

Estudio comparativo de la adsorción de azul de toluidina y cristal violeta por la biomasa de dos especies del género *trichoderma* y carbón activado

Rosalba Argumedo-Delira^{a*}, Alejandro Alarcón^b, Ronald Ferrera-Cerrato^b, Ma. Remedios Mendoza-López^a, Oscar García-Barrada^a y Jesús Samuel Cruz-Sánchez^a.

^aUnidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica (SARA), Universidad Veracruzana. Luis Castelazo Ayala s/n Col. Industrial Animas 91190, Xalapa, Veracruz, México.

^bÁrea de Microbiología. Postgrado de Edafología. Colegio de Postgraduados. Carretera México-Texcoco Km 36.5, Montecillo 56230, Estado de México, México.

*E mail de autor responsable: rargumedo@uv.mx, rosasusana13@hotmail.com

Recibido 06-septiembre-2013, Aceptado 18-octubre-2013

Resumen

El Cristal Violeta (CV) y el Azul de Toluidina (AT) han sido encontrados en ecosistemas terrestres y acuáticos debido a su inapropiada disposición. Para disminuir la contaminación que provocan dichos colorantes al medio ambiente se han buscado alternativas biológicas, dentro de las cuales se encuentra el uso de la biomasa fúngica como agente adsorbente. Considerando lo anterior el presente trabajo determinó la biosorción de la biomasa de dos especies del género *Trichoderma* frente a CV y AT, y la comparó con la adsorción que presenta el carbón activado ante estos dos colorantes. Los resultados indicaron que el promedio de biosorción de CV por la biomasa de *T. viride* (96%) y *T. virens* (94%) no fueron tan altos como la del carbón activado (99%). En contraste, el promedio de adsorción para AT fue mucho menor para la biomasa de *T. viride* (83%), *T. virens* (84%) y carbón activado (93%) que el que tuvieron ante CV. Los datos experimentales tienen una buena correlación con los modelos de Freundlich, Langmuir y el modelo cinético de pseudo segundo orden. Encontrando una q_{max} de 10.39 mg g⁻¹ para *T. viride* en el caso de CV y de 21.69 mg g⁻¹ para *T. virens* ante AT.

Palabras clave: Colorante, *Trichoderma*, biosorción, biomasa, micelio

Keywords: Dye, *Trichoderma*, biosorption, biomass, mycelium

1. Introducción

Los colorantes son sustancias orgánicas que sirven para dar color a diversos productos comerciales (tales como lana, seda, algodón, lino, rayón, nylon, papel, cosméticos, alimentos y plásticos) de un gran número de industrias y además son compuestos complejos con varios anillos aromáticos de carácter recalcitrante [1,2]. El Cristal Violeta (cloruro de N,N,N',N',N",N"-hexametil-p-roanilina) es ampliamente utilizado como un agente dermatológico, agente de tinción, medicamento veterinario (contra hongos y parásitos) y en la industria textil-papelera [3]. Mientras que el Azul de Toluidina (Sal disódica del ácido-2,2'-(9,10-dihidro-4,8-dihidroxi-9,10-dioxo-1,5-antracenedil) diimino)Bis[5-metil bencensulfónico]) ha sido usado como bactericida-fungicida, en la industria textil y como indicador en varias reacciones químicas y bioquímicas [4]. Ambos colorantes contribuyen a la contaminación de los hábitats acuáticos debido a su inapropiada disposición [5]. El CV ha sido encontrado en el suelo y en sistemas acuáticos, se supone que es el responsable de la promoción del crecimiento de tumores en peces por lo que ha sido reportado como uno de los colorantes más tóxicos para la microbiota acuática, con una media de sobrevivencia alrededor del 21% a una concentración de 5.0 mg L⁻¹ [5,6]. También se ha encontrado que ambos colorantes son cancerígenos y poseen efecto mutagénico [7-9]. Para disminuir la contaminación que provocan los colorantes se han buscado alternativas biológicas, dentro de las cuales se encuentra el uso de hongos filamentosos,

y entre los más utilizados en sistemas *in vitro* están *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Rhizopus arrhizus*, *Penicillium restrictum* y *Cunninghamella elegans* [10-14]. Cabe mencionar que los hongos filamentosos emplean la biosorción, biodegradación y bioacumulación para la decoloración de los colorantes [15]. El proceso de biosorción consiste en la captación pasiva del colorante en su biomasa (viva o muerta), basado en la propiedad que posee la biomasa para enlazar y acumular diferentes tipos de colorantes, este proceso ha ganado una atención considerable en las últimas décadas como un método alternativo y menos costoso para eliminar colorantes de efluentes textiles, debido a que los actuales procesos de adsorción resultan ser costosos y presentar problemas de regeneración [16,17]. Considerando lo anterior el presente trabajo determinó la capacidad de biosorción de dos especies del género *Trichoderma* (hongos ampliamente estudiados para el control biológico) frente a CV y AT, y comparó su biosorción con la adsorción que presenta el carbón activado frente a estos dos colorantes. La importancia de realizar este estudio radica en generar información adicional a la ya reportada, puesto los estudios de biosorción y degradación de colorantes empleando especies del género *Trichoderma* se enfocan principalmente a las especies *T. harzianum* y *T. sp.*, dentro de estos estudios se encuentra la remoción de rodamina 6G, azul de tripano y erio glucina por el micelio de *T. harzianum* y la decoloración de rodamina 6G, azul de tripano y erio glucina por la enzima lacasa proveniente de *T. harzianum* WL1, además de la

biosorción de naranja G por la biomasa de *Trichoderma* sp. [18-22].

2. Parte experimental

2.1. Microorganismos

Los hongos *T. virens* y *T. viride* forman parte de la colección microbiana del Laboratorio de Microbiología de Suelos del Colegio de Postgraduados, ambos fueron aislados de suelo de la rizosfera de mezquite (*Prosopis* sp.) en el estado de Jalisco, México [23].

2.2. Biosorción de CV y AT por la biomasa seca de *T. virens* y *T. viride*

Las dos cepas de *Trichoderma* se reactivaron en cajas de Petri con agar papa dextrosa (PDA, Merck®) a 28 °C por 5 días. Posteriormente, se preparó una suspensión de esporas a partir de varios lavados con agua destilada estéril. Los fragmentos de micelio se removieron de la suspensión por filtración a través de fibra de vidrio estéril. La suspensión de esporas se ajustó a una concentración aproximada de 10^6 esporas mL⁻¹. A matraces Erlenmeyer de 1000 mL de capacidad, se les adicionaron 500 mL del medio mineral estéril (g L⁻¹) 0.1 CaCl₂; 0.2 KCl; 0.5 KH₂PO₄; 0.5 (NH₄)₂SO₄; 0.2 MgSO₄·7H₂O; 0.05 CuSO₄; 0.05 ZnSO₄; 0.43 MnSO₄; 0.05 (NH₄)₆Mo₇O₂₄·H₂O; 6 glucosa y pH 4.3. Luego, se agregaron 10 mL de la suspensión de esporas (10^6 esporas mL⁻¹) de cada cepa de *Trichoderma* al medio de cultivo correspondiente. Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente y se oxigenaron con una bomba de oxígeno por seis días. Al término de la incubación, el micelio fúngico se separó del medio de cultivo mediante filtración al vacío, luego se secó a 70 ± 2 °C por 96 h para determinar su peso seco y después el micelio fúngico se molió en un mortero. Los experimentos de adsorción se llevaron a cabo por la agitación de 100 mg del respectivo adsorbente (carbón activado, biomasa seca de *T. virens* y *T. viride*) con 1 mL de CV y AT a las siguientes concentraciones: 0, 15, 30, 45, 60, 75 y 90 mg L⁻¹ respectivamente, a 25°C, pH=6 y 150 rpm en un agitador para microtubos con termostatación (TS-100, bioSan®). Debido a que los colorantes son sustancias orgánicas que presentan generalmente en su estructura química, al menos un cromóforo, sistemas conjugados y electrones de resonancia; dichas características les permite absorber luz en el espectro visible, por lo cual la espectrofotometría UV-Visible es una de las técnicas utilizada en el estudio de decoloración y adsorción de colorantes [24-29]. Considerando lo anterior, en el presente estudio la concentración de cada colorante se estimó espectrofotométricamente mediante el monitoreo de la absorbancia del CV (586 nm) y AT (625 nm), utilizando un lector multi-modal de microplacas (Synergy 2 SL, Biotek®) y la capacidad de adsorción se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$Q = \frac{V(C_i - C_e)}{M} \quad (1)$$

Donde, Q es la cantidad de colorante adsorbido (mg g⁻¹), V representa el volumen de la solución del colorante

(L), C_i y C_e son la concentración inicial y en equilibrio del colorante (mg L⁻¹), y M es el peso seco de la biomasa fúngica (g).

Por otra parte, considerando que durante la adsorción, se establece un rápido equilibrio entre el colorante adsorbido sobre las células fúngicas muertas (q_e) y el colorante no adsorbido presente en la solución (C_e), y que dicho fenómeno ha sido descrito bien a temperatura constante por los modelos de Freundlich y Langmuir en estudios anteriores [30-33]. En el presente trabajo se estudiará la capacidad de adsorción de los diferentes adsorbentes utilizando los modelos anteriormente mencionados con las siguientes ecuaciones [34,35]:

$$q_e = K_F C_e^{\frac{1}{n}} \quad (2)$$

Modelo Freundlich

$$q_e = \frac{q_{max} K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (3)$$

Modelo Langmuir

Donde q_{max} es la capacidad máxima (mg g⁻¹) y K_L es el coeficiente de afinidad (L mg⁻¹), mientras que q_e (mg g⁻¹) y C_e (mg L⁻¹) representa la capacidad de adsorción y la concentración del colorante en la solución al equilibrio, respectivamente. K_F y n representan los coeficientes de Freundlich (n, adimensional; K_F mg^{1-1/n} g⁻¹ l^{1/n}).

Las cinéticas de adsorción se analizaron con los modelos de pseudo-primer y pseudo-segundo orden. El modelo de pseudo-primer orden en su forma lineal descrito por Lagergren [36]:

$$\log(q_e - q_t) = \log(q_e) - \frac{K_1}{2.303} t \quad (4)$$

Donde q_e es la capacidad de adsorción en el equilibrio (mg g⁻¹), q_t es la cantidad de adsorbato adsorbido por tiempo t (mg g⁻¹) y K₁ es la constante pseudo-primer orden (min⁻¹). Mientras que la forma lineal del modelo cinético pseudo-segundo orden descrito por Ho [37]:

$$\frac{t}{q_t} = \frac{1}{K_2 q_e^2} + \frac{1}{q_e} t \quad (5)$$

Donde K₂ es la constante pseudo - segundo orden (g mg⁻¹ min⁻¹).

3. Resultados y discusión

3.1. Biosorción de CV y AT por la biomasa seca de *T. virens* y *T. viride*

Analizando los datos, se observó que la adsorción de CV y AT por carbón activado es rápida para ambos colorantes (Fig. 1a y 1b) y se mantuvo casi sin cambios en todos los tiempo de evaluación para el caso del CV, lo que indica que llega más rápidamente al equilibrio. En el caso de la biomasa fúngica seca de ambas especies de *Trichoderma* se logra apreciar mayor variabilidad en la

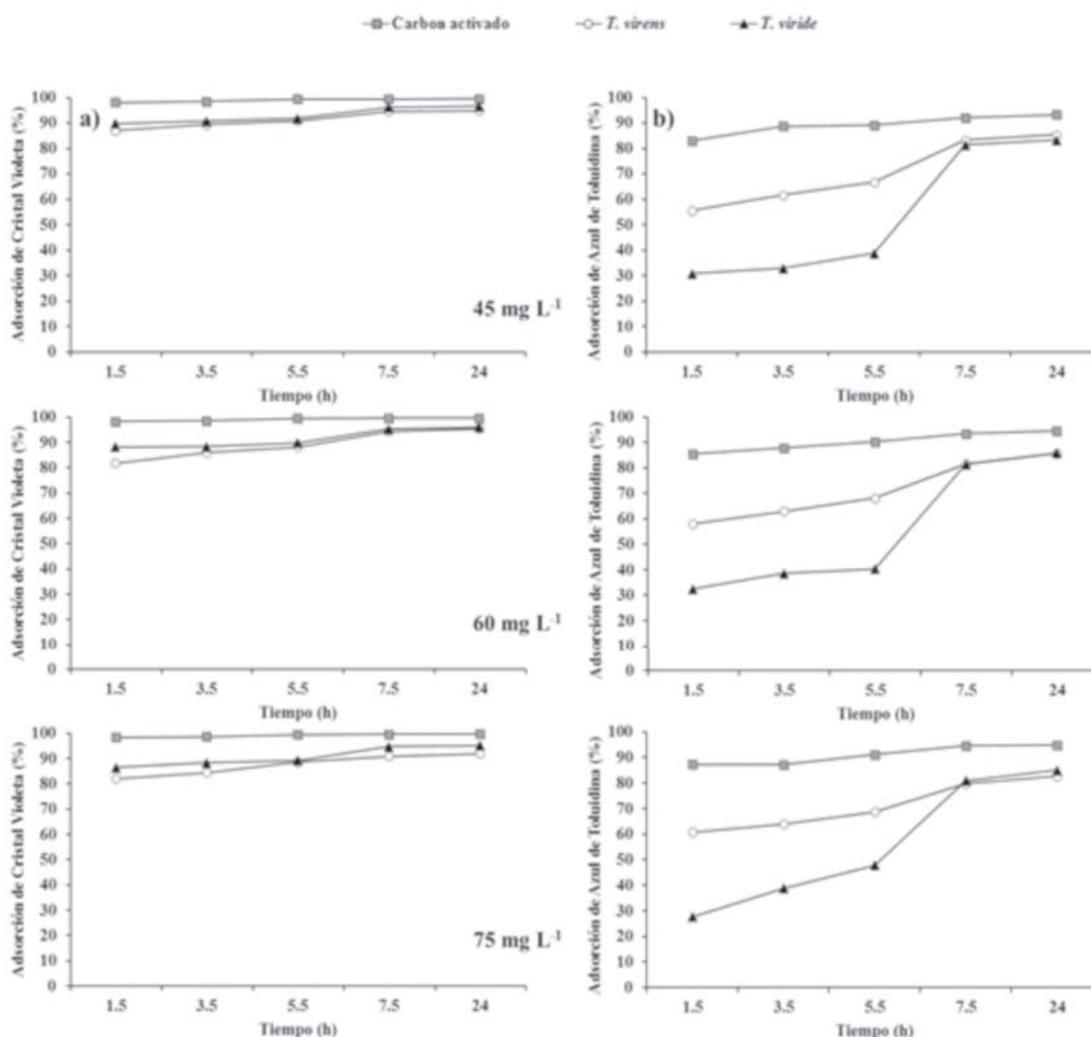
adsorción de CV y AT, y no se observa si se llega a un equilibrio en los tiempos de evaluación probados (**Fig. 1a y 1b**). Adicionalmente el promedio de adsorción de CV por la biomasa seca de *T. viride* (96%) y *T. virens* (94%) no fueron tan altos como la del carbón activado (99%) (**Fig. 1a**). No obstante, el promedio de adsorción para AT fue mucho menor para la biomasa seca de *T. viride* (83%), *T. virens* (84%) y carbón activado (93%) que el que tuvieron ante CV (**Fig. 1b**), pero también el carbón activado tuvo mayor adsorción. La tendencia de biosorción de la biomasa fúngica seca ante los dos colorantes es baja, en los primeros tiempos de evaluación tomando en consideración la adsorción del carbón activado, sin embargo, a las 24 h de evaluación la adsorción aumenta considerablemente.

Para este estudio se utilizaron los modelos de isotermas de Langmuir y Freundlich definidos anteriormente, y se encontró que los datos experimentales para CV y AT bajo las concentraciones empleadas (15-90 mg L⁻¹) se describen mejor mediante la isoterma de Freundlich para los tres adsorbentes (**Fig. 2a y 2b**). La capacidad máxima de adsorción definida como q_{max} (**Tabla 1**) muestran que *Trichoderma viride*

presenta una mayor capacidad de adsorción para CV que *Trichoderma virens* y el carbón activado, mientras tanto para AT la especie fúngica *Trichoderma virens* es la que muestra mayor capacidad de adsorción. También se puede observar que la capacidad máxima de adsorción para CV es muy similar para las dos especies de *Trichoderma*.

Por otra parte, los datos experimentales se ajustaron mejor al modelo cinético de pseudo segundo orden (**Fig. 3a y 3b**) que al modelo de pseudo primer orden. El modelo de pseudo segundo orden puede explicar la cinética de adsorción de los dos colorantes en el carbón activado y la biomasa fúngica en los primeros tiempos de evaluación, ya que al incluir los datos de las evaluaciones a las 24 y 48 h se pierde la correlación de este modelo.

Los valores de las constantes cinéticas que se muestran en la Tabla 2, indican que es mayor la velocidad con la que se adsorbe el CV en la biomasa de *T. virens* que en los otros dos adsorbentes, mientras que para AT la velocidad de adsorción es mayor para la biomasa de *T. viride*.



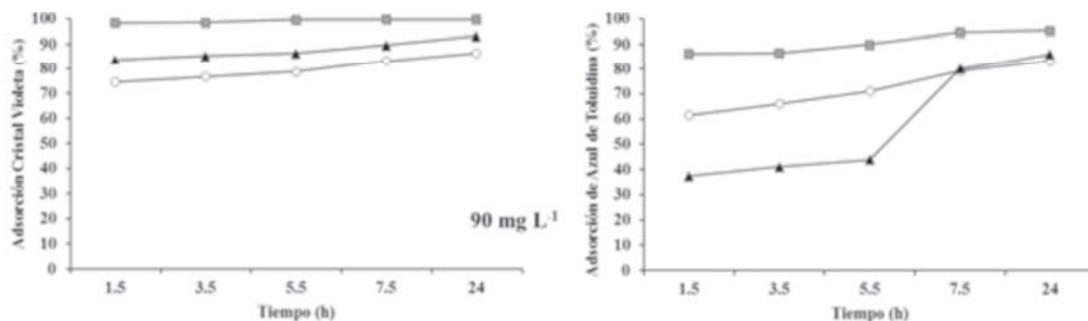


Figura 1. Adsorción de dos colorantes por carbón activado y la biomasa seca de *T. virens* y *T. viride* a 25°C y pH=6, a) Cristal Violeta y b) Azul de Toluidina.

Cabe mencionar que los estudios sobre la capacidad de adsorción que presentan los hongos del género *Trichoderma* ante colorantes como CV y AT no han sido reportados. Sin embargo, en el caso de las especies de *Trichoderma* se ha reportado que la biomasa fúngica viva y muerta de *T. harzanium* presentan una capacidad

máxima de adsorción para el colorante azul de tripano de 4.11 mg g⁻¹ y 4.13 mg g⁻¹ respectivamente [19]. Mientras que la biomasa fresca de *T. harzanium* tuvo una capacidad máxima de adsorción de 3.09 mg g⁻¹ para el colorante erioglaucina [20].

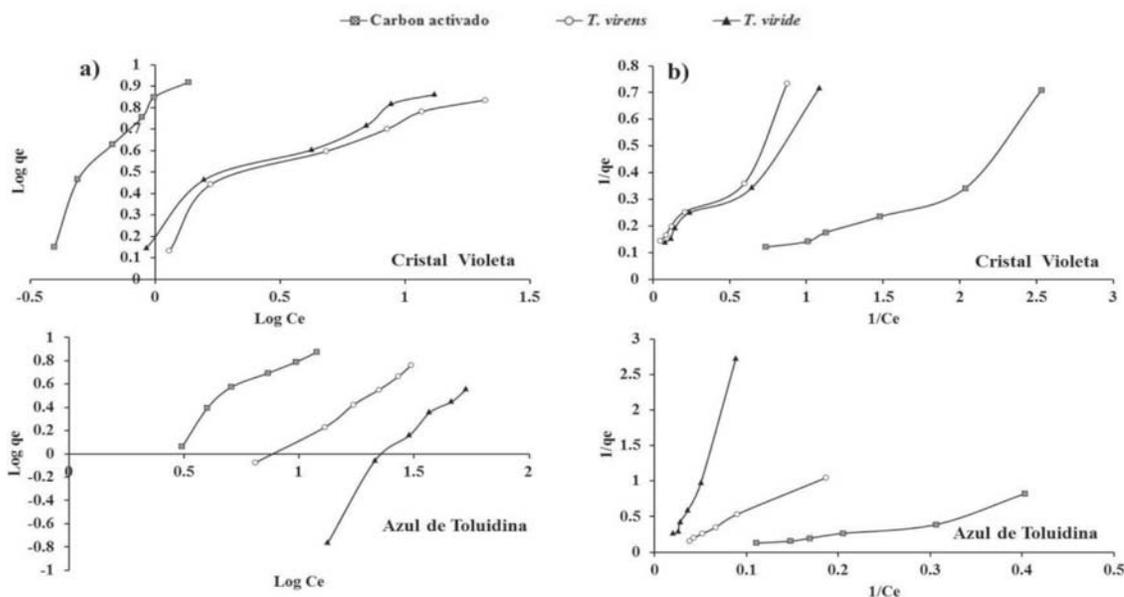


Figura 2. Isotermas de adsorción para Cristal Violeta y Azul de Toluidina por carbón activado y la biomasa seca de *T. virens* y *T. viride* a 25°C y pH=6, a) Freundlich y b) Langmuir.

Tabla 1. Constantes de las Isotermas de Freundlich y Langmuir para carbón activado y la biomasa seca de *T. virens* y *T. viride* ante Cristal Violeta y Azul de Toluidina (Método de mínimos cuadrados).

Colorante	Adsorbente	Freundlich			Langmuir		
		KF	n	R ²	qmax	KL	R ²
CV	Carbón activado	6.479	0.730	0.929	6.053	0.542	0.878
	<i>T. virens</i>	2.997	2.319	0.912	9.293	0.171	0.912
	<i>T. viride</i>	3.126	1.699	0.945	10.395	0.181	0.948
AT	Carbón activado	0.407	0.713	0.960	5.518	0.080	0.919
	<i>T. virens</i>	0.125	0.855	0.988	21.691	0.093	0.995
	<i>T. viride</i>	0.104	0.658	0.984	1.578	0.017	0.975

Tool, Norway: DNV, 1999.

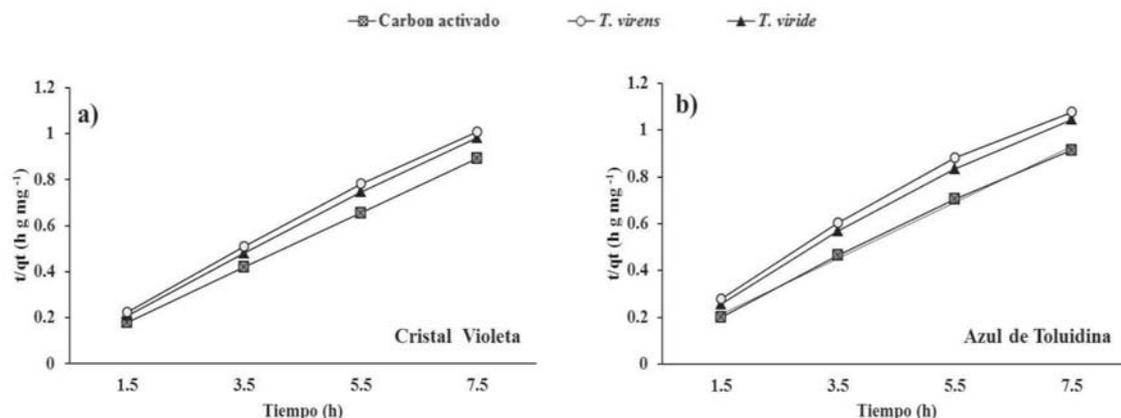


Figura 3. Modelo cinético de pseudo segundo orden para carbón activado y la biomasa seca de *T. virens* y *T. viride* a 25°C y pH=6, a) Cristal Violeta y b) Azul de toluidina.

Por otra parte, con respecto al colorante CV se ha reportado que el hongo basidiomiceto *Ceriporia lacerata* P2 presenta una adsorción máxima de 239.25 mg g⁻¹ la cual es bastante alta en comparación con las obtenidas para *T. viride* (10.39 mg g⁻¹) y *T. virens* (9.29 mg g⁻¹) en el presente trabajo, pero a la vez la adsorción máxima de las dos especies de *Trichoderma* es 2.50 y 2.24 mayor que la que se reporta para la biomasa de la hoja de *Calotropis procera* (4.14 mg g⁻¹) ante CV [38,39].

Tabla 2. Constantes del modelo cinético de pseudo segundo orden para carbón activado y la biomasa seca de *T. virens* y *T. viride* a 25°C y pH=6, ante CV y AT.

Colorante	Adsorbente	qe	K2	R ²
CV	Carbón activado	4.217	1.027	1.000
	<i>T. virens</i>	3.815	2.935	0.997
	<i>T. viride</i>	3.871	1.659	0.999
AT	Carbón activado	4.199	2.323	0.997
	<i>T. virens</i>	3.732	1.785	0.998
	<i>T. viride</i>	4.379	3.878	0.993

En el caso del colorante AT los reportes de adsorción por hongos filamentosos son aún más escasos que con CV, no obstante se ha reportado que la adsorción máxima para la zeolita clinoptilolita es de 64.22 mg g⁻¹ (2.1X10⁻⁴ mol g⁻¹) a un pH de 11, la cual es mayor a la encontrada para las dos especies de *Trichoderma* bajo las condiciones experimentales del presente estudio, pero la adsorción máxima de *T. virens* (21.69 mg g⁻¹) se encuentra más cercana a la reportada para el yeso gypsum que es de 28 mg g⁻¹ [29,40].

4. Conclusiones

Aunque es evidente la falta de más investigaciones para el género de hongos *Trichoderma* con este tipo de enfoques, este estudio muestra que *T. viride* y *T. virens* presentan una alta remoción del colorante CV después

de las 24 h de evaluación. Evidenciando el posible potencial que pueden tener las especies del género *Trichoderma* para el tratamiento de aguas contaminadas con este colorante.

5. Agradecimientos

Se agradece al CONACyT por el apoyo otorgado durante la realización del presente trabajo. Además los autores agradecen las observaciones y sugerencias al manuscrito por parte de los revisores.

6. Referencias

- Zollinger, H. *Color Chemistry: Syntheses, Properties, and Applications of Organic Dyes and Pigments*, 3ra. ed.; Wiley-VCH: Zürich, Germany, 2003; pp 13-14.
- Mishra, G.; Tripathi, M. *Colourage*. **1993**, 40, 35-38.
- Azmi, W.; Sani, R. K.; Banerjee, U.C. *Enzyme Microb. Tech.* **1998**, 22, 185-191.
- Wainwright, M. *Biotech. Histochem.* **2003**, 78,147-155.
- Michaels, G. B.; Lewis, D. L. *Environ. Toxicol. Chem.* **1985**, 4, 45-50.
- Black, J. J.; Holmes, M.; Dymerski, P. P.; Zapisek, W.F. Fish tumor pathology and aromatic hydrocarbon pollution in a great lakes estuary. In *Hydrocarbons and halogenated hydrocarbons in the aquatic environment*; Afghan, B. K.; Mackay, D., Eds.; Plenum Press: New York, 1980; pp 559-565.
- Au, W.; Pathak, S.; Collie, C. J.; Hsu, T. C. *Mutat. Res.* **1978**, 58, 269-276.
- Dunipace, A. J.; Beaven, R.; Noblitt, T.; Li, Y.; Zunt, S.; Stookey, G. *Mutat. Res.* **1992**, 279, 255-259.
- Chi, Z.; Liu, R.; Sun, Y.; Wang, M.; Zhang, P.; Gao, C. J. *Hazard. Mater.* **2010**, 175, 274-278.
- Zhao, X.; Hardin, I. R. *Dyes Pigments.* **2007**, 73, 322-325.
- Pazarlioglu, N. K.; Urek, R. O.; Ergun, F. *Process Biochem.* **2005**, 40, 1923-1929.
- Aksu, Z.; Cagatay, S. S. *Sep. Purif. Technol.* **2006**, 48, 24-35.

13. Cha, C.; Doerge, D. R.; Cerniglia, C. E. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, 67, 4358-4360.
14. Iscen, C.F.; Kiran, I.; Ilhan, S. J. *Hazard. Mater.* **2007**, 143, 335-340.
15. Fu, Y.; Viraraghavan, T. *Bioresour. Technol.* **2001**, 79, 251-262.
16. Binupriya, A. R.; Sathishkumar, M.; Swaminathan, K.; Ku, C. S.; Yun, S.E. *Bioresour. Technol.* **2008**, 99, 1080-1088.
17. Kaushik, P.; Malik, A. *Environ. Int.* **2009**, 35, 127-141.
18. Sadhasivam, S.; Savitha, S.; Swaminathan, K. J. *Environ. Manage.* **2007**, 85, 155-161.
19. Sadhasivam, S.; Saritha, E.; Savitha, S.; Swaminathan, K. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2005**, 75, 1046-1053.
20. Sadhasivam, S.; Savitha, S.; Swaminathan, K. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, 23, 1075-1081.
21. Sadhasivam, S.; Savitha, S.; Swaminathan, K. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, 25, 1733-1741.
22. Sivasamy, A.; Sundarabal, N. *Curr. Microbiol.* **2011**, 62, 351-357.
23. Ibarra-Medina, V. A.; Ferrera-Cerrato, R.; Alarcón, A.; Lara-Hernández, M. E.; Valdés-Carrasco, J. M. *Rev. Mex. Mic.* **2010**, 31, 53-63.
24. Allen, R. L. M. *Colour Chemistry*, Thomas Nelson and Sons Ltd: London, 1971; pp 11-13.
25. Abrahart, E. N. *Dyes and their Intermediates*, Chemical Publishing: New York, 1977; pp 1-12.
26. Ramsay, J. A.; Nguyen, T. *Biotechnol. Lett.* **2002**, 24, 1757-1761.
27. Fu, Y.; Viraraghavan, T. *Bioresour. Technol.* **2002**, 82, 139-145.
28. Kumar, K. V.; Ramamurthi, V.; Sivanesan, S. *Dyes Pigments.* **2006**, 69, 102-107.
29. Alpat, S. K.; Özbayrak, Ö.; Alpat, Ş.; Akçay, H. J. *Hazard. Mater.* **2008**, 151, 213-220.
30. Sağ, Y., Kutsal, T. *Chem. Eng. J.* **1995**, 181-188.
31. Gallager, K. A.; Healy, M. G.; Allen, S. J. Biosorption of synthetic dye and metal ions from aqueous effluents using fungal biomass. En *Global Environmental Biotechnology*; Wise, D. L, Eds; Elsevier: UK, 1997; pp 27-50.
32. Aksu, Z.; Karabayır, G. *Bioresour. Technol.* **2008**, 99, 7730-7741.
33. Aksu, Z. *Process Biochem.* **2005**, 40, 997-1026.
34. H. M. F. J. *Phys. Chem.* **1906**, 57, 385-470.
35. Langmuir, I. *J. Am. Chem. Soc.* **1916**, 38, 2221-2295.
36. Lagergren, S. *Kung Sven Vetén Hand.* **1898**, 24, 1-39.
37. Ho, Y. S.; McKay, G. *Process Biochem.* **1999**, 34, 451-465.
38. Lin, Y.; He, X.; Han, G.; Tian, Q.; Hu, W. J. *Environ. Sci.* **2011**, 23, 2055-2062.
39. Ali, H.; Muhammad, S. K. *J. Environ. Sci. Technol.* **2008**, 1, 143-150.
40. Rauf, M. A.; Qadri, S. M.; Ashraf, S.; Al-Mansoori, K. M. *Chem. Eng. J.* **2009**, 150, 90-95.