

TRATAMIENTO BIOLÓGICO DE EFLUENTES CON BASIDIOMICETOS LIGNINOLÍTICOS PARA LA DEGRADACIÓN DE COLORANTES TEXTILES A ESCALA DE LABORATORIO

Autores principales: Ana Margarita Manzano León, María Isabel Sánchez López, Miguel Ramos Leal, Giselle Torres Farradá y Gilda Guerra Rivera

Colaboradores: 17

Nacionales

1. Osmel Domínguez Guilarte (Dpto. de Microbiología, Fac. Biología, UH)
2. Marlón Daniel Hernández (Dpto. de Microbiología, Fac. Biología, UH)
3. Angel Sánchez Lamar (Dpto. Genética Vegetal, Fac. Biología, UH)
4. Pedro Valiente (CEP, Fac. Biología, UH)
5. Alberto del Monte (CEP, Fac. Biología, UH)
6. Lucía Jiménez Romero (Empresa textil Hilatex)
7. Roberto Núñez Moreira (Centro de Bioproductos Marinos, CEBIMAR)
8. Milay Cabarroi Hernández (Jardín Botánico Nacional, JBN)
9. Sara Herrera (Instituto de Ecología y Sistemática, IES)
10. Alexander Banguela, (Instituto de Investigaciones de Fruticultura Tropical)
11. Pedro Luis Ramos González (Instituto de Investigaciones de Fruticultura Tropical)

Internacionales

12. Ann. M Corbisier (Universidad Católica de Lovaina, Bélgica)
13. Michel Pennickx (Universidad Libre de Bruselas, Bélgica)
14. Dominic Rochefort (Universidad de Montreal, Canadá)
15. Michael D. McLean (Universidad de Guelph, Canadá)
16. Cony Decock (Universidad Católica de Lovaina, Bélgica)
17. Sophie Vanhulle (Universidad Católica de Lovaina, Bélgica)

Departamento de Microbiología y Virología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana (UH). Teléfono: (53) (07) (832-9241).

Dra. Ana Margarita Manzano León (20%). E-mail: manzale@fbio.uh.cu

Dra. María Isabel Sánchez López (20%). E-mail: isabel@fbio.uh.cu

Dr. Miguel Ramos Leal (20%). E-mail: ramosleal@fbio.uh.cu

MSc. Giselle Torres Farradá (20%). E-mail: giselletf@fbio.uh.cu

Dra. Gilda Guerra Rivera (20%). E-mail: ggr@fbio.uh.cu

Autor para la correspondencia:

Dra. Gilda Guerra Rivera. Facultad de Biología. Calle 25 e/ J e I No 455. Vedado. Plaza de la Revolución. **Teléfono:** (07) 8321321, 8329241 **Fax:** (07) 8321321. **Email:** ggr@fbio.uh.cu;

RESUMEN

Los colorantes presentes en los efluentes textiles son compuestos xenobioticos de elevada toxicidad y limitada posibilidad de degradación, por lo que el residual debe ser tratado antes de su vertimiento. Los sistemas de tratamiento existentes son muy costos o resultan ineficientes ya que no logran degradar el colorante y pueden originar aminos tóxicos y carcinogénicos. Por ello el objetivo de nuestro trabajo consistió en “Analizar las características de la biodegradación de colorantes presentes en efluentes textiles por basidiomicetos ligninolíticos nativos, con vistas a establecer alternativas para su tratamiento biológico a escala de laboratorio”. El aislamiento y evaluación de 49 cepas de basidiomicetos de la podredumbre blanca, provenientes de ecosistemas cubanos (urbanos y rurales), permitió seleccionar dos cepas pertenecientes a las especies ***Ganoderma weberianum* (B-18)** y ***Trametes maxima* MUCL44155** (identificadas mediante taxonomía polifásica) con alta capacidad biodegradativa frente a colorantes de diversa complejidad química. Estas cepas mostraron un comportamiento marcadamente diferente en cuanto a la degradación de los tintes. En ***Ganoderma weberianum*, especie aislada por primera vez en Cuba**, juega un papel determinante la biosorción del tinte a la biomasa fúngica y la acción de las isoenzimas lacasa intra y extracelulares, que son inducidas selectivamente de acuerdo a la naturaleza del colorante a degradar. Los reactores de lecho empacado y lecho fluidizado en régimen semi-continuo, con la biomasa de *G. weberianum* B-18, rindieron porcentajes de decoloración superiores al 70 % para la mayoría de los colorantes y efluentes analizados, con una reducción importante de su toxicidad. Estos resultados indican su pertinencia para el tratamiento de efluentes coloreados. La diversidad de isoenzimas lacasa en este hongo de la podredumbre blanca, justifican su alto poder degradativo y está relacionado con la presencia de al menos cinco genes que codifican para la síntesis de enzimas lacasa. Cuatro de las secuencias aminoacídicas deducidas a partir de los fragmentos de genes secuenciados son novedosas. *T. maxima* MUCL 44155 en cambio, informada por primera vez para la ciencia su capacidad para degradar colorantes textiles, produce una sola isoforma de lacasa, con independencia del tipo de inductor, la cual desempeña un papel protagónico en la biodegradación de los colorantes. Los crudos enzimáticos con actividad lacasa son estables en las condiciones de pH, temperatura, concentración de colorante y salinidad característicos de los efluentes de la industria textil, lo que permite el empleo de la enzima inmovilizada en el tratamiento de efluentes textiles de diferente naturaleza. El biocatalizador Lac-MANA-Sepharose CL 4B, mostró una elevada retención de la actividad funcional y alta estabilidad operacional frente a tres colorantes diferentes, con porcentajes de decoloración superiores al 95%. Los resultados en su conjunto permiten considerar el tratamiento biológico con biomasa de *Ganoderma weberianum* (B-18) o el biocatalizador Lac-MANA-Sepharose CL 4B para la degradación de los colorantes como una etapa más en los sistemas de tratamientos tradicionales para reducir la contaminación en los residuales coloreados.

COMUNICACIÓN CORTA

Introducción

El desarrollo industrial en las últimas décadas ha implicado la liberación a los ecosistemas naturales, de grandes cantidades de compuestos químicos residuales de elevada toxicidad y limitada posibilidad de biodegradación. Los efluentes textiles han sido considerados como uno de los más contaminantes, debido fundamentalmente a la estabilidad de los colorantes a la luz, la temperatura, la acción de detergentes y a la degradación microbiana. Algunos colorantes causan alergias, son tóxicos, mutagénicos y/o carcinogénicos. La presencia de colorantes en los cuerpos de agua disminuye el oxígeno disuelto, reduce el paso de la luz solar, disminuyendo la fotosíntesis de algas y plantas acuáticas, efectos que en su conjunto impiden la recuperación natural de los ecosistemas (Vaithanomsat *et al.*, 2010).

En muchos países los efluentes coloreados son tratados mediante métodos físicos y químicos, que aunque resultan efectivos, son costosos, acumulan grandes cantidades de lodos y requieren altos niveles de energía (Gupta *et al.*, 2011). En Cuba, el tratamiento de los efluentes textiles se circunscribe a lagunas de oxidación o tratados en plantas convencionales para residuales urbanos. Tales procedimientos no son adecuados para el tratamiento biológico ya que no ocurre la degradación eficiente de los tintes y la acción de microorganismos anaerobios transforman los azo colorantes en aminas carcinogénicas de elevada toxicidad. Los hongos basidiomicetos de la podredumbre blanca (HPB) se consideran potentes herramientas biotecnológicas para complementar o reemplazar las tecnologías de tratamiento existentes. Estos hongos producen enzimas ligninolíticas (lacasa, manganoso peroxidasa y lignina peroxidasa) de baja especificidad por el sustrato, capaces de degradar lignina y compuestos xenobióticos de estructura análoga, entre ellos los colorantes textiles. Teniendo en cuenta estos antecedentes y la política para la protección del ambiente en correspondencia con el lineamiento 133 del PCC, nuestro trabajo se orientó a “Analizar las características de la biodegradación de colorantes presentes en efluentes textiles por basidiomicetos ligninolíticos nativos, con vistas a establecer alternativas para su tratamiento biológico a escala de laboratorio”.

Aislamiento, selección e identificación de cepas.

El aislamiento y evaluación de 49 cepas de basidiomicetos de la podredumbre blanca, provenientes de ecosistemas urbanos y rurales, con capacidad para degradar colorantes y efluentes textiles en su conjunto constituyó una contribución al conocimiento de la biodiversidad fúngica cubana. El análisis de conglomerados atendiendo a los niveles de decoloración de tintes de diversa complejidad química (azoicos y antraquinónicos) y efluentes textiles, permitió la selección de dos cepas nativas pertenecientes a las especies.

***Trametes maxima* MUCL44155 y *Ganoderma weberianum* (B-18)** identificada mediante taxonomía polifásica. Estas cepas mostraron porcentajes de decoloración superiores al 90%, por lo que pueden ser consideradas para el tratamiento biológico de aguas residuales de la industria textil. Estos resultados revisten gran importancia ya que se informa por primera vez para la ciencia la capacidad biodegradativa de la especie *Trametes maxima* sobre colorantes textiles industriales y el aislamiento de la especie ligninolítica *G. weberianum* en el área geográfica de Cuba y el Caribe.

Papel de la Biomasa fúngica y las enzimas lacasas en la biodegradación. Los ensayos de biodegradación con colorantes y efluentes textiles indicaron que para ambas cepas la enzima lacasa tiene un papel protagónico en la biodegradación, aunque también se detecta en los cultivos la actividad manganeso peroxidasa. El análisis electroforético en geles de poliacrilamida al 15% en condiciones nativas, en sistema tampón discontinuo, evidenció que *T. maxima* MUCL 44155 produce una isoforma de lacasa, con independencia del tipo de inductor, la cual desempeña un papel protagónico en la biodegradación de varios colorantes textiles, entre ellos el colorante modelo Azul ácido 62. Los crudos enzimáticos con actividad lacasa son estables en las condiciones de pH, temperatura, concentración de colorante y salinidad característicos de los efluentes de la industria textil, lo que permite su empleo en el tratamiento de efluentes textiles de diferente naturaleza. En consecuencia la inmovilización de la enzima lacasa constituye la alternativa más apropiada para la degradación.

La biodegradación de colorantes con *G. weberianum* (B-18) muestra características diferentes. En ella juega un papel determinante la biosorción del tinte a la biomasa fúngica y la acción de isoenzimas lacasas intra y extracelulares inducidas selectivamente de acuerdo a la naturaleza del xenobiótico a degradar, por lo que el tratamiento biológico debe incluir la biomasa fúngica en los reactores.

La amplificación mediante PCR y secuenciación de fragmentos de genes lacasa de *G. weberianum* (B-18) que incluyen la región comprendida entre los sitios I y II de unión a átomos de cobre, característicos del sitio activo de la enzima, permitió identificar mediante análisis filogenéticos y de alineamientos múltiples la presencia de al menos cinco genes que codifican para la síntesis de enzimas lacasa que participan en la decoloración. Cuatro de las secuencias aminoacídicas deducidas a partir de los fragmentos de genes secuenciados no han sido previamente descritas. La diversidad de genes e isoenzimas lacasa en este hongo de la podredumbre blanca justifica su alto poder degradativo, comparable al de cepas de HPB seleccionadas para su aplicación en procesos industriales patentados (Vanhulle *et al.*, 2001).

Diseño de los medios de cultivo. El diseño y optimización del medio de cultivo, mediante el método de Box y Hunter, para la producción de enzimas ligninolíticas de *Trametes maxima* MUCL44155, resultó en un medio más simple y económico

que el informado en la literatura y permitió triplicar la actividad lacasa e incrementar siete veces la manganoso-peroxidasa, con una reducción importante de los componentes del medio de cultivo. La propagación del inóculo de *G.weberianum*, en medio con melaza de caña de azúcar, urea, sulfato de magnesio heptahidratado y dihidrogenofosfato de potasio preparó a la biomasa fúngica para la degradación y quintuplicó la actividad lacasa del inóculo, lo que permitió obtener valores de decoloración entre 88,4 y 100 % para efluentes textiles diversos en solo cuatro días de tratamiento. El medio resultante es simple, barato y sus constituyentes están disponibles en nuestro país. Ambos medios propician la implementación de las dos alternativas del tratamiento biológico antes indicadas.

Sistemas biológicos para el tratamiento de colorantes presentes en efluentes textiles.

La lacasa de *T. maxima* MUCL 44155 inmovilizada en el soporte MANA-Sepharose CL 4B por el método de enlazamiento covalente, mostró una elevada retención de la actividad funcional y alta estabilidad operacional frente a tres colorantes diferentes [Intra-ácido marino T-R (IN-TR), Intra-ácido azul E-B (IB-EB), azul ácido 62 (AB-62)] con porcentajes de decoloración superiores al 95%. Los porcentajes de decoloración obtenidos para los tres colorantes, así como la retención de la actividad funcional son similares y en muchos casos superiores a los informados para otros derivados inmovilizados de la enzima lacasa (Wang *et al.* 2013). Estos resultados indican que el derivado inmovilizado constituye una alternativa factible para la descontaminación de los residuales textiles. Los reactores de lecho empacado y fluidizado en régimen semi-continuo, con la biomasa de *G. weberianum* B-18, rindieron porcentajes de decoloración superiores al 70 % para la mayoría de los colorantes y efluentes analizados, con una reducción importante de su toxicidad. Estos resultados tienen relevancia ya que la biodegradación de los tintes no siempre trae consigo su detoxificación y en muchos casos se obtienen intermediarios tan o más tóxicos que el compuesto original (Svobodová *et al*, 2012).

En el orden práctico, los resultados contribuyen al desarrollo de un proceso de tratamiento integral para los efluentes de la industria textil cubana. La propuesta consiste en combinar la degradación de los colorantes por *Ganoderma weberianum* (B-18) o el biocatalizador Lac-MANA-Sepharose CL 4B (derivado inmovilizado con la enzima lacasa de *Trametes maxima*) con los sistemas de tratamientos que normalmente son empleados para reducir la Demanda Química y Bioquímica de Oxígeno en los residuales coloreados (Novotny *et al.*, 2011). Es decir no implicaría gastos excesivos por la introducción de una nueva tecnología, sino que puede aprovecharse la capacidad instalada a la cual se añadiría la etapa de degradación con los HPB, como se indica en la figura 1.

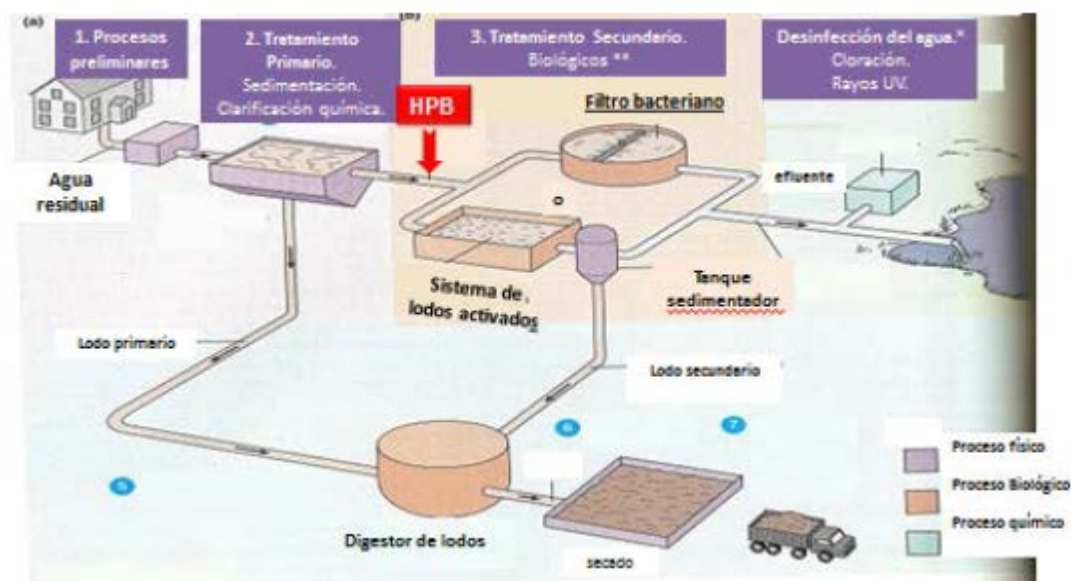


Fig.1 Inclusión de la etapa de tratamiento con hongos de la podredumbre blanca (HPB) para la degradación de colorantes presentes en efluentes textiles.

La aplicación de los resultados puede traer grandes **beneficios sociales y ambientales** ya que contribuirá a mejorar la calidad del agua en los sitios de vertimiento y al rescate de las características naturales de los ecosistemas y sus usos.

Conclusiones

El aislamiento y evaluación de 49 cepas de basidiomicetos de la podredumbre blanca, provenientes de ecosistemas cubanos (urbanos y rurales), permitió seleccionar dos cepas pertenecientes a las especies ***Ganoderma weberianum* (B-18)** y ***Trametes maxima* MUCL44155** (identificadas mediante taxonomía polifásica) con alta capacidad biodegradativa frente a colorantes de diversa complejidad química. La caracterización del proceso de biodegradación de colorantes evidenció que estas cepas mostraron un comportamiento marcadamente diferente, a partir de lo cual se establecieron dos métodos para el tratamiento biológico. Uno de ellos considera la enzima lacasa de *T. maxima* MUCL 44155 inmovilizada en el biocatalizador Lac-MANA-Sepharose CL 4B el cual mostró una elevada retención de la actividad funcional y alta estabilidad operacional frente a tres colorantes diferentes, con porcentajes de decoloración superiores al 95%. El otro método involucra la biomasa de *G. weberianum* B-18 en reactores de lecho empacado o lecho fluidizado en régimen semi-continuo, los cuales rindieron porcentajes de decoloración superiores al 70% para la mayoría de los colorantes y efluentes analizados, con una reducción importante de la toxicidad. Los resultados en su conjunto permiten considerar el tratamiento biológico con las biomásas fúngicas o las lacasas de los HPB como una etapa que

complementa los sistemas de tratamientos tradicionales para reducir la contaminación en los residuales coloreados.

Referencias bibliográficas

- (1) Gupta, N., Tripathi, A.K. & Harsh, N.S.K. (2011). Bioremediation of Cotton-Textile Effluent using Fungi. *Bulletin of Environment, Pharmacology & Life Sciences*, 1 (1): 15-19.
- (2) Svobodová, K., Majcherczyk, A., Novotný, C. & Kues, U. (2012). Implication of mycelium-associated laccase from *Irpex lacteus* in the decolorization of synthetic dyes. *Bioresource Technol.*, 99: 463-471.
- (3) Vaithanomsat, P., Apiwatanapiwat, W., Petchoy, O. & Chedchant, J. (2010). Production of ligninolytic enzymes by white-rot fungus *Datronia sp.* KAPI0039 and their application for reactive dye removal. *Int. J. of Chem. Eng.*, 16: 2504-2506.
- (4) Vanhulle, S., Lucas, M., Mertens, V., Gobeaux, B., Corbisier, A-M., Bols, C-M., Buchon, F., Wesenberg, D., & Agathos, S. (2001). Sustainable process for the treatment and detoxification of liquid waste, *World Patent WO0303556*.
- (5) Wang, P., Fan, X., Cui, L., Wang, Q. & Zhou, A. (2013). Decolorization of reactive dyes by laccase immobilized in alginate/gelatin blent with PEG. *J. Environ. Sci.*, 20(12): 1519-1522.
- (6) Novotný, C., Svobodova, K., Erbanova, P., Cajthaml, T., Kasinatha, A. & Lang, E. (2011). Lignolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biol. Biochem.*, 36: 1545-1551.