

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA REMOCIÓN DE VERDE DE BROMOCRESOL Y ROJO CONGO ENTRE *Sechium edule* Y *Trametes versicolor*

COMPARATIVE STUDY OF REMOVAL OF BROMOCRESOL GREEN AND CONGO RED BETWEEN *Sechium edule* AND *Trametes versicolor*

Maribel Cano¹, José H. Castorena¹, Víctor Santiago¹, José A. Ariza², Luis A. Cervantes¹

(1) Instituto Tecnológico del Altiplano de Tlaxcala, Departamento de Ingenierías, Km 7.5 Carretera San Martín Texmelucan-Tlaxcala S/N, San Diego Xocoyucan, Tlaxcala - México

(2) Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias de la Salud, Carretera Actopan-Tilcuautla, Ex-Hacienda la Concepción, San Agustín Tlaxiaca, Pachuca, Hidalgo - México
(e-mail: maribel_cano@hotmail.com)

Recibido: 22/08/2016 - Evaluado: 06/10/2016 - Aceptado: 17/11/2016

RESUMEN

Se realizó un estudio comparativo entre las capacidades de remoción de *T. versicolor*, desarrollado en medio líquido y la biomasa vegetal de *Sechium edule* con espinas. Ambas biomásas fueron deshidratadas y molidas. Los bioensayos se realizaron a temperatura ambiente y a pH controlados. Los porcentajes de remoción del rojo congo fueron 78.83 y 75.35 % para *S. edule* y *T. versicolor* respectivamente. Para el verde de bromocresol los porcentajes de remoción fueron de 86.34 % con *Sechium edule* y 72 % con *T. versicolor*. En ambos casos, se observó que la biomasa de *S. edule* tuvo mayor potencial para remover tanto al rojo congo sin control de pH y al verde de bromocresol a pH de 4.0. Esto implica una ventaja de *Sechium edule* frente a la producción de hongos ligninolíticos que últimamente han sido estudiados para la degradación de colorantes; cuya desventaja principal es su cultivo bajo condiciones controladas.

ABSTRACT

A comparative study was carried out between the removal abilities of *T. versicolor*, developed in liquid medium and the vegetal biomass of *Sechium edule* with spines. Both biomass were dehydrated and ground. The bioassays were performed at room temperature and pH controlled. The percentages of removal of congo red were 78.83 and 75.35% for *S. edule* and *T. versicolor* respectively. For bromocresol green for removal percentages were 86.34% with *Sechium edule* and 72% with *T. versicolor*. In both cases, it was observed that the biomass *S. edule* had greater potential to remove both congo red without pH control as bromocresol green at pH 4. This implies an advantage of *Sechium edule* against the production of ligninolytic fungi which have recently been studied for degradation of dyes; whose main disadvantage is its cultivation which require controlled conditions.

Palabras clave: biomasa fúngica, remoción de colorantes, degradación, contaminación

Keywords: fungal biomass, removal of dyes, degradation, pollution

INTRODUCCIÓN

Existe una gran cantidad de compuestos aromáticos polisustituídos y policíclicos que son sintetizados con fines industriales, un ejemplo de ello son los colorantes. Este tipo de compuestos son vertidos a diferentes cuerpos acuíferos. La mayoría de los colorantes son tóxicos y carcinogénicos y dañan a los diferentes ecosistemas. Para la degradación de estos compuestos se han realizados diversos estudios en los que se encuentran los tratamientos biotecnológicos, que utilizan hongos de pudrición blanca. Los hongos ligninolíticos han sido ampliamente estudiados por contener enzimas ligninolíticas capaces de degradar diversos tipos de colorantes industriales (Kumar *et al.*, 2016; Cano *et al.*, 2012; Fernández *et al.*, 2009). Sin embargo, una de las desventajas para su implementación a nivel industrial, es su cultivo en medio líquido que requiere condiciones controladas de esterilidad, pH, temperatura, sales y aireación. Por otro lado, los procesos de separación posteriores al tratamiento del hongo con los contaminantes, implica un incremento en los costos; estas desventajas impiden que se puedan tratar aguas residuales en grandes volúmenes, por medio de biomasa fúngicas. Una alternativa a esta problemática, es la utilización de biomasa vegetales cuyo cultivo es menos controlado y pueden tener una eficiencia equiparable a la de los hongos ligninolíticos.

El rojo congo (RC) es una molécula conformada por anillos aromáticos condensados, en cuya estructura química también presenta grupos azo. El RC es soluble en agua y es tóxico (Ficha de datos de seguridad de rojo congo C.I. 22120 Ph Eur, del 19 de junio 2013). Se utiliza como indicador en el cambio de pH de 3 a 5 en los laboratorios de análisis químicos y como colorante en la industria textil y papelera. Los tratamientos para la decoloración y degradación del RC consisten en: el uso de enzimas de *Schizophyllum sp.* F17 que son empleadas dentro de un reactor de lecho fluidizado (Li & Jia 2008); la degradación fotocatalítica (Erdemoglu *et al.*, 2008; Murcia *et al.*, 2014) cuya desventaja principal son los altos costos de operación; la adsorción en bentonita o en quitosano (Bulut *et al.*, 2008) y el tratamiento con pellets de *Trametes versicolor* (Binupriya *et al.*, 2008) donde se requiere de un control de nutrientes para el crecimiento del hongo.

El verde de bromocresol es un halogenuro de arilo, es un compuesto de la familia de los trifenilmetanos (McMurry, 2012; Raggi *et al.*, 1985), el cual es utilizado como colorante de seguimiento para la electroforesis en gel de agarosa de ADN (Sipan *et al.*, 2016; Agbaba & Radovic, 1993). El verde de bromocresol actúa como inhibidor del transporte de las prostaglandinas (García *et al.*, 2014; Madrigal *et al.*, 2013). La aplicación más común es como indicador orgánico de pH en los laboratorios de análisis químicos. Para la remoción de este colorante presente en los desechos líquidos de los laboratorios o de aguas residuales; se han empleado métodos como la fotocatalisis heterogénea con TiO₂ (Degussa P-25) como catalizador, obteniéndose degradaciones de verde de bromocresol del 84 % (Guarín & Mera, 2011), y del 93.94 % (Mera & Mera, 2011). No obstante, este tipo de tratamiento puede llegar a ser costoso por la inversión en fuentes de poder y por el tipo de electrodos que se utilizan. Una alternativa a esta inconveniencia es la utilización de biomasa vegetales, que puede permitir la remoción de estos compuestos.

Sechium edule con espinas, es una planta comestible que tiene una importancia comercial, cultural y nutricional. Se le han atribuido distintas propiedades medicinales y es producida principalmente en el Estado de Veracruz. El fruto de *S. edule*, contiene peoxidasa que lo convierten en un material biológico con características bioquímicas para la remoción de contaminantes.

El presente trabajo tuvo como principal objetivo comparar la eficiencia de remoción de rojo congo y verde de bromocresol por medio de la biomasa generada por *Trametes versicolor* y *Sechium edule* con espinas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los reactivos rojo congo, verde de bromocresol, ácido sulfúrico (H₂SO₄) e hidróxido de sodio (NaOH), que se utilizaron fueron grado reactivo, el medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) fue de la marca Bioxón. La preservación del hongo *Trametes versicolor* se llevó a cabo de la siguiente forma: se utilizó como medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA), el cual fue esterilizado a 121 °C y 14.7 lbf/plg² durante 15 min; el medio esterilizado

fue vertido en cajas Petri, e inoculado en condiciones estériles, con el hongo *T. versicolor*, posteriormente se incubó a 30 °C por siete días y se mantuvieron las cajas Petri en refrigeración a 4 °C. Para el cultivo del *T. versicolor* se empleó un medio líquido a base de extracto de paja y malta en una concentración de 100 gL⁻¹ y 20 gL⁻¹ respectivamente; de acuerdo con la metodología reportada por Sainos *et al.* (2006). El medio líquido fue esterilizado a 121 °C y 14.7 lbf/plg² durante 15 min, posteriormente se inoculó con el hongo ligninolítico, preservado en caja Petri en condiciones estériles. Los cultivos estuvieron en incubación en forma estática a 30 °C por un periodo de 10 días. Las biopelículas formadas se separaron del medio líquido, utilizando pinzas estériles, el exceso de medio líquido fue retirado con papel filtro, posteriormente las biopelículas se congelaron y se deshidrataron por medio de un liofilizador marca Labconco; las biopelículas deshidratadas se molieron en mortero y se mantuvieron a 4 °C para su uso posterior. La biomasa de *Sechium edule* con espinas, se trato de la siguiente forma: se lavaron los frutos de *Sechium edule* equivalentes a un kilogramo, se lavaron, se cortaron en rodajas delgadas y se deshidrataron por 4 horas a una temperatura de 45 °C en una estufa de secado con control de temperatura (SHEL LAB). Posteriormente se molió en un mortero y se almacenó en frascos secos, los que se mantuvieron en refrigeración a 4 °C. Para el proceso de decoloración, se prepararon soluciones de rojo congo y verde de bromocresol a una concentración de 100 ppm, los bioensayos se efectuaron en matraces Erlenmeyer de 25 mL, con una concentración de 15 g/litro de solución colorante tanto para *S. Edule* como para *T. versicolor*. La temperatura de los bioensayos fue la ambiental, la agitación de 800 rpm, para el caso del verde de bromocresol el pH fue controlado a 2, 4 y 7 por medio de soluciones de H₂SO₄ al 0.1M y de NaOH al 0.01M y un pH-metro marca Hanna, el tiempo de los bioensayos fue de 4 horas; los bioensayos se realizaron por duplicado. La remoción de color se determinó por medio de un espectroscopia UV-Vis. Para determinar la longitud de onda donde se obtiene la máxima absorbancia de las bandas espectrales en cada uno de los colorantes se realizó un barrido desde 190 a 1100 nm. El porcentaje de remoción de color se determinó utilizando la fórmula (1).

$$\% \text{ Remoción} = \frac{(\text{Abs}_i - \text{Abs}_f) * 100}{\text{Abs}_i} \quad (1)$$

donde: Abs_i es la absorbancia del colorante sin tratamiento
Abs_f es la absorbancia después del tratamiento

Para los cálculos se consideró la máxima absorbancia registrada para rojo congo (RC) y verde de bromocresol (VB) las cuales fueron localizadas a las longitudes de onda de 500 y 610 nm respectivamente. La línea base de las mediciones espectrofotométricas fue calibrada con un blanco; preparado únicamente con biomasa y agua en la misma proporción que las muestras con colorantes y tratado bajo las mismas condiciones de pH y temperatura de los bioensayos. Las muestras fueron centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos antes de ser leídas en el espectrofotómetro UV-Vis.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1, se muestran los espectros de absorción de rojo congo, tratado con *T. versicolor* y *S. edule* con espinas. Los porcentajes de remoción de rojo congo sin control de pH fueron 78.83 y 75.35 % para el tratamiento con *S. edule* y *T. versicolor* respectivamente. Como se puede observar no hay una diferencia significativa en los porcentajes de remoción, lo cual sugiere que la biomasa fúngica como la vegetal puede tener características fisicoquímicas y bioquímicas similares. Por otro lado, es importante señalar que el rojo congo es una molécula recalcitrante difícil de degradar. El tiempo en que se logró la remoción del colorante fue menor al reportado por Cardona *et al.* (2009), quienes lograron un 86.7 % en la decoloración de colorantes industriales después de 7 días de tratamiento con hongos ligninolíticos. Mientras que Li *et al.* (2015), obtuvieron la degradación de rojo congo en una concentración de 100 ppm, utilizando *Acinetobacter baumannii* YNWH 226 después de 24 horas. Li *et al.* (2015), degradaron rojo congo en un tiempo de 90 minutos utilizando una relación de peróxido de hidrógeno y rojo congo de 75:1 en un fotoreactor tubular. Ivanka *et al.* (2010), utilizaron laccasas crudas de *T. versicolor* para la decoloración del rojo congo con un tiempo de remoción de 13 días, lo que muestra que la degradación de este compuesto requiere fuertes oxidantes.

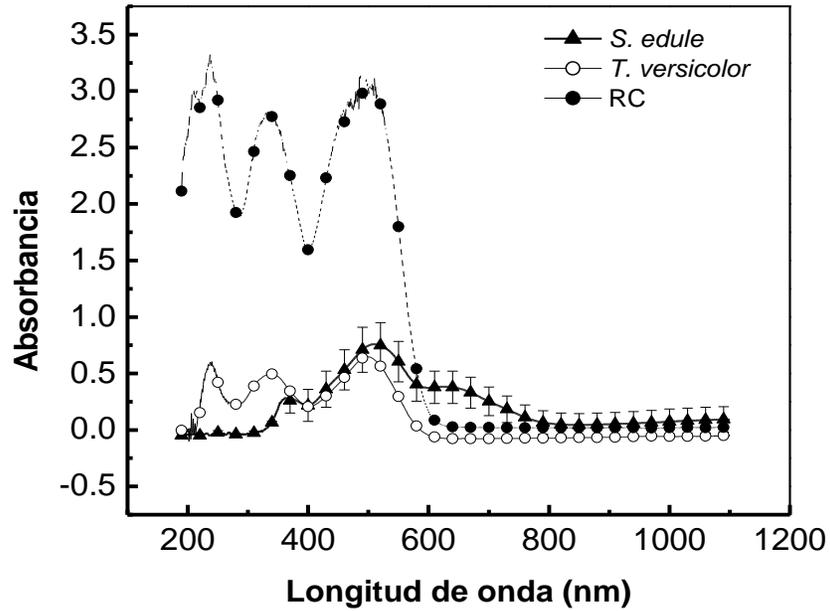


Fig. 1: Remoción de rojo congo en concentración de 100 ppm con *S. edule* con espinas y *T. versicolor*

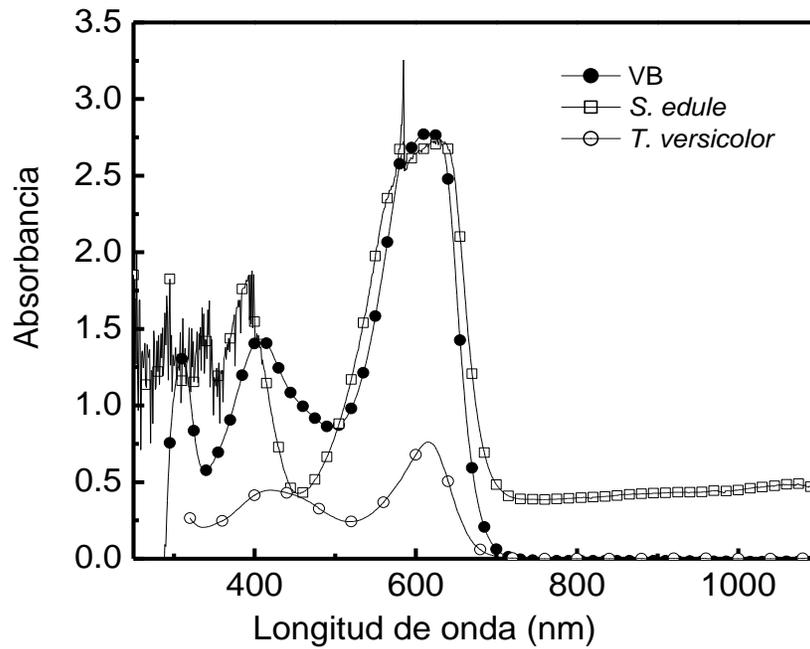


Fig. 2: Remoción de verde de bromocresol por medio de *T. versicolor* y *S. edule*

En la Figura 2, se observó un 72 % de remoción de verde de bromocresol a un pH de 7 con *T. versicolor*, mientras que con *S. edule* no se observó ningún efecto. La razón por la que no se observó remoción con *S. edule* es por el pH, tal como se puede observar en la Figura 3. El pH de 4 es el que favorece el mayor porcentaje de remoción utilizando *S. edule*. Esta observación coincide con Chaleshtori *et al.* (2013), quienes observaron que la degradación del verde de bromocresol en reacciones fotocatalíticas fueron mayores en soluciones acidas.

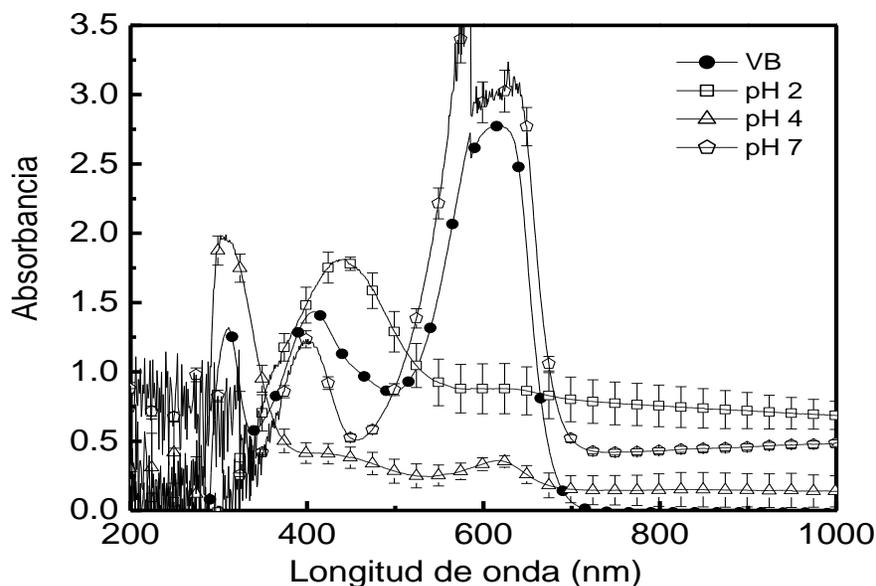


Fig. 3: Remoción de verde de bromocresol a diferentes pH con *S. edule* con espinas

La degradación a un pH de 2 fue de 68.021 % y a pH 4 fue de 86.34 %. A un pH de 4, el porcentaje de remoción con *S. edule* fue mayor que el reportado por Guarín y Mera (2011), quienes utilizaron fotocatalisis heterogénea con TiO_2 . En la remoción de verde de bromocresol se han empleado principalmente tratamientos de fotólisis, procesos de oxidación avanzada y la combinación de agentes oxidantes $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$, de $\text{S}_2\text{O}_8^{2-}/\text{UV}$ (Fassi *et al.*, 2012), así como la combinación de TiO_2/UV (Fassi *et al.*, 2014). La decoloración de colorantes por lacasas de *T. versicolor* requiere condiciones de inducción específica, tales como pH de 4.5, temperatura de 45 °C (Ivanka *et al.*, 2010) y de glucosa como fuente de energía (Borchert y Libra, 2001); además se debe mantener condiciones estériles durante el desarrollo del hongo. Esto ha conducido a investigar alternativas como son la producción de enzimas en condiciones no estériles (Libra *et al.*, 2003), la utilización de procesos de inmovilización (Sánchez *et al.*, 2014), el cultivo en medio líquido (Sainos *et al.*, 2006), ó la utilización de enzimas intracelulares (Cano, *et al.*, 2012). Por otro lado, el *S. edule* es una cucurbitácea que crece en suelos arcillo-arenoso, se adapta a temperaturas que van de 18 a 30 °C y requiere menos condiciones controladas que el cultivo de *T. versicolor*. *Sechium edule* es un producto de consumo nacional, cuyos excedentes pueden ser aprovechados para remover este tipo de contaminantes.

CONCLUSIONES

La remoción de rojo congo y verde de bromocresol por medio *Sechium edule*, fue superior al de *Trametes versicolor*. Lo que sugiere que puede ser utilizado en la remoción de estos colorantes. El desarrollo de *T. versicolor* requiere condiciones controladas, mientras que *Sechium edule* se adapta fácilmente a diferentes climas. Los porcentajes de remoción obtenidos tanto para rojo congo sin control de pH y de verde de bromocresol a pH 4, son comparables a los procesos fotocatalíticos, por lo que representan una alternativa biológica a ese tipo de procesos.

REFERENCIAS

1. Agbaba, D.N. & Radovic, D. (1993). Spectrophotometric determination of molsidomine in pharmaceutical formulations using bromocresol green. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 11 (3), 247-249.
2. Binupriya, A.R., Sathishkumar, M., Swaminathan, K., Ku, C.S. & Yun, S.E. (2008). Comparative studies on removal of Congo red by native and modified mycelial pellets of *Trametes versicolor* in various reactor modes. *Bioresource Technology*, 99 (5), 1080-1088.
3. Borchert, M. & Libra, J. A. (2001). Decolorization of reactive dyes by the white rot fungus *Trametes versicolor* in sequencing batch reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 75 (3), 313-321.
4. Bulut, E., Ozacar, M. & Sengil, I.A. (2008). Equilibrium and kinetic data and process design for adsorption of Congo Red onto bentonite. *Journal of Hazardous Materials*, 154 (1-3), 613-622.
5. Cano, M., Solís, M., Solís, A., Loera, O., Pérez, H.I., & Teutli, M.M.M. (2012). Decoloración de CD2 (café directo 2) por enzimas intracelulares y extracelulares de *Trametes versicolor*. *Interciencia*, 37 (4), 294-298.
6. Cardona, M., Osorio, J. & Quintero, J. (2009). Degradación de colorantes industriales con hongos ligninolíticos. *Revista Facultad de Ingeniería*, 48, 27-37.
7. Chaleshtori, M.Z., Hosseini, M., Edalatpour, R., Sarif, S.M. & Chianelli, R.S. (2013). New porous titanium-niobium oxide for photocatalytic degradation of bromocresol green dye in aqueous solution. *Materials Research Bulletin*, 48 (10), 3961-3967.
8. Erdemoglu, S., Aksu, S.K., Sayilkan, F., Izgi, B., Asilturk, M., Sayilkan, H., *et al.* (2008). Photocatalytic degradation of Congo Red by hydrothermally synthesized nanocrystalline TiO₂ and identification of degradation products by LC-MS. *Journal of Hazardous Materials*, 155 (3), 469-476.
9. Fassi, S., Bousnoubra, I., Sehili, T. & Djebbar, K. (2012). Degradation of "Bromocresol Green" by direct UV photolysis, Acetone/UV and advanced oxidation processes (AOP's) in homogeneous solution (H₂O₂/UV, S₂O₈²⁻/UV). Comparative study. *Journal Materials. Environmental Science*, 3 (4), 732-743.
10. Fassi, S., Djebbarand, K. & Sehili, T. (2014). Photocatalytic Deegradation of Bromocresol green by TiO₂/UV in aqueous medium. *Journal Materials Environmental Science*, 5 (4), 1093-1098.
11. 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. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 11 (1), 59-72.
12. Garcia, C., Fernández, A.B. & De Lucio, F.J. (2014). Regulación de HIF-1 α por micropartículas de células tubulares proximales renales. Papel de COX y PGE2. *Dianas*, 3 (1), 1-7.
13. Guarín, C.Y. & Mera, A.C. (2011). Fotocatálisis Heterogénea con TiO₂ para el Tratamiento de Desechos Líquidos con Presencia del Indicador Verde de Bromocresol. *Revista Ingenierías*, 10 (19), 79-88.
14. Ivanka, S., Krastanov, A. & Veselin, S. (2010). Properties of crude laccase from *Trametes versicolor* produced by solid-substrate fermentation. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 1, 208-215.
15. Kumar, S., Rautb, S., Bandyopadhyaya, P. & Rautb S. (2016). Fungal decolouration and degradation of azo dyes: A review. *Fungal Biology Reviews*, 30 (3), 112-13.

16. Li, R., Ning, X.A., Sun, J., Wang, Y., Liang, J., Lin, M., *et al.* (2015). Decolorization and biodegradation of the Congo red by *Acinetobacter baumannii* YNWH 226 and its polymer production's flocculation and dewatering potential. *Bioresource Technology*. doi: 10.1016/j.biortech.2015.06.139. Epub 2015 Jul 2.
17. Li, X. & Jia, R. (2008). Decolorization and biosorption for Congo red by system rice hull- *Schizophyllum sp.* F17 under solid-state condition in a continuous flow packed-bed bioreactor. *Bioresource Technology*, 99, 6885-6892.
18. Libra, J.A, Borchert, M. & Banit, S. (2003). "Competition Strategies for the Decolorization of a Textile-Reactive Dye with the White-Rot Fungi *Trametes Versicolor* under Non-Sterile Conditions". *Biotechnology Bioengineering*, 82 (6), 736-744.
19. Madrigal, A.F., Lucio, J. & Fernández, A.B. (2013). Implicación de PGE2 intracelular en cáncer de próstata. *Dianas*, 2 (1), 1-7.
20. McMurry, J. (2012). *Química Orgánica*. Capítulo 15, pp. 534, octava edición, Editorial Cengage Learning. IPN. México.
21. Mera, D.A. & Mera, A.C. (2011). Tratamiento fotocatalítico de aguas residuales generadas en laboratorios con presencia del indicador verde de bromocresol. *Revista Lasallista de Investigación*, 8 (1), 28-41.
22. Murcia, M.D., Gómez, M., Ortega, S., Hidalgo, A.M., Gómez, E. & Gómez, J.L. (2014). Degradación de rojo congo en un fotorreactor tubular de tecnología excimer. Estudio cinético. *Afinidad*, LXXII, 569, Enero – Marzo.
23. Raggi, M.A., Cavrini, V., & Di Pietra, A.M. (1985). A calorimetric assay for dicyclomine hydrochloride using bromocresol green. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 3 (3), 287-291.
24. Sainos, E., Díaz G., Montiel-González, A.M., Loera, O. & Sánchez, C. (2006). Growth of *Pleurotus ostreatus* on wheat straw and wheat grain-based media: biochemical aspects and preparation of mushroom inoculum. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72 (4), 812-815.
25. Sánchez, J., Martínez, J.L., Segura, E.P., Contreras, J.C., Medina, M.A., Aguilar, C.N., *et al.* (2014). Inmovilización de enzimas lignocelulolíticas en nanopartículas magnéticas. *Química Nova*, 37(3), 504-512.
26. Sipan, M.C., Cuenca, J.B. & Mota, M. (2016). *Biología Molecular y Citogenética*, Editorial Paraninfo S.A., España.

