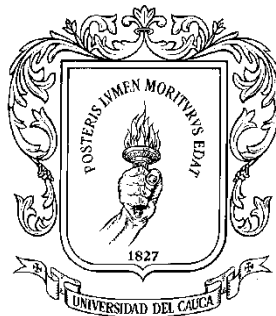


**ANÁLISIS DE LA POTENCIALIDAD DEL HONGO *Anthracophyllum discolor* EN  
LA BIODEGRADACIÓN DE EFLUENTES COLOREADOS.**



**ANA ISABEL VIDAL BENAVIDES**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL  
PROGRAMA DE INGENIERÍA AMBIENTAL  
POPAYÁN  
2009**

**ANÁLISIS DE LA POTENCIALIDAD DEL HONGO *Anthracoxyllum discolor* EN  
LA BIODEGRADACIÓN DE EFLUENTES COLOREADOS.**

**ANA ISABEL VIDAL BENAVIDES**

**Trabajo de Grado para optar al título de  
Ingeniero Ambiental.**

**Director**

**I.Q. Msc. PhD. JUAN CARLOS QUINTERO DÍAZ  
UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA  
GRUPO BIOPROCESOS**

**Codirector**

**I.Q. Msc. JUAN CARLOS CASAS ZAPATA  
UNIVERSIDAD DEL CAUCA**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE INGENIERÍA CIVIL  
PROGRAMA DE INGENIERÍA AMBIENTAL  
POPAYÁN  
2009**

**Nota de Aceptación**

---

---

---

---

**Director:**

---

**Jurado 1**

---

**Jurado 2**

## CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS.....	7
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
ÍNDICE DE ANEXOS.....	11
INTRODUCCIÓN .....	12
<b>1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1. Hongos Ligninolíticos .....</b>	<b>14</b>
1.1.1. Generalidades.....	14
1.1.1.1. Degradación de la Lignina .....	14
1.1.1.2. Degradación de Compuestos Recalcitrantes.....	15
1.1.2. Sistema Enzimático Extracelular.....	16
1.1.3. Hongo de Pudrición Blanca <i>Anthracophyllum discolor</i> .....	22
1.2. Degradación de colorantes y efluentes textiles por hongos ligninolíticos.....	23
1.3. Generalidades de los Colorantes.....	25
1.4. Efectos de Colorantes sobre el Medio Ambiente.....	29
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>32</b>
<b>3. HIPÓTESIS.....</b>	<b>33</b>
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>34</b>
4.1. OBJETIVO GENERAL .....	34
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	34
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
5.1. Materiales .....	35
5.1.1. Microorganismos y Medios de Cultivo.....	35
5.1.2. Colorantes empleados en los Ensayos .....	36
5.2. Métodos.....	36
5.2.1. Determinación de la capacidad decolorativa de <i>A. discolor</i> en medio sólido.....	36

5.2.2.	Determinación de la capacidad decolorativa de <i>A. discolor</i> en medio líquido...	36
5.2.3.	Ensayo de Tolerancia de <i>A. discolor</i> con mezcla de colorantes Industriales.....	37
5.2.4.	Ensayo de capacidad decolorativa de <i>A. discolor</i> en efluente sintético y en efluente textil (agua residual real) .....	37
5.2.5.	Efecto de diferentes concentraciones salinas sobre <i>A. discolor</i> .....	38
5.2.6.	Ensayo de Decoloración por <i>A. discolor</i> en Efluente Textil en condiciones no estériles.	39
5.3.	Métodos analíticos.....	39
5.3.1.	Determinación de capacidad decolorativa y porcentaje de degradación.....	39
5.3.2.	Determinación de concentración de Biomasa.....	40
5.3.3.	Determinación de azúcares reductores. ....	40
5.3.4.	Determinación de Actividad Enzimática. ....	40
6.	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	42
6.1.	<b>TOLERANCIA Y DECOLORACIÓN DE COLORANTES INDUSTRIALES Y ESTÁNDARES POR <i>A. discolor</i></b> .....	42
6.1.1	Efecto de la concentración de los colorantes sobre el crecimiento y capacidad decolorativa de <i>Anthracoxyllum discolor</i> en medio sólido. ....	42
6.1.2.	Efecto de la concentración de los colorantes sobre la capacidad decolorativa de <i>Anthracoxyllum discolor</i> en medio líquido. ....	46
6.1.3.	Medición de Biomasa de <i>A. discolor</i> . ....	52
6.2.	<b>DECOLORACIÓN POR <i>A. discolor</i> EN AGUA RESIDUAL SINTÉTICA.</b> .....	53
6.2.1.	Decoloración por <i>A. discolor</i> en mezcla de colorantes industriales. ....	53
6.2.2.	Decoloración por <i>A. discolor</i> en Agua Residual Textil Sintética.....	55
6.2.3.	Decoloración por <i>A. discolor</i> en efluente textil esterilizado.....	57
6.2.4.	Ensayo <i>A. discolor</i> a diferentes concentraciones salinas.....	59
6.3.	<b>DECOLORACIÓN DE EFLUENTE TEXTIL POR <i>A. discolor</i> EN CONDICIONES NO ESTÉRILES.</b> .....	70
6.3.1.	Decoloración por <i>A. discolor</i> de efluente textil no esterilizado.....	74
6.3.2.	Conteo de microorganismos en agua residual textil. ....	77
7.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	79
8.	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	81

**BIBLIOGRAFÍA**

**ANEXOS**

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Organismos productores de enzimas ligninolíticas. [3]	24
Tabla 2. Medio de Conservación, Mantenimiento y Cultivo para Hongos Ligninolíticos	35
Tabla 3. Velocidad decoloración (cm/día) de <i>Anthracophyllum discolor</i> .	50
Tabla 4. Porcentajes de decoloración ensayo por bloques, en mezcla de colorantes y en efluente sintético.	57
Tabla 5. Caracterización Agua Residual Textil.	58
Tabla 6. Porcentajes de decoloración en efluente textil no esterilizado.	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Rompimiento de estructura no fenólica recalcitrante de la lignina, por acción de la Ligninoperoxidasa [4].	18
<b>Figura 2.</b> Rompimiento de una estructura fenólica terminal de la lignina por acción oxidante de la Manganoperoxidasa [4].	19
<b>Figura 3.</b> Reacción típica de despolimerización de la Lacasa de hongos ligninolíticos. [24, 25].	20
Figura 4. Esquema teórico del sistema ligninolítico de un hongo de pudrición blanca [18].	21
<b>Figura 5.</b> Hongo Ligninolítico <i>Anthracophyllum discolor</i> [27].	23
<b>Figura 6.</b> Estructuras de los principales Cromóforos [36].	26
Figura 7. Estructura colorantes azoicos.	27
Figura 8. Estructura colorantes Tiazolicos [36].	28
Figura 9. <i>A. discolor</i> en (A) Crecimiento en Medio de Mantenimiento; (B) Medio de Cultivo; (C) Medio de Conservación.	43
Figura 10. Decoloración en medio sólido por <i>Anthracophyllum discolor</i>	44
Figura 11. Velocidad de crecimiento (■) y velocidad de decoloración (■) de <i>Anthracophyllum discolor</i> .	45
Figura 12. Ensayo en bloque de decoloración por <i>A. discolor</i> .	47
Figura 13. Decoloración de Colorantes Industriales por <i>Anthracophyllum discolor</i> .	47
Figura 14. Porcentaje de Decoloración por <i>Anthracophyllum discolor</i> en colorantes industriales; ■ Azul Terasil; ■ Rojo Cibacron; ■ Rojo Erionyl; ■ Turquesa Erionyl.	49
Figura 15. Concentración de Biomasa de <i>Anthracophyllum discolor</i> en colorantes industriales: ■ Azul Terasil; ■ Rojo Cibacron; ■ Rojo Erionyl; ■ Turquesa Erionyl.	52
Figura 16. Biomasa de <i>A. discolor</i> en (A) Control (B) Mezcla de colorantes	53
Figura 17. Decoloración de Mezcla de Colorantes Industriales Rojo Erionyl, Azul Terasil, Rojo Cibacron y Turquesa Erionyl. ■ Día 0; ◆ Día 4; ▲ Día 8; ● Día 12.	54
Figura 18. Porcentaje de Decoloración de Mezcla de Colorantes Industriales Azul Terasil (AT), Rojo Cibacron (RCi), Rojo Erionyl (RE) y Turquesa Erionyl (TE).	54
Figura 19. Decoloración de Efluente Sintético con Colorantes industriales (Rojo Erionyl, Azul Terasil, Rojo Cibacron y Turquesa Erionyl). ■ Día 0; ◆ Día 4; ▲ Día 8; ● Día 12.	56



Figura 20. Porcentaje de Decoloración en Efluente Sintético con Colorantes industriales Azul Terasil (AT), Rojo Cibacron (RCi), Rojo Erionyl (RE) y Turquesa Erionyl (TE)	56
Figura 21. Decoloración por <i>A. discolor</i> de efluente real textil esterilizado (colorantes reactivos). ♦ Día 0; ■ Día 4; ▲ Día 8; ● Día 12.	58
Figura 22. Ensayos <i>A. discolor</i> en diferentes concentraciones de 0,15 g/L, 9 g/L, 20 g/L, 30 g/L y 40 g/L de NaCl.	59
Figura 23. Consumo de Sustrato de <i>A. discolor</i> en diferentes concentraciones salinas.	60
Figura 24. Actividad Enzimática Mangesoperoxidasa de <i>A. discolor</i> en diferentes concentraciones salinas. ♦ 0,15 g/L NaCl; ■ 9 g/L NaCl; ▲ 20 g/L NaCl; x 30 g/L NaCl; ● 40 g/L NaCl.	61
Figura 25. Actividad Enzimática Ligninoperoxidasa de <i>A. discolor</i> en diferentes concentraciones salinas. ♦ 0,15 g/L NaCl; ■ 9 g/L NaCl; ▲ 20 g/L NaCl; x 30 g/L NaCl; ● 40 g/L NaCl	61
Figura 26. Concentración de Biomasa de <i>A. discolor</i> a diferentes concentraciones de NaCl.	63
Figura 27. Concentración de Biomasa de <i>A. discolor</i> a diferentes concentraciones de NaCl en mezcla de colorantes.	63
Figura 28. Decoloración por <i>A. discolor</i> en mezcla de colorantes y diferentes concentraciones salinas. (A) 0,15 g/L de NaCl. (B) 9 g/L de NaCl. (C) 20 g/L de NaCl. (D) 30 g/L de NaCl. (E) 40 g/L de NaCl. ♦ Día 0; ■ Día 4; ▲ Día 8; ● Día 12.	65
Figura 29. Decoloración por <i>A. discolor</i> en concentraciones salinas de 0,15 g/L, 9 g/L, 20 g/L, 30 g/L, 40 g/L de NaCl (De izquierda a Derecha).	66
Figura 30. Porcentaje de decoloración en Mezcla de colorantes a diferentes concentraciones salinas. (A) Azul Terasil. (B) Rojo Cibacron. (C) Rojo Erionyl. (D) Turquesa Erionyl. ♦ 0,15 g/L NaCl; ■ 9 g/L NaCl; ▲ 20 g/L NaCl; x 30 g/L NaCl; ● 40 g/L NaCl	67
Figura 31. Actividad Enzimática y Consumo de sustrato de <i>A. discolor</i> en condiciones no estériles. ♦ Consumo de sustrato (g/L); ■ Actividad MnP (U/L); ▲ Actividad LiP (U/L)	70
Figura 32. Ensayos <i>A. discolor</i> en agua residual textil no estéril. (A) Agua residual textil; (B) Agua residual textil con Biomasa y sales; (C) Agua residual textil con biomasa, sales y fuentes de Carbono y Nitrógeno.	71
Figura 33. Actividad de MnP en agua residual textil no estéril con (A) 10% y (B) 20% de Biomasa de <i>A. discolor</i> en diferentes condiciones. ♦ Solo Biomasa; ■ Biomasa y Fuente de C/N; ▲ Biomasa, Fuente de C/N y sales; ● Biomasa y sales.	71

Figura 34. Actividad de LiP en agua residual textil no estéril con (A) 10% y (B) 20% de Biomasa de *A. discolor* en diferentes condiciones. ♦ Solo Biomasa; ■ Biomasa y Fuente de C/N; ▲ Biomasa, Fuente de C/N y sales; ● Biomasa y sales. 73

Figura 35. Consumo de sustrato en agua residual textil no estéril con (A) 10% y (B) 20% de Biomasa de *A. discolor* en diferentes condiciones. ■ Biomasa y Fuente de C/N; ▲ Biomasa, Fuente de C/N y sales. 74

Figura 36. Porcentaje de decoloración en agua residual textil no estéril bajo diferentes condiciones. (A) 10% Biomasa de *A. discolor*. (B) 20% Biomasa de *A. discolor*. 1. Solo Biomasa. 2. Fuente de C/N y Biomasa. 3. Fuente de C/N, Sales y Biomasa. 4. Sales y Biomasa. 76

Figura 37. Recuento de microorganismos en Cámara de Neubauer. (A) 10% Biomasa de *A. discolor*. (B) 20% Biomasa de *A. discolor*. ♦ Solo Biomasa; ■ Biomasa y Fuente de C/N; ▲ Biomasa, Fuente de C/N y sales; ● Biomasa y sales. 78

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A. COLORANTES ESTÁNDARES E INDUSTRIALES	89
ANEXO B. VELOCIDAD DE CRECIMIENTO Y DECOLORACIÓN DE <i>Anthracophyllum discolor</i> .	90
ANEXO C. CURVAS DE CALIBRACIÓN DE COLORANTES INDISTRIALES	91
ANEXO D. DETERMINACIÓN DE AZUCARES REDUCTORES POR EL MÉTODO DEL DNS.	92
ANEXO E. ENSAYOS DE CONTROL EN BIOMASA INACTIVA: COLORANTES INDUSTRIALES.	93
ANEXO F. RESUMEN DISEÑO EXPERIMENTAL EN DESIGN EXPERT	94
ANEXO G. ANOVA DE CADA FACTOR (COLORANTE) EN ENSAYO DE TOLERANCIA	95
ANEXO H. DISTRIBUCIÓN NORMAL DE ENSAYO DE TOLERANCIA EN COLORANTES INDUSTRIALES	97
ANEXO I. ADSORCIÓN POR BIOMASA INACTIVA EN MEZCLA DE COLORANTES EN DIFERENTES CONCENTRACIONES SALINAS.	99
ANEXO J. ADSORCIÓN POR BIOMASA INACTIVA EN MEZCLA DE COLORANTES	100
ANEXO K. ANOVA ENSAYO AGUA RESIDUAL NO ESTÉRIL.	101
ANEXO L. DISTRIBUCIÓN NORMAL DE ENSAYO AGUA RESIDUAL NO ESTÉRIL	101

## INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, diferentes organismos han generado gran interés en investigaciones con fines industriales y de biorremediación; unos de los que han sido ampliamente estudiados especialmente en procesos de degradación de sustancias contaminantes son los hongos, los cuales son relativamente sencillos de manipular y cuyo crecimiento y reproducción pueden ser controlados eficientemente ajustando las condiciones medioambientales de su hábitat en el medio en el que son introducidos; así mismo diferentes especies de hongos han mostrado capacidad para absorber y acumular sustancias de diferente naturaleza, lo que los hace apropiados para aplicaciones biotecnológicas en el tratamiento de suelos y aguas contaminadas [1].

Concretamente los hongos ligninolíticos, que son responsables de la biodegradación de la lignina y de la oxidación de una amplia variedad de compuestos orgánicos contaminantes como tintes, hidrocarburos poliaromáticos, pentaclorofenol [2]. Diversos estudios han demostrado la capacidad degradativa de estos hongos en varios tipos de efluentes industriales y con sustancias contaminantes dentro de los que se encuentran los colorantes textiles, los plaguicidas y los hidrocarburos polinucleo aromáticos [3]. La aplicación de estas especies fúngicas en el tratamiento de efluentes altamente coloreados se logra gracias a su batería de enzimas con distintas funciones; estas enzimas son la Ligninoperoxidasa, Manganoperoxidasa y Lacasa, las cuales tienen potente capacidad oxidante y tienen baja especificidad [2].

En este trabajo se empleó el hongo ligninolítico *Anthracophyllum discolor* con el fin de evaluar su capacidad de decoloración en medios y aguas residuales constituidas por colorantes utilizados en la industria textil. Este hongo fue aislado en Chile y hasta ahora ha sido estudiada su capacidad en la biorremediación de suelos contaminados con pentaclorofenol [4].

Para cumplir con el objetivo de este trabajo mencionado anteriormente, además se realizó el seguimiento a la producción de enzimas ligninolíticas, las cuales serían las responsables del proceso de reducción del color.

Del mismo modo se determinó que influencia tiene la concentración de los colorantes sobre su crecimiento y capacidad decolorativa. Una etapa importante de este estudio fue la experimentación con agua residual textil en condiciones no estériles, correspondiente a un ensayo previo en la proyección de un sistema de tratamiento de aguas residuales de la industria textil.

En este trabajo además del conocimiento general de esta especie, se obtuvo información importante sobre el comportamiento y afinidad de este hongo frente a diferentes colorantes industriales, a la concentración en las que estos se encuentren y el efecto que

tienen las sustancias adicionales en efluentes textiles como lo son las sales utilizadas en el lavado y fijación de los colorantes a las telas.

Finalmente los ensayos en condiciones no estériles y en diferentes condiciones de variación de sustrato y biomasa fúngica permitieron obtener una referencia sobre las posibles técnicas o alternativas viables y económicas para el tratamiento de este tipo de efluentes.

# **1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

## **1.1. Hongos Ligninolíticos**

### **1.1.1. Generalidades**

La capacidad de diferentes microorganismos como lo son algunas clases de hongos, para convertir compuestos recalcitrantes en agua y dióxido de carbono, ha sido el objetivo de diferentes investigaciones que buscan demostrar la utilidad de estos en los procesos de descontaminación. Dentro de esta clase se encuentran los hongos ligninolíticos que han manifestado su alto potencial biotecnológico para aplicarlos en diferentes sectores industriales, ya que poseen un sistema enzimático extracelular, metabolitos de bajo peso molecular y sistemas reductores capaces de degradar compuestos complejos como la lignina, compuestos aromáticos de diferentes estructuras como: colorantes, pesticidas, hidrocarburos aromáticos (benzo-pireno, fenantreno, pireno, etc.), compuestos orgánicos clorados (pentaclorofenoles, cloroanilinas, bifenilos policlorados), azocolorantes, etc.; debido a su sistema enzimático no específico [5-7]. Es importante mencionar que los hongos ligninolíticos requieren para su existencia algunas condiciones necesarias como lo es la existencia de sustrato, humedad, oxígeno y temperatura adecuada.

#### **1.1.1.1. Degradación de la Lignina**

La madera como material de origen orgánico compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa y lignina, es la base de alimentación de organismos vivos como los hongos ligninolíticos o de pudrición blanca, considerados como agentes degradadores de la madera. Un agente degradador es toda causa que directa o indirectamente interviene en el deterioro o alteración de la madera.

Algunos de los hongos que se relacionan con la madera son los hongos de pudrición blanca cuyo ciclo biológico se define por esporas, hifas, micelio y cuerpos de fructificación y empieza cuando existen las condiciones favorables para su germinación (maderas con contenido de humedad superior al 22%). El ciclo inicia cuando de las esporas emergen las hifas que son células muy finas, visibles con microscopio y que son las que se introducen en la madera. Las hifas se alimentan de las sustancias de reservas del interior de las células y segregan enzimas que producen la descomposición de la pared celular vegetal y es así como degradan la madera. Las hifas aumentan de tamaño y forman el micelio, donde se forman los cuerpos de fructificación, que son visibles y que vuelven a emitir esporas al exterior cerrando el ciclo.

Al final del proceso hay disgregación total de la estructura de la madera con una pérdida importante de sus características físico – mecánicas. Sin embargo es difícil clasificar la pudrición ya que no hay parámetros fijos para apoyar este concepto, pero existe una clasificación que es la más aceptada, es la que relaciona el color de la madera atacada y su aspecto. De esta forma, los tipos o clases de pudrición son las pudriciones pardas cuyo ataque se centra en la celulosa, las pudriciones blancas que ataca la lignina y las pudriciones blandas que atacan cuando existen altas condiciones de humedad tanto en el ambiente como en la madera [8].

La lignina, es un producto final inerte del metabolismo vegetal y solamente es degradada por los microorganismos, ya que es un compuesto químicamente no uniforme y con estructura compleja debido al gran número de diferentes enlaces que unen a sus monómeros [9]. Los pasos iniciales de la despolimerización de la lignina por las enzimas no específicas de los hongos ligninolíticos, se dan por la liberación de productos altamente inestables que catalizan reacciones de oxidación, esta oxidación no específica de la lignina se ha denominado “combustión enzimática” [10]. La degradación de la Lignina por medio del sistema enzimático de los hongos, se da en presencia de oxígeno y glucosa; las peroxidasas catalizan la ruptura oxidativa de los enlaces  $\beta$ -O-4 éter y los C-C de la lignina; además este sistema requiere  $H_2O_2$  resultante de la oxidación por la glucosa-oxidasa. Por otra parte, la formación de peroxidasas es promovida por la limitación de nitrógeno y la descomposición de la lignina al parecer tiene como objetivo el acceso a los componentes nitrogenados de la madera [9]. Además de los sistemas enzimáticos producidos por estos microorganismos, se ha considerado que la participación de compuestos de bajo peso molecular es también esencial en la degradación de la lignina. Esto se postula debido a que la lignina en su estado natural es inaccesible para enzimas tales como la Lignino Peroxidasa y la Manganese Peroxidasa [11].

#### **1.1.1.2. Degradación de Compuestos Recalcitrantes**

La estructura y estabilidad química de los compuesto xenobióticos, hace que sean persistentes por mucho tiempo en la biosfera sin sufrir alteración alguna, por lo cual se dice que son recalcitrantes a la biodegradación y es así como se convierten en contaminantes. Algunos compuestos sintéticos son posibles de degradar utilizando microorganismos, por lo cual ha sido amplia su investigación en este campo y principalmente el estudio de la desviación de rutas metabólicas capaces de degradar estos compuestos y de servir como compuestos de carbono para el sustento de varias clases de microorganismos.

Uno de los procesos de tratamiento para estos compuestos esta dado por hongos ligninolíticos los cuales por su fisiología y metabolismo permiten que se realice la introducción de cepas específicas en efluentes y lugares contaminados como vectores de nuevas actividades, como la creación de nichos ecológicos permitiendo la colonización

rápida del microorganismo. En este aspecto es importante mencionar que una parte fundamental de la eliminación biológica de compuestos xenobióticos por estos organismos es el proceso de cometabolismo que desarrollan, en el que se transforma metabólicamente una sustancia mientras que una segunda sustancia sirve de fuente de energía primaria o fuente de carbono. Los hongos ligninolíticos degradan varios tipos de compuestos organoclorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos, clorofenoles, nitrotoluenos, tintes y policlorobifenilos y bifenilos; el sistema enzimático responsable es el compuesto por las peroxidasas y oxidasas, que estos hongos emplean para degradar la lignina de las plantas en condiciones normales. Es así como los microorganismos que obtienen electrones y energía de las transformaciones, llevan a cabo la mayoría de degradaciones producidas en plantas de tratamiento biológico de aguas residuales.

Las conversiones cometabólicas que pueden implicar solo una enzima, son entre otras las reacciones de oxidación, sin embargo muchas de las conversiones son complejas e implican varias enzimas y algunas de estas no son específicas en las transformaciones que catalizan como es el caso del sistema enzimático de los hongos ligninolíticos [10].

Por esta razón, los hongos ligninolíticos se consideran dentro del grupo de microorganismos útiles en procesos de biodegradación ambiental, en este sentido y a pesar de estudiar su potencial en estos tratamientos, la investigación en muchos casos se ha reducido al interés económico más que ecológico ya que el fin último de investigar estas especies, es encontrar alternativas viables y económicas para procesos de biodeterioro, biorremediación y bioconversión. Por lo anterior, se puede decir que la existencia de microorganismos degradadores genera opciones para implementar y mejorar los procesos de tratamiento de aguas residuales y precisamente el conocimiento de diferentes hongos ligninolíticos da a conocer la capacidad metabólica del organismo cuando entra en contacto con una sustancia contaminante, ya que esta es una de las mayores dificultades para el desarrollo de las prácticas de biorremediación [12].

Es así, como aumenta la necesidad de comprender los sistemas degradadores de este tipo de hongos, sabiendo que los métodos tradicionales para el tratamiento de desechos recalcitrantes y peligrosos, como los químicos, físicos y térmicos no siempre son eficaces pero si presentan altos costos. Ante esta realidad sobre el saneamiento de aguas residuales es primordial una alternativa eficaz, rápida y con un costo aceptable, características que tienen los métodos de biorremediación de contaminantes [13].

### **1.1.2. Sistema Enzimático Extracelular**

El sistema degradador de la lignina, se compone de una serie de enzimas extracelulares oxidativas esenciales en la mineralización de la lignina, como celobiohidrolasas, endoglucanasas,  $\beta$ -glucosidasas, glioxaloxidasas, xilanasas, xilosidasas,  $\alpha$ -galactosidasa,



piranose 2-oxidasa, superóxido dismutasas, manosa -6- fosfatasas y principalmente lignino peroxidadas, manganeso peroxidadas conocidas como ligninasas[6].

Algunas de estas enzimas están indirectamente relacionadas a la mineralización de la lignina como la glioxaloxidasa y la superóxido dismutasa que sintetizan el Peróxido de Hidrogeno ( $H_2O_2$ ) necesario para la actividad de la Ligninoperoxidasa y la Manganoperoxidasa. Otras de estas enzimas funcionan de enlace entre las rutas de mineralización de la lignocelulosa como la glucosaoxidasa y la celobiohidrolasa [15].

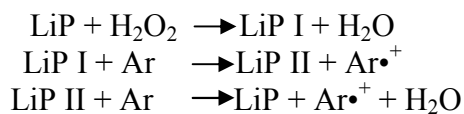
Las principales enzimas que participan en el proceso son la Lignino peroxidasa, la Manganeso peroxidasa y Lacasa [10].

## Peroxidasas

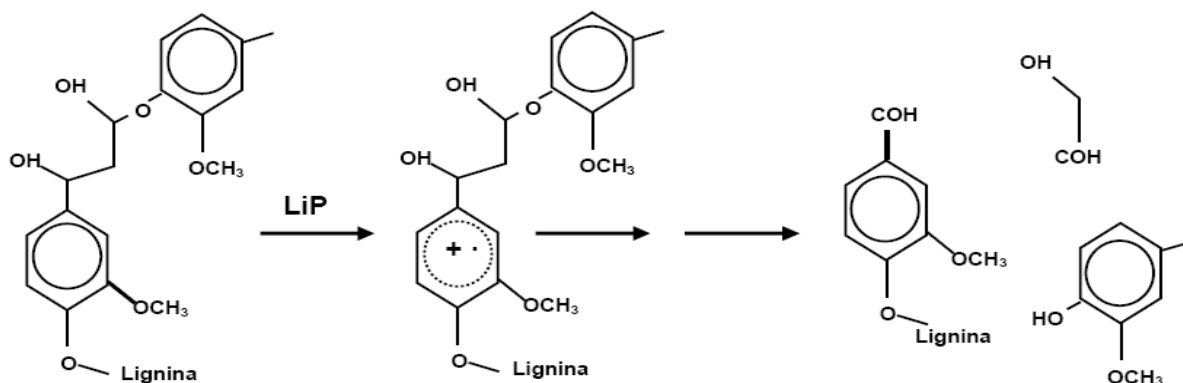
### Lignino peroxidasa (LiP)

Esta enzima es un fuerte oxidante de sustratos como fenoles y anilinas, oxida estructuras no fenólicas y éteres aromáticos similares a las unidades estructurales básicas de la lignina [16]. La Ligninoperoxidasa es una hemoproteína extracelular, que opera con el típico ciclo catalítico de las peroxidadas, dependiente del peróxido de Hidrogeno, con alto potencial redox y bajo pH óptimo de 2,5 el cual es controlado aparentemente este ciclo catalítico [17]. La LiP es oxidada por peróxido de Hidrogeno ( $H_2O_2$ ) a un intermediario llamado Compuesto I, que vuelve a su estado de reposo al realizar dos oxidaciones de un electrón de sustratos donantes; el termino intermedio deficiente en un electrón es el Compuesto II [18].

En el caso de la interacción de la Lignino peroxidasa con el sustrato se hace mediante un mecanismo ping-pong; el  $H_2O_2$  oxida mediante dos electrones y se obtiene *Lignino peroxidasa I*. Después *Lignino peroxidasa I* oxida sustratos aromáticos (Ar) por un electrón para obtener *Lignino peroxidasa II* que se oxida de nuevo por el sustrato aromático y llega al estado original [4]. El ciclo catalítico de la lignino peroxidasa puede resumirse de la siguiente forma:



La ligninoperoxidasa se considera como la primera catalizadora en la descomposición de las estructuras no fenólicas de la lignina; el inicio del proceso de oxidación catalizado por la LiP de subestructuras de la lignina como se observa en la Figura 1, se da por la extracción de un electrón del anillo aromático del sustrato donante. El radical catión aril resultante experimenta diferentes reacciones post enzimáticas, actuando como un radical o también como un catión y formando diferentes fragmentos degradados [18].

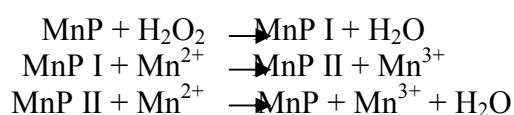


**Figura 1.** Rompimiento de estructura no fenólica recalcitrante de la lignina, por acción de la Ligninoperoxidasa [4].

### Manganeso peroxidasa (MnP)

La función principal de la Manganeso peroxidasa, es oxidar  $Mn^{2+}$  a  $Mn^{3+}$  usando  $H_2O_2$  como oxidante [20]. Al igual que las Lignino peroxidasa, son glicosiladas y además presentan un ciclo catalítico convencional de peroxidasa pero con  $Mn^{2+}$  como sustrato. El Compuesto I es un producto intermedio de la oxidación de dos electrones por el peróxido de hidrogeno, y puede oxidar sustratos fenólicos o  $Mn^{2+}$  y aparentemente el Compuesto II de la Manganesoperoxidasa es reducido sólo por  $Mn^{2+}$ ; este último debe ser quelado por ácidos orgánicos bidentados como los son el glicolato y oxalato, para estabilizar el producto  $Mn^{3+}$  y promover su liberación de la enzima; por tal razón los hongos ligninolíticos secretan ácido oxálico y otros ácidos como el malónico que funcionan como acomplejante del  $Mn^{3+}$ .

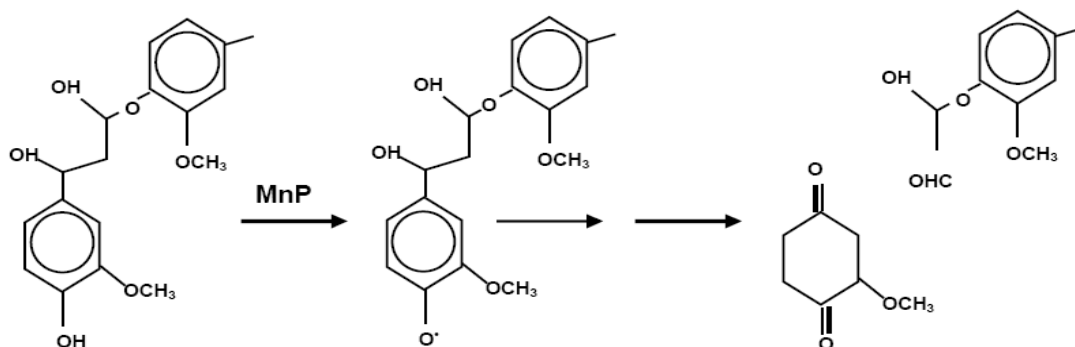
De la misma forma, el ciclo catalítico de la Manganesoperoxidasa puede resumirse de la siguiente manera:



El  $Mn^{3+}$  que resulta, es un oxidante difusible que actúa a cierta distancia de la enzima a pesar de no ser oxidante fuerte y puede oxidar estructuras fenólicas que son aproximadamente el 10% de las unidades de la lignina [20]. La Manganeso peroxidasa promueve la peroxidación de grasas no saturadas y se generan lipoxirradicales intermedios pasajeros los cuales demuestran que oxidan modelos de compuestos de lignina no fenólica.

Es así como el sistema de peroxidación Manganeso peroxidasa/graso, despolimeriza tanto ligninas sintéticas fenólicas y fenólicas bloqueadas (metiladas), indicando que el sistema funciona en la despolimerización de la lignina como lo ilustra la Figura 2; las

reacciones que se presentan en el proceso, generan un limitado grado de ligninólisis y otras reacciones degradativas.



**Figura 2.** Rompimiento de una estructura fenólica terminal de la lignina por acción oxidante de la Manganoperoxidasa [4].

### Lacasa

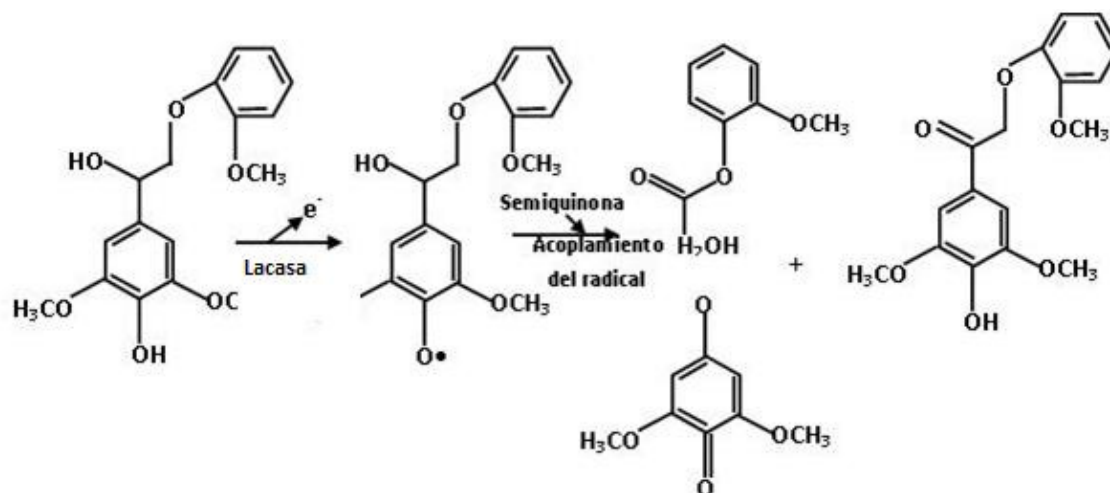
Las lacasas son enzimas que catalizan la oxidación de compuestos fenólicos y aminas aromáticas, donde el oxígeno molecular es aceptor de electrones, reduciéndolo a agua. Esta enzima contiene átomos de cobre y está distribuida en plantas superiores, diversas clases de hongos y algunas bacterias; la Lacasa es una fenol oxidasa extracelular que puede ser producida por basidiomicetos, ascomicetos y deuteromicetos; los mejores productores de esta enzima son los hongos ligninolíticos [21].

Todas las lacasas son glicoproteínas extracelulares con cuatro átomos de cobre en su estado de oxidación que les confieren una coloración azul [22].

Desde el punto de vista bioquímico, la Lacasa es una enzima que oxida compuestos aromáticos, cataliza la remoción de un electrón y un protón de hidroxilos fenólicos o de grupos amino aromáticos formando radicales libres fenoxilo y radicales amino respectivamente. La Lacasa además de oxidar, descarboxila ácidos fenólicos y metoxifenólicos y ataca sus grupos metoxilo, por desmetilación o desmetoxilación; todas estas reacciones pueden contribuir en la transformación inicial de la lignina [23].

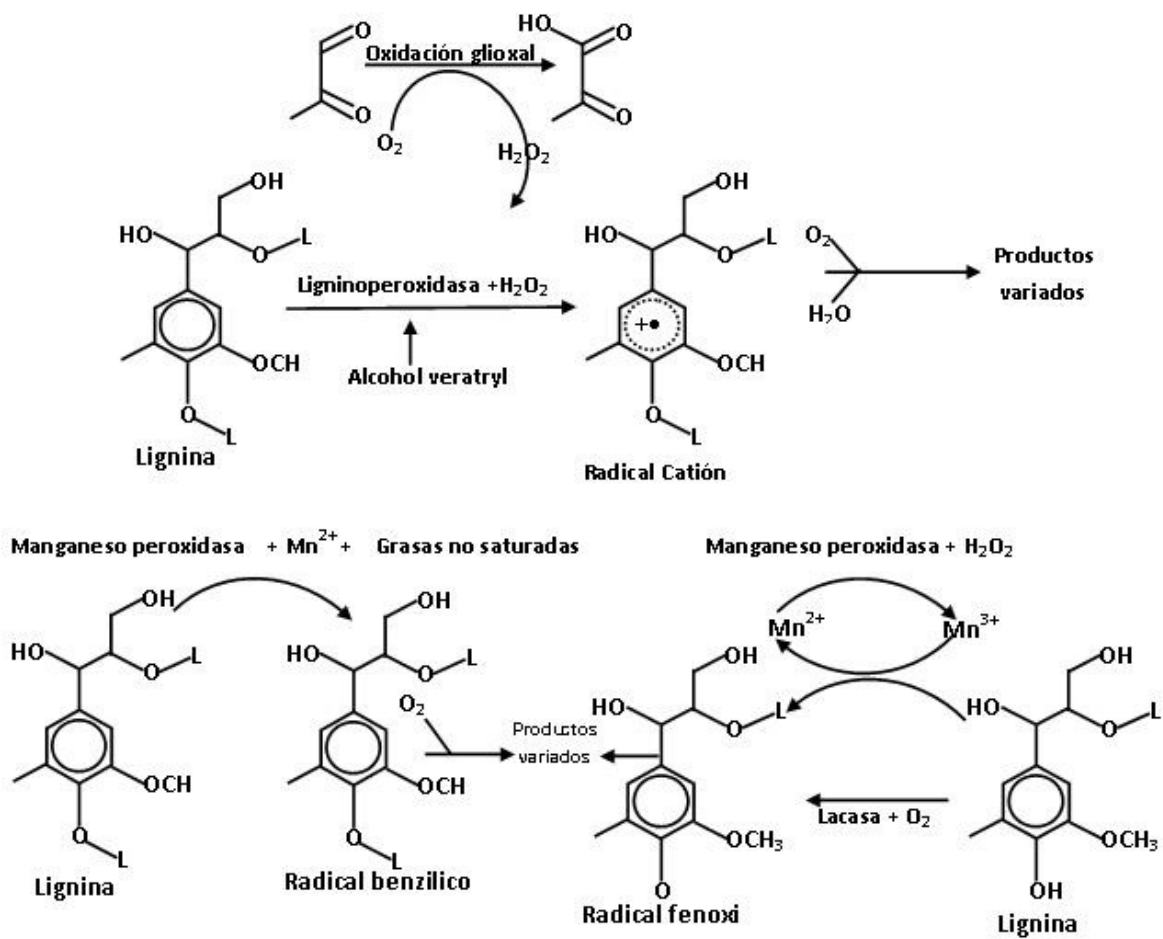
La Lacasa en presencia de un cosustrato adicional o mediador redox como el 2,2-azino-bis (3- etilbencenotiazolin 6-sulfonato) (ABTS) o hidroxilbenzotriazol (HBT), puede degradar fenoles relativamente recalcitrantes en un proceso oxidativo involucrando el mediador y el sustrato [22].

Las reacciones catalizadas por la Lacasa de los hongos son de relevancia fisiológica como se observa en la Figura 3, la Lacasa oxida los grupos hidroxilos de las subunidades fenólicas de la lignina en cooperación con las polifenoloxidasas y forman un radical o semiquinona, el cual posteriormente ataca otras subunidades.



**Figura 3.** Reacción típica de despolimerización de la Lacasa de hongos ligninolíticos. [24, 25].

Por último respecto al sistema ligninolítico de estos hongos, la Figura 4 ilustra este sistema, mostrando las tres enzimas mencionadas anteriormente. Los hongos ligninolíticos pueden presentar una o más de estas enzimas; el peróxido extracelular para la oxidación con peroxidasas es suministrado en algunos hongos por la oxidación glioxal.



**Figura 4.** Esquema teórico del sistema ligninolítico de un hongo de pudrición blanca [18].

### 1.1.3. Hongo de Pudrición Blanca *Anthracoxyllum discolor*

Se pueden desarrollar procesos microbiológicos que degraden los contaminantes y los transformen en sustancias menos perjudiciales. Una de estas alternativas es el uso de hongos ligninolíticos para el tratamiento de efluentes industriales, ya que este tipo de hongos, oxidan y degradan la lignina de sustratos lignocelulósicos, destruyendo la pared química y permitiendo el paso hacia los polisacáridos de la madera o fuente de energía.

Dentro de las especies de hongos con esta característica, se encuentra *Anthracoxyllum discolor*, el cual produce enzimas ligninolíticas no específicas, capaces de mineralizar la lignina y de degradar moléculas similares [25].

Este hongo de pudrición blanca, ha sido objeto de algunos estudios en los que se demostró su capacidad para degradar algunos contaminantes dentro de los cuales están: Poly R-478 y pentaclorofenol, debido a la producción de las enzimas extracelulares Lacasa, Ligninoperoxidasa y Manganoperoxidasa [26].

El hongo *Anthracoxyllum discolor* cuya morfología externa se ilustra en la Figura 5, fue aislado en un bosque del sur de Chile, en la región de La Araucanía, en un estudio que buscó evaluar la capacidad de biorremediación en suelos contaminados con pentaclorofenol; este trabajo logró demostrar que *A. discolor* presenta un alto potencial ligninolítico.

Uno de los hechos que vale la pena resaltar sobre la investigación mencionada es la intervención de microflora autóctona del suelo, la cual compite con los hongos de pudrición blanca y disminuye su acción degradadora sobre el pentaclorofenol, esto es posible que ocurra también en experimentos para otro tipo de contaminantes, y no necesariamente en el suelo sino también en aguas residuales. A pesar de esto, en la misma investigación se afirma que se puede esperar un efecto sinérgico entre la microflora y el hongo de pudrición blanca, favoreciendo la degradación del compuesto contaminante.

#### Clasificación científica de *Anthracoxyllum discolor*

**Nombre:** *Anthracoxyllum discolor*

**Estatus:** Especie

**POSICIÓN TAXONÓMICA:**

**Género:** *Anthracoxyllum*

**Familia:** Tricholomataceae

**Orden:** Agaricales

**Clase:** Basidiomycetes

**División/Phylum:** Basidiomycota

**Reino:** Fungí.



**Figura 5.** Hongo Ligninolítico *Anthracophyllum discolor* [27].

## **1.2. Degradación de colorantes y efluentes textiles por hongos ligninolíticos.**

Se estima que en la industria textil, entre el 10% y 14% de los colorantes, después del proceso de teñido de telas, son vertidos en agua dulce, entre estos colorantes los más comunes como los azo, los trifenilmetano o polimérico/heterocíclico, los cuales son estables a la acción degradadora de la microbiota natural. Buscando disminuir los impactos negativos, existe la alternativa de emplear hongos de la pudrición blanca con sus correspondientes enzimas extracelulares inespecíficas que oxidan la lignina [15].

Los primeros estudios relacionados con hongos ligninolíticos se realizaron en los años setenta, en estos se comprobó que la degradación de la lignina origina productos que provienen de la ruptura oxidativa de anillos aromáticos, lo cual sugirió que las oxigenasas extracelulares podrían estar involucradas en la transformación de la lignina. Posteriormente, se reportó la existencia de una ligninasa que podía oxidar y despolimerizar la lignina y compuestos modelo y cuya actividad enzimática depende del peróxido de hidrógeno [28].

A través del tiempo, se han desarrollado investigaciones relacionadas con organismos productores de enzimas ligninolíticas, algunos de los cuales se presentan en la Tabla 1. Estos estudios han demostrando su potencial en el tratamiento de aguas residuales de diferentes industrias entre ellas las que utilizan colorantes en sus procesos.

**Tabla 1.** Organismos productores de enzimas ligninolíticas. [3]

<b>Organismo</b>	<b>Enzimas Ligninolíticas</b>
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	MnP, LiP
<i>Trametes versicolor</i>	MnP, Lacasa
<i>Ceriporiopsis subvermispora</i>	MnP, Lacasa
<i>Cyanthus stercoreus</i>	MnP, Lacasa
<i>Phlebia radiate</i>	MnP, LiP, Lacasa
<i>Nematoloma frowardii</i>	MnP, LiP, Lacasa
<i>Pleurotus eryngii</i> , <i>Pleurotus ostreatus</i> , <i>Pleurotus pulmonarius</i>	MnP, LiP, Lacasa

Desde entonces, se han realizado varias publicaciones sobre hongos ligninolíticos y su potencialidad en el tratamiento de aguas residuales que contienen diferentes sustancias contaminantes. Uno de los casos más estudiados tiene que ver con las aguas residuales que contienen colorantes, los cuales como se ha mencionado pueden ser degradados por el sistema extracelular de los hongos ligninolíticos.

Es el caso de *P. ostreatus*, *P. chrysosporium* y *Cladariomyces fumago*, de los cuales se ha demostrado su capacidad degradativa tanto en medio sólido como líquido para residuos de la industria textil, encontrando la enzima Lacasa como responsable de esta actividad decolorante [29]. Por su parte, los hongos basidiomicetos *Phanerochaete chrysosporium* y *Colorius versicolor* que también tienen su sistema enzimático no específico, han sido utilizados para la degradación del colorantes tipo azo alcanzando valores de eficiencia entre 64% y 80% y demostrando que hay mayor efectividad cuando se inocula el micelio y se permite su desarrollo durante cinco días y enseguida se adiciona el colorante para obtener una decoloración con valores cercano al 76%. [30]. En otro estudio también con *Pleurotus ostreatus* se demostró su capacidad degradadora en ensayos con cultivos sumergidos, tanto en medios coloreados pero también en aguas residuales coloreadas, alcanzando remociones de color en los dos casos mayores del 50% [31].

Además, es importante considerar los experimentos realizados para efluentes textiles en reactores, por ejemplo en un reactor con pellets de *Trametes versicolor*, se han obtenido resultados satisfactorios en proceso continuos y discontinuos; en los dos casos con porcentajes de decoloración mayores al 90%, donde sin conocer la estructura molecular de los colorantes, se comprobó la transformación de estos por este hongo [32].

Diferentes investigadores, han expuesto la efectividad de estos organismos en el tratamiento de residuos con colorantes; Levin *et al.*, en 2004, realizaron una investigación sobre 26 hongos de la pudrición blanca para decolorar colorantes como



el verde malaquita, azure B, Poly R-478, antraquinona azul, rojo congo y xilidina en agar con extracto de malta y colorante. Se encontró que estos hongos sintetizaron la LiP, la MnP y la Lacasa para eliminar los colorantes. Además una nueva especie; *Coloriolus versicolor f antarticus*, redujo 28% la xilidina, 30% la Poli-R-478, 43% el azul brillante de Remazol R, 88% el verde de malaquita y 98% el índigo carmín [15].

De igual forma, Keharia y Madamwar en 2002, trabajaron sobre la degradación de colorantes por *Trametes versicolor* en medio de cultivo líquido, encontrando que colorantes como el amarillo dorado R, el violeta 5, el azul 28 y el rojo Ponceau 4R, en concentraciones de 80 ppm respectivamente, se degradan en 72 horas y el negro 5 a 40 ppm lo hace en 5 días [15].

Por otra parte es fundamental realizar estudios con hongos ligninolíticos en efluentes no estériles, dado que estas son las condiciones que tendrán las aguas residuales a ser tratadas. Se han investigado algunos de los hongos mencionados anteriormente en procesos con aguas residuales coloreadas no estériles mediante la inmovilización generalmente en espuma de poliuretano. El fin de estos experimentos es determinar cómo es afectado el hongo y su capacidad decolorativa por la presencia de microorganismos como bacterias y otros tipos de hongos.

*Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium* han sido algunos de los hongos inmovilizados y de los cuales se encontró que no existe inhibición en el crecimiento de biomasa, además se ha alcanzado valores de 82% en remoción de color y 80 % en remoción de DQO [24, 33].

Finalmente se puede decir que a pesar de que estas investigaciones empezaron hace más de 30 años, se ha incrementado el interés en estos hongos y en los últimos dos años, varios investigadores continúan con esta tarea; Mouso *et al.*, concluyeron que el hongo ligninolítico *Stereum hirsutum* obtiene altos valores en decoloración y detoxificación en colorantes como el índigo carmín y el verde malaquita y determinaron que no siempre los valores máximos de decoloración deben coincidir con los valores máximos de actividad enzimática. Y por su parte Yonni *et al.*, demostraron que la cepa de *Bjerkandera sp.* puede disminuir significativamente la concentración de colorantes como el negro directo y el rojo ácido en un periodo inicial de aproximadamente 4 días. En este estudio además se determina la ecotoxicidad de los colorantes antes y después del tratamiento sobre organismos vivos sensibles a este tipo de contaminantes, mostrando la importancia que tiene para la biota acuática la disminución de colorantes en sus medios de vida [34].

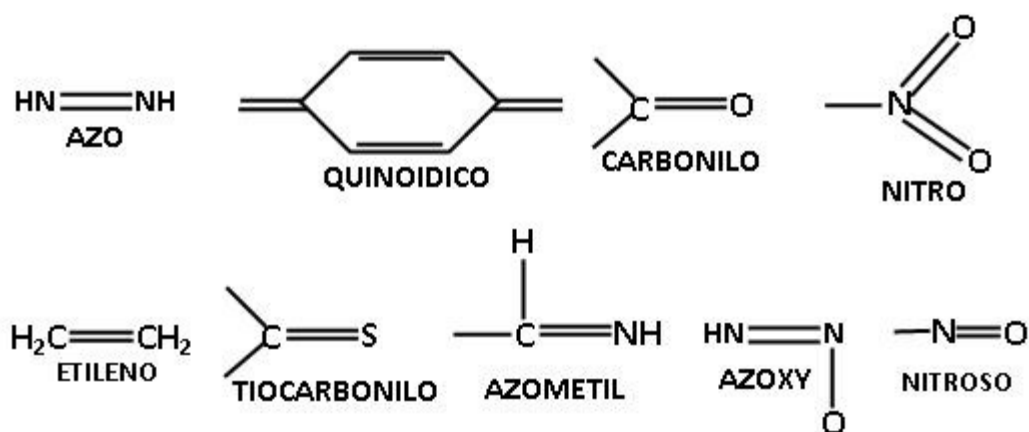
### **1.3. Generalidades de los Colorantes**

Los colorantes son sustancias que al ser aplicadas a un sustrato, imparten color a este. Son retenidos en el sustrato por absorción, retención mecánica o por un enlace iónico o covalente y generalmente se usan en textiles, papel y piel [35].

En el año 1856, en Inglaterra, William Henry Perkin preparó el primer colorante sintético llamado Mauvine, lo cual marcó el inicio de la industria de los colorantes sintéticos. Una década después fueron descubiertos los colorantes Magenta, Anilina Azul, Violeta Metil, Violeta Hofmann, Anilina Negra y Verde Aldehído, pero sin una base teórica, solamente basados en experimentos empíricos. En el año 1859, Verguin en Francia descubrió el segundo colorante llamado Fucsina y fue usado como colorante textil. En 1880 Adolf Baeyer sintetizó el Azul Índigo, empleado como colorante textil por primera vez en Alemania en 1897.

### Constitución de Colorantes

La propiedad colorante depende de la presencia en la molécula de grupos llamados cromóforos (chromos: color; foros: portador) unidos al grupo Bencénico; algunos de estos se presentan en la Figura 6.



**Figura 6.** Estructuras de los principales Cromóforos [36].

Estos grupos funcionales localizados en la molécula determinan el color, si cambia el grupo funcional, cambia el color o el tono, así como una posición diferente en la molécula puede dar un color distinto. Cuando la complejidad de la molécula es mayor, esta da un color más oscuro.

Algunos compuestos con enlaces insaturados, tienen un solo centro de insaturación y absorben la luz de una sola región del espectro y por lo general a bajas longitudes de onda. A estos grupos con algún enlace insaturado se les denomina cromóforos, siendo los más importantes; Nitroso -N=O, Nitro, Azo, Azoamina, Azoxi, Tiocarbonillo. Hay que tener en cuenta que intensificar el color, significa aumentar la longitud de onda.

## Clasificación de Colorantes

La clasificación elemental para colorantes es la que diferencia colorantes naturales (de origen vegetal, animal y mineral) y artificiales. Los colorantes artificiales son los utilizados en la industria textil, la mayoría proviene del aislamiento en laboratorio de las sustancias correspondientes a los mismos colorantes en estado natural y de sintetizar químicamente colorantes idénticos a sus correspondientes naturales.

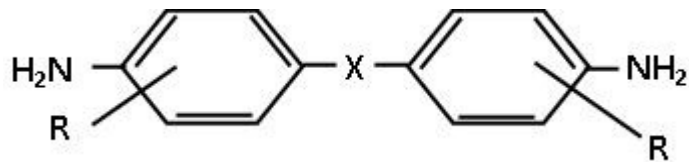
Por ser los utilizados en la industria textil, los colorantes artificiales se han clasificado según diferentes características [36].

**Colorantes Ácidos:** Se usan en tintura de lana, seda, poliamidas. Tienen diferentes grados de solidez<sup>1</sup>.

**Colorantes Básicos:** Tintura directa de lana, seda y de fibras acrílicas, con ellos se obtienen colores vivos, brillantes y con buenas solidez.

**Colorantes Directos (Sustantivos):** Se usan para tintura de fibras celulósicas. Se absorben directamente por las fibras en soluciones acuosas; existen dos familias de colorantes directos:

- **Colorantes Azoicos:** Son derivados de las aminas del difenilo. En la figura 7., N puede ser -HN-NH-, arildiaminas, enlace simple de bencidínicos, -CH=CH-, etilbénicos, -NH-, -O-, -S-, -CONH, -NH-CO-NH-. En la constitución de estos colorantes hay grupos aromáticos unidos a un grupo azo. Son utilizados en el teñido de fibras sintéticas, ya que son fabricados expresamente para ese fin.

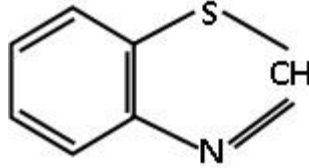


**Figura 7.** Estructura colorantes azoicos.

**Colorantes Tiazolicos:** Contienen en su molécula el anillo tiazolico como se muestra en la Figura 8. Estos colorantes son solamente amarillos, anaranjados y pardos.

---

<sup>1</sup> La solidez del color de un material (en este caso textil) informa la resistencia a las variaciones cromáticas producidas por acción de la radiación, de agentes climáticos, de detergentes, etc. [36]



**Figura 8.** Estructura colorantes Tiazolicos [36].

Además, dentro del grupo de los colorantes Directos se encuentran los colorantes ácidos y básicos.

- **Los colorantes básicos**, son sales amónicas o complejos formados por cloruro de zinc o aminas. Algunos de estos colorantes son absorbidos por el rayón y el algodón.
- **Los colorantes ácidos**, son sales de los ácidos sulfúricos o carboxílicos que se precipitan sobre la fibra. Se llaman colorantes ácidos, ya que la constitución química del colorante contiene moléculas de grupos ácidos. Son solubles en agua y se aplican generalmente en fibras de lana, nylon y fibras acrílicas. Su grupo cromóforo es aniónico. De ellos, los azoicos son los tintes amarillos, anaranjados, rojos, escarlatas, marinos sólidos, algunos verde oscuros y marrones (mezcla de varios azoicos).

**Colorantes a la Tina:** Necesitan del oxígeno ambiental para ser efectivos, su constitución química es análoga a las del índigo y necesitan de aglutinantes para su fijación. Son sustancias insolubles que se pueden reducir a materiales alquil-solubles, el colorante se aplica en su forma reducida y se re-oxida en presencia de la fibra. Todos son insolubles en agua y por su reducción en un medio alcalino se transforman en leucoderivados hidrosolubles.

**Colorantes Dispersos:** Empleado para la tintura de rayón, acetatos y poliésteres, son compuestos orgánicos no iónicos que se aplican con un dispersante por su insolubilidad en agua y tienen un alto grado de dispersión. También se usan con auxiliares “carriers”.

**Colorantes Sulfurosos:** Especiales para fibras celulósicas, son económicos pero de resultados pobres de matices. Se llaman así debido a que su molécula tiene azufre, el cual puede ser oxidado con facilidad. Son insolubles en agua, pero solubles en medio alcalino y en presencia de sulfuro sódico como agente reductor.

**Colorantes de Complejo Metálico:** Utilizados para tintura de lana, son de buena solidez.

**Colorantes sobre Mordiente:** El mordiente es un producto que se adiciona a la fibra y es absorbido por ella, pudiendo consecutivamente atraer el colorante. Son poco empleados.

**Colorantes Reactivos:** Empleados en la tintura de fibras celulósicas, mediante reacción química con las moléculas de celulosa. Producen matices de coloreado muy vivos y brillantes. Pueden ser:

**Colorantes reactivos que forman ésteres de celulosa,** los cuales tienen anillos heterocíclicos en su molécula y su reacción se basa en sustitución nucleófila.

**Colorantes reactivos que forman éteres de celulosa,** de los cuales algunos son vivisulfónicos y otros acrililamídicos. Su reacción se basa en el doble enlace  $-C=C-$  capaces de formar un medio alcalino, adicionando núcleos [37].

Existe además una clasificación para los colorantes, desde el punto de vista químico. Entre estos se encuentran los Nitrosos y nitrocolorantes, los azoicos o azocolorantes, colorantes del trifenilmetano, colorantes de la antraquinona, colorantes indigoides, colorantes del aril y triarilmetano, colorantes de xantenos, colorantes oxacinas y dioxacinas, colorantes al azufre.

#### **1.4. Efectos de Colorantes sobre el Medio Ambiente**

La mayoría de los procesos industriales genera residuos que necesitan ser dispuestos o tratados adecuadamente para no crear daños al medio o entorno donde se descargan o se almacenan. Este es el caso de los residuos generados en industrias que utilizan colorantes, generalmente la industria textil, donde los efluentes pueden ser altamente nocivos para el medio ambiente.

En los procesos textiles, además de emplear variedad de productos químicos dependiendo de la fibra a teñir, se utiliza gran variedad de colorantes sintéticos, entre los cuales están colorantes de tipo azo, antraquinónicos, triarilmetano, phtalocianinas, etc. Se estima que cerca del 10% de los colorantes utilizados se pierden en aguas residuales, estos colorantes presentan elevada toxicidad y son difíciles de degradar o eliminar por métodos físicos, químicos y/o biológicos [38].

Uno de los mayores problemas es que los colorantes reactivos, usados ampliamente en esta industria, son altamente solubles en aguas y no biodegradables bajo condiciones típicas aeróbicas en procesos biológicos convencionales [39]. El color oscuro que generan estos colorantes incrementa la turbidez de los cuerpos de agua, afectando los procesos fotosintéticos. Unos de los colorantes más usados son los colorantes reactivos, generalmente de naturaleza azoica y de los que se ha demostrado producen efectos

tóxicos en el ambiente y en los humanos por la exposición a los colorantes o sus metabolitos.

Otras investigaciones demuestran que los colorantes azoicos están formados por aminas aromáticas consideradas agentes cancerígenos además se ha encontrado que un 10% de estos presentan características mutagénicas (McCarthy 1997). La eliminación de colorantes con estructuras aromáticas es resistente a degradación por procesos biológicos convencionales. Se han probado diferentes procesos para remover colorantes desde efluentes textiles como es la adsorción sobre diferentes materiales, el proceso de carbón activado y la turba.

Cuando se descargan estas aguas residuales en el medio acuático, sin un previo tratamiento eficiente, se producen la coloración del medio afectando indirectamente a los peces y en mayor grado a los invertebrados acuáticos que componen su cadena alimenticia. Estas sustancias pueden acumularse en los tejidos animales o aumentar su nivel tóxico del agua en los ríos. En algunos casos, según la composición del colorante, es posible que las descargas aumenten la población de peces y algas debido a su contenido de nitrógeno y fósforo (proceso de eutrofización) [40].

Por otro lado, los colorantes sintéticos básicos como el trifenilmetano, fenacina y tiacina causan menor deterioro ambiental por su mayor fotodegradación o pérdida del color en solución que los tintes básicos modernos o “modificados” como el Azo, Antraquinonoides y otros, que al contrario pierden más fácilmente el color sobre la fibra que en solución.

A pesar que los procesos textiles no liberan grandes cantidades de metales, estas pequeñas concentraciones pueden producir acumulación en los tejidos de animales acuáticos y los efectos se observan a largo plazo y generalmente el tratamiento de este problema es costoso y complicado.

Los colorantes textiles son persistentes en el ambiente y los métodos de eliminación clásicos no son útiles, ya que la oxidación o reducción parcial puede generar productos secundarios altamente tóxicos [41]. Este problema es debido a las variadas y complejas estructuras de los colorantes, la mayoría de origen sintético, solubles en agua, resistentes a la acción de agentes químicos y poco biodegradables. Se estima que 60% de los colorantes utilizados en la industria textil son colorantes reactivos, caracterizados por formar un ión éter con la fibra garantizando mayor duración del color en el tejido. Según las características de solubilidad y estabilidad de estos colorantes, los métodos de floculación, sedimentación o adsorción, comúnmente empleados no sirven para la remoción de estos compuestos [42].

Ante este panorama, la opción hasta ahora más conveniente está en la biorremediación ambiental; la cual se define como un proceso en el que se utilizan organismos biológicos, principalmente bacterias, hongos y diversos vegetales, con el fin de solucionar problemas ambientales específicos como la contaminación y es un proceso

que inicia el hombre para subsanar el medio ambiente, a diferencia de la biodegradación que es producida naturalmente.

Existen varias técnicas de biorremediación desarrolladas en la actualidad, la biorremediación Intrínseca donde el propio medio ambiente soluciona el problema de contaminación, siempre y cuando se presenten las condiciones óptimas aunque se debe controlar este proceso en el caso que se produzcan compuestos secundarios tóxicos. La biorremediación In-situ por su parte, acelera el proceso en el mismo medio cambiando las condiciones ambientales como el pH, la humedad, la temperatura, el oxígeno y añadiendo los nutrientes para que sea posible multiplicar los organismos del lugar o por medio de la inoculación de organismos más eficaces para determinado vertido, en este proceso la adición de nutrientes es la opción más económica y la que ofrece mayores posibilidades de éxito. Y por último la biorremediación Ex-situ en la que el contaminante se extrae y se degrada en otro sitio en condiciones controladas de laboratorio, aunque es un proceso más costoso y difícil de realizar en muchos casos [43].

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La industria textil en Colombia es una de las más importantes, constituye parte significativa de las exportaciones y del sistema productivo del país; representando el 12,1% de la producción industrial del país y está concentrada principalmente en las ciudades de Medellín y Bogotá. Esta industria ha incrementado su prestigio gracias al desarrollo de los factores de competitividad de los productos textiles, los cuales precisamente coinciden con las etapas del proceso que generan riesgos ambientales.

Los diferentes procesos textiles, principalmente los procesos finales de acabado de telas, tintura y teñido, generan residuos con alta carga contaminante dada por los colorantes y otras sustancias (carga orgánica como DBO<sub>5</sub>, DQO, fenoles, tensoactivos, metales, sulfuros y detergentes); cuando estos efluentes son descargados sin el debido tratamiento, generan impactos ambientales que van desde perjudicar tuberías de alcantarillados hasta afectar los niveles de oxígeno disuelto, deteriorando la calidad de las aguas y alterando el equilibrio de ecosistemas acuáticos.

Según estadísticas del DANE, el consumo de colorantes textiles en Colombia es bastante alto (4200 toneladas por año, datos de 2005) [44], por lo cual, los colorantes textiles representan uno de los factores que podrían perjudicar el medio ambiente por su característica de persistencia en el mismo, por poseer estructuras muy variadas y complejas de origen sintético, muy solubles en agua, poco biodegradables y porque los métodos de eliminación clásicos no son útiles debido a que oxidaciones o reducciones parciales pueden generar productos secundarios altamente tóxicos.

De igual forma, los problemas que generan los efluentes con cargas considerables de colorantes, tienen que ver con la contaminación estética o visual; modifican el color natural del agua y actúan como filtro, que impide el paso natural de radiación luminosa en el cuerpo de agua suprimiendo los procesos fotosintéticos, que son vitales para el equilibrio del hábitat o medio de descarga, por lo que su presencia debe ser controlada [45].



### 3. HIPÓTESIS

- El hongo *Anthracophyllum discolor* tiene la potencialidad en la decoloración de efluentes industriales fuertemente coloreados.
- En efluentes industriales con colorantes, las enzimas de la especie *Anthracophyllum discolor* decoloran los colorantes.
- La concentración de colorante del efluente influye directamente sobre el crecimiento de los hongos y su eficiencia en la decoloración de efluentes coloreados.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1. OBJETIVO GENERAL**

Analizar la potencialidad del hongo *Anthracophyllum discolor* en la biodegradación de efluentes industriales con colorantes.

### **4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Estudiar el efectos de la concentración de diversos colorantes, sobre el crecimiento de la especie *Anthracophyllum discolor* y sobre su capacidad degradadora.
- Evaluar la capacidad de decoloración de la especie *Anthracophyllum discolor* en aguas sintéticas y el efecto de la concentración salina.
- Determinar el crecimiento de biomasa fúngica en los efluentes residuales industriales no estériles.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Materiales

#### 5.1.1. Microorganismos y Medios de Cultivo

El hongo *Anthracoxyllum discolor* se obtuvo de la colección de cultivos del Grupo de Bioprocesos de la Universidad de Antioquia, conservada como stock en cultivos sobre tubos de agar conservación. Se hicieron repiques cada tres meses sobre caja Petri de agar conservación para garantizar la viabilidad de la cepa. La cepa es transferida periódicamente a cajas de Petri con medio de mantenimiento, llevadas a incubación por 5 días a 30°C. Para realizar los diferentes experimentos se prepara inóculo utilizando trozos de agar del medio de mantenimiento de 9 mm de diámetro en un erlenmeyer de 1 L con 100 mL de medio de cultivo, incubándolo durante 5 días a 30°C en condiciones estáticas. Al generarse una biopelícula sobre toda la superficie del medio, el hongo se homogeniza en condiciones estériles por 30 segundos. En la Tabla 2 se muestran las composiciones para los respectivos medios utilizados.

**Tabla 2.** Medio de Conservación, Mantenimiento y Cultivo para Hongos Ligninolíticos

<b>Composición de Medio de Conservación</b>	
Agar	15 g/L
Glucosa	20 g/L
Peptona	5,0 g/L
Extracto de Levadura	2,0 g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g/L
MgSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,5 g/L
Serrín	2,0 g/L
pH	5,5
<b>Composición de Medio de Mantenimiento</b>	
Agar	15 g/L
Glucosa	15 g/L
Extracto de Malta	3,5 g/L
pH	5,5
<b>Composición de Medio de Cultivo</b>	
Glucosa	10 g/L
Peptona	5,0 g/L
CaCl <sub>2</sub>	0,1 g/L
Trazas de sales	100 mL/ L
Tiamina	2,0 mg/L
pH	4,5

### **5.1.2. Colorantes empleados en los Ensayos**

Se utilizaron colorantes estándares y colorantes industriales. Los ensayos de decoloración con colorantes industriales se realizaron con colorantes ácidos (Turquesa Erionyl® y Rojo Erionyl®), reactivo (Rojo Cibacron®) y disperso (Azul Terasil®). El ensayo de decoloración en medio sólido, además de realizarse con los colorantes industriales, se realizó con los estándares; Azul de Metileno, Naranja de Metilo y Rojo Congo (Anexo A).

## **5.2. Métodos**

Los resultados de las respectivas mediciones descritas a continuación fueron almacenados revisando la representatividad y homogeneidad de los mismos, teniendo en cuenta las variables estadísticas que permitieron definir su competencia para el análisis en este trabajo.

### **5.2.1. Determinación de la capacidad decolorativa de *A. discolor* en medio sólido.**

Se utilizaron cajas de Petri con medio de mantenimiento y colorante con concentración de 150 ppm. Las cajas se inocularon con trozos de agar colonizado de 9 mm de diámetro y se incubaron a 30°C midiendo diariamente el halo de crecimiento y decoloración. Esta prueba se realizó para colorantes estándares e industriales.

### **5.2.2. Determinación de la capacidad decolorativa de *A. discolor* en medio líquido.**

#### **- Ensayo de Tolerancia de *A. discolor* con colorantes Industriales a diferentes concentraciones**

Para este ensayo se emplearon erlenmeyers de 500 mL, con 180 mL de medio de cultivo (Tabla 2) y 20 mL de biomasa, suplementado con cada colorante; la incubación se realizó en el agitador orbital GUFA, a 30° C y 175 rpm. Se evaluó la tolerancia del hongo a diferentes concentraciones de los colorantes analizando el porcentaje de degradación.

Adicionalmente se prepararon controles de biomasa inactiva [46] en erlenmeyers de 100 mL con 36 mL de medio de cultivo y 4 mL de biomasa para cada concentración de colorante, y abiótico en un erlenmeyer de 100 mL con 40 mL de medio de cultivo y con colorante a 400 ppm; con el fin de determinar si existe adsorción sobre la biomasa o degradación del colorante sin la presencia del hongo. En ambos casos se conservaron las mismas condiciones de incubación.

#### **- Concentración de biomasa de *Anthracophyllum discolor* con colorantes industriales a diferentes concentraciones.**

Este ensayo fue realizado sin y con colorantes industriales, en erlenmeyers de 100 mL, con 36 mL de medio de cultivo y 4 mL de biomasa, cada colorante fue suplementado con las diferentes concentraciones. Se llevó a incubación por 12 días al agitador orbital GUFA, a 30°C y 175 rpm. La concentración de biomasa en gramos por litro, se midió por el método del peso seco para los días 6 y 13.

### **5.2.3. Ensayo de Tolerancia de *A. discolor* con mezcla de colorantes Industriales**

Se utilizaron erlenmeyers de 100 mL, con 36 mL de medio de cultivo y 4 mL de biomasa, adicionando la cantidad correspondiente de cada colorante al mismo erlenmeyer. La concentración de cada colorante fue de 150 ppm para obtener una concentración final de mezcla de 600 ppm, la incubación se realizó en agitador orbital GUFA a 30° C y 175 rpm por 12 días. Este ensayo se realizó por triplicado, con el fin de analizar el comportamiento del hongo a la mezcla de colorantes y se obtuvo de este, el porcentaje de decoloración para la mezcla y para cada colorante.

### **5.2.4. Ensayo de capacidad decolorativa de *A. discolor* en efluente sintético y en efluente textil (agua residual real)**

En esta fase del trabajo, se evaluó la capacidad de decoloración del hongo *Anthracoxyllum discolor* en aguas sintéticas y en efluentes reales estériles. Las aguas sintéticas son: mezcla de colorantes industriales en medio Kirk modificado y agua preparada en composición de colorantes y sales en medio Kirk modificado. Además se realizó el estudio de producción de biomasa en estas diferentes aguas. Finalmente se realizaron ensayos a diferentes concentraciones de sales en el agua sintética preparada con mezcla de colorantes y medio Kirk modificado con el fin de establecer el efecto que estas tienen sobre la capacidad de decoloración del *A. discolor*.

En la segunda parte del ensayo se utilizó agua residual obtenida de una industria textil (colorantes tipo tina y reactivo), se preparó el medio de cultivo normalmente utilizado pero reemplazando el agua destilada por el agua residual textil.

#### **- Efluente Sintético**

En erlenmeyers de 100 mL, se adicionó 36 mL de medio de cultivo suplementado con mezcla de colorantes industriales a una concentración final de 600 ppm y 4 mL de inóculo correspondiente a una concentración de biomasa de 10%. El medio de cultivo usado fue el medio Kirk modificado (ver numeral 5.1.1), el cual fue suplementado con NaCl (30 g/L), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5 g/L) y NaOH (1,5mL/L). La incubación se realizó en el agitador orbital GUFA a 30° C y 175 rpm. Este ensayo se realizó por triplicado, para determinar el comportamiento de *A. discolor* frente al efluente sintético y el efecto sobre su crecimiento y capacidad degradativa. Se obtuvo el respectivo porcentaje de degradación para la mezcla y para cada colorante. Además se determinó la concentración de biomasa por muestra destructiva, mediante el método de peso seco para los días 6 y 13.

#### **- Efluente Textil (Agua Residual Real)**

El montaje se realizó en erlenmeyers de 500 mL con 180 mL de medio de cultivo preparado con agua residual textil y 20 mL de inóculo, por triplicado para cada tipo de agua residual. Se incubó en el agitador orbital a 175 rpm y 30°C durante 12 días.

Adicionalmente, se realizó un ensayo de control sin biomasa en erlenmeyer de 100 mL con 40 mL de medio para establecer si hay decoloración abiótica del agua residual y un control con biomasa inactiva en erlenmeyer de 250 mL con 90 mL de medio y 10 mL de biomasa

inactiva para determinar si hay adsorción del color por parte de la biomasa. En los dos casos se conservaron las condiciones de incubación mencionadas.

#### **5.2.5. Efecto de diferentes concentraciones salinas sobre *A. discolor*.**

Para evaluar el comportamiento de *A. discolor* en diferentes concentraciones salinas, se preparó el medio de cultivo, modificado con la correspondiente concentración salina (NaCl). Los niveles de sales fueron respectivamente 0,15 g/L, 9 g/L, 20 g/L, 30 g/L, 40 g/L

##### **- Capacidad Decolorativa**

El ensayo se realizó con el colorante Poly R 478 a una concentración de 200 ppm, en erlenmeyers de 100 mL con 4mL de biomasa y 36 mL de medio de cultivo y la correspondiente concentración salina. La incubación fue en el agitador orbital GUFA a 30° C y 175 rpm por 12 días. Se determinó la tolerancia de *A. discolor* frente a las diferentes concentraciones salinas mediante el barrido espectrofotométrico, el cual proporcionó el porcentaje de decoloración. Además, se realizó la medición de consumo de sustrato para cada uno de los niveles de sales. Las mediciones en ambos casos se realizaron cada dos días.

##### **- Actividad Enzimática y Consumo de Sustrato**

En este ensayo se utilizaron erlenmeyers de 250 mL con 90 mL de medio de cultivo, modificado con cada concentración salina y 10 mL de biomasa. La incubación fue en el agitador orbital GUFA a 30° C y 175 rpm. Se tomaron muestras cada dos días con el fin de medir actividad enzimática de Manganese Peroxidasa, Lignino Peroxidasa y Lacasa. También se realizó la medición de consumo de sustrato.

##### **- Concentración de Biomasa**

Con 4mL de biomasa y 36 mL de medio de cultivo, modificado con las concentraciones salinas mencionadas, en erlenmeyer de 100 mL, se realizó el montaje con el fin de determinar la concentración de biomasa en g/L. Se llevó a incubar en un agitador orbital a 30° C y 175 rpm. La determinación de concentración de biomasa fue por el método de peso seco con muestras destructivas y por duplicado, para los días 6 y 13.

##### **- Capacidad decolorativa en mezcla de colorantes industriales**

Para este ensayo se utilizaron erlenmeyers de 100 mL, con 4 mL de biomasa y 36 mL de medio de cultivo modificado con las concentraciones salinas y suplementado con cada colorante a 150 ppm para obtener una concentración final de mezcla de 600 ppm, la incubación se realizó en un agitador orbital a 30° C y 175 rpm.

Este ensayo se realizó por duplicado y con el fin de analizar la capacidad decolorativa del hongo con concentración salina. Para determinar el porcentaje de degradación, se realizó el barrido de cada muestra los días 0, 6 y 13. Además se determinó concentración de biomasa los días 6 y 13 por duplicado y muestra destructiva, midiendo además actividad enzimática y consumo de sustrato los días 6 y 13.

### **5.2.6. Ensayo de Decoloración por *A. discolor* en Efluente Textil en condiciones no estériles.**

En erlenmeyers de 500 mL, se adicionó el agua residual textil diluida, variando diferentes factores como lo fue la proporción de Biomasa (10% ó 20%) y la presencia o ausencia de Glucosa, Peptona y Trazas de Sales respectivamente.

El diseño experimental dio como resultado ocho ensayos con la respectiva combinación de los factores, los cuales se realizaron en dos bloques.

En cada ensayo, se realizó el barrido espectrofotométrico cada 4 días, determinando además la actividad enzimática y la concentración de sustrato en los correspondientes casos. Los resultados se presentaron para las diferentes condiciones en la proporción de Biomasa de 10% y 20% respectivamente.

### **5.3. Métodos analíticos**

Para los ensayos en medio líquido se tomaron las respectivas las muestras y se llevaron a la centrifuga Hettich EBA 8S a 8000 rpm por 10 minutos. Posteriormente se realizó cada una de las pruebas descritas a continuación.

#### **5.3.1. Determinación de capacidad decolorativa y porcentaje de degradación.**

##### **- Medio Sólido**

En el ensayo de Decoloración en medio sólido se midieron los halos de crecimiento y decoloración diariamente, con los cuales se graficó la medida de los halos vs el tiempo, obteniendo las pendientes de cada grafico que representan la velocidad de crecimiento y decoloración respectivamente en cm por día. Es decir que la velocidad de crecimiento y decoloración respectivamente fue:

$$\frac{(\text{Halo}_{\text{final}}(\text{cm}) - \text{Halo}_{\text{inicial}}(\text{cm}))}{\text{Tiempo}_{\text{final}}(\text{días}) - \text{Tiempo}_{\text{inicial}}(\text{días})}$$

##### **- Medio Líquido**

Para los ensayos con colorantes individuales, se tomaron muestras de 1 mL cada día, los primeros seis días y después cada dos días hasta el día trece. Después de la respectiva dilución se midió la absorbancia en el Espectrofotómetro Thermo Spectronic Helios  $\alpha$  a la longitud de onda correspondiente para cada colorante (Anexo A). Con estos valores se calculó la concentración de cada colorante utilizando las curvas de calibración de cada uno (Anexo C); finalmente se obtuvo el porcentaje de degradación:

$$\text{Porcentaje de Degradación: } \frac{\text{Concentración}_{\text{inicial}} - \text{Concentración}_{\text{final}}}{\text{Concentración}_{\text{inicial}}} * 100$$

Para los ensayo de mezcla de colorantes se tomaron muestras de 1 mL cada tres días a partir del día cero hasta el día trece, después de diluir la muestra se realizó un barrido en el espectrofotómetro con un rango de longitud de onda comprendido entre 450nm y 700nm.

Con los gráficos de resultado (Absorbancia vs longitud de onda) se realizó el cálculo del área bajo la curva y se obtuvo el porcentaje de degradación para la mezcla de colorantes:

$$\text{Porcentaje de Degradación: } \frac{\text{Área}_{\text{inicial}} - \text{Área}_{\text{final}}}{\text{Área}_{\text{inicial}}} * 100$$

De las mismas gráficas de barrido se obtuvo el valor de Absorbancia correspondiente a la longitud de onda de cada colorante con el fin de establecer la degradación de cada uno de estos en la mezcla, obteniendo de igual forma el porcentaje de degradación:

$$\text{Porcentaje de Degradación: } \frac{\text{Absorbancia}_{\text{inicial}} - \text{Absorbancia}_{\text{final}}}{\text{Absorbancia}_{\text{inicial}}} * 100$$

### 5.3.2. Determinación de concentración de Biomasa.

Para este análisis se realizaron cultivos independientes debido a la dificultad de tomar una muestra representativa de la biomasa. Se filtró al vacío la muestra contenida en un erlenmeyer empleando filtros Wathman N° 42 previamente secados a 105 °C y pesados. Después de filtrar la muestra, los filtros con biomasa fueron secados nuevamente en estufa a 105°C por 2 horas y pesados. La concentración de biomasa se obtuvo por la diferencia de peso de los filtros y dividido por el volumen filtrado:

$$\text{Concentración de Biomasa} = \frac{\text{Filtro con biomasa} - \text{Filtro seco (g)}}{\text{Volumen filtrado (mL)}}$$

### 5.3.3. Determinación de azúcares reductores.

La medición de la concentración de glucosa en los cultivos líquidos, se realizó por el método de DNS ó Técnica del Ácido 3,5- dinitrosalicílico (Anexo D). A cada muestra previamente diluida, se agrega 1mL del reactivo DNS sin fenol y se calienta en ebullición por 5 minutos; después se detiene la reacción con hielo por 5 minutos más. Finalmente se lee la absorbancia en el Espectrofotómetro Thermo Spectronic Helios  $\alpha$  a 540 nm. La concentración de glucosa se obtiene con la curva de calibración del reactivo DNS. Esta prueba se realizó por duplicado para todos los casos.

### 5.3.4. Determinación de Actividad Enzimática.

Para este análisis se tomó 5mL de muestra del medio de cultivo y se utilizó la cantidad requerida según el método de medición de cada enzima, adicionando los correspondientes reactivos. La actividad de las tres enzimas, se define como la cantidad de enzima necesaria para transformar 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por minuto (U).

**Manganesoperoxidasa:** Se determina mezclando 200  $\mu\text{L}$  de malonato de sodio (50 mM, pH 4,5), 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{MnSO}_4$  (20 mM), 600  $\mu\text{L}$  de muestra previamente diluida, finalmente 50  $\mu\text{L}$  de 2,6 DMP (2,6-dimetoxifenol) (20 mM) y 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (4mM). Se midió la Actividad en el Espectrofotómetro Thermo Spectronic Helios  $\alpha$  a 468 nm con un tiempo de medida de 1 minuto. El coeficiente de absorptividad molar es  $\epsilon = 18300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .



**Lacasa:** La mezcla para esta reacción contiene 200  $\mu\text{L}$  de malonato de sodio (50 mM, pH 4,5), 150  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ , 600  $\mu\text{L}$  de muestra previamente diluida y 50  $\mu\text{L}$  de 2,6 DMP (2,6-dimetoxifenol) (20 mM). La Actividad se midió en el Espectrofotómetro Thermo Spectronic Helios  $\alpha$  a 468 nm con un tiempo de medida de 1 minuto. El coeficiente de absorptividad molar es  $e = 49000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

**Ligninperoxidasa:** Se midió con la mezcla de 200  $\mu\text{L}$  de tartrato de sodio (250 mM, pH 3,0), 200  $\mu\text{L}$  de Alcohol veratrílico (10 mM), 500  $\mu\text{L}$  de muestra previamente diluida, y finalmente 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (4mM). Se determinó la Actividad en el Espectrofotómetro Thermo Spectronic Helios  $\alpha$  a 310 nm con un tiempo de medida de 1 minuto. El coeficiente de absorptividad molar es  $e = 9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. TOLERANCIA Y DECOLORACIÓN DE COLORANTES INDUSTRIALES Y ESTÁNDARES POR *A. discolor*

En el presente estudio se evaluó la potencialidad del hongo de pudrición blanca *Anthracoxyllum discolor* en el tratamiento de efluentes de la industria textil. Para este fin, se estudio el efecto de diferentes concentraciones de colorantes sobre el crecimiento y la capacidad decolorativa, la decoloración de aguas sintéticas y efluentes reales estériles y no estériles y el efecto de la concentración salina en el crecimiento, producción enzimática y decoloración.

Debido a las diferentes estructuras y naturaleza química de los colorantes textiles, es importante determinar la influencia de estos en el metabolismo del hongo *A. discolor*, además de estudiar la capacidad decolorativa característica en los hongos de pudrición blanca, específicamente en este hongo. De esta manera y según los objetivos planteados para esta investigación, se determinó el crecimiento de *Anthracoxyllum discolor* en medio sólido y líquido y en presencia de colorantes estándares e industriales utilizados extensamente en la industria textil.

#### 6.1.1 Efecto de la concentración de los colorantes sobre el crecimiento y capacidad decolorativa de *Anthracoxyllum discolor* en medio sólido.

El ensayo de crecimiento en medio sólido, se realizó con los colorantes estándares Azul de Metileno, Naranja de Metilo y Rojo Congo y con los colorantes industriales Azul Terasil, Rojo Cibacron, Rojo Erionyl y Turquesa Erionyl y permitió establecer que *A. discolor* crece satisfactoriamente en medio de mantenimiento suplementado con cada colorante, colonizando el área total de la caja de Petri en promedio a los 12 días de incubación. Se comparó el crecimiento micelial del hongo en centímetros en el medio de mantenimiento (Figura 9) con y sin suplemento de colorante en una concentración de 150 mg/L. El crecimiento del micelio de *A. discolor* empezó aproximadamente a 8 horas de iniciar la incubación en la mayoría de los colorantes, sin embargo, en dos de los colorantes estándares, el Azul de Metileno y el Rojo Congo, el crecimiento del micelio fue a partir del día 10 y del día 4 respectivamente. Este tardío crecimiento pudo estar influenciado por los compuestos estructurales de estos dos colorantes, los cuales al parecer inhiben este hongo, teniendo en cuenta el carácter ecotóxico del Azul de Metileno y a la estructura recalcitrante del Rojo Congo.

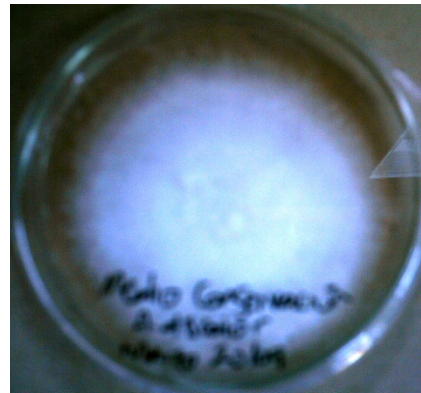
La decoloración de los medios se dio entre el segundo y tercer día para la mayoría de los colorantes a excepción del Azul de Metileno y Rojo Congo, en los cuales el inicio de la decoloración también fue tardío; según Pérez *et al*, 2002, el cambio de coloración en el medio, indica la degradación de los compuestos tóxicos constituyentes de los colorantes, lo que a su vez se puede relacionar con la excreción de las enzimas ligninolíticas consideradas como las responsables del mecanismo de detoxificación que poseen algunos hongos de pudrición blanca[10].



(A)



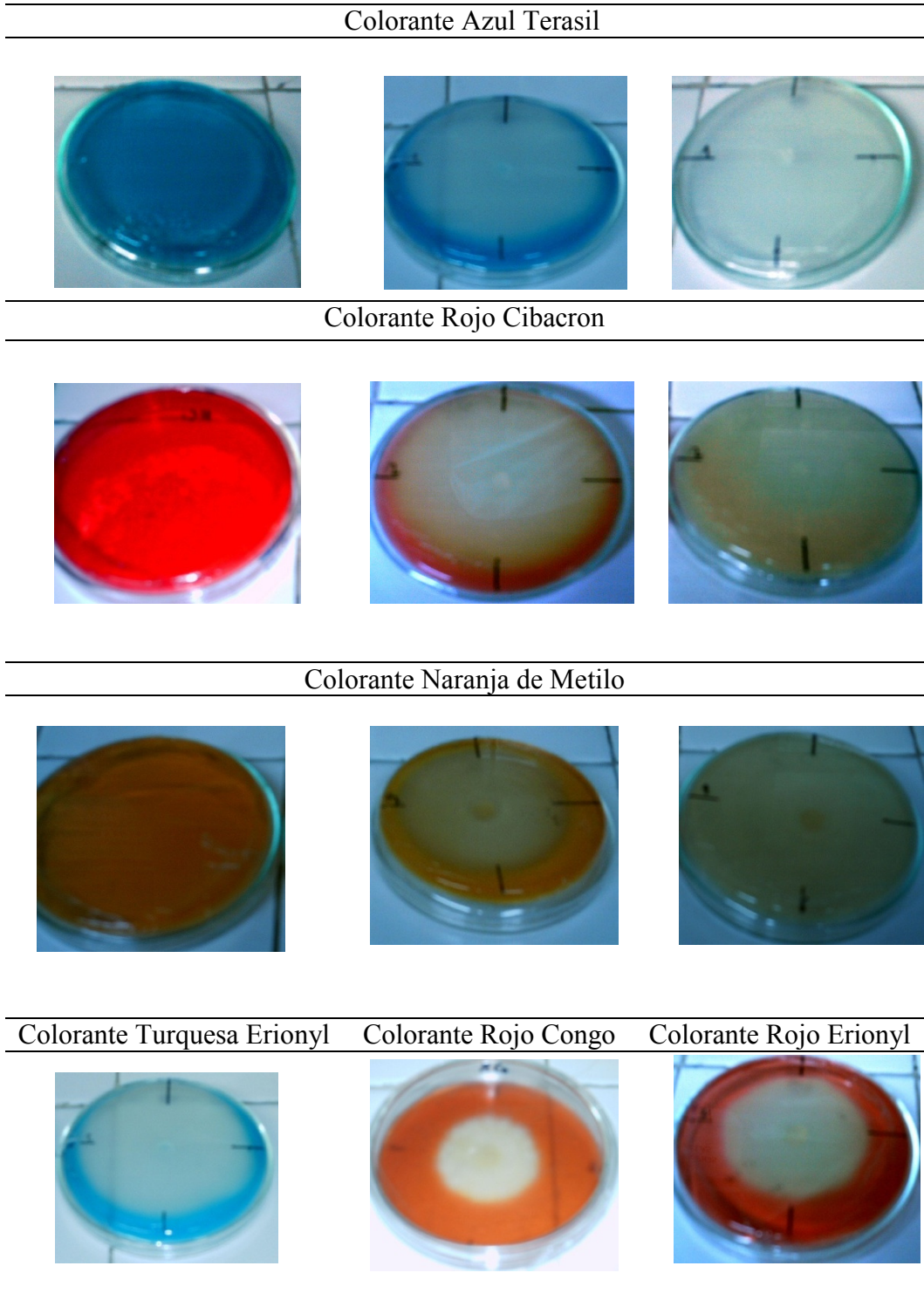
(B)



(C)

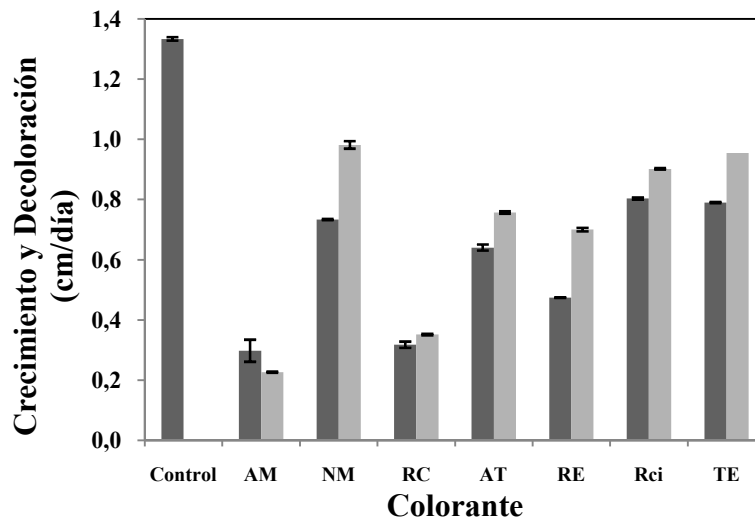
**Figura 9.** Crecimiento de *A. discolor* en (A) Medio de Mantenimiento; (B) Medio de Cultivo; (C) Medio de Conservación.

Las mediciones diarias del micelio y la decoloración visible en el agar (Figura 10) , permitieron calcular las respectivas velocidades de crecimiento y de decoloración de *Anthracoephyllum discolor* en centímetros por día (Figura 11) junto con el ensayo de control, realizado en medio de mantenimiento sin colorante se estableció que el hongo se ve afectado en su tiempo de crecimiento por la presencia de colorante; en el ensayo de control se encontró un valor de 1,33 cm/s en crecimiento, sin embargo no se inhibe su capacidad decolorativa.



**Figura 10.** Decoloración en medio sólido por *Anthracophyllum discolor*

Teniendo en cuenta las diferentes estructuras de los colorantes, se observan variaciones importantes en las velocidades de crecimiento y decoloración, lo que indica que ciertos tipos de colorantes podrían afectar mayormente el desarrollo del hongo, como se muestra en la Figura 11, los colorantes Azul de Metileno, Rojo Congo y Rojo Erionyl son los que retardan más el crecimiento micelial del hongo; los demás colorantes presentan valores cercanos entre sí, pero siempre por debajo del control de crecimiento sin presencia de colorante.



**Figura 11.** Velocidad de crecimiento (■) y velocidad de decoloración (■) de *Anthracophyllum discolor*.

La mayor velocidad de crecimiento se presentó en el medio suplementado con Naranja de Metilo en el grupo de los colorantes estándares; en el grupo de los colorantes industriales, los valores mayores los presentó el medio suplementado con Rojo Cibacron y Turquesa Erionyl (Figura 11), por otro lado el medio suplementado con Azul de Metileno presentó la velocidad de crecimiento menor y de los colorantes industriales, este valor fue dado por el Rojo Erionyl. Los valores de velocidad de decoloración son proporcionales a la velocidad de crecimiento para los mismos colorantes mencionados.

Respecto a los colorantes Azul de Metileno y Rojo Congo los cuales presentaron las menores velocidades de decoloración, se puede decir que este resultado podría depender de la Clase del hongo y de la tolerancia que este tiene hacia la composición del colorante. Algunos hongos como *A. niger*, *A. ochraceus*, *A. terreus* y *P.citrinum* son capaces de decolorar el Azul de Metileno después de 48 horas de incubación y de la misma forma su velocidad de crecimiento (0,5 cm/día en promedio) fue mayor a siendo esta proporcional a la velocidad de decoloración [47].

De la misma forma, el colorante Rojo Congo ha sido decolorado por *D. triramosum* alcanzando uno de los mayores valores de velocidad de crecimiento dentro del conjunto de hongos con el que fue analizado y mayor a la determinada en este estudio [48]; por lo cual al igual que lo dicho en aquella investigación, también para este caso se puede decir que la

velocidad de crecimiento y decoloración pueden depender de la cepa utilizada; teniendo en cuenta que los hongos que han sido capaces de decolorar estos dos colorantes son de la Clase de los deuteromicetos, de los cuales se ha atribuido su capacidad decolorativa a la adsorción miceliar y/o a la biotransformación por las enzimas oxidativas extracelulares Lacasas y Peroxidasas [48].

Esta capacidad decolorante de los diferentes hongos ligninolíticos en medio sólido, también fue identificada por Rodríguez *et al*, 2000, en varios colorantes textiles Reactivos (Azul) y Ácidos (Azul y Negro) donde una de las cepa con mayor capacidad decolorante fue *P. ostreatu* [29].

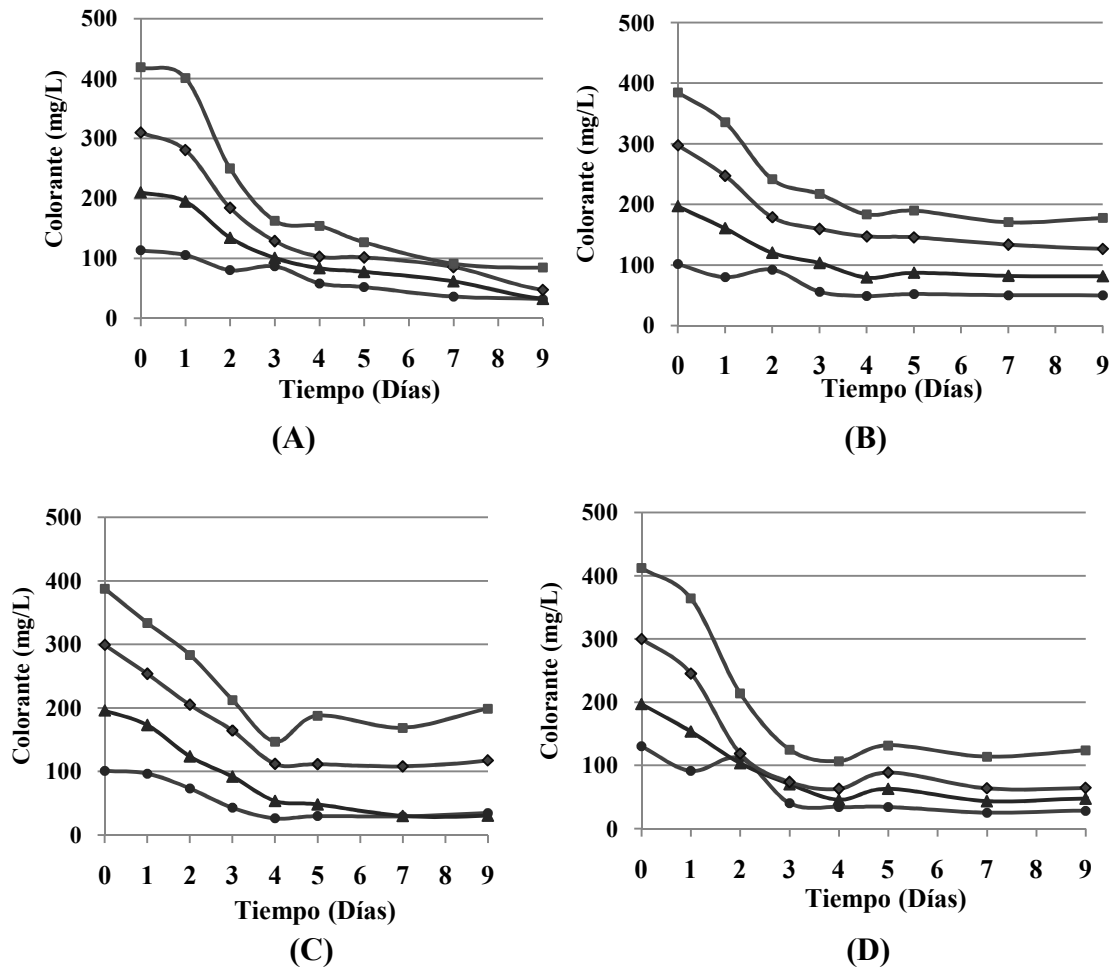
De este mismo hongo, en otra investigación se encontró que las velocidades de crecimiento y decoloración (entre 3 cm/día y 6 cm/día) en presencia de colorantes recalcitrantes son considerablemente mayores a las encontradas en este estudio [31], sin embargo se podrían atribuir estas diferencias en los resultados más que a la composición de los colorantes, a la afinidad o tolerancia que tengan los hongos por estos, teniendo en cuenta que en otro estudio realizado con *Phanerochaete chrysosporium* se presentaron valores menores de velocidad de crecimiento (0,3-0,4 cm/día) en presencia de colorantes básicos y los autores concluyeron para ese caso la baja afinidad que tiene *P. chrysosporium* por esta clase de colorantes a diferencia de la que presenta por colorantes Ácidos y Reactivos [49].

#### **6.1.2. Efecto de la concentración de los colorantes sobre la capacidad decolorativa de *Anthracophyllum discolor* en medio líquido.**

Este ensayo fue realizado en tres bloques, los cuales conservaron las mismas condiciones de incubación durante el periodo de prueba de 12 días (Figura 12). Se observó aparentemente un buen crecimiento de biomasa en todas las concentraciones de colorantes (100 mg/L, 200 mg/L, 300 mg/L, 400 mg/L) apreciación que se demostró posteriormente determinando la concentración de biomasa (ver numeral 6.1.3). El crecimiento del micelio de este hongo, confirma al igual que el experimento en medio sólido, la capacidad de *A. discolor* para crecer tolerando algunos de los compuestos constituyentes de los colorantes. En las Figura 13 se muestra la reducción en la concentración de cada colorante durante el periodo de prueba con *A. discolor*.



**Figura 12.** Ensayo en bloque de decoloración por *A. discolor*.



**Figura 13.** Decoloración de Colorantes Industriales por *Anthracophyllum discolor*. (A) Azul Terasil; (B) Rojo Cibacron; (C) Rojo Erionyl; (D) Turquesa Erionyl. ● 100 ppm; ▲ 200 ppm; ◆ 300 ppm; ■ 400 ppm.

Como lo muestra la Figura 13, en los colorantes se da un comportamiento similar en la disminución de color; esta decoloración se presenta desde el segundo día de incubación y la reducción máxima de color generalmente se da al cuarto día. Es decir que en este lapso de tiempo se alcanzó en promedio un porcentaje de degradación entre el 45% y el 55%, valores que concuerdan con los valores de decoloración alcanzados a las 48 horas de incubación por el hongo de pudrición blanca *B. adusta*, analizado en un experimento de decoloración para colorantes textiles utilizando igualmente colorantes de tipo ácido y disperso [51].

Los porcentajes de decoloración finales mostrados en la Figura 14, están muy cercanos a los valores de porcentaje de decoloración que han alcanzado otros hongos de la pudrición

blanca en experimentos con colorantes utilizados en la industria textil; *Phanerchaete chrysosporium* ha alcanzado 69% en reducción de color, mientras que *Pleurotus ostreatus* ha logrado 74% y *Colorius versicolor* 63% [30], lo cual indica que el comportamiento de *A. discolor* frente a estos colorantes es el característico de este tipo de hongos, sin olvidar que cada especie está sujeta a diferentes condiciones que pueden variar su capacidad decolorativa y entre las cuales, principalmente se encuentran la temperatura del ambiente, el pH del medio y la afinidad o tolerancia por determinadas sustancias químicas presentes en los colorantes.

El rápido descenso que se presenta en las concentraciones de los colorantes en los primeros tres días de incubación, podría atribuirse al estado inicial del hongo en el medio; cuando intenta adaptarse a este y por lo tanto utiliza mayormente su potencial metabólico y enzimático para sobrevivir, lo cual posiblemente se realizaría paralelamente con la decoloración del medio.

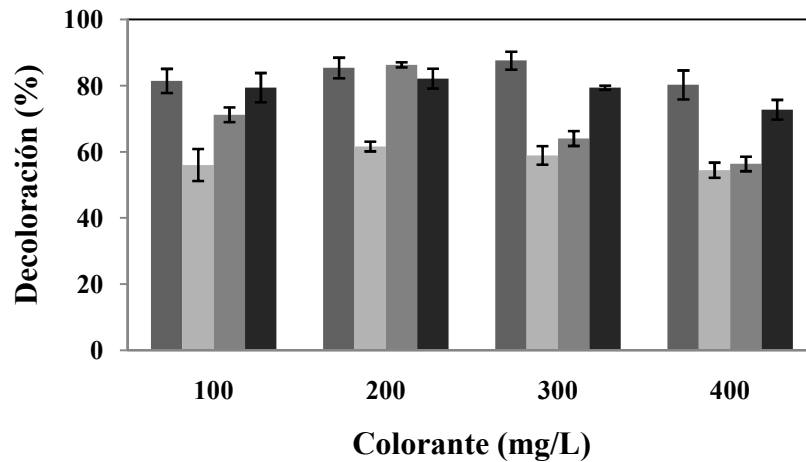
Algunos autores, en trabajos realizados con Hongos Ligninolíticos, afirman que en algunas ocasiones el colorante más que ser descompuesto es adsorbido por la biomasa fúngica [50]. En este sentido, junto con los ensayos realizados, se hicieron controles remplazando la biomasa de *A. discolor* por biomasa inactiva de este hongo con el fin de determinar si hay adsorción (Anexo E); estos resultados demostraron que aunque se presenta una disminución en la concentración de color en los primeros días de prueba; en los últimos días las concentraciones aumentan nuevamente hasta un valor muy cercano al valor inicial, por lo cual no se atribuiría la reducción del color a este fenómeno.

Es importante mencionar que actualmente se considera la existencia de dos mecanismos de decoloración biológica y son la degradación y la adsorción por biomasa y varios estudios concluyen que la biomasa tiene un gran potencial como adsorbente, en especial tratándose de hongos de pudrición blanca, donde pueden ocurrir los dos procesos [11], por lo cual este fenómeno también hace parte importante del futuro tratamiento de aguas residuales coloreadas. Aunque, la adsorción no es un mecanismo principal de decoloración, tiene un papel muy importante en todo el proceso ya que cuando la biomasa adsorbe los grupos cromóforos contenidos en los colorantes, los encierra y permite el contacto con las enzimas responsables de la degradación y que en gran parte están asociadas a la superficie celular [11].

Uno de los hechos relevantes de esta parte del estudio fue comprobar que *A. discolor* puede soportar los colorantes hasta una concentración 400 mg/L, considerando que una de las principales dificultades para el desarrollo de procesos de biorremediación, está en que el organismo que se va a utilizar para dicho tratamiento sea activo metabólicamente al tener contacto con el contaminante [52].

La medición de la Absorbancia a la respectiva longitud de onda (Anexo A), permitió conocer el porcentaje de decoloración para cada uno de los colorantes estudiados; estos valores son presentados en la Figura 14.





**Figura 14.** Porcentaje de Decoloración por *Anthracoxyllum discolor* en colorantes industriales; ■ Azul Terasil; ■ Rojo Cibacron; ■ Rojo Erionyl; ■ Turquesa Erionyl.

El porcentaje de decoloración varía entre el 54% y 87%, sin embargo se observa que la capacidad degradadora del hongo no está determinada por a la concentración en que se encuentre el colorante, ya que para los cuatro colorantes, los valores de decoloración son similares entre concentraciones, sin embargo se observa que la capacidad de decoloración de *Anthracoxyllum discolor* estaría condicionada al tipo de colorante.

Tanto el colorante Azul Terasil como Turquesa Erionyl presentaron los mayores porcentajes de degradación desde concentraciones de 100 mg/L hasta 400 mg/L; entre 80 % y 87 % para el colorante Azul Terasil y entre 72 % y 82 % para el colorante Turquesa Erionyl, mientras que los colorantes Rojo Erionyl y Rojo Cibacron presentan porcentajes menores, para el mismo rango de concentración, los porcentajes observados son de 56% hasta 86% para el colorante Rojo Erionyl y de 54% hasta 62% para el colorante Rojo Cibacron. Esto conlleva a plantear que la capacidad degradativa de *A. discolor* depende del tipo del colorante a tratar y su composición química más que por la concentración en que dicho colorante se encuentre en un efluente. Este comportamiento ha sido comprobado con otros hongos, Knapp *et al*, en una investigación sobre decoloración por hongos de pudrición de la madera, también concluyo según sus resultados, que la descomposición depende tanto de la estructura química del colorante como del carácter específico del hongo [53].

Sin embargo, al considerar la velocidad de decoloración de los colorantes industriales a 200 mg/L se puede inferir que esta no está relacionada con la capacidad decolorativa para cada uno de estos; como se observa en la Tabla 3, el colorante Azul Terasil presentó la menor velocidad de decoloración al mismo tiempo que es uno de los mayormente decolorados (Figura 14) y de la misma forma el colorante Rojo Cibacron con una mayor velocidad pero con el menor porcentaje de decoloración.

**Tabla 3.** Velocidad decoloración (cm/día) de *Anthracophyllum discolor*.

<b>Concentración (mg/L)</b>	<b>Azul Terasil</b>	<b>Rojo Cibacron</b>	<b>Rojo Erionyl</b>	<b>Turquesa Erionyl</b>
<b>200</b>	0,756	0,901	0,700	0,954

En el Anexo F y G, se muestran el diseño experimental y los valores del análisis de varianza de cada uno de los ensayos con los colorantes respectivamente. Con estos valores, fue posible comparar si los resultados obtenidos de cada bloque son significativamente diferentes entre sí ;los resultados para este trabajo mostraron un nivel de significancia mayor que 0,05 para los ensayos de degradación en medio liquido realizados con los colorantes Azul Terasil, Rojo Cibacron y Turquesa Erionyl, por lo cual se acepta la hipótesis nula que señala que no hay efectos diferenciales entre los tratamientos que en este caso son las diferentes concentraciones en las que se utilizo cada colorante; este hecho confirma lo expuesto anteriormente sobre la dependencia que podría tener la capacidad degradadora de *A. discolor* por la composición de cada colorante pero no por la concentración a la que este se encuentra. Sin embargo, para el colorante Rojo Erionyl, se encontró un nivel de significancia menor de 0,05 lo cual podría indicar que para este colorante a diferencia de los otros, las concentraciones en las que se encuentre este colorante si influyen sobre el porcentaje de degradación final lo cual se demostró al obtener valores de degradación para la correspondiente concentración que van desde 56% hasta 71% mostrando un rango de variación mayor que para los demás colorantes.

Por otro lado, los ensayos realizados con los colorantes Azul Terasil, Rojo Erionyl y Turquesa Erionyl, presentaron valores en el coeficiente de variación menores del 10% (Anexo G) por lo cual se puede decir que la distribución de los datos es homogénea y que no existe gran dispersión entre los resultados obtenidos en cada bloque. Sin embargo, el experimento realizado con el colorante Rojo Cibacron, demuestra un nivel aceptable de dispersión por encontrarse su coeficiente de variación entre 10% y 15%, lo cual podría atribuirse a cambios en la dinámica de degradación del hongo al entrar en contacto con este colorante y no como se pensaría a cambios en las condiciones de experimentación ya que al igual que para los otros colorantes, las condiciones de incubación fueron conservadas durante todo el tiempo de prueba.

En el Anexo G, también se observan los valores correspondientes para la prueba t, la cual representa cómo cada punto de los resultados se ajusta a los otros puntos del modelo que está basado en la totalidad de datos excepto el punto en mención; solo los valores mayores o iguales de 3,5 se deben considerar atípicos [54]. En el mismo anexo, se observa que para cada colorante existe un punto en uno de sus bloques que presenta valor mayor de 3,5 lo cual se puede explicar por las variaciones presentadas en el porcentaje de degradación debidos como se menciona antes a modificaciones de la actividad enzimática, sin embargo la mayoría de los datos están dentro del rango establecido, confirmando homogeneidad en los resultados obtenidos.

Para completar el análisis entre las variables implicadas, se observa el gráfico de probabilidad normal para los residuos, en el cual se muestra como se distribuyen los datos en relación a la distribución normal, que es la distribución esperada de estos mismos. En los gráficos presentados en el Anexo H, los puntos parecen ajustarse a la línea recta, lo cual puede indicar que estos se adecuan bien a esta distribución normal, sin embargo es imprescindible tener en cuenta que aunque los datos se ajusten a una línea recta puede que no provengan de una distribución normal[55].

A pesar que en los gráficos se observa que los residuales siguen la línea recta, hay ciertos puntos en los que algunos valores están alejados aunque estos no sean muchos y de igual forma difieren entre los colorantes, teniendo en cuenta que en los resultados influyen otros factores diferentes de la concentración del colorante y el tipo de colorante que aunque no se incluyeron en el diseño experimental, son importantes para el resultado final de degradación como por ejemplo la actividad enzimática que el hongo este desarrollando en el momento del experimento y algunas variaciones climáticas que puedan afectar las condiciones normales de incubación necesarias para el adecuado crecimiento y desarrollo del hongo.

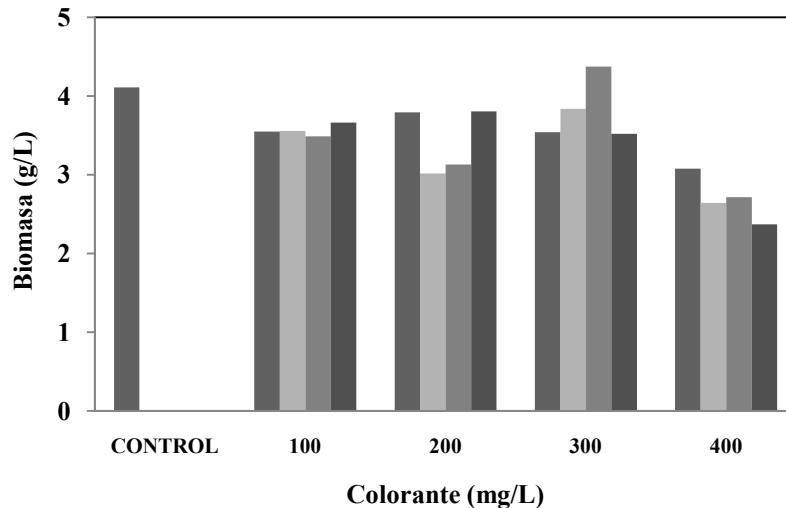
Las diferencias en la decoloración entre colorantes también se han presentado en otros estudios realizados con hongos de pudrición blanca; como es el caso de *P. chrysosporium* en el cual se mostraron diferencias en la decoloración de colorantes con grupos estructurales similares [56], en otra investigación también con *P. chrysosporium* se presentó alta degradación para algunos colorantes mientras que en otros colorantes solo hubo una degradación parcial debida a la toxicidad de estos [56].

Al suponer que las diferencias estructurales de los colorantes definen el grado de decoloración obtenido, es importante conocer que las enzimas encargadas de este proceso pueden presentar cierta susceptibilidad a degradar ciertos colorantes ya que algunos compuestos que son decolorados rápidamente por MnP son resistentes a la LiP y viceversa [56], por lo cual la degradación además de depender del tipo de colorante, también podría depender de la afinidad que tiene las enzimas ligninolíticas por los colorantes utilizados en esta investigación, los cuales son de tipo Acido (Rojo Erionyl y Turquesa Erionyl), Disperso (Azul Terasil) y Reactivo (Rojo Cibacron), por lo cual difieren es su composición y es esta estructura la que tiene gran efecto sobre el grado de decoloración alcanzado por *A. discolor*.

Demostrando la capacidad que tiene *A. discolor* para tolerar y decolorar colorantes textiles, se asume que este efecto es generado por la acción de las enzimas ligninolíticas Peroxidasas (Manganeso Peroxidasa y Ligninoperoxidasa) y Lacasas, las cuales son producidas por los hongos de pudrición blanca. Según Young y Yu, 1997 la capacidad degradadora de este tipo de hongos se debe a estas enzimas, por lo cual su interés biotecnológico se concentra en el tratamiento de efluentes coloreados [57], el cual es también el fin último de este trabajo.

### 6.1.3. Medición de Biomasa de *A. discolor*.

Este ensayo resulta de gran importancia para comprobar el efecto que generan los colorantes sobre el crecimiento del Hongo y fue realizado mediante el método de peso seco con cada uno de los colorantes y a las mismas concentraciones trabajadas anteriormente. En la Figura 15, se observa que la concentración de biomasa se encuentra entre 2,5 g/L y 3,5 g/L, encontrándose que los valores menores se presentan con concentración de colorante de 400 ppm. Al igual que en medio solido, se establece cierta inhibición en el crecimiento de biomasa fúngica por la presencia de colorantes, ya que la concentración de biomasa para el ensayo de control está por encima de la concentración de biomasa con colorantes a las diferentes concentraciones con un valor de 4,2 g/L. Es importante mencionar que a pesar de que el crecimiento de biomasa se ve afectado por la mayor concentración de colorante esto parece afectar en gran medida la decoloración de esta misma concentración, ya que como se menciono anteriormente en el ensayo de decoloración en efluente liquido los colorantes en una concentración de 400 mg/L, también presentaron porcentaje de decoloración satisfactorios. Por otro lado, a diferencia del ensayo de decoloración en medio liquido, observando la Figura 15, es difícil afirmar que la concentración de biomasa está limitada por el tipo de colorante, ya que los resultados presentan una variación considerable en cada colorante a la respectiva concentración.



**Figura 15.** Concentración de Biomasa de *Anthracophyllum discolor* en colorantes industriales: ■ Azul Terasil; ■ Rojo Cibacron; ■ Rojo Erionyl; ■ Turquesa Erionyl.

De la misma forma que para el ensayo de decoloración en medio liquido, el nivel de significancia para todos los ensayos de concentración de biomasa, están por encima de 0,05 lo cual indica que para este caso, la concentración de biomasa no dependería de las concentraciones en las que se encuentre el colorante, sin embargo no es este el resultado que muestra la Figura 15, como se menciono la concentración de biomasa si se afecta por una alta concentración de colorante, pero por otra parte, al observar los ensayos para las concentraciones de colorante de 100 mg/L, 200 mg/L y 300 mg/L se nota que los valores

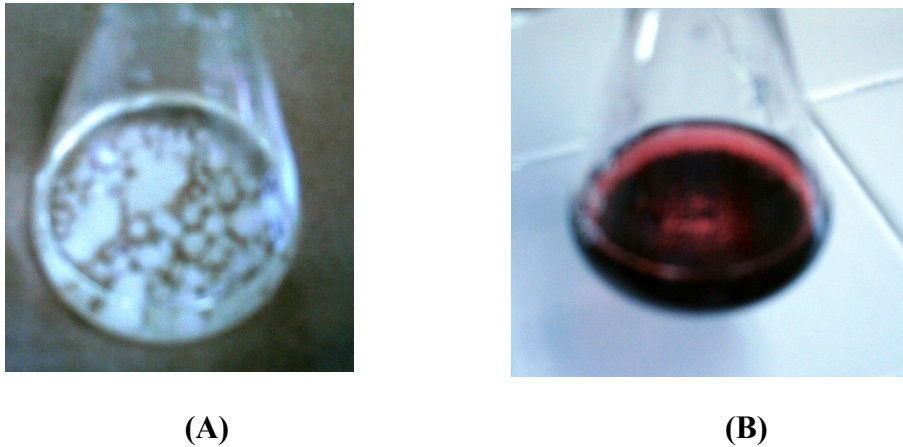
varían dentro del mismo rango, por lo cual podría aceptarse parcialmente la hipótesis de la independencia de variables.

## 6.2. DECOLORACIÓN POR *A. discolor* EN AGUA RESIDUAL SINTÉTICA.

En esta fase del trabajo, se evaluó la capacidad de decoloración del hongo *Anthracoxyllum discolor* en aguas sintéticas y en efluentes reales estériles.

### 6.2.1. Decoloración por *A. discolor* en mezcla de colorantes industriales.

El primer día de cultivo se observó crecimiento del hongo en forma de pellets, morfología que presenta en cultivos sin la presencia de colorantes, lo cual sugiere que el hongo no se vería afectado por la presencia de varios colorantes, aunque se notaron ciertas diferencias como la reducción del tamaño del pellet (Figura 15).



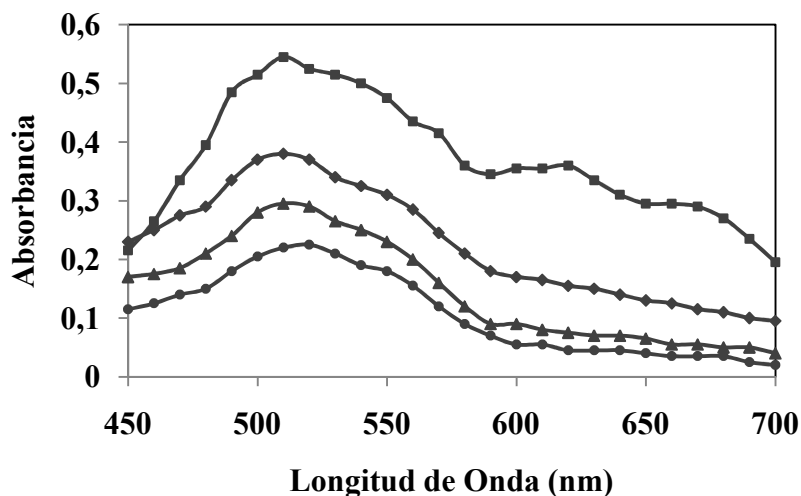
**Figura 16.** Biomasa de *A. discolor* en (A) Control (B) Mezcla de colorantes

En la Figura 17 se muestra el barrido realizado en la mezcla de colorantes en el intervalo de 450 nm a 700 nm, intervalos que comprenden las longitudes de onda de los colorantes industriales trabajados (Anexo A)

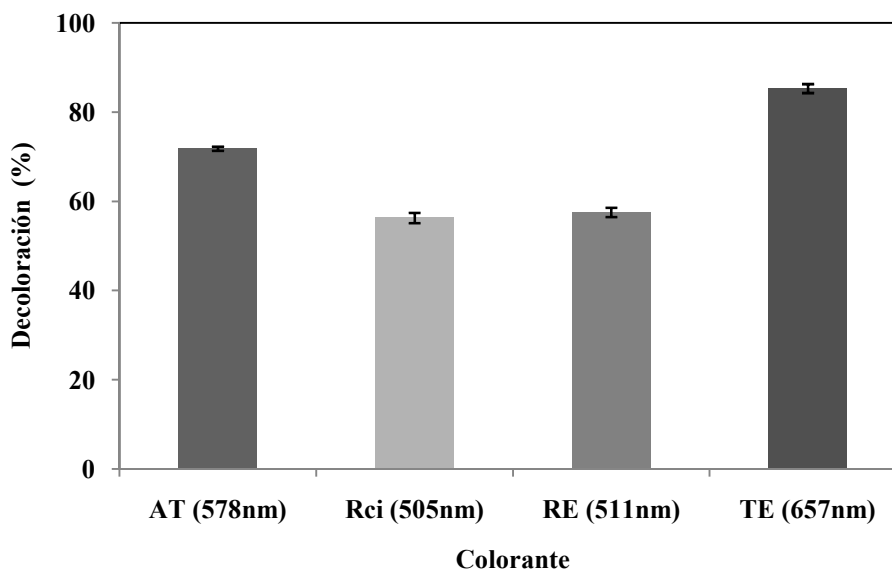
Como lo muestra la Figura 17, el color, en la mezcla se reduce significativamente hasta el día 4 y continua hasta el día 12 pero en menor proporción entre cada medición, lo cual coincide con los resultados obtenidos en el ensayo individual de los colorantes, donde también se presentó la disminución significativa en la concentración de cada colorante hasta el día 4.

Se obtuvo un porcentaje de decoloración de 68 % (Tabla 4); el valor encontrado es similar a los encontrados para la decoloración de los colorantes industriales individuales, por lo cual se puede decir que *A. discolor* también tiene un buen desempeño en presencia de varios colorantes.

A partir de estos barridos se pueden obtener las degradaciones de los colorantes individuales dentro de la mezcla. En la Figura 18 se observan los porcentajes de decoloración, Azul Terasil: 71,8%, Rojo Cibacron: 56,2 %, Rojo Erionyl: 57,5% y Turquesa Erionyl 85,2%, los cuales fueron menores que los logrados para cada colorante a excepción del colorante Turquesa Erionyl que superó el valor de aquel ensayo (82%) (Ver numeral 6.1.2)



**Figura 17.** Decoloración de Mezcla de Colorantes Industriales Rojo Erionyl, Azul Terasil, Rojo Cibacron y Turquesa Erionyl. ■ Día 0; ◆ Día 4; ▲ Día 8; ● Día 12.



**Figura 18.** Porcentaje de Decoloración de Mezcla de Colorantes Industriales Azul Terasil (AT), Rojo Cibacron (RCi), Rojo Erionyl (RE) y Turquesa Erionyl (TE).

Por otra parte se confirma que los colorantes Azul Terasil y Turquesa Erionyl alcanzan los porcentajes de decoloración más altos; lo que permite afirmar, comparando también con el ensayo de colorantes individuales, que el hongo *A. discolor* tiene una mayor capacidad para el tratamiento de colorantes tipo dispersos y directos (ácidos). Además se observa que el hongo no se inhibe en capacidad decolorativa por la presencia de varios colorantes en forma simultánea y a una alta concentración, característica que se encuentran en aguas residuales de la industria textil.

### **6.2.2. Decoloración por *A. discolor* en Agua Residual Textil Sintética.**

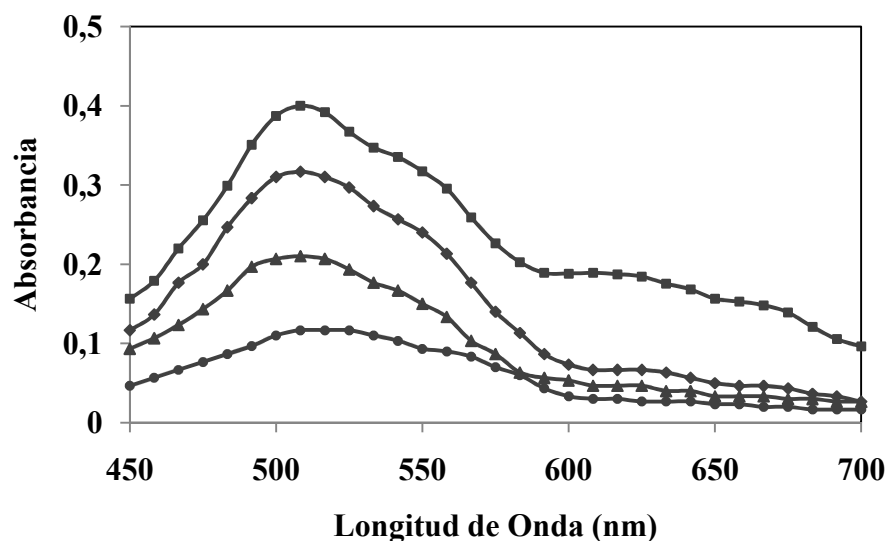
Al suplementar el medio de cultivo con estos aditivos típicos del agua residual textil, se apreció que *A. discolor* puede desarrollar su micelio en estas condiciones, aunque en menor proporción y con una reducción en el tamaño del pellet, características que se observaron en el ensayo de mezcla de colorantes. Esto puede llevar a la conclusión que *A. discolor* es capaz de soportar la presencia de las sustancias propias de los efluentes textiles además de los colorantes. En este sentido, también se determinó la concentración de biomasa en mezcla de colorantes por el método de peso seco para el día 6 con un valor de 1,765 (g/L).

Este resultado se encuentra por debajo de la concentración de biomasa del ensayo control, (4,11 g/L), por lo cual *A. discolor* es afectado en su crecimiento por la presencia de los aditivos y colorantes textiles, sin embargo este hecho al parecer no significa un impedimento para que este hongo efectuó el trabajo de decoloración esperado.

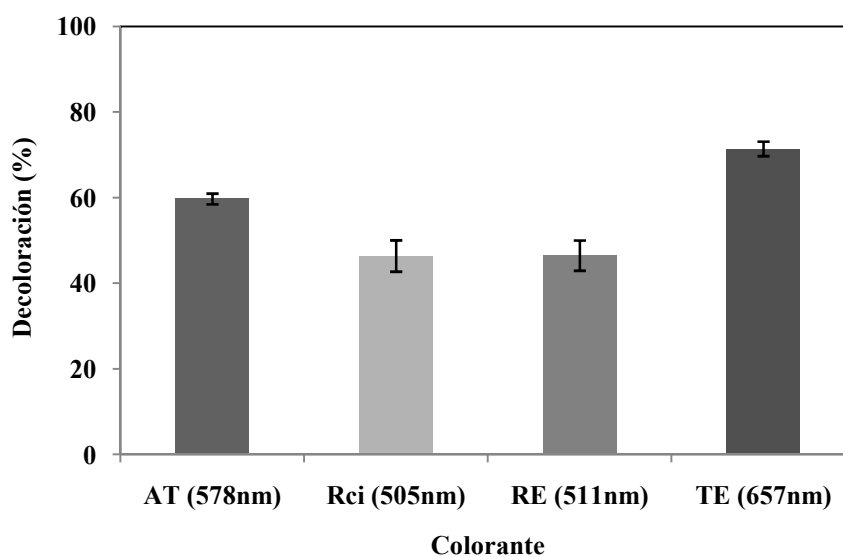
En la Figura 19 se presenta el barrido realizado al efluente sintético; en este caso la mayor reducción de color no se da hasta el día 4 sino que se da proporcionalmente a lo largo de los 12 días del ensayo a diferencia del los resultados para la mezcla de colorantes.

El porcentaje de decoloración alcanzado es del 62 %; se puede afirmar entonces que el hongo *A. discolor* conserva la capacidad decolorativa, aun en aguas residuales con aditivos textiles, a pesar de observarse cierta inhibición en el crecimiento. Estos valores de decoloración son parecidos a los encontrados en decoloración de aguas residuales sintéticas con diferentes hongos ligninolíticos como *T. versicolor* y *S. commune*, en un tiempo similar de incubación [51]

En la Figura 20, se pueden observar los porcentajes de decoloración de cada colorante dentro del efluente sintético, los cuales son menores que los obtenidos en la mezcla de colorantes sin aditivos (numeral 6.2.1) indicando que la presencia de las las sales del efluente sintético ejercen cierta inhibición en las funciones vitales del hongo; es posible que estas causen la pérdida de líquido o deshidratación del hongo lo cual interfiere en desempeño y capacidad de decoloración. Los colorantes Azul Terasil y Turquesa Erionyl son aquellos con los porcentajes de decoloración más altos, de 59% y 71% respectivamente (Tabla 4).



**Figura 19.** Decoloración de Efluente Sintético con Colorantes industriales (Rojo Erionyl, Azul Terasil, Rojo Cibacron y Turquesa Erionyl). ■ Día 0; ◆ Día 4; ▲ Día 8; ● Día 12.



**Figura 20.** Porcentaje de Decoloración en Efluente Sintético con Colorantes industriales Azul Terasil (AT), Rojo Cibacron (RCi), Rojo Erionyl (RE) y Turquesa Erionyl (TE)

En diferentes estudios realizados con efluentes sintéticos con hongos ligninolíticos como *G. candidum* y *T. versicolor* se lograron valores mayores en el porcentaje de decoloración, aunque en diferentes tiempos de incubación, pero en los cuales fue necesaria la dilución de los efluentes para realizar los ensayos [51]; en este caso los ensayos con el agua residual sintética se efectuaron sin diluir esta.



Los valores de decoloración obtenidos en ambos experimentos reafirman la acción decolorativa de *A. discolor* en aguas fuertemente coloreadas (600 mg/L) y en presencia de sustancias que al parecer no perjudican la capacidad ligninolítica del mismo, sin embargo según los resultados obtenidos, la presencia de estas sales generan que *A. discolor* disminuya su eficiencia para la decoloración de la mezcla de colorantes. Por esta razón se planteo el ensayo en mezcla de colorantes a diferentes concentraciones salinas con el fin de determinar cómo pueden afectar estas condiciones del agua residual sintética sobre el desempeño de *A. discolor*.

**Tabla 4.** Porcentajes de decoloración ensayo por bloques, en mezcla de colorantes y en efluente sintético.

Ensayo en Bloques					
Colorante (mg/L)	AT	RCi	RE	TE	
100	81,43	56,03	71,21	79,40	
200	85,35	61,61	86,29	82,15	
300	87,58	58,92	64,03	79,37	
400	80,22	54,42	56,34	72,72	

Ensayo mezcla de colorantes					Decoloración de mezcla
Colorante (mg/L)	AT	RCi	RE	TE	
150 (Cada Colorante)	71,79	56,27	57,51	85,28	68%

Ensayo Efluente sintético					Decoloración de mezcla
Colorante (mg/L)	AT	RCi	RE	TE	
150 (Cada Colorante)	59,74	46,40	46,51	71,44	62%

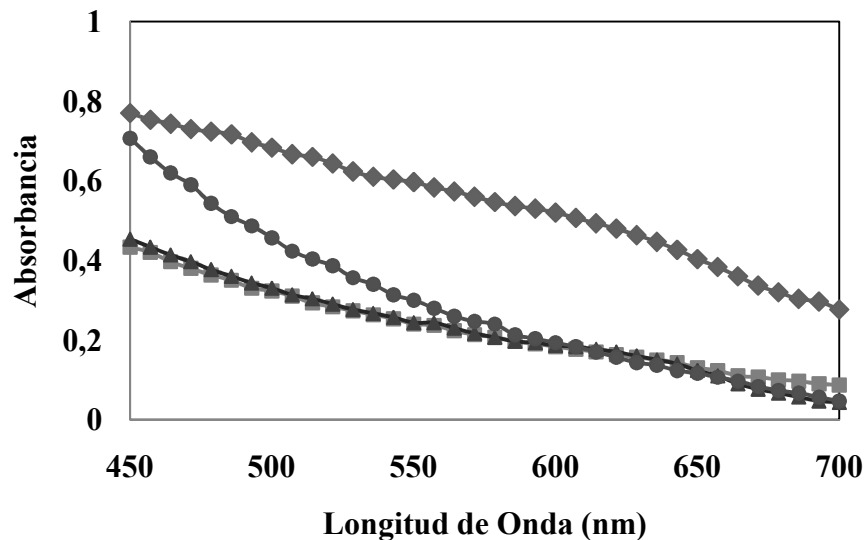
### 6.2.3. Decoloración por *A. discolor* en efluente textil esterilizado.

Como complemento al ensayo con agua sintética, se efectuó una prueba con agua residual de una industria textilera la cual fue esterilizada. La prueba se realizo con dos efluentes distintos (por triplicado) de los cuales se conoce que son provenientes del lavado de textiles que utilizaron colorantes tina y reactivo, de los que se determinaron algunos parámetros mostrados en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Caracterización Agua Residual Textil.

Parámetro	Agua Residual Tina	Agua Residual Reactivo
Conductividad	12.50 ms-cm	4.35 ms-cm
Temperatura	23 ° C	24.4 ° C
DQO	250 ppm	111 ppm
COT	904. 2 ppm	478.8 ppm

La Figura 21 muestra el barrido del efluente proveniente del proceso de lavado Pat Batch (colorantes reactivos); en este se puede ver que la máxima disminución de color se da hasta el día 4 y permanece hasta el día 8, en el día 12 se presentó un aumento en la línea del barrido para el intervalo de longitud de onda comprendido entre 450 nm y 600 nm, que pudo generarse por la desorción de este por parte de la biomasa fúngica. También se observa de esta figura que en las longitudes de onda mayores de 550 nm es donde se alcanzaron los menores valores de absorbancia para el día 12



**Figura 21.** Decoloración por *A. discolor* de efluente real textil esterilizado (colorantes reactivos). ◆ Día 0; ■ Día 4; ▲ Día 8; ● Día 12.

El porcentaje de decoloración obtenido en esta prueba fue de 67% (Día 8) el cual es similar a los porcentajes de decoloración obtenidos en las pruebas con mezcla de colorantes (68%) y en el efluente sintético (62%).

Respecto al ensayo realizado con el efluente de colorantes tipo tina, se encontró que *A. discolor* no es tolerante a las sustancias constituyentes de este; no hubo crecimiento de su micelio en los 12 días de prueba ni la consecuente reducción del color. Esto indica que este tipo de colorantes con diferentes constituciones químicas entre sí, insolubles en agua y constituidos generalmente por compuestos de azufre son perjudiciales o inhibitorias para organismos como los hongos ligninolíticos. Esto finalmente indica que *A. discolor* no es

apto para la decoloración de efluentes textiles que estén constituidos por colorantes tipo tina o por colorantes de constitución similar.

#### 6.2.4. Ensayo *A. discolor* a diferentes concentraciones salinas.

En esta sección del trabajo se buscó realizar el ensayo control y en mezcla de colorantes en soluciones hipotónicas, isotónicas e hipertónicas; al mismo tiempo establecer el efecto que tiene determinada concentración salina similar a la de un efluente textil sobre el consumo de sustrato, la actividad enzimática y finalmente sobre la capacidad decolorativa de *A. discolor*.

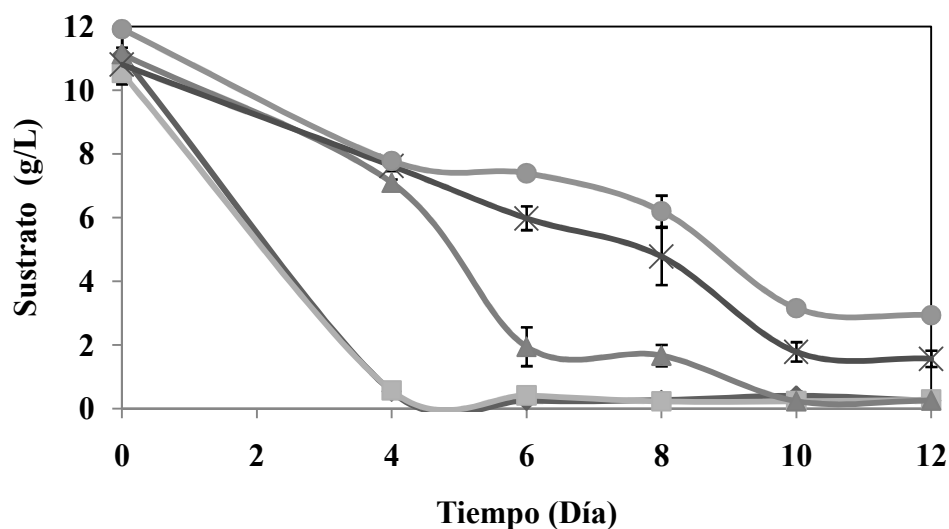


**Figura 22.** Ensayos *A. discolor* en diferentes concentraciones de 0,15 g/L, 9 g/L, 20 g/L, 30 g/L y 40 g/L de NaCl.

#### **Consumo de Sustrato y Actividad Enzimática de *A. discolor* en diferentes concentraciones salinas.**

En la Figura 23 se presenta el consumo de sustrato para cada concentración de NaCl; en esta se observa que existe un comportamiento similar para las concentraciones de 0,15 g/L de NaCl y 9 g/L de NaCl, donde el sustrato es consumido casi en su totalidad en los primeros 4 días de prueba. En las concentraciones de 30 g/L y 40 g/L de NaCl respectivamente también hay un comportamiento parecido entre sí; en ambos casos, el consumo de sustrato se realiza de forma gradual a los largo de los 12 días de prueba.

Por su parte, el ensayo de 20 g/L de NaCl presento el consumo total de sustrato hasta el día 10 de la prueba. Según lo anterior la situación más conveniente para el adecuado abastecimiento del sustrato para este hongo en presencia de sales, se presenta en las concentraciones de 30 g/L y 40 g/L de NaCl.



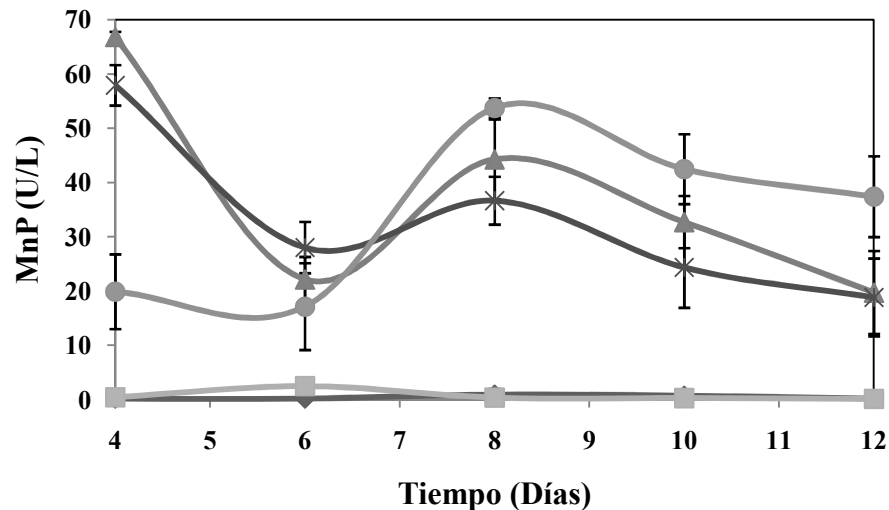
**Figura 23.** Consumo de Sustrato de *A. discolor* en diferentes concentraciones salinas.  
 ◆ 0,15 g/L NaCl; ■ 9 g/L NaCl; ▲ 20 g/L NaCl; x 30 g/L NaCl; ● 40 g/L NaCl.

De acuerdo al rápido consumo de sustrato hasta el día 4 en las concentraciones de 0,15 g/L NaCl y 9 g/L NaCl, a partir de este día podría no presentarse una eficiente decoloración ya que como se ha demostrado con los resultados anteriores, el trabajo de decoloración en mezcla de colorantes muestra una importante reducción hasta el día 4 pero necesita al menos hasta 9 o 10 días para alcanzar valores mayores en porcentaje de decoloración, de esta forma la acción decolorativa de *A. discolor* posiblemente dependerá del consumo de la fuente de Carbono la cual es utilizada por este hongo para llevar a cabo sus funciones metabólicas y fisiológicas entre las que se encuentran la misma asimilación de nutrientes y la reproducción. De esta manera se puede suponer que a pesar que la secreción de enzimas se da en el periodo con escasa concentración de sustrato, es posible para *A. discolor* reducir las concentraciones de color, lo cual será mostrado con los resultados del ensayo de decoloración presentados más adelante.

Por su parte los resultados de actividad enzimática (Figura 24 y 25) señalan altos valores de actividad enzimática de MnP para las concentraciones mayores de NaCl principalmente en las concentraciones de 30 g/L NaCl y 40 g/L NaCl. Y en contraste los valores de Actividad Enzimática para las concentraciones de 0,15 g/L NaCl y 9 g/L NaCl resultaron bastante reducidos; hecho que no es el esperado ya que 0,15 g/L de NaCl es la concentración normal de sales utilizada en el medio de cultivo de *A. discolor* por lo cual se esperarían los valores mayores de Actividad para este hongo.

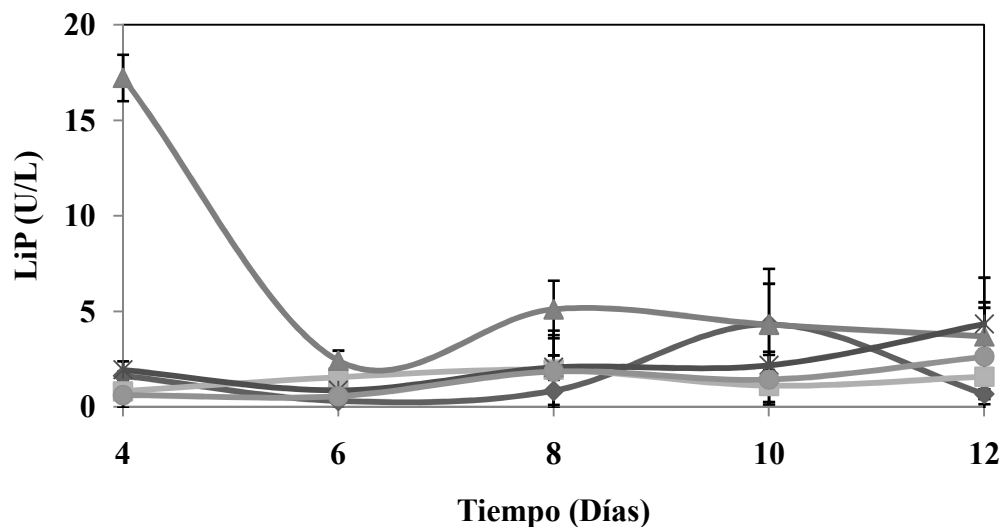
Algunos investigadores al desarrollar tratamientos en efluentes de industrias papeleras encontraron un aumento importante en la producción de MnP en hongos de origen marino basidiomicetos (*Halosarpheia ratnagiriensis*) los cuales pueden tener hongos homólogos en el ecosistema terrestre [58] y que pueden adaptarse a condiciones marinas [59].

Es decir que posiblemente *A. discolor* al adaptarse a estas condiciones hipersalinas una vez en contacto con el medio, tenga el comportamiento similar a estos hongos y por lo tanto se incrementó la actividad enzimática; en este caso la actividad de la Manganoperoxidasa.



**Figura 24.** Actividad Enzimática Manganoperoxidasa (MnP) de *A. discolor* en diferentes concentraciones salinas. ◆ 0,15 g/L NaCl; ■ 9 g/L NaCl; ▲ 20 g/L NaCl; x 30 g/L NaCl; ● 40 g/L NaCl.

La actividad enzimática de Ligninoperoxidasa presentó menos variaciones entre concentraciones salinas y fue a lo largo de los 12 días de prueba no mayor a 5 U/L, lo cual indica que esta enzima no se ve afectada por determinada concentración de NaCl, sino por la presencia de esta sal a cualquier concentración.



**Figura 25.** Actividad Enzimática Ligninoperoxidasa (LiP) de *A. discolor* en diferentes concentraciones salinas. ◆ 0,15 g/L NaCl; ■ 9 g/L NaCl; ▲ 20 g/L NaCl; x 30 g/L NaCl; ● 40 g/L NaCl

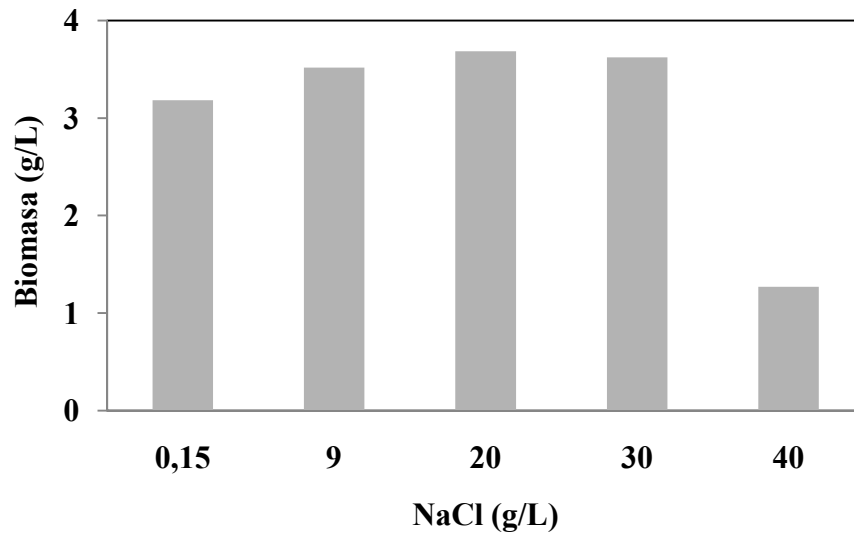
Por estas razones es necesario establecer de qué manera influye la concentración salina del medio en el que se encuentra *A. discolor* sobre la forma de consumir el sustrato o si este efecto se presenta directamente sobre la actividad enzimática ya que según estos resultados se estarían afectando los mecanismos de metabolismo basal de este hongo.

Es fundamental preguntarse si el hongo ligninolítico *A. discolor* puede adaptarse a medios con altas concentraciones salinas o cuál es su reacción al entrar en contacto con un efluente de estas características. Se tiene conocimiento de hongos capaces de vivir en condiciones marinas los cuales crecen en virtud de la solución salina, dentro de este grupo se conocen los denominados hongos facultativos que son los hongos marinos, de agua dulce o de un medio terrestre, obligados a crecer en estas condiciones mediante adaptaciones fisiológicas [60] que les permite crecer por lo cual es muy posible que se adecuen bien para el tratamiento de efluentes salinos [58]

Adicionalmente, se ha demostrado que algunos de estos hongos de tipo filamentoso también son capaces de degradar colorantes sintéticos en diferentes concentraciones salinas [58]. También se han encontrado otros hongos basidiomicetos como lo es *Phlebia* sp, identificado como un hongo tolerante a ambientes hipersalinos y degradador de la lignina, el cual ha participado en el bioblanqueo de pasta de papel y decoloración de tintes en presencia de diferentes concentraciones de sales marinas y de NaCl [58]. Se podría creer que este tipo de adaptación puede ser desarrollada por el sistema ligninolítico de *A. discolor* lo cual estaría permitiendo que se presenten los altos valores de actividad enzimática en la prueba realizada en este trabajo.

Este hecho es precisamente el que permite demostrar la adaptación de este hongo a un medio de condiciones salinas, como afirmó Raghukumar *et al* 1998; la prueba de adaptación al medio ambiente y a su capacidad de crecimiento de los hongos de origen marino es la producción de enzimas. En este caso, retomando esta afirmación, la producción de enzimas ligninolíticas en los medios con 20 g/L de NaCl, 30 g/L de NaCl y 40 g/L de NaCl, sería la prueba de adaptación de *A. discolor* a estos medios [58].

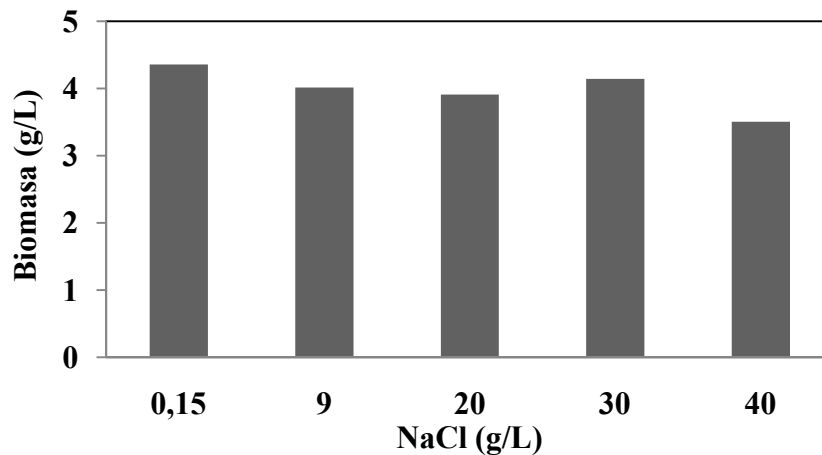
En este ensayo, se determinó la concentración de biomasa y como lo refleja la Figura 22, estos valores son menores que la Biomasa en condiciones normales (4,11 g/L) aunque la concentración de biomasa en 40 g/L de NaCl, está bastante reducida en comparación a las demás concentraciones salinas, lo que indica que a esta concentración se empieza a inhibir el crecimiento micelial a pesar de demostrar que no hay efectos inhibitorios sobre la actividad enzimática para esta misma concentración.



**Figura 26.** Concentración de Biomasa de *A. discolor* a diferentes concentraciones de NaCl.

**Decoloración por *A. discolor* en mezcla de colorantes industriales a diferentes concentraciones salinas.**

La medición de concentración de biomasa, por el contrario mostro que esta no se redujo sino que se incremento respecto a la concentración de biomasa sin NaCl con valores promedio entre 3,5 g/L Y 4,5 g/L. Como se observa en la Figura 27 el menor valor en biomasa se presenta a 40 g/L de NaCl, concentración que podría estar generando inhibición en el crecimiento de *A. discolor* y que presento el mismo comportamiento en la prueba sin colorantes. Por otro lado, los demás valores son mayores que los encontrados anteriormente en medio de cultivo sin colorantes (control), para cada uno de los colorantes industriales y para la mezcla de colorantes sin ningún aditivo.



**Figura 27.** Concentración de Biomasa de *A. discolor* a diferentes concentraciones de NaCl en mezcla de colorantes.

El aumento en la concentración de biomasa en los ensayos a diferentes concentraciones salinas con y sin mezcla de colorantes también se ha presentado en otros experimentos con hongos ligninolíticos para el tratamiento de sustancias contaminantes como lo son hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), donde se ha considerado este aumento debido en parte al fenómeno de adsorción por la biomasa, concluyendo que el micelio tiene una función activa como adsorbente pero también como degradador de los contaminantes xenobióticos [58]

Con el fin de comprobar la capacidad decolorativa de *A. discolor* en medios con diferentes concentraciones de NaCl, se realizó el ensayo en mezcla de colorantes. En la Figura 28, aparecen los barridos para cada una de las correspondientes concentraciones salinas.

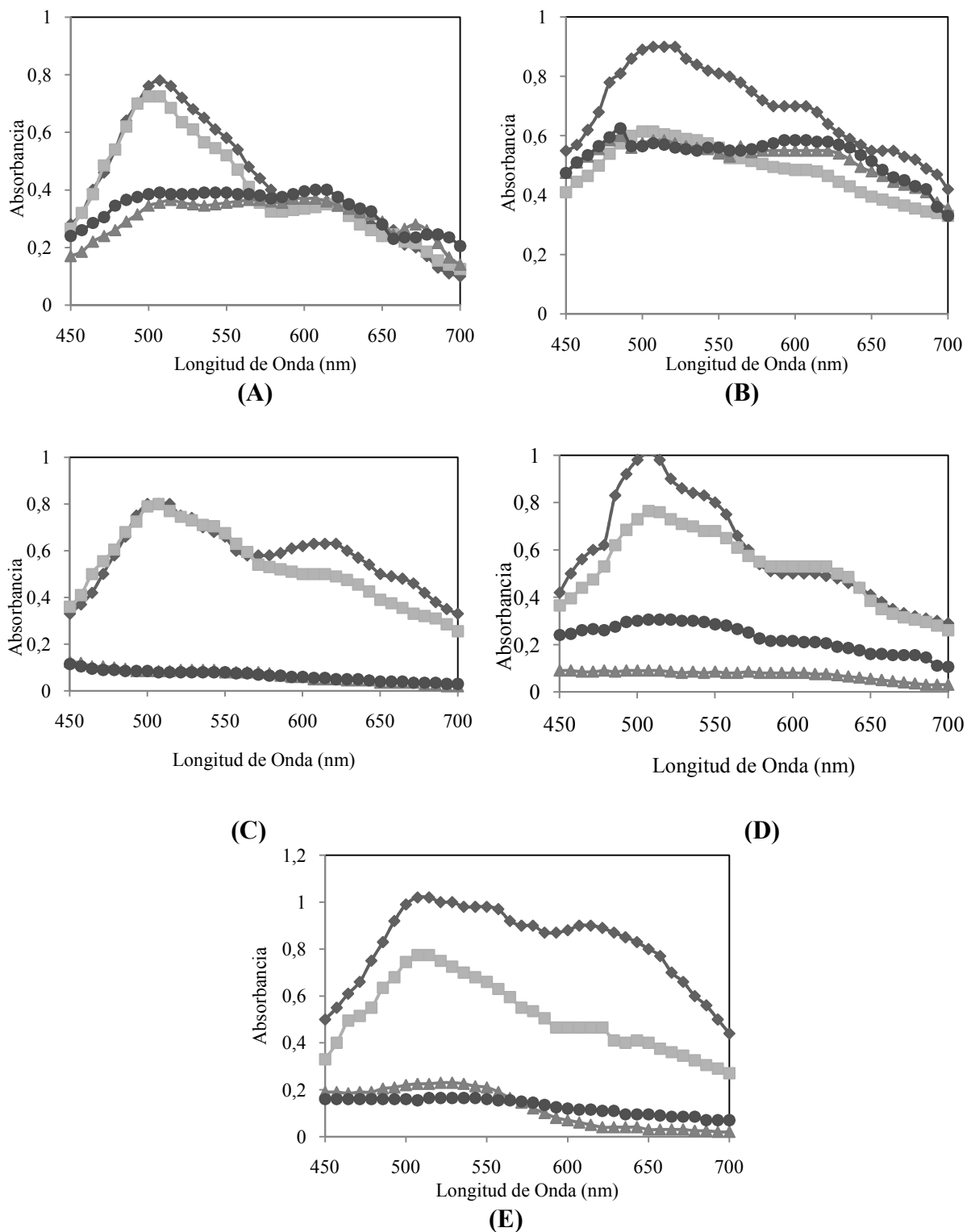
Estas figuras indican poca reducción de colorantes en los ensayos con menores concentraciones de NaCl (0,15 g/L y 9 g/L), resultados que no son los esperados aún más en la concentración de 0,15 g/L NaCl que es la concentración normal de sales utilizadas para el medio de cultivo y conociendo además los resultados de decoloración obtenidos para la mezcla de colorantes (con 0,15 g/L de sales) donde se obtuvo una importante reducción de color.

Estos resultados se expresan calculando los porcentajes de decoloración para la mezcla; 54% y 55%, valores menores que los encontrados para la mezcla de colorantes sin sal (68%). Por otra parte estos valores coinciden con las respectivas actividades enzimáticas para estas concentraciones salinas, ya que estas para el caso de la MnP presentaron valores sumamente bajos confirmando lo anteriormente dicho.

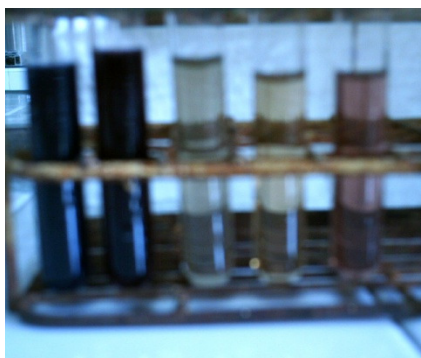
En contraste, se encuentran los porcentajes de decoloración obtenidos para las concentraciones salinas de 20 g/L, 30 g/L y 40 g/L de NaCl que fueron de 98,1 %, 99,8% y 99,9 % respectivamente. Y corresponden a los más altos valores de actividad de MnP.

Teniendo en cuenta estos porcentajes de decoloración, se podría asegurar que además de tolerar ambientes con altas concentraciones salinas; *A. discolor* está capacitado para la disminución de la concentración de colorantes presentes en efluentes que además contienen sales y que estas no inhiben o perjudican este proceso (Figura 29).





**Figura 28.** Decoloración por *A. discolor* en mezcla de colorantes y diferentes concentraciones salinas. (A) 0,15 g/L de NaCl. (B) 9 g/L de NaCl. (C) 20 g/L de NaCl. (D) 30 g/L de NaCl. (E) 40 g/L de NaCl. ◆ Día 0; ■ Día 4; ▲ Día 8; ● Día 12.



**Figura 29.** Decoloración por *A. discolor* en concentraciones salinas de 0,15 g/L, 9 g/L, 20 g/L, 30 g/L, 40 g/L de NaCl (De izquierda a Derecha).

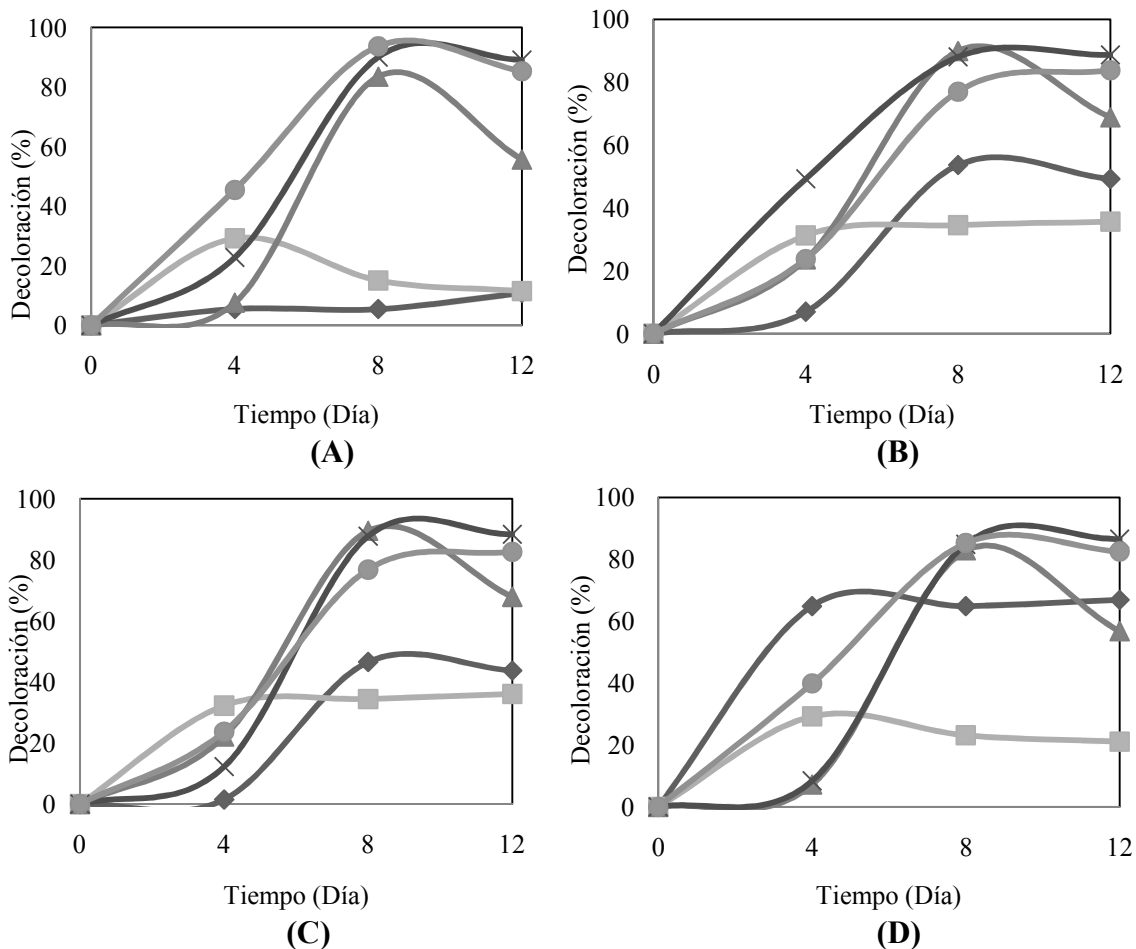
Respecto a este resultado, surgió la necesidad de pruebas de adsorción en biomasa inactiva a cada concentración salina para verificar que este trabajo de decoloración sea por acción ligninolítica más que por el fenómeno de adsorción por parte de la biomasa fúngica (Anexo I). Los resultados fueron coherentes a los expuestos anteriormente ya que en las concentraciones de NaCl de 0,15 g/L y 9 g/L, se presenta cierta reducción de color hasta el día 4, la cual al parecer sufre un fenómeno de desorción el día 12 cuando el barrido espectrofotométrico se encuentra muy similar al correspondiente al día 0. Sin embargo para las concentraciones de 20 g/L, 30 g/L y 40 g/L de NaCl la reducción de estos barridos es mayor hasta el día 8 y a pesar de presentarse desorción el día 12, el barrido para este día está por debajo del barrido del día 0. Esta prueba permite concluir entonces que la decoloración realizada por *A. discolor* en las concentraciones de 20 g/L, 30 g/L y 40 g/L de NaCl se debe también a la adsorción de los colorantes que realiza su micelio pero sin restar importancia al trabajo de decoloración enzimática que está relacionado con los valores principalmente de MnP determinados para estas mismas condiciones.

Por otra parte, se efectuó otro ensayo de adsorción en mezcla de colorantes con biomasa inactiva, por duplicado y en un tiempo de 6 horas, tomando la muestra cada media hora y realizando el barrido espectrofotométrico. De acuerdo a estos resultados, no se presentó mayor variación en la Absorbancia a lo largo del tiempo de prueba lo que sirve para ratificar la acción degradativa de *A. discolor* en mezcla de colorantes (Anexo J).

Las deducciones anteriores acerca de la capacidad decolorativa de *A. discolor* en condiciones salinas no coinciden con las de otros estudios llevados a cabo con hongos ligninolíticos en los que se concluyó que algunos de estos son más eficientes en concentraciones salinas menores (5% en sales). sales)

Finalmente, los porcentajes de decoloración de cada colorante en mezcla de los mismos (Figura 30) demuestran que la mayor decoloración como se menciono, se presenta en las

concentraciones salinas de 30 g/L y 40 g/L de NaCl, pero esta vez a diferencia de los ensayos en mezcla de colorantes no hay diferenciación entre colorantes, ya que para todos se ha obtenido un porcentaje de decoloración entre 82% y 89%. Para el ensayo a 20 g/L de NaCl estos porcentajes varían desde 55% hasta 68% y como se menciono antes, para las concentraciones de 0,15 g/L y 9 g/L los porcentajes de decoloración son los más bajos siendo estos en su mayoría menores de 50%.



**Figura 30.** Porcentaje de decoloración en Mezcla de colorantes a diferentes concentraciones salinas. (A) Azul Terasil. (B) Rojo Cibacron. (C) Rojo Erionyl. (D) Turquesa Erionyl. ♦ 0,15 g/L NaCl; ■ 9 g/L NaCl; ▲ 20 g/L NaCl; x 30 g/L NaCl; ● 40 g/L NaCl

De esta manera, se ha comprobado la capacidad de *A. discolor* en la decoloración de los cuatro colorantes industriales empleados en este trabajo y en medios con altas concentraciones salinas. Lo cual sirve para determinar el posible uso de este hongo ligninolítico en el tratamiento de efluentes industriales textiles, basándose en la idea de que este hongo puede ser considerado como un organismo con características o adaptaciones similares a los organismos halófilos, dentro de los cuales se encuentran algunos hongos

filamentosos como *Gymnoscella marismortui* que ha sido aislado del mar muerto y es útil en el tratamiento de colorantes sintéticos [61]. Acerca de los organismos halófilos, se sabe de ellos que son organismos que muestran gran afinidad por la sal y viven en ambientes hipersalinos definidos como aquellos en los que la concentración de sal supera la del agua de mar (3,5% de sales totales) [62]; para poder vivir en este ambiente, este tipo de organismos desarrollan mecanismos de adaptación que les atribuyen propiedades con un gran potencial aplicado gracias a procesos de haloadaptación; esta característica única les confiere gran interés desde el punto de vista biotecnológico.

No obstante este tipo de ambientes genera la pérdida del agua citoplasmática de los organismos debido a la alta osmolaridad del ambiente, es por esto que los halófilos acumulan un soluto compatible, el cual es una sustancia que el microorganismo almacena en su citoplasma para ajustar su actividad de agua, la cual no debe inhibir el metabolismo celular y pueden ser sintetizada por el microorganismo (azúcares, aminoácidos, etc.) o tomados del exterior y acumulados activamente [62].

En este trabajo, *A. discolor* demostró su capacidad de supervivencia y decoloración en ambientes hipersalinos por lo cual es posible que este realizando este tipo de adaptación semejante a la realizada por los organismo halófilos para tolerar, crecer y disminuir la concentración de colorantes en ambientes salinos.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta prueba a diferentes concentraciones salinas a pesar de no coincidir como se menciono antes, con otros estudios que demostraron que algunos hongos ligninolíticos son más eficientes en concentraciones salinas menores, un estudio de biodegradación de Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) con hongos de pudrición blanca y a diferentes concentraciones salinas demostró que no todos estos tienen el mismo comportamiento al entrar en contacto con las sales. Mientras que *Irpex lacteus* no realizó ningún trabajo de decoloración en el colorante Poly R-478 y en una proporción de agua de mar de 100%; *Lentinus tigrinus* y *Bjerkandera adusta* lograron una alta reducción de este colorantes en estas condiciones salinas[63] por lo cual se puede decir que la capacidad decolorativa de los hongos ligninolíticos en concentraciones salinas no se puede generalizar y por el contrario depende de las adaptaciones que estos sean capaces de desarrollar y de su propio sistema enzimático.

Después de conocer los porcentajes de decoloración en la mezcla de colorantes con y sin adición de NaCl se ha podido establecer la potencialidad de *A. discolor* para el tratamiento de efluentes coloreados y además se ha demostrado mayor afinidad por dos de los colorantes empleados en los ensayos (Azul Terasil y Turquesa Erionyl), sin excluir la capacidad de decoloración en los otros dos colorantes (Rojo Erionyl y Rojo Cibacron).

Además de la acción enzimática de este hongo ligninolítico, en la reducción de estos colorantes pueden influir ciertos factores o características propias de los mismos que pueden facilitar o dificultar el proceso. Principalmente la estructura de los colorantes Azul Terasil y Turquesa Erionyl de tipo disperso y ácido respectivamente los cuales posiblemente son susceptibles a la reacción inducida por las enzimas ligninolíticas lo que podría indicar que estas sustancias son menos resistentes a la transformación que los colorantes Rojo Erionyl y Rojo Cibacron. Otro factor que pudo ser determinante en este

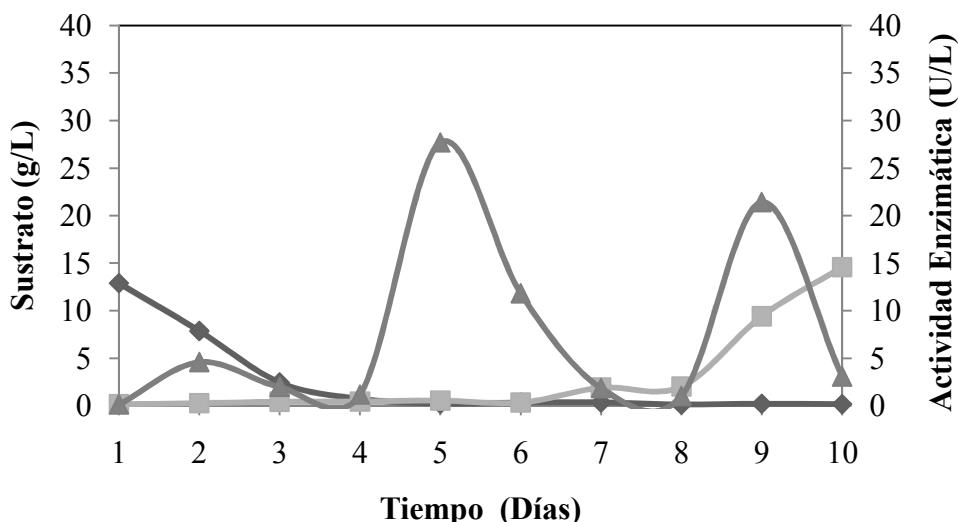
proceso fue la solubilidad de cada uno de estos colorantes de la cual depende en muchos casos la biodegradabilidad de un compuesto[64]; en este sentido no se encontró una relación entre la solubilidad y la reducción en la concentración de los colorantes; el Colorante Turquesa Erionyl con un valor de solubilidad en agua de 57 g/L fue uno de los colorantes que alcanzo los mayores porcentajes de decoloración en todos los ensayos y con un valor similar, el colorante Rojo Erionyl (solubilidad: 48 g/L) presento valores inferiores en la reducción del color.

Finalmente al referirse a las características fisicoquímicas de los colorantes, es fundamental conocer el coeficiente octanol/agua de estos; los cuatro colorantes industriales utilizados en este estudio presentan coeficientes menores de 10, lo cual los convierte en compuestos relativamente hidrofílicos y al mismo tiempo da una idea del carácter bioacumulativo de los mismos, el cual para el caso de estos colorantes significa que no son propensos a esta característica; sin embargo a pesar de que en este trabajo no se realizaron pruebas de toxicidad se espera que al no presentar alta resistencia a la decoloración; estos colorantes, en un efluente después del tratamiento no sean tóxicos para la biota acuática con la que entraran en contacto, ya que uno de los indicadores de éxito en un proceso de biorremediación es precisamente la disminución o eliminación de la toxicidad para los seres vivos existentes en el medio de descarga del agua residual tratada [65].

### 6.3. DECOLORACIÓN DE EFLUENTE TEXTIL POR *A. discolor* EN CONDICIONES NO ESTÉRILES.

En esta última parte, se estudió la decoloración de efluentes textiles reales sin esterilización por parte del hongo *A. discolor*.

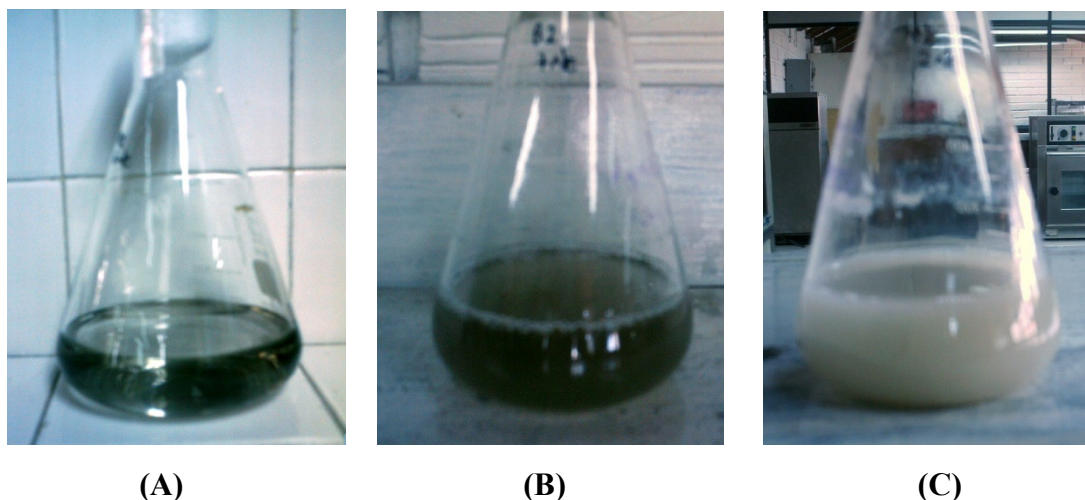
Previamente, se realizó la prueba de cinética de crecimiento y producción de enzimas bajo condiciones no estériles con el propósito observar su comportamiento en dichas condiciones. En la Figura 31 se observa que el comportamiento de la producción de enzimas es bastante variable para la LiP mientras que la MnP permanece casi constante y se incrementa en los últimos días de prueba. Por otro lado, el consumo casi total del sustrato en los primeros cuatro días de fermentación, pudo ser consecuencia de la presencia de otros microorganismos cuyas características metabólicas les permiten consumir el sustrato en menor tiempo que el utilizado por los hongos ligninolíticos.



**Figura 31.** Actividad Enzimática y Consumo de sustrato de *A. discolor* en condiciones no estériles. ◆ Consumo de sustrato (g/L); ■ Actividad MnP (U/L); ▲ Actividad LiP (U/L)

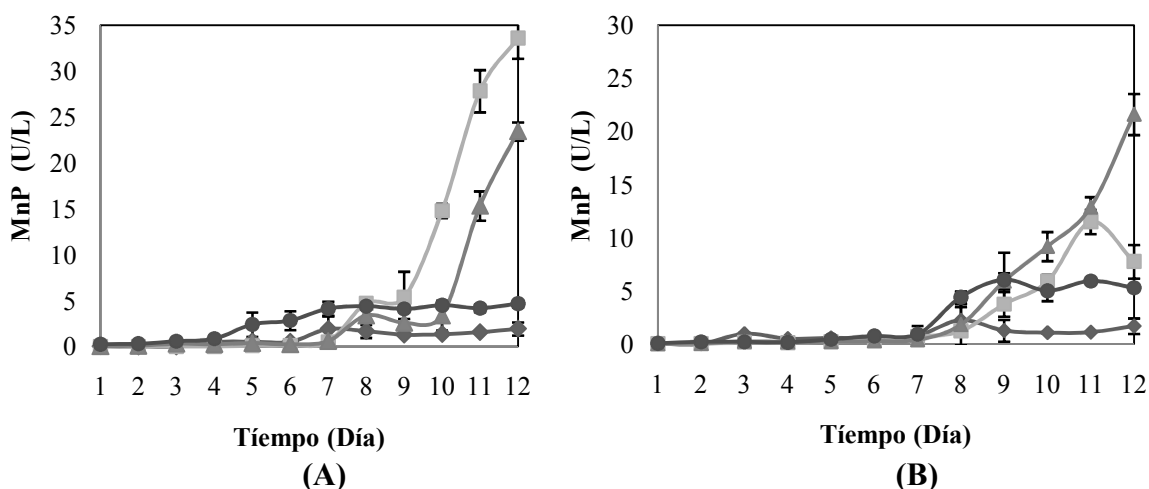
La experimentación con el efluente real textil (agua residual proveniente del lavado de algodón teñido con colorantes reactivos) consistió en suplementar dicha agua con variaciones en la fuente de Carbono y Nitrógeno, trazas de sales y biomasa.

Estos ensayos se realizaron con el objetivo de establecer el efecto que tienen dichas variaciones sobre la capacidad decolorativa de *A. discolor* en el agua residual real y en condiciones no estériles, considerando que esta sería la forma de desarrollar el tratamiento a gran escala buscando además utilizar la menor cantidad de reactivos en el proceso y de una forma eficiente y económica.



**Figura 32.** Ensayos A. discolor en agua residual textil no estéril. (A) Agua residual textil; (B) Agua residual textil con Biomasa y sales; (C) Agua residual textil con biomasa, sales y fuentes de Carbono y Nitrógeno.

La Figura 33 (A y B) presenta la actividad enzimática de MnP de los ensayos con las dos proporciones de biomasa utilizada; los mayores valores de actividad se logran utilizando 10% de inóculo de *A. discolor* y adicionando la fuente de C/N, seguido por el ensayo en el que además se adicionan sales. La actividad de MnP se encuentra por encima de los valores encontrados en la prueba control (Figura 31) donde también se utilizó 10% de Biomasa, por lo cual se podría decir que en agua residual no hay inhibición en la actividad enzimática de MnP.



**Figura 33.** Actividad de MnP en agua residual textil no estéril con (A) 10% y (B) 20% de Biomasa de *A. discolor* en diferentes condiciones. ♦ Solo Biomasa; ■ Biomasa y Fuente de C/N; ▲ Biomasa, Fuente de C/N y sales; ● Biomasa y sales.

De la Figura 33, se puede afirmar además la similitud en el comportamiento de los ensayos donde no se adicionó la fuente de C/N ya que la actividad enzimática se encuentra reducida, lo cual significa que esta podría ser en parte dependiente de la presencia de sustrato. Sin embargo es un hecho fundamental que exista actividad tanto en presencia como en ausencia de las fuentes de carbono y nitrógeno en condiciones no estériles, lo que resulta en una ventaja para la aplicación de este hongo en el tratamiento de efluentes textiles teniendo en cuenta que la presencia de otros microorganismos en el medio, parece no afectar completamente la producción enzimática.

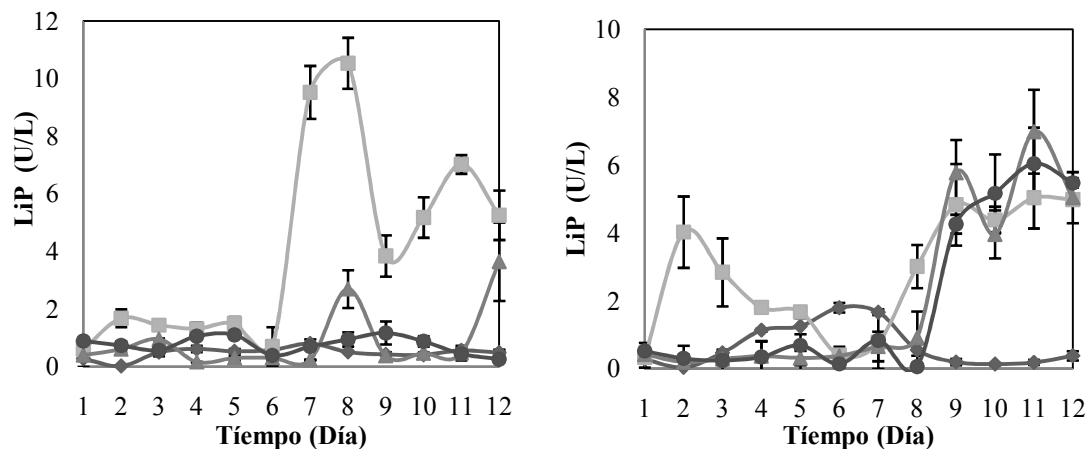
Otro de los hechos destacados con esta prueba está en que el aumento (20%) de la cantidad inicial de biomasa de *A. discolor* no representa un beneficio sobre la actividad enzimática y la consecuente decoloración lo cual se confirmará o refutará al determinar la decoloración en estas condiciones.

Estos resultados en actividad, coinciden con estudios realizados para el tratamiento de aguas residuales coloreadas en condiciones no estériles con *P. chrysosporium* [66] en el cual la actividad enzimática de MnP también aumentó, aunque fue tempranamente, mientras que en este caso, el incremento se dio a partir del día 9 de prueba. Por otra parte, no concuerdan con los resultados obtenidos en un estudio similar con el hongo de pudrición blanca *T. versicolor* [67] donde se afirmó que la incubación de este hongo en condiciones no estériles y la consecuente presencia de bacterias causa la rápida disminución de la actividad enzimática de peroxidasas, demostrando la importancia de tener en cuenta a los microorganismos diferentes de los hongos en el tratamiento de aguas residuales.

Respecto a la actividad de la LiP se puede decir que no presentó un comportamiento uniforme durante los 12 días de la prueba, al igual que en el ensayo de control, aunque con valores menores que en ese caso. Además según la Figura 34, los mayores valores se presentan en el ensayo realizado con 20% de biomasa para las diferentes condiciones pero en los días finales de la prueba. Como se observa en la Figura 34, no hay un comportamiento similar entre la condición de 10% de biomasa y 20% de biomasa sin embargo aunque el valor más alto se presentó con 10% de biomasa de *A. discolor*, la mayoría de los valores de actividad están por debajo de 5 (U/L) lo cual indica que para este caso, el aumento en la cantidad de biomasa si tendría un efecto positivo sobre la actividad de esta enzima.

Las anteriores deducciones permiten establecer que *A. discolor* puede producir en ambientes no estériles y en presencia de residuales de la industria textil, las enzimas que según diferentes investigaciones [66, 67] son las que le confieren su capacidad decolorativa en este tipo de efluentes. A pesar de esto, la actividad enzimática tanto de MnP como de LiP, no mostraron la misma relación con la cantidad de biomasa en las que se determinaron; el aumento de biomasa parece no tener efecto sobre la MnP, mientras que si aumenta la actividad de LiP.





**Figura 34.** Actividad de LiP en agua residual textil no estéril con (A) 10% y (B) 20% de Biomasa de *A. discolor* en diferentes condiciones. ◆ Solo Biomasa; ■ Biomasa y Fuente de C/N; ▲ Biomasa, Fuente de C/N y sales; ● Biomasa y sales.

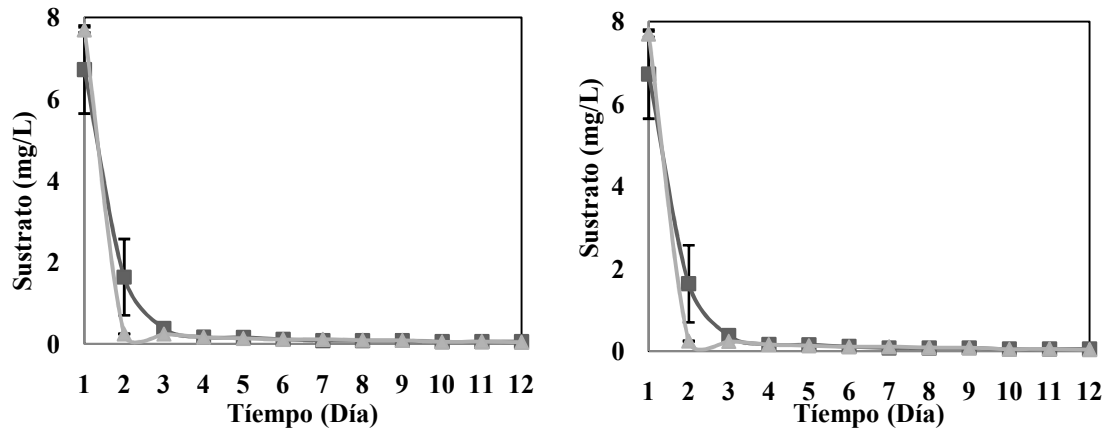
De otra manera la ausencia de C/N al parecer no crea gran diferencia en la producción de MnP; tanto en el control como en este ensayo estos valores permanecieron cercanos a 5 U/L, y solo se incrementaron en los días finales de prueba. Respecto a la actividad de LiP se puede decir que sin las fuentes de C/N, tanto en el ensayo con 10% como en el de 20% de biomasa, si se presenta cierta inhibición en la producción de esta enzima teniendo en cuenta que en el ensayo de control los máximos valores alcanzados están entre 20 U/L y 25 U/L (Figura 31), mientras que sin la adición de C/N, los valores más altos se encontraron entre 6 U/L y 10 U/L, por lo que la presencia de estos nutrientes podría influir en la producción de esta enzima y en su correspondiente función en el tratamiento del efluente coloreado.

Otra de las variables importantes en este ensayo fue el consumo del sustrato en el respectivo caso donde se adicionó la fuente de C/N, la Figura 35 representa esta variable en las dos proporciones de biomasa; como se observa, las fuentes de Carbono (Glucosa) se agotan rápidamente hasta el día 2, debido seguramente a la presencia de otros microorganismos, especialmente bacterias que de igual forman consumen el sustrato, por lo visto en un tiempo menor, considerando que en ensayos anteriores en condiciones estériles que aseguraron la presencia única de *A. discolor*, el consumo de sustrato se dio gradualmente a lo largo del tiempo de prueba. Según Heinfling *et al*, 1998 las bacterias crecen y se reproducen mucho más rápido que los hongos de pudrición blanca, por lo cual compiten con los hongos por los nutrientes y generalmente son estas las que predominan rápidamente en el sistema [66]. Es así como en los hongos de pudrición blanca se retarda su crecimiento y hasta pierden su habilidad degradativa en efluentes coloreados debido a la presión que ejercen las bacterias impactando la secreción de las enzimas ligninolíticas.

Por lo visto, el consumo de nutrientes (Carbono) es más rápido en presencia de agua residual que en el ensayo de control (Figura 31) donde se consumió el sustrato hasta el día 4, posiblemente la presencia de los colorantes o sus respectivos componentes generan cierta

presión ya sea sobre el metabolismo o sobre las mismas funciones vitales tanto de *A. discolor* como de los otros microorganismos que colonizan este medio, haciendo que estos requieran mayor cantidad de nutrientes, lo que finalmente los llevaría a consumirlos en un menor tiempo.

En diferentes investigaciones con este tipo de hongos, se ha demostrado de igual forma la reducción temprana de las fuentes de nutrientes, entre los primeros dos y cuatro días de prueba, atribuyendo este consumo a las bacterias que colonizan rápidamente el medio y que de la misma forma consumen los sustratos disponibles para su manutención en los efluentes coloreados [66, 67, 68].



**Figura 35.** Consumo de sustrato en agua residual textil no estéril con (A) 10% y (B) 20% de Biomasa de *A. discolor* en diferentes condiciones. ■ Biomasa y Fuente de C/N; ▲ Biomasa, Fuente de C/N y sales.

### 6.3.1. Decoloración por *A. discolor* de efluente textil no esterilizado.

Además de determinar los parámetros expuestos anteriormente para las diferentes condiciones del agua residual (adición de sales y C/N), se determinó la decoloración que ejerció este hongo sobre el efluente en condiciones no estériles a partir del barrido espectrofotométrico de las muestras.

Según las curvas de barrido, se presenta la decoloración paulatina del efluente, y en la mayoría de los casos se da la máxima reducción del color hasta el día 8, ya que en algunos ensayos se presentó el aumento en los valores de absorbancia para el día 12 (ensayos con C/N), como se ha mencionado, este hecho podría estar relacionado con desorción de colorante por parte de la biomasa fúngica que lo habría adsorbido previamente, o en este caso, por las condiciones no estériles, la presencia de bacterias pudo generar cierta interferencia a pesar de centrifugar todas las muestras, teniendo en cuenta que desde los primeros días del montaje se observó el agua residual bastante turbia.

En la Tabla 6, se presentan los respectivos porcentajes de decoloración de los dos bloques realizados, de esta se generan varios hechos importantes sobre el efecto que tiene la variación de nutrientes y de concentración de inóculo para el tratamiento de este efluente.

**Tabla 6.** Porcentajes de decoloración en efluente textil no esterilizado.

Ensayo	Bloque 1	Bloque 2
10% Biomasa	48,46	44,30
10% Biomasa-C/N	20,86	-
10% Biomasa-C/N-Sales	22,61	-
10% Biomasa- Sales	50,41	41,91
20% Biomasa	56,76	67,47
20% Biomasa-C/N	-	7,94
20% Biomasa-C/N-Sales	19,47	-
20% Biomasa- Sales	39,18	45,76

La primera deducción importante se refiere al efecto que tiene la adición de las fuentes de carbono y nitrógeno en estos experimentos; como lo muestra la Tabla 6, en estos ensayos fue donde se presentaron los menores porcentajes de decoloración y en algunos de estos no hubo reducción en los colorantes hasta el día 12. Como se dijo antes, en el medio no estéril, estos nutrientes facilitan la propagación de los microorganismos diferentes al hongo, los cuales consumen el sustrato disponible.

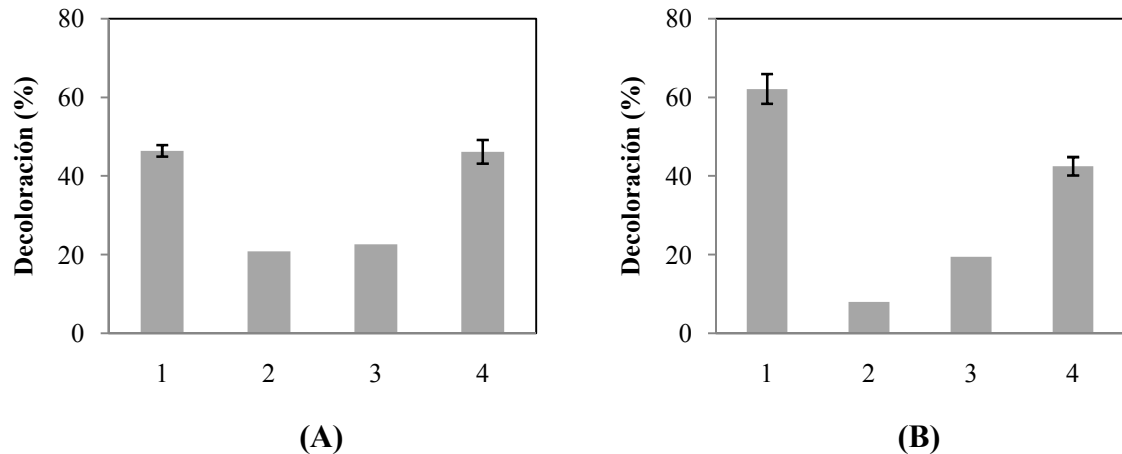
Como se supuso anteriormente, los mayores valores en porcentaje de decoloración corresponden a bajos valores de actividad enzimática tanto de Manganosperoxidasa como Ligninoperoxidasa y con 10% y 20% de biomasa lo cual confirma que la reducción de los colorantes textiles no requiere altos valores de actividad enzimática para su decoloración.

Según Yin *et al.* 1989, el tratamiento para aguas residuales textiles requiere de dos etapas; la primera de crecimiento en la cual el micelio del hongo se forma y una segunda etapa de reacción en la que el hongo entra en la fase de metabolismo secundario y empieza a excretar las enzimas responsables de la degradación de los efluentes [68]. En este sentido, si el consumo de sustrato se da rápidamente como se demostró con la medición de concentración de sustrato (Figura 35) y atribuido a la presencia de los otros microorganismos que colonizaron el agua residual, entonces la decoloración del efluente efectivamente se da gracias a la acción ligninolítica de estas enzimas, la cual empieza después de consumirse las fuentes de Carbono y Nitrógeno (Figura 33 y 34).

Se puede deducir que la adición de glucosa y peptona no genera beneficios sobre la decoloración de este efluente en los dos casos estudiados; usando 10% y 20% de biomasa respectivamente y a pesar de que en los ensayos con presencia de C/N fue donde se presentaron los mayores valores de actividad enzimática de MnP y LiP. Estos resultados son similares a la investigación desarrollada por Gao, *et al.* 2007, quienes encontraron valores de actividad de MnP mayores a los determinados en este estudio con los cuales obtuvieron también porcentajes de decoloración alrededor del 20% en el tratamiento de colorantes reactivos bajo condiciones no estériles [66].

Según esta investigación, se puede plantear que no es necesaria una alta producción de enzimas para decolorar los efluentes textiles en condiciones no estériles según los porcentajes de decoloración obtenidos.

En la Figura 36, se observa que no existe notable diferencia entre la reducción de color obtenida según la cantidad de inoculo utilizado. Este hecho es similar al demostrado en el estudio de decoloración de colorantes reactivos con *T. versicolor* bajo condiciones no estériles [67], en el cual a pesar de lograr porcentajes mayores que los alcanzados en este ensayo, no se presentó mayor diferencia entre los porcentajes de decoloración (cerca de 90%) entre los experimentos con 10 g y 20 g de inoculo respectivamente.



**Figura 36.** Porcentaje de decoloración en agua residual textil no estéril bajo diferentes condiciones. (A) 10% Biomasa de *A. discolor*. (B) 20% Biomasa de *A. discolor*. 1. Solo Biomasa. 2. Fuente de C/N y Biomasa. 3. Fuente de C/N, Sales y Biomasa. 4. Sales y Biomasa.

Finalmente se observa en la Figura 36, que hay mayor eficiencia en la decoloración cuando sólo se adiciono la biomasa de *A. discolor* en las dos cantidades o cuando esta estuvo acompañada únicamente por las sales empleadas en el medio de cultivo. Estas trazas de sales que contienen cobre, cobalto, hierro, zinc, manganeso, potasio entre otros elementos, cumplen la función de cofactores e inductores de las enzimas haciendo que estas sean activas, lo que los convierte en elementos esenciales que influyen en el metabolismo de compuestos tan complejos como lo son las enzimas. Es así como estos micronutrientes, seguramente favorecen el desarrollo y adaptación del hongo a estas aguas residuales lo cual pudo beneficiar el proceso de decoloración.

En el Anexo K se encuentra el análisis de varianza para este último ensayo; en el cual el valor del nivel de significancia menor de 0,05 lo cual confirma la incidencia que tiene sobre la decoloración cada unas de las condiciones en las que se llevo a cabo esta prueba, como se menciono, el porcentaje de decoloración alcanzado mostro dependencia principalmente en la presencia de las fuentes de Carbono y Nitrógeno adicionadas y en menor proporción en la cantidad de biomasa utilizada.

De acuerdo a este análisis, se presento una considerable dispersión entre los resultados obtenidos entre los dos bloques según el coeficiente de variación, el cual es mayor del 10%. A pesar de realizar los dos bloques en tiempos diferentes pero en iguales condiciones de incubación, esta variación pudo estar influenciada por el ambiente no estéril en el que se desarrollaron los ensayos y donde se presenta mayor dificultad para controlar los diferentes agentes de contaminación en el respectivo bloque.

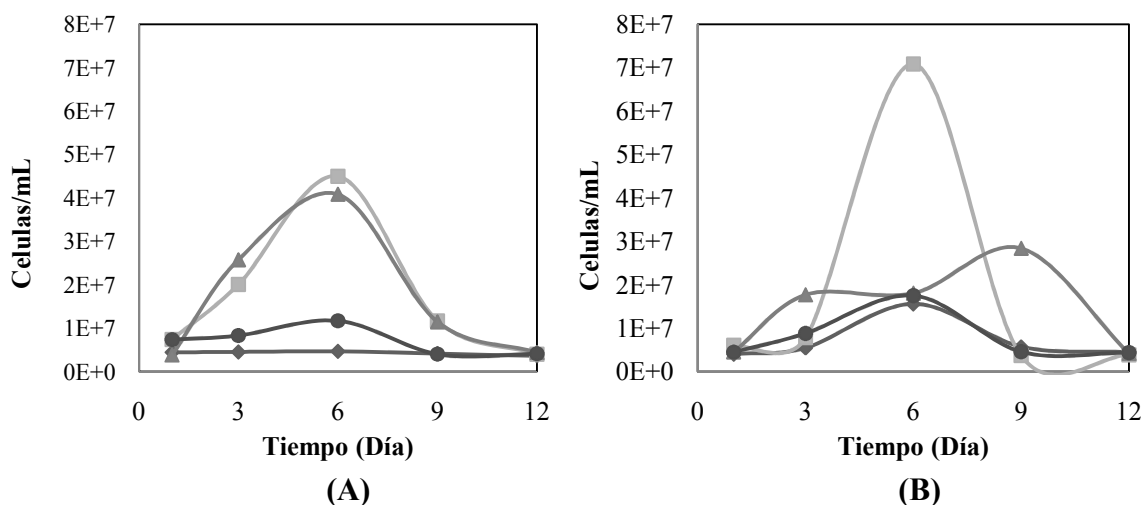
Respecto a la prueba t, incluida en el mismo análisis, se encontró que no hay valores atípicos respecto al modelo que generan la totalidad de los datos. (Son valores atípicos los mayores de 3,5). Finalmente, en el grafico de probabilidad normal para los residuos en el Anexo L, se observa que los datos siguen una trayectoria que casi describe la línea recta por lo que se infiere que la distribución de los datos respecto a la distribución normal es buena para este caso.

### **6.3.2. Conteo de microorganismos en agua residual textil.**

El proceso de decoloración en condiciones no estériles es dependiente en gran medida de los microorganismos diferentes al hongo que pueden colonizar este medio, que es un hábitat propicio para su propagación; por tal motivo se realizó el conteo microbiano para cada uno de los ensayos, en los que en el microscopio se observaron estructuras esféricas entre las cuales posiblemente se encontraron bacterias (cocos) y levaduras.

Este procedimiento fue fundamental; permitió comprobar el predominio de estos microorganismos en los medios en los cuales se adiciono las fuentes de Carbono y Nitrógeno, lo cual confirma las suposiciones hechas antes sobre la competencia por los nutrientes disponibles y el efecto que el consumo del sustrato por estos microorganismos pudo tener sobre la acción decolorante de *A. discolor* en este tipo de efluente; teniendo en cuenta que el ensayo previo con la misma agua residual textil pero en condiciones estériles (ver numeral 6.2.3) se obtuvo un porcentaje de decoloración de 67% el cual es superior al encontrado en este último ensayo (Tabla 6).

El recuento bacteriano realizado en cámara de Neubauer demuestra claramente mayor número de microorganismos en los ensayos suplementados con la fuente de C/N, lo cual complementa las deducciones acerca de la relación que posiblemente existió entre la presencia de estos microorganismos y la poca reducción de color que se obtuvo en aquellos ensayos donde se adiciono glucosa y peptona.



**Figura 37.** Recuento de microorganismos en Cámara de Neubauer. (A) 10% Biomasa de *A. discolor*. (B) 20% Biomasa de *A. discolor*. ♦ Solo Biomasa; ■ Biomasa y Fuente de C/N; ▲ Biomasa, Fuente de C/N y sales; ● Biomasa y sales.

A pesar de la presencia de estos microorganismos en el efluente, fue posible reducir el color de este, lo cual indica que al igual que en un hábitat natural, en este medio se podría generar una relación sinérgica o conjunta entre *A. discolor* y los otros microorganismos presentes en el mismo. Esta relación daría como resultado mediante los respectivos mecanismos metabólicos la reducción del color que es el fin último del uso de microorganismos para el tratamiento de estos efluentes, sin embargo si se busca reducir la sustancia contaminante del efluente exclusivamente por *A. discolor*, surge la necesidad de encontrar métodos que reduzcan la presencia de otros microorganismos diferentes; para esto, actualmente se utilizan diferentes técnicas entre las que se encuentran la limitación de las fuentes de Nitrógeno en el medio, reducción del pH y la inmovilización del micelio del hongo mediante diferentes materiales, beneficiando el crecimiento del hongo y a la producción de sus enzimas al evitar o reducir la contaminación por otros microorganismos [66].

Según los anteriores resultados la optimización para el tratamiento de efluentes textiles estaría enfocada principalmente a la adición de biomasa fúngica en la proporción normalmente utilizada (10%), la reducción de las fuentes de Carbono y Nitrógeno (glucosa y peptona) y el uso de algunas de las técnicas mencionadas anteriormente con el fin de disminuir la presencia de otros microorganismos y de esta manera asegurar la efectividad de este tratamiento y al menor costo posible.

## 7. CONCLUSIONES

La velocidad de crecimiento de *A. discolor* en presencia de colorantes industriales y estándares disminuye y en algunos casos más que en otros según el colorante; se encontró que el colorante Azul de Metileno y Rojo Erionyl son los responsables de la mayor reducción en la velocidad de crecimiento micelial de este Hongo. Sin embargo este hecho no representa disminución de la capacidad decolorativa de *A. discolor* en el medio (sólido).

Además de tolerar altas concentraciones de colorantes en medio líquido (400 mg/L), *A. discolor* tiene la capacidad de reducir estas concentraciones; además su eficiencia depende del tipo de colorante y en menor proporción de la concentración en el que este se encuentre. Este hongo presenta mayor capacidad decolorativa en los colorantes Azul Terasil y Turquesa Erionyl, lo que sugiere cierta afinidad hacia los colorantes de tipo disperso y ácido respectivamente.

En presencia de varios colorantes y de sales características de aguas residuales de la industria textil (agua residual sintética), *A. discolor* reduce significativamente la concentración de los colorantes demostrando su capacidad para el tratamiento de este tipo de efluentes; teniendo en cuenta que la reducción del color es menor que la lograda en los colorantes individualmente.

Las condiciones hipersalinas del medio coloreado no representan para este hongo inhibición en la producción de sus enzimas ligninolíticas ni en su desempeño en la reducción del color.

La concentración de biomasa se reduce por el contacto con los colorantes industriales, la mezcla de estos y por las sales utilizadas en la industria textil, esto no significa un impedimento para que *A. discolor* reduzca del color en cada uno de los casos.

En condiciones no estériles y a pesar de la competencia que ejercen otros microorganismos sobre el consumo de las fuentes de energía disponibles, *A. discolor* está capacitado para disminuir el color del agua residual textil, considerando que los mejores resultados se obtienen suprimiendo la fuente de Carbono; además es posible que los microorganismos presentes en el medio no impidan el buen desempeño de este hongo o realicen un trabajo conjunto para el tratamiento de este efluente.

Finalmente se hace evidente la capacidad de *A. discolor* para el tratamiento de efluentes coloreados; la optimización y desarrollo de las técnicas estudiadas en este trabajo podrían representar una alternativa viable y relativamente sencilla, para ser aplicada en procesos de biorremediación principalmente de efluentes de la industria textil.



## 8. RECOMENDACIONES

Todos los ensayos realizados dieron a conocer las respuestas y reacciones del hongo ligninolítico *A. discolor* frente a los efluentes coloreados, sin embargo es fundamental determinar la adaptación que tendrá este hongo en condiciones reales, con variaciones las respectivas variaciones medioambientales, mayores volúmenes y demás factores que estén involucrados en un efluente real.

Por otra parte es necesario establecer la relación que existe entre la producción de enzimas ligninolíticas y la reducción de las concentraciones de los colorantes, teniendo en cuenta que en algunas ocasiones en el presente trabajo estas no estuvieron directamente relacionadas con la decoloración del medio.

Por último, constituye una parte importante para el éxito de esta alternativa de descontaminación en efluentes coloreados, investigar métodos que reduzcan la presencia de microorganismos en condiciones no estériles o de igual forma que demuestren las ventajas en la reducción del color, considerando la posibilidad del trabajo conjunto de varios tipos de microorganismos.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] MARTIN C. y GONZÁLEZ A. Tratamiento Biológicos de Suelos Contaminados: Contaminación por Hidrocarburos. Aplicaciones de Hongos en Tratamientos de Biorrecuperacion. Rev Iberoam Micol 2004; 21: 103-120.
- [2] AGREDO M. Aislamiento y Caracterización inicial de Proteínas Nucleares que reconocen elementos discretos en el promotor del gen *Cs-mnp2B* de *Ceriporiopsis subvermispora*. [Tesis] Santiago: Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas; 2006.
- [3] DÁVILA G. y VÁZQUEZ R. Enzimas Ligninolíticas Fúngicas para Fines Ambientales. Mensaje Bioquímico 2006; 30: 29-55.
- [4] RUBILAR O. Biorremediación de Suelos Contaminados con Pentaclorofenol (PCF) por Hongos de Pudrición Blanca.[Tesis] Temuco-Chile: Universidad de la Frontera. Facultad de Ingeniería, Ciencias y Administración; 2007.
- [5] MANZANO A, LEÓN T. Hongos de la Podredumbre Blanca con Capacidad Ligninolítica y Acción Decolorante sobre el Violeta Cristal. Revista Biología 2004; 18: 123-126. Universidad de la Habana, Cuba.
- [6] MOTATO K, MEJÍA A y LEÓN A. Evaluation of the agroindustrial wastes of banana (*Musa paradisiaca*) and sawdust of abarco (*Cariniana pyriformis*) as substrates for the culture of the fungus *Pleurotus djamor*. Vitae 2006; 13: 24-29.
- [7] CHRISTIAN V, SHRIVASTAVA D, SHUKLA H, MODI H. Degradation of xenobiotic compounds by lignin-degrading white-rot fungi: enzymology and mechanisms involved. Indian Journal of Experimental Biology 2005; 43: 301-302.
- [8] PERAZA F. Protección Preventiva de La Madera: Agentes Degradadores de la Madera. AITIM; 2001. p. 45-52.
- [9] CARRILLO L. Microbiología Agrícola: Actividad Microbiana. Universidad de la Salta. 2003. p. 10-13.
- [10] PEREZ J, MUÑOZ J, DE LA RUBIA T y MARTINEZ J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. Int Microbiol 2002; 5. [Publicación periódica en línea]. p. 53-56. Se encuentra en URL: [http://www\\_im\\_microbios\\_org-articles0203-2002-june-02%20Perez\\_pdf.mht](http://www_im_microbios_org-articles0203-2002-june-02%20Perez_pdf.mht).

- [11] KNAPP J, VANTOCH-WOOD E y ZHANG F. Use of Wood-Rotting Fungi for the Decolorization of Dyes and Industrial Effluents. En: GADD G.M. Fungi in Bioremediation. Cambridge. Cambridge University Press; 2001. p. 242-304.
- [12] EVANS C, HEDGER. Degradation of plant cell wall polymers. En: GADD G.M. Fungi in Bioremediation. Cambridge. Cambridge University Press; 2001. p. 1-21.
- [13] REDDY A, MATHEW Z. Bioremediation potential of white rot fungi. En: GADD G.M. Fungi in Bioremediation. Cambridge. Cambridge University Press; 2001. p. 52-71.
- [14] BLANCO P, GALEANO D, QUIROGA I y HERRERA L. Degradación de Hidrocarburos Aromáticos por Basidiomycetes (*Phanerochaete chrysosporium*). [Tesis] Bogotá D.C.: Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Naturales; 2006. p.13.
- [15] SÁNCHEZ YÁÑEZ, J. Degradación de Aromáticos por Hongos de la Podredumbre Blanca. [Trabajo de Grado.] Morelia.: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas; 2008.
- [16] TOUR U, WARIISHI H, SCHOEMAKER y GOLD M.H. Oxidation of Phenolic Arylglycerol Beta-Aryl Ether Lignin Model Compounds by Manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: Oxidative cleavage of an Alpha-Onlyonyl model compound. *Biochemistry* 1992; 31: 4986-4995.
- [17] GOLD M.H y ALIC M. Molecular Biology of the Lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiological Reviews* 1993; 57(3): 611.
- [18] RUIZ J.M, Determinación de Factores Ambientales para el Crecimiento de dos Hongos (*Lentinus edodes* y *Stereum hirsutum*) y su acción biodegradante sobre la madera de *Pinus radiata* y *Eucalyptus globulus*. [Trabajo de Grado Ingeniería Forestal] Santiago: Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Forestales; 2004.p.40-45
- [19] PASZCZYNSKI A, PASTI-GRIGSBY M, GOSZCZYNSKI R, CRAWFORD R y CRAWFORD D. Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58(11): 3598-3604.
- [20] WARIISHI H, VALLI K y GOLD M.H. Manganese (II) Oxidation by Manganese Peroxidase from the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic Mechanism and Role of Chelators. *Biochemistry* 1992; 267: 2368-2369.

- [21] LEONOWICH A., CHO N, LUTEREK J, WILKOLAZKA A, WOJTAS M., et al. Fungal Laccase: Properties and activity on lignin. *Journal of Basic Microbiology* 2001; 41: 185-227.
- [22] GIANFREDA L., XU F. y BOLLAG J. Laccases: A Useful Group of Oxidoreductive Enzymes. *Bioremediation Journal* 1999; 3(1): 1-26
- [23] CHEN C., GRATZL J., KIRKMAN A., POTTHAST A. y ROSENAU T. Selective enzymatic oxidation of aromatic methyl groups to aldehydes by oxygen in the presence of a laccase-mediator catalyst. [Sitio en Internet] Free patents on line. Disponible en: <http://freepatentsonline.com/patent5888787.mht>. Acceso el 2 Marzo 2009.
- [24] GAO D., ZENG Y., WEN X. y QIAN Y. Competition Strategies for the Incubation of White Rot Fungi Under Non-sterile Conditions. *Process Biochemistry* 2008; 43: 934-944.
- [25] LÓPEZ J. Relación entre la Actividad de las Enzimas Lacasas y la Maduración de *Pleurotus ostreatus* y *Pleurotus pulmonarius*. [Tesis] Mexico D.F: Universidad Autónoma Metropolitana. División de Ciencias Biológicas y de la Salud; 2001.p.31
- [26] ACEVEDO F., Uso de Manganosperoxidasa Inmovilizada en Nanoarcillas para Aplicaciones Biotecnológicas. [Tesis] Temuco-Chile: Universidad de la Frontera. Biotecnología Ambiental; 2006.
- [27] MAGNASCO C., y FURCI G. ¿Qué son los Hongos? [Sitio en Internet] Hongos.cl. Disponible en: [http://www\\_hongos\\_cl-Imagenes-anthracoPhillum\\_jpg.mht](http://www_hongos_cl-Imagenes-anthracoPhillum_jpg.mht). Acceso el 4 febrero 2009.
- [28] TIEN M. y KIRK K. Lignin-degrading Enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*. *Science* 1984; 81: 2280-2284.
- [29] RODRIGUEZ E., PICKARD M. y VÁZQUEZ R. Industrial Dye Decolorization by Laccases from Ligninolytic Fungi. *Curr Microbiol* 1999; 38: 27-32.
- [30] MOELLER G. y GARZÓN M. Desarrollo de Tecnologías no Convencionales para el Tratamiento de Efluentes de la Fabricación de Colorantes Tipo Azo. *Anuario IMTA* 2003; 77-85.
- [31] RODRÍGUEZ S., BERMUDEZ R., SERRAT M. y KOUROUMA A. Selección de Cepas de *Pleurotus ostreatus* para la Decoloración de Efluentes Industriales. *Revista Mexicana de Micología* 2006; 23: 9-15.

- [32] VICENT T. Desarrollo de un Proceso Biotecnológico Sostenible para Decoloración de Efluentes Textiles.[Diapositiva]. Universidad de Barcelona; 2007. [16 diapositivas]
- [33] PEDROZA A., MOSQUEDA R., ORJUELA P. y RODRÍGUEZ R. Colonización de Soportes Inertes con Hongos de Podredumbre Blanca para el Tratamiento de Aguas Residuales de la Industria Papelera. [Tesis] Bogotá D.C.: Universidad Javeriana. Departamento de Microbiología; 2006.p.132-133
- [34] YONNI F., FASOLI H. y ÁLVAREZ H. Sistemas Biológicos para el Tratamiento de efluentes textiles [Sitio en Internet] Saber Cómo. Disponible en: [http// SABER COMO - INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA INDUSTRIAL.mht](http://SABER_COMO - INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGIA INDUSTRIAL.mht). Acceso el 12 Enero 2009.
- [35] MONDRAGÓN V.Molienda de Pigmentos Hasta Tamaño de Partícula Submicron con Medicion de Potencial Z. [Tesis] Puebla: Universidad de las Américas. Escuela de Ingeniería y Ciencias; 2006.
- [36] ARTIGAS J., Tecnología del Color. 3 ed. Valencia: PUV; 2004. p.339
- [37] PERINAT M. Los Colorantes [Sitio en Internet] Tecnología de la Confección textil. Disponible en: [http// La tintura textil - los colorantes.mht](http://La tintura textil - los colorantes.mht). Acceso el 12 marzo 2009.
- [38] MOLINA J., SOLANO R., HERNÁNDEZ M., ARIAS M. y RODRÍGUEZ. Decoloración de Colorantes Textiles por Actinomicetos. [Tesis] Madrid: Universidad de Alcalá. Depto. de Microbiología y Parasitología; 2009.
- [39] SEPÚLVEDA L., PALMA C. y CONTRERAS E. Fotooxidación con UV/H2O2 de Aguas Residuales Provenientes de una Planta Textil. Interamerican Confederation of Chemical Engineering 2006; 6-15
- [40] SETTE R., JIMÉNEZ D. y LORA F. Tratamiento de Aguas Residuales. Madrid: Ed. Reverté; 2006. p.23
- [41] DELEE W., O'NEILL C., HAWKES F. y PINHEIRO H. Anaerobic Treatment of Textile Effluents: A Review. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 1998; 73: 323-335.
- [42] U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Office of Compliance Sector Notebook Project: Profile of the Textile Industry 1997; 564-7022.

- [43] FERNÁNDEZ A. Biorremediación: Descontaminación Natural. [Sitio en Internet] Consumer Eroski. Disponible en: [http// Biorremediación Descontaminación natural CONSUMER EROSKI.mht](http://BiorremediaciónDescontaminaciónnaturalCONSUMEREROSKI.mht). Acceso el 27 abril 2009.
- [44] SANIN L. Industria Textil y Medio Ambiente. Parte III. Colombia Textil 1997; 124.
- [45] O'NEIL C., HAWKES N., LOURENCO N., DELEE W. y PINHEIRO H. Tratamiento de Residuos Líquidos de Celulosa y Textil. Chem. Technol. Biotechnol 1999; 74.
- [46] PRIGIONE V., VARESE G.C., CASIERI L. y MARCHISIO V.F. Biosorption of Simulated Dyed Effluents by Inactivated Fungal Biomasses. Bioresource Technology 2008; 99: 3559-3567.
- [47] MUTHEZHILAN R., YOGANANTH N., VIDHYA S. y JAYALAKSHMI S. Dye Degrading Mycoflora from Industrial Effluents. Research Journal of Microbiology 2008; 3 (3): 204-208.
- [48] LIBERTO R. y SAPARRAT M. Crecimiento y Habilidad Decolorante Potencial de *Hyphomycetes (Deuteromycetes)* de Rio Santiago sobre Medio Agarizado Suplementado con Cromóforos Sintéticos. Bol. Soc. Argent. Bot. 2005; 40:3-4
- [49] SEPÚLVEDA L., PALMA C. y CONTRERAS E. Caracterización y Evaluación de la Capacidad de Decoloración de Hongos Aislados desde Turba Magallánica. [Tesis] Santiago: Universidad Santiago de Chile. Depto de Ingeniería Química; 2007.
- [50] SUMATHI S., MANJU B. Uptake of Reactives Dyes by *Aspergillus foetidus*. Enzyme Microb Technol 2000; 27: 345-355. Citado por: FORGACS E., CSERHÁTI T. y OROS G. En: Removal of Synthetic Dyes from Wastewaters: a review. Elsevier 2004; 30: 963.
- [51] MOHORCIC M., TEODOROVIC S., GOLOG V. y FRIEDRICH J. Fungal and Enzymatic Decolourisation of Artificial Textile Dye Baths. Chemosphere 2005; 30. p 9.
- [52] HARVEY P. y THURSTON F. The Biochemistry of Ligninolytic Fungi. En: GADD G.M. Fungi in Bioremediation. Cambridge: Cambridge University Press; 2001. p. 27-51.
- [53] KNAPP J., NEWBY P. y REECE L. Decolorization of Dyes by Wood-Rotting Basidiomycete Fungi. Enzyme Microb Technol 1995; 17: 664-668. Citado

por: FORGACS E., CSERHÁTI T. y OROS G. En: Removal of Synthetic Dyes from Wastewaters: a review. *Environmental International* 2004; 30: 963.

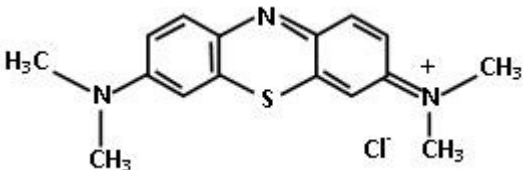
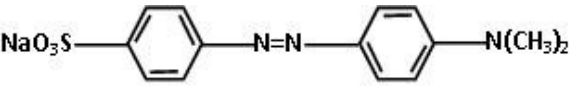
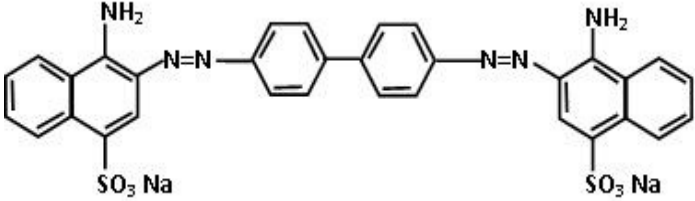
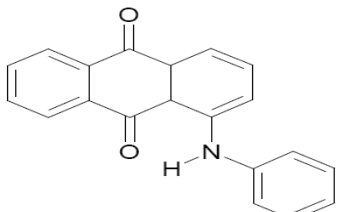
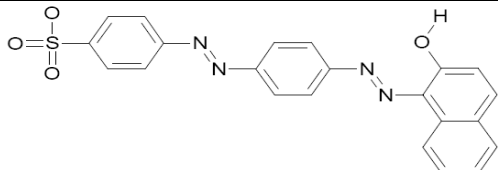
- [54] DESIGN-EXPERT® SOFTWARE. User's Guide: One Factor Tutorial. p 2-14.
- [55] STEEL R. y TORRIE J. *Bioestadística: Principios y Procedimientos*. 3 ed. McGraw-Hill; 1998.
- [56] SPADARO J. y RENGANATHAN V. Degradation of Azo Dyes by the Lignin-degrading Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 1992; 58: 2387-2401. Citado por: KNAPP J. *et al.* En: *Fungi in Bioremediation*. Edición. Cambridge: Cambridge University Press; 2001. p. 243-304.
- [57] YOUNG H., TAKEMORI T. Adsorption of Direct Dye on Cross-linked chitosan fiber. *Water Sci Technol* 1997; 35: 29-37. Citado por: FORGACS E., CSERHÁTI T. y OROS G. En: Removal of Synthetic Dyes from Wastewaters: a review. *Environmental International* 2004; 30: 962.
- [58] RAGHUKUMAR C., D'SOUZA D. y KUMAR A. Treatment of Colored Effluents with Lignin-degrading Enzymes: An Emerging Role of Marine-derived Fungi. *Critical Reviews in Microbiology* 2007; 34: 189-206.
- [59] RAGHUKUMAR C. Fungi from Marine Habitats: An Application in Bioremediation. *Mycol. Res* 2000; 104: 1222-1226. Citado por: RAGHUKUMAR C., D'SOUZA D. y KUMAR A. En: Treatment of Colored Effluents with Lignin-degrading Enzymes: An Emerging Role of Marine-derived Fungi. *Critical Reviews in Microbiology* 2007; 34: 189-206
- [60] KOHLMAYER J. y KOHLMAYER E. *Marine Mycology. The Higher Fungi*. Academy Press New York 1979. Citado por: RAGHUKUMAR C. En: *Marine Fungal Biotechnology: An Ecological Perspective*. *Fungal Diversity* 2007; 31: 19-35.
- [61] MOLITORIS H., BUCHALO A., KURCHENKO I., NEVO E., RAWAL B., *et al.* Physiological Diversity of the First Filamentous Fungi Isolated from the Hypersaline Dead Sea. *Fungal Diversity* 2000; 5: 55-70. Citado por: RAGHUKUMAR C., D'SOUZA D. y KUMAR A. En: Treatment of Colored Effluents with Lignin-degrading Enzymes: An Emerging Role of Marine-derived Fungi. *Critical Reviews in Microbiology* 2007; 34: 189-206
- [62] HALÓFILOS y BIOTECNOLOGÍA. [Sitio en Internet] Bras del Port. Disponible en: [http:// Bras del Port Bacteriorhodopsin, halophiles, biotechnology, photochromic, bioelectronic.mht](http://Bras del Port Bacteriorhodopsin, halophiles, biotechnology, photochromic, bioelectronic.mht). Acceso el 4 abril 2009.

- [63] VALENTIN L., FEIJOO G., MOREIRA M. y LEMA J. Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Forest and Salt Marsh Soils by White-Rot Fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2006; 58: 15-21.
- [64] SELLERS, 1999 Factores que Inciden en la Eficiencia de una Tecnología de Remediación. [Sitio en Internet] Instituto Nacional de Ecología. Disponible en: [http// Bras del Port Bacteriorhodopsinbuscar](http://BrasdelPort.Bacteriorhodopsinbuscar). Acceso 25 abril 2009.
- [65] ALEXANDER, 1994 Factores que Inciden en la Eficiencia de una Tecnología de Remediación. [Sitio en Internet] Instituto Nacional de Ecología. Disponible en: [http// Bras del Port Bacteriorhodopsinbuscar](http://BrasdelPort.Bacteriorhodopsinbuscar). Acceso 25 abril 2009.
- [66] GAO D., ZENG Y., WEN X. y QIAN Y. Competition Strategies for the Incubation of White-Rot Fungi under Non-sterile Conditions. *Process Biochemistry* 2008; 43: 931-944.
- [67] LIBRA J., BORCHERT M. y BANIT S. Competition Strategies for the Decolorization of a Textile-Reactive Dye with the White-Rot Fungi *Trametes versicolor* under Non-sterile Conditions. *Biotechnol Bioeng* 2003; 82: 736-744.
- [68] ASSADI M., ROSTAMI K., SHAHVALE M. y AZIN A. Decolorization of Textile Wastewater by *Phanerochaete chrysosporium*. *Desalination* 2001; 141: 331-336.
- [69] TENS M. y JORRÍN J. Extracción y Ensayo de la Actividad Invertasa de la Levadura de Panadería. Universidad de Córdoba. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.
- [70] MOUSO N., DIORIO L. y FORCHIASSIN F. Acción de *Stereum hirsutum* en la Degradación de Colorantes. *Revista Mexicana de Micología* 2007; 24: 294-298.



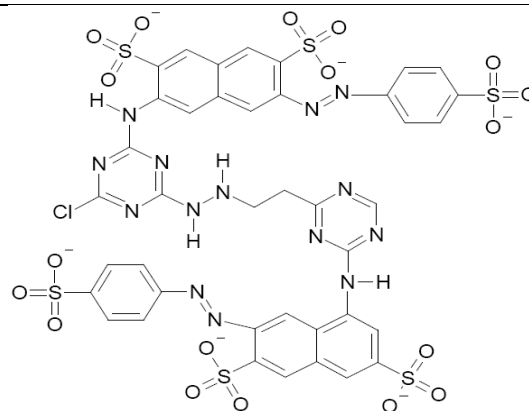
## ANEXOS

### ANEXO A. COLORANTES ESTÁNDARES E INDUSTRIALES

COLORANTES ESTÁNDARES		
COLORANTE	LONGITUD DE ONDA	ESTRUCTURA
Azul de Metileno	665 nm	
Naranja de Metilo	464 nm	
Rojo Congo	499 nm	
COLORANTES INDUSTRIALES		
Azul Terasil®	578 nm	
Rojo Erionyl®	511 nm	

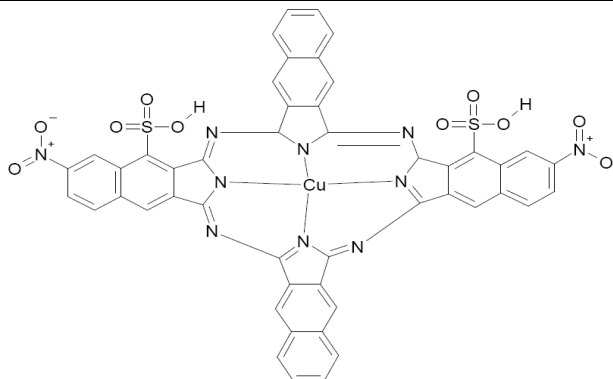
Rojo Cibacron®

505 nm



Turquesa Erionyl®

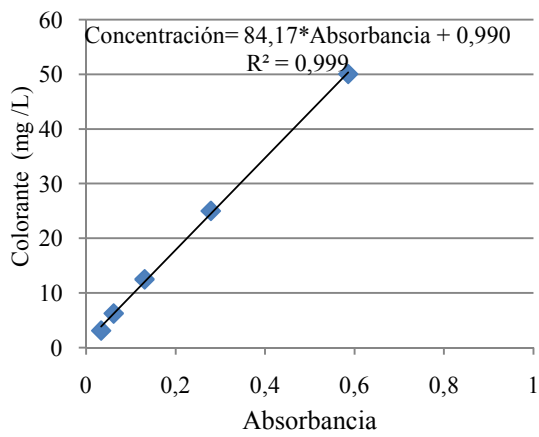
657 nm



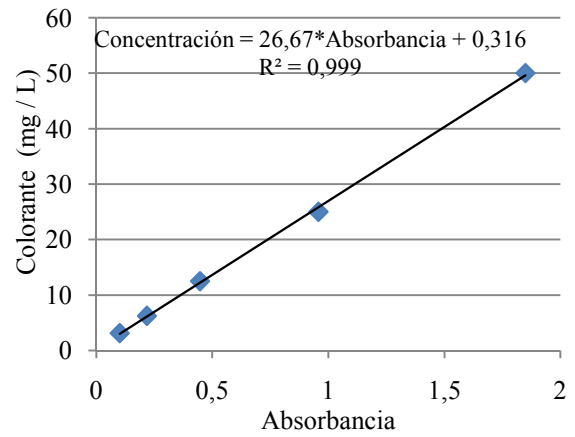
**ANEXO B. VELOCIDAD DE CRECIMIENTO Y DECOLORACIÓN DE *Anthracophyllum discolor*.**

Colorante	Velocidad de Crecimiento (cm/día)	Desviación Estándar	Velocidad de Decoloración (cm/día)	Desviación Estándar
Azul de Metileno	0,298	0,037	0,227	0,040
Naranja de Metilo	0,733	0,005	0,981	0,006
Rojo Congo	0,318	0,031	0,352	0,037
Azul Terasil	0,640	0,030	0,757	0,008
Rojo Cibacron	0,803	0,012	0,902	0,018
Rojo Erionyl	0,475	0,003	0,700	0,012
Turquesa Erionyl	0,790	0,005	0,955	0,007

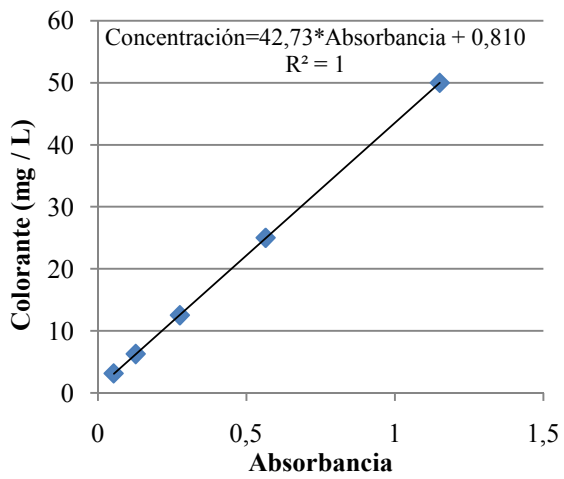
## ANEXO C. CURVAS DE CALIBRACIÓN DE COLORANTES INDUSTRIALES



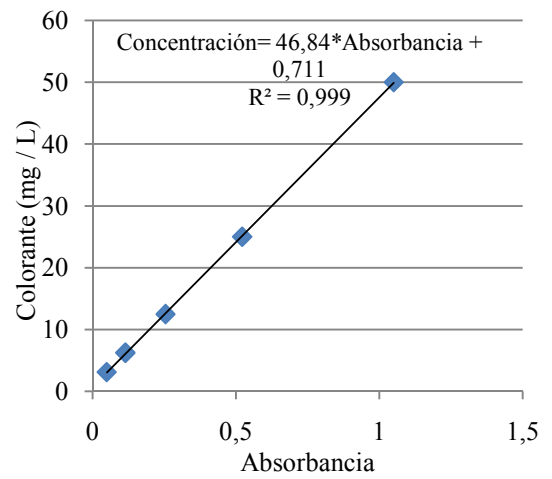
**Azul Terasil**



**Rojo Cibacron**



**Rojo Erionyl**



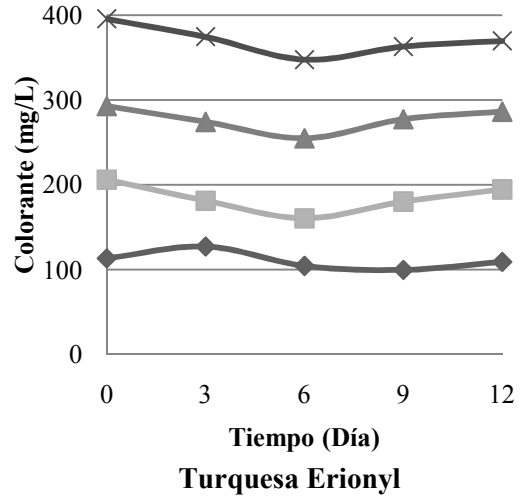
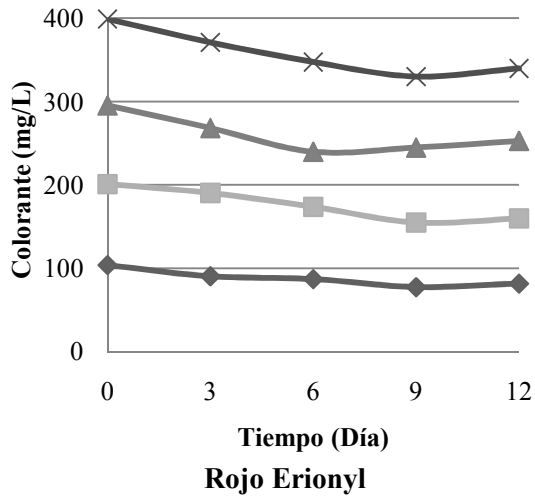
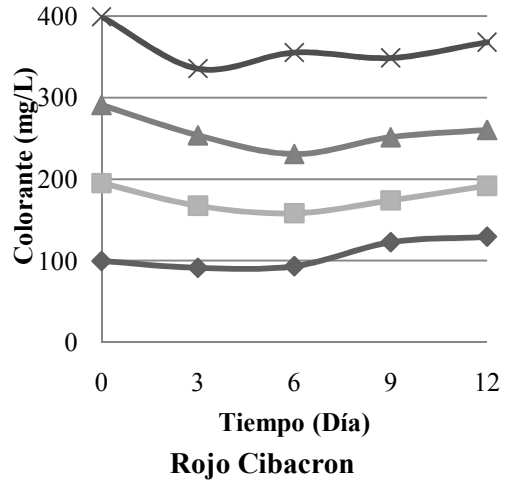
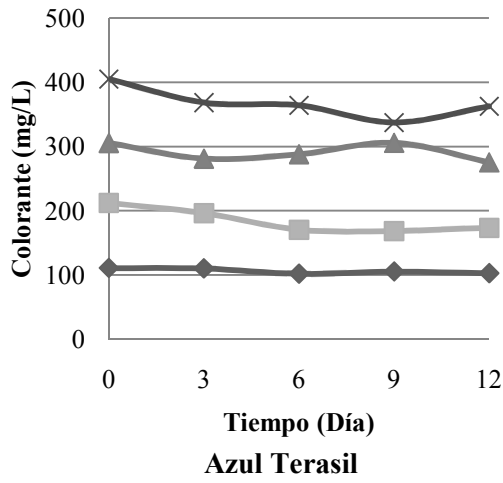
**Turquesa Erionyl**

## **ANEXO D. DETERMINACIÓN DE AZUCARES REDUCTORES POR EL MÉTODO DEL DNS.**

El método del ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) se basa en la reducción del DNS (de color amarillo) por la glucosa y otro azúcar reductor al ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (de color rojo ladrillo) cuya presencia se detecta por la Absorbancia a 540 nm. Es necesario obtener la correspondiente curva de calibración mediante diferentes soluciones patrón de glucosa; a partir de una solución stock de glucosa de 40 mM y por dilución con agua destilada se preparan diferentes soluciones del azúcar de diferente concentración. De cada una de estas concentraciones se toma 1 mL y se añade 1 mL del reactivo DNS y se lleva a ebullición durante 5 minutos, a continuación se enfría con hielo por 5 minutos y se determina la absorbancia a 540 nm utilizando como blanco agua destilada. Finalmente se realiza la curva de Absorbancia vs. Concentración.

Para determinar la concentración de glucosa de cada muestra, se diluye esta y de la misma forma se se toma 1 mL de la muestra diluida y se añade 1 mL del reactivo DNS; se lleva a ebullición durante 5 minutos y se enfría con hielo por 5 minutos más. Se determina la absorbancia a 540 nm utilizando como blanco agua destilada; este dato es el introducido en la curva de calibración obteniendo finalmente la concentración de glucosa [69].

**ANEXO E. ENSAYOS DE CONTROL EN BIOMASA INACTIVA: COLORANTES INDUSTRIALES.**



## ANEXO F. RESUMEN DISEÑO EXPERIMENTAL EN DESIGN EXPERT

<b>Tipo de Estudio</b>	<b>Número de Experimentos</b>	<b>Numero de Bloques</b>
Un Factor	12	3
<b>Factor</b>	<b>Respuesta % Decoloración</b>	<b>Respuesta Biomasa</b>
Azul Terasil	Mínimo 68.72	Mínimo 3.49
	Máximo 95.81	Máximo 3.66
Rojo Cibacron	Mínimo 40.62	Mínimo 3.01
	Máximo 69.46	Máximo 3.81
Rojo Erionyl	Mínimo 51.22	Mínimo 3.52
	Máximo 87.99	Máximo 4.38
Turquesa Erionyl	Mínimo 62.61	Mínimo 2.37
	Máximo 89.20	Máximo 3.08

**ANEXO G. ANOVA DE CADA FACTOR (COLORANTE) EN ENSAYO DE TOLERANCIA**

Factor: Azul Terasil, Respuesta: Porcentaje de Decoloración

Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media Cuadrática	F	Prob > f	Coefficiente de Variación
<b>Bloque</b>	754.40	2	377.20	1.49	0.3088	5.78
<b>Entre (explicada)</b>	104.82	3	34.94			
<b>Intra (Residual)</b>	140.41	6	23.40			
<b>Total</b>	999.62	11				

Factor: Rojo Cibacron, Respuesta: Porcentaje de Decoloración

Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media Cuadrática	F	Prob > f	Coefficiente de Variación
<b>Bloque</b>	292.31	2	146.15	0.45	0.7262	14.22
<b>Entre (explicada)</b>	91.12	3	30.37			
<b>Intra (Residual)</b>	404.52	6	0.000			
<b>Total</b>	787.95	11	67.42			

Factor: Rojo Erionyl, Respuesta: Porcentaje de Decoloración

Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media Cuadrática	F	Prob > f	Coefficiente de Variación
<b>Bloque</b>	157.22	2	78.61	23.96	0.0010	6.50
<b>Entre (explicada)</b>	1463.94	3	487.98			
<b>Intra (Residual)</b>	122.19	6	20.36			
<b>Total</b>	1743.35	11				

Factor: Turquesa Erionyl, Respuesta: Porcentaje de Decoloración

Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media Cuadrática	F	Prob > f	Coefficiente de Variación
<b>Bloque</b>	395.65	2	197.82	4.09	0.0671	4.64
<b>Entre (explicada)</b>	158.36	3	52.79			
<b>Intra (Residual)</b>	77.36	6	12.89			
<b>Total</b>	631.37	11				

Factor: Azul Terasil, Respuesta: Biomasa

Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media Cuadrática	F	Prob > f	Coefficiente de Variación
<b>Bloque</b>	0.000	2	0.000	6.366E+07	< 0.0001	0.000
<b>Entre (explicada)</b>	0.048	3	0.016			
<b>Intra (Residual)</b>	0.000	6	0.000			
<b>Total</b>	0.048	11				

Factor: Rojo Cibacron, Respuesta: Biomasa

Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media Cuadrática	F	Prob > f	Coefficiente de Variación
<b>Bloque</b>	0.000	2	0.000	0.45	6.366E+07	< 0.0001
<b>Entre (explicada)</b>	1.60	3	0.53			
<b>Intra (Residual)</b>	0.000	6	0.000			
<b>Total</b>	1.60	11				

Factor: Rojo Erionyl, Respuesta: Biomasa

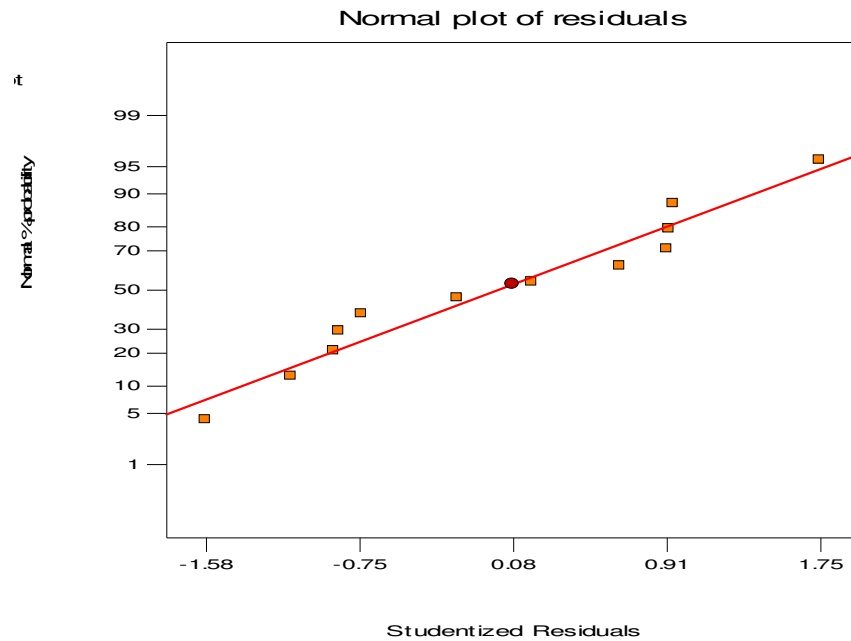
Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media Cuadrática	F	Prob > f	Coefficiente de Variación
<b>Bloque</b>	0.000	2	0.000	6.366E+07	< 0.0001	0.000
<b>Entre (explicada)</b>	1.43	3	0.48			
<b>Intra (Residual)</b>	0.000	6	0.000			
<b>Total</b>	1.43	11				

Factor: Turquesa Erionyl, Respuesta: Biomasa

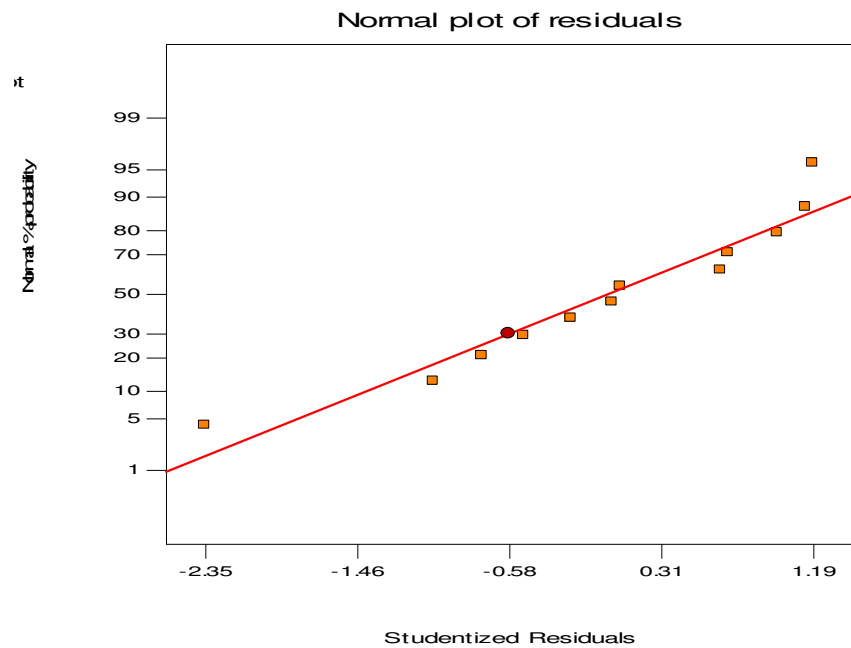
Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media Cuadrática	F	Prob > f	Coefficiente de Variación
<b>Bloque</b>	0.000	2	0.000	6.366E+07	0.0001	0.000
<b>Entre (explicada)</b>	0.76	3	0.25			
<b>Intra (Residual)</b>	0.000	6	0.000			
<b>Total</b>	0.76	11				



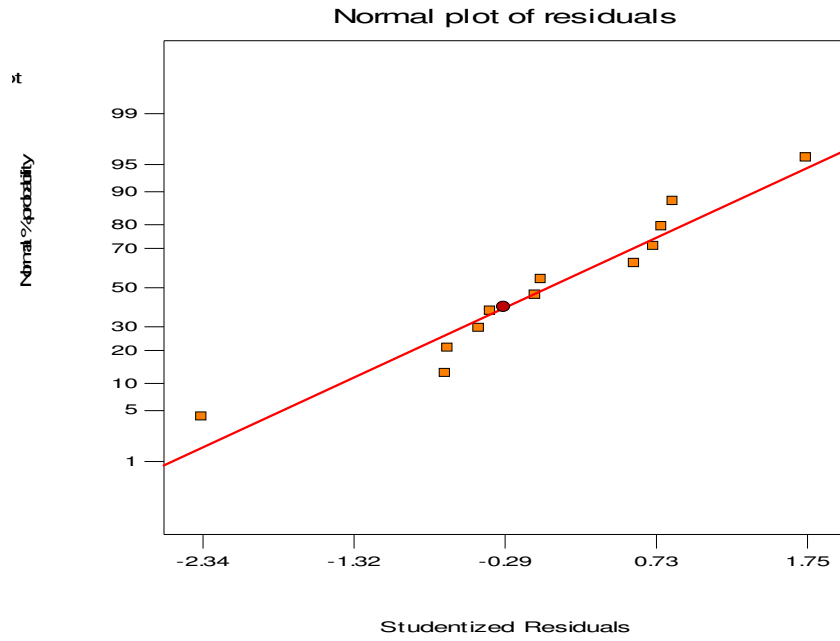
## ANEXO H. DISTRIBUCIÓN NORMAL DE ENSAYO DE TOLERANCIA EN COLORANTES INDUSTRIALES



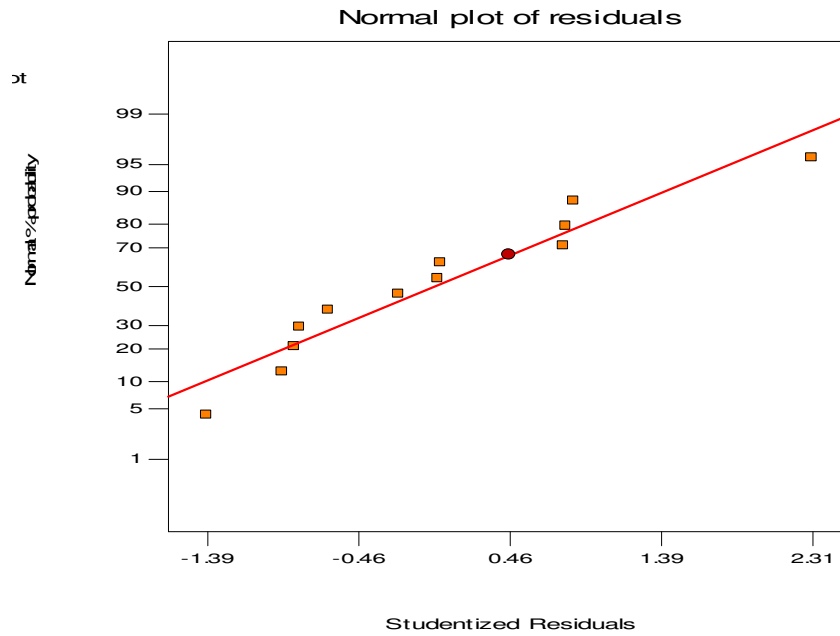
### Colorante Azul Terasil



### Colorante Rojo Cibacron



**Colorante Rojo Erionyl**



**Colorante Turquesa Erionyl.**

**ANEXO I. ADSORCIÓN POR BIOMASA INACTIVA EN MEZCLA DE COLORANTES  
EN DIFERENTES CONCENTRACIONES SALINAS.**

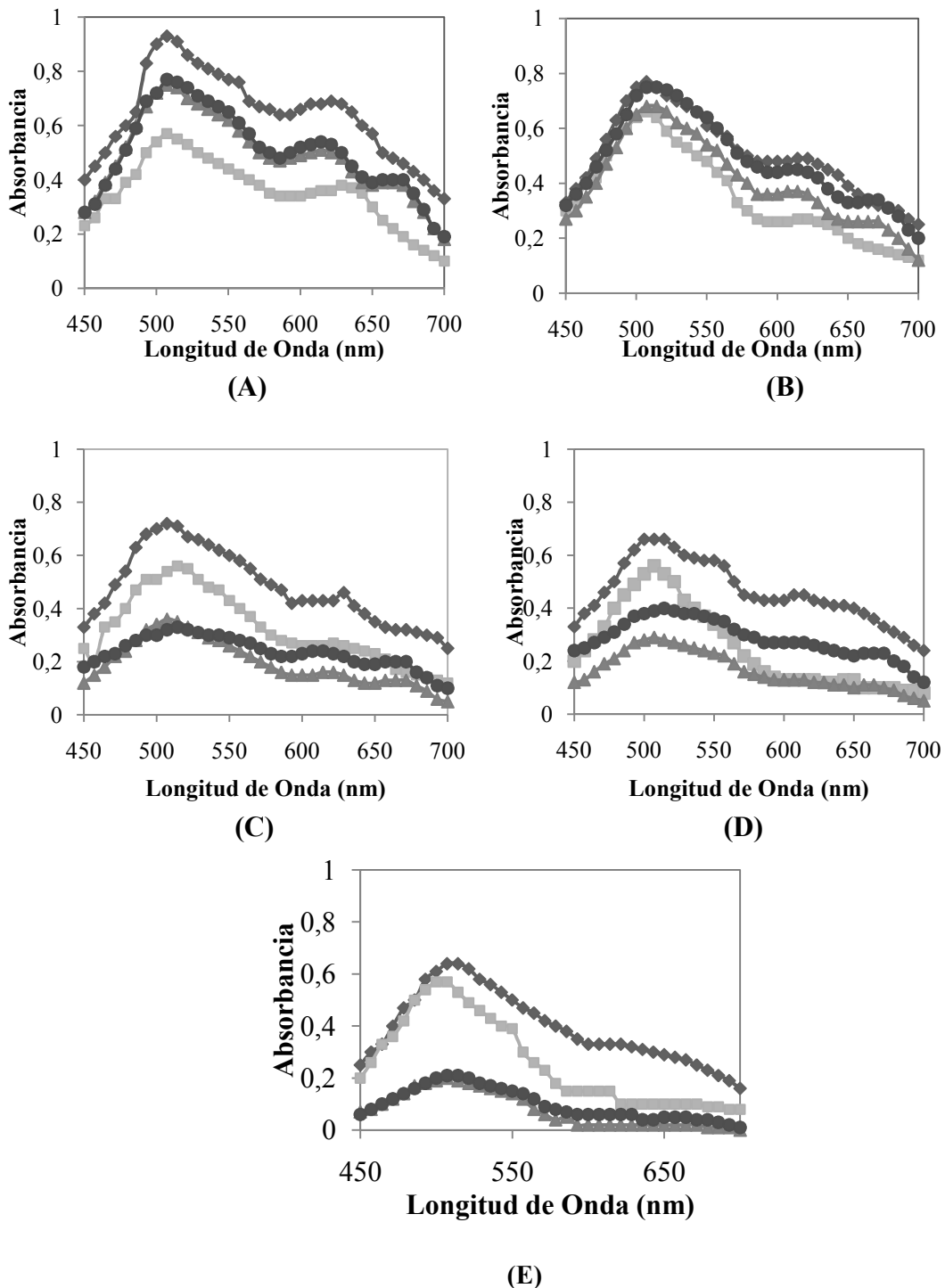


Figura A-1. Decoloración por *A. discolor* en mezcla de colorantes y diferentes concentraciones salinas. (A) 0,15 g/L de NaCl. (B) 9 g/L de NaCl. (C) 20 g/L de NaCl. (D) 30 g/L de NaCl. (E) 40 g/L de NaCl. ◆ Día 0; ■ Día 4; ▲ Día 8; ● Día 12.

## ANEXO J. ADSORCIÓN POR BIOMASA INACTIVA EN MEZCLA DE COLORANTES

$\lambda(\text{nm})$	ABSORBANCIA *						
	0	1	2	3	4	5	6
450	0,4	0,46	0,33	0,47	0,45	0,39	0,49
500	0,84	0,69	0,68	0,61	0,72	0,63	0,89
550	0,75	0,68	0,63	0,66	0,57	0,59	0,86
600	0,61	0,52	0,49	0,52	0,56	0,49	0,75
650	0,53	0,44	0,42	0,44	0,45	0,45	0,65
700	0,33	0,28	0,26	0,29	0,38	0,30	0,51
$\lambda(\text{nm})$	7	8	9	10	11	12	
450	0,42	0,44	0,43	0,34	0,35	0,36	
500	0,77	0,61	0,68	0,69	0,69	0,70	
550	0,67	0,66	0,64	0,64	0,64	0,67	
600	0,57	0,51	0,5	0,49	0,5	0,49	
650	0,5	0,42	0,41	0,41	0,42	0,43	
700	0,35	0,28	0,26	0,27	0,29	0,28	

\* Datos correspondientes a los barridos espectrofotométricos realizados cada media hora durante seis horas.

### ANEXO K. ANOVA ENSAYO AGUA RESIDUAL NO ESTÉRIL.

Factor: Azul Terasil, Respuesta: Biomasa

Variación	Suma de Cuadrados	Grados de Libertad	Media Cuadrática	F	Prob > f	Coficiente de Variación
<b>Bloque</b>	158.57	1	158.57	71.75	< 0.0001	22.83
<b>Entre (explicada)</b>	653.51	1	653.51			
<b>Intra (Residual)</b>	184.20	13	91.09			
<b>Total</b>	0.048	15				

### ANEXO L. DISTRIBUCIÓN NORMAL DE ENSAYO AGUA RESIDUAL NO ESTÉRIL

