

BIODECOLORACIÓN DE TINTES SINTÉTICOS INDUSTRIALES POR BACTERIAS TERMÓFILAS CON ACTIVIDAD ENZIMÁTICA TIPO LACASA

Fiorela Virginia Salazar Torreblanca^{1a2}, Roberto Castellanos Cabrera^{1b2c}

RESUMEN

En este trabajo se investigó la capacidad de decoloración de las bacterias termófilas del Cepario del Laboratorio de Biotecnología Enzimática con actividades tipo lacasa sobre tintes sintéticos industriales, especialmente, tintas de impresión que se liberan en los efluentes industriales en el momento del destintado del papel reciclado. Por tal motivo, se seleccionaron los cultivos bacterianos termófilos *Geobacillus thermoleovorans* CB-13, *Geobacillus thermoparaffinivorans* CB-25, *Geobacillus thermoleovorans* FT-06 y *Geobacillus kaustophilus* TM-12, que presentaron mayor actividad enzimática tipo lacasa en medio sólido para los cuatro sustratos evaluados (2-MP; 2,6-DMP; ABTS y SRG). *Geobacillus kaustophilus* TM-12 se seleccionó por presentar el mayor potencial para la decoloración de tintes sintéticos en ensayos de decoloración en tubo. En el estudio de las cinéticas de remoción del tratamiento biológico con *Geobacillus kaustophilus* TM-12 se alcanzó un porcentaje de decoloración superior al 75% para los tintes azoicos en periodos de tiempo menores a las 24 horas y se observaron cambios en los espectros de absorción, indicando la degradación química del tinte. Asimismo, el tratamiento del efluente de destintado simulado resultó en 60% de decoloración a las 14 horas, evidenciando la acción biodecolorante de tintes sintéticos durante el tratamiento biológico con bacterias termófilas con actividad enzimática tipo lacasa. Por tanto, es una aplicación promisoriosa para tratamiento de efluentes procedentes del destintado industrial.

Palabras claves: Biodecoloración; Lacasa; *Geobacillus*.

BIODECOLORIZATION OF INDUSTRIAL SYNTHETIC DYES BY THERMOPHILES BACTERIA WITH ENZYMATIC ACTIVITY LACCASE TYPE

ABSTRACT

In this work, the discoloration capacity of the thermophilic bacteria of the Cepario of the Enzymatic Biotechnology Laboratory was investigated with laccase type activities about industrial synthetic dyes, especially printing inks that are released in the industrial effluents at the time of the de-inking of the recycled paper. For this reason, thermophilic bacterial cultures *Geobacillus thermoleovorans* CB-13, *Geobacillus thermoparaffinivorans* CB-25, *Geobacillus thermoleovorans* FT-06 and *Geobacillus kaustophilus* TM-12 were selected, which showed higher laccase-like enzymatic activity in solid medium for the four substrates evaluated (2-MP; 2,6-DMP; ABTS and SRG). *Geobacillus kaustophilus* TM-12 was selected as having the highest potential for decolorization of synthetic dyes in tube discoloration tests. In the study of the removal kinetics of the biological treatment with *Geobacillus kaustophilus* TM-12, a percentage of discoloration higher than 75% was reached for azo dyes in periods of time less than 24 hours and changes were observed in the absorption spectra, indicating the chemical degradation of the dye. Likewise, the treatment of the simulated deinking effluent resulted in 60% discoloration at 14 hours evidencing the biodecoloring action of synthetic dyes during the biological treatment with thermophilic bacteria with laccase-like enzymatic activity. Therefore, a promising application for the treatment of effluents from industrial deinking.

Keywords: Biodecoloration, laccase, *Geobacillus*.

¹ Escuela Profesional de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann. Tacna, Perú.

² Proyecto de investigación "Tratamiento biotecnológico con enzimas termoestables bacterianas para el destintado del papel periódico y de oficina en su proceso de reciclado", UNJBG, FONDECYT, CIENCIACTIVA, CONCYTEC.

^a Biólogo microbiólogo, Laboratorio de Biotecnología Enzimática, UNJBG. fsalazar.torreblanca@gmail.com

^b Magíster en bioquímica, UNMSM. Docente principal de la Escuela Profesional de Biología, FACI, UNJBG.

^c Jefe e investigador principal. robertocastellanoscabrera@yahoo.es

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, existen más de diez mil diferentes tintes sintéticos que se utilizan en diversos procesos industriales, desde la coloración de alimentos o cosméticos hasta la imprenta e industria textil, cuyas propiedades físicas y químicas son mejoradas para que sean más estables y permanezcan por más tiempo en el producto. Sin embargo, se ha originado un grave problema ambiental debido al incremento de la resistencia de estos tintes sintéticos a los métodos convencionales de degradación por agentes químicos y biológicos ^(1,2), lo que ocasiona que permanezcan durante largos periodos de tiempo en el medio ambiente sin poder controlar las consecuencias adversas para los seres vivos y el ecosistema por su naturaleza tóxica y mutagénica ^(3,4).

En el presente estudio considerando el origen de estas sustancias, se le denomina “tinte sintético” a toda sustancia que imparte color a un sustrato por absorción selectiva de la luz y que han sido obtenidas por síntesis química de otras sustancias, como: el benceno, naftaleno, antraceno, sosa cáustica, ácidos inorgánicos, aminas aromáticas, quinonas, etc. El color es debido a la estructura cromógeno-cromóforo (aceptor de electrones), y la capacidad de afinidad es debido a grupos auxocromos ionizables (donantes de electrones) ^(5,6).

Las propiedades recalcitrantes de los tintes sintéticos han llevado a formular varios tratamientos físicos y químicos para removerlos de los efluentes. A pesar que los tratamientos físicos y químicos son efectivos, demasiado costosos por las grandes cantidades de reactivos y catalizadores que se emplean, y los gastos adicionales de operación por la disposición final de los residuos peligrosos que se originan ^(7,8). El proceso de reciclaje en el papel necesita eliminar el material impreso y recubierto, para formar una nueva pasta utilizable en la elaboración de distintos tipos de productos, por lo tanto, la etapa más importante es el destintado, que genera efluentes difíciles de tratar con un impacto negativo sobre el ambiente. El promedio aproximado de efluentes generados de la producción de papel gráfico y de la fibra reciclada de papel de oficina es 32 a 46 galones de agua por tonelada de pulpa recuperada ⁽⁹⁾. Estos efluentes se caracterizan por sus valores elevados de DBO, sólidos suspendidos y pH, debido a que contienen fibras perdidas, arcilla, material de recubrimiento, y otros

productos químicos como hidróxido sódico, silicato sódico, carbonato sódico, hipoclorito sódico), junto a partículas dispersas de tinta de impresión ^(10,11).

Frente a este reto, la biotecnología aporta alternativas eficientes y amigables con el medio ambiente empleando la degradación biológica ⁽¹²⁾. En este campo, los hongos son los organismos más estudiados ya que degradan compuestos aromáticos complejos a través de enzimas lignolíticas. No obstante, el tratamiento con hongos requiere condiciones de acidez para la actividad óptima de sus enzimas y periodos largos de retención hidráulica para la decoloración completa ^(13,14); además, pueden inhibir el crecimiento de otros microorganismos útiles. Por estas razones, se han hecho evidentes; las ventajas ofrecidas por las bacterias con actividad óxido reductora productora de lacasas que actúan en medios neutros o alcalinos y en menor tiempo, favoreciendo su empleo a escala industrial.

Las lacasas son enzimas oxidorreductasas (EC 1.10.3.2, p-difenol: oxígeno-oxidorreductasa), que se caracterizan por su baja especificidad de sustrato y amplio rango de compuestos susceptibles de ser oxidados por estas enzimas, así se incluye a mono y polifenoles, aminofenoles o fenoles sustituidos con grupos metilo, metoxilo, así como poliaminas aromáticas y algunos iones metálicos ⁽¹⁵⁾. Para definir la actividad de estas enzimas, se recomienda incluir sustratos específicos como la siringaldazina, ABTS o catecol, para los que la lacasa tiene una alta afinidad y algunos de poca o ninguna afinidad, como: tirosina ^(16,17). Son generalmente glicoproteínas monoméricas que contienen aproximadamente 500 aminoácidos dispuestos en 3 dominios tipo β -barril ensambladas para modelar tres distintos sitios de unión catalíticos espectroscópicamente distintos ⁽¹⁸⁾. Generalmente, las lacasas contienen un centro mononuclear tipo-1 (T1) de cobre que se encarga de la oxidación del sustrato, un centro tipo-2 (T2) y dos centros tipo-3 (T3) con Cu₂ y Cu₃ dispuestos en un centro trinuclear, el cual se encarga de reducir el oxígeno molecular ^(19,20). En la última década se ha descubierto la existencia de dos tipos de lacasas: las azules y amarillas o blancas. La diferencia entre ambas se presenta en la carencia de absorción alrededor de 610 nm de las lacasas amarillas/blancas que siempre se encuentra en las azules, también, lacasas amarillas/blancas oxidan sustratos no fenólicos en ausencia de moléculas mediadoras que se requieren en casos de

lacasas azules. Por lo tanto, muchos autores afirman que las lacasas amarillas/blancas son mejores biocatalizadores que las azules⁽²¹⁾.

Teniendo en cuenta que los microorganismos termófilos presentan propiedades fisicoquímicas, óptimas para el uso industrial como amplios rangos de pH y termoestabilidad⁽²²⁾. Este trabajo propone aprovechar las ventajas metabólicas de las bacterias termófilas estudiando la biodecoloración de los tintes sintéticos presentes en las tintas de impresión como una estrategia para el tratamiento de los efluentes procedentes del destintado industrial.

MATERIALES Y MÉTODOS

El diseño del trabajo de investigación es un estudio descriptivo, básico, orientado y de corte transversal.

Ubicación y delimitación del área de estudio

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Enzimática de la Carrera Profesional de Biología Microbiología de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, Tacna – Perú.

Población

La población lo constituyen 120 cepas de bacterias termófilas aisladas en los géiseres de Calientes, Candarave – Tacna, que pertenecen al Cepario del Laboratorio de Biotecnología Enzimática de la Facultad de Ciencias.

Muestra

Representada por 11 cepas de bacterias termófilas que mostraron actividad tipo lacasa con guayacol (2-metoxifenol) bajo la codificación de CB-13, CB-16, CB-25, BT-16, CTB-13, CTB-16, CTB-19, CTB-21, FT-06, FT-09 y TM-12.

Evaluación de la actividad enzimática tipo lacasa de las bacterias termófilas

Para determinar la producción de la enzima, se siguió el método de Sheiki et al.⁽²²⁾, sembrando por estriado las bacterias termófilas en agar Luria Bertani con 0,08% v/v de guayacol (2-metoxifenol o 2-MP) y sulfato de cobre (Cu_2SO_4 0,25 mM). Después de 48

horas de incubación a 60 °C, se evaluó la coloración de las colonias registrándose el marrón oscuro como positivo. La segunda prueba se realizó según el método de Verma y Shirkot⁽³²⁾, modificado según Ambika en consulta por correo electrónico. Se empleó siringol (2,6 dimetoxifenol o 2,6-DMP), los inóculos se sembraron por estriado en agar Luria Bertani inducido con sulfato de cobre (Cu_2SO_4 0,25 mM), luego de 48 horas de incubación a 60 °C, se vertió una solución de tampón fosfato 100 mM con 0,2 % v/v de siringol a pH 7 sobre las colonias. Luego de 20 minutos de reacción, se registró como resultado positivo a todas las colonias anaranjadas y se valorizó la intensidad de la coloración. Además, los cultivos bacterianos termófilos de la escala alta fueron evaluados con ABTS (1, 2, 2'-azino bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico), según la metodología de Saparrat et al.⁽²³⁾, añadiendo 250 mg/l de ABTS al cultivo Luria Bertani estéril y se evaluó la aparición de halos verdes. Junto a ensayos con siringaldazina (3,5-Dimetoxi-4-hidroxibenzalazino) vertiendo solución tampón fosfato 100 mM pH 6,5 con 0,2 % v/v de solución de siringaldazina en metanol absoluto, sobre colonias crecidas en Agar Luria Bertani inducido con Cu_2SO_4 0,25 mM y se monitoreó el cambio de coloración de las colonias a violeta durante 2 horas.

Selección del cultivo bacteriano termófilo con mayor potencial para la decoloración de tintes sintéticos

Se evaluó la capacidad de decoloración de 5 tintes sintéticos puros (rojo de Congo, azul brillante de remazol R, azul de toluidina, verde malaquita y cristal violeta) junto a 4 tintas de impresión Epson® color Negro, Amarillo, Magenta y Ciano; la clasificación y estructura química de cada uno, se da a conocer en la tabla 1.

Se utilizó caldo cerebro-corazón (BHI, Merck Millipore; 10 g/l tejido animal digerido enzimáticamente; 17,5 g/l extracto cerebro-corazón; 2 g/l D (+)- Glucosa; 5 g/l NaCl; Na_2HPO_4 ; anhidro 2,5 g/l) inducido con 0,25 mM de $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 0,25 mM de CuSO_4 al cual se le añadió cada tinte sintético a 0,025% v/v luego de la esterilización a 1 atm y 120 °C por 20 minutos.

El medio de cultivo fue distribuido en condiciones estériles en tubos de ensayo para cada cultivo bacteriano preseleccionado (CB-13, CB-25, FT-6 y TM-12), reactivado en caldo Luria Bertani y se inocularon

al 10% v/v e incubaron a 60 °C, registrando las observaciones del crecimiento y decoloración cada 24 horas.

Caracterización bioquímica e identificación molecular

Se utilizó el micro método cualitativo RapID™ SRT System (Remel, Oxoid). Las pruebas bioquímicas de este sistema se basan en la degradación microbiana de sustratos específicos, se realizó el procedimiento según el manual. Además, se realizó la prueba de la catalasa. Para la identificación molecular, la cepa seleccionada fue procesada para obtener el ADN genómico para obtener los genes ARNr 16S por PCR y enviarlos a MacroGen Inc. en Seúl - Corea del Sur, para su secuenciamiento por el método de Sanger (24). Luego, para analizar la similitud de las secuencias de nucleótidos obtenidos se utilizó la herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST) frente a secuencias de referencia disponibles en NCBI GenBank.

Tabla 1. Tintes sintéticos del ensayo del potencial de decoloración

Tinte sintético	Clasificación	Estructura química
Rojo de Congo	diazoico	
Azul brillante de Remazol R	antraquinónico	
Azul de toluidina	fentiazina	
Verde malaquita	trifenilmetano	

Cristal violeta	trifenilmetano	
Tinta magenta (Epson)	monoazoico	
Tinta cian (Epson)	ftalocianina	

Fuente: Elaboración propia

Cinéticas de decoloración de cada tinte sintético

En matraces Erlenmeyer de 250 ml se prepararon 50 ml de caldo cerebro corazón autoclavado a 1 atm, 121 °C durante 20 min que luego fue inducido con 0,25 mM MnSO₄·5H₂O y 0,25 mM CuSO₄·5H₂O y finalmente se le añadió cada tinte sintético según la tabla 2, por triplicado.

La inoculación se realizó al 10% (v/v), del cultivo termófilo TM-12 reactivado en caldo BHI por 18 horas (D.O. ~ 0,4 a 600 nm). La incubación se llevó a cabo a 60 °C en estático. El tiempo de incubación e intervalos de muestreo varían según el tinte sintético.

Tabla 2. Condiciones del tratamiento biológico según el tinte sintético utilizado

Tinte sintético	Porcentaje inicial (% v/v)	Tiempo de incubación (horas)	Muestreo (horas)
Rojo de Congo	0,1*	48	12
Tinta Magenta (Epson)	0,05	24	4
Tinta Negro (Epson)	0,05	24	4
Tinta Cian (Epson)	0,025 0,05 0,1	48	12

Fuente: Elaboración propia

Todos los tratamientos biológicos se acompañaron de un control abiótico que mantenía las mismas condiciones en el medio de cultivo, porcentaje de tinte e incubación. El control abiótico se utilizó, además, para calcular la longitud de absorbancia máxima de cada uno de los tintes sintéticos, empleados realizando un barrido espectrofotométrico desde 200 a 900 nm con intervalos de 12 nm de longitud de onda utilizando el espectrofotómetro de luz UV-visible UNICO 2102.

Luego de 8 horas de incubación, en los muestreos se tomó 1,5 ml en microtubos estériles que se centrifugaron por 10 min a 10 000 rpm y el sobrenadante se traspasó a nuevos microtubos.

Se registraron las unidades de absorbancia a la longitud de onda máxima de cada tinte sintético cada 2 horas y se graficó la curva de remoción de cada tinte sintético tratado para conocer el tiempo de la decoloración. Además, con cada sobrenadante se realizó un barrido espectrofotométrico desde 200 a 900 nm con intervalos de 12 nm de longitud de onda para comprobar los cambios en la estructura química en las alícuotas.

El porcentaje de decoloración se determinó como la disminución relativa en la absorbancia de cada tinte sintético en uso a la longitud de onda de absorbancia máxima, que fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Decoloración (\%)} = \frac{(A_0 - A_t)}{(A_0)} \times 100$$

Dónde:

A_t = Absorbancia del tinte de la muestra medido a una hora específica

A_0 = Absorbancia del tinte del control a las mismas horas que la muestra

Cinética de decoloración del efluente simulado

Se continuó la misma metodología de tratamiento de tintes sintéticos puros, solo se combinó las cuatro tintas de impresión (magenta, amarillo, negro a

0,05% v/v y ciano a 0,025 % v/v. Del mismo modo, se realizó la inoculación al 10% (v/v) del cultivo bacteriano TM-12 reactivado y la incubación se llevó a cabo a 60 °C en estático por 24 horas.

Se realizó el recuento bacteriano hasta la formación de la biopelícula, donde se utilizó una cámara Petroff Haussen y luego, el monitoreo del espectro de absorción para determinar la curva de remoción y el porcentaje de decoloración, tal como se señaló en la sección anterior.

Análisis estadístico

Todos los análisis fueron llevados a cabo con el programa STATGRAPHICS. Para los análisis estadísticos se utilizó un nivel de confianza de 95% ($\alpha=0,05$) y se rechazó la hipótesis nula si el p-valor obtenido es menor a 0,05.

En caso de comparar más de tres tratamientos, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para evaluar la presencia o no de diferencias significativas entre los mismos. Al existir diferencia significativa, se procedió a usar la prueba de rangos múltiples según el método de Fisher para determinar cuál es el tratamiento más favorable.

RESULTADOS

Evaluación de la actividad enzimática tipo lacasa de las bacterias termófilas

Se valorizó cualitativamente la actividad enzimática por la intensidad de las coloraciones de las colonias, correspondientes a la oxidación de cada sustrato empleado (tabla 3). Las bacterias CB-13, CB-16, BT-16, CTB-13 y TM-12 se les asignaron el mismo puntaje para guayacol y siringol, sin embargo, el resto tienen mayor puntaje con siringol (2,6-DMP), ya que se observó un aumento en la intensidad de la coloración.

La reacción de oxidación del ABTS y siringaldazina fue negativa para las bacterias termófilas CB-13, CB-25, TM-12 y FT-06 por no observarse cambios en la coloración de las colonias.

Tabla 3. Actividad enzimática tipo lacasa de bacterias termófilas en medio sólido

Bacteria	2-MP	2,6-DMP	ABTS	SRG	Categoría
CB-13	5	5	0	0	Alta
CB-16	3	3	-	-	Media
CB-25	4	5	0	0	Alta
BT-16	3	3	-	-	Media
CTB-13	1	1	-	-	Baja
CTB-16	1	2	-	-	Baja
CTB-19	1	2	-	-	Baja
CTB-21	3	4	-	-	Media
FT-06	4	5	0	0	Alta
FT-09	2	3	-	-	Media
TM-12	4	4	0	0	Alta

2-MP: 2-Metoxifenol; 2,6-MP: 2,6 Dimetoxifenol; ABTS: 2,2'- azinobis - bis-(3-etilbenzotiazolinosulfanato); SRG: Siringaldazina.

Fuente: Elaboración propia

Del total de cepas evaluadas, las bacterias termófilas CB-13, CB-25, FT-06 y TM-12 presentaron intensidad alta para la oxidación del guayacol y siringol, mientras que la actividad enzimática de CB-16, BT-16, CTB-21 y FT-09 se valorizaron como intermedia, representando ambas categorías el 73% del total.

Según los criterios de cribado para la detección de la actividad enzimática tipo lacasa en medio sólido con diferentes sustratos fueron elegidas para los posteriores estudios de decoloración las bacterias termófilas CB-13, CB-25, TM-12 y FT-06.

Selección del cultivo bacteriano termófilo con mayor potencial para la decoloración de tintes sintéticos

Se evaluó la capacidad de decoloración de los cuatro cultivos bacterianos previamente seleccionados frente a cinco tintes textiles puros y cuatro tintas de impresión de color magenta, amarillo, ciano y negro en caldo BHI. Los resultados obtenidos del potencial de decoloración a las 24 horas, se detallan en la tabla 4.

TM-12 decoloró totalmente el rojo de congo en 24 hrs seguida de CB-13 y CB-25, con menor intensidad

observándose color anaranjado. CB-13 y TM-12 con Azul brillante de remazol R, se observó disminución en el color inicial de azul oscuro a verde azulado con abundante biomasa bacteriana; por lo que se consideró una decoloración incompleta (++) . También, CB-13 y TM-12 junto a FT-6 crecieron en el medio de cultivo con azul de toluidina, observándose turbidez, pero el color inicial se mantuvo; por lo tanto, no hubo decoloración. Los otros tintes sintéticos inhibieron el crecimiento microbiano. CB-13, CB-25 y TM-12 lograron decolorar la tinta de impresión magenta y amarillo a las 24 hrs; mientras que la tinta negra, solo la bacteria CB-25 seguida de TM-12 a las 48 horas. Sin embargo, ninguna de las bacterias decoloró completamente el medio con tinta ciano.

Los resultados obtenidos de la decoloración de tintes sintéticos y tintas de impresión, CB-25 y TM-12 son las dos cepas que muestran mayor capacidad para decolorar tintas de Impresión. Se eligió la bacteria termófila TM-12 por presentar un rango más amplio de decoloración que el resto de cultivos bacterianos.

Tabla 4. Selección del cultivo bacteriano termófilo con mayor potencial de decoloración de tintes sintéticos

Tinte sintético	CB-13	CB-25	TM-12	FT-06
Rojo de Congo	++	++	+++	C
Azul brillante remazol R	++	CI	++	CI
Azul de toluidina	C	CI	C	C
Verde malaquita	CI	CI	CI	CI
Cristal violeta	CI	CI	CI	CI
Negro (Epson)	+	+++	++	V
Amarillo (Epson)	+++	+++	+++	V
Magenta (Epson)	+++	+++	+++	V
Ciano (Epson)	C	C	C	CI

El signo (+) indica un orden de intensidad de la decoloración; (C) denota crecimiento sin cambio de color; (V) indica variables en los resultados; (CI) denota inhibición en el crecimiento.

Fuente: Elaboración propia

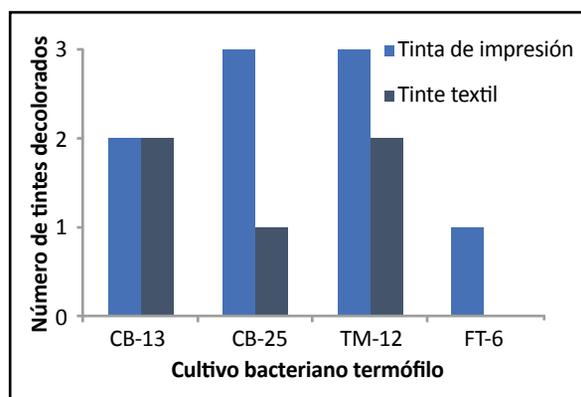


Figura 1. Selección del cultivo bacteriano termófilo con mayor potencial de decoloración de tintes sintéticos

Caracterización bioquímica e identificación molecular

Los resultados de la reactividad del sistema RapID STR y su interpretación según las indicaciones del manual, se muestran en la tabla 5. Adicionalmente, la prueba de la catalasa dio como resultado positivo. Y, el 100% de las bacterias termófilas fueron Gram positivos, su morfología corresponde a bacilos de diferentes longitudes con presencia o ausencia de esporas terminales deformantes. Además, se observó agrupaciones en forma de cadenas rectas y cortas o filamentosas largas y onduladas, según la cepa evaluada. El algoritmo BLAST se utilizó para recuperar las secuencias homólogas, a la secuencia de ARNr 16S de 1518 nucleótidos obtenida de la bacteria termófila TM-12 en GenBank. El aislamiento bacteriano reveló un 99% de identidad con cuatro especies del género *Geobacillus*, estas fueron *Geobacillus thermoleovorans* CB-13, *Geobacillus thermoparaffinivorans* CB-25, *Geobacillus thermoleovorans* FT-06 y *Geobacillus kaustophilus* TM-12.

Cinéticas de decoloración de los tintes sintéticos

Durante todo el proceso se llevó a cabo la cinética de un control abiótico, el cual tenía la misma cantidad de tinte textil o tinta de impresión, pero sin microorganismo inoculado. La decoloración del rojo de congo inició a partir de las 12 horas tal como se demuestra con la disminución de la absorbancia a 500 nm finalizando a las 36 horas (figura 2). Además, el espectro de absorción presenta un pico elevado a los 500 nm entre las 0-12 horas pero desaparece a las 24 horas junto a la disminución de todo el rango de absorbancias desde los 400 a 600 nm (figura 3).

Tabla 5. Resultados del sistema RapID STR para la bacteria termófila TM-12

Prueba bioquímica	Resultado	Interpretación
ARG	Amarillo	Negativo
ESC	Crema	Negativo
MNL	Rojo guinda	Negativo
SBL	Rojo guinda	Negativo
RAF	Rojo guinda	Positivo
INV	Guinda	Positivo
Gal	Amarillo	Positivo
Glu	Amarillo	Positivo
Nag	Amarillo	Positivo
PO ₄	Amarillo	Positivo
TYR	Morado	Positivo
HPR	Transparente	Negativo
LYS	Rosado	Negativo
PYR	Transparente	Negativo

Fuente: Elaboración propia

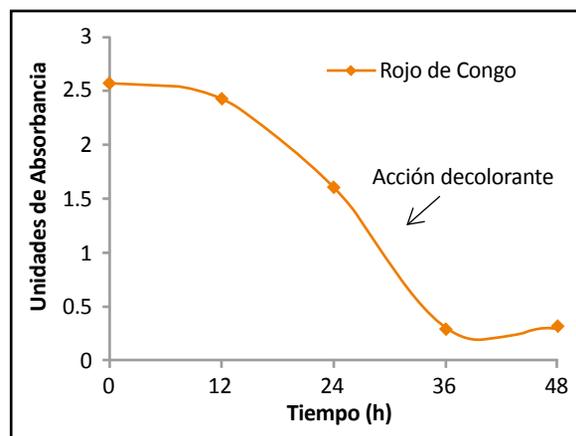


Figura 2. Curva de remoción para rojo de congo

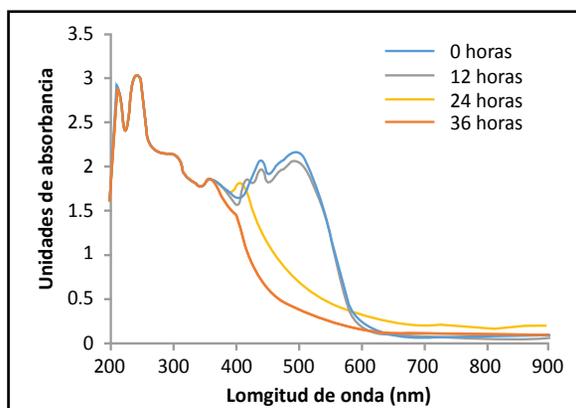


Figura 3. Espectros de absorción para el rojo de congo

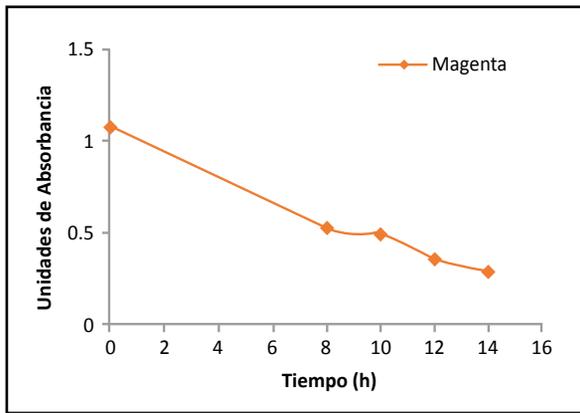


Figura 4. Curva de remoción para la tinta de impresión magenta. Monitoreo desde de las 8 horas de incubación a 60 °C por cada 2 horas hasta las 14 horas

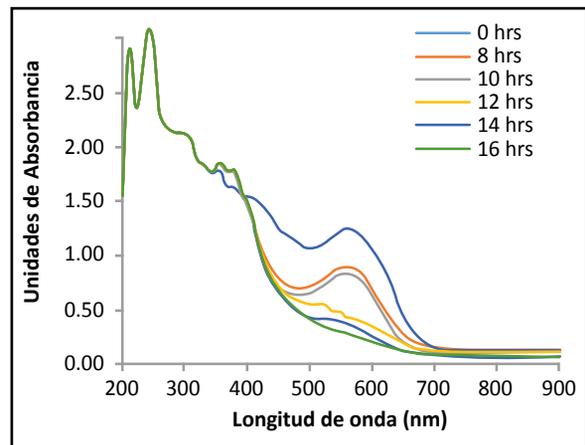


Figura 7. Espectros de absorción del tratamiento para la tinta de impresión negra. Cambios en el espectro de absorción con desaparición total de los picos máximos de absorción hacia los 500 nm y la aparición de nuevos picos a los 400 nm, a las 12 horas

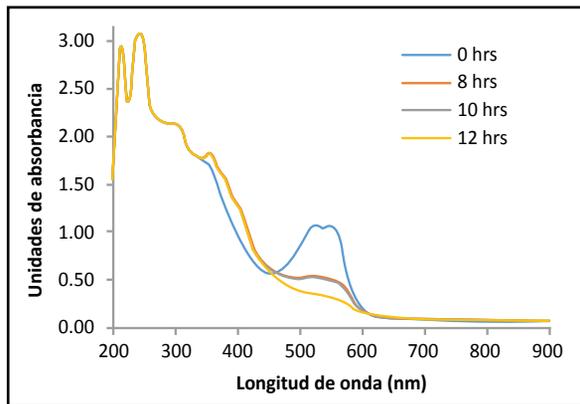


Figura 5. Espectros de absorción del tratamiento para la tinta de impresión magenta. Cambios progresivos a las 14 horas entre los 400 a 600 nm

La decoloración de la tinta de impresión ciano fue evaluada cada 12 horas para tres diferentes concentraciones. Del análisis de varianza (P 0,05), existe diferencia significativa entre las medias de la decoloración de la tinta de impresión ciano entre una concentración y otra. Para determinar cuál es la concentración más favorable para una mejor decoloración de la tinta de impresión, se procedió a realizar la prueba de múltiples rangos al 95% de confiabilidad. Por lo tanto, la decoloración de la tinta de impresión ciano depende de la concentración inicial de la tinta y se obtiene mayor decoloración al utilizar la concentración de 0,025% (v/v) correspondiente al valor más bajo.

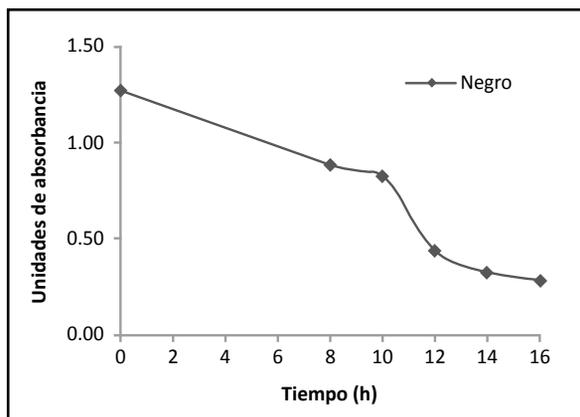


Figura 6. Curva de remoción para la tinta de impresión negra. Monitoreo a partir de las 8 horas hasta las 12 horas

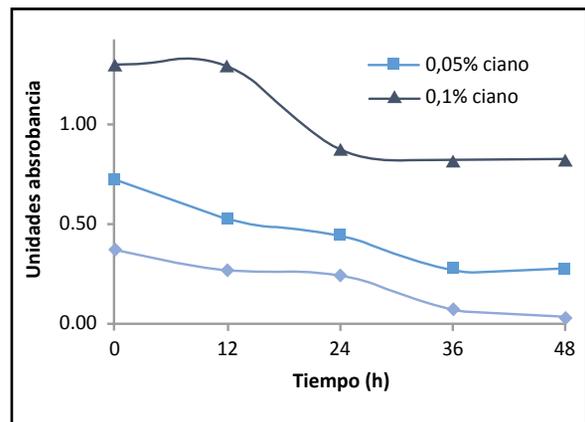


Figura 8. Curvas de remoción para la tinta de impresión ciano a tres concentraciones

La curva de remoción de la tinta de impresión ciano presenta una disminución constante en las unidades de absorción del rango visible, con una máxima disminución a las 36 horas (figura 8). Sin embargo, no se presentaron cambios en el espectro UV para las concentraciones de 0,1 y 0,05% v/v, solo a 0,025% v/v con la desaparición del pico de absorción; sin embargo, este resultado podría deberse a un proceso de adsorción del tinte por las paredes de las bacterias ya que la biopelícula presentó color azulado (datos no publicados).

Tabla 6. Resultados de remoción de tintes sintéticos obtenidos por decoloración con bacteria termófila TM-12

Tinte	λ (nm)	UA inicial	UA final	% Decoloración
Rojo de congo	500	2,152	0,340	84
Tinta magenta	524	1,075	0,289	73
Tinta negra	560	1,273	0,285	78
Tinta ciano	605	1,294	0,822	36

UA: Unidades de absorción

Fuente: Elaboración propia

De acuerdo con tabla 6, se evidencia que los tratamientos para el rojo de congo y la tinta de impresión de color negro fueron totalmente efectivos con porcentajes de decoloración cercanos al 80%, cuya absorbancia final corresponde al color amarillo inicial del medio de cultivo cerebro-corazón, demostrando la capacidad de la bacteria termófila TM-12 para la degradación de estos tintes sintéticos.

Cinética de decoloración del efluente simulado

Se monitoreó el crecimiento bacteriano hasta la formación de una biopelícula sobre el medio de cultivo hasta las 8 horas de incubación, se alcanzó una concentración aproximada de $2,17 \times 10^8$ células/ml.

En la curva de remoción a 560 nm se registraron las más altas unidades de absorción en el tiempo inicial (1,019) y durante el monitoreo se puede observar que la absorbancia se mantiene constante alrededor de la unidad, hasta las 16 horas que

disminuye a 0,412 donde se ve la desaparición total del color en medio del cultivo (figura 9).

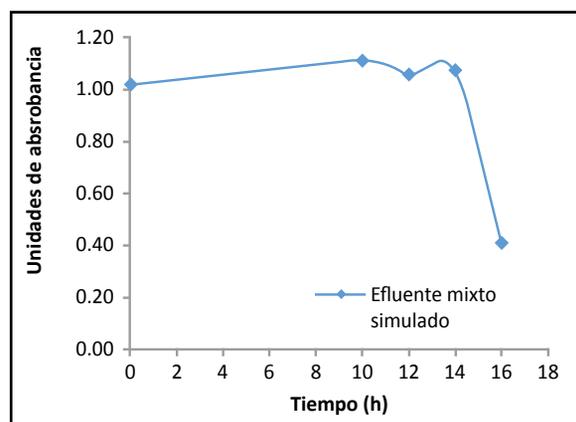


Figura 9. Curva de remoción para el efluente simulado de un destintado

El espectro de absorción da a conocer las curvas de unidades de absorción iguales desde el inicio (0 horas) hasta las 14 horas, seguido de una notable disminución (líneas punteadas, figura 10). Estos resultados del espectro de absorción, no concuerdan con los cambios progresivos del color, observados de negro hasta, finalmente, un color verde olivo claro.

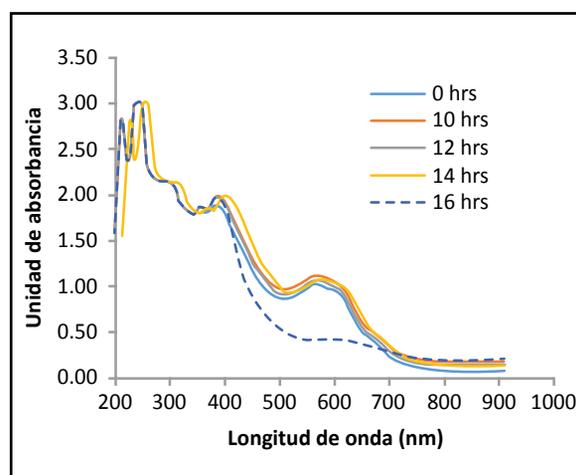


Figura 10. Espectros de absorción para el efluente simulado de un destintado

El resultado del porcentaje de decoloración del tratamiento biológico con la bacteria termófila TM-12 del efluente simulado de un destintado (60%), concuerdan con los datos antes mencionados en la decoloración de tintes sintéticos, incluso la presencia de la tinta de impresión ciano, no impidió que se decolore el resto de tintas de impresión.

DISCUSIÓN

Sheikhi et al. ⁽²²⁾ fueron los primeros en aislar bacterias productoras de lacasas intracelulares, utilizando 0,5 mM guayacol (2-metoxifenol). A partir de los resultados obtenidos, se puede afirmar que se ha logrado aislar bacterias termófilas con actividad tipo lacasa que oxidan al guayacol desarrollando colonias de color marrón. Además, ha sido reportado que las lacasas tienen la capacidad para oxidar ácidos metoxifenólicos a diferentes grados, ⁽²⁵⁾ lo que llevó a utilizar el siringol (2,6 dimetoxifenol), logrando observar mejor la intensidad del cambio de color de las colonias anaranjadas. Se asignaron puntajes más altos para la oxidación del 2,6-DMP que 2-MP; probablemente, por lo antes mencionado por Guillén et al. ⁽²⁶⁾, al estudiar la lacasa de *Pleurotus eryngii*.

Generalmente, las lacasas se combinan con una alta afinidad por el ABTS y siringaldazina, mientras que la oxidación de guayacol es considerablemente más lenta; sin embargo, no se detectó actividad oxidorreductora sobre ABTS o siringaldazina, estos resultados se asemejan a lo reportado por la lacasa amarilla de *Bacillus* sp. ADR, que oxidó o-toluidina 2,6-DMP, guayacol, hidroquinona y L - DOPA, pero no ABTS, siringaldazina, catecol, benzidina, p-cresol, pirogalol, ácido cafeico y tirosina ⁽²⁷⁾. Además, la lacasa fúngica de *Aspergillus nidulans* fue incapaz de oxidar al ABTS y siringaldazina ⁽²⁸⁾, así como, la lacasa de *Agaricus bisporus* que tampoco oxidó siringaldazina, catecol, pirogalol y L-DOPA ⁽²⁹⁾. Sin embargo, el color amarillo-anaranjado formado por la quinona producto de la oxidación del 2,6-DMP que se observó en la coloración de las colonias, confirman la presencia de enzimas con capacidad de oxidar compuestos fenólicos sustituidos con radicales metoxilo, por lo cual, se afirma que las bacterias termófilas CB-13, CB-25, FT-06 y TM-12 presentan actividad enzimática tipo lacasa.

De la selección del cultivo bacteriano termófilo con mayor potencial para la decoloración de tintes sintéticos, en general, los tintes sintéticos azoicos (tinta amarilla, tinta magenta y rojo de congo), les corresponde mayor de decoloración frente al resto de tintes. Esta diferencia puede estar relacionada a la complejidad de la estructura química del tinte, ya que la presencia del azufre en los anillos de las fenotiazinas o los grupos sulfóxidos de los tintes de antraquinona no facilitan su degradación; una

observación similar fue por Jiménez y Catherine ⁽³⁰⁾. Además, los colorantes a base de antraquinona son considerados como los más resistentes debido a sus propiedades estructuras aromáticas fundidas que permanecen coloreadas durante períodos de tiempo ⁽¹³⁾. Por otra parte, los tintes de trifenilmetano como el cristal violeta o verde malaquita por sus propiedades antibacterianas probablemente ocasionaron la inhibición total del crecimiento de las bacterias cultivadas, a diferencia de los estudios realizados con hongos como *Fomitopsis feei* el cual, presentaba altos porcentajes de decoloración de tintes de trifenilmetano correlacionado a la actividad enzimática de trifenilmetano reductasas, mas no a la actividad enzimática de lacasas ⁽³¹⁾.

El único bacilo termófilo con actividad enzimática de lacasas reportado, *Geobacillus thermocatenulatus* MS5 aislado de las fuentes termales de Manikaran en India, con una baja temperatura óptima de 55-60 °C ⁽³²⁾. Mientras que el cultivo bacteriano TM-12 es un bacilo aerobio Gram positivo, formador de esporas, capaz de crecer a altas temperaturas (50-75 °C), con un crecimiento óptimo de 65 °C; bioquímicamente puede utilizar como fuente de carbono a la rafinosa e inulina, pero no al manitol ni sorbitol y es capaz de hidrolizar p-nitrofenil- sustituido o fosfoéster identificado como *Geobacillus kaustophilus* TM-12.

Los mejores resultados de remoción para el colorante rojo de congo (84%), seguida de la tinta de impresión negra y magenta (78% y 73%), contrario a la tinta de impresión ciano en bajas concentraciones (59%); lo cual refleja como la remoción de cada uno de los tintes sintéticos, varía de acuerdo a la estructura química del tinte sintético, logrando decolorar compuestos azoicos pero no ftalocianinas. *Geobacillus kaustophilus* TM-12 superó la toxicidad inherente a los compuestos azoicos esta capacidad se ha relacionado a la producción de enzimas oxidasas como las lacasas y enzimas reductasas como las azorreductoras. Por las condiciones de cultivo estático, puede estar ocurriendo la producción de ambas enzimas para la degradación de los tintes. Al haber confirmado la actividad enzimática tipo lacasa previamente con ensayos en medio sólido, se puede tener la seguridad que dichas enzimas están participando en el tratamiento biológico de los tintes sintéticos en condiciones estáticas, por lo cual se estarían liberando productos no tóxicos, que permiten que

la biomasa bacteriana continúe en aumento. Al respecto, Durão et al. ⁽³³⁾ mostraron que la incubación estática mejoró el contenido de cobre celular, produciendo así, una población totalmente cargada de proteína de cobre que favorece la producción de las lacasas, con este tipo de tratamiento biológico favorable para el medio ambiente.

El mecanismo en que las lacasas oxidan un electrón del anillo fenólico de los compuestos azoicos para generar un radical fenoxi indica Moreno y Ospina ⁽³⁴⁾, que se debe oxidar una vez más por la enzima para producir un ión carbonio, en el que la carga está localizada en el anillo fenólico que lleva el carbono azo y lograr que el ataque nucleofílico por el agua forme 4-sulfufenildiazeno y una benzoquinona perdiendo el color del compuesto.

No se observan estos nuevos picos con el tinte ciano. Esto, junto con los sedimentos bacterianos altamente coloreados, indica que la disminución de las concentraciones de colorante con ciano, se debe a la adsorción. Al igual que en el estudio de Zhou y Zimmermann ⁽³⁵⁾ quienes lograron el 52,3% de decoloración de un efluente con tintes, a los 14 días de incubación en medios líquidos utilizando cepas de actinomicetos; sin embargo, se le atribuye a una absorción del tinte a las células en lugar de una degradación del tinte.

CONCLUSIONES

Se determinó que las bacterias termófilas *Geobacillus thermoleovorans* CB-13, *Geobacillus thermoparaffinivorans* CB-25, *Geobacillus thermoleovorans* FT-06 y *Geobacillus kaustophilus* TM-12, del Cepario del Laboratorio de Biotecnología Enzimática, presentan mayor actividad enzimática tipo lacasa, para los cuatro sustratos evaluados (2-MP; 2,6 – DMP; ABTS y SRG), en medio sólido.

La bacteria *Geobacillus kaustophilus* TM-12 se caracteriza por ser un bacilo aerobio Gram positivo, identificado molecularmente con un porcentaje de homología del 99 % en su secuencia de ARNr 16 S respecto a la base de datos del NCBI.

Las cinéticas de remoción de los tintes sintéticos azoicos durante el tratamiento biológico con *Geobacillus kaustophilus* TM-12 demuestran un alto porcentaje de decoloración superior al 75% en

periodos de tiempo menores a las 24 horas.

En el tratamiento del efluente de destintado simulado con la bacteria termófila *Geobacillus kaustophilus* TM-12, pese a la persistencia del tinte ciano, logró la biodecoloración en un 60% hacia las 14 horas.

RECOMENDACIONES

Optimizar el medio de cultivo para el tratamiento de tintes sintéticos con bacterias termófilas evaluando el efecto de aireación o agitación, midiendo la cantidad de oxígeno disuelto.

Medir la actividad enzimática tipo lacasa intracelular de *Geobacillus kaustophilus* TM-12 con un amplio rango de sustratos fenólicos y no fenólicos.

Se debe evaluar la inmovilización de las bacterias en mallas inertes para el tratamiento de decoloración de tintes sintéticos, considerando realizar una fase inicial de saturación de las mallas inmovilizadas, para descartar la posibilidad de que la remoción de los colorantes se presente por absorción al soporte, y así poder dar mayor estabilidad y resistencia a las concentraciones más elevadas de los contaminantes con un efecto de protección, debido a las altas densidades celulares que se alcanzan.

Agradecimientos

Al Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT) que, a través del cofinanciamiento con el Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, concedieron gran parte de los materiales que han permitido llevar a cabo los trabajos para realizar esta investigación.

A todas las personas que se involucraron de múltiples formas en cada fase de este trabajo.

Conflictos de interés

Los autores declaran no tener conflictos de interés.

Financiamiento

La investigación fue financiada por la cantidad de 6 000.00 soles en materiales, con fondo

concurso del canon, sobrecanon y regalías mineras otorgado por la Universidad Nacional Jorge Basadre Grohmann, en el "II Concurso de financiamiento de tesis, 2015". Y con el 10% del monto total financiado por el FONDECYT para la ejecución del

Proyecto de Investigación, Convenio de Subvención N° 099-2015-FONDECYT, titulado "Tratamiento biotecnológico con enzimas termoestables bacterianas para el destintado del papel periódico y de oficina en su proceso de reciclado".

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Robinson T, McMullan G, Marchant R, Nigam P. Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology*. 1 de mayo de 2001;77(3):247-55.
- Chacko JT, Subramaniam K. Enzymatic degradation of azo dyes-a review. *International Journal of Environmental Sciences*. 2011;1(6):1250.
- Chung KT, Cerniglia CE. Mutagenicity of azo dyes: structure-activity relationships. *Mutat Res*. septiembre de 1992;277(3):201-20.
- Ratna, Padhi BS. Pollution due to synthetic dyes toxicity & carcinogenicity studies and remediation. *Int J Environ Sci*. 1 de enero de 2012; 3:940-55.
- Suteu D, Zaharia C, Măluțan T. Biosorbents based on lignin used in biosorption processes from wastewater treatment. A review. En: *Lignin: Properties and Applications in Biotechnology and Bioenergy*. 2012. p. 278-305.
- Welham A. The theory of dyeing (and the secret of life). *Journal of the Society of Dyers and Colourists*. 2000; 116:140-3.
- Ghoreishi SM, Haghighi R. Chemical catalytic reaction and biological oxidation for treatment of non-biodegradable textile effluent. *Chemical Engineering Journal*. 15 de septiembre de 2003;95(1):163-9.
- Crini G. Non-conventional low-cost adsorbents for dye removal: A review. *Bioresource Technology*. 1 de junio de 2006;97(9):1061-85.
- Bajpai P. Generation of Waste in Pulp and Paper Mills. En: *Management of Pulp and Paper Mill Waste* (Internet]. Springer, Cham; 2015 [citado 2 de marzo de 2018]. p. 9-17. Disponible en: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-11788-1_2
- Hodge WW, Morgan PF. Characteristics and Methods for Treatment of Deinking Wastes. *Sewage Works Journal*. 1947;19(5):830-62.
- Nemerow NL, Dasgupta A. Tratamiento de vertidos industriales y peligrosos. Ediciones Díaz de Santos; 1998. 858 p.
- Verma P, Madamwar D. Decolourization of synthetic dyes by a newly isolated strain of *Serratia marcescens*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 1 de agosto de 2003;19(6):615-8.
- Banat IM, Nigam P, Singh D, Marchant R. Microbial decolorization of textile-dyecontaining effluents: A review. *Bioresource Technology*. 1 de diciembre de 1996;58(3):217-27.
- Swamy J, Ramsay JA. The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. *Enzyme and Microbial Technology*. 1 de febrero de 1999;24(3):130-7.
- Giardina P, Faraco V, Pezzella C, Piscitelli A, Vanhulle S, Sannia G. Laccases: a never-ending story. *Cell Mol Life Sci*. febrero de 2010;67(3):369-85.
- Edens WA, Goins TQ, Dooley D, Henson JM. Purification and characterization of a secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. *Appl Environ Microbiol*. julio de 1999;65(7):3071-4.
- Shin KS, Lee YJ. Purification and characterization of a new member of the laccase family from the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*. *Arch Biochem Biophys*. 1 de diciembre de 2000;384(1):109-15.
- Ferraroni M, Myasoedova NM, Schmatchenko V, Leontievsky AA, Golovleva LA, Scozzafava A, et al. Crystal structure of a blue laccase from *Lentinus tigrinus*: evidences for intermediates in the molecular oxygen reductive splitting by multicopper oxidases. *BMC Struct Biol*. 26 de septiembre de 2007;7:60.
- Claus H. Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Arch Microbiol*. marzo de 2003;179(3):145-50.
- Baldrian P. Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiol Rev*. marzo de 2006;30(2):215-42.
- Chaurasia PK, Bharati SL, Singh SK. Comparative Studies on the Blue and Yellow Laccases. *Research in Plant Sciences, Research in Plant Sciences*. 2 de septiembre de 2015;1(2):32-7.
- Sheikhi F, Roayaei Ardakani M, Enayatizamir N, Rodriguez-

- Couto S. The Determination of Assay for Laccase of *Bacillus subtilis* WPI with Two Classes of Chemical Compounds as Substrates. *Indian J Microbiol.* diciembre de 2012;52(4):701-7.
23. Saparrat MC, Margarita-Bucszinsky AM, Alfio-Tournier H, Cabello MN, Arambarri AM. Extracellular ABTS-oxidizing activity of autochthonous fungal strains from Argentina in solid medium. *Rev Iberoam Micol.* junio de 2000;17(2):64-8.
 24. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* diciembre de 1977;74(12):5463-7.
 25. Bar M. Kinetics and physico-chemical properties of white-rot fungal laccases. diciembre de 2001; Disponible en: <http://scholar.ufs.ac.za:8080/xmlui/handle/11660/649>
 26. Guillén F, Muñoz C, Gómez-Toribio V, Martínez A T, Jesús Martínez M. Oxygen Activation during Oxidation of Methoxyhydroquinones by Laccase from *Pleurotus eryngii*. *Appl Environ Microbiol.* enero de 2000;66(1):170-5.
 27. Telke AA, Ghodake GS, Kalyani DC, Dhanve RS, Govindwar SP. Biochemical characteristics of a textile dye degrading extracellular laccase from a *Bacillus* sp. *ADR. Bioresour Technol.* enero de 2011;102(2):1752-6.
 28. Scherer M, Fischer R. Purification and characterization of laccase II of *Aspergillus nidulans*. *Arch Microbiol.* agosto de 1998;170(2):78-84.
 29. Miller R, Kuglin J, Gallagher S, Flurkey W h. A spectrophotometric assay for laccase using o-tolidine. *Journal of Food Biochemistry.* 1 de junio de 1997;21(1):445-59.
 30. Jiménez G, Catherine R. Cinética de degradación de colorantes textiles de diferentes clases químicas por hongos y bacterias inmovilizados sobre fibra de agave tequilana Webber var azul. 7 de mayo de 2014; Disponible en: <http://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8222>
 31. Nidadavolu SVSSSLHB, Gudikandula K, Pabba SK, Maringanti SC. Decolorization of triphenyl methane dyes by *Fomitopsis feei*. *Natural Science.* 14 de junio de 2013;05(06):30.
 32. Verma A, Shirkot P. Purification and Characterization of Thermostable Laccase from Thermophilic *Geobacillus thermocatenulatus* MS5 and its applications in removal of Textile Dyes. 2014.
 33. Durão P, Chen Z, Fernandes AT, Hildebrandt P, Murgida DH, Todorovic S, et al. Copper incorporation into recombinant CotA laccase from *Bacillus subtilis*: characterization of fully copper loaded enzymes. *J Biol Inorg Chem.* febrero de 2008;13(2):183-93.
 34. Moreno Sandoval N, Velandia O, Alexandra X. Evaluación de inductores metálicos y co-sustratos para la remoción de negro reactivo 5 empleando *pleurotus ostreatus* inmovilizado en fique [Internet]. 2014. Disponible en: <http://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8229>
 35. Zhou W, Zimmermann W. Decolorization of industrial effluents containing reactive dyes by actinomycetes. *FEMS Microbiol Lett.* 1 de marzo de 1993;107(2-3):157-61.

Correspondencia: Fiorela Virginia Salazar Torreblanca

Dirección: Av. Miraflores S/N, Laboratorio de Bioquímica, Facultad de Ciencias, Ciudad Universitaria Sede Los Granados UNJBG, Tacna – Perú.

Correo electrónico: fsalazar.torreblanca@gmail.com