

Biorremediación de residuos peligrosos generados en laboratorios de docencia universitaria

Bioremediation of hazardous waste generated in university teaching laboratories

Biorremediação de resíduos perigosos gerados em laboratórios de docência universitária

Cristian Ramirez*; Juan Ariza; John Castellanos; Judith Camacho

Resumen

Se realizó un diagnóstico de los residuos generados que se consideran peligrosos por tener características corrosivas, reactivas, explosivas, tóxicas, inflamables, infecciosas y riesgo biológico (CRETIB). Los microorganismos aislados fueron: *Staphylococcus sciuri*, *Burkholderia cepacea*, *Aeromonas hydrophila*, usados en consorcio microbiano, *Corynebacterium aquaticum*; Y los hongos *Aspergillus niger*, usado en inmovilización fúngica y *Penicillium spp.* seleccionados por su mejor potencial de degradación. La inmovilización fúngica degradó 35,06% de los desechos básicos en 192 horas, el consorcio bacteriano se degrada 72,78%, el cristal violeta, 32,78% los residuos de colorante y 100% los residuos de hipoclorito de sodio a las 6 horas, el microorganismo *Aeromonas hydrophila* degradó 58,42% de cristal violeta en 192 horas. La microencapsulación del consorcio bacteriano degradó 45,52% los residuos básicos y 100% los residuos de hipoclorito de sodio en 192 horas. El ANOVA (95%) estableció que no existen diferencias significativas entre tratamientos y estos pueden biorremediar los residuos peligrosos.

Palabras clave: biorremediación; consorcio; Inmovilización; microencapsulación; residuos peligrosos.

Abstract

A diagnosis of the generated waste that is considered dangerous because it has corrosive, reactive, explosive, toxic, flammable, infectious and biological risk (CRETIB) characteristics was made. The microorganisms isolated were: *Staphylococcus sciuri*, *Burkholderia cepacea*, *Aeromonas hydrophila*, used in microbial consortium, *Corynebacterium aquaticum*; And the fungi *Aspergillus niger*, used in fungal immobilization and *Penicillium spp.* selected for their best degradation potential. The fungal immobilization degraded 35.06% of the basic waste in 192 hours, the bacterial consortium degrades 72.78%, the crystal violet, 32.78% the dye residues and 100% the sodium hypochlorite residues at 6 hours, the microorganism *Aeromonas hydrophila* 58.22% violet crystal degraded in 192 hours. The microencapsulation of the bacterial consortium degraded 45.52% of the basic waste and 100% of the sodium hypochlorite waste in 192 hours. The ANOVA (95%) established that there are no significant differences between treatments and these can bioremediate hazardous waste.

Keywords: bioremediation; consortium; immobilization; microencapsulation; hazardous waste.

Resumo

Um diagnóstico dos resíduos gerados que consideram os focos de pigmentação por corrosivos, reativos, explosivos, tóxicos, inflamáveis, infecciosos e risco biológico (CRETIB) foi feito. Os microrganismos isolados foram: *Staphylococcus sciuri*, *Burkholderia cepacea*, *Aeromonas hydrophila*, utilizados no consórcio microbiano, *Corynebacterium aquaticum*; E os fungos *Aspergillus niger*, usados na imobilização de fungos e *Penicillium spp.* selecionados para seu melhor potencial de degradação. A imobilização fúngica degradou 35,06% dos resíduos básicos em 192 horas, o consórcio bacteriano degrada 72,78%, o cristal violeta, 32,78% os resíduos de corantes e 100% os resíduos de hipoclorito de sódio às 6 horas, o microrganismo *Aeromonas hydrophila* 58,22% de cristal violeta degradado em 192 horas. A microencapsulação do consórcio bacteriano degradou 45,52% do resíduo básico e 100% do resíduo de hipoclorito de sódio em 192 horas. A ANOVA (95%) estabeleceu que não há diferenças significativas entre os tratamentos e estes podem biorremediar os resíduos perigosos.

Palavras-chave: biorremediação; consorcio; imobilização; microencapsulação; resíduos perigosos.

Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Bogotá, Colombia.

*Autor para correspondencia: cframirez@unicolmayor.edu.co (C. Ramirez)

Recibido: 12 de febrero del 2019 Aceptado: 27 de mayo del 2019

Introducción

El crecimiento de técnicas donde se utilizan colorantes como en laboratorios de práctica universitarios, industrias, entidades de la salud, colegios e institutos, grupos de investigación, en donde se manejan diversas sustancias químicas, colorantes, reactivos de carácter básico y ácido, solventes y residuos de hipoclorito de sodio, los cuales presentan características peligrosas y se clasifican como corrosivos, reactivos, explosivos, tóxicos e inflamables. Los residuos mencionados producen un impacto negativo sobre el medio ambiente y salud de las personas encargadas de su manejo y disposición, debido a su peligrosidad. Sumándose a la problemática de su vertimiento en aguas, contaminación de suelo y de lodos, o vertidos directos o indirectos a las fuentes hídricas afectando estos ecosistemas y causando un daño a la fauna y flora, que en algunos casos puede ser irreversible. Estos vertimientos intervienen en los procesos de la vida acuática impidiendo el libre paso de la luz, causando la reducción del proceso fotosintético y como consecuencia la menor disponibilidad de oxígeno y alterando características físicas y químicas del agua.

Los tratamientos convencionales para tratamiento de residuos peligrosos se basan en la aplicación de procesos de tipo mecánico, físico y químico, todos estos procesos físicos, químicos y térmicos tienen una ventaja y es que pueden realizarse a periodos cortos. Aunque tienen la desventaja de ser procesos que implican un elevado costo económico y ser poco amigables con el medio ambiente y en algunas ocasiones poco eficiente. Por esta razón, se propone utilizar métodos de biorremediación menos costosos utilizando microorganismos nativos presentes en este tipo de residuos, aprovechando sus capacidades metabólicas para degradarlos y así proponer esta tecnología limpia menos costosa para tratarlos y poder utilizarlos en el tratamiento de residuos de similares características generados y así aportar en su buena disposición, utilizando un método amigable con el medio ambiente.

Se ha evaluado la decoloración de colorantes como rojo de carmín y tintes índigos comparando los tratamientos convencionales como la oxidación química, con la utilización de microorganismos como *Pseudomonas* spp. la cual alcanza una degradación del 69% y con hongos como *Trametes versicolor* y *Aspergillus*

alliaceus los cuales alcanzan una degradación del 80 al 100% (Quintero, 2009), también se han enfocado en el tratamiento de aguas residuales a través de consorcios bacterianos de hasta 4 tipos de bacterias en inóculos al 4% V/V logrando la degradación del 91% de cristal violeta (Cheriaa, 2012), es importante resaltar que en la biodegradación de algunos colorantes se crean sustancias más tóxicas como sucede en los casos de la degradación de los colorantes de tipo azo, donde las aminas producidas volvían el ambiente más tóxico (Salazar-Huerta et al., 2018), por lo cual el uso de microorganismos para la biorremediación puede disminuir esta contaminación; También se han desarrollado investigaciones donde se alcanza una decoloración del 98,6% del colorante cristal violeta por medio de la bacteria *Burkholderia vietnamensis* C09V inmovilizadas en perlas de PVA-alginato-caolín (Cheng, 2012). Por lo cual se plantea como objetivo, realizar la biorremediación de los residuos peligrosos generados en los laboratorios de docencia universitaria.

Materiales y métodos

El proyecto se realizó por triplicado y se mantuvieron condiciones ambientales sin alteraciones de temperatura y/o pH, se desarrolló en tres fases de investigación:

Fase 1: realización de una observación directa de los diferentes tipos de residuos generados en los laboratorios y se procede a él diligenciamiento de una matriz para establecer los residuos generados y su cantidad. A los residuos generados se les toma muestras según Normas (IDEAM, 2016) de cada uno de los contenedores. La toma de muestra se efectúa en los laboratorios 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, donde se da clase de micología, hematología clínica, bioquímica, química, industrial, aguas, toxicología y microbiología. La toma de muestra se realizó el 05 de abril del año 2018, el cual se realizó por triplicado. Se mantuvieron a 4 °C hasta su análisis.

Se realizó la determinación de las características de corrosividad, midiendo pH, toxicidad, explosividad, toxicidad y la característica de inflamable. Las características de determinación según lo exigido por los protocolos emitidos por el IDEAM (2016) y teniendo en cuenta la información dada por las fichas de seguridad de

las posibles sustancias presentes en estos residuos.

Fase 2. Aislamiento e identificación de microorganismos presentes en los residuos peligrosos generados en los laboratorios de práctica universitarios, la realización del inóculo se muestra en la tabla 1.

Tabla 1
Realización del inóculo (Ortiz, 2006)

Inóculo	Medio
Controles sin células (sin inóculo)	MSM + Contaminante (residuos básicos, residuos de colorantes, Cristal violeta (50mg/l), Residuos
Tratamientos con células (inóculo)	ácidos, residuos hipoclorito) con y sin Glucosa.

Se realiza siembra de las bacterias y hongos seleccionados e identificados en un medio que contenga el colorante cristal violeta a una concentración de 50 mg/l, en el caso de las bacterias en medio agar nutritivo, y los hongos en medio agar PDA. Se realizaron pruebas de antagonismo de los microorganismos seleccionados.

Se inocularon los microorganismos, utilizando el método de Kirby/Bauer, por triplicado. Se incubaron a las mismas condiciones previamente mencionadas para bacterias y hongos. Se sembró un microorganismo control suministrada por el cepario del laboratorio central: *Pseudomonas aureginosa*. Se procedió a medir los halos de decoloración para seleccionar los microorganismos que tienen un valor mayor a 10 mm o mayor o igual al valor en mm del halo de decoloración que da el microorganismo utilizado como control. Los microorganismos seleccionados se utilizaron para los siguientes procesos.

Fase 3. Biorremediación de los residuos generados utilizando diferentes métodos, se utilizó cada microorganismo aislado en forma individual, se realizó inmovilización de *A. niger*, ensayo de biorremediación de bacterias seleccionadas en consorcio en caldo y microencapsuladas. La ecuación 1 se usó para determinar el porcentaje de degradación, comparando las diferentes absorbancias en diferentes tiempos con la absorbancia obtenida en tiempo 0 (Cheriaa, 2012).

$$(Abs \text{ tiempo } 0 - Abs \text{ tiempo } 1 \div Abs \text{ tiempo } 0) \times 100$$

Ecuación 1. Determinación de porcentaje de degradación.

Se determinó porcentaje de biodegradación en el tiempo para cada tratamiento. Se realizó un ANOVA (95%) para establecer diferencias significativas entre tratamientos.

Resultados y discusión

Las cantidades generadas de residuos se estimaron por litros, en su respectivo orden: residuos de hipoclorito de sodio 302 litros, residuos de colorantes 112 litros, residuos de ácidos 32 litros, residuos de solventes 10 litros y residuos básicos 16 litros.

Los microorganismos aislados fueron *Staphylococcus sciuri*, *Burkholderia cepacea*, *Aeromonas hydrophila*, *Corynebacterium aquaticum*, *Aspergillus niger* y *Penicillium* spp.

Los microorganismos presentaron halos de decoloración entre 3,25 mm y 1,4 mm, el microorganismo que presentó mayor halo de decoloración fue *Aeromonas hydrophila* seguido por *Burkholderia cepacea*, *Staphylococcus sciuri* y por último *Corynebacterium aquaticum* el control *Pseudomonas aureginosa* presentó un halo de decoloración de 2 mm. Seleccionándose el *Staphylococcus sciuri*, la *Burkholderia cepacea* y la *Aeromonas hydrophila* para realizar el consorcio microbiano y el *Aspergillus niger* se usó para la inmovilización.

La inmovilización fúngica degradó 35,06% de residuos básicos en 192 horas. *Aspergillus niger*, fue aislado de estos mismos residuos, se podría establecer que estaba adaptado para este ambiente y sus condiciones, aunque lo que cabe destacar es que el porcentaje de degradación para cristal violeta y residuos de colorantes fue de menos del 10%, pero esto fue debido a la concentración del pH y ya que estos tipos de residuos tienden a tener pH de 3 a 3,5 aproximadamente (pH presentados al final); esto afecta el metabolismo del hongo inhibiendo su desarrollo y su potencial de biodegradación, además de evidenciar que la porosidad del poliuretano no protege al hongo de las condiciones de los residuos peligrosos.

El consorcio bacteriano degradó 72,78%, de cristal violeta, 32,78% de residuos de colorantes, destacando al microorganismo *Aeromonas hydrophila* como células libres, el cual degradó 58,42% de cristal violeta en 192 horas, *A. hydrophila* Puede ser encontrado también en plantas de tratamiento de aguas residuales de la impresión textil donde se ha

demostrado que existen cepas de este microorganismo que pueden degradar colorantes en concentraciones de 50 mg/l de hasta 90% de degradación en un periodo de 10 horas, para esto se aisló e identificó una cepa (SJ4) que fue inoculada 1% (v/v) en 100 ml de MSM con 100 mg/l de colorante cristal violeta donde se tomaron muestras de absorbancia a 620 nm para medir el crecimiento de la bacteria y después de centrifugada a 590 nm para después ser expresada en porcentaje de degradación con la fórmula planteada en este mismo proyecto, se obtuvieron lecturas a las 2,4,6 y 8 horas demostrando un máximo porcentaje de degradación (99%) a un pH de 7, y mostrando un porcentaje de degradación del 9% en un pH de 5 nosotros no modificamos los pHs naturales de los residuos peligrosos de tal manera los potenciales de degradación fueron recreados intentando llegar a condiciones ambientales comunes; Además el consorcio degradó 100% de residuos de hipoclorito de sodio a las 6 horas, el hipoclorito de sodio es un compuesto químico fuertemente oxidante que contiene un compuesto activo en forma de ácido hipocloroso el cual actúa como agente desinfectante, como se puede ver en el trabajo desarrollado por Cote (2006), donde describe la existencia de microorganismos cloro resistentes como *A. hydrophila*, la cual resistió concentraciones de hasta 2 mg/l de hipoclorito de sodio en un tiempo de 10 minutos, demostrándonos de esta manera que esta bacteria se adapta a las condiciones de estos residuos donde en su gran mayoría existe la sustancia de hipoclorito de sodio en concentraciones de 5000 ppm es decir 0,5 mg/l, por lo cual puede ser aislada de estos residuos, tal y como lo demostró este proyecto, además al ser combinada con *S. sciuri* y *B. cepacea* mejora su acción, ya que se combinan metabolismos y se estimula la acción de enzimas para degradar este contaminante.

La microencapsulación del consorcio bacteriano degradó en 45,52% los residuos básicos y en 100% los residuos de hipoclorito de sodio en 192 horas esto es debido principalmente a que el alginato de sodio es un material encapsulante muy poroso, de baja durabilidad química y que en pH bajos (presentados en residuos de colorantes y colorante cristal violeta) puede tener muy poca estabilidad física, debido a que estos pHs reducen el peso molecular del alginato causando su degradación y

produciendo fugas (Reyes-Reyes et al., 2018; Lopretti, 2014), además de que en concentraciones inferiores a 3% puede llegar a tener formas irregulares y que por su porosidad pueden obtenerse concentraciones inferiores de células libres del consorcio, por lo cual las células libres pueden estar siendo liberadas en cantidades ineficientes al medio contaminante (Lopretti, 2014).

El análisis ANOVA con 95% de confianza realizado estableció que no hay diferencias significativas entre tratamientos para el proceso de biorremediación ($F= 1,941$; $P= 0,199$; $GL= 2$) concluyendo que los microorganismos aislados sirven para degradar los residuos generados, siendo mejor el uso del consorcio bacteriano.

Conclusiones

Se pueden desarrollar tratamientos eficaces a través de tratamientos no convencionales como la biorremediación la cual puede degradar residuos peligrosos. El pH ácido que se desarrolla en residuos de colorantes hace más difícil su tratamiento debido a que existen diferentes tipos de colorantes los cuales al ser degradados pueden volver más tóxicos los residuos de colorantes, materiales como el alginato de sodio tienen a ser inestables en pHs ácidos, lo que hace más difícil su degradación; Este proyecto aconseja el uso de células libres de microorganismos que resistan condiciones ácidas como en colorantes y residuos de colorantes, para el desarrollo de la degradación, y también el recubrimiento del alginato de sodio en otro material encapsulante. Los materiales encapsulantes permiten la protección de los microorganismos, volviéndolos más resistentes frente a las condiciones tóxicas del ambiente, pero limitan la degradación de los residuos peligrosos al tamaño del poro que se obtenga en el proceso de la microencapsulación, resaltamos el uso del alginato de sodio al 2% y su estabilidad en pHs neutros y básicos presentados en residuos de hipoclorito y residuos básicos. El ANOVA con 95% de confianza nos indica que no hay diferencia significativa entre tratamientos ensayados ($F= 1,94$; $P= 0,199$; $gl=2$), por lo cual se concluye que las células libres de los microorganismos nativos aislados y usados en consorcio, consorcio microencapsulado e inmovilización

fúngica tienen la capacidad de biorremediar los residuos peligrosos generados en los laboratorios de docencia.

Referencias bibliográficas

- Cheng, Y.; Lin, H.; Chen, Z.; Megharaj, M.; Naidu, R. 2012. Biodegradation of crystal violet using *Burkholderia vietnamiensis* C09V immobilized on PVA-sodium alginate-kaolin gel beads. *Ecotoxicology and environmental safety* 83:108-114.
- Cheriaa, J.; Khairredine, M.; Rouabhia, M.; Bakhrouf, A. 2012. Removal of triphenylmethane dyes by bacterial consortium. *The Scientific World Journal*: 512454.
- Cote, C.R. 2006. Aislamiento, identificación bioquímica y pruebas de cloro resistencia in vitro a cepas nativas de coliformes totales y *E. coli* obtenidas en la red de distribución del acueducto de Bogota. Trabajo final de grado. Pontifica Universidad Javeriana, Bogota.
- IDEAM. 2016. Informe Nacional de Residuos o Desechos Peligrosos en Colombia, 2016. Bogotá, D.C. 128 p.
- Lopretti, M.I.; Olazabal, L. 2014. Microencapsulación de microorganismos *kluyveromyces marxianus* en diferentes sistemas y materiales. evaluación de su actividad biológica en la producción de bioetanol a partir de materiales lignocelulósicos. *Revista Iberoamericana de Polímeros* 15: 55-65.
- Ortiz, M.L. 2006. Principios y aplicaciones de la Biotecnología. Universidad Autónoma del estado de Morelos. México.
- Quintero, L.; Cardona, S. 2009. Tecnologías para la decoloración de tintes índigo e índigo carmín. *Dyna* 77(162): 371-376.
- Reyes-Reyes, M.A.; Puentes-Cala, E.; Casanova-Montes, E.L.; López-Deluche, F.; Panqueva-Alvarez, J.H.; Castillo-Villamizar, G. 2018. Inmovilización de bacterias potencialmente degradadoras de petróleo crudo en matrices orgánicas naturales y sintéticas. *Rev. Int. Contam. Ambie* 34(4): 597-609.
- Salazar-Huerta, M.; Velázquez-García, A.; Juárez-Ramírez, C.; Santoyo-Tepole, F.; Ruíz-Ordaz, N.; Galíndez-Mayer, J. 2018. Evaluación comparativa de la biodegradación del ácido sulfanílico por cultivos puros. V Congreso Internacional de Ingeniería Bioquímica, XVI Congreso Nacional de Ingeniería Bioquímica, VI Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular. México D.F., México.