

**SELECCIÓN DE UN CONSORCIO FÚNGICO INMOVILIZADO SOBRE
Furcraea sp PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE LA
INDUSTRIA TEXTIL**

**DIEGO ARMANDO CÓRDOBA PRIETO
LAURA CATALINA OSPINA ESPITIA**

TRABAJO DE GRADO

**Presentado como requisito parcial
para optar al título de
MICROBIÓLOGO INDUSTRIAL**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL
Bogotá, D.C.
Noviembre de 2009**

NOTA DE ADVERTENCIA

“La universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1996

**SELECCIÓN DE UN CONSORCIO FÚNGICO INMOVILIZADO SOBRE
Furcraea sp PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE LA
INDUSTRIA TEXTIL**

**DIEGO ARMANDO CÓRDOBA PRIETO
LAURA CATALINA OSPINA ESPITIA**

APROBADO

**Aura Marina Pedroza, Ph.D
Bacterióloga
Directora**

**Mbio. Ingrid Johanna Puentes
Microbióloga Industrial
Codirectora**

**María Ximena Rodríguez, Ph.D
Jurado**

**Ing. Sonia Esperanza Ruiz
Jurado**

**SELECCIÓN DE UN CONSORCIO FÚNGICO INMOVILIZADO SOBRE
Furcraea sp PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES DE LA
INDUSTRIA TEXTIL**

**DIEGO ARMANDO CÓRDOBA PRIETO
LAURA CATALINA OSPINA ESPITIA**

APROBADO

**Ingrid Schuler, Ph.D
Decana Académica
Facultad de Ciencias**

**Janeth Arias Palacios, M.Sc, M. Ed
Directora de Carrera
Microbiología Industrial**

Dedicado a
HECTOR IVÁN CÓRDOBA PRIETO
1983 – 2010

Even though you're gone, we're still a team

AGRADECIMIENTOS

A Dios primero que todo por haberme regalado la oportunidad de estar acá escribiendo estas palabras, por la vida, por la salud y por haberme brindado sabiduría y fortaleza durante todo este tiempo, no tengo las suficientes palabras para agradecerle todo lo que me ha dado. A mis padres, gracias a ellos por darme el regalo de la vida, de formarme como profesional y como persona. A mi hermano por haber sido siempre mi consejero, mi apoyo y un excelente modelo de profesional entregado y aunque hoy no está físicamente, su legado perdurará en mí para siempre hasta que un día volvamos a encontrarnos. A la Dra. Aura Marina Pedroza por haberme dado esta increíble oportunidad de trabajar e investigar con ella, gracias a su exigencia y entrega, cada día fue un nuevo reto y así mismo cada día fue un nuevo aprendizaje. A Johanna Puentes por su compañía durante todo el proyecto, sus enseñanzas y sobre todo por su amistad. Por supuesto a Cata por haber asumido conmigo este reto y por ser aparte de una excelente compañera una increíble amiga. A todos mis amigos del laboratorio de Microbiología Ambiental y Suelos, quienes durante más de diez meses se convirtieron en nuestra pequeña familia: Alejandro, Carolina, Erika, Sonia y Lorena, ¡gracias por todos los buenos momentos compartidos, nunca se borrarán de nuestros corazones! A la Ing. Balkys Quevedo por proporcionarnos la ayuda con los equipos y reactivos del Laboratorio de Biotecnología Aplicada y a todo el personal de monitoría de la Facultad de Ciencias, especialmente a Inesita a quien recuerdo con mucho afecto. Mil gracias también a los que siempre estuvieron pendientes y dándome mucho apoyo en este tiempo especialmente a Frank Enciso y Edgar Suárez CSV, mi segunda familia, millones de gracias por ser mis guías espirituales, mi fortaleza y por ayudarme cada día a ser una mejor persona y finalmente agradecimientos a todos los que siempre estuvieron a nuestro lado: Angela, Nata, Miguel, Willie, Rodrigo, Liza, Oriana, Aura y Lorena. ¡A TODOS MIL GRACIAS!

DIEGO A. CÓRDOBA PRIETO

AGRADECIMIENTOS

- A mi familia en especial a mi papá, mi mamá y mi hermano, que en cada paso en mi vida me ha acompañado y apoyado de manera incondicional, agradezco sus esfuerzos tolerancia y extrema comprensión. A mis tías que siempre tuvieron una voz de apoyo en los momentos de dificultad.
- A la Pontificia Universidad Javeriana, por disponer el espacio físico, los equipos, los reactivos y los servicios para llevar a cabo el proyecto. Agradecemos especialmente al laboratorio de Biotecnología y al laboratorio de Microbiología ambiental y de suelos.
- A la Dra. Aura Marina Pedroza, por darme la oportunidad de realizar este trabajo, continuar con la línea de investigación, también por su exigencia y apoyo, que contribuyó a un constante aprendizaje.
- A la Microbióloga Ingrid Johanna Puentes, codirectora de la investigación, quien colaboró siempre, con sus conocimientos y su atención durante todo el proceso experimental.
- Al Microbiólogo del centro de servicios Alejandro Rodríguez Palacios por su cálida bienvenida y los numerosos favores y consejos.
- A la Ingeniera Balkys Quevedo, por todo su apoyo, resolviendo algunas dudas, además por sus préstamos incondicionales de servicios, reactivos y material del laboratorio de Biotecnología.
- A los compañeros de laboratorio, Carolina, Erika, Alejandro, Johanna, Lorena, Sonia, Nataly, y a todos los que diariamente transitaban por ahí, Dani R, Andrés Q, Rodrigo, Andrés H, Carolina G, a todos ellos, ya que se convirtieron en nuestra familia después de convivir tanto tiempo juntos, agradezco por su apoyo, amistad y todos los agradables y cómicos momentos.
- Al departamento de coordinación, monitoria y servicios de la facultad de ciencias básicas y en especial a Diana, Nesly. También a Inesita por miles de favores y apoyo durante todo este proceso.
- A todos los amigos que acompañaron y apoyaron este proceso largo y complejo, pero que también han estado siempre a mi lado, Ángela, Ori, mi Chaparrita, Liza, Diego.
- Y finalmente a Diego, por luchar junto conmigo por este triunfo, y lograr sacar adelante esta meta, además por brindarme siempre su incondicional amistad y apoyo. Además de nunca dejar que olvidara nada. Siempre cuentas conmigo.

LAURA CATALINA OSPINA ESPITIA

CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
1 RESUMEN.....	1
2 INTRODUCCIÓN.....	2
3 JUSTIFICACIÓN	2
4 MARCO TEÓRICO	3
4.1 Impacto ambiental generado por la industria textil	3
4.2 Tratamiento biológico con hongos de podredumbre blanca (HPB) y desarrollo de bioportadores mediante inmovilización	5
5 OBJETIVOS.....	6
5.1 Objetivo General	6
5.2 Objetivos Específicos	6
6 HIPÓTESIS	7
7 MATERIALES Y MÉTODOS.....	7
7.1 Microorganismos	7
7.2 Colonización del portador a base de fique.....	7
7.3 Pruebas preliminares de decoloración en medio sólido.....	7
7.4 Estudios de adsorción	8
7.5 Estudios de biodegradabilidad del portador	9
7.6 Selección de las condiciones de operación a escala erlenmeyer empleando células inmovilizadas y agua residual textil.....	9
7.6.1 Caracterización del agua residual sintética similar a la proveniente de una industria textil	9

7.6.2	Diseño experimental para la selección del consorcio fúngico	9
7.6.2.1	Montaje de los tratamientos para el Plackett Burman	9
8	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	11
8.1	Microorganismos.....	11
8.2	Colonización del portador a base de fique.....	12
8.3	Pruebas preliminares de decoloración en medio sólido.....	12
8.4	Estudios de adsorción	17
8.5	Estudios de biodegradabilidad del portador	21
8.6	Selección de las condiciones de operación a escala erlenmeyer empleando células inmovilizadas y agua residual textil	22
8.6.1	Caracterización del agua residual sintética similar a la proveniente de la industria textil	22
8.6.2	Diseño experimental para la selección del consorcio fúngico.....	24
8.7	Barridos UV-VIS para los Tratamientos del diseño del Plackett Burman	28
9	CONCLUSIONES.....	29
10	RECOMENDACIONES.....	30
11	BIBLIOGRAFÍA.....	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores evaluados en el Plackett-Burman. Matriz codificada del diseño Plackett-Burman.....	10
Tabla 2. Decoloración <i>in vitro</i> para colorantes azoicos (negro reactivo 5), trifenilmetánico (verde de malaquita) y antraquinónico (cristal violeta) en agar Rhada suplementado 2 g/L de celulosa y fique. 30° C, 10 días	15
Tabla 3. Decoloración <i>in vitro</i> para la mezcla de colorantes azoicos de la gama iris en agar Rhada suplementado con 2 g/L de fique. 30°C, 10 días.....	17
Tabla 4. Constantes de saturación y concentraciones de saturación máxima para el fique como portador libre de biomasa.....	19
Tabla 5. Pruebas físicas-químicas para el agua residual de acuerdo a la resolución 3957 SDA.....	23

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Colonización de plantillas de fique de 4 cm². (izquierda) plantilla sin colonizar. (derecha) plantilla colonizada. 8 días, 30° C en agar extracto de salvado de trigo 12
- Figura 2.** Pruebas de decoloración *in vitro* para colorantes azoicos (negro reactivo 5), trifenilmetánico (verde de malaquita) y antraquinónico (cristal violeta) en agar Rhada suplementado 2 g/L de celulosa y fique. 30° C, 10 días..... 13
- Figura 3.** Pruebas de decoloración *in vitro* para colorantes azoicos (negro reactivo 5), trifenilmetánico (verde de malaquita) y antraquinónico (cristal violeta) en agar Rhada suplementado 2 g/L de celulosa y fique. 30° C, 10 días..... 15
- Figura 4.** Pruebas de decoloración *in vitro* para diferentes colorantes azoicos de la gama iris en agar Rhada suplementado con 2 g/L de fique. 30° C, 10 días 16
- Figura 5.** Decoloración *in vitro* para la mezcla de colorantes en agar Rhada suplementado con 2g/L de fique, 30 °C, 10 días 17
- Figura 6.** Linealización de la ecuación de Langmiur para determinar la adsorción de la mezcla de colorantes sobre el fique libre de biomasa a 30° C 19
- Figura 7.** Linealización de la ecuación de Langmiur para determinar la adsorción de la mezcla de colorantes sobre el bioportador a base de *P. ostreatus* inmovilizado sobre 0.6g de fique a 30° C 20
- Figura 8.** Linealización de la ecuación de Langmiur para determinar la adsorción de la mezcla de colorantes sobre el bioportador a base de *P. chrysosporium* inmovilizado sobre 0.6g de fique a 30° C 20

Figura 9. Linealización de la ecuación de Langmiur para determinar la adsorción de la mezcla de colorantes sobre el bioportador a base del consorcio <i>P. ostreatus</i> y <i>P. chrysosporium</i> inmovilizado sobre 0.6 g de fique a 30° C	21
Figura 10. Estudios de Biodegradabilidad preliminares. Fibra sin colonizar alto aumento (izquierda), fibra colonizada (derecha)	22
Figura 11. (Izquierda) fique colonizado con <i>P. ostreatus</i> , (Centro) fique colonizado con <i>T.versicolor</i> . (Derecha) fique colonizado con <i>P. chrysosporium</i> 30° C, 8 días	24
Figura 12. Resultados del diseño experimental Plackett Burman.....	25
Figura 13. Barridos UV/VIS para los tratamientos de Plackett Burman	29

1 RESUMEN

Se evaluaron los hongos *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* y *Phanerochaete chrysosporium* para seleccionar un consorcio y las condiciones de operación apropiadas para evaluar la tratabilidad de un agua residual de origen textil como alternativa no convencional de tratamiento.

Se realizaron pruebas de decoloración *in vitro* en medio sólido empleando el medio mineral Rhada, suplementado con celulosa y fibra de fique como fuentes de carbono para favorecer el proceso de decoloración. Posteriormente, se realizaron pruebas seleccionando un colorante representativo de cada grupo químico, Negro reactivo 5 (azoico), Verde de malaquita (antraquinónico) y Cristal violeta (trifenilmetano). De acuerdo con los resultados obtenidos, los hongos no decoloran el cristal violeta bajo ninguna de las condiciones nutricionales evaluadas, por lo cual fue retirado del estudio. Con respecto al verde de malaquita la decoloración fue mayor para *P. ostreatus* y *T. versicolor*, con valores de 28% y 25% en celulosa y 16% para *T. versicolor* en fique. Para el Verde de malaquita la decoloración fue mayor para *P. ostreatus* y *T. versicolor*, con valores de 28% y 25% en celulosa y 16% para *T. versicolor* en fique.

La mejor decoloración se obtuvo con el NR5 con valores de 99, 87 y 29% para *P. ostreatus* en celulosa, *T. versicolor* en fique y *P. ostreatus* en fique. Al evidenciar estos valores de remoción, se realizó un ensayo complementario donde se mezclaron varias referencias de la misma familia observando decoloración del 52%, 31% y 21% para *T. versicolor*, *P. chrysosporium* y *P. ostreatus*, respectivamente, en medio suplementado con fique.

Tras los ensayos realizados en medio sólido, se seleccionaron los colores que participaron en los ensayos posteriores del diseño experimental del Plackett Burman; para esto, se realizó un conjunto de 12 tratamientos, con el fin de evaluar el efecto de 11 factores a dos niveles sobre la decoloración del agua residual textil previamente caracterizada. De acuerdo con el análisis estadístico, los factores que favorecieron la decoloración del consorcio formulado a base de *P. ostreatus* y *P. chrysosporium* fueron, emplear el agua residual al 100% sin suplemento de C/N, a pH 8.0, 120 rpm, 30° C por 4 días. Bajo estas condiciones la decoloración fue del 99% con remociones de 75% para DQO y actividad enzimática de 21 U/L (lacasa), 0.1 U/L (MnP) y 191 U/L (LiP).

2 INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las industrias textiles utilizan diversos compuestos químicos con el fin de proporcionar color y características especiales a las fibras. Generalmente se emplean tintes sintéticos en los procesos de teñido, los cuales, después de las operaciones de lavado y adecuación, son mezclados con todos los efluentes generados por la planta y se convierten en agua residual no tratada. Además, esta industria tiene un alto consumo de agua potable, ya que es utilizada en diferentes partes del proceso productivo, trayendo como consecuencia la generación de grandes cantidades de agua residual con una carga orgánica e inorgánica heterogénea. Para su tratamiento se emplean métodos físicos, químicos y biológicos que alcanzan eficiencias interesantes con respecto a la remoción de materia orgánica e inorgánica. No obstante, algunos de ellos dejan concentraciones variables de colorante, lo que limita su calidad para ser reutilizada y puede llegar a generar graves problemas de contaminación ambiental al realizar el vertimiento puntual. Por esta razón, en la actualidad se están valorando métodos no convencionales que permitan obtener una decoloración mayor y disminuyan el impacto ambiental, siendo los hongos de podredumbre blanca una alternativa promisoriosa. Estos métodos tienen como ventaja su versatilidad, economía y que en algunos casos, se puede llegar a reutilizar la biomasa para un tratamiento adicional.

En este trabajo, se estudió de manera *in vitro* un sistema biológico seleccionando un consorcio a base de hongos de podredumbre blanca, inmovilizados en *Furcraea* sp, con el fin de evaluar la remoción de color y DQO presente en un agua residual textil y su correlación con la actividad enzimática de los hongos a escala de laboratorio.

3 JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, el incremento de la contaminación del medio ambiente ha hecho que se aumente la preocupación ante la disminución de los recursos naturales y por lo tanto, esto ha hecho que el hombre busque nuevas alternativas para reducir el efecto contaminante de sus actividades. En el caso de la industria textil, se estima que un 5-30% de los colorantes utilizados no se fijan a las fibras utilizadas y por consiguiente son eliminados con el agua de lavado. Debido a la demanda mundial en esta industria, día a día se presenta una gran demanda de procesos y por consiguiente se descarga una gran cantidad de agua coloreada y contaminada. Dentro de los procesos físicos y químicos utilizados en la actualidad para el tratamiento, se disminuyen de manera significativa otros parámetros tales como la DBO₅ y la DQO, pero no se reduce la carga de color del agua residual. En este estudio, se planteó y evaluó un sistema de tratamiento biológico como alternativa no convencional

en el tratamiento de aguas residuales empleando tres hongos de la podredumbre blanca, *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochaete chrysosporium* y *Trametes versicolor*, reconocidos por poseer un sistema enzimático eficiente en la degradación de la lignina y de compuestos estructuralmente similares a esta. Al inmovilizar el hongo sobre un soporte, se asegura un mayor contacto de los microorganismos con el contaminante a tratar y esto resulta en que la técnica sea más versátil y económica.

En Colombia, aunque la industria textil es una de las más importantes para la economía, no se ha prestado la atención necesaria al problema de la contaminación que esta genera, por esto resulta de gran utilidad la formulación de nuevas alternativas para el tratamiento de los residuos líquidos originados, implementando procesos no convencionales, dentro de los cuales se encuentran los de tipo biológico que plantean nuevas soluciones y evitan que se siga contribuyendo al grave problema mundial de la contaminación del medio ambiente.

4 MARCO TEÓRICO

4.1 Impacto ambiental generado por la industria textil

La empresa textil ocupa el cuarto puesto a nivel mundial con respecto a la cantidad de agua potable que utiliza durante las diferentes etapas del proceso (Kunz *et al.*, 2001). En general, las corrientes de agua de descarga provienen principalmente del descruce, macerado (20%) y del blanqueo, teñido y lavado (65%). En promedio se han reportado entre 125 y 170 litros de agua por kilogramo de producto (USEPA, 1997). La composición química del agua es muy variada, pero los contaminantes prioritarios son el color, compuestos aromáticos, DQO, DBO₅ y metales pesados dependiendo del tipo de tinte. Según lo reportado por Gonçalves *et al.*, (2000), los residuales provenientes de la tintura del poliéster tiene concentraciones variables de DQO (50-5000 mg/L), DBO₅ (200-300 mg/L), sólidos suspendidos (50-500 mg/L), nitrógeno orgánico (18-39 mg/L), fósforo total (0.3-15 mg/L), y cromo total (0.2-0.5 mg/L). Generalmente la DBO₅ (Demanda Bioquímica de Oxígeno) es relativamente baja en comparación con la DQO (Demanda Química de Oxígeno) (Mantzavinos y Psillakis, 2004).

La Secretaría Distrital de Ambiente, es la entidad encargada, en Bogotá, de orientar y liderar la formulación de políticas ambientales y de aprovechamiento sostenible de los recursos ambientales y del suelo, tendientes a preservar la diversidad e integridad del ambiente, el manejo y aprovechamiento sostenible de los recursos naturales distritales y la conservación del sistema de áreas protegidas, para garantizar una relación adecuada

entre la población y el entorno ambiental y crear las condiciones que garanticen los derechos fundamentales y colectivos relacionados con el medio ambiente. (Secretaría del medio Ambiente, 2009). Esta entidad tiene en vigencia una resolución por la cual se establece, la norma técnica para el control y manejo de los vertimientos realizados a la red de alcantarillado público de la red Capital. Dicha Resolución es la No 3957 del 19 de junio de 2009, donde se establece importancia en proteger los recursos naturales, para nuestro interés el agua potable, además de prevenir y controlar los factores de deterioro ambiental, para garantizar su desarrollo sostenible, su conservación, restauración o sustitución y garantizar el derecho a un ambiente sano para los actuales habitantes y las generaciones futuras del distrito capital (Secretaría de Ambiente, 2009).

Los métodos de tratamiento para la remoción de la DBO₅, sólidos y DQO son muy bien establecidos, sin embargo los colorantes son más difíciles de tratar debido a que son producidos para resistir la exposición al sudor, jabón, agua, luz y agentes oxidantes, lo que los convierte en compuestos muy estables y menos susceptibles a la biodegradación (Levin *et al.*, 2004, Blánquez *et al.*, 2004, Romero *et al.*, 2006). El color residual presente en el agua depende del procedimiento de tintura, tipo de colorante, método de aplicación y relación agua/colorante, y se considera que aproximadamente entre un 5-20% de colorantes ácidos, 10% de colorantes dispersos y 5-30% de colorantes directos, no se unen satisfactoriamente a las telas y se pierden en el agua de lavado. Dada la heterogeneidad de los residuales y considerando que para algunas empresas diariamente la producción y tintura de telas puede alcanzar hasta tres toneladas, la generación de aguas coloreadas es muy significativa (Gonçalves *et al.*, 2000). La remoción de colorantes se ha convertido en un área de gran interés para diversos grupos de investigación, básicamente porque la legislación es exigente con respecto a los vertimientos que producen ciertas industrias como las papeleras, textiles y metalúrgicas. La mayoría de las empresas cumplen con estos parámetros, sin embargo vierten aguas residuales muy coloreadas ó con cierto contenido de metales pesados y AOX (Compuestos halogenados absorbibles), que podrían ser tratadas y reutilizadas en alguna de las etapas de tintura ó lavado en las cuales no se requiera agua con 100% de transparencia y ausencia total de sales como sodio, sulfato y calcio (Vishnu *et al.*, 2007). Adicionalmente ciertos colorantes ó subproductos pueden tener efectos toxicológicos, mutagénicos y carcinogénicos a mediano y largo plazo sobre diferentes especies animales y vegetales (Alvares de Lima *et al.*, 2007).

4.2 Tratamiento biológico con Hongos de Podredumbre Blanca (HPB) y desarrollo de bioportadores mediante inmovilización

Los microorganismos más empleados en la biorremediación de efluentes contaminados son los hongos de la podredumbre blanca (HPB) inmovilizados en diferentes materiales, estos hongos tienen la habilidad para degradar fibras, en el caso específico de fique, por ser compatibles degradadores de lignina. Estos hongos se encuentran fácilmente en la naturaleza, son *Basidiomycetes* y pertenecen a la clase *Hymenomyces*, comunes en bosques de pino y encino, estos hongos realizan una función natural esencial en la conversión de lignina cuya producción es de 20.3×10^{12} Kg/año, este es un polímero polifenólico heterogéneo que se degrada por oxidación a compuestos aromáticos de más fácil degradación como el ácido vainillínico y ácido protocaténico (Morales y Ruiz, 2008).

La inmovilización se define como las distintas formas de atrapamiento o adhesión celular a diferentes soportes por adhesiones físicas o químicas, gracias a esto el microorganismo es capaz de formar agrupaciones por biopelículas o colonizaciones. Es un evento que se da naturalmente gracias a procesos de adherencia a superficies o a otros microorganismos, debido a estructuras celulares ó a sustancias que estos mismos segregan. De forma artificial o inducida, puede darse por atrapamiento en los espacios o poros de fibras y geles, entre muchos (Couto *et al.*, 2004).

La inmovilización de HPB en diferentes soportes, para el tratamiento de diferentes clases de residuales ha demostrado ser una tecnología eficiente y económica, gracias a la cual los sistemas se pueden operar por varios ciclos, dependiendo el tipo de soporte no es necesaria la adición de co-sustrato para soportar el metabolismo y el producto de la inmovilización, se puede emplear para empacar reactores de configuración sencilla escalables a planta piloto y nivel industrial. Shin *et al.*, 2002 demostraron que varios soportes no inertes son colonizados por *Trametes versicolor* y son utilizados como co-sustrato para la degradación de amaranto, determinando que para la degradación de colorantes sea necesario la adición de un sustrato de fácil asimilación que soporte metabolismo primario. Por otro lado la inmovilización por encapsulación en una matriz de alginato se ha usado para decolorar el naranja II (Colorante AZO), empleando a *Trametes versicolor* logrando una decoloración del 80% en 3 días comparado con un cultivo en suspensión que redujo el color en un 60% en 6 días (Ramsay *et al.*, 2005).

Pedroza *et al.*, 2007 reportaron que la forma de crecimiento de los hongos favoreció la penetración de las hifas a través de la espuma de poliuretano incrementando la capacidad de remoción de los contaminantes presentes en aguas residuales papeleras.

El procesamiento industrial del fique genera gran cantidad de residuos de la fibra empleada para los costales. Estos costales desechados podrían utilizarse como soportes para inmovilizar la biomasa de hongos de la podredumbre blanca con el fin de utilizarlos como portadores laminares que pueden acoplarse a reactores cilíndricos agitados y aireados por la inyección de aire en profundidad; otra de las ventajas que aportaría el material es que químicamente está compuesto por lignina, celulosa y hemicelulosa. Cada uno de estos polímeros le serviría a los hongos para funciones específicas, Por un lado la lignina actuaría en unión con los colorantes del agua textil como inductores de la actividad enzimática responsable de la decoloración. La celulosa y hemicelulosa actuarían como fuentes de carbono complementarias para soportar el crecimiento de los hongos y por consiguiente se favorecería la remoción de DBO y DQO en el agua. Por último la unión de un soporte natural y la biomasa favorecería la decoloración ya que los dos tienen propiedades adsorptivas altas que entrarían a complementarse; eficiencia que no se lograría si se empleara cada uno por separado (www.sica.gov.ec, 2007).

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Seleccionar y evaluar un consorcio fúngico inmovilizado sobre *Furcraea* sp para el tratamiento de aguas residuales de la industria textil.

5.2 Objetivos específicos

- Seleccionar las cepas con mayor capacidad de decoloración *in vitro*, empleando colorantes azoicos, antraquinónicos y trifenilmetánicos.
- Desarrollar y evaluar un bioportador utilizando biomasa fúngica inmovilizada sobre *Furcraea* sp.
- Evaluar la capacidad de decoloración del sistema bifásico implementando estudios a escala de erlenmeyer.

6 HIPÓTESIS

El consorcio fúngico empleado inmovilizado sobre *Furcraea* sp, decolorará el agua residual de la industria textil a escala *in vitro*.

7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 *Microorganismos*

Los hongos *Phanerochaete chrysosporium* (CINVESTAV, México), *Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus* (Laboratorio de Microbiología Ambiental PUJ, Colombia), se reactivaron y preservaron en agar extracto salvado de trigo de acuerdo a la metodología propuesta por (Fernández *et al.*, 2009).

7.2 *Colonización del portador a base de fique*

Se prepararon erlenmeyers de 250mL con 50mL de caldo extracto salvado de trigo, los cuales se inocularon por separado con seis discos de agar con cada uno de los tres hongos crecidos y posteriormente se llevaron a incubar en agitador termostatado a 120rpm, 30°C, durante diez días. Se tomaron los erlenmeyer con formación de biomasa en forma de pellet y esta se recuperó mediante filtración, utilizando un colador metálico previamente esterilizado, separando la fase sólida del extracto del caldo de cultivo. Como soporte no inerte se empleó fibra de fique la cual fue tejida obteniendo plantillas de 4 cm². El soporte se esterilizó previamente en autoclave a 15lbs, 15 minutos. Para el proceso de inmovilización se prepararon cajas de Petri que contenían agar extracto salvado de trigo; el agar se dejó gelificar durante 5 minutos y se colocaron las mallas de fique estériles, a las cuales se les determinó el peso y posteriormente fueron inoculadas con una cantidad conocida de biomasa pelletizada previamente determinado y se homogenizó sobre las mallas hasta cubrirlas totalmente. Las cajas se incubaron por diez días a 30°C. Para determinar la cantidad de biomasa inmovilizada sobre el soporte se empleó el protocolo propuesto por Morales y Ruiz, (2007).

7.3 *Pruebas preliminares de decoloración en medio sólido*

Se realizaron pruebas de decoloración en medio sólido utilizando un colorante de cada grupo (Azoico, antraquinónico y trifenilmetánico), como medio base se empleó la formulación publicada por Radha *et al.*, (2005). Se sembró un disco de cada uno de los hongos crecidos sobre el agar con colorante preparado a 150ppm, utilizando como fuente de carbono celulosa y por otro lado fibras con un tamaño de 5mm de *Furcraea* sp. Las cajas se incubaron por 10 días a 30°C, evaluando diariamente el diámetro del halo de decoloración y de crecimiento radial en centímetros. Como controles se utilizaron el medio propuesto por Radha *et al.*, (2005) sin colorante, incubándolo bajo las mismas condiciones. Teniendo en cuenta que en la industria textil se utiliza en su mayoría colorantes azoicos, se realizaron pruebas de decoloración en medio sólido utilizando

diferentes colorantes comerciales de este tipo, marca IRIS (Negro 24, Rojo 9, Verde Oscuro 21 y Azul 16) y el colorante Negro Reactivo 5. Se siguió la misma metodología de los otros grupos de colorantes.

7.4 Estudios de adsorción

Se analizó el efecto del tipo de adsorbente sobre las propiedades adsorptivas de cada uno de los colorantes seleccionados en el numeral 7.3, empleando como materias primas, costal de fique (*Furcraea* sp) sin colonizar y fique colonizado. Previamente a los estudios se realizaron curvas de absorbancia para determinar la longitud de onda de máxima absorción para cada colorante y posteriormente se construyeron curvas de calibración para cada uno de ellos (Fernández *et al.*, 2009). Las isothermas de adsorción se llevaron a cabo preparando por separado cada uno de los colorantes en agua destilada. Los experimentos se evaluaron colocando una cantidad determinada del soporte en 50mL de solución colorante a 30°C a 120 rpm por doce horas, protegidos de la luz. Se realizaron muestreos cada 60 minutos para determinar la concentración de colorante residual en cada uno de los tiempos, extrapolando las absorbancias en la curvas de calibración y se informó en ppm. Con el fin de modelar el mecanismo de adsorción se usó el modelo cinético de adsorción de pseudo-primer-orden (Langmuir) para analizar los datos experimentales, asumiendo que las concentraciones medidas son iguales a las concentraciones en la superficie (Parab *et al.*, 2006) (Ecuación 1).

$$C_s = K_1 C_{s_{\max}} C / (1 + K_1 C) \quad (1)$$

$$\frac{1}{C_s} = \frac{1}{K_1 C_{s_{\max}} C} + \frac{1}{C_{s_{\max}}} \quad (2)$$

$$\frac{C}{C_s} = \frac{1}{K_1 C_{s_{\max}}} + \frac{C}{C_{s_{\max}}} \quad (3)$$

Donde C_s (mg/g) es la cantidad de soluto adsorbido sobre el adsorbente, $C_{s_{\max}}$ es la máxima cantidad soluto adsorbido sobre el adsorbente en equilibrio y k_1 es la constante de equilibrio de Langmuir. Se realizó una transformación de datos invirtiendo los términos de la ecuación (1) para obtener la ecuación (2) la cual se multiplico por C para obtener la forma lineal de la ecuación (1) y al graficar C versus C/C_s se obtuvo una línea

recta cuya pendiente es igual a $(1/Cs_{\max})$ y el intercepto es $(1/K_I * Cs_{\max})$ (Valente *et al.*, 2006).

7.5 Estudios de biodegradabilidad del portador

Se colonizaron láminas de fique de 4cm^2 con cada uno de los hongos y se sembraron sobre agar agua, las cajas se incubaron por 30 días, haciendo muestreos de 5mm^2 cada siete días y se realizó microscopía electrónica de barrido, según la metodología descrita por Pedroza *et al.*, (2007). Como control se utilizó el soporte sin biomasa incubado durante 30 días con observaciones al inicio y final de proceso.

7.6 Selección de las condiciones de operación a escala erlenmeyer empleando células inmovilizadas y agua residual textil

7.6.1 Caracterización del agua residual sintética similar a la proveniente de la industria textil

Se utilizó el agua residual preparada en el laboratorio que semejó las condiciones a una producida por una empresa textil la localizada en Bogotá. Con respecto a la caracterización inicial se realizaron las pruebas exigidas por la SRA en la resolución 3957/2009.

7.6.2 Diseño experimental para la selección del consorcio fúngico

7.6.2.1 Montaje de los tratamientos para el Plackett Burman

Para estudiar el efecto de algunos factores ambientales y condiciones de operación se realizó un diseño experimental de Plackett- Burman, empleando las cepas preseleccionadas de forma individual y en consorcio (Montgomery, 2003). El modelo contempló dos niveles de selección para cada variable, un nivel bajo (-1) y un nivel alto (+1). La tabla 1 muestra los factores evaluados y los niveles para cada factor. El diseño de Plackett-Burman está basado en un modelo de primer orden descrito por la ecuación (4):

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i \quad (4)$$

Donde y es la respuesta de la variable dependiente, β_0 es el intercepto del modelo y β_i es el coeficiente estimado para cada variable o factor X_i . Este modelo no describe la interacción entre los factores, se usa para seleccionar y evaluar los factores más significativos que influyen en el proceso. El máximo número de factores que puede ser evaluado en un diseño de este tipo es igual al número total de experimentos menos uno.

En este trabajo se tomaron en cuenta 9 variables (A-K) a dos niveles de variación, lo que arrojó 12 tratamientos. Las combinaciones para este diseño se observan en la tabla 1. Cada experimento se realizó por triplicado, empleando como controles el soporte sin colonizar y medio sin microorganismos.

Tabla 1. Factores evaluados. Matriz codificada del diseño Plackett-Burman.

Clave		Factor									
A		<i>Pleurotus ostreatus</i>									
B		<i>Trametes versicolor</i>									
C		<i>Phanerochaete chrysosporium</i>									
D		Carbono (g/L)									
E		Nitrógeno (g/L)									
F		Temperatura (°C)									
G		pH (Unid)									
H		Tiempo (Días)									
I		Ciego									
J		Concentración del residual (%v/v)									
K		Agitación (rpm)									
Tx	Claves y Combinaciones										
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	1	-1
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	-1	1
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	1	-1
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1	1
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
-1	sin	sin	sin	0	0	15	4,5	2	-	100	0
1	con	con	con	2,5	0,5	30	8	4	-	100	120

Se emplearon erlenmeyer de 100 mL que contenían 20 mL del agua residual ajustada de acuerdo a cada tratamiento y el portador laminar de fique colonizado con los hongos teniendo en cuenta la combinación de cada uno de los factores. Los cultivos se mantuvieron bajo las condiciones de operación constantes referidas a tiempo, velocidad de agitación y temperatura de acuerdo al diseño. Con los resultados obtenidos, se efectuó un análisis de varianza (ANOVA) y un análisis de regresión empleando los programas Desing expert 6.0, SAS 6.06 para Windows y Statistica.

8 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 *Microorganismos*

Se utilizaron tres cepas, *T. versicolor*, *P. ostreatus* (Colombia) y *P. chrysosporium* (México), las cuales fueron reactivadas en agar extracto salvado de trigo: g/L (glucosa 10, peptona 5, extracto de levadura 2, KH_2PO_4 0.1, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,05, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.076, agar-agar 15, extracto líquido salvado de trigo 175g L-1 a 30° C por 8 días) (Pedroza *et al.*, 2007).

Este medio brinda macronutrientes como glucosa y extracto de levadura, fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente, fundamentales para el crecimiento de los microorganismos y para su actividad metabólica, también sales de micronutrientes como sulfato de manganeso, magnesio, potasio, sodio, azufre y cloro, útiles para mantener activos los procesos metabólicos (Antongiovanni and Sargentini, 1991), además estos microorganismos poseen la habilidad de degradar la lignina proveniente del salvado de trigo, que se encuentra en una proporción del 15%, induciendo actividad enzimática ligninolítica, convirtiendo esta molécula compleja en compuestos más sencillos asimilables por los hongos, los cuales son fuentes alternas de carbono para este grupo de organismos (Deacon, 1988).

8.2 *Colonización del portador a base de fique*

Inicialmente se realizó un ensayo de colonización en pequeña escala empleando plantillas de fique de 4 cm² las cuales fueron inoculadas con esferas o pellets de biomasa fúngica previamente cultivadas en medio líquido. Con este ensayo se verificó la capacidad de colonización y el tiempo de recubrimiento del soporte lignocelulósico, observando que a los 7 días de incubación se forma una capa de biomasa uniforme con peso promedio de 1.6 g/g, 1,4 g/g y 1,5 g/g para *P. ostreatus*, *P. chrysosporium* y *T. versicolor* respectivamente. Un lote nuevo de estas plantillas se utilizó para el montaje del diseño

experimental de Plackett Burman como se describe en la sección 7.6. La figura 1 muestra la colonización de las mallas (plantillas) de fique.

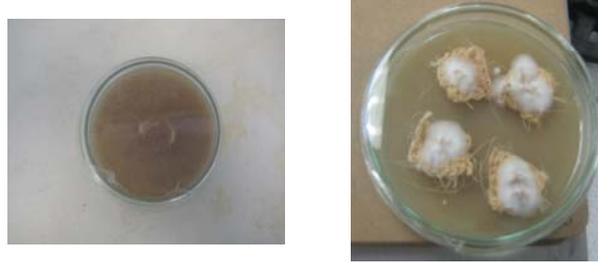


Figura 1. Colonización de plantillas de fique de 4 cm². (Izquierda) plantilla sin colonizar. (Derecha) plantilla colonizada. 8 días, 30° C en agar extracto salvado de trigo.

Los hongos filamentosos tienen una inclinación natural por crecer adheridos a superficies (Morera *et al.*, 2003), la adsorción física inicial se logra gracias a las fuerzas electroestáticas o por enlaces covalentes entre la pared celular y el soporte. (Fernández; *et al* 2009). Entre algunos de los componentes de adherencia se encuentran la propia quitina de la pared fúngica, algunas glicoproteínas y esterasas que logran establecer fuerzas de van der Waals entre la pared y el soporte. Esto es de gran importancia en este estudio ya que los hongos son inmovilizados en las mallas de fique, las cuales proveen compuestos celulósicos similares a los de su hábitat natural. La malla permite que estos microorganismos crezcan en toda la superficie, colonizando con el micelio dicha área, así mismo, la forma de crecimiento apical de los hongos hace que las hifas se extiendan hacia los lugares donde hay sustratos disponibles, permitiendo así mayor inmovilización de biomasa. Además, los hongos poseen un polisacárido adherente, β -glucano, el cual facilita su fijación al soporte donde está desarrollándose, lográndose una mayor retención de biomasa (Morera *et al.*, 2003), el fique al ser un soporte poroso hace que se beneficie la transferencia de oxígeno, y al estar en contacto con el medio hace que mayor disponibilidad de nutrientes para el micelio en crecimiento.

8.3 Pruebas preliminares de decoloración en medio sólido

Para los ensayos de decoloración *in vitro* se empleó el agar Radha como base y se suplementó con dos fuentes de carbono por separado para favorecer el proceso de decoloración (celulosa 2 g/L y fique en hilos de 5mm a una concentración final de 2 g/L). Se seleccionaron los colorantes negro reactivo 5, cristal violeta y verde de malaquita a

150 ppm como representantes de los azoicos, antraquinónicos y trifenilmetánicos. De acuerdo con los resultados del análisis estadístico se encontraron diferencias altamente significativas que demuestran que el colorante antraquinónico (cristal violeta) no fue decolorado por ninguna de las cepas en ninguna de las fuentes de carbono ya que no se observó crecimiento ni decoloración en el medio sólido ($p < 0.0001$). Por esta razón, se retiró del estudio (figura 2).

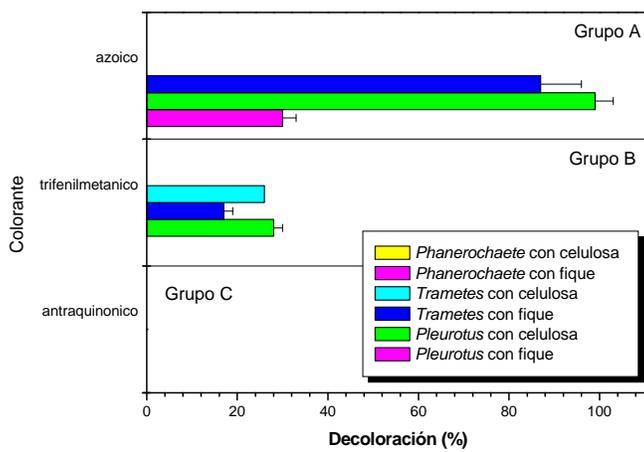


Figura 2. Pruebas de decoloración *in vitro* para colorantes azoicos (negro reactivo 5), trifenilmetánico (verde de malaquita) y antraquinónico (cristal violeta) en agar Rhada suplementado con celulosa y fique 2 g/L, 30° C, 10 días.

(Autores, 2009)

Con respecto, al colorante trifenilmetánico, verde de malaquita, se observó que las cepas con mayor potencial de decoloración a los 10 días fueron *P. ostreatus* y *T. versicolor* con valores de 28% para *P. ostreatus* en celulosa, 25% para *T. versicolor* en celulosa y 16% para *T. versicolor* en fique ($p < 0.0001$) (figura 3). El colorante azoico negro reactivo 5 presentó los mayores porcentajes de decoloración con 99, 87 y 29% para *P. ostreatus* en celulosa, *T. versicolor* en fique y *P. ostreatus* en fique a los 10 días de evaluación (Tabla 2) (figura 3). Con respecto a estos resultados, se observó una menor decoloración para el colorante trifenilmetánico ya que su estructura es más compleja por la presencia de tres anillos derivados la difenilamina y del di y tri-fenilmetano junto con radicales aromáticos y sulfónicos que los hacen más complejos al ataque por parte de los microorganismos y los convierten en compuestos recalcitrantes debido a que los átomos de la estructura se encuentran fuertemente enlazados y resulta más complejo para la maquinaria enzimática

lograr sustraer electrones de estos para debilitar los enlaces (Jiménez; *et al*, 2003). Para el caso de los colorantes antraquinónicos, los resultados obtenidos sugieren que ninguna de las cepas logró utilizar los sustratos del medio para crecer, por lo tanto no hubo producción de enzimas extracelulares que lograran degradar el colorante, esto sucedió de manera contraria a lo reportado por Garzón, 2008, quien evaluó un colorante antraquinónico a una concentración de 300ppm y logró hasta un 75% de decoloración. En este caso como se evaluó cristal violeta, los resultados sugieren que la concentración utilizada del colorante inhibió el crecimiento de las cepas. Para esto, sería útil realizar un ensayo con diferentes concentraciones menores a 150ppm para lograr encontrar la adecuada para permitir el crecimiento de los microorganismos.

Los hongos de podredumbre blanca, producen enzimas especializadas para degradar compuestos complejos en más simples, estos últimos para utilizarlos como fuentes nutricionales; las más importantes son la LiP, MnP y Lacasa, las cuales se producen en el momento en el que el hongo encuentra moléculas que puedan ser usadas en su metabolismo, como la lignina, o el grupo cromóforo de un colorante.

T. versicolor posee la capacidad de inducir la producción de sus enzimas extracelulares en la presencia de compuestos aromáticos fenólicos y no fenólicos con estructura similar a la de la lignina, este hongo fue reportado por Garzón, 2008, en la remoción de colorantes como el azul ácido 113 (azoico), fucsina ácida (trifenilmetánico) e Índigo carmín (antraquinona). El hongo *P.ostreatus* ha sido reportado como uno de los microorganismos más eficientes para la remoción de colorantes, así lo demuestran estudios anteriores, (Rodríguez *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2005), sin embargo hay limitaciones con estudios de colorantes a concentraciones mayores de 150ppm, ya que algunas concentraciones mayores a este valor, inhiben la producción de estas enzimas. Por otro lado *P. chrysosporium* fue la cepa con menor porcentaje de decoloración en todos los ensayos, tanto en los estudios de decoloración, como para la mezcla del agua residual pero cabe anotar que estos resultados no indican que este hongo no sea bueno para la remoción de colorantes, ya que otros estudios como el de Radha *et al.*, 2005, obtiene porcentajes de decoloración entre el 75 y 98 % de siete colorantes diferentes como metil violeta, naranja ácido, magenta, azul de metileno, rojo congo, rojo ácido 114 y verde ácido.

Tabla 2. Decoloración *in vitro* para colorantes azoicos (negro reactivo 5), trifenilmetánico (verde de malaquita), y antraquinónico (cristal violeta) en agar Rhada suplementado 2 g/L de celulosa y fique 30°C, 10 días.

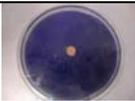
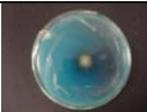
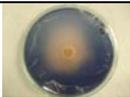
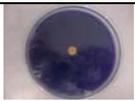
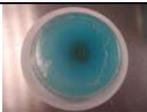
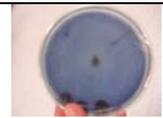
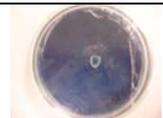
Cepa y fuente de carbono	Antraquinónico <i>Cristal violeta</i>	Trifenilmetánico <i>Verde malaquita</i>	Azoico <i>Negro Reactivo 5</i>
<i>P. ostreatus</i> Celulosa			
<i>P. ostreatus</i> Fique			
<i>T. versicolor</i> Celulosa			
<i>T. versicolor</i> Fique			
<i>P. chrysosporium</i> Celulosa			
<i>P. chrysosporium</i> Fique			

Figura 3. Pruebas de decoloración *in vitro* para colorantes azoicos (negro reactivo 5), trifenilmetánico (verde de malaquita) y antraquinónico (cristal violeta) en agar Rhada suplementado 2 g/L de celulosa y fique. 30° C, 10 días.

(Fuente, Autores)

Al presentarse diferencias significativas entre los porcentajes de decoloración ($p < 0.0001$) entre colorantes y cepas, se procedió a hacer un ensayo complementario que consistió en evaluar más colorantes azoicos de una casa comercial (Iris) suplementados con celulosa y fique para establecer si la respuesta positiva se mantenía igual al variar la gama de colores. Los colorantes evaluados fueron azul 16, rojo 9, verde oscuro 21 y negro 24. Se puede apreciar en la figura 4 que la cepa de *P. ostreatus* decoloró en un 100% los colores azul, verde y negro; *T. versicolor* y *P. chrysosporium* presentaron diferentes porcentajes de decoloración para estos mismos colorantes: 95% de decoloración para el color negro por parte de *T. versicolor* y 100% de remoción para color verde por parte *P.*

chryso sporium. La obtención de estos resultados trae como ventaja que a la hora de escalar el ensayo, se pueden utilizar diversos tintes en la gama de los azoicos, al igual que en la industria textil en donde no solo se utilizan pequeñas cantidades de colorantes sino que debido a la gran demanda del mercado nacional e internacional, se utilizan una gran variedad de tintes en el procesamiento de las fibras textiles.

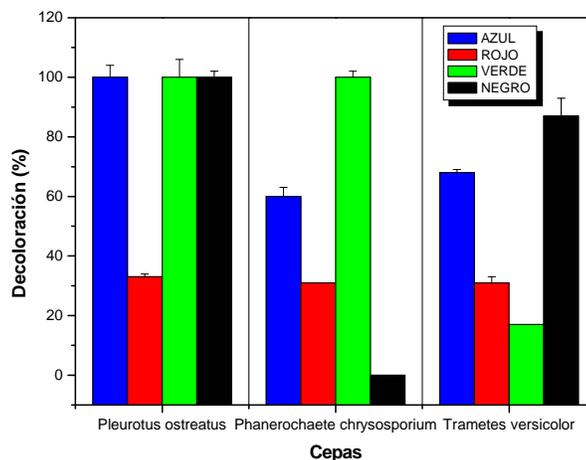


Figura 4. Pruebas de decoloración *in vitro* para diferentes colorantes azoicos de la gama iris en agar Rhada suplementado con 2 g/L de fique. 30° C, 10 días.

(Autores, 2009)

Finalmente se realizó una mezcla de los cuatro colorantes azoicos Iris y negro reactivo 5, en partes iguales, con una concentración final de 150ppm para determinar el potencial de decoloración sobre la mezcla en función del tiempo, empleando fique como fuente de carbono. Esto se hizo de esta manera debido a que en los ensayos anteriores se demostró que al someter los microorganismos en el medio suplementado con fibra de fique como fuente de carbono, se logra una buena decoloración para cada uno de los azoicos comerciales, esto trae ventajas en cuanto a que el fique es una fibra de fácil consecución en el país y es muy económica, comparado con la utilización de celulosa como fuente de carbono. En la figura 5 (tabla 3), se puede observar el comportamiento que tuvieron las cepas en medio sólido y se puede apreciar que los tres hongos presentaron una decoloración importante al final del ensayo, con halos de decoloración que abarcaban todo el medio, lo que significa que probablemente las cepas continuarían decolorando si se hubiera extendido el tiempo de experimentación. *P. ostreatus*, *T. versicolor* y *P. chryso sporium* presentaron porcentajes de decoloración del 21%, 52% y 31%

respectivamente, estos valores de decoloración son bajos respecto a los ensayos de los colorantes evaluados por aparte, evidenciando así, que a pesar de que sean de la misma familia (tipo azo), al estar mezclados aumenten su resistencia y complejidad en la molécula, formando anillos diazo más fuertes y difíciles de atacar por las enzimas expresadas por los hongos.

Tabla 3. Decoloración *in vitro* para la mezcla de colorantes azoicos de la gama iris en agar Rhada suplementado en 2g/L de fíque. 30°C, 10 días.

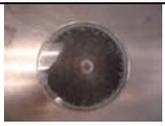
Cepa	Inicial	Final
<i>P. ostreatus</i> fíque		
<i>T. versicolor</i> fíque		
<i>P. chrysosporium</i> fíque		

Figura 5. Decoloración *in vitro* para la mezcla de colorantes en agar Rhada suplementado con 2g/L de fíque, 30 °C, 10 días.

(Autores, 2009)

8.4 Estudios de adsorción

La remoción del color en los tratamientos se beneficia por la adsorción de la mezcla de colorantes al soporte. Se evaluaron en algunos tratamientos por si solo el fíque, y se corroboró la reducción en la concentración del colorantes, esto está soportado en las isotermas de adsorción obtenidas para cada uno de los grupos de colorantes.

El modelo aplicado para obtener las constantes de adsorción y concentraciones máximas de adsorción fue el de Langmiur, el cual fue transformado a su forma lineal para poder realizar la modelación de los datos y calcular los parámetros de interés que se presentan en la tabla 4 y figuras 6-9. Para el primer grupo de colorantes, se encontró que el colorante antraquinónico es el que presenta menor afinidad por el soporte ya que su concentración máxima de adsorción fue de 0,373 mg de colorante/mg de soporte y según

lo reportado por Valente *et al.*, 2006, valores de $C_{s \text{ max}}$ menores de 1, indican que no existe una fuerte interacción entre el soluto y el adsorbente. Para el colorante trifenilmetánico, se observó que la concentración máxima de adsorción aumentó con relación al antraquinónico, lo que quiere decir que existe una interacción entre el colorante y el fique pero no muy fuerte lo que sugiere que no se reducirá de manera importante la concentración de este tipo de tinte en el residual. En el caso del colorante azoico negro reactivo 5, se obtuvo el mayor valor de $C_{s \text{ max}}$, esto se debe a que la estructura química de los colorantes azoicos, facilita la adsorción al soporte, ya que el grupo auxocrómico le proporciona la capacidad de unirse mediante interacciones covalentes y fijarse a las fibras de celulosa, además pH alcalino del efluente, hace que el soporte se cargue positivamente y exista una mayor atracción con la carga de los colorantes (Annadurai *et al*, 1998), esta atracción es de tipo covalente y le permite al tinte fijarse a las fibras de celulosa del fique.

Por otro lado, al realizar los estudios de adsorción de la mezcla de azoicos se observó que el mejor biomaterial fue *P. ostreatus* inmovilizado en fique, seguido por el soporte solo, el consorcio fúngico inmovilizado en fique y *P. chrysosporium* inmovilizado (figuras 6-9). Los resultados obtenidos son similares a los presentados para el negro reactivo 5, lo que indica que los colorantes azoicos presentan una alta interacción con el soporte y el biomaterial, de acá se puede sugerir que el soporte podría ser usado como adsorbente por sí solo, sin embargo, la remoción de la mezcla sería solo por proceso físico y podría sufrir procesos de desorción que devolverían la contaminación al agua residual, por esta razón se prefirió trabajar con las cepas inmovilizadas y el hecho de tenerlas viables produciendo enzimas, le da al sistema un valor agregado ya que se pueden llevar a cabo procesos de biotransformación y posible mineralización, resultados que se confirman en el numeral 8.6.2. Con respecto a *T. versicolor*, esta cepa no fue sometida a este estudio porque al realizar el primer diseño experimental de decoloración en medio sólido, esta por sí sola ni en consorcio logró superar decoloraciones que si presentó el consorcio en relación 1:1 de *P. ostreatus* y *P. chrysosporium*, los cuales potenciaban la remoción de color. Para los colorantes antraquinónicos y trifenilmetánicos, los valores de $C_{s \text{ max}}$ bajos obtenidos serían contraproducentes ya que al desarrollar biomateriales se espera que se ejerza un efecto sinérgico entre el soporte y la biomasa microbiana para potencializar la decoloración y al tener una concentración de adsorción con estos valores gran parte del colorante quedaría disuelto en el efluente, y el problema de la contaminación por el color permanecería latente y al emplear un tratamiento biológico, se generarían bajas eficiencias de remoción.

De acá se concluye que el fique es un material adecuado para someterlo a las condiciones del diseño experimental del Plackett Burman.

Tabla 4. Constantes de saturación y concentraciones de saturación máxima para el fique como portador libre de biomasa.

Colorantes	$C_{s_{max}}$ (mg/g)	K_l (1/mg)
Negro reactivo 5 (Azoico)	263	0.0003
Verde de malaquita (Trifenilmetánico)	9.40	0.0088
Cristal violeta (Antraquinónico)	0.373	0.22
Diferentes azoicos de la gama IRIS		
Negro 25	223	0.0094
Azul 25	666	0.0011
Verde 32	178	0.00042
Rojo 53	166	4.8×10^{-4}

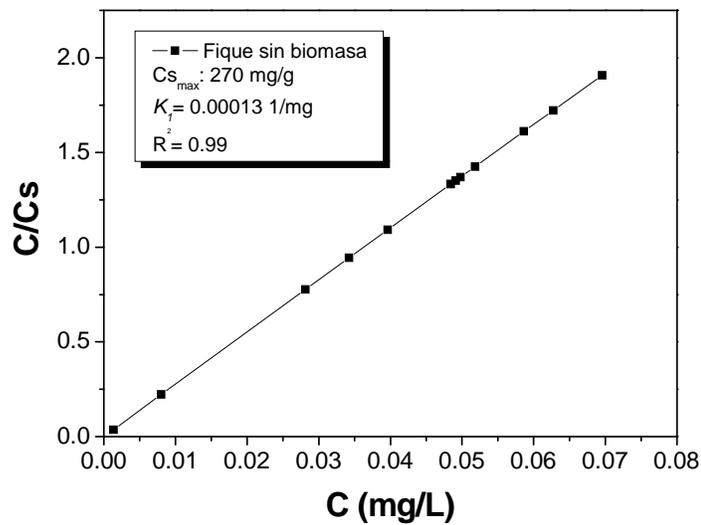


Figura 6. Linealización de la ecuación de Langmuir para determinar la adsorción de la mezcla de colorantes sobre el fique libre de biomasa a 30° C ($R^2 = 0.99$).

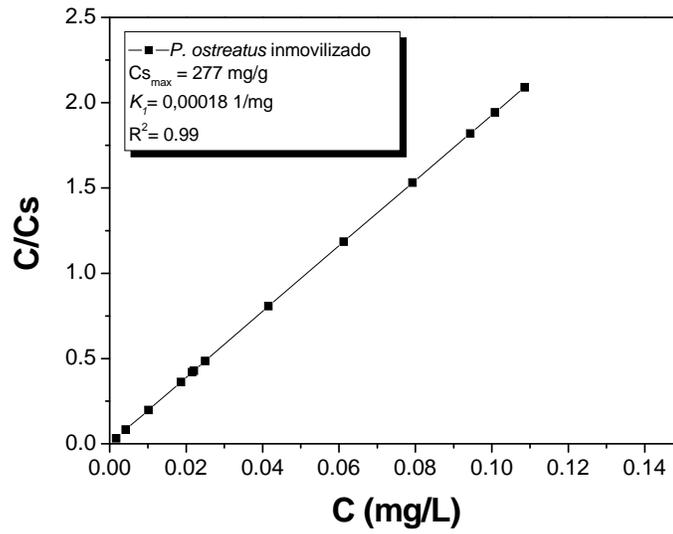


Figura 7. Linealización de la ecuación de Langmiur para determinar la adsorción de la mezcla de colorantes sobre el bioportador a base de *P. ostreatus* inmovilizado sobre 0.6g de fique a 30° C ($R^2= 0.99$).

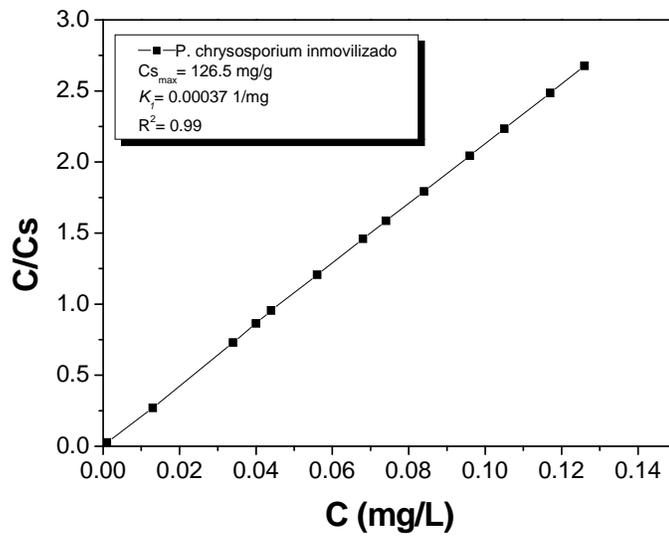


Figura 8. Linealización de la ecuación de Langmiur para determinar la adsorción de la mezcla de colorantes sobre el bioportador a base de *P. chrysosporium* inmovilizado sobre 0.6g de fique a 30° C ($R^2= 0.99$).

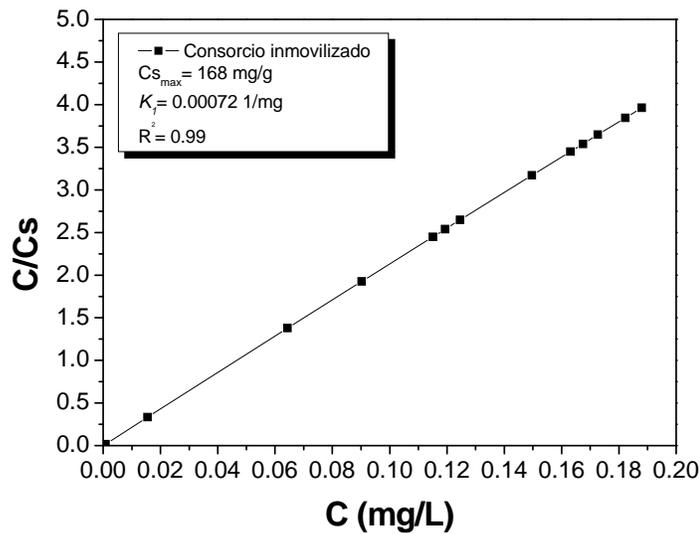


Figura 9. Linealización de la ecuación de Langmuir para determinar la adsorción de la mezcla de colorantes sobre el bioportador a base del consorcio *P. ostreatus* y *P. chrysosporium* inmovilizado sobre 0.6 g de fique a 30° C ($R^2=0.99$).

8.5 Estudios de biodegradabilidad del portador

La fibra de fique gracias a su estructura interna y a la forma en que fue tejida, permitió que la superficie de adherencia entre el hongo y esta fuera amplia, estas estructuras también permitieron óptimas condiciones de aireación y transporte de sustancias necesarias para el crecimiento y desarrollo de los microorganismos implicados en este estudio. Esto se ve reflejado en el crecimiento que presentaron las tres cepas fúngicas (Garzón, 2008). El crecimiento abundante sobre el soporte en tan corto tiempo, sugiere que las células presentan un mayor metabolismo cuando están inmovilizadas a cuando se encuentran libres. (Polprasert *et al.*, 1989; Angelova *et al.*, 2000; Navarro y Durand, 1977).

Germeiner y colaboradores (1994), demostraron que las matrices orgánicas tienen mayor adsorción de la que pueden brindar las matrices sintéticas, esto se debe a que los materiales orgánicos tienen mayor cantidad de grupos radicales como amino, carboxil, entre otros; así como una mayor cantidad de nutrientes, lo cual permite una adherencia y crecimiento más eficaz (Cohen, 2001). La fibra de agave, por ser un soporte de origen natural y presentar en su estructura compuestos como celulosa y lignina, promueve la

colonización de estas cepas, ya que estos compuestos pueden ser utilizados como fuente de carbono y suplir algunos nutrientes necesarios para el crecimiento de los mismos (Shin *et al.*, 2002), presentando una colonización uniforme y total sobre el soporte. (Garzon, 2008).

En el ensayo realizado, las láminas de fique que fueron colonizadas por cada uno de los hongos, fueron evaluadas durante treinta días para observar el proceso de degradabilidad. Los análisis de microscopía electrónica de barrido mostraron una degradación del soporte evidente, debido a la acción enzimática dual que realizaron enzimas ligninolíticas al actuar junto con lacasa, MnP o LiP. Como se puede observar en la figura 10, se evidenció un cambio físico del fique solo, en comparación del fique con la biomasa inmovilizada, mostrando adelgazamiento de las fibras que lo componen al transcurrir el tiempo del análisis.

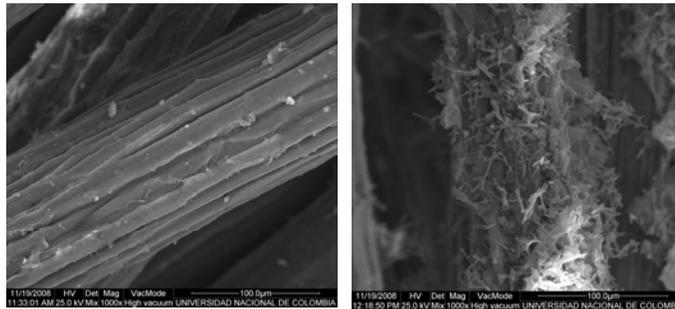


Figura 10. Estudios de biodegradabilidad preliminares. Fibra de fique sin colonizar en aumento de 1000X (izquierda) y fibra colonizada con *P. ostreatus* (derecha).

(Ospina *et al.*, 2009)

8.6 Selección de las condiciones de operación a escala erlenmeyer empleando células inmovilizadas y agua residual textil

8.6.1 Caracterización del agua residual sintética similar a la proveniente de la industria textil

El agua residual que se utilizó en los 12 tratamientos del diseño experimental de Plackett Burman, fue preparada simulando la composición de un agua residual de un efluente real de una industria textilera, aportando compuestos tóxicos y derivados del proceso de teñido de fibras. Con respecto a la caracterización inicial, se realizaron las pruebas exigidas por SDA en la resolución 3957/2009, estos estudios arrojaron los resultados que se observan en la tabla 5, los cuales corroboran que la formulación determinada imita de

manera adecuada las características del agua de un efluente textilero, esta mezcla compleja contenía una gran variedad de compuestos como material orgánico, compuestos aromáticos (colorantes), grasas, estas y otras más provenientes de reactivos químicos. Ledakowicz, *et al.* 2001, estudiaron la decoloración de aguas residuales de un efluente proveniente de una industria procesadora de poliéster y de igual manera que en este ensayo, caracterizaron y prepararon un agua residual sintética simulando las condiciones presentadas en el efluente real. Esto trae como ventaja que a la hora de escalar el tratamiento del residual, se asegura que las condiciones del efluente son similares a las reales y los resultados serán más confiables, también, al poder obtener un volumen grande de muestra, se asegura que los componentes iniciales del agua sean los mismos para todas las fases del experimento ya que se tiene una formulación constante conocida.

Tabla 5. Pruebas físicas-químicas para el agua residual de acuerdo a la resolución 3957/2009, SDA.

Parámetro	Resultado	Límites Resolución 3957 SDA
pH (Unidades)	5.48	5.0-9.0
Temperatura (°C)	15	30
Unidades de color	10300	50 (dilución 1/20)
Sólidos suspendidos (mg/L)	NE	600
Sólidos sedimentables (mg/L/h)	0	2
DBO5 (mg/L)	911	800
DQO (mg/L)	1340	1500
Nitrógeno Total	18	N.E
Fósforo Total	12.6	N.E
Grasas y aceites (mg/L)	15.7	100
Cobre	0.202	0.25
Cadmio	<0.005	0.02
Plomo	0.461	0.1

*NE: No establecido

8.6.2 Diseño experimental para la selección del consorcio fúngico

Para el montaje de plackett burman se utilizaron plantillas de fique de 4 cm² colonizadas con biomasa fúngica de *P. ostreatus* solo *P. chrysosporium* y el consorcio relación 1:1 para tener una biomasa de 1.5 g/g (gramos de biomasa/gramos de fique) (figura 11).



Figura 11. (Izquierda) fique colonizado con *P. ostreatus*, (Centro) fique colonizado con *T.versicolor*. (Derecha) fique colonizado con *P. chrysosporium* 30° C, 8 días.

(Fuente, Autores)

De acuerdo con los resultados del análisis estadístico para el diseño de Plackett Burman con respecto a las variables DQO, Lacasa, MnP y LiP, se observó que los factores no ejercieron un efecto significativo sobre ellas ($p > 0.0001$) determinando que cualquiera y a cualquier nivel podría ser utilizadas. Por esta razón, la toma de decisiones se basó en la decoloración observando que todos los factores tuvieron un efecto positivo ($p < 0.0001$) obteniendo una ecuación que describió el modelo de la siguiente forma:

$$\text{Decoloración(\%)} = 64 + 6.4a + 2.9b + 5.4c - 3.9d - 0.3e - 7.5f + 6.8g + 8.1h + 7.3j + 5.3k$$

Para seleccionar que nivel de los factores favorecía la decoloración adicionalmente se realizó una comparación de medias entre tratamientos, observando que en T1 la decoloración fue del 99%, valor significativamente superior que los demás tratamientos ($p < 0.0001$). Por esta razón, el agua residual será tratada empleando un consorcio en la relación 1:1 a base de *P. ostreatus* y *P. chrysosporium*, sin suplemento de C/N, a pH 8.0, por 4 días a 15° C, 120 rpm. Los resultados para las otras variables dependientes fueron: 74% remoción de DQO, 21 U/L Lacasa, 0.1 U/L MnP y 191 U/L de LiP (figura 12).

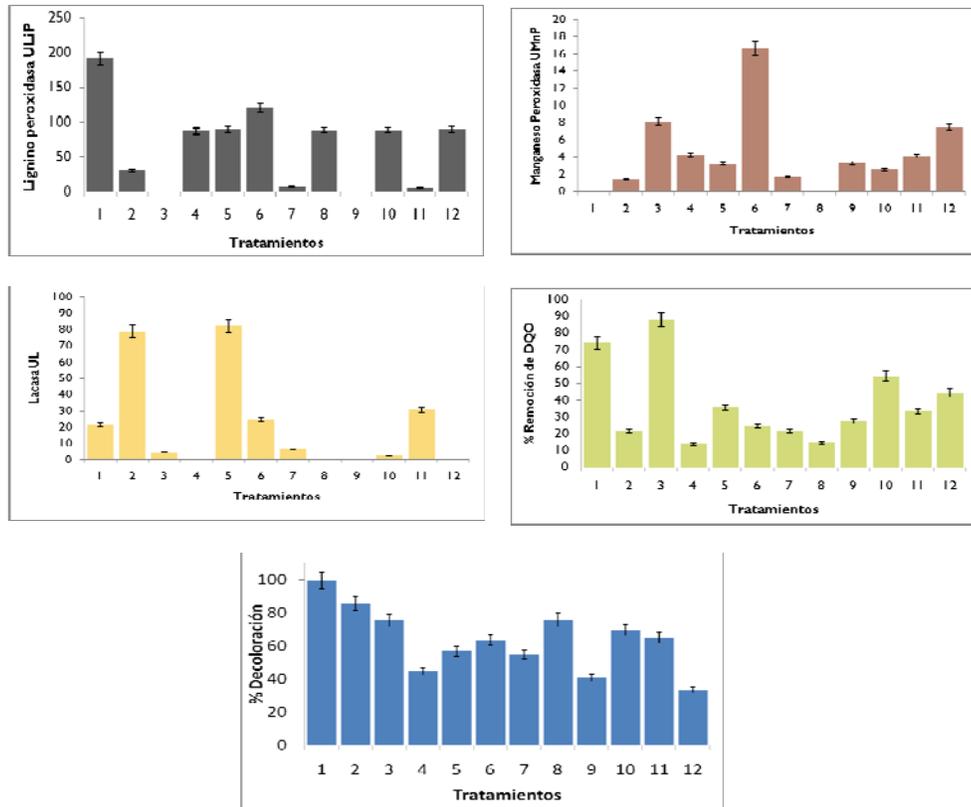


Figura 12. Resultados del diseño experimental Plackett Burman.

(Fuente, Autores)

Al observar el porcentaje de decoloración obtenido para el T1, se destaca de los otros tratamientos de manera significativa, considerando que el color es un aspecto fundamental que se tiene en cuenta para los efluentes de la industria textil. Tras analizar los resultados de los 12 tratamientos del diseño del Plackett Burman, se puede afirmar que el tratamiento biológico es una excelente alternativa con respecto a la remoción de color del agua residual, ya que en todos los tratamientos hay una decoloración importante, involucrando procesos de bioconversión y de adsorción. Hay que tener en cuenta, que un inconveniente de estos resultados es que no se conoce la naturaleza y la composición de los subproductos obtenidos después de la decoloración, es posible que se hayan formado nuevos compuestos de naturaleza tóxica. Para evaluar dicha toxicidad será necesario llevar a cabo pruebas ecotoxicológicas. También cabe resaltar que en este ensayo se observó que la concentración de mezcla colorantes utilizada (150ppm), no ejerció ningún efecto negativo sobre las dos cepas de hongos. Con respecto a la demanda química de oxígeno, el tratamiento seleccionado, mostró un 74% de remoción de DQO,

lo que sugiere una reducción de la carga de materia orgánica e inorgánica presente en el agua residual, lo que se explica por una transformación biológica parcial por parte del consorcio fúngico ya que no se alcanzó una remoción del 100%, lo que hubiese indicado una oxidación total de la materia presente. El porcentaje obtenido en el ensayo cumple con la normatividad de la resolución 3975 de la SDA, por lo cual, basados en el parámetro de DQO, el agua puede ser vertida en el alcantarillado. Este resultado es importante y promisorio ya que otros autores han reportado un porcentaje de remoción de DQO máximo de 30% para aguas residuales textiles tratadas con HPB (Levin *et al.*, 2004), similar al porcentaje de remoción encontrado por Blánquez *et al.*, 2004 en donde se removía un 25% de DQO con la utilización de *T. versicolor* solamente.

Las enzimas extracelulares producidas por los hongos de podredumbre blanca son reconocidas por su capacidad oxidativa, lo que soporta la hipótesis de que los microorganismos metabolizaron gran parte de los componentes orgánicos presentes en el agua residual. Con relación a la decoloración y a la remoción de DQO, se espera que los hongos metabolicen primero los sustratos más sencillos, pero en este caso se puede ver que al obtener un alto porcentaje de decoloración en el tratamiento seleccionado y una alta remoción de DQO, los microorganismos están utilizando toda la materia presente en el agua para su metabolismo y la están oxidando.

Con respecto a la actividad enzimática, la figura 12 muestra la producción de Lacasa en todos los tratamientos a excepción del T4 y T8. En el tratamiento 8, se encontraba solamente *P. chrysosporium*, este, no presentó actividad enzimática, lo que concuerda con lo reportado por varios autores como Gold y Alic, (1993); Wong y Yu, (1999) y Novotny *et al.*, (2004), quienes demostraron que *P. chrysosporium* es productor de lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa, pero carece de la actividad lacasa.

La actividad de lacasa en los tratamientos indican que esta actuó sobre la estructura de los colorantes azoicos en su grupo cromóforo, debido a una interacción electrostática entre las fracciones aniónicas o grupos sulfónicos de los colorantes con los aminoácidos cargados de la enzima (Dias *et al.*, 2004), esta actúa también sobre los grupos amino presentes en los colorantes azoicos, sustrayendo electrones y debilitando los enlaces sobre la molécula, lo que altera la naturaleza del compuesto y su conformación química (Fernández *et al.*, 2009)

El tratamiento 1 mostró expresión enzimática de lacasa a pH con valores cercanos a 6, lo que difiere con lo reportado por Lankinen, 2004 en donde el pH óptimo para lacasa es cercano o igual a 4.5. La actividad obtenida en este ensayo determina que esta enzima tiene estabilidad en pH cercanos a la neutralidad. Este resultado es muy importante si se

tiene en cuenta que el pH de los efluentes de la industria textil se encuentra dentro de un rango de 6,3 a 7,2 (Moeller y Garzón, 2003). Una de las razones para que la lacasa sea estable en valores de pH alrededor de 6,0 es la presencia de calcio Ca^{2+} ya que este contribuye en la estabilización del punto isoeléctrico de las proteína, el cual oscila entre 3,45 y 6,5 en cultivo líquido (Lobos y Peña, 2002) protegiéndola así de una posible denaturalización. En el agua residual utilizada en este estudio se encontraba el calcio en forma de cloruro dihidratado y según lo mencionado anteriormente, la presencia de este compuesto estabiliza la enzima (Collins y Dobson, 1997).

En la figura 13 se puede apreciar que la actividad de MnP, presentó valores bajos para la mayoría de los tratamientos a pesar de que el agua residual contaba con inductores para la enzima, como lo son el CuSO_4 y el MnSO_4 , de acá se puede inferir que esta enzima tiene baja participación en la degradación de los colorantes azoicos utilizados, lo que quiere decir que la producción de esta enzima se relaciona directamente con la degradación de la lignina presente en el soporte de fique, atacando las estructuras fenólicas que la constituyen extrayendo un hidrógeno de los radicales fenoxi, originando radicales como vainillina, alcohol vainillínico, ácido protocatéquino y grupos metoxi (Hofrichter, 2002). Se sabe que esta enzima es inestable en pH mayores a 7,5 y que por encima de un pH de 6,6 no se genera respuesta en la actividad enzimática (Gill y Arora, 2003), sin embargo, en los tratamientos de este ensayo, con los dos valores de pH manejados se presentó actividad enzimática, a excepción de T8; lo que indica que a pesar de que el pH al que las cepas fueron sometidas fue más alto de 7.5, aún así, se logró obtener actividad enzimática, de manera que estos resultados evidencian que el rango de actividad de la MnP es más amplio.

Con respecto a la actividad de la enzima LiP, los resultados demuestran que es posible que la expresión se hubiese dado gracias a la ruptura de los enlaces carbono-carbono y oxidación de unidades no fenólicas presentes en los colorantes (Herrera y Rosas, 2003). Adicionalmente los datos llevan a pensar que esta enzima hubiese podido mostrar una mayor expresión si el medio Radha suplementado con los colorantes presentara un pH óptimo como el sugerido por Lucas *et al.*, 2001 y Wesenberg *et al.*, 2003 oscilando entre 2.5-5.0, lo cual contrasta con nuestro ensayo ya que el pH se mantuvo por encima de 6.

Teniendo en cuenta que *P. ostreatus* produce en su mayoría lacasa y que *P. chrysosporium* LiP, se puede inferir que estas dos enzimas están altamente implicadas en la degradación de los colorantes y que en consorcio, como lo plantea el tratamiento 1, la expresión conjunta de estas dos enzimas, potencializa la capacidad de decoloración del agua residual.

8.7 *Barridos UV-VIS para los tratamientos del diseño de Plackett Burman*

Después de realizar los tratamientos biológicos del agua, se pudo observar que el espectro de absorción presentó notables cambios con relación a la línea base presentada por el agua residual sin tratar (Figura 13), esto indica que hubo cambios en la conformación estructural del complejo cromóforo-auxocrómico de los colorantes debido a una biotransformación y no a una mineralización de las moléculas (Swamy and Ramsay, 1999), de esto se puede concluir que las cepas fueron las encargadas de realizar la degradación y que en este caso, el soporte de fide no intervino sobre la estructura química del colorante tratado. Con respecto a las nuevas longitudes de onda obtenidas, según lo reportado por Borchert and Libra, (2001), el desplazamiento de absorción del rango visible al ultravioleta evidencia la presencia de compuestos químicos aromáticos producto de la degradación de los colorantes y según lo reportado por Martins *et al.*, (2003); Zhao *et al.*, (2006); Zhao and Hardin, (2007) y Lu *et al.*, (2008), la remoción de colorantes de tipo azo por HPB puede generar intermediarios como el ácido benzenosulfónico, ácido-4-hidroxibenzenosulfónico, 3-metil-4-hidroxibenzenosulfónico, 1,2-Naftoquinona-6-acidosulfónico, ácido-3-metilbenzenosulfónico, 3 hidroxibenzoico, 3 hidroxibenzil alcohol, 1-2 naftoquinona, 4-nitroanilina, 4-nitrobenceno, 4-nitrofenol y 4-nitroanisol y en referencia a esto, es posible que se hayan producido compuestos aromáticos que pueden llegar a ser tóxicos. Cabe anotar que puede llegar a existir la producción de aminas aromáticas lo cual representaría un grado de toxicidad para el producto obtenido; esto se podría llegar a confirmar utilizando análisis de detección precisos tales como HPLC y espectrofotometría de masas.

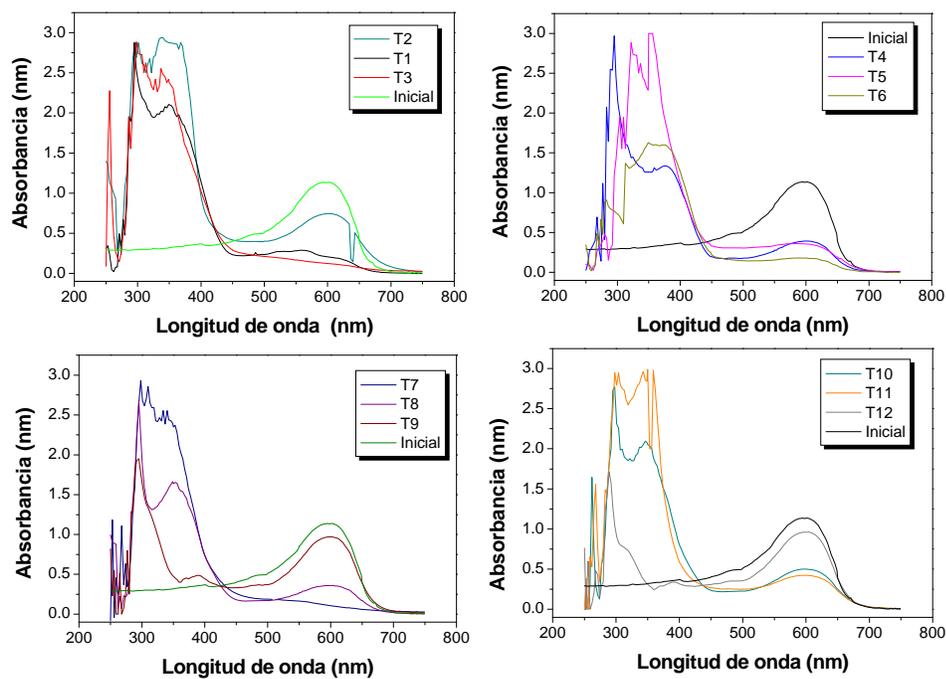


Figura 13. Barridos UV/VIS para los tratamientos de Plackett Burman.
(Fuente, Autores).

9 CONCLUSIONES

- Se desarrolló un novedoso bioadsorbente a base de *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium* inmovilizados en fibra de fique.
- Bajo condiciones *in vitro*, el bioadsorbente removió el 99% de color, 74% de DQO, llevando a cabo un proceso simultaneo de adsorción y biotransformación bajo condiciones de alcalinidad, a temperatura ambiente y sin suplemento nutricional.

10 RECOMENDACIONES

- Realizar bioensayos de ecotoxicidad a partir de los efluentes obtenidos post-tratamiento.
- Determinar la naturaleza de los compuestos obtenidos al final del tratamiento biológico mediante una técnica cromatográfica (HPLC) o espectrometría de masas
- Evaluar la producción no solo de enzimas extracelulares por parte de los microorganismos sino intracelulares y otros tipos de enzimas como catecolasas y glioxal-oxidasas que pueden estar implicadas en la remoción de color.
- Realizar estudios de inmovilización, utilizando como soporte residuos de la industria textil como algodón y poliéster.

11 BIBLIOGRAFÍA

- Annadurai, G., Chellapandian, M. and Krishnan M. 1998. Adsorption of reactive dye on chitin. *Environmental Monitoring and Assessment* 59: 111–119.
- Antongiovanni, M. and Sargentini, C. 1991. Variability in chemical composition of straws. *CIHEAM - Options Mediterraneennes*. 16 : 49- 53.
- Al Duri, B., 1996. Adsorption modeling and mass transfer. In: McKay, G. (Ed), *Use of adsorbents for the removal of pollutants from wastewaters*. CRC Press, Boca Ratón, Fl, pp. 137-140.
- Alvares de Lima, R. O., Bazon, A.P., Fávero, D.M. Salvadori, Rechb, C.M., Palma Oliveira, D., Umbuzeiro, G.A. 2007. Mutagenic and carcinogenic potential of a textile azo dye processing plant effluent that impacts a drinking water source. *Mutation Research*. 626:53–60.
- Baldrian, P and Gabriel, J. 2006. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiology Letters*. 206: 69-74.

- Blázquez, P., Casas, N., Font, X., Gabarrell, X., Sarrá, M., Caminal, G. and Vicent, T. 2004. Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*. *Water Research*. 38:2166-2172.
- Choteborská, P., Palmarola-Adrados, B., Galbe, M. Zacchi, G., Melzoch, K. and Rychtera, M. 2004. Processing of wheat bran to sgar solution. *Journal of Food Engineering*. 61: 561-565.
- Collins, P. and Dobson, A. 1997. Regulation of Laccase Gene Transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*. 78: 3444–3450.
- Couto, S., Toca, J. (2006) Industrial And Biotechnological Application Of Laccases: A Review. *Biotechnology Advances*, 24: 500-513.
- Christie, R. 2001. Colour chemistry. Royal society of chemistry. Cambridge. United Kingdom. pp. 1-5, 23-26, 45-46, 118-120, 135- 137,191.
- DAMA (Departamento Técnico Administrativo del Medio Ambiente) [en línea]. <<http://www.dama.gov.co>>
- Dávila A, y Vázquez-Duhalt, R. (2006). Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. *Mensaje Bioquímico*. 30:29-55.
- Deacon, J. 1988. Introducción a la micología moderna. Primera edición. Editorial Limusa. México. pg.39-4.
- Dias, A., Bezerra, R. and Pereira, A. 2004. Activity and elution profile of laccase during biological decolorization and dephenolization of olive mill wastewater. *Bioresource Technology*. 92: 7–13.
- Dittmer, J., Patel, N., Dhawale, S. and Dhawale, S. 1997. Production of multiple laccase isoforms by *Phanerochaete chrysosporium* grown under nutrient sufficiency. *FEMS Microbiology Letters*. 149: 65-70.
- Ecological and Toxicological Association of the Dyestuffs Manufacturing Industry [en línea]. <<http://www.etad.com>>. [Consulta: 21 de Julio 2009].

- Elgueta, K. 2007. Utilización de colorantes sintéticos y naturales en teñido de tejidos. Manual de Laboratorio de la Asignatura de Química General. Universidad de los Lagos Ingeniería del Medio Ambiente. Osorno. Chile. 1-6p.
- Fernández J., *et al.* 2009. Inmovilización de hongos ligninolíticos para la remoción del colorante Negro reactivo 5. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 11(1): 59-73.
- Forgacs E, Cserháti T, Oros G. 2004. Removal of synthetic dyes from wastewaters. *Environmental International* 30:953-971.
- Galhaup C. and Haltrich, D. 2001. Enhanced formation of laccase activity by the whiterot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 225-232.
- Garzón-Jiménez, R. 2008. Cinética de degradación de colorantes textiles de diferentes clases químicas por hongos y bacterias inmovilizados sobre fibra de *Agave tequilana* Weber var. Azul. Tesis de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia.
- Gayosso, M., Leal, E. and Rodríguez, R. 2004. Evaluación de la actividad enzimática de *Pleurotus ostreatus* en presencia de bifenilos policlorados. *Revista Iberoamericana*. 23:76-81.
- Gill, P.K. and Arora, D.S. 2003. Effect of culture conditions on manganese peroxidase production and activity by some white rot fungi. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 30: 28-33.
- Gold, M. and Alic, M. 1993. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Biological reviews*. 605-622.
- Gonçalves, I M C., Gomes, A., Brás, R., Ferra, M I A., Amorim, M T P., Porter, R.S. 2000. Biological treatment of effluent containing textile dyes. *JSDC*. 116:214-219.

- Ha, H., Honda, C., Watanabe, Y. and Kuwahara, M. 2001. Production of Manganese Peroxidase by pellet culture of the lignin-degrading basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 55: 704-711.
- Herrera, A., Rosas, J. 2003. Estudio preliminar de la producción de enzimas ligninolíticas por los hongos *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus* para el tratamiento de efluentes de la industria papelera. Microbiólogo Industrial. Pontifica Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Depto. Microbiología. Bogotá. 154p.
- Hofrichter., M. 2002. Review: Lignin Conversion by Manganese Peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology.* 30:454-466.
- Jiménez.,G., Penninx,M.2003. Nuevo proceso de biodegradación de colorantes, utilizando hongos de la podredumbre blanca de la madera / New technology to dyes biodegradation by white rot fungi strains. *Vitae (Medellín)* ;10(2):52-59.
- Kaushik, P., Malik A. 2009. Fungal dye decolourization: Recent advances and future potential. *Environmental International.* 35:127-141.
- Kunz, A., Reginatto, V., Durán, N. 2001. Combinated treatment of textile effluent using the sequence *Phanerochaete chrysosporium*-ozone. *Chemosphere.* 44:281-287.
- Lankinen, P. 2004. Ligninolytic enzymes of the basidiomycetous fungi *Agaricus bisporus* and *Phlebia radiata* on lignocellulose-containing media. Academic Dissertation in Microbiology. University of Helsinki.Division of Microbiology. Department of Applied Chemistry and Microbiology. Helsinki. 54p.
- Ledakowicz, S., Solecka, M., Zylla,R.2001. Biodegradation, decolourisation and detoxification of textile wastewater enhanced by advanced oxidation processes. Department of Bioprocess Engineering, Technical University of Lodz, ul. Wolczanska 213, PL-93 005 Lodz, Poland. *Journal of Biotechnology* 89 (2001) 175-184.

- Levin, L., Papinutti, L. and Forchiassin, F. 2004, Evaluation of Argentinean white rot fungi for their ability to produce lignin modifying enzymes and decolorize industrial dyes. *Bioresource Technology*. 94:169-176.
- Lobo, C. y Peña, M. 2002. Expresión transiente de la enzima alfa amilasa de *Thermus* sp. en *Escherichia coli* recombinante. Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Depto. Microbiología. Bogotá. 155p.
- Lucas. R., Robles.A., Gálvez del Postigo, A., García.T, Pérez.R and Álvarez de Cienfuegos. G. 2001. Biodegradación de la celulosa y la lignina. Universidad de Jaén. *Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico*. 65-97p.
- Mansur, M., Suárez, T. and González, A. 1998. Differential Gene Expression in the Laccase Gene Family from Basidiomycete I-62 (CECT 20197). *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (2) 771–774.
- Mantzavinos, D. and Psillakis, E. 2004. Enhancement of Biodegradability of industrial wastewaters by chemical oxidation pretreatment. *Journal of Chemistry Technology and Biotechnology*. 79:431-454.
- Manzano, A., León, T., Arguelles, J., Leal, R., China, R., Guerra, G., Casado, G., Sánchez, M. y Gómez, B. 2004. Hongos de la podredumbre blanca con capacidad ligninolítica y acción decolorante sobre el violeta cristal. *Revista Biología*. 18: 26-30.
- Mayer, A. and Staples, R. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme *Phytochemistry*. 60 (6) 551-565.
- Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial Ministerio de Agricultura y desarrollo rural Departamento nacional de planeación. 2006. Guía Ambiental Del Subsector Fiquero. 2ª Edición. República de Colombia.

- Ministerio de Salud Republica de Colombia. 1984. Decreto 1594. Usos del agua y residuos líquidos. 1-52p.
- Moeller, G. and Garzón, M. 2003. Desarrollo de tecnologías no convencionales para el tratamiento de efluentes de la fabricación de colorantes del tipo azo. *Anuario Imta*. 23: 123-129.
- Montgomery, D.C. 2003. Diseño y análisis de experimentos. Limusa Wiley, México D.F. 218 p.
- Morales, D. y Ruiz, K. 2007. Determinación de la capacidad de remoción de metales pesados como el cadmio, plomo y níquel por hongos de podredumbre blanca inmovilizados en portador laminar inerte. Tesis de Pregrado. Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Microbiología Industrial. Bogotá, Colombia.
- Moreira, M., Feijoo, G. and Lema J. 2003. Fungal bioreactors: Applications to white-rot fungi *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 2: 247–259.
- Novotny, C., Svobodova, K., Erbanová, P., Kajthaml, T., Kasinath, A., Lang, E. and Sasek, V. 2004. Ligninolytic fungi in Biorremediation extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biology and Biochemistry*. 36:1545-1551.
- Parab, H., Joshi, S., Shenoy, N., Lali, A., Sarma, U.S., Sudersanan. 2006. Determination of kinetic and equilibrium parameters of the batch adsorption of Co (II), Cr (III) and Ni (II) onto coir pith. *Process Biochemistry*. 41:609-615.
- Patel, R and Suresh, D. 2008. Kinetic and equilibrium studies on the biosorption of reactive black 5 dyes by *Aspergillus foetidus*. *Bioresource Technology*. 99:51-58.
- Pedroza-Rodríguez, A.M., Mosqueda, R., Alonso-Vante, N. y Rodríguez-Vázquez, R. 2007. Secuencial treatment via *T. versicolor* and UV/TiO₂/Ru_xSe_y to reduce contaminants in waste water resulting from the bleaching process during paper production. *Chemosphere*. 67:793-801.

- Radha, K.V, Regupathi, I, Arunagiri, A , Murugesan,T, 2005. Decolorization of synthetic dyes using *Phanerochaete chrysosporium* and their kinetics. *Process Biochemistry*. 40:3337-3345.
- Ramsay, J., Mok, W., Luu, Y. and Savage, M. 2005. Decoloration of textile dyes by alginate-immobilized *Trametes versicolor*. *Chemosphere*. 61: 956-964.
- Rincón, F. 2006. Análisis molecular de la Lacasa de *Phanerochaete flavid-alba*: Caracterización del gen y regulación por fenoles y metales. Doctor en Ciencias. Universidad de Granada. Facultad de Farmacia. Departamento de Microbiología. Granada. España. 164p.
- Robinson, T., Chandran, B., Nigam, P., 2001b. Studies on the production of enzymes by white-rot fungi for the decolorization of textile dyes. *Enzyme and Microbial Technology* 29, 575–579.
- Rodriguez, E., Pickard, M.A., Vazquez-Duhalt, R., 1999. Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Current Microbiology* 38, 27–32.
- Romero, S., Blánquez, P., Font, X., Gabarrell, X., Sarrá, M., Caminal, G. and Vicent, T. 2006. Different approaches to improving the textile dye degradation capacity of *Trametes versicolor*. *Biochemical Engineering Journal*. 1-6p.
- Secretaria del Ambiente, Resolucion 3957 del 19 de junio de 2009.
- Servicio de información Agropecuaria del Ministerio de Agricultura y ganadería del Ecuador SICA [en línea] <<http://www.sica.gov.ec>> [Consulta: 30 de Julio de 2009]
- Shin, M. Nguyen, T. Ramsay, J. 2002. Evaluation of support materials for the surface immobilization and decoloration of amaranth by *Trametes versicolor*. *Applied Microbiology Biotechnology*. 60:218–223.

- Tinoco, R., Pickard, M., and Vazquez-Duhalt, R. 2001. Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Letters in Applied Microbiology*. 32:331-335.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). (1997) Office of compliance Sector Notebook, Project: Profile of the textile Industry [en línea] <<http://www.cluin.org/download/toolkit/textilsn.pdf>>
- Vishnu, G., Palanisamy, S., Kurian, J. 2007. Assessment of field scale zero liquid discharge treatment systems for recovery of water and salt from textile effluents. *Journal of Cleaner Production*:1-9.
- Vyas, R., Stepler, H. and Housing, D. 2007. Involvement of an Extracellular H.sub.2 O.sub.2 -Dependent Ligninolytic Activity of the White Rot Fungus *Pleurotus ostreatus* in the Decolorization of Remazol Brilliant Blue R. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(1):3919-3927.
- Wesenberg , D., Kyriakides, I. and Agathos, S. 2003. White –rot Fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluent. *Biotechnology Advances*. 22: 161-187.
- Wong, Y. and Yu, J. 1999. Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Water Research*. Vol 33, No. 16: 3512-3520.
- Zille, A., Gónacka, B., Rehorek, A. and Cavaco-Paulo, A. 2005, Degradation of Azo Dyes by *Trametes villosa* Lacasse over Long Periods of Oxidative Conditions, *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 6711-6718.

Recursos electrónicos:

Secretaria Distrital de Ambiente (Colombia) [en línea] : La entidad. Secretaria Distrital de Ambiente (Bogotá, Colombia). < www.secretariadeambiente.gov.co >. login: 'bn' [Consulta: 17. Nov. 2009].