

CINÉTICA DE DEGRADACIÓN COLORANTE TEXTIL ROJO IRIS POR LA ACCIÓN DE LA CEPA *PSEUDOMONA FLUORESCENS*

SEMILLERO DE INVESTIGACIÓN OBATALÁ
PROYECTO CURRICULAR DEL SEMILLERO DE INVESTIGACIÓN TECNOLOGÍA EN SANEAMIENTO AMBIENTAL
PROYECTO CURRICULAR ESTUDIANTES INGENIERÍA SANITARIA

Autor (es): Johanna Carolina Bain Loayza – johannabain@gmail.com
Angie Katherine Fonseca Callejas – angie.kth15@gmail.com

Docente asesor: Juan Rodríguez Miranda

RESUMEN

Los procesos de producción relacionados a la industria textil actualmente son unos de los generadores de vertimientos con más altas concentraciones de carga orgánica en el mundo, ya que los compuestos con los que tiñen sus productos contienen uno o más grupos azo, asociados a elementos del grupo aromático, lo que incrementa su problemática en los efluentes, puesto que pueden convertirse en fuentes tóxicas para la salud humana. Por lo cual, se plantea para ello la remoción de un tipo de colorante rojo iris a partir de biorremediación, teniendo en cuenta condiciones óptimas para la adaptación del organismo, a partir de diferentes muestras y ensayos de adaptación a la bacteria *Pseudomona fluorescens*.

PALABRAS CLAVES

Pseudomona fluorescens, aguas Residuales, biorremediación, cinética de degradación, industria textil.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se ha demostrado que anualmente el uso de colorantes a nivel mundial por la industria textil es de aproximadamente siete millones de toneladas, lo cual genera grandes volúmenes de agua residual durante sus procesos, provocando el aumento de los niveles de carga contaminante y materia orgánica que pueden variar de 100 a 500 mg/L (Robinson T, 2001), los volúmenes de agua a pesar de recircularse en algunos de sus procesos de teñido, estampado de telas y limpieza de materias primas, en su gran mayoría son depurados con sustan-

cias adiciones tales como colorantes, grasas, aceites, surfactantes y otros productos químicos (Kemmer, 1989).

Los colorantes frecuentemente empleados por las empresas textiles son los azoicos; estos son un tipo de tintes sintéticos que pueden contener uno o más grupos azo y cada enlace generalmente se encuentra unido a dos grupos aromáticos, usualmente aminas. La degradación de los tintes que presentan compuestos azo, se realiza en dos pasos.

1. Rompimiento del enlace azo
2. Mineralización parcial o total de productos intermediarios.

Tiene entonces gran importancia, debido a que los productos intermediarios de la gran mayoría de los tintes azo tales como Benzidina, 2-naftilamina y otras aminas aromáticas, son agentes cancerígenos y tóxicos para las poblaciones. (Chacón, 2002),

Sin embargo, una opción viable para tratar estas aguas residuales de los procesos industriales, es la biodegradación de colorantes a partir de bacterias que reaccionen a enzimas con poder reductor y condiciones medioambientales

específicas con temperaturas entre 30 a 40°C y pH 7 a 8. Para esto, es importante tener en cuenta la degradación con bacilos Gram-negativos, ya que estos tienen funcionamientos óptimos de acuerdo a las características anteriormente descritas (Portillo, 2017).

Razón por la cual, esta investigación se desarrolla con el objeto de analizar los procesos de degradación de un colorante tipo azo en el agua, mediante la acción de la cepa *Pseudomonas fluorescens*. Inicialmente determinando la eficiencia de crecimiento de la bacteria *Pseudomonas fluorescens* a concentraciones de 1.5, 3.0 y 9.0 ppm en colorante, posteriormente a esto, se evalúa la eficiencia de degradación de la bacteria teniendo en cuenta los niveles de acidez y alcalinidad en el medio, construyendo de esta manera las curvas sintéticas de degradación para cada una de las concentraciones y finalmente identificar así las enzimas características para cada compuesto, de acuerdo a los mecanismos probables de degradación.

MÉTODOS

La metodología empleada se realizó a través de dos fases, con la descripción de los materiales utilizados en esta (Barragán, 2006).

FASE I: SELECCIÓN MEDIO IDEAL

1. Crecimiento microbiano: Inicia con la incubación en agar cetrimide sólido para el acondicionamiento del crecimiento de la bacteria *Speudomona fluorescences*, durante 48 horas a una temperatura constante de 25°C. (Razo-Flores, 1997)

2. Pruebas durezas del medio: Se realiza tinción de Gram, prueba oxidasa y medio sólido Cetrimide.

3. Medios de crecimiento: Los ensayos en medio líquido se llevaron a cabo para cuantificar el porcentaje de biodegradabilidad del colorante rojo iris y su efecto sobre la degradación, con el fin de conocer el perfil de crecimiento y consumo de sustrato. Estas pruebas se realizaron teniendo en cuenta las siguientes especificaciones del medio: 50ml de medio sales mínimas + 0.1% peptona + 1.5ppm colorante rojo

iris. (Aksu, 2003)

A partir de este medio, se modificaron variables de pH a 5, 7 y 9 y concentraciones del colorante rojo iris a 1.5, 3 y 9 ppm; cabe mencionar que cada muestra se realizó por duplicado, comparándola con una muestra control (Garzón Jiménez, 2009).

Adicionalmente, para el control de la acidez y/o basicidad del medio, se emplea el papel indicador de pH, mientras que para evaluar la concentración óptima de degradación, se toman muestras a las tres concentraciones anteriormente descritas, definiendo así a la concentración óptima la de 1.5, a partir de los resultados dados en ensayos espectrofotométricos.

4. Conteo celular: Se realizó a partir de 2µL de la muestra inoculada extraída con una pipeta de 5µL y posteriormente es vertida en la placa de cristal de la cámara de Neubauer recubierta por un cristal de cuarzo, finalmente se realiza el conteo por cuadrantes y se obtiene el cálculo final mediante la siguiente ecuación. (Moeller, 2016)

$$\text{Concentración} = \frac{\text{número de células} \cdot 25 \cdot 16 \cdot 10.000}{\text{número de cuadrados}}$$

FASE II: CINÉTICAS DE REMOCIÓN

1. Adaptación en birreactor: A partir de las condiciones de pH y concentración óptimas evaluadas anteriormente, se realiza la cinética de remoción en el fermentador. El ensayo se evaluó sobre un medio de 1700ml de medio de sales mínimas + peptona 0.1% + 55ppm colorante rojo iris + adición de 10ml medio previamente inoculado. (Moeller, 2016)

Posteriormente se incubó a una temperatura de 25°C, y se realiza la lectura cada hora en el espectrofotómetro a 450nm durante seis horas continuas. Para la lectura, se extrae 2ml del medio contenido en el birreactor y se vierte en un tubo de Nuyen, seguidamente se depositan en un agitador a 4000rpm durante 20 minutos determinando así en cada una de las muestras la absorbancia y porcentaje de decoloración para cada muestra, teniendo en cuenta la siguiente ecuación.

$$\text{Decoloración (\%)} = \frac{(\text{absorbancia inicial}) - (\text{absorbancia observada})}{(\text{absorbancia inicial})} \cdot 100$$

Cabe mencionar que el fermentador utilizado realiza mezcla completa, el cual se encontraba equipado de un agitador con velocidad de agitación de la muestra de 115rpm y temperatura media de 27°C.

Por otra parte, para determinar la cantidad de volumen necesario en el fermentador, se empleó la ecuación volumétrica.

$$C_1 * V_1 = C_2 * V_2$$

Donde

V₁: Volumen a inocular del pre-cultivo

C₁: Concentración de células en el pre-Cultivo

V₂: Volumen del reactor

C₂: Concentración de células en el biorreactor

$$V_1(\text{ml}) = \frac{(1,4E8 \text{ cel/ml}) * (1700 \text{ ml})}{(1,5 \text{ ppm Colorante})}$$

Obteniendo finalmente que el volumen inoculado del cultivo original durante un periodo de 48 horas debía de ser 10 ml aproximadamente, con el fin de verter al medio en condiciones ideales, teniendo en cuenta las condiciones anteriormente descritas en la degradación del sustrato (Colorante).

RESULTADO

FASE I: SELECCIÓN MEDIO IDEAL

para cada uno de los ensayos realizados en pH y concentración del colorante

A continuación, se presentan los valores dados

Tabla 1 evaluación de parámetros (pH y ppm).

pH	Absorbancia	Remoción
5	0,057	56,818
7	0,022	83,333
9	0,027	79,545
Concentración Inicial (ppm)		0.132
Longitud de Onda (nm)		450
Concentración (ppm)	Absorbancia	Remoción
0.5	0,056	56,250
1.5	0,037	71,093
9	0,091	28,906
Concentración Inicial (ppm)		0.128
Longitud (nm)		450

Fuente: autores

Por otra parte, los resultados obtenidos por cada hora de acuerdo a las condiciones óptimas de acondicionamiento del cultivo dentro del

fermentador, con el fin de demostrar la remoción del colorante a partir de la cepa de estudio.

Tabla 2 conteo celular y concentración de OD en relación con la remoción del colorante

Tiempo (H)	Cel /ml	OD	Hora	Concentración Inicial (ppm)	Concentración Final (ppm)	Porcentaje Remoción
08:30:00 a. m.	140000000	91	0	50	47,695	2.305
08:35:00 a. m.	140000000	87,04	2	47,695	42,351	5.344
09:35:00 a. m.	14500000	84,2	4	42,351	36,06	6.291
10:35:00 a. m.	160000	81,52	6	36,06	28,848	7.212
11:35:00 a. m.	150000	72	8	28,848	24,655	4.193
12:35:00 p. m.	120000	60,6	10	24,655	21,548	3.107
01:35:00 p. m.	110000	46,7	12	21,548	18,548	3

Fuente: autores

DISCUSIÓN

El uso de la *Pseudomonas fluorescens* en el caldo colorante permite comprender el comportamiento mediante un medio en pH neutro, generando un porcentaje del 83,3% con una absorbancia final del 0,022 frente a una inicial de 0,132, esto se debe a que la *Sp. Fluorecens* reacciona mejor a condiciones de pH neutro (Castro, 2015). Es decir, posee una estructura química del colorante rojo azoico, viéndose afectado por el pH del medio, influyendo significativamente sobre las cargas superficiales del absorbente generando influencias sobre la adsorción del colorante.

Al realizar las pruebas en el caldo colorante a diferentes concentraciones (1,5; 3 y 9 ppm), se determina que la mayor capacidad de

absorción registrada se encuentra en el rango de 1,5 ppm, debido a que la absorbancia Vs. tiempo ofrece el mejor resultado.

La decoloración durante la cinética realizada, se dio principalmente durante las primeras 2 horas. Estos datos concuerdan con los reportados por Blánquez y colaboradores (2002) Guo y colaboradores (2008), podría ser atribuida a la acción de las enzimas oxidativas como la Lacasa producidas por la bacteria, difundida al medio. Estas enzimas permiten la degradación de compuestos aromáticos complejos, entre ellos los colorantes debido a los cortos procesos de óxido reducción en poco tiempo; sin embargo, son liberadas al medio permitiendo un proceso ex-

tracelular.

El crecimiento de células dentro del biorreactor se observa que comienza a descender drásticamente a partir de la tercera hora desde una población de $1,4E8$ a $1,45E7$; Sin embargo, luego se observa que a partir de la hora tres (3) el crecimiento es constante en relación a cada $1,0E1$ cel/ml esto se atribuye a que al disminuir la concentración de peptona que actúa como fuente de carbono en el caldo, la población bacteriana inicia su proceso de lisis celular.

Finalmente, se debería comparar para estudios próximos la diferencia entre la variación de los niveles de absorbancia establecidos (450nm y 60nm) para medir el porcentaje de concentración para los colorantes.

CONCLUSIONES

La remoción de colorante rojo iris es óptima a condiciones establecidas a partir de las diferentes comparaciones entre muestras estándares y muestra patrón; sin embargo, para futuras réplicas y/o mejoramientos de la presente inves-

tigación, se debe reconsiderar otros parámetros donde el microorganismo tenga que adaptarse para evaluar su crecimiento y desarrollo de manera óptima, teniendo en cuenta parámetros como mayores concentraciones de sustrato y acondicionamiento del medio.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a los miembros del semillero de investigación Obatalá por su constante motivación y a todas aquellas personas que diariamente intentan mejorar las condiciones de vida de poblaciones vulnerables, a través de diferentes desarrollos tecnológicos y científicos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aksu, Z. 2003. Reactive dye bioaccumulation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Process Biochem.* 38, 1437-1444.
- Barragán, B. E., Costa, C., Márquez, M. C. 2006. Biodegradation of azo dyes by bacteria inoculated on solid media. *Dyes and Pigments* (artículo en prensa), 1-9.

- Chacón, J. M., Leal, M. T., Sánchez, M., Bandalá, E. R. 2002. Tratamiento de agua residual proveniente de la industria textil mediante fotocatalisis solar. XXVIII Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Cancún, México.
- Garzón Jiménez, R. C. (2009). Cinética de degradación de colorantes textiles de diferentes clases químicas por hongos y bacterias inmovilizados sobre fibra de Agave de Tequila. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- Kemmer, F. N. y McCallion, J. 1989. NALCO, Manual del agua, su naturaleza, tratamiento y aplicaciones. Tomo III. McGraw-Hill, México.
- Kuhad R.C., Sood N., Tripathi K.K., Singh A. y Ward O.P., 2004. Developments in microbial methods for the treatment of dye effluents. *Adv. Appl. Microbiol.*, 56, 185-213.
- Moeller, A. (2016). Influencia de las características hidráulicas y geométricas de biofiltros empacados sobre la eliminación de un colorante azo. XV Congreso Nacional de Ingeniería sanitaria y ciencias ambientales.
- Portillo, A. (2017). Descripción de la *Pseudomonas fluorescens*. México.
- Razo-Flores, E., Luijten, M., Donlon, B., Lettinga, G., Field, J. 1997. Biodegradation of selected azo dyes under methanogenic conditions. *Wat. Sci. Tech.*, 36(6-7), 65-72.
- Razo-Flores, E., Lettinga, G., Field, J. A. 1999. Biotransformation and biodegradation of selected nitroaromatics under anaerobic conditions. *Biotechnol. Prog.*, 15, 358-365
- Robison, T., McMullan, G., Marchant, R., Nigman, P (2001). Remediation of Dyes in textile effluent: A Critical Review on current Treatment Technologies With A proposed Alternative. *Bioresource Technology*, 247 - 255.