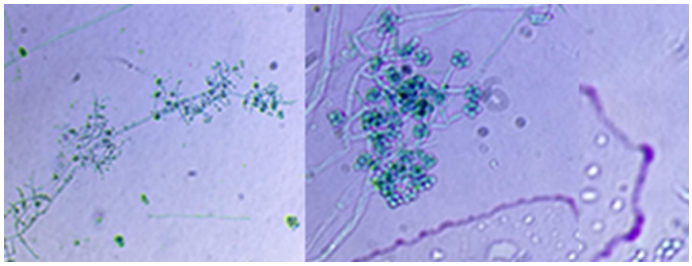

Figura 1. Morfología microscópica de Gliocladium sp. Fiálides y conidios con hifas septadas hialinas en 40x
Fuente: Elaboración propia

ABTS y el azul índigo en medio sólido

En las pruebas de ABTS, se determinó que los hongos ligninolíticos si presentan actividad enzimática, y capacidad de biorremediación en efluentes de industrias textiles de Medellín y de cuerpos de agua contaminados con tintes industriales en este caso azul índigo. Para el caso de la investigación en particular se concluyó que los mejores resultados se dan en la concentración de 60 ppm de azul índigo. En la figura 2 se muestra la actividad enzimática con ABTS y azul índigo.

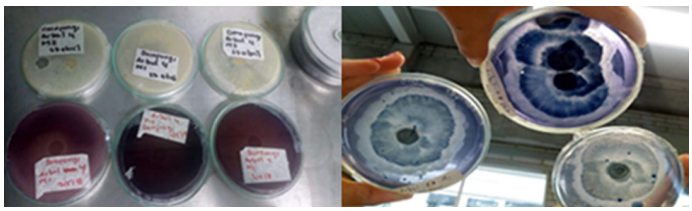

Figura 2. Prueba con el indicador ABTS y decoloración del azul índigo respectivamente (izquierda a derecha) con el hongo Gliocladiun sp.
Fuente: Elaboración propia

Decoloración del azul índigo y viabilidad de Gliocladium sp en medio líquido

Para la medición de resultados, se evaluaron longitudes de onda entre 500 nm a 700 nm, con intervalos de 50 nm, obteniendo mejor espectro de absorbancia en longitud de onda de 600 nm. Se empleó como blanco agua desionizada y la concentración del colorante se obtuvo mediante curva de calibración elaborada a partir de soluciones con concentración conocida (ver figura 3).

La concentración inicial del azul índigo fue de 60 ppm. Se pudo evidenciar un gran potencial biorremediador del hongo Gliocladium sp. sobre el colorante azul índigo, en la Figura 1, la cual muestra que a medida que aumenta el tiempo de contacto entre el microorganismos y el contaminante la absorbancia es menor, lo que indica una disminución en la concentración del azul índigo con el tiempo; adicionalmente, la capacidad de formar micelio (Figura 3) con el colorante como fuente de nutrientes es criterio determinante para considerar el Gliocladium sp. como biorremediador de colorantes como el azul índigo, usado en la industria textil, ya que con ésta investigación queda demostrado su eficiencia en la degradación de éste tipo de contaminante.

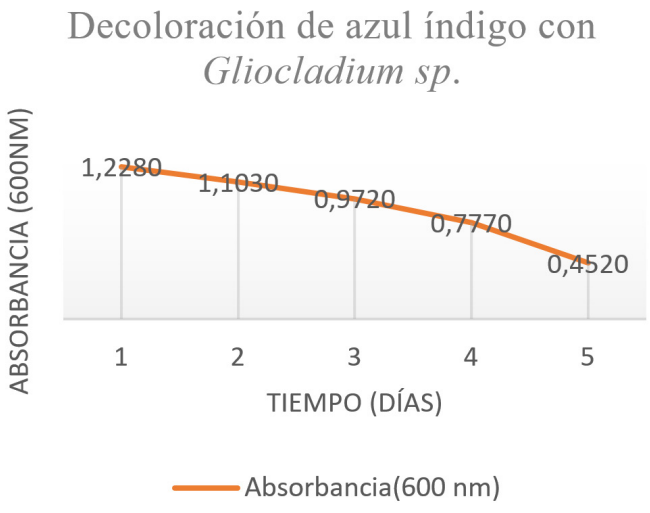

Figura 3. Porcentajes de remoción Degradación de azul índigo a 60 ppm con Gliocladium sp. Relación de absorbancia en los días 1, 2, 3 y 6.
Fuente: Elaboración propia

La degradación del colorante azul índigo por hongos ligninolíticos, permitió identificar la capacidad de degradación del hongo ***Gliocladium sp.***

Este hongo no fue inhibido en su crecimiento por las concentraciones a 60 rpm de azul índigo aplicada, como se observa en la figura 4.

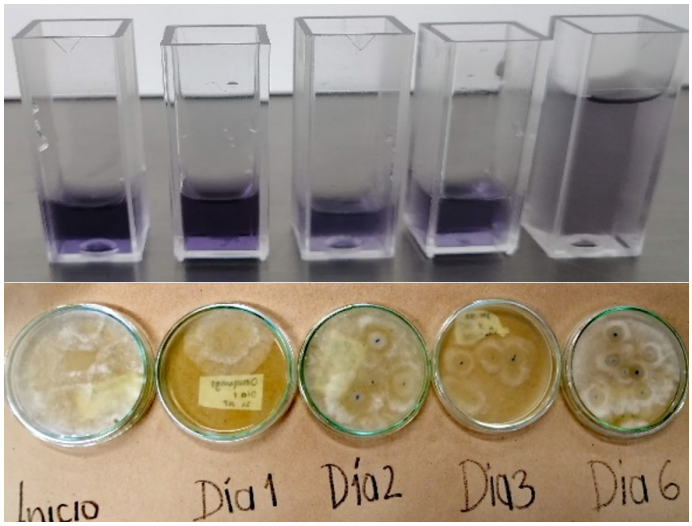

Figura 4. Viabilidad celular del hongo Gliocladium sp. en medio PDA suplementado con azul índigo a 60 ppm.
Fuente: Elaboración propia

Para esta investigación se concluye que el hongo Gliocladium sp evaluado presenta capacidad decolorante del azul índigo y por tanto expresa al menos una de las enzimas ligninolíticas en 6 días de tratamiento, lo cual, indica que es un microorganismo potencial en el tratamiento de colorantes en aguas residuales.

4. REFERENCIAS

Bilal, M., Rasheed, T., Iqbal, H. M. N., & Yan, Y. (2018). Peroxidases-assisted removal of environmentally-related hazardous pollutants with reference to the reaction mechanisms of industrial dyes. Science of the Total Environment, 644, 1–13. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.274

Cardona, M., Osorio, J., & Quintero, J. (2009). Degradacion de colorantes industriales con hongos ligninolticos. Revista Facultad de Ingenieria, (48), 27–37.

Cardona, M., Osorio, J., & Quintero, J. (2009). Degradation of industrial dyes with white rot fungi. Degradación de Colorantes Industriales Con Hongos Ligninolíticos, (48), 27–37.

Cardona, M., Osorio, J., & Quintero, J. (2009). Degradation of industrial dyes with white rot fungi. Degradación de Colorantes Industriales Con Hongos Ligninolíticos, (48), 27–37. Retrieved from http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-69649086235&partnerID=40&md5=c8dc6e69c193b8ba0228e5292ab93aee

Castillo, H; Rojas, R; Villalta, M. Gliocladium sp., agente biocontrolador con aplicaciones prometedoras. Tecnología en Marcha. Edición Especial Biocontrol. Pág 65-73.

Chanagá, X., Plácido, J., Marín, M., & Yepres, M. D. S. (2012). Hongos Nativos con Potencial Degradador de Tintes Industriales en el Valle de Aburrá , Colombia. Revista Facultad Nacional Agronomía de Medellín, 65(2), 6811–6821.

Chavez, N., Jauregui, J., & Saucedo, B. (2008). Biodgradación De Los Colorantes Indigo Y Verde Presentes En Un Efluente De La Industria Textil Utilizando Hongos Ligninoliticos. Investigación y Ciencia de La Universidad Autonoma de Aguas Calientes., p. 6. Retrieved from degradadores; complejos; aromáticos

Coello Paredes, J. M. (2011). Aplicación del hongo Pleurotus ostreatus como alternativa para la biorremediación de suelos contaminados con metales pesados. Espol, 49.

Cortazar Martínez, A., Coronel Olivares, C., Escalante Lozada, A., & González Ramírez, C. (n.d.). Contaminación Generada Por Colorantes De La Industria Textil. Universidad Autónoma Del Estado de Hidalgo. Retrieved from http://www.uaeh.edu.mx/scige/boletin/prepa4/n3/e1.html

Cortázar Martínez, C. G.-R., C Coronel-Olivares, JA Escalante-Lozada, J. C.-R., & JR Villagómez-Ibarra. (2012). Biotecnología Aplicada a La Degradación De Colorantes De La Industria Textil. 28(2), 187–199.

Echavarría, J. O., Isabel, A., Benavides, V., & Carlos, J. (2011). Decoloración de aguas residuales textiles utilizando el hongo ligninolítico anamorfo R1 de Decolorization of textile wastewater using the white rot fungi anamorph R1 of Bjerkandera sp . 85–93.

Garzón Jiménez, R. C. (2009). Cinética de degradación de colorantes textiles de diferentes clases químicas por hongos y bacterias inmovilizados sobre fibra de agave tequilana Webber var azul. Universidad Pontificia Javeriana, 1–137. Retrieved from http://repository.javeriana.edu.co/bitstream/10554/8222/1/tesis217.pdf

Infante, D., Martínez, B., & González, N. (2009). Rpv02109. 24(1), 14–21.

Jaramillo, A., Jiménez, S., Merino, A., & Hormaza, A. (2014). Obtaining a Fungal Inoculum for Degradation of an Azo Dye By Solid State Fermentation. 17(2), 577–585.

Landau, L. (1937). Posibles aplicaciones del hongo Phanerochaete. Zhurnal Eksperimental'noi i Teoreticheskoi Fiziki, 2–9. Retrieved from http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:No+Title#0

Martínez, B., Infante, D., Reyes, Y., Martínez, B., & González, N. (2013). Rpv01113. Protección Vegetal, 24(1), 1–11.

Moeller, G., Sandoval, L., & MijaylovaNacheva, P. (2011). Evaluación de diferentes procesos de tratamiento de remoción de colorantes sintéticos utilizados en la industria textil. (777), 148. Retrieved from http://repositorio.imta.mx:8080/cenca-repositorio/bitstream/123456789/1406/1/TC-1223.1.pdf

Mouso, N., Diorio, L., & Forchiassin, F. (2007). Acción de Stereum hirsutum (Wild) Pers. en la degradación de colorantes. Revista Iberoamericana de Micología, 24(4), 294–298. https://doi.org/10.1016/S1130-1406(07)70059-1

Of, P., Enzymes, L., Basidiomycete, F., On, F., & Materials, L. (2006). Producción de enzimas ligninolíticas con hongos basidiomicetos cultivados sobre materiales lignocelulósicos. (53), 61–67.

Paper, C. (2016). Decolorization of dye black reactive 5 using native ligninolytic fungi. (October 2009).

Paper, C. (2016). Isolation and preselection of fungi with decolorazing activity of textile synthetic dyes. (August 2009).

Quintero, L. U. Z., & Cardona, S. (2010). Índigo Carmín technologies for the decolorization of dyes : indigo and indigo carmine. Dyna, 77(June 2010), 371–386.

Rojas, J., & Hormaza, A. (2015). PODREDUMBRE BLANCA Y SUS CONSORCIOS EVALUATION OF BRILLIANT BLUE DYE BIODEGRADATION. 179–187.

Ruiz, S. E. B. (2011). Evaluación de la remoción del colorante índigo utilizado en empresas dedicadas a la producción de telas tipo DENIM empleando a Pleutorus ostreatus como modelo biológico. Universidad de La Sabana, 1–94.

Walters, A., Santillo, D., & Johnhston, P. (2005). El tratamiento de textiles y sus repercusiones ambientales. In Laboratorio de investigación GREENPEACE (Vol. 8).

Zouari-Mechichi, H., Mechichi, T., Dhouib, A., Sayadi, S., Martínez, A. T., & Martínez, M. J. (2006). Laccase purification and characterization from Trametes trogii isolated in Tunisia: decolorization of textile dyes by the purified enzyme. Enzyme and Microbial Technology, 39(1), 141–148. https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.11.027