

Evaluación de la remoción del colorante INDIGO utilizado en empresas dedicadas a la producción de telas tipo DENIM empleando a *Pleutorus ostreatus* como modelo biológico

PRESENTADO POR: SONIA ESPERANZA RUIZ BALAGUERA
Para optar el título de Master en DISEÑO Y GESTION DE PROCESOS
con énfasis en Bioprocesos

UNIVERSIDAD DE LA SABANA
2011

Evaluación de la remoción del colorante INDIGO utilizado en empresas dedicadas a la producción de telas tipo DENIM empleando a *Pleutorus ostreatus* como modelo biológico

PRESENTADO POR: SONIA ESPERANZA RUIZ BALAGUERA
Para optar el título de Master en DISEÑO Y GESTION DE PROCESOS
con énfasis en Bioprocesos

DIRECTORA: Dr. AURA MARINA PEDROZA RODRIGUEZ
Co-DIRECTOR : Dr. LUIZ EDUARDO DIAZ BARRERA

UNIVERSIDAD DE LA SABANA
2011

Evaluación de la remoción del colorante ÍNDIGO utilizado en empresas dedicadas a la producción de telas tipo DENIM empleando a *Pleurotus ostreatus* como modelo biológico

Resumen

La industria textil en Colombia específicamente la especializada en la producción de DENIM, emplea grandes cantidades de agua potable para su proceso de teñido empleando como materia prima el colorante índigo (tinte con estructura aromática, de difícil degradación y altamente recalcitrante), parte del cual queda remanente en los efluentes hídricos, debido a que estos residuales son vertidos directamente al alcantarillado sin ningún pre tratamiento, razón por la cual convierte a este tipo de industria como foco de contaminación para el medio ambiente.

En este estudio se planteo valorar la remoción del colorante índigo por medio de la combinación de dos mecanismos, bioadsorción y biodegradación, empleando el hongo de podredumbre blanca *Pleurotus ostreatus*. Mediante estudios preliminares de decoloración en medio agarizado (agar Radha) a 30°C, a dos concentraciones de índigo: 160ppm y 320ppm, bajo dos condiciones nutricionales: con suplementación de glucosa (2g/L) y sin suplementación de glucosa. Se determinó que la mayor decoloración fue de 90% de decoloración para los medios suplementados al cabo de 5 días, con 160ppm de índigo y 70% de decoloración al cabo de 11 días para los medios con 320ppm de colorante.

Posteriormente se realizó un estudio de remoción a dos escalas: laboratorio (50mL) y banco reactor (1,5L). Donde a escala laboratorio se evaluaron los factores pH (5 y 8), temperatura (30°C y 50°C), % inóculo (1 y 5%), concentración de glucosa (0 y 10g/L), Cu SO₄ (0 y 150μMol/L), MnSO₄ (0 y 160μMol/L), NH₄Cl (0 y 0,5g/L), tiempo de reacción (6 y 12h), agitación (0 y 120rpm), concentración de colorante (60 y 160ppm) evaluando su efecto sobre las variables de respuesta % de decoloración, % de remoción de DQO, actividad enzimática. Estos factores fueron evaluados mediante un diseño experimental Plackett Burman, donde se determinó que la agitación 120rpm, tuvo un efecto significativo sobre las variables de respuesta, y mediante comparación de medias entre tratamientos se encontró que la concentración de índigo de 160ppm, pH 8.0, 30°C, adición de 10 g/L de glucosa y 160 μMol/L de MnSO₄ fueron la combinación de factores más significativa (p<0.0001). Mediante cinéticas de remoción a escala laboratorio se determinó el tiempo de mayor remoción evaluando dos condiciones de biomasa, viable e inactiva obteniendo 88% de remoción de color y 61.92% remoción de DQO para biomasa viable en 48h, 23% y 15% para biomasa inactiva en 48h. Posteriormente a escala (1,5L) reactor se evaluaron las variables agitación (60 y 120rpm), aireación (1 y 2vvm), % de inóculo (1 y 10%), mediante un diseño experimental factorial 2³ se determinó que al utilizar 10% p/v de inóculo, aireado con 2vvm y una velocidad de agitación de 120rpm se obtuvieron las mayores remociones: de color 98% y 57% de remoción de DQO y actividad lacasa 31U/L. Bajo estas condiciones de operación se realizaron cinéticas por 5 días evaluando biomasa viable e inactiva se determinó que al cabo de 24h se obtuvo 91% de remoción de color y 85% de remoción de DQO para la biomasa viable y 46% de remoción de color y 20% remoción DQO con biomasa inactiva al cabo de 18h, bajo condiciones no estériles. Se realizaron barridos uv/vis para observar el comportamiento del colorante en el tiempo. Finalmente, se realizaron pruebas preliminares de tratabilidad con agua residual proveniente de una empresa textil de Medellín y Bogotá, obteniendo 93% de decoloración, 98% de remoción de DQO, 68%, de decoloración, 53% de remoción de DQO, respectivamente por 72h. A su vez se realizaron barridos uv/vis para observar el comportamiento de estas aguas en el tiempo

Palabras claves:

Decoloración, DQO, actividad enzimática, adsorción, biotransformación, índigo, industria textil

Agradecimientos

A Dios, por brindarme esta oportunidad de realizar este sueño

Quiero dar un agradecimiento muy especial a mi directora **AURAMARINA PEDROZA RODRIGUEZ**, por su colaboración entrega y confiar en mí para permitirme realizar este proyecto de tesis, ante todo por su amistad.

A **FRANCISCO DURIER** y **JHON JAIRO** por su colaboración incondicional y su amistad

Al Laboratorio de microbiología ambiental y de suelos de la universidad Pontificia Javeriana

A mis compañeros y amigos que me colaboraron y me brindaron su amistad incondicional

A mis padres y hermano Javier que me brindó su apoyo

A mis profesores de la universidad de la Sabana por brindarme sus conocimientos y amistades

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCION	10
2.MARCO TEORICO.....	13
2.1COLORANTE.....	13
2.2ÍNDIGO.....	14
2.3 Impacto ambiental y legislación para vertimientos.....	15
2.4 Tratamiento de aguas residuales de origen textil.....	16
2.4.1 Bioadsorción.....	18
2.4.2 Isoterma de Langmuir.....	20
2.4.3 Isoterma de Freundlich´s.....	20
2.4.4 Efecto de varios parámetros en la Bioadsorción.....	20
2.4.4.1 Efecto del pH.....	20
2.4.4.2 Efecto de la temperatura.....	21
2.4.5 Biotransformación enzimática.....	21
2.4.6 Mecanismo de degradación del colorante índigo por medio de la lacasa.....	24
3. REACTOR DE MEZCLA COMPLETA.....	24
3. 1. Reactor de mezcla completa en el tratamiento de aguas residuales con hongos de la podredumbre	24
3.2. Velocidad de agitación.....	24
3.3. Aireación.....	25
3.4 Temperatura.....	25
3.5. Fisiología de la biomasa.....	25
4. OBJETIVOS.....	26
4.1 Objetivo general.....	26
4.2 objetivos específicos.....	26
5. Metodología.....	27
5.1. Microorganismo.....	27
5.2. Colorante índigo.....	27
5.2.1. Preparación del colorante.....	27
5.2.2. Barrido de adsorción.....	27
5.2.3. Curva de calibración.....	27
5.3. Preparación de la biomasa fúngica para los experimentos.....	27
5.3.1. Producción de biomasa en cultivo sumergido.....	27
5.3.2. Determinación del porcentaje de humedad de la biomasa fúngica.....	27
5.4. Estudios preliminares de decoloración y adsorción.....	28
5.4.1. Decoloración en medio solido.....	28
5.4.2. Estudios de adsorción.....	28
5.5. Selección de las condiciones de operación a escala erlenmeyer.....	29
5.5.1. Diseño experimental Plackett Burman.....	29
5.5.2. Diseño experimental de paso ascendente/descendente.....	31
5.5.3. Curvas de remoción a escala laboratorio	31
5.5.4. Curvas de remoción a escala banco (1,5L).....	31
5.5.4.1. Selección de condiciones de operación para el reactor de 1.5litros.....	32
5.5.4.2. Cinéticas finales de remoción en reactor de mezcla completa.....	33

5.5.4.3. Pruebas de tratabilidad con residuales reales provenientes de dos empresas textiles.....	33
6. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	34
6.1. Reactivación de la cepa.....	34
6.2. Caracterización del colorante (índigo) y estudios de adsorción por la biomasa fúngica.....	34
6.2.1. Elaboración del colorante.....	34
6.2.2. Barrido de adsorción UV/VIS.....	34
6.3. Pruebas preliminares de decoloración es sólido.....	34
6.4. Estudios de adsorción de índigo por biomasa viable e inactiva de <i>P. ostreatus</i>	36
6.5. Selección de las condiciones de operación a escala de erlenmeyer.....	39
6.5.1. Diseño de Plackett Burman.....	39
6.5.2. Diseño experimental de paso ascendente/descendente.....	42
6.6. Cinética de decoloración de índigo a escala de laboratorio.....	44
6.6.1. DQO y decoloración.....	44
6.6.2. Biomasa y pH.....	45
6.6.3. Cuantificación de enzimas.....	46
6.6.4 Barridos UV/VIS.....	47
6.7. Curvas de remoción a escala de banco(1,5L).....	48
6.7.1. Selección de condiciones de operación para el reactor de 1,5 litros factorial 2 ³	48
6.7.2. Evaluación de variables del proceso de decoloración del colorante índigo en Reactor.....	50
6.7.3. Remoción de color y DQO.....	51
6.7.4. Conductividad y pH.....	55
6.7.5. Actividad enzimática, pH y azúcares totales.....	56
6.7.6. Barrido UV/VIS.....	58
6.7.7. Recuento de microorganismos heterótrofos totales y pruebas de viabilidad para la biomasa de <i>P. ostreatus</i> pos tratamiento.....	59
6.8. Estudios de tratabilidad con residuales industriales reales.....	62
7. CONCLUSIONES	66
8. RECOMENDACIONES.....	67
9. ANEXOS	68
10. BIBLIOGRAFIA.....	78

TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del índigo.	14
Figura 2. Reactor de mezcla completa utilizado.....	32
Figura 3. <i>P. ostreatus</i> en agar extracto salvado de trigo a 30°C después de 8 días: (A) anverso, (B)reverso.....	34
Figura 4. Pruebas preliminares de crecimiento y decoloración en agar Rhada suplementado con índigo. Condiciones 30° C, 11 días, pH 4,5	36
Figura 5. Estudio de adsorción biomasa viable a 160ppm de índigo durante 6h temperatura a 30°C, pH8.....	38
Figura 6. Estudio de adsorción biomasa viable a 160ppm de índigo durante 12h temperatura a 30°C,pH8.....	39
Figura 7. Diseño experimental Plackett Burman.....	42
Figura 8 Diseño de experimental de paso ascendente/descendente. Condiciones: índigo a 160 ppm, pH 8.0, 30° C, 1% de inóculo, 120 rpm, 10g/L de glucosa, 160 μMol/L de MnSO ₄	43
Figura 9. Cinética de remoción a escala erlenmeyer para biomasa viable e inactiva, condiciones de experimentación Índigo a 160ppm, pH de 8, a 30°C, 120rpm, durante 3 días.....	45
Figura 10. Perfiles de la producción de enzimas (Lac, MnP y LiP) y pH a través del tiempo. Índigo a 160ppm, pH de 8, a 30°C y 120rpm, durante 3 días.....	47
Figura 11. Barrido UV/VIS del colorante inicial y de la cinética a las 24h para biomasa viable e Inactiva	51
Figura 12. Diseño experimental Factorial 2 ³ en reactor.....	54
Figura 13. Decoloración, remoción de DQO y pH para la biomasa viable e inactiva. Condiciones de operación: 5 días, pH 8, 120rpm y 2vvm.....	55
Figura 14. Cambios de pH y conductividad durante la cinética. Condiciones de operación: 5 días, pH 8, 120 rpm y 2vvm,.....	56
Figura 15. Lacasa, azucares reductores y pH. Condiciones de operación: 5 días, pH 8, 120 rpm y 2 vvm.....	58
Figura 16. Barridos UV /VIS para biomasa viable (izquierda) y biomasa inactiva (derecha).....	59
Figura 17. Recuento iniciales y finales para bacterias heterótrofas totales en los tratamientos con biomasa viable e inactiva Biomasa viable (1), biomasa inactiva (2). Condiciones de operación Condiciones de operación: 5 días, pH, 8,2, 200 rpm y 2 vvm.....	60
Figura 18. Características macroscópicas y microscópicas de las bacterias heterótrofas recuperadas en los dos reactores. Bacilos Gram negativos (izquierda), bacilos Gram positivos (derecha). Agar nutritivo, 37° C, 48 horas.....	60
Figura 19. Cambios morfológicos y crecimiento del micelio pos tratamiento en reactor. Agar rosa de bengala, 30°C, 5 días.....	61
Figura 20. Remoción de color, DQO y actividad lacasa para residuales índigo y dispersos.....	62
Figura 21. Barridos UV/Vis para residuales índigo.....	62
Figura 22. Barridos UV/Vis para residuales dispersos.....	63

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los colorantes según su forma de aplicación.....	14
Tabla 2. Características químicas y físicas del agua textil DENIM.....	16
Tabla 3. Resolución 3957 de la Secretaria Distrital de Ambiente para vertimientos Industriales.....	17
Tabla 4. Comportamiento de las diferentes clases de colorantes enfrentadas a diversos procesos de remoción.....	17
Tabla 5. Ventajas y desventajas de los tratamientos del agua residual	18
Tabla 6. Factores a evaluar en el Plackett- Burman.....	31
Tabla 7. Factores evaluados en el Plackett- Burman.....	31
Tabla 8. Parámetros analizados durante el diseño experimental y las curvas de remoción en reactor.....	32
Tabla 9. Deltas para encontrar las condiciones más favorables del proceso.....	33
Tabla 10. Factorial 2 ³ para encontrar las condiciones de operación del reactor biológico tipo mezcla completa.....	34
Tabla 11. Diseño experimental de bloques.....	35
Tabla 12. Fotografías de la decoloración in vitro en Radha bajo dos condiciones nutricionales con el hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> , 30°C, 11 días.....	38
Tabla 13. Valores calculados para los estudios de adsorción según el modelo de Langmuir y Freundlich.....	40
Tabla 14. Condiciones del proceso de tratabilidad.....	66

Tabla de contenido de Anexos

Anexo 1. Composición del agar extracto de salvado de trigo.....	68
Anexo 1b. Composición del agar Rhada.....	68
Anexo 2. Preparación del colorante índigo.....	72
Anexo 3. Barrido UV/VIS del colorante índigo.....	72
Anexo 4. Curva de calibración del colorante índigo.....	73
Anexo 5. Preparación de reactivos para DQO curva de calibración del dicromato.....	73
Anexo 6. Información complementaria para soporte de estudios de adsorción	
Anexo 7. Porcentaje de humedad y peso seco de la biomasa fungica de <i>P. ostreatus</i>	74
Anexo 8. Estructura del grupo cromóforo presente en el índigo.....	74
Anexo 9. Mecanismo de degradación del colorante índigo por medio de la lacasa.....	75
Anexo 10. Vista de la biomasa antes y después del proceso de decoloración.....	76
Anexo 11. Barridos uv/vis para el diseño experimental factorial 2 ³ para determinar las condiciones de operación del reactor (1,5L).....	77
Anexo 12. Publicaciones y Eventos.....	78

Dedicatoria

*Esta tesis está dedicada con todo mi corazón a **LEONARDO SASTOQUE CALA** por confiar en mis conocimientos brindarme su apoyo incondicional, su amistad, y estar en los momentos más difíciles de mi vida, por su noble corazón.....a ti*

1. INTRODUCCIÓN

La industria textil Colombiana especializada en la producción de DENIM realiza una gran cantidad de operaciones unitarias, donde se utilizan diversas materias primas como algodón, lana, fibras sintéticas o mezclas de ellas. Estos materiales se procesan con colorantes y auxiliares textiles, generando un gran impacto ambiental principalmente por la descarga de sus efluentes compuestos por sustancias contaminantes (reactivos, colorantes y residuos del proceso) en ríos o cuerpos de agua. Este tipo de operaciones unitarias son ineficientes ya que se pierden entre un 10 - 20% (Xian et al., 2006) del colorante empleado en todos los procesos de teñido industrial.

La industria textil dedicada a la producción de telas tipo DENIM utiliza índigo como colorante principal, es producido por síntesis química y utilizado para el teñido de fibras textiles como algodón. La producción mundial de este colorante representa cerca de 120.000Ton por año correspondiendo al 7% del total de los colorantes en la industria textil (Eremektara et al., 2007).

Para el año 2007 Colombia tuvo una demanda de 12 millones de metros mensuales de índigo de los cuales 6 millones se produjeron en Colombia y los otros 6 millones fueron importados (Quintero y Cardona, 2009). El índigo es un colorante, tiene una estructura aromática compleja que lo hace resistente a la luz, transformación biológica y demás condiciones de degradación del medio ambiente (Sukumara et al., 2009).

El proceso de teñido con el colorante índigo es conocido como “tina” debido a que este proceso se realiza en tinas o canoas de teñido. Durante el proceso, el colorante sufre una transformación química previa (reducción del colorante) para que tenga afinidad por las fibra de algodón, la cual se realiza en un medio altamente alcalino (NaOH) mediante la presencia de un agente reductor como el hidrosulfito de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). Finalmente se obtienen sales solubles o leuco sales que después de haber sido reducidas, permiten que el colorante se adhiera a la fibra por medio una reoxidación con oxígeno atmosférico o con peróxido (H_2O_2) (Fieser, 2010).

El consumo promedio diario de este colorante en un empresa de producción de DENIM en Colombia es de 400 kg/día con un caudal de salida de aproximadamente 400.000 litros/día (datos reales de industria textil 2009, Quintero y Cardona, 2009). En general, las textileras generan aguas residuales con elevadas cargas contaminantes asociadas con DQO, DBO_5 , unidades de color, entre otros contaminantes. Estudios realizados por (Unlu et al; 2009) reportan que en general las aguas residuales de la industria textil tienen rangos de pH entre 9-11, conductividad entre 680-1500 mS/cm, DQO 800-1800 mg/L, unidades de color entre 5000-10000 Pt-Co. La resolución 3957 de la Secretaria Distrital de Ambiente bajo el acuerdo CAR 46 del 2006 rige los vertimientos de esta industria en Bogotá. Esta resolución establece que para realizar vertimientos al alcantarillado los valores máximos permisibles para estos parámetros deben ser de: DQO 1500 mg/L, color 50 unidades Pt-Co en dilución 1/20 y pH entre 4-9, entre otros. De esta manera, la industria textil nacional genera un alto impacto ambiental, problemática que requiere el desarrollo de nuevas investigaciones y tecnologías eficientes y adecuadas para el tratamiento de este tipo de efluentes residuales que permitan a estas industrias cumplir con la normatividad vigente minimizando el impacto ambiental.

Kariminiaae et al., 2007; Prachi y Anushree, 2008 reportaron que existen métodos biológicos económicos, con menores requerimientos energéticos y eficientes en la remoción de una amplia gama de colorantes textiles entre estos el índigo, donde se analiza el efecto de diversos parámetros de proceso como pH, temperatura, concentración de colorante entre otros; estos procesos resultan ser muy favorables al medio ambiente obteniendo bioconversiones completas de los contaminantes tóxicos a productos estables y amigables al medio ambiente.

Entre estos métodos biológicos se destacan los tratamientos con hongos de podredumbre basidiomicetos descomponedores primarios de madera (podredumbre, blanca, café y azul), donde se encuentra reportado que tienen gran potencial en degradar contaminantes como hidrocarburos, explosivos, plaguicidas, bifenilos policlorados, entre otros. (Sathishkumar et al., 2010; Prachi y Anushree, 2008; Faraco et al., 2009, Rekuc et al., 2010, Salame et al., 2010), al igual la eliminación de colorantes presentes en el efluente de la industria textil (Ahluwalia y Goyal, 2007; Banat et al., 2006; Rekuc et al., 2010; Pedroza et al., 2010; Sukumara et al., 2009).

Diferentes estudios han demostrado la capacidad que tienen estos hongos ligninolíticos para remover y biotransformar colorantes industriales. Convirtiéndolos en microorganismos de interés para el sector textil (Banat et al., 2006; Antonella et al., 2009). Ya sea que se utilice la biomasa viable como estrategia de biotransformación o inactiva como bioadsorbentes (Balan y Monteiro, 2001). Adicionalmente, se reporta que son capaces de reducir la demanda química de oxígeno y la demanda bioquímica de oxígeno por medio de biodegradación aeróbica convencional (Gómez et al., 2008).

Los mecanismos de acción de estos hongos se clasifican en dos grupos: Físicos, mediado por el micelio fúngico que actúa como un adsorbente natural proceso que se favorece por el área superficial de las hifas y por sus grupos funcionales presentes en la pared celular que actúan como ligando, este proceso no implica gasto energético para el microorganismo Chávez et al., 2006. El segundo es de tipo bioquímico asociado con el metabolismo en el cual participan de manera simultánea tres sistemas enzimáticos: El primero de ellos es denominado complejo ligninolítico, el cual está conformado por un amplio grupo de enzimas de la familia de las polifenoloxidasas dependientes de peróxido. Su actividad catalítica se basa en la sustracción de electrones a partir de compuestos aromáticos y no aromáticos con diferentes grados de sustituciones, empleando como aceptor final de electrones el oxígeno molecular. El segundo sistema está compuesto por todas las enzimas que favorecen la producción de peróxido de hidrógeno a partir de la transformación de monómeros (aril alcohol oxidasa, glucosa oxidasas, entre otras). La generación de peróxido es un mecanismo de retro alimentación fundamental para producir el activador del compuesto de las peroxidasas, intermediario que genera la primera sustracción de electrones en los anillos aromáticos. Por último se tiene la participación de todas las enzimas que actúan en las rutas bioquímicas del catabolismo y anabolismo para generar energía e intermediarios claves como ciertos ácidos orgánicos, que intervienen en quelación de iones metálicos como el manganeso, activador específico para la enzima manganeso peroxidasa. Gracias a la interacción de los tres sistemas, gran variedad de colorantes son oxidados parcialmente o mineralizados hasta dióxido de carbono y agua (Pedroza et al., 2010; Martínez et al., 2011).

Este trabajo de investigación se centró en evaluar la remoción del colorante índigo preparado a nivel laboratorio el cual está presente en el agua residual de la industria textil productora del DENIM, empleando a *Pleurotus ostreatus* como modelo valorando dos procesos (biosorción y biodegradación). Donde se analizó el comportamiento de diversos parámetros como pH, porcentaje de decoloración, remoción de DQO, actividad enzimática, entre otros. Estos ensayos se realizaron a

escala laboratorio y banco reactor (1,5L), bajo condiciones de no esterilidad, con la finalidad de proponer el proceso biológico como alternativa para el tratamiento de los efluentes de la industria textil.

2. Marco teórico

2.1 Colorantes

Los colorantes son sustancias orgánicas fluorescentes o de color intenso que imparten color a una sustancia incolora o bien a un sustrato por medio de una adsorción selectiva de luz dentro de las longitudes de onda de 400nm–700nm del espectro electromagnético (Abdula et al., 2000). El compuesto está constituido por tres grupos funcionales, el cromóforo, que es el grupo responsable de la adsorción de la luz, dándole la propiedad de color al compuesto; los auxocromos, que le dan afinidad por la fibra e intensifican el color y por último el solubilizador, que le da afinidad a solventes diversos y esta dado por la presencia de iones como $-\text{SO}_3 \text{Na}^+$, $-\text{NH}_3\text{Cl}^-$, $-\text{SO}_2\text{NH}_2^+$, $-\text{ONa}^+$ (Antonella et al., 2009).

Los colorantes usados industrialmente poseen una compleja estructura química encontrando así a aquellos que contienen grupos tipo azo, diazoantraquinonas y complejos metálicos, los cuales generalmente se aplican como mezclas. Según sus propiedades pueden ser clasificados como ácidos, básicos, reactivos y directos (Fieser, 2010).

La referencia más importante acerca de la clasificación de colorantes y pigmentos es el *colour index*, publicado por “*The society of dyers and colourists*”. En esta publicación los colorantes y pigmentos se clasifican de acuerdo con su estructura química como: azo (-N=N-), carbonil (C=O) (incluyendo antraquinonas), phtalocianinas, diversas clases químicas de colorantes orgánicos (colorantes polienos y polimetinos, colorantes con ion arilcarbonilo (incluyendo trifenilmetinas), dioxacinas, (azufre y nitroquímicas) (Christie, 2001).

Otro método comúnmente utilizado para clasificar colorantes está basado en el proceso de aplicación a las fibras, incluye: ácidos, básicos, directos, reactivos, dispersos, tina (EPA, 2007).

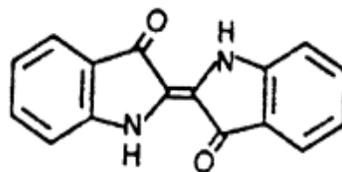
La aplicación más común de los colorantes sobre las fibras es la tinción, se ha desarrollado una clasificación de los colorantes en función de su método de aplicación, la cual se realiza por medio de las siguientes interacciones entre el colorante y la fibra: uniones iónicas, puentes de hidrogeno, fuerzas de Van der Waals o enlaces covalentes (tabla 1).

Tabla 1 Clasificación de colorantes según su forma de aplicación

Tipo de colorante	Forma de aplicación a la fibra	Descripción del colorante
Ácidos	Su interacción con la fibra es de intercambio iónico	Los colorantes ácidos son de tipo aniónicos y poseen grupos sulfónicos
Mordiente	Su interacción con la fibra es de intercambio iónico	Requieren de metales mordientes para ser a fin a la fibra no posee capacidad de teñir por si solo
Pre metalizados	Su interacción con la fibra es de intercambio iónico	Colorantes que requieren de complejos metálicos para su aplicación
Directos	Su interacción con la fibra es a través de las fuerzas de Vander Waals	colorantes que poseen más de un grupo azo
Reactivos	La interacción de estos colorantes es por medio de enlaces covalentes	El colorante posee grupos electrofílicos
De tina	Su interacción es debida a interacciones iónicas	Son insolubles y derivados del indól , se reducen y se oxidan para depositarse en la fibra. Como el índigo
Dispersos	Su interacción es debida a interacciones iónicas	Son insolubles, deben ser hidrolizados y posteriormente precipitados sobre la fibra
Básicos	Colorantes tipo catatónicos	Requieren interacciones iónicas para su aplicación

(Tomado de Waring y Hallas, 1990; Guaratini y Zanoni, 2000)

2.2 Índigo



Índigo

Figura 1. Estructura química del índigo.

(Doralice et al., 2001)

El colorante índigo pertenece al grupo de los derivados del indól, este colorante posee excelente durabilidad del color en el tiempo, gran estabilidad a los rayos UV (Walter et al., 2006; Sandoval, 2005) es generalmente usado por la industria textil productora del DENIM, es considerado como una sustancia recalcitrante altamente contaminante debido a su persistencia en los efluentes de dicha industria.

El colorante índigo es un colorante a la tina insoluble en agua, para su aplicación directa a la fibra se utilizan agentes reductores fuertes, tales como el hidrosulfito de sodio en un medio altamente alcalino transformándolo en la correspondiente forma leuco reducida, en esta forma reducida el colorante es afín a las fibras de celulosa y algodón. Luego se efectúa la oxidación del colorante sobre la tela paso en el cual el colorante se adhiere a la fibra por medio de aire perboratos, con peróxidos (H₂O₂) o con el aire. Posteriormente, se debe eliminar el exceso de álcali y colorante con lavados en caliente; obteniendo efluentes con concentraciones de un (10-20%) del colorante inicial empleado en el proceso de teñido (Xian et al., 2006). Generando efluentes con altos valores de DQO y color residual.

El teñido industrial de índigo se realiza de manera continua donde los hilos de urdimbre se tiñen con añil (índigo) pasando por varias tinas o cubas de inmersión cada una compuesta con rodillos exprimidores con su correspondiente paso por aire (zona de reoxidación), debido a la baja afinidad de la celulosa por el añil se deben realizar varios ciclos de inmersión dependiendo de la concentración de colorante deseada sobre la fibra, los hilos de urdimbre son lavados en un sistema de exprimidores para eliminar los químicos y colorante residuales, por último los hilos de urdimbre pasan por proceso de secado conformado por bombos y cilindros (Montoya, 2005).

2.3 Impacto ambiental y legislación para vertimientos industriales

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). La composición química del agua es muy variada, pero los contaminantes prioritarios son el color, compuestos aromáticos, DQO, DBO₅ y metales pesados. Dado que la DQO (demanda química de oxígeno) es un parámetro indicador del grado de contaminación en efluentes industriales gracias a que mide la cantidad de sustancias disueltas o en suspensión susceptibles de ser oxidadas (materia orgánica) expresada en miligramos de oxígeno diatómico por litro (mgO₂/l). Otro parámetro indicador de contaminación es la DBO (demanda biológica de oxígeno) gracias a que es una medida de la cantidad de materia orgánica fácilmente biodegradable, entendida como “la cantidad de oxígeno que se requiere para oxidar biológicamente la materia orgánica presente”.

Las empresas que específicamente trabajan en la tintura de telas o hilos de algodón pueden generar residuales con valores promedio presentes en la tabla 2.

Tabla 2. Características químicas y físicas del agua textil DENIM

Parámetros	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Mezcla de las 3
pH	9.4-10.4	10.0-12.0	9.2-10.2	9.4-11-3
Conductividad (mS/cm)	680-400	800-1010	550-320	660-590
DQO (mg/L)	1096-841	1571-1787	1178-348	1263-929
Color (Pt-Co)	6460-5593	9540-8600	5070-1255	6850-5120

Tomado de (Unlu et al., 2009)

Los métodos para la remoción de la DBO₅, sólidos y DQO están 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; Aguedach et al., 2006). Igualmente la presencia de nitrógeno en ciertos colorantes determina que bajo transformación microbiana se

generen aminos aromáticas más tóxicas y mutagénicas que el compuesto inicial (Nilsson et al., 2006). También se ha encontrado que los colorantes pueden sufrir procesos de bioacumulación, encontrándose en altas concentraciones en algas y plantas expuestas a tales efluentes (Banat et al., 2006; Kirby et al., 2000). Dada la heterogeneidad de los residuales y considerando que para algunas empresas diariamente la producción y tintura de telas puede alcanzar hasta 150.000m de hilo teñido/día, la generación de aguas coloreadas es muy significativa (Gonçalves et al., 2000). Por esta razón, la remoción de colorantes se ha convertido en un área de gran interés para diversos grupos de investigación, básicamente porque la legislación a nivel mundial y nacional es más exigente con respecto a los vertimientos que producen ciertas industrias como las papeleras, textiles y metalúrgicas. Las principales razones se asocian con un gasto excesivo de agua potable que debe ser reducido por medio de la implementación de tratamientos que permitan reutilizar parte del agua en los ciclos de lavado. A su vez algunos de los compuestos liberados están incluidos en la lista de contaminantes prioritarios de la Agencia de protección Ambiental de USA EPA (2007). Con respecto a esta situación en Colombia, las industrias textiles deben cumplir con lo dispuesto en el artículo 73 del Decreto 1594 del 84 (Ministerio de Salud, 1984) y para Bogotá la resolución 3957 de la Secretaria Distrital de Ambiente, la cual considera los parámetros que se presentan en la tabla 3. La mayoría de las empresas cumplen con estos requerimientos, sin embargo algunas de ellas todavía vierten aguas muy coloreadas que causan efectos adversos al ecosistema acuático como bloqueo del paso de luz, inhibición de la fotosíntesis, condiciones anóxicas y eliminación parcial o total de especies animales y vegetales a diferentes niveles tróficos.

Tabla 3. Resolución 3957 de la Secretaria Distrital de Ambiente para vertimientos Industriales en Bogotá.

Parámetro	Unidades	Valor
Color	Unidades de Pt-Co	50 en dilución 1/20
DBO ₅	g/L	800
DQO	mg/L	1500
Grasas y aceites	mg/L	100
Sólidos sedimentables	mL/	2
Sólidos suspendidos totales	mg/L	600
Tensoactivos	mg/L	10
Temperatura	grados centígrados	30
pH	Unidades	5.0-9.0

2.4 Tratamiento de aguas residuales de origen textil

En Colombia la industria textil supera en impacto ambiental a las aguas negras de origen domésticos debido a que estas industrias emplean en su proceso productivo una amplia gama de colorantes y aditivos los cuales tienen la particularidad de persistir en el ambiente, (Christie, 2001). Por esta razón, los métodos de tratamientos clásicos no son muy útiles debido a que oxidaciones o reducciones del proceso pueden generar productos secundarios altamente tóxicos (Roessler et al., 2002; Vishnu et al., 2007). Hasta el momento para la eliminación del colorante presente en el agua residual textil se han empleado procesos como adsorción, neutralización, coagulación, degradación química, degradación fotocatalítica, filtración por membrana e intercambio iónico, entre otros (Lucasa et al., 2007), aunque estos procesos han demostrado ser útiles en la remoción de colorantes, tiene la desventaja de tener un alto costo a nivel industrial, se saturan rápidamente y no remueven la

totalidad de los colorantes empleados en la industria textil. En la (tabla 4) se observa la viabilidad de cada uno de estos procesos en cuanto a la decoloración de colorantes.

Tabla 4. Comportamiento de las diferentes clases de colorante enfrentadas a diversos procesos de remoción

Clase de colorante	Coagulación	Carbón activado	Procesos físico químicos y biológicos	Proceso biológico tradicional	Ozono	Lodos
Azoico	0	(+)	(+)	0	(+)	0
Reactivo	0	(+)	(+)	0	(+)	0
Acido	0	(+)	(+)	0	(+)	0
Básico	0	(+)	(+)	0	(+)	(+)
Disperso	(+)	0	(+)	0	0	0
Sulfurados y indigoides	(+)	0	(+)	0	(+)	0

(Tomado de Yuzhu y Viraraghavan, 2001)

Por otro lado, los procesos químicos aunque remueven algunos colorantes tienen la desventaja de generar lodos residuales lo que conllevaría a problemas ambientales secundarios producidos por el uso excesivo de químicos que a su vez presentan subproductos altamente tóxicos Díaz et al., 2004. Los procesos físicos tienen la desventaja de tener tiempo de vida útil relativamente cortos lo que conlleva a ser reemplazados y aumentar los costos del proceso disminuyendo su viabilidad (Mantzavinos y Psillakis, 2004). Por otro lado, los procesos convencionales para tratamiento de aguas residuales como lodos activados y sistemas anaeróbicos se han evaluado presentando baja remoción de color y susceptibilidad a ciertos compuestos como AOX (Sustancias químicas orgánicas que contienen uno ó varios átomos de un elemento halógeno, generalmente cloro, aunque existen compuestos formados con bromo e Yodo, son tóxicos para los organismos acuáticos en concentraciones bajas, son muy persistentes en el medio ambiente, con tendencia a bioacumularse) (Savant et al., 2008; Shaul et al., 1991; Gonçalves et al., 2000; Sirianuntapiboon et al., 2006). En la tabla 5 se comparan varios tratamientos para la remoción de colorantes.

Tabla 5. Ventajas y desventajas de los de tratamiento de agua residual (Gregorio et al., 2005)

Proceso de tratamiento de agua residual	Ventajas	Desventajas
Coagulación	Fácil de operar utilizado a gran escala	Baja eficiencia en la remoción de la % DQO, no remueven el color
Intercambio iónico	Alta eficiencia para remover el % DQO Capacidad para eliminar sustancias hidrófilas	Altos costos de operación producción de residuos alta selectividad no es utilizado aun a gran escala, no remueven el color
Procesos de oxidación	Altas eficiencias de remoción	Eficiencias variables no aplicable a gran escala generación de biopelículas en los sistemas de distribución, remueve el color pero no en su totalidad de los colorantes
Membranas	Alta eficiencia	Costos altos, taponamiento de las membrana, no remueve el color
Carbón activado	Apropiado para la disminución del % en la DQO	Bloqueo de los sitios activos debido a la presencia de altas concentraciones de materia orgánica, no remueve la totalidad de los colorantes
Hongos de la podredumbre blanca (Hpb)	Potencial la reducción de color y material orgánico potencial de reducción de lodos potencial de reducción al uso de productos químicos	Su aplicación al tratamiento de agua no ha sido demostrada. Altamente efectivo en la remoción del color

Estudios reportan el uso de los hongos de podredumbre blanca para el tratamiento de aguas residuales textiles (Rekuc et al., 2010; Ahluwalia y Goyal, 2007; Banat et al., 2006; Rekuc et al., 2010, Pedroza et al., 2010; Sukumara et al., 2009). Este grupo de hongos producen diversos tipos de enzimas que biotransforman gran diversidad de contaminantes como compuestos aromáticos clorados, colorantes, plaguicidas e hidrocarburos aromáticos policíclicos (Dávila y Vázquez, 2006), de igual manera comportándose como adsorbentes naturales, crecen sobre medios económicos y pueden ser retenidos sobre varios soportes (Ramsay et al., 2005; Gao et al., 2006; Morales y Ruiz, 2008). Sin embargo, la mayoría de estudios se han realizado bajo estricto control de esterilidad, resultados que dejan abierto un gran interrogante con respecto a lo que podría suceder bajo una condición en la cual el agua residual viene acompañada con otros microorganismos que pueden ejercer un efecto negativo sobre la remoción de un determinado contaminante (Levi et al., 2004).

La acción decolorante de los hongos de la podredumbre blanca se ve afectada por factores, tales como especie de hongo utilizado, estructura del colorante, pH, temperatura, tiempo de reacción y el uso de inductores enzimáticos como glucosa y nitrógeno (Yesilada et al., 2003). La capacidad de estos hongos para biodegradar colorantes y aguas residuales se basa en la capacidad de estos en efectuar dos tipos de mecanismos: tanto la bioadsorción como la biotransformación debido a la

producción de enzimas extracelulares como peroxidasa y polifenoloxidasas entre otras (Wong y Yu, 1999; Tauber et al., 2005; Kariminiaae et al., 2007).

2.4.1 Bioadsorción

La adsorción es un proceso mediante el cual se extrae materia de una fase y se concentra sobre la superficie de otra fase (generalmente sólida). Por ello se considera como un fenómeno subsuperficial. La sustancia que se concentra en la superficie o se adsorbe se llama "adsorbato" y la fase adsorbente se llama "adsorbente". (Foust et al., 2001).

La adsorción constituye uno de los procesos más utilizados dentro de los sistemas de tratamiento terciario de las aguas residuales. Se emplea, fundamentalmente, para retener contaminantes de naturaleza orgánica, presentes en concentraciones bajas como compuestos fenólicos, hidrocarburos aromáticos nitrados, derivados clorados, sustancias coloreadas, así como otras que comunican olor y sabor a las aguas. La operación es menos efectiva para sustancias de pequeño tamaño molecular y estructura sencilla, que suelen ser fácilmente biodegradables, susceptibles de tratamiento biológico (Prachi y Anushree, 2008).

Este proceso de adsorción se lleva a cabo gracias al intercambio iónico o puentes de hidrogeno que se da entre iones de la sustancia adsorbida y el adsorbente. La sustancia adsorbida se une a la superficie del adsorbente mediante fuerzas físicas de Van der Waals y enlaces covalentes (Anto, 2006, Alvares et al., 2007).

La adsorción empleando biomasa fúngica como adsorbente es independiente del metabolismo, se lleva a cabo por medio de los grupos funcionales presentes en la pared fúngica como son: Amino, carboxil, tiol, y fosfatos, responsables de la adhesión del colorante a la pared cuya composición es a base de quitina y quitosano que proporciona enlaces con grupos amino, N-acetilglucosamina que proporciona enlaces de hidroxil, β -glucan (1-6) que proporciona enlaces carboxilo, proteínas de pared que proporcionan enlaces sulfhidrilo.

Para evaluar la capacidad adsorptiva de la biomasa fúngica frente a la remoción de colorantes industriales se deben realizar estudios de adsorción con la finalidad de determinar las condiciones de saturación del adsorbente y comparar la eficiencia entre biomasa viable o inactiva con la finalidad de determinar cuál es el proceso más favorable en cuanto a la remoción de contaminantes (color, DQO), teniendo en cuenta que la biomasa inactivada con o sin tratamiento químico o por medio de tratamientos térmicos le brinda mayor capacidad adsorptiva. Ya que autores reportan que ciertas modificaciones a nivel de la pared fúngica potencializan la capacidad de adsorción de los hongos (Prachi y Anushree, 2008).

Los estudios de adsorción se realizan por medio de isotermas de adsorción donde se relaciona la cantidad de adsorbato adsorbido por peso unitario de adsorbente a temperatura constante y con respecto a la concentración de adsorbato en el equilibrio (José et al., 2006).

Dentro de los modelos matemáticos que se ajustan a las diferentes isotermas experimentales están: Langmuir, Freundlich.

2.4.2 Isotherma de Langmuir

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

C_s = Es la cantidad de soluto adsorbido por gramo de adsorbente, capacidad de adsorción (mg/g)

$C_{s(\max)}$ = Es la capacidad de máxima adsorción del adsorbente

C = Es la concentración en el equilibrio del liquido residual

K_1 = Es la constante de linealidad de Langmuir (coeficiente de adsorción), hace referencia a la energía requerida para los enlaces. Los valores de K_1 se ven directamente afectados con la temperatura (José et al., 2006).

El modelo de Langmuir se basa en la hipótesis de que la energía de adsorción es constante e independiente de la cobertura de la superficie, plantea que la adsorción ocurre sobre sitios localizados donde no existe interacción entre el adsorbente y las moléculas del adsorbato, y que la máxima adsorción se lleva a cabo cuando la superficie del adsorbente está recubierta por una monocapa de adsorbato. Estudios reportan que el azul de metileno y la rodamina B son adsorbidos por *Phellinus igniarius* y *Fomes fomentarius* este proceso adsortivo es descrito por el modelo de Langmuir (Prachi y Anushree, 2008).

2.4.3 Isotherma de Freundlich

Es una isoterma de adsorción empírica aplicable a superficies solidas heterogéneas y con interacción entre las moléculas adsorbidas. El modelo de Freundlich representa la adsorción por mono capas, considera que no todos los sitios de adsorción tienen la misma energía de interacción con el adsorbato. Si la adsorción fuera por mono capa, el modelo de Freundlich la representaría correctamente (José et al., 2008).

$$C_s = K_f C^{1/n} \quad (2)$$

K_f = Contante de adsorción de Freundlich

C_s = Es la cantidad de soluto adsorbido por gramo de adsorbente, capacidad de adsorción (mg/g)

$1/n$ = Son los grados de linealidad

C = Es la concentración en el equilibrio del liquido residual

(José et al., 2006)

La adsorción se ve afectada por parámetros como son: pH, temperatura, efecto de las fuerzas iónicas, la concentración de colorante, desorción y regeneración de biomasa.

2.4.4 Efecto de varios parámetros en la bioadsorción

2.4.4.1 Efecto del pH:

La estructura química del colorante y la biomasa fúngica en solución se ven afectados por el pH inicial de la solución coloreada, influyendo de forma significativa sobre las cargas superficiales del adsorbente; generando influencias sobre la adsorción del colorante. La capacidad adsortiva de la biomasa fúngica incrementa para colorantes ácidos con disminuciones en el pH, para colorantes

básicos incrementa con incrementos en el pH. O'Mahony et al., 2002 reportaron que la capacidad adsorptiva para *Rhizopus arrhizus* con el colorante ácido azul remazol fue de 95mg/g con una concentración inicial de colorante de (100mg/L) a pH 2 comparado con (30mg/L) a pH 10. Esto se debió a la mayor protonación de los grupos de la pared fúngica a pH bajos (pH inferiores al punto isoeléctrico de la biomasa). Los grupos de la pared fúngica adquieren una carga positiva neta obligando a los grupos aniónicos del colorante ácido a adherirse. Así mismo Iqbal y Saeed, 2007 reportaron la captación de máxima adsorción del colorante Remazol Brilliant Blue R de 53,46% es un colorante ácido, con una concentración de 100mg/L, por medio de *Phanerochaete chrysosporium* a pH 2.0, donde evaluaron que la adsorción de este colorante disminuyó significativamente con el aumento en el pH. Maurya et al., 2006 observaron que la adsorción de azul de metileno colorante básico con concentración inicial (100mg/L) por medio de *Fomes fomentarius* y *Igniarius Phellinus* aumento del 18% al 75% y 16% a 79%, respectivamente, cuando el pH se incrementó de 3 a 11.

2.4.4.2 Efecto de la temperatura

Se han realizado un sin número de estudios donde se evaluó el efecto de la temperatura sobre la adsorción de colorantes. La mayoría de estos estudios indican que la capacidad de adsorción de la biomasa fúngica aumenta con el aumento de la temperatura hasta alcanzar las condiciones de equilibrio dinámico debido a que la adsorción se lleva a cabo de manera espontánea. Lakshami et al., 2009; Annadurai et al., 1999 obtuvieron para el colorante (rojo verofix) la absorción de 38mg/g a (60°C) en comparación con 28mg/g a (30°C), empleando quitina como adsorbente. Gracias al efecto de expansión que realiza la quitina, producida por las altas temperaturas, permitiendo así al colorante penetrar más en la estructura del adsorbente. Bayramoglu y Arica, 2007) reportaron que la capacidad de adsorción de *Trametes versicolor* fue mayor cuando la temperatura aumentó de 5 a 35°C para el colorante azul directo1 y rojo directo 128. Llevado a cabo por el aumento de la actividad superficial del adsorbente y al aumento de la energía cinética del colorante. Zeroual et al., 2006 informaron que la adsorción del colorante azul de bromofenol con biomasa de *Rhizopus stolonifer* como adsorbente se incrementó ligeramente con un aumento de la temperatura por encima de 35°C pasando de 710mg/g a 718mg/g, manteniéndose estable a 717mg/g en 55°C. En el estudio realizado por Iqbal y Saeed, 2007 se evidenció que la temperatura tiene un efecto sobre el porcentaje de adsorción, donde se evaluó la adsorción del colorante azul remazol R con concentración de colorante inicial de 100mg/L por *P. chrysosporium* a 30°C obteniendo 70% de adsorción, se observó disminución de la adsorción con el aumento de la temperatura 60% a 50°C. Por lo tanto los estudios sugieren que la temperatura tiene un efecto significativo sobre la adsorción, a su vez se demostró la capacidad de este hongo para remover colorantes residuales.

2.4.5 Bio transformación enzimática

Este proceso es dependiente del metabolismo e implica el inicio de la transformación del colorante por la acción de enzimas extracelulares y posterior internalización de compuesto parcialmente transformado. Durante esta etapa los grupos cromóforos del colorante que están unidos a las células empiezan a ser degradados perdiendo su capacidad para absorber luz a una determinada longitud de onda. Para que este proceso se lleve a cabo se requieren ciertas condiciones nutricionales y ambientales favorables, como la concentración de nutrientes en el efluente, pH, temperatura, aireación cantidad de biomasa, tiempo de contacto etc. (Annadurai et al., 1999; Gao et al., 2006; Zhao et al., 2007).

Este proceso es mediado por las enzimas peroxidasas LiP (E.C.1.11.1.14), MnP (E.C 1.11.1.13), son hemoproteínas que catalizan reacciones en presencia de peróxido de hidrógeno, las dos tienen

mecanismos similares de acción el cual inicia con la activación de las enzimas por la acción del peróxido de hidrógeno, posteriormente el ciclo involucra transferencias de electrones sucesivas tomando como donadores a los compuestos coloreados y por consiguiente el centro catalítico de la enzima sufre un proceso de reducción, posteriormente los electrones son transferidos al oxígeno o al H₂O para formar peróxido y transformar la enzima a su forma inactiva. La MnP también es activada por el H₂O₂, sin embargo tienen un mecanismo adicional que permite la oxidación de Mn⁺² a Mn⁺³. Los iones Mn³⁺ con alto potencial de reducción son estabilizados mediante la formación de quelatos con ácidos orgánicos. El Mn III en forma de quelatos actúa entonces como mediador redox difusible capaz de extraer un electrón de los compuestos fenólicos para formar radicales fenoxi (Días et al., 2003; Hofritcher, 2002; Dávila y Vázquez, 2006).

Otra de las enzimas asociadas a la decoloración de efluentes textiles es la lacasa (EC1.10.3.2) oxígeno benzenodiol oxidoreductasa es una enzima no específica capaz de actuar sobre una amplia gama de sustratos como difenoles, diferentes fenoles sustituidos, diaminas, aminas aromáticas, benzenodiolos y otros compuestos xenobioticos, las condiciones óptimas de acción de la lacasa son temperaturas entre (25-30°C) y pH entre (5-10) (Gursharan et al., 2007).

La lacasa es una enzima extracelular, contiene cobre en su sitio catalítico y es capaz de oxidar polifenoles, y compuestos no fenólicos en presencia de un mediador redox. También cataliza la remoción de un átomo de hidrógeno del grupo hidroxilo, que se puede encontrar en posición *orto* o *para* de sustratos monofenólicos o polifenólicos, dejando un radical libre por donde se inicia la futura despolimerización, formación de quinonas, metilación o demetilación de oligómeros que son producidos por las peroxidasas y degradando fragmentos de bajo peso molecular. Están involucradas en la producción del ion peróxido y catalizan la reducción de oxígeno a agua. Se ha encontrado que la actividad enzimática aumenta al cultivar los hongos en sustratos complejos que contienen fenoles, cobre, compuestos de bajo peso molecular y macromoléculas con grupos fenólicos provenientes de lignina o fracciones de la ligninocelulosa (Harald, 2004).

El incremento en la capacidad de biorremediación puede lograrse por medio de varios mecanismos. Entre los que se destacan el ajuste de la relación C/N y adición de inductores metálicos. La primera se basa en inducir condiciones ligninolíticas a nivel de laboratorio, similares a las presentadas en la naturaleza cuando el hongo crece sobre la madera (C/N 150 – 500) (Kirk y Farrell, 1997). Bajo estas condiciones el hongo ajusta su metabolismo a estrés por déficit de nitrógeno. Posteriormente se puede hacer transición a metabolismo secundario comportamiento desencadenado por el agotamiento de la fuente sencilla de carbono (Galhaup y Haltrich, 2001; Días et al., 2003).

El segundo mecanismo de inducción de actividad enzimática se relaciona con la adición de metales formando sales para minimizar la toxicidad. Dado que la adición de metales como cobre y Mn se hacen para realizar inducción transcripcional de las MnP y lacasa generando como efecto mayores concentraciones de las enzimas. Cervantes y Gutierrez, 1994; Palmieri et al., 2001 reportaron que el cobre es un micro nutriente esencial para la mayoría de los organismos, está formando parte de diferentes metalo enzimas, proteínas involucradas en los mecanismos de transporte de electrones y reacciones de oxidación-reducción. Los requerimientos de cobre para los microorganismos son muy bajos a razón de 1-10 μM. Según estos autores el cobre ejerce el mecanismo de inducción de la lacasa por medio de la regulación a nivel transcripcional ya que los niveles de mRNA aumentan en presencia de cobre aunque el mecanismo aun no está completamente elucidado. A nivel de la estructura química de la lacasa el metal está presente en los centros de cobre (T1, T2, T3) los sitios T2 y T3 forman un cluster trinuclear de cobre en el cual el oxígeno es reducido a agua. El centro T1 es el responsable de

unión del sustrato fenólico y no fenólico para que se lleve a cabo la sustracción de un electrón y por consiguiente reducción de Cu (II) a Cu (I); internamente se lleva a cabo la transferencia de electrones del sitio T1 a T2 y T3 donde finalmente los 4 átomos de oxígeno actúan como aceptor final de electrones (Tinoco et al., 2001). Sin embargo a elevadas concentraciones el cobre tiene un efecto negativo que está asociado a la interacción con ácidos nucleicos, alteración de los sitios activos de ciertas enzimas y la oxidación de componentes de membrana (Brown et al., 1991; Swamy y Ramasay, 1999; Galhaup y Haltich, 2001; Lorenzo et al., 2005).

Algunos autores como Swamy y Ramasay, 1999; Ramsay et al., 2005 reportan la acción del $MnSO_4$ como inductor de la actividad MnP, que bajo condiciones ligninolíticas la adición de $MnSO_4$ en concentraciones de 0.2mM favorece la expresión de MnP. El manganeso se necesita para que se complete el ciclo catalítico de la enzima ya que el Mn^{2+} se oxida a Mn^{3+} y el Mn^{3+} asociado con ácidos orgánicos (ácido málico y ácido oxálico) actúa como un agente primario en la ligninólisis y puede llevar la oxidación de compuestos aromáticos clorados por oxidación de dos electrones. Ozturk y Kaikara, 2005 demostraron que la adición de $MnSO_4$ (0.175mM) favorece la decoloración de colorantes azo hasta en un 80%.

La literatura reporta algunos mecanismos desarrollados por organismos eucariotes para soportar elevadas concentraciones de colorantes efectuada mediante procesos físicos - químicos y biológicos. Se sabe que el proceso físico-químico es independiente del metabolismo y hace referencia a la unión del colorante a la pared, mientras que el proceso biológico es dependiente de la energía metabólica. La unión de cantidades significativas de colorante a la pared fúngica es un proceso que se realiza con rapidez, frecuentemente en pocos minutos, lo que en ocasiones se visualiza por la pigmentación del micelio (Yuzhu y Viraraghavan, 2001). Los biopolímeros de pared celular que se han asociado con la captura de colorantes son el quitosano y la quitina. A nivel extracelular se ha descrito que ciertos metabolitos fúngicos como los ácidos pueden detoxificar el colorante por mecanismos de complejación y precipitación formando oxalato de cobre (Caesar et al., 1995; Nyanhongo et al., 2002; Cervantes y Gutiérrez, 1994).

2.4.6. Mecanismo de degradación del colorante índigo por medio de la lacasa

En el posible mecanismo de transformación del índigo por parte de la enzima lacasa, se generan ciertos intermediarios, primero, por sustracción de 2 electrones se oxida a dihidroíndigo y por sustracción de 4 electrones se oxida completamente a el ácido isatín sulfónico (ISA) ó isatín, que posteriormente con una hidrólisis se convierte en ácido antranílico, el cual es el producto estable al final de la oxidación anexo 9 (Podgornik y Perdih, 2001; Solís, 2005). Así se deduce que la función de la lacasa puede consistir en aumentar la susceptibilidad del medio de contraste hacia el ataque hidrolítico por el agua (Arora y Gill, 2001; Alonso, 2006; Balan y Moneiro, 2001). Posteriormente se podría realizar la completa mineralización del colorante a CO_2 y agua por medio de la degradación de anillo bencénico obteniendo intermediarios como benceno dihidrodiol, catecol, hasta obtener acetaldehído y piruvato entrando al ciclo de krebs (anexo 9).

Así mismo, en cuanto a las peroxidasas, estas catalizan la decoloración del índigo, se forma el ISA y a diferencia del proceso anteriormente descrito para la Lacasa, se ha evidenciado la formación de un producto estable rojo de oxidación cuando interactúa la enzima MnP, producto que no se evidencia

cuando la LiP actúa como catalizador (Kandelbauer y Guebitz, 2005; Vautier et al., 2001, Bakardjieva et al., 2005).

3. REACTOR DE MEZCLA COMPLETA

3. 1 Reactor de mezcla completa en el tratamiento de aguas residuales con hongos de la podredumbre

Los hongos de la podredumbre blanca han demostrado tener una excelente capacidad para degradar colorantes de uso textil, en la actualidad la mayoría de los estudios (Sukumara et al., 2009; Quintero y Cardona, 2009; Eltaief et al., 2009) se han centrado en la degradación de estos a nivel laboratorio, por tal razón se hace necesario implementar el tratamiento de agua residual a nivel industrial. (Barragán et al., 2006; Antonella et al., 2010) En sus estudios evaluaron el tratamiento de aguas residuales con biorreactores bajo condiciones similares a las encontradas a escala laboratorio (erlenmeyer). Evaluando la capacidad decolorante de *Bjerkandera adusta*, frente a el agua residual textil que contenía una mezcla de colorantes azoicos, poliazoicos y antraquinonicos, las condiciones para el proceso de decoloración en reactor fueron de 130rpm, 28°C, a su vez realizaron barridos uv/vis dentro del rango 360nm-790nm para evidenciar el comportamiento de la decoloración del agua residual en el tiempo, el tiempo de reacción fue de 7 días.

En la actualidad el uso de reactores de mezcla completa para el tratamiento de aguas residuales coloreadas empelando hongos de la podredumbre blanca no ha sido ampliamente estudiado aunque en general existen condiciones de operación para el reactor de mezcla completa que son relevantes como: control del pH, la fisiología de la biomasa, la concentración de sustrato, la concentración de oxígeno, velocidad de agitación entre otros.

3.2. Velocidad de agitación

En el reactor de mezcla completa generalmente es cilíndrico, se encuentre equipado con un agitador en el centro que consta de un eje sobre el cual se montan uno o dos turbinas, este tipo de reactor está equipado con baffles que rompen el efecto vortex generado típicamente dentro del reactor efecto que provoca la lisis de la pared celular, por lo general son 4 baffles con un ancho de entre 1/10 o 1/12 del diámetro del tanque (Nielsen et al., 2003), existe una gran variedad de turbinas dentro de las cuales tenemos las de flujo radial como la turbina Rushton y las de flujo axial como la turbina Maxflo. Destacando que la turbina Rushton es la más empleada en bioprocesos

Otras de las condiciones de operación en reactor de mezcla completa que influyen significativamente es el patrón de flujo, debido a que este favorece la transferencia de masa, al igual que la transferencia de calor dentro del reactor, viéndose favorecido por la cantidad de turbinas empleadas. El uso de más de una turbina favorece las condiciones del patrón de flujo y garantiza que la velocidad de rotación del impelente sea menor al igual mejora la distribución de la potencia en el volumen del liquido (Schmidt, 2005)

3.3. Aireación

La aireación dentro del reactor es un factor de suma importancia para los cultivos aeróbicos realizada por medio de un difusor o tubo con orificios que está ubicado debajo de los impulsores, la

potencia consumida por el impulsor se ve afectada por la aireación generando áreas llenas de gas llamadas cavidades o inundación donde las cavidades crecen y el impulsor se encuentra totalmente inmerso en el gas, estas condiciones no son deseadas ya que impiden una completa dispersión influyendo en la transferencia de oxígeno dentro del reactor (Morgan, 2010; Antonella et al., 2010).

3.4. Temperatura

La temperatura debe mantenerse estable dentro de los rangos óptimos necesarios para el cultivo su control en biorreactores se basa en un sistema de intercambio térmico provisto de un circuito que ordena y regula la acción del motor re- circulando el líquido refrigerante (agua), a su vez está dotado de un sensor de temperatura llamado termocupla que mide la temperatura, el biorreactor tiene un sistema de tuberías por donde se conduce el agua (fluido térmico por excelencia) para la transferencia de calor por conducción a través de las paredes metálicas del serpentín de calentamiento (Morgan, 2010; Antonella et al., 2010).

3.5. Fisiología de la biomasa

Ha et al., 2001 evaluaron el efecto de la morfología de la biomasa en la degradación de colorantes por medio de hongos ligninolíticos encontrando que la forma pelle-tizada de la biomasa fúngica facilita la transferencia de oxígeno al micelio, igual que la asimilación de nutrientes, viéndose de esta forma favorecida la producción de enzimas lininolíticas y por consiguiente favorecida la decoloración.

Enshasy et al., 2010 en su estudio mostraron las condiciones óptimas para la producción de *Pleurotus ostratus* a nivel de reactor de mezcla completa donde se emplearon dos turbinas Rushton de 6 aspas planas con agitación de 200rpm, 30 °C, con 1vvm de aireación.

Destacando que hasta el momento existen muy pocos estudios donde trabajan bajo condiciones de no esterilidad la cual es una condición real de los efluentes textiles y mucho menos su tratamiento a nivel biorreactor.

4. Objetivos

4.1. Objetivo General:

- Remover el colorante índigo presente en las aguas residuales de la industria dedicada a la producción de telas tipo DENIM empleando *Pleurotus ostreatus* con la finalidad de generar una alternativa de bioremediación.

4.2. Objetivos Específicos

Evaluar la capacidad de crecimiento, decoloración y adsorción de *Pleurotus ostreatus* tanto en forma viable o inactivo en la remoción del colorante índigo.

Determinar y evaluar las condiciones de operación que favorecen el proceso de remoción del colorante índigo a escala de erlenmeyer y reactor de banco (1.5L).

Realizar cinéticas de remoción del colorante a escala banco (1.5L) con biomasa viable e inactiva bajo condiciones no estéril.

Evaluar la capacidad decolorante de *Pleurotus ostreatus* empleando diferentes tipos de residuales industriales reales bajo dos condiciones de experimentación.

5. Metodología

5.1. Microorganismo

El hongo *Pleurotus ostreatus* se reactivó en agar extracto salvado de trigo de acuerdo a la metodología propuesta por Fernández et al., 2009 anexo 1.

5.2. Colorante índigo

5.2.1 Preparación del colorante

La preparación del colorante índigo se realizó, teniendo en cuenta lo descrito en estudios previos realizados por (Castillo, 2004), simulando el proceso de tinción en la industria textil de telas o hilos de algodón. Durante la preparación del índigo, se hizo necesaria la adición de un agente reductor (hidrosulfito de sodio) y álcali (NaOH), calentando a 30°C por 20min, aditivos que favorecieron la conversión de la forma oxidada del índigo a su forma leuco reducida, la cual es incolora y soluble en agua en las condiciones de alcalinidad estandarizadas anexo 2.

5.2.2. Barrido de adsorción

Para determinar la longitud de máxima adsorción del colorante índigo se realizó un barrido uv/vis entre 200 y 800nm; determinando la longitud de onda a la cual adsorbe el colorante índigo anexo 3.

5.2.3. Curva de calibración

Se realizó una curva de calibración con la finalidad de poder medir la concentración de índigo presente en el proceso de decoloración, se prepararon diferentes concentraciones de colorante (180, 160, 140, 120, 100, 80, 60, 40, 20, 10 ppm) (Pedroza et al., 2010) a las cuales se les determinó la absorbancia a la longitud de máxima adsorción de colorante. La curva se realizó por triplicado y con el promedio de los datos se aplicó un modelo matemático para determinar la ecuación de la línea recta que permite transformar las absorbancias a concentración anexo 4.

5.3. Preparación de la biomasa fúngica para los experimentos en erlenmeyer y reactor

5.3.1 Producción de biomasa en cultivo sumergido

Se prepararon erlenmeyers de 250mL, con 100mL de caldo extracto de salvado anexo 1, los cuales se inocularon por separado con ocho discos de agar con hongo crecido y posteriormente se incubaron en shaker horizontal a 120 rpm, 30°C, por ocho días. La biomasa pelletizada se recuperó por filtración con posteriores lavados con agua destilada, controlando las condiciones de esterilidad y se refrigeró a 4°C.

5.3.2. Determinación del porcentaje humedad de la biomasa fúngica

Se siguió la metodología de Manzano et al., 2004 para determinar el porcentaje de humedad de la biomasa fúngica de *P. ostreatus*. Inicialmente se preparó medio salvado de trigo en erlenmeyers de

250mL con un volumen de trabajo de 100mL, se inocularon ocho discos de *Pleurotus ostreatus* y se incubaron por 8 días a 120rpm a 30°C. Posteriormente, la biomasa se filtro con papel filtro Whatman N°1, se pesaron 6g de biomasa húmeda en una balanza de 3 dígitos, se secó a 80°C por 24h en una estufa hasta peso constante y se determinó el peso de la biomasa seca, este procedimiento se realizó por quintuplicado, para determinar el porcentaje de humedad se reemplazaron los valores obtenidos en la ecuación y determinado el porcentaje de humedad de la biomasa fúngica (ecuación 3). Esta metodología se implemento con la finalidad de manejar la misma cantidad de biomasa en peso seco para cada una de las etapas de este estudio

$$\% \text{ Humedad} = \frac{\text{PesoHumedo} - \text{PesoSeco}}{\text{PesoHumedo}} \times 100 \quad (3)$$

5.4. Estudios preliminares de decoloración y adsorción

5.4.1. Decoloración en medio sólido

Para evaluar el efecto de la concentración del colorante índigo y la adición del co-sustrato sobre la decoloración y crecimiento de *Pleurotus ostreatus* se realizaron pruebas preliminares en estado sólido empleando como medio el agar Rhada (anexo 1b) conformado por los requerimiento metálicos, necesarios para el metabolismo de los hongos de la podredumbre blanca tales como (cobre, hierro, manganeso, molibdeno, zinc y níquel), (Pedroza et al., 2010) bajo dos condiciones: índigo a dos concentraciones (120 y 360 ppm) (Fernández et al., 2009), con glucosa y sin glucosa. Dicho proceso de decoloración se llevo a cabo en caja petri de 90mm de diámetro total correspondientes al 100% de decoloración, el halo de decoloración producido por la biomasa fúngica en el tiempo medido en mm fue asociado al porcentaje de decoloración en medio agarizado.

Cada caja se inoculó con un disco colonizado con biomasa por 8 días a 25°C evaluando diariamente el halo de decoloración mm tomando como decoloración completa (100%) al halo de decoloración igual al diámetro total de la caja y el crecimiento radial en mm. Como control se utilizó el agar Radha, sin colorante (Radha et al., 2004), inoculado e incubado bajo las misma condiciones de experimentación. Estas pruebas se realizaron por quintuplicado y se realizó una comparación de medias entre tratamientos para establecer las diferencias entre concentración de colorante y requerimientos de glucosa.

5.4.2. Estudios de adsorción

Para los estudios de adsorción se realizaron isotermas de adsorción, evaluando cinéticas de 6 y 12h para la biomasa viable e inactiva respectivamente. Los experimentos se desarrollaron colocando 0,5g de biomasa húmeda, con un volumen efectivo de trabajo de 20mL de colorante índigo a una concentración de 160 ppm, 30°C y 120rpm por triplicado. Se registraron los valores de absorbancia a la longitud de onda de máxima adsorción del colorante puro, cada 30 min. Se determinó la concentración del colorante residual utilizando la curva de calibración del colorante.

Con el fin de examinar el mecanismo de adsorción se uso un modelo cinético de adsorción de pseudo-primer-orden empleando los resultados experimentales y asumiendo que las concentraciones medidas son iguales a las concentraciones en la superficie, resaltando que correlaciones iguales o superiores 0,99 indican cual es el modelo adecuado para representar el mecanismo adsorptivo (Parab et al., 2006; Patel y Surech, 2008) (ecuación 4).

$$\frac{t}{q} = \frac{1}{k_{2,ads} q_e^2} + \frac{1}{q_e} * t \quad (4)$$

Donde q (mg/g) es la cantidad de colorante adsorbido sobre el adsorbente al tiempo t , q_e es la cantidad adsorbida en el equilibrio y $k_{2,ads}$ ($\text{g mg}^{-1} \text{min}^{-1}$) es la constante de velocidad de adsorción de segundo orden. La estimación de la capacidad de adsorción a diferentes concentraciones iniciales de colorante se realizó utilizando el modelo de adsorción más usado para tal fin que es Langmuir (Duri, 1996). La forma lineal de la ecuación de la isoterma de Langmuir se representa en la ecuación (5).

$$\frac{1}{q} = \frac{1}{b} + \frac{1}{bkc_e} \quad (5)$$

Donde q es la cantidad adsorbida en el equilibrio (mg/g), C_e la concentración en equilibrio (mg/L), b la masa de soluto adsorbido requerido para saturar una unidad de masa del adsorbente (mg/g) y K es la constante de adsorción en el equilibrio (L/mg). El modelo de la isoterma de Freundlich (ecuación 6), el cual es un modelo empírico usado para describir la adsorción en sistemas acuosos, se usara para interpretar el proceso de adsorción de colorante observado sobre cada uno de los adsorbentes.

$$\log\left(\frac{x}{m}\right) = \log k_i + \frac{1}{n \log c_e} \quad (6)$$

Donde C_e es la concentración en equilibrio de la solución (mg L^{-1}), x/m es la cantidad adsorbida por unidad de masa del adsorbente (mg g^{-1}), m es la masa del adsorbente (g), K_i es una constante que representa la capacidad de adsorción y $1/n$ es una medida de la intensidad de la adsorción.

5.5. Selección de las condiciones de operación a escala de erlenmeyer

5.5.1. Diseño experimental de Plackett Burman

Las condiciones de operación, adición de co-sustrato/nitrógeno e inductores enzimáticos se seleccionaron realizando un diseño experimental Plackett Burman, evaluando el efecto de las siguientes variables independientes o factores: Concentración de índigo (ppm), inductores metálicos ($\text{CuSO}_4/\text{MnSO}_4$), nitrógeno (NH_4Cl), la temperatura, porcentaje de inóculo, pH, agitación, tiempo, y fuente de carbono o co-sustrato (glucosa). Las variables de respuesta fueron: DQO (% remoción), decoloración % y actividad enzimática (lacasa, lignina y manganeso peroxidasa) (tabla 8) (Mongomery, 2000).

El modelo predicho para un diseño de Plackett Burman a dos niveles de selección, codificados como (-1) (+1) se presenta en la tabla 6. El diseño de Plackett-Burman se basó en un modelo de primer orden descrito por la ecuación 7:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i \quad (7)$$

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 10 factores (A-K) a dos niveles de variación, lo que genero un total de 12 tratamientos. Las combinaciones se presentan en la tabla 6 y 7.

Tabla 6. Factores a evaluar en el diseño experimental de Plackett-Burman

Trat.	Concentración (ppm)	pH	T	% inóculo	Cu $\mu\text{mol/L}$	Agitación rpm	Tiempo (h)	Glu (g/L)	N (g/L)	Mn $\mu\text{mol/L}$
1	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-
2	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
3	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
4	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+
5	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-
6	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-
7	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-
8	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+
9	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
10	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+
11	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+
12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 7. Factores evaluados en el Plackett-Burman

Factor	Clave	Nivel Bajo (-1)	Nivel alto (+1)
pH	A	5	8
Temperatura	B	30 °C	50°C
% inóculo	C	1%	5%
Cobre	D	0	150 $\mu\text{mol/L}$
Agitación	E	0	120 rpm
Tiempo	F	6h	12h
Glucosa	G	0	10 g/L
Nitrógeno	H	0	0,5 g/L
Manganeso	I	0	160 $\mu\text{mol/L}$
Concentración de índigo	J	160	220ppm
Variables de respuesta	Decoloración %, Remoción DQO %, LiP (U/L), MnP (U/L), lacasa (U/L)		

Cada tratamiento del diseño se realizó por triplicado, en erlenmeyer de 100mL de volumen total con 50mL de volumen de trabajo. Para poder evaluar los factores que influyeron significativamente sobre las variables de respuesta se realizó un análisis de varianza multifactorial (ANOVA) y un análisis de regresión empleando los programas Desing expert 6.0 y SAS 6.0 para Windows.

Tabla 8. Variables dependientes analizadas durante el diseño experimental y las curvas de remoción en reactor

Parámetro	Técnica	Referencia
Unidades de color	Curva de calibración	
DQO	Reflujo cerrado anexos 5	APHA 2005
pH	Potenciométrica	
Actividad Lacasa	Colorimétrica oxidación del ABTS	Tinoco et al., 2001
Actividad MnP	Colorimétrica oxidación del rojo de fenol	Michel et al., 1999
Actividad LiP	Colorimétrica oxidación del veratril alcohol	Tien y Kirk 1988

5.5.2 Diseño experimental de paso ascendente/descendente

De acuerdo con los resultados obtenidos en el diseño de Plackett Burman se tomaron los factores que tuvieron un efecto significativo sobre las variables de respuesta, para realizar un segundo diseño experimental denominado pasos de ascensos/descensos. Con esta prueba se buscó mejorar la respuesta de las variables dependientes haciendo ajustes solamente para dos factores; siendo la velocidad de agitación y la adición de glucosa los que se valoraron al generar tres ascensos y tres descensos. Los experimentos se realizaron por triplicado realizando el mismo tipo de montaje, inóculo y residual que para el diseño Plackett Burman. Las variables dependientes fueron DQO, porcentaje de decoloración y actividad enzimática (tabla 8 y 9).

Tabla 9. Diseño experimental de paso ascendente/descendente

Tratamiento	Concentración ppm	pH	T (°C)	% in	Cu SO ₄ μMol/L	Agitación rpm	Tiempo (h)	Glu (g/L)	N (g/L)	MnSO ₄ μMol/L
11	160	8.0	30	1	0	120	12	10	0	160
Δ1	160	8.0	30	1	0	180	12	7.5	0	160
Δ2	160	8.0	30	1	0	240	12	5	0	160
Δ3	160	8.0	30	1	0	300	12	2.5	0	160

5.5.3 Curvas de remoción a escala laboratorio

Se determinó la remoción del colorante índigo por parte del hongo *Pleurotus ostreatus*, realizando cinéticas a escala laboratorio empleando erlenmeyer's de 100mL con un volumen efectivo de trabajo de 50mL. Se evaluaron las mejores condiciones de operación seleccionadas por medio de los diseños experimentales. En este ensayo se valoraron dos tratamientos; biomasa viable, biomasa inactiva. Se realizaron muestreos cada 3h, 6h, 12h, 24 h y luego cada 24 horas durante 5 días, se midió el porcentaje de decoloración, DQO, pH, actividad enzimática (tabla 7 y 8) y se realizaron barridos uv/vis.

5.5.4 Curvas de remoción a escala banco reactor (1,5L)

Las curvas de remoción se realizaron en un reactor de mezcla completa con control de temperatura, agitación y aireación conformado por dos turbinas Rushton de seis aspas tipo paleta, en un vaso de vidrio con volumen total de 1.5L y con la siguiente configuración geométrica HT= altura total del vaso, HTT= altura tope a tope, HL= altura de liquido en el tanque, DI= diámetro de la turbina,

DT=diámetro total de fermentador: HT=17cm, HTT=25cm, HL=15cm, DI=5cm, DT=10,5cm, cuatro placas deflectoras, con inyección de aire por medio de una flauta ubicada en el fondo del vaso.



Figura 2. Reactor de mezcla completa 1.5L

5.5.4.1 Selección de condiciones de operación para el reactor de un 1.5 litros#

Se realizó un diseño factorial 2^3 , en la tabla 10 se observan los factores y niveles evaluados. La preparación del residual y demás condiciones de operación se mantuvieron fijas de acuerdo con los resultados de los experimentos a escala de erlenmeyer. Las variables dependientes fueron remoción de DQO %, decoloración % y actividad enzimática. Cada reactor se preparó con 1L de agua residual fresca sin esterilizar y se inoculo con el porcentaje de biomasa a evaluar en cada tratamiento. Posteriormente, se tapó el vaso, se conecto al panel de control y se ajustaron los factores como flujo de aire y velocidad de agitación. Los dos sistemas operaron a 30°C por 2 días y al finalizar el tiempo se retiró la totalidad del residual para hacer la separación de biomasa del residual tratado y realizar las determinaciones para color, DQO, pH y enzimas.

Tabla 10. Diseño factorial 2^3 para las condiciones de operación en reactor biológico tipo mezcla completa.

Tratamiento	Factor A Aireación vvm	Factor B % inoculo	Factor C Velocidad de agitación
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
Factores	(-1) 1vvm flujo de aire (+1) 2vvm flujo de aire	(-1) 1% inoculo (+1) 10% inoculo	(-1) agitación 60rpm (+1) agitación 120rpm
Variables dependientes	Decoloración %, Remoción DQO % y actividad enzimática		

Con el fin de evaluar los factores que influyeron significativamente sobre las variables de respuesta, se efectuó un análisis de varianza (ANOVA) y un análisis de regresión empleando los programas Desing expert 6.0, SAS 6.0 para Windows. Tomando como base estos resultados se realizaron las curvas de remoción.

5.5.4.2 Cinética final de remoción en reactor de mezcla completa.

Con las condiciones de operación obtenidas en el factorial 2^3 se realizaron cinéticas de remoción en el reactor de mezcla completa. Este ensayo se valoraron dos tratamientos: biomasa viable o tratamiento biótico y biomasa inactiva o adsorción. El tiempo de estudio fue 120h y se realizaron muestreos periódicos con intervalos de 3 horas en los primero tiempos de muestreo y posteriormente se extendieron a cada 24 horas. Se midió el porcentaje de decoloración, DQO, pH, actividad enzimática, conductividad, azúcares reductores totales, recuento de heterótrofos por la técnica de recuento en placa y barrido uv/vis.

5.5.4.3. Pruebas de tratabilidad con residuales reales provenientes de dos empresas textiles

Para evaluar el potencial de *Pleurotus ostreatus* frente a la decoloración de agua residual real (índigo y dispersos), se realizaron estudios de tratabilidad con biomasa viable e inactiva, mediante un diseño experimental de bloques (tabla 11) a escala de erlenmeyer de 100mL con un volumen de trabajo de 50mL por triplicado con 0,5g en peso húmedo de inculo (1%).

Tabla 11. Diseño experimental de bloques

Tratamiento	Tipo de residual	Concentración del residual (v/v)	Suplemento glucosa g/L
Nivel	Índigo (DENIM) Dispersos y Pigmentos	100%, 80% 100%, 80%	10g/L, 0g/L 10g/L, 0g/L
Variables dependientes	Decoloración %, Remoción DQO %, lacasa (U/L)pH,		

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

6.1. Reactivación de la cepa

Pleurotus ostreatus se reactivó en agar extracto salvado de trigo anexo 1a, el hongo presentó la morfología característica asociada de su género, creció formando micelio algodonoso blanco, con la presencia de anillos concéntricos (figura 1A) microscópicamente se evidenciaron hifas hialinas, esporas cilíndricas y lisas (figura 1B).

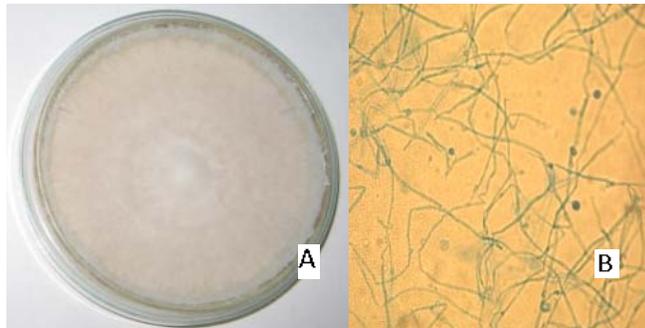


Figura 3. *P. ostreatus* en agar extracto salvado de trigo a 30°C después de 8 días de crecimiento: (A) anverso, (B) reverso.

6.2. Caracterización del colorante (índigo) y estudios de adsorción por la biomasa fúngica

6.2.1. Barrido de adsorción UV/VIS.

Con el fin de determinar la longitud de onda a la cual el índigo preparado en el laboratorio presentó su mayor absorción en el espectro visible se realizó un barrido uv/vis (200nm-800nm) anexo 3. Según reportes, el colorante índigo presenta dicha absorción a una longitud de onda de 610nm (Lakshami et al., 2009). Aunque otros autores como Doralice et al., 2001 reportaron que la determinación se realizó en longitudes de onda diferentes (580 y 680nm). Realizada la exploración en el rango UV/ VIS, se encontró que la longitud de onda en la region visible con mayor absorción fue a 667nm. Posteriormente se realizó una curva de calibración para el colorante índigo con la finalidad de determinar la concentración del colorante durante el proceso de decoloración esta curva presentó un coeficiente de correlación de 0,99 anexo 4.

6.3. Pruebas preliminares de decoloración en sólido

Por medio de pruebas preliminares de decoloración en agar Rhada se evaluó la concentración de colorante que soporta *Pleurotus ostreatus* sin verse inhibido su crecimiento (120 y 360ppm) (Henaó y Fernández, 2007), a su vez se determinó la concentración de co-sustrato requerida para que el microorganismo active su metabolismo obteniendo % de decoloración satisfactorios al comparar con la resolución 3957.

La cinética se llevó a cabo durante 11 días a 30°C realizando mediciones diarias del crecimiento micelial en mm y decoloración en % asociado a mm del halo de decoloración tomando como

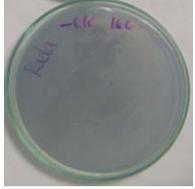
100% de decoloración el diámetro total de la caja 90mm. Se obtuvo un crecimiento total (cubrimiento total de la biomasa dentro de la caja petri) (> 80mm) en aquellos medios con suplemento de glucosa (2g/L) al cabo de 8 días y en aquellos medios sin suplemento, al cabo de 10 días (figura 4, tabla 12). Mediante análisis estadístico (figura 4) de comparación de medias para el crecimiento radial del micelio se encontró que no existen diferencias mínimas significativas entre los tratamientos lo que indicaría que la concentración de colorante índigo no tendría un efecto significativo sobre el crecimiento micelial aunque en los tratamientos sin suplemento de glucosa el micelio fue delgado y poco abundante, mientras que los tratamientos con suplementación de glucosa el micelio fue abundante y aéreo lo que demuestra la necesidad de un co-sustrato en el proceso de decoloración del colorante índigo por medio de *Pleurotus ostreatus*.

En cuanto a la decoloración en medio agarizado mediante análisis estadístico (figura 4) se encontró que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos, se observó un efecto inhibitorio en la decoloración en los medios con elevadas concentraciones del colorante (360ppm) con y sin suplementación de glucosa. Viéndose reflejada en la disminución del porcentaje de decoloración obteniendo no superiores al 70%. Este efecto puede deberse posiblemente al carácter tóxico del colorante y los aditivos que lo acompañan. (Choi et al., 2002; Chang et al., 2004; Mansilla et al., 2010) Reportaron que el colorante índigo se considera de bajo riesgo a concentraciones inferiores a 2.5ppm, posiblemente a concentraciones superiores se pueden presentar efectos genotóxicos en bacterias razón por la cual se puede ver afectada la capacidad decolorante del microorganismo (Mhw, 1993).

Los hongos de la podredumbre blanca metabolizan compuestos complejos (índigo) como única fuente de carbono y energía, pero pueden realizarlo mejor y más rápido si se les aporta un co-sustrato de fácil asimilación como la glucosa (co-metabolismo) (Castillo, 2004; Radha et al., 2004), esto se corrobora con lo obtenido en esta investigación ya que a bajas concentraciones del colorante y con adición de glucosa la decoloración fue superiores al 90%.

Con respecto a la fuente de carbono Khelifi et al., 2010 reportaron que existe una relación directa entre el consumo de sustrato, crecimiento micelial y la decoloración, bajo concentraciones iguales o superiores a 12,5mM (2.25g/L) de co-sustrato (glucosa), comprobando lo obtenido en este estudio donde bajo la concentración de índigo a 160 ppm, se evidenció una decoloración mayor al 90% (figura 4). Donde Esther et al., 2004; Gómez et al., 2008 demostraron que la decoloración, es mediada por la producción de la enzima lacasa, la cual participa en la oxidación del colorante hasta un producto estable como el ácido antranílico (Campos et al., 2001), favoreciendo la transformación del grupo cromóforo anexo 8 responsable del color azul, la enzima MnP, con la degradación de compuestos mono aromáticos como el ácido antranílico, generando una completa mineralización de la estructura del colorante índigo (Husain et al., 2009).

Tabla 12. Fotografías de la decoloración *in vitro* en Radha bajo dos condiciones nutricionales con el hongo *Pleurotus ostreatus*. 30°C, 11 días

MEDIO	Radha con Glucosa y 320 ppm de índigo	Radha sin Glucosa y 320 ppm de índigo	Radha con Glucosa y 160 ppm de índigo	Radha sin Glucosa y 160 ppm de índigo
INICIAL				
FINAL				

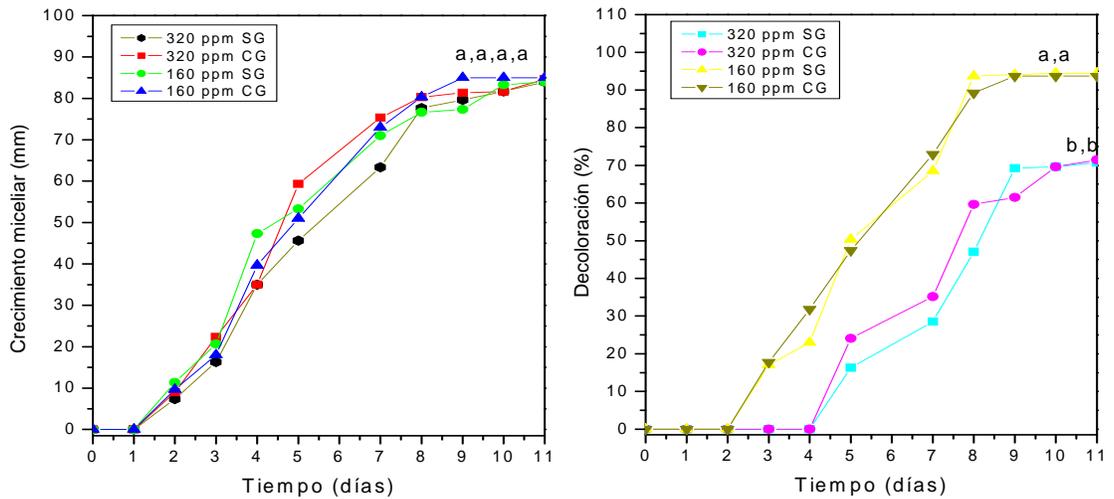


Figura 4. Pruebas preliminares de crecimiento y decoloración en agar Rhada suplementado con índigo. Condiciones 30° C, 11 días, pH 4,5.

6.4. Estudios de adsorción de índigo por biomasa viable e inactiva de *P. ostreatus*.

Estos estudios de adsorción se llevaron a cabo durante 6 y 12 h para biomasa viable e inactiva (figuras 5 y 6), el proceso de inactivación térmica se realizó exponiendo a la biomasa a altas temperaturas de 120°C por 20min permitiendo que la estructura química de la pared fúngica compuesta por quitina y quitosano se expandiera facilitando la adsorción del colorante exponiendo

los radicales como hidroxil, carboxilo, amino, fosfato y sulfhidrilo (Avendaño, 2010) que posee en posición α facilitando la adsorción del colorante (Mandeel et al., 2005).

El comportamiento lineal ver anexo 6 de los datos experimentales al modelo de Langmüir parece indicar que el proceso de adsorción del colorante índigo se produce a través de centros activos homogéneos y energéticamente equivalentes, a su vez este comportamiento indica que el mecanismo predominante en la interacción adsorbente-adsorbato es un mecanismo no competitivo característico para la adsorción de compuestos constituidos por cadenas carbonadas largas, en comparación si los datos hubiesen presentado un comportamiento lineal al modelo de Freundlich indicarían que este proceso se llevaría a cabo mediante adsorbentes con superficies energéticamente heterogéneas. A su vez el comportamiento lineal de las isothermas indicó la formación de una monocapa en la superficie del adsorbente. Los valores altos de adsorción del colorante índigo para la biomasa inactiva es debido posiblemente a el aumento de la masa del adsorbente provocada por el tratamiento térmico impartido a la biomasa generando rompimiento de la forma esférica de esta exponiendo los sitios activos del adsorbente, esto asociado a los mayores requerimientos energéticos $K_1 0,44$ demostrando una mayor afinidad entre adsorbato- adsorbente. Comprobando lo reportado por José et al., 2008 donde se demuestra que a concentraciones bajas de adsorbente menores requerimientos energéticos, en nuestro estudio se puede asumir que la biomasa viable debido a su forma esférica disminuye la exposición de los centros de adsorción generando una adsorción del colorante índigo menor que la inactiva 55mg/g asociado a menores requerimientos energéticos $K_1 0,33$, menor afinidad adsorbato – adsorbente.

Estudios realizados por Savan et al., 2008 comprueban lo obtenido en este estudio donde se evaluaron 3 hongos filamentosos (*Rhizopus arrhizus*, *Trametes versicolor*, *Aspergillus niger*) se les determino la capacidad adsorptiva ante el gryfalan, un colorante compuesto por negro RL-metal, en función del pH, temperatura y concentración del tinte, demostraron un máximo de adsorción para *Rhizopus arrhizus* de 666.7mg/g, en comparación con la de *Trametes versicolor* de 434.7mg/g y *Aspergillus niger* de 416.6mg/g a su vez se obtuvieron contantes de saturación de 1.55, 0.62 y 0.46 (1/mg) respectivamente, observando que para *Rhizopus arrhizus* requiere una mayor energía de interacción, concluyendo que *R. arrhizus* fue el bioadsorbente más efectivo para la remoción de este colorante, esto confirma lo reportado en el presente estudio donde a mayor capacidad de adsorción de la biomasa, mayor energía para adherir el colorante a su pared celular, como en el caso de la biomasa inactiva, la cual se satura con 80mg/g, con un requerimiento energético de $K_1 = 0.44$ (1/mg), en comparación con la biomasa viable con 55,2 mg/g y un K_1 de 0.33 (1/mg).

A pesar de que la prueba refleja una mayor cantidad de colorante removido por la biomasa inactiva tabla 13 , debido posiblemente a un aumento de la superficie de contacto causado por la ruptura de las células durante la inactivación o por la expansión de la estructura de pared fúngica efecto impartido por el aumento de temperatura (Robinson et al., 2001), es de mayor utilidad el uso de biomasa viable debido a que esta realiza una total mineralización del colorante permitiendo una mejora en los procesos de biorremediación de aguas residuales asiéndolos ambientalmente amigables.

Con respecto al pH, el estudio de adsorción inicio con un pH alcalino 8, que favoreció la adsorción del índigo debido posiblemente a la carga ionica de la pared celular del hongo reportada por Maurya et al., 2006 como negativa debido a la naturaleza de los grupos funcionales. Maurya et al., 2006 evaluaron la biosorción de colorantes como azul de metileno y rodamina, usando biomasa inactiva de *Fomes fomentarius* y *Phellinus igniarius* donde evaluó el efecto del pH en el proceso de adsorción,

determinó que al hacer aumentos en el pH de 3 a 11 se favorece la capacidad adsorptiva de la pared fúngica pasando de un 18% a 75% respectivamente para el azul de metileno y del 16 al 79% para la rodamina. Por tal razón la alcalinidad favorece la electronegatividad neta del biosorbente debido a la deprotonación de diferentes grupos funcionales, provocando un aumento de la fuerza electrostática de atracción entre el biosorbente (cargado negativamente) y los iones del colorante (cargados positivamente) (Maurya et al., 2006).

Tabla 13. Valores calculados para los estudios de adsorción según el modelo de Langmuir y Freundlich.

Biomasa	Langmuir			Freundlich		
	$C_{s\max}$ (mg/g)	K_1 (1/mg)	R^2	R^2	n	K_f (1/mg)
Viable	55.2	0.33	0,9903	0,874	5.914	12,07
Inactiva	80	0.44	0,9927	0,788	0.096	2,08

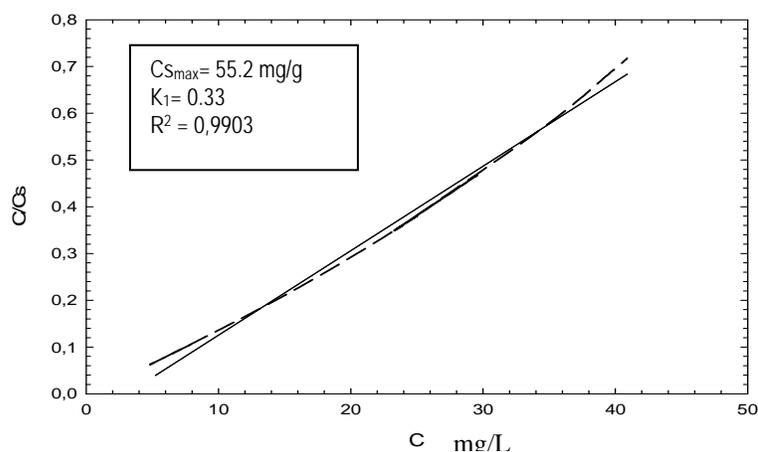


Figura 5. Estudio de adsorción con biomasa viable a 160 ppm de índigo durante 6h temperatura 30°C, pH 8

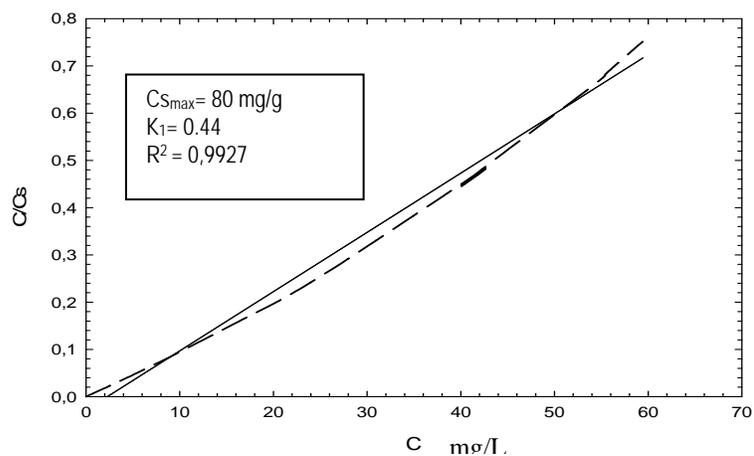


Figura 6. Estudio de adsorción con biomasa inactiva a 160ppm de índigo durante 12h, temperatura 30°C, pH 8.

6.5 Selección de las condiciones de operación a escala de erlenmeyer

6.5.1. Diseño de Plackett Burman

De acuerdo con los resultados del análisis de varianza con un nivel de confianza del 95%, el factor que afectó significativamente las variables de respuesta (decoloración y remoción de DQO) fue la velocidad de agitación en su nivel alto 120 rpm o factor F con un $p=0.0382$ para el porcentaje de decoloración y con un $p=0.0494$ para el porcentaje de remoción de DQO). Por lo tanto las ecuaciones de primer orden que describieron los modelos fueron:

$$DEC = 86 + 0,42 * F(8) \quad DQO = 42,56 + 2,31 * F(9)$$

Dado a que se obtubieron elevados porcentajes de remoción de color y DQO para uno u otro factor en algunos tratamientos, se realizó una comparación de medias para establecer diferencias mínimas significativas entre los 12 tratamientos.

Con respecto de la decoloración, se presentaron diferencias altamente significativas entre tratamientos ($p<0.0001$), siendo 8, 10 y 11 los mejores tratamientos con porcentajes de 86, 96 y 83% respectivamente.

Adicionalmente, con respecto al porcentaje de remoción de DQO, también se observaron diferencias altamente significativas ($p<0.0001$) entre tratamientos. No obstante los tratamientos 11 y 12 entre si no presentaron diferencias ($p>0.0001$) con valores de 88 y 89%, determinando que cualquiera podría ser utilizado.

Con el objeto de seleccionar el mejor tratamiento que permita cumplir, tanto remoción de color como de DQO, y con base en la normativa que rige los vertimientos de las industrias textiles, se analizaron los valores obtenidos para cada parámetro. Así, en los tratamientos 8, 10, 11 y 12 se encontraron valores de decoloración del 86, 96, 83 y 67% y de DQO de 23, 39, 78 y 89% respectivamente (figura 7).

Teniendo en cuenta esto, se observó que si bien unos tratramientos presentan altos porcentajes de remoción para un parámetro, para otro no, por esta razón se determinó que el tratamiento a elegir era el 11 el cual presentó valores decoloración del 83% con una remoción de DQO de 78%. Con respecto a la actividad enzimática para este tratamiento los resultados obtenidos fueron de 21.1 U/L Lacasa y 0.13 U/L para LiP (figura 7). Determinando que la remoción del colorante índigo se favoreció cuando se utilizó una concentración inicial de 160 ppm de colorante, pH inicial de 8, 30°C, sin adición de cobre, 120rpm, 12h, 10g/L de glucosa, sin suplemento de nitrógeno y 160 μ Mol/L de MnSO₄.

Tomando como referencia estos factores, en cuanto a la concentración inicial del colorante (160ppm) se corroboró, lo obtenido en la prueba de decoloración en sólido, que no presentó toxicidad sobre el crecimiento celular y su metabolismo a bajas concentraciones (Hazrat, 2010) aunque que a altas concentraciones (320ppm) generó un efecto tóxico al microorganismo por tal razón la concentración de 160ppm facilitó el proceso de degradación por *P. ostreatus*. Por otro lado, el pH 8.0 inicial disminuyó alcabo de las 48h de tratamiento hasta un valor de pH 4 el cual está dentro de lo pH óptimo de actividad de la enzima lacasa pH (4-6) (Abadulla et al., 2000), tiempo en el cual se obtuvo una remoción de color de (83%), para el tratamiento 11, resultados que coinciden con los obtenidos

por Sarnthima et al., 2009 donde evaluaron la decoloración del colorante índigo carmín indicando con un pH 9 por medio de *Lentinus polychrous* lo que nos demuestra que pH alcalinos entre (8-9) no inhiben la actividad enzimática de la lacasa (Solís, 2005). Ahora bien, el pH disminuye debido posiblemente al efecto del metabolismo del co-sustrato (glucosa) por medio de la glicólisis, produciendo ácidos orgánicos, ácido pirúvico y ácido láctico entre otros, los cuales generan cambios en el pH de la solución mejorando así la degradación del índigo. Efecto que se comprueba con lo obtenido por Gomez et al., 2000; Gómez et al 2008, donde evidenciaron que la disminución en el pH favoreció la actividad enzimática ya que éstas enzimas presentan sus pH óptimos en rangos de acidez (Sarnthima et al., 2009).

Ahora bien, la adición de glucosa como co-sustrato, facilitó la remoción del colorante ya que los hongos de podredumbre blanca requieren tiempos prolongados cuando utilizan los colorantes como única fuente de carbono y energía (Hernández, 2004; Karuppuchamy y Jeong, 2005; Hussein, 2008), transformándolo ya que actúa como un sustrato de crecimiento alternativo (co-metabolismo) (Castillo, 2004 y Radha et al., 2005). Cuando la glucosa es utilizada como sustrato para el crecimiento, una concentración mínima de 2g/L es necesaria para que el hongo mantenga su capacidad de decoloración ya que cuando el microorganismo emplea el colorante como única fuente de carbono al cabo del tiempo produce enzimas proteolíticas que pueden degradar las enzimas ligninolíticas, por tal razón la adición de glucosa inhibe la proteasa y activa la ligninasa, indicando que la glucosa produce una represión catabólica sobre la proteasas, esto es muy importante ya que dependiendo de la interacción de la proteasa es posible aumentar el tiempo de degradación de las enzimas ligninolíticas (Harald, 2004), a su vez en este estudio los niveles altos de remoción se vieron favorecidos por las concentraciones altas de glucosa (concentraciones mayores de 10g/L) dado que la adición de glucosa favorece el metabolismo del microorganismo aumentando su capacidad de decolorar en cuanto a tiempo de remoción, efecto que se ve representado en el tratamiento 11 que tenía una adición de 10g/L donde se obtuvo una decoloración de 83% en 48h (figura 7) comparado con el tratamiento 6 que no contenía glucosa con una decoloración de 31% en 48h donde tenía como única fuente de carbono y energía el colorante índigo. Anjaneyulu et al., 2005 y Kandelbauer y Guebitz, 2005 encontraron que existe cierta correlación entre la secreción de enzimas ligninolíticas por *Pleurotus* spp, y la decoloración de aguas residuales, además de la existencia de otros sistemas enzimáticos como peroxidasas que contribuyen a la reducción del color degradando compuestos mono aromáticos permitiendo así la completa mineralización de los colorantes por medio de los hongos de pudrición blanca (Prachi y Anushree, 2008).

La temperatura es un factor fundamental en la producción de enzimas y la decoloración por parte de *Pleurotus ostreatus*, aunque se reportan diferentes temperatura óptimas para la biodegradación, dependiendo de la estructura del colorante.

En el caso particular de índigo se obtuvo una temperatura óptima de decoloración de 30°C (Hazrat, 2010). Que se debe probablemente al tipo de sustrato presente (índigo), que activa diferentes sistemas enzimáticos responsable de la decoloración como lo indican (Lestan et al., 1994; Kirby et al., 2000; Kunz et al., 2001).

Este comportamiento es factible ya que los colorantes presentan diferentes estructuras químicas cambiando así la ruta de metabolización para cada uno de ellos. Esta afirmación puede explicarse por la diferencia existente entre las temperaturas óptimas a la cuales las enzimas tienen mayor actividad. Cuando las temperaturas de crecimiento son elevadas puede afectarse la producción de enzimas debido en parte a los costos excesivos de energía necesaria para el remplazo de moléculas

inactivadas por el calor que debe realizar el microorganismo produciendo una disminución en la decoloración como se puede observar en la figura 7 los tratamientos 1, 4, 6 realizados a temperatura de 50°C con porcentajes de decoloración de 18, 21, 32% comparado con los tratamientos 5, 10, 11 realizados a 30°C con porcentajes de decoloración de 62, 96, 83% (Limura et al., 1996; Mendoza et al., 2000; Martinez et al., 2011; Chávez et al., 2007).

Por último, la agitación (120rpm) favoreció la decoloración debido a que se mejora la transferencia de oxígeno del medio hacia la célula y la distribución de nutrientes en comparación con los cultivos estáticos donde los microorganismos son capaces de decolorar pero en tiempos prolongados (Hazrat, 2010). Al comparar la actividad de lacasa entre el tratamiento 11 (agitado) y 5 (estático) con valores de 21.1U/L, con 83% de decoloración en 48h y 98.93U/L, con 62% de decoloración en 48h lo que indica que en cultivos estaticos a pesar de tener una actividad enzima elevada requiere de tiempos prolongados para una completa decoloración. Como lo obtenido por Prachi y Anushree, 2008 quienes demostraron que para decolorar el colorante azul reactivo – 25 por medio del microorganismo *A. ochraceus* en cultivos estacionarios se emplearon 25 días comparado con 20 días para sistemas agitados.

En cuanto a la actividad enzimática, se generó una disminución de la misma cuando el cultivo se encontró en agitación, en contraste con la actividad obtenida en el cultivo estático. Este efecto inhibitorio de la agitación frente a la actividad enzimática puede deberse posiblemente a que el oxígeno presente aumenta dentro del medio de cultivo al cabo de las 48h de tratamiento favoreciendo la actividad de las proteasas del hongo y disminuyendo la actividad de las ligninasas como lo reporta Dosoretz et al., 1990. Resultados similares fueron obtenidos por Novotny et al., 2004 donde estudiaron el efecto de la agitación en la actividad de las enzimas ligninolíticas encontrando que en cultivos estáticos la máxima actividad enzimática de MnP, Lac y LiP fue de 76, 2 y 1.1 U/L, mientras que en cultivo agitado, la máxima actividad fue de 0.2, 1 y 0 U/L respectivamente al cabo de 120h (Chávez et al., 2007).

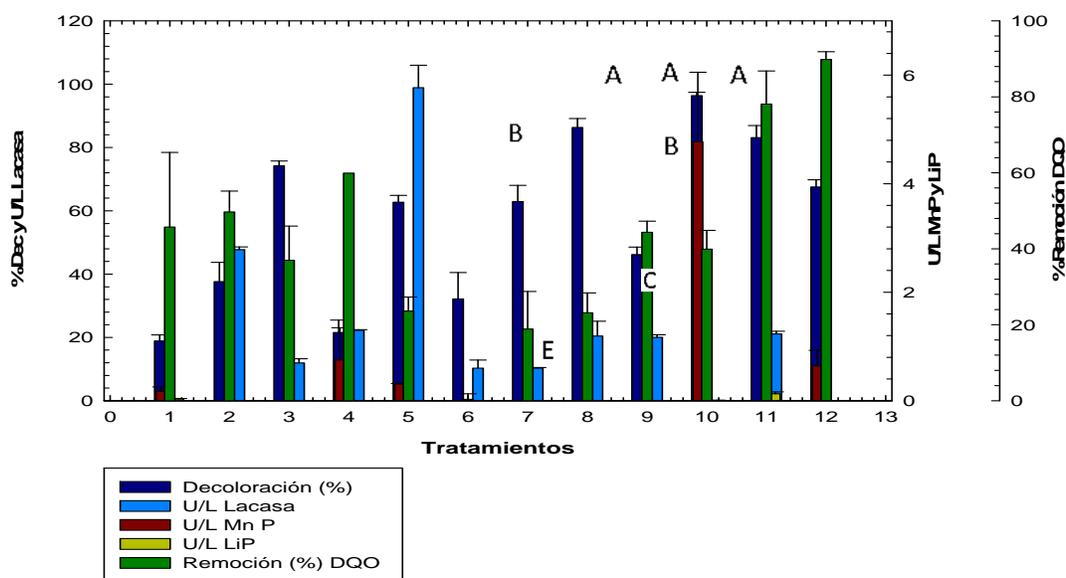


Figura 7. Diseño experimental Plackett Burman 48h.

De esto se puede inferir que la lacasa no tiene una estrecha correlación con la decoloración y la remoción de DQO aunque en sus valores bajos puede generar la disminución del tamaño de las moléculas más complejas (colorante) facilitando la decoloración y la remoción de la DQO, otro factor que favoreció la remoción en el tratamiento 11 es la adsorción del colorante a la pared fúngica proceso característico de los hongos de la podredumbre blanca, de igual forma la decoloración se pudo favorecer posiblemente a la presencia de otras enzimas no cuantificadas en el proceso que pueden estar asociadas en la degradación de colorantes de una manera indirecta: glioxal oxidasa (E.C. 1.2.3.5) superóxido dismutasa (E.C. 1.15.1.1) las cuales producen H_2O_2 que contribuyan a la oxidación del índigo (Mielgo et al., 2002; Martínez et al., 2011; Ozturk y Kaikara, 2005; Mouso et al., 2007)

6.5.2. Diseño experimental de paso ascendente/descendente

Este diseño experimental tenía como objetivo evaluar los factores con efecto significativo sobre las variables de respuesta (decoloración y remoción de DQO), para esto, se evaluó la máxima velocidad de agitación y la mínima concentración de glucosa que mostrara la máxima remoción de color y DQO con respecto al punto central.

Tomando como referencia el diseño experimental Plackett Burman, se seleccionó el tratamiento 11, el cual se operó bajo las siguientes condiciones: Concentración inicial de índigo a 160 ppm, pH 8.0, 30° C, 1% de inóculo, 120 rpm, 10g/L de glucosa, 160 μ Mol/L de $MnSO_4$. El tratamiento 11 es el punto central a partir del cual se calcularon los deltas ascendente y descendentes.

A partir de la formulación mencionada, se realizaron 3 ascensos con delta de 0.5 para el factor significativo (agitación) y 3 descensos con delta de 0.25 para la glucosa el criterio para la toma de decisión en cuanto a los ascensos en la agitación fue debido a que en el diseño experimental Plaket Burman se evidenció un efecto significativo en la revoluciones altas, para los descensos de la glucosa el criterio fue tomado por decisión no estadística, con el fin de evaluar si a concentraciones menores, se mantenía o mejoraba el proceso de remoción (color y DQO), tratando de limitar o anular la suplementación del agua residual sintética, evitando que a futuro esta suplementación limitara la viabilidad del tratamiento.

Con respecto a la decoloración, con un nivel de confianza del 95%, se evidenciaron diferencias altamente significativas ($p < 0.0001$) entre los tratamientos formulados y a su vez, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.0001$) entre el punto central y el primer ascenso/descenso (77.96 y 76.88%) y el segundo y tercer ascenso/descenso (56.63 y 57.69%) (figura 8) esto quiere decir que entre grupos de a dos no existieron diferencias mínimas significativas encontrando que en el punto central se obtuvo la mejor decoloración.

En cuanto a la remoción de DQO, con una confianza del 95%, se evidenciaron diferencias altamente significativas ($p < 0.0001$) entre los tratamientos formulados y a su vez, no se encontraron diferencias significativas ($p > 0.0001$) entre el punto central y el tercer ascenso/descenso (51.23 y 48.83%) (figura 8). Lo que indica que para la remoción de DQO tanto el punto central como el tercer ascenso puede ser factible para la remoción. Determinado que el punto central presentó los valores más altos en cuanto actividad enzimática (96U/L a 120rpm – 11U/L a 330rpm). Teniendo en cuenta lo anterior, un ascenso en la velocidad de agitación en rpm podría generar un efecto inhibitorio de las ligninasa favorecido por las altas concentraciones de

oxígeno el cual incrementa la producción de proteasas degradadoras de las enzimas ligninolíticas. Por otra parte en la decoloración no se observaron efectos significativos en los aumentos de la agitación en comparación con el punto central determinando que los costos de operación resultan ser más favorables en el punto central.

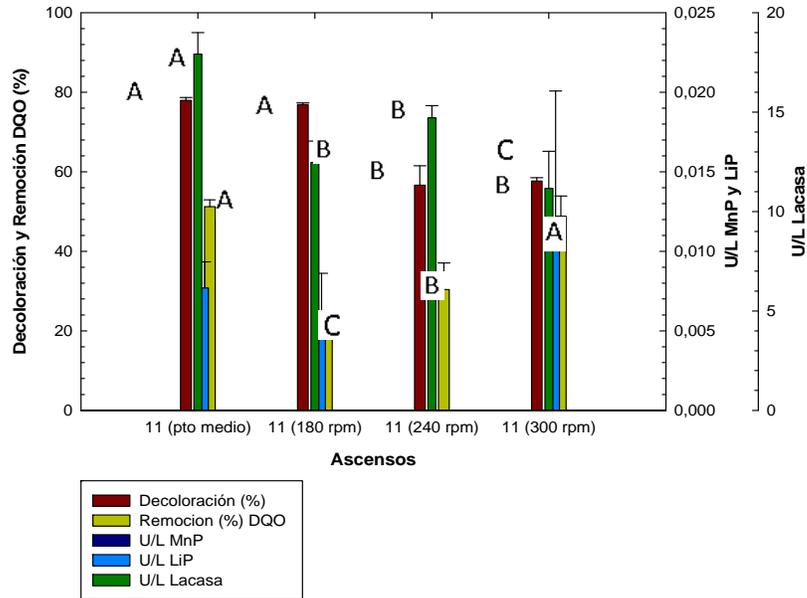


Figura. 8 Diseño experimental de paso ascendente/descendente. Condiciones: índigo a 160 ppm, pH 8.0, 30°C, 1% de inóculo, 120 rpm, 10g/L de glucosa, 160 μ Mol/L de $MnSO_4$, 48h.

6.6. Cinética de decoloración de índigo a escala de laboratorio

6.6.1. DQO y decoloración

Como uno de los parámetros de evaluación en la remoción de compuestos persistentes en efluentes industriales, se determinó la demanda química de oxígeno, lo cual mostró un valor estimado del contenido de materia orgánica presente en la muestra de análisis, iniciando para los tratamientos con 71380mgO₂/L lo que sería aportado por: colorante índigo, dispersante, hidrosulfito de sodio y la adición inicial de glucosa, según la normatividad vigente se encontró en más de un 100% por encima de los límites de vertimiento permitidos (1500mgO₂/L), siendo un gran contaminante de los cuerpos de agua a los cuales puede ser depositado.

Teniendo en cuenta el grado de contaminación, se hace indispensable el tratamiento fúngico, ya que debido a la transformación del colorante (Campos et al., 2001; Peiro, 2003; Pirkaniem y Sillanpää, 2002) y al consumo de co-sustratos presentes en el agua de tratamiento, se favorece la reducción del color, el contenido de materia orgánica y de los compuestos aromáticos presentes detectados en el rango uv anexo 3.

Según se ha reportado en la literatura, la decoloración de un efluente mediante degradación biológica está estrechamente relacionada con la remoción de DQO ya que esta mide la cantidad de sustancia susceptible de ser oxidadas ya sean disueltas o en suspensión presentes en la

muestra (Trujillo y Valdez, 2006), de lo que puede inferirse que gran parte de la carga orgánica degradada por el hongo es aportada por compuestos coloreados, tensoactivos y el hidrosulfito de sodio para los tratamientos sin adición de glucosa iniciando con una DQO 7867mgO₂/L obteniendo un 35% de remoción para biomasa viable y un 15% para biomasa inactiva encontrándose aun por encima de los requerimientos de la resolución, para los tratamientos con adición de glucosa se observó un aumento considerable en la DQO inicial 71380mgO₂/L debido a la presencia de la glucosa, encontrando que para estos tratamientos se obtuvo una remoción del 62%.

En cuanto a decoloración, se evidenció un aumento progresivo a través del tiempo, encontrando una remoción de 88% para biomasa viable y 23% para biomasa inactiva al cabo de 48 horas de evaluación (figura 9), observando diferencias altamente significativas ($p < 0.0001$) entre los tratamientos evaluados, demostrando que la biomasa viable fue más eficiente que la inactiva.

En este estudio se evidenció que la mayor remoción de color y DQO se dio durante los primeros días de la cinética donde se observó que dentro de las 24 y 48h de tratamiento se obtuvieron los valores máximos de remoción, en cuanto a la actividad enzimática se evidencio actividad de la enzima lacasa al cabo de la hora 3 teniendo su máxima actividad a la hora 6 con 4,21U/L, resaltando que en el transcurso de los dos primeros días de seguimiento, presentó una correlación positiva significativa entre estos 3 factores ($p = 0.012$).

De esto se puede inferir que la lacasa jugó un papel significativo en el proceso de decoloración de colorante índigo ya que este sirvió como inductor para su actividad dentro de las primeras horas de las 0 - 6h de tratamiento pasando de 0 - 4,21U/L, a su vez se observo en la (figura 9) un aumento progresivo en la decoloración pasando de 0-52%, efecto que favoreció la disminución de la concentración del material biológico disuelto o en suspensión del residual viéndose reflejado en la disminución en la DQO 0-48%.

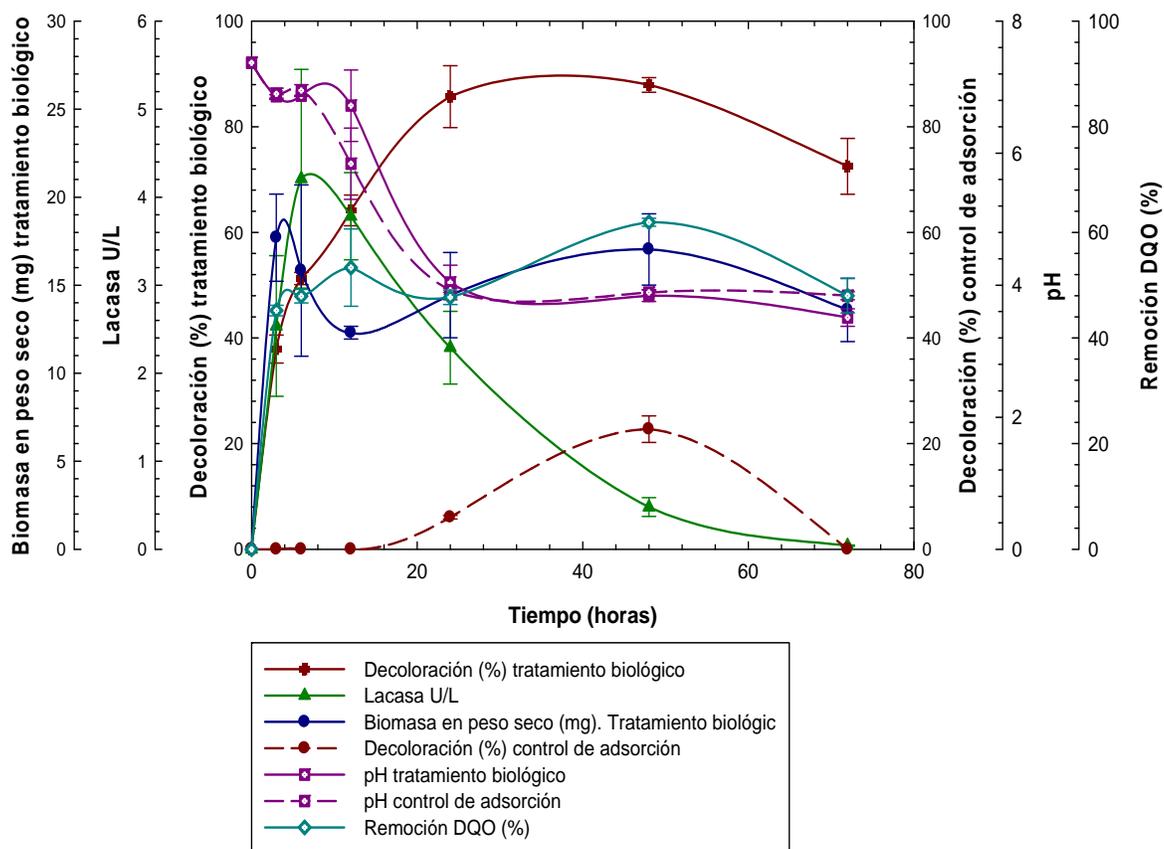


Figura 9. Cinética de remoción a escala erlenmeyer para biomasa viable e inactiva. Condiciones de experimentación Índigo a 160ppm, pH de 8, a 30°C, 120rpm, durante 3 días

6.6.2. Biomasa y pH.

El pH tubo una disminución en el tiempo pasando de pH 8 - pH 3 esta disminución en el pH es debido posiblemente a la producción de ácidos orgánicos provenientes del metabolismo del colorante mediada por la ruta de los ácidos tricarbóxicos ruta característica de los hongos de la podredumbre blanca para la degradación de la lignina (Yuzhu y Viraraghavan, 2001; Rancano et al., 2003; Asgher et al., 2008).

La biomasa tubo un aumento significativo a partir de las 12 horas de tratamiento pasando de (0,017mg -12 mg de biomasa en base seca) mostrando un máximo registro (17mg de biomasa en base seca) al cabo de 48 horas (figura 9). Este incremento es debido a que los hongos de la podredumbre blanca tienen la capacidad de degrada colorantes por medio de mecanismos adsortivos anexo 9, efecto evidenciado por el color presente en la biomasa al cabo de los 3 días de experimentación, a su vez este incremento se favoreció por el crecimiento de el hongo debido a que uso durante las primeras horas una fuente de carbono de fácil asimilación como la glucosa,

posteriormente empleo el índigo como fuente de carbono y nitrógeno evidenciado mediante la expresión enzimáticas de las peroxidasa y polifenoloxidasas.

6.6.3. Cuantificación de enzimas.

Durante la cinética se realizaron mediciones de las enzimas lacasa, manganeso peroxidasa (MnP) y lignina peroxidasa (LiP) en cada tiempo de muestreo, obteniendo valores máximos de 4.21 U/L, 0.05 U/L y 0.02 U/L respectivamente (figura 10).

Según Morales y Ruiz, 2008 cuando la glucosa es utilizada como sustrato para el crecimiento, una concentración mínima de 2g/L es necesaria para que el hongo mantenga su capacidad de decoloración, en este estudio se determinó que los niveles más altos de remoción se obtuvieron a concentraciones altas de glucosa (concentraciones mayores de 10g/L) en nuestro estudio dentro de la primeras horas 0 – 6h alcanzando su valor máximo a la hora 6, etapa en la cual existió una mayor disponibilidad de nutrientes, a su vez una mayor producción de lacasa 4.21U/L.

Como se aprecia en la figura 10, se evidencia que la lacasa es excretada en estadios tempranos del crecimiento del hongo, participando de modo indirecto en la decoloración de estos residuos. Al cabo de la hora 6 se evidenció una disminución en la actividad de lacasa debido a que se pudo inhibir su actividad posiblemente por medio de sustancias quelantes como el dispersante (cecanol) empleado en la preparación de colorante, varios autores reportan que la presencia de estos agentes quelantes disminuyen en un 20% la actividad de la enzima, a su vez por el aumento en la concentración de oxígeno dentro del medio impartido por la agitación de 120rpm, y por la obtención de metabolitos secundarios producidos en la degradación de colorante índigo (Abadulla et al., 2000; Pazarliog et al., 2004; Parshetti et al., 2007).

Anjaneyulu et al., 2005; Kandelbauer y Guebitz, 2005 estos autores evaluaron la decoloración de *Pleurotus spp* frente a colorantes azoicos donde encontraron que existe una estrecha correlación entre la producción de la enzima lacasa y la decoloración de este tipo de colorantes, además demostraron la existencia de otros sistemas enzimáticos como la citocromo P-450 o peroxidases que contribuyen a la reducción del color, de esta manera se demuestra la utilización de este y otros hongos de pudrición blanca como organismos para el tratamiento de efluentes coloreados (Manzano et al., 2004).

La producción de lacasa está directamente relacionada con la cantidad de biomasa producida ya que es un metabolito secundario, producido por *Pleurotus ostreatus* al igual que en otras especies de *Pleurotus* reportadas por Castillo, 2004 para este microorganismo la lacasa no es regulada por condiciones limitantes de nutrientes, pues cantidades suficientes o en exceso estimulan esta actividad al igual que la producción de biomasa. En contraste con otros hongos ligninolíticos en los que la actividad ligninolítica se expresa e incrementa en concentraciones limitantes de nutrientes en el cultivo, (ej. las actividades lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa de *Phanerochaete chrysosporium*). Se evidenció un comportamiento similar de la actividad lacasa en estudios con hongos de pudrición blanca productores de lacasa-manganeso peroxidasa (Solís, 2005).

La lacasa ha sido empleada para fines ambientales debido a la capacidad de degradar compuestos xenobióticos y recalcitrantes como los HPA y pesticidas (Knapp et al., 1995; Kandelbauer y Guebitz, 2005; Levin et al., 2004; Kaushik y Malik, 2009). Esta enzima es ampliamente utilizada en el tratamiento de residuos, el mayor uso está en la industria de pulpa y papel, donde su inclusión en el

pulpeo ha sido seleccionada como una de las mejores alternativas industriales (Maurya et al., 2006), además de la degradación de tintes o colorantes textiles (Campos et al., 2001; Mandeel et al., 2005). Esta enzima tiene la ventaja de no requerir la adición de peróxido de hidrógeno como co-factor, y en muchos trabajos ha estado correlacionada su actividad con la degradación de compuestos tóxicos y colorantes textiles.

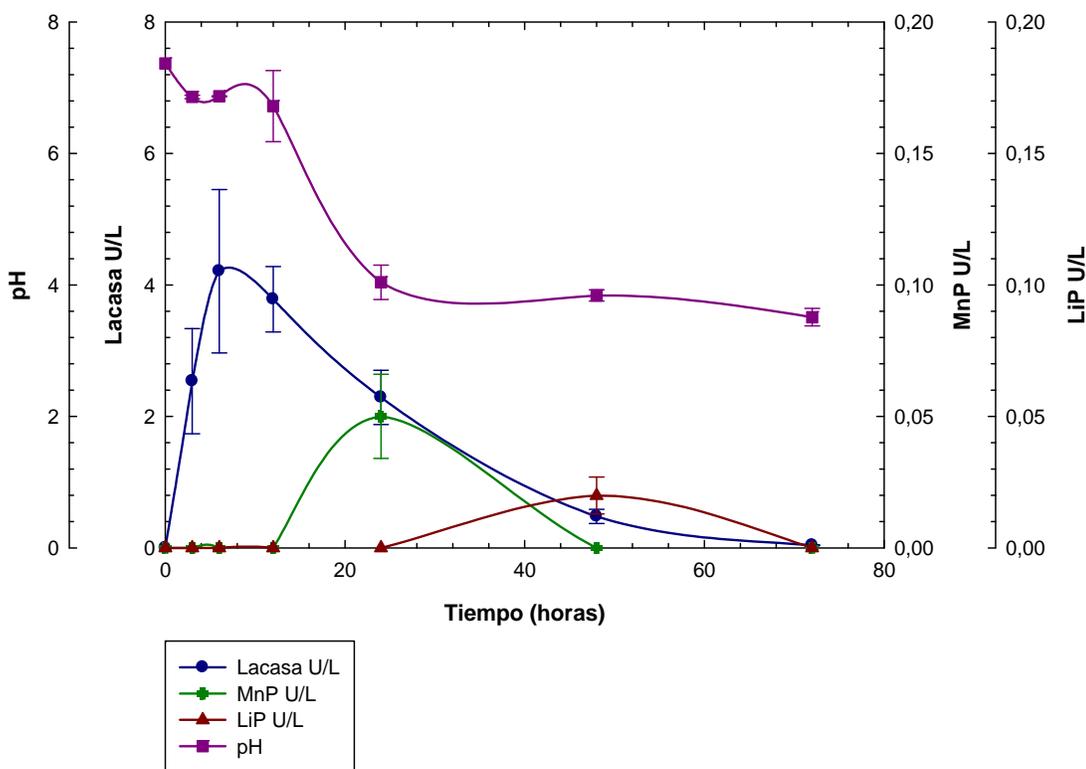


Figura 10. Perfiles de la producción de enzimas (Lac, MnP y LiP) y pH a través del tiempo. Índigo a 160ppm, pH de 8, a 30°C y 120rpm, durante 3 días

6.6.4. Barridos UV /Vis

Al realizar el barrido UV/VIS (200-800nm) (figura 11) para la confirmación del proceso de degradación del índigo, se encontró que a través del tiempo, el pico característico de este colorante (entre 600 y 700nm) disminuyó, simultáneamente aparecieron varios picos en el rango ultravioleta sugiriendo que hubo una posible transformación de este en nuevos productos. Teniendo en cuenta que uno de los subproductos es el ISA, y que este tiene su longitud de mayor adsorción a 235nm (Kandelbauer y Guebitz, 2005) se puede atribuir a los picos formados a partir de las 24h en los ensayos con biomasa viable e inactiva (figura 11). Por otro lado, el ácido antranílico, absorbe a una longitud de onda aproximada de 240nm al igual que el ácido pícrico.

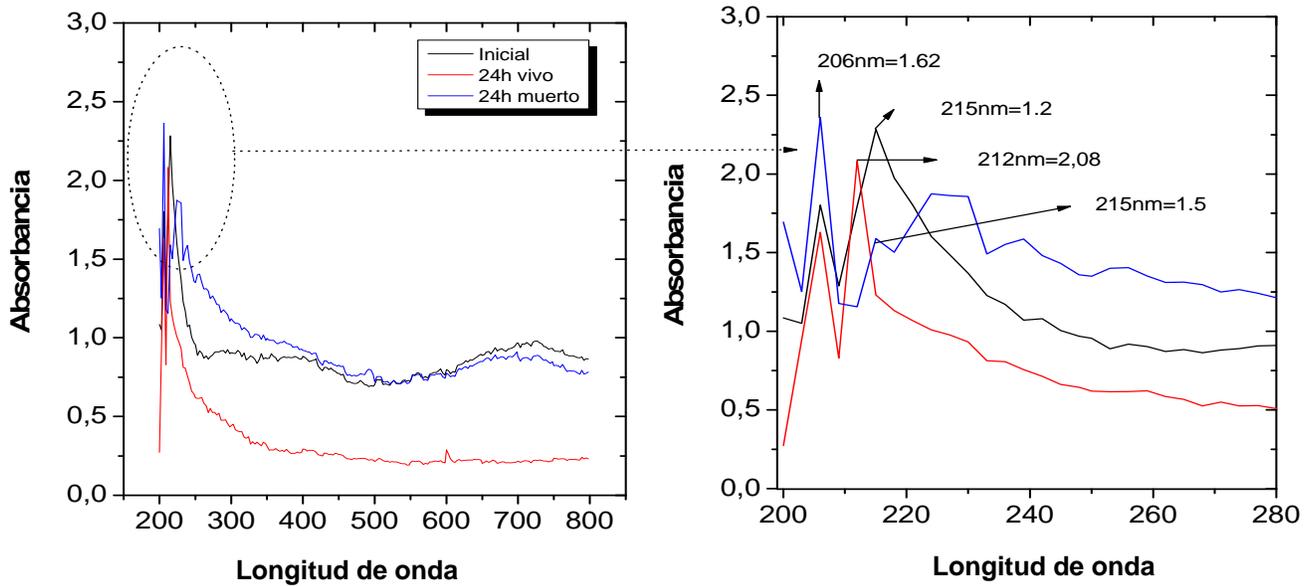


Figura 11. Barrido UV/VIS del colorante inicial y de la cinética a las 24h para biomasa viable e inactiva.

6.7. Curvas de remoción a escala de banco (1,5 L)

6.7.1. Selección de condiciones de operación para el reactor de un 1.5 litros factorial 2^3

Con la finalidad de evaluar los factores que tienen un efecto significativo a escala banco reactor de mezcla completa se realizó un diseño experimental factorial de 2^3 , teniendo como factores independientes (flujo de aire, % inoculo y velocidad de agitación) a dos niveles, teniendo como variables de respuesta (% remoción de color, % remoción de DQO y actividad lacasa).

Los coeficientes de correlación (R^2) obtenidos para la interacción entre la decoloración y remoción de DQO fueron 99% y 98% respectivamente demostrando que los datos experimentales correlacionan bien con el modelo encontrado (ecuación 10 y 11) ($p < 0.0001$). A su vez se demostró por medio de un análisis de varianza multifactorial con interacciones entre factores que la (aireación, % inoculo y velocidad de agitación) en sus niveles altos favorecen la decoloración (57%) y remoción de DQO (97%) a las 48 horas (2 días) de tratamiento inoculando 10% de biomasa viable (100g en peso húmedo), con 2vvm de aireación (21% de oxígeno) y con 120rpm de agitación.

$$\text{Decoloración...}(\%) = 46.7 + 5.5A_1 + 29.9B_1 - 5.8C_1 + 15AB + 0.14AC - 15.1BC + 11.6A_1B_1C_1 \quad (10)$$

$$\text{Remoción DQO...}(\%) = 46.11 + 1.41A_1 - 2.08B_1 + 9.06C_1 - 0.95AB + 6.77AC - 0.16BC + 3.22A_1B_1C_1 \quad (11)$$

Los resultados obtenidos concuerda con los datos reportados por Zhao et al., 2007 para *Pleurotus ostreatus* donde este hongo es sometido a remover colorantes como naranja disperso 3 y amarillo disperso 3, bajo condiciones de 200ppm a 30°C obteniendo 57% de remoción de color al cabo de 5 días con 150rpm de agitación, en nuestro estudio de obtuvo un 57% de remoción de color al cabo de 48h, la razón posible por la cual se alcanzaron porcentajes de decoloración en menor tiempo es debido a que el colorante índigo posee una estructura química de mas fácil degradación, de igual manera la decoloración se favoreció debido a que la concentración inicial de colorante índigo es de 160ppm menor que la evaluada por el autor. Afirmándose así, lo reportado por Zeroual et al., 2006; Kumari y Abraham, 2007 donde en sus estudios demostraron que el porcentaje de decoloración se ve afectado inversamente a los aumentos en la concentración del colorante inicial. En nuestro estudio se observó que el aumento en la agitación (60rpm – 120rpm) y aeración (1vvm- 2vvm) favorecieron el porcentaje de decoloración y la remoción de DQO en sus valores altos, debido a que existo una mejor transferencia de oxígeno, y se mantuvo la mezcla homogénea favoreciendo así la mejor asimilación de nutrientes por el hongo y manteniendo expuestos de manera homogénea los sitios activos de las enzimas involucradas en la decoloración. Rigas y Dritsa, 2006 reportaron que aumentos significativos en la agitación afectan favorablemente la decoloración, en su estudio evaluaron el porcentaje de decoloración del colorante Remazol en proceso estacionario y lo compararon con el proceso agitado obteniendo porcentaje de decoloración de 50%–93% respectivamente. Parshetti et al., 2007 evaluaron el efecto que tiene la agitación sobre el tiempo de reacción por medio de la decoloración del colorante azul reactivo-7 por medio de *A. ochraceus*, donde evaluaron la decoloración con biomasa viable o inactiva bajo condiciones de agitación y estacionarias, obteniendo que para la biomasa viable se obtuvo una total remoción a condiciones agitadas empleando 7h comparado con 15h en sistema estacionario, para la biomasa inactiva se obtuvo decoloración para el sistema agitado al cabo de 20 días y para el estacionario 25 días. Con esto se evidencia que la agitación tiene efectos positivos para la remoción de color debido a que se mantiene homogénea la mezcla exponiendo todos los sitios activos del microorganismo facilitando la adhesión del colorante a la pared fúngica permitiendo la biotransformación.

Con respecto a la actividad lacasa los tres factores (flujo de aire, % inoculo y velocidad de agitación) por separado tuvieron un efecto significativo ($p < 0.0001$, $p < 0.0001$ y $p = 0.0023$), al igual que la interacción de los mismos ($p = 0,0002$), donde se encontró que la actividad lacasa se favoreció por la aireación y velocidad de agitación en sus niveles altos y bajos. Demostrando que la mayor actividad se obtuvo en los tratamientos 2, 6 y 8 con valores de (10, 5, 31) UL/L. La ecuación que describe el modelo es la ecuación 10 se obtiene como resultado de la prueba anova la cual genera los valores del intercepto, los coeficientes para cada factor por separado y las interacciones, el propósito de generar la ecuación polinómica que representa la actividad enzimática es evidenciar el signo que precede cada coeficiente de cada factor o sus interacciones para determinar si dicha actividad se ve afectada por los valores bajos o altos del factor.

$$\text{Actividad.Lacasa.} \left(\frac{U}{L} \right) = 47.2 + 30.09A_1 - 20.7B_1 - 6.8C_1 - 29.85AB + 2.7AC - 1.3bBC + 10.2A_1B_1C_1 \quad (12)$$

Estos tratamientos poseían condiciones en común de 2vvm de aireación, los tratamientos 6 y 8 tenían (10% de inoculo, agitación de 60rpm y 120 rpm respectivamente), el tratamiento 2 tenía 1% inóculo con agitación de 60 rpm, donde se determinó para los tratamientos 6 y 8 valores de 5 y 31U/L lacasa, se infirió que la agitación tiene un efecto significativo favoreciendo la producción de la

enzima lacasa. Lo que comprobado con el estudios realizados por Pedroza et al., 2010 donde se afirma que ligeros cambios en la velocidad de agitación produce aumentos moderados sobre la producción de lacasa claro está que estos aumentos en la agitación deben ser moderados con la finalidad de no llevar al microorganismo a condiciones de estrés, produciendo un efecto contrario al deseado.

Pedroza et al., 2010 reportaron que la aireación es el principal limitante en la producción de lacasa. De igual manera en esta investigación la actividad enzimática se vio favorecida por los valores altos de aireación correspondientes a 2vvm debido a que en el reactor es posible mantener controlada la aireación (concentración de oxígeno dentro del reactor) condición que favoreció la producción de lacasa ya que a altas concentraciones de oxígeno en el tiempo podrían activar la producción de proteasas que inhiben a las lignino peroxidasas.

Adicionalmente se realizó un análisis de correlación de variables para el tratamiento 8 y se estableció que existe una correlación positiva altamente significativa ($p < 0.0001$) entre decoloración y remoción de DQO. Demostrando que las dos están estrechamente relacionadas y que el colorante aporta al agua sintética parte de la DQO.

La actividad lacasa (EC 1.10.3.2), se correlacionó en menor proporción con la DQO y la decoloración ($p = 0.04$) posiblemente porque esta enzima no es la única implicada en la decoloración, de igual manera pudo deberse a que la biomasa participó activamente como adsorbente y adicionalmente otras enzimas que no fueron cuantificadas pudieron estar presentes como glioxal oxidasa (E.C. 1.2.3.5) su peróxido dismutasa (E.C. 1.15.1.1) las cuales producen H_2O_2 que contribuyeron a la oxidación del índigo (Sandoval, 2005, Sedarati, 2003, Tavares et al., 2009).

Se determinó por medio de un diagrama de bloques que el mejor tratamiento que favoreció las variables de respuesta % de remoción de DQO, porcentaje de decoloración y producción de lacasa es el tratamiento 8 (figura 12) encontrando que las condiciones más favorables para la remoción de colorante índigo por medio de *P. otreatus* fueron (2vvm, 120 rpm, pH 8, 10% de inóculo correspondiente a 100gr de biomasa húmeda, 30°C, adición de 10g/L de glucosa y 160 $\mu\text{Mol/L}$ de MnSO_4 , con un tiempo de reacción de 48h, bajo estas condiciones se obtuvieron resultados de (57% b) en remoción de DQO, (97% a) de decoloración, (31 UL/L d) lacasa (figura 12). De igual manera se realizaron barridos uv/vis entre 200nm-800nm para comprobar la disminución del pico característico del colorante índigo y poder así analizar los tratamientos más y menos favorables anexo 9.

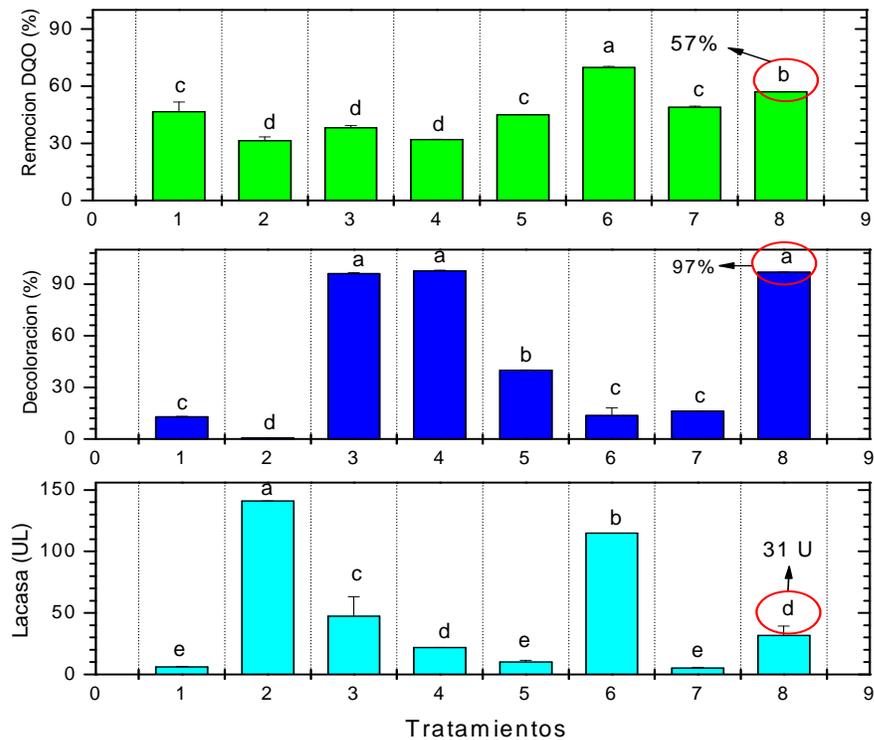


Figura 12. Diseño experimental Factorial 2^3 en reactor.

6.7.2. Evaluación de las variables del proceso de decoloración del colorante índigo en reactor

Conociendo las condiciones de operación del reactor de mezcla completa se realizaron estudios tanto con biomasa viable e inactiva para determinar a esta escala la condición de biomasa más favorable para el tratamiento del residual, a su vez determinar el tiempo de mayor remoción de color y DQO, evidenciando el comportamiento en el tiempo de: los azúcares totales, conductividad y pH, de igual manera se realizaron recuentos de heterótrofos (inicial y fina) y viabilidad de la biomasa fúngica al finalizar las curvas. De esta manera se analizó el comportamiento de *P. ostreatus* a escala banco (1L) en reactor de mezcla completa durante el tiempo. El agua sintética tratada presentó las siguientes características de entrada: pH 8, unidades de color 4011UC, conductividad (11,77mS/cm), DQO 24804mg/L, azúcares totales 12g/L y recuento de heterótrofos totales 20ufc/mL (1,3 log₁₀ ufc/mL). Las colonias predominantes pertenecían a bacilos Gram positivos y Gram negativos.

6.7.3. Remoción de color y DQO.

En las cinéticas con biomasa viable, el porcentaje de decoloración se fue incrementando gradualmente hasta alcanzar su valor máximo entre las 24 y 48 horas con 91 y 94% (320 y 250UC), posteriormente se presentó un proceso de desorción del colorante remanente determinando que el porcentaje disminuyera y el agua adquiriera nuevamente color azul verdoso. Considerándose que la mayor decoloración se alcanzó entre estos dos intervalos de muestreo, se determinó que el tiempo de retención debía ser de 24 horas para evitar tener el agua por 1 día más e incrementar la decoloración en un 3%. Adicionalmente, al comparar los resultados con lo exigido por la resolución

3957 de la SDA, las unidades de color obtenidas con 24 horas de tratamiento fueron de 320, donde en dilución 1/20 efectivamente cumplen con los límites de vertimiento (50 UC en dilución 1/20).

Con respecto a la remoción de DQO en función del tiempo los dos experimentos iniciaron con 24804mg/L, la cual fue aportada por el colorante (carbono y nitrógeno) y la adición del co-sustrato (glucosa). En el reactor con biomasa viable se observó un descenso gradual de la DQO hasta obtener un máximo de 4960mg/L (85%) a las 24 horas con posterior disminución, siendo muy similar a lo que ocurrió con la decoloración. Pese a que se obtuvieron porcentajes de remoción altos a las 24 horas este valor aun continua estando por encima de los límites de vertimiento que deben ser igual o menores que 1500mg/L. Lo que deja abierta la inquietud con respecto a un estudio posterior que permita evaluar el efecto de la disminución del co-sustrato para encontrar el valor mínimo sin que afecte el metabolismo primario del hongo y permita alcanzar valores iguales o mejores que los obtenidos en este experimento. Siendo un buen punto de partida iniciar la suplementación de carbono con solo 8691mg/L de glucosa.

Al realizar una correlación entre variables se observó que para la decoloración y la remoción de DQO, en porcentaje se presentó una correlación positiva significativa entre las dos para las primeras 24 horas de tratamiento ($p=0.0009$), demostrando que las dos están relacionadas con la capacidad de remoción de *Pleurotus ostreatus* el cual pudo actuar por medio de la capacidad de adsorción que tiene la biomasa fúngica, y por la producción de enzimas favorecida por el consumo de la fuente de carbono sencillas que benefició el metabolismo del hongo.

Con respecto a los experimentos con biomasa inactiva para la decoloración y remoción de DQO, se observó que también tienen capacidad de remoción pero fue inferior, alcanzando valores de 46% y 19% respectivamente, entre las 12 y 18 horas de tratamiento. En las siguientes horas de proceso se presentó variabilidad en los resultados para los dos parámetros sin que fueran superiores a los obtenidos en las primeras horas de experimentación. Al analizar el comportamiento de los tratamientos se pudo establecer que la biomasa viable es la mejor alternativa para tratar el agua residual sintética con presencia del colorante índigo.

Las razones por las cuales la biomasa viable se comporta mejor se podrían relacionar con los dos mecanismos propuestos durante el estudio. El primero hace referencia a la adsorción de colorante a la biomasa fúngica, proceso que es de tipo físico - químico y no asociado al metabolismo fúngico. Esta etapa se da en las primeras horas de proceso, no genera una transformación completa y puede estar fuertemente influenciada por el pH de la solución. Una vez el colorante es adsorbido se empieza a generar las transformaciones del colorante a través de reacciones ligadas al metabolismo.

La transformación bioquímica se pudo favorecer gracias a que *in vitro* se simuló una condición ligninolítica (mayor relación C/N) similar a la que este hongo tiene cuando está en hábitat natural creciendo sobre árboles altamente lignificados. En el presente trabajo esta relación se generó por la presencia del colorante que aporta carbono y nitrógeno, y la adición del co - sustrato. Con estos ajustes nutricionales la cepa activó tres sistemas bioquímicos: Ligninolíticos, generador de peróxido y asimilación de azúcares con producción de ácidos orgánicos. La acción combinada de los tres permitieron que se obtuviera carbono y energía para el metabolismo primario con inducción paralela de las enzimas ligninolíticas que llevaron a cabo la oxidación del índigo por sustracción de electrones a nivel del grupo cromóforo ó en los anillos aromáticos, sin poderse considerar como una mineralización completa a partir de la cual el hongo obtiene carbono directamente. Razón por la cual se ve una disminución en la absorción de colorante en el espectro visible más marcada con la

biomasa viable que con la biomasa inactiva (Castillo, 2004; Moreno et al., 2009; Titus et al., 2004; Martínez et al., 2011). La actividad ligninolítica fue comprobada de manera indirecta experimentalmente ya que la actividad metabólica se evidenció mediante el consumo de glucosa pasando de 10g/L a 6,5g/L al cabo de las 120h de tratamiento, a su vez como subproductos del metabolismo se obtienen ácidos carboxílicos efecto comprobado por medio de la acidificación del medio pasando de pH 8 a pH 5,8, la biodegradación del colorante índigo se evidencio mediante la disminución del pico característico en el rango visible representado en los barridos uv/vis (figura 15) y el incremento de los aromáticos destacados en el rango visible (uv) efecto determinante de un ataque nucleofílico de los anillos aromáticos, de igual manera la biotransformación del colorante se evidenció por el aumento en la actividad de la enzima lacasa pasando de 0 a 866 U/L al cabo de 24h

Por otro, lado la asimilación y metabolismo de azúcares por rutas como glucolisis y ciclo de ácidos tricarboxílicos. Generaron la disminución de pH de 8,3 a 5,8 en (24 horas) y 3,3 (5 días) favoreciendo el proceso adsortivo. Esta tendencia permite inferir que se produjeron ácidos orgánico como oxálico, cítrico, málico, entre otros, los cuales cumplen un papel fundamental en la regulación de la actividad enzimática ya que la literatura reporta que los valores óptimos de actividad para ligninasas están entre 4.5 y 5.5. Adicionalmente, los ácidos pudieron participar como quelantes del Mn^{+3} , permitiendo que actúen como agentes fuertemente oxidantes de compuestos aromáticos en zonas ajadas de la influencia de las hifas.

Esto resultados comparados con los obtenidos por Eltaief et al., 2009 donde estudiaron la decoloración del colorante índigo por medio de *Aspergillus alliaceus* se obtuvieron porcentajes de decoloración de 98,6% al cabo de 9 días demuestran que en comparación con los obtenidos en nuestro estudio las 24 horas y 48 horas es el tiempo más que suficiente para obtener 91 y 94% de remoción de color (320 y 250UC). De igual manera Doralice et al., 2001 estudiaron la decoloración de colorante índigo por medio de diferentes microorganismos como *Phellinus gilvus*, *Ph. Chrysosporium*, *Py. Sanguineus*, *Pl. sajor-caju*, obteniendo porcentajes de decoloración de (100% en 4 días, 75% en 4 días, 91% en 4 días, 94% en 4 días) respectivamente. Sarika et al., 2009 realizaron un estudio donde se evaluó la decoloración del colorante índigo por medio de 8 basidiomicetos codificados (PHC, PYC, RCK-1, RCK-2, RCK-3, RCK-4, RCK-5, RCK-6) su estudio se realizó por un tiempo de 192h obteniendo porcentajes de decoloración (81.3, 95.7, 97.8, 98.4, 99.2, 17.1, 34.2, 89.3) respectivamente para cada una de la cepas demostrando que la decoloración del colorante índigo empleando *Pleurotus ostreatus* donde se obtienen porcentajes de decoloración altos en tiempos más cortos comparados con lo reportado por la literatura posiblemente debido a el tipo de microorganismo empleado en la decoloración. Sarika et al., 2009, demostraron que existe una estrecha correlación entre la decoloración y la producción de lacasa obteniendo correlaciones de (No determinado, 0.99, 0.99, 1.00, 0.99, 0.96, 0.99, 0.99) para cada una de las cepas donde se demuestra que la acción decolorante para el colorante índigo está estrechamente relacionada con la producción de lacasa por medio de hongos basidiomicetes.

Sahoo y Gupta, 2005 evaluaron la decoloración de colorante índigo por medio de la enzima lacasa comercial donde se evidenció una decoloración del 95% al cabo de 72h, de igual manera se evaluó la disminución de la DQO se encontró que pasadas las 72h aun los valores para este parámetro continuaban altos. Lo que concuerda con los resultados obtenidos en este estudio evidenciando una decoloración exponencial dentro de las 0-72h con un 94% de máxima decoloración, por otro lado la disminución de la DQO fue de 19% para biomasa inactiva y 85% para la biomasa viable, en concentración la DQO para biomasa viable fue de 4960mg/L y con biomasa inactiva de 7320mg/L encontrándose aun altos para cumplir con la resolución (1500mg/L), la baja disminución de este

factor se debió posiblemente a que durante el proceso oxidativo de la lacasa con el colorante índigo solo se dan rompimiento de enlaces quedando aún compuestos aromáticos, motivo por el cual podría existir una alta concentración de materia orgánica durante la decoloración del índigo.

Para la cinética con biomasa inactiva el tiempo de reacción fue de 120h (5 días) a 120rpm, 30°C, 2vvm 10% de inóculo (100g de biomasa húmeda), la biomasa fue inactivada a 120°C, 15psi de presión por 20min, en la (figura 13) se puede observar que la disminución en el pH afecta positivamente el proceso de decoloración debido a que estas variaciones en el pH generan cambios en las cargas de la superficie de la pared fúngica efecto significativo en la decoloración. Por tal razón se observó que en las primeras horas existió un aumento significativo de la decoloración favorecido por el pH 8.0 condición inicial del colorante índigo comparado con lo reportado por Tauber et al., 2005 y Ullah et al., 2000, donde reportaron que la mayor adsorción se da dentro de las horas 2 y 3 alcanzando así las condiciones de equilibrio. En nuestro caso particular se obtuvo la máxima adsorción al cabo de las 48 Horas observándose un aumento exponencial entre las horas (0-48) alcanzando así el equilibrio de adsorción, de igual manera comparado con lo obtenido por Bayramo et al., 2005, donde reportaron que la mayor adsorción para el fenol y el 2, clorofenol por medio de *F.trogii* demuestran la influencia que tienen los aumentos en el pH donde se evaluó la adsorción entre pH's 2-11 encontrando que su máxima adsorción se obtuvo entre pH 8-9 favoreciendo así las interacciones entre los grupos funcionales de la pared fúngica (OH) y el colorante (Cl), de igual manera lo obtenido por Parshetti et al., 2008 donde se estudiaron el proceso adsortivo del fenol por medio de *Lesso nianigrescens* Bory y *Macrocystisintegrifolia* Bory, este estudio se baso en el efecto que tuvo el pH inicial sobre el proceso adsortivo encontrando que la adsorción se incrementa a pHs básicos.

Abdula et al., 2000 reportaron que el proceso de inactivación por aumento de temperatura (autoclavado) favoreció significativamente la adsorción al igual que lo reportado por Bayramoglu y Arica, 2007 donde observaron un aumento en la capacidad adsortiva para *Trametes versicolor* en el proceso de remoción del colorante azul directo 1 con una concentración inicial de colorante de (800mg/L), incrementando la capacidad adsortiva pasando de 10.1mg/g a 152.3mg/g, de igual manera lo obtenido por Wu et al., 2005 donde evaluaron la capacidad adsortiva del colorante rojo congo por medio de *T. versicolor* con una concentración de colorante 50mg/L obteniendo capacidades de adsorción de 42.35mg/g para biomasa viva, 46,09mg/g para biomasa auto-clavada, y 26,16mg/g y 2,42mg/g capacidad adsortiva con biomasa inactivada con procesos químicos (Rancaño et al., 2003; Romero et al., 2006.).

Para el proceso de biodegradación del colorante índigo el pH inicial jugó un papel importante en la decoloración ya que debido la disminución en el pH se favoreció la producción de enzimas ligninolíticas. Parshetti et al., 2007 reportaron en su estudio que se obtiene una completa decoloración del colorante azul reactivo- 25 con (100mg/L) de concentración inicial de colorante, por medio de *A. ochraceus* a pH de 5.0 de igual manera en este estudio se realizaron análisis de remoción a diferentes pH entre 3,7 y 9 obteniendo porcentajes de decoloración de 87%, 81% y 70% respectivamente (Ha et al., 2001)

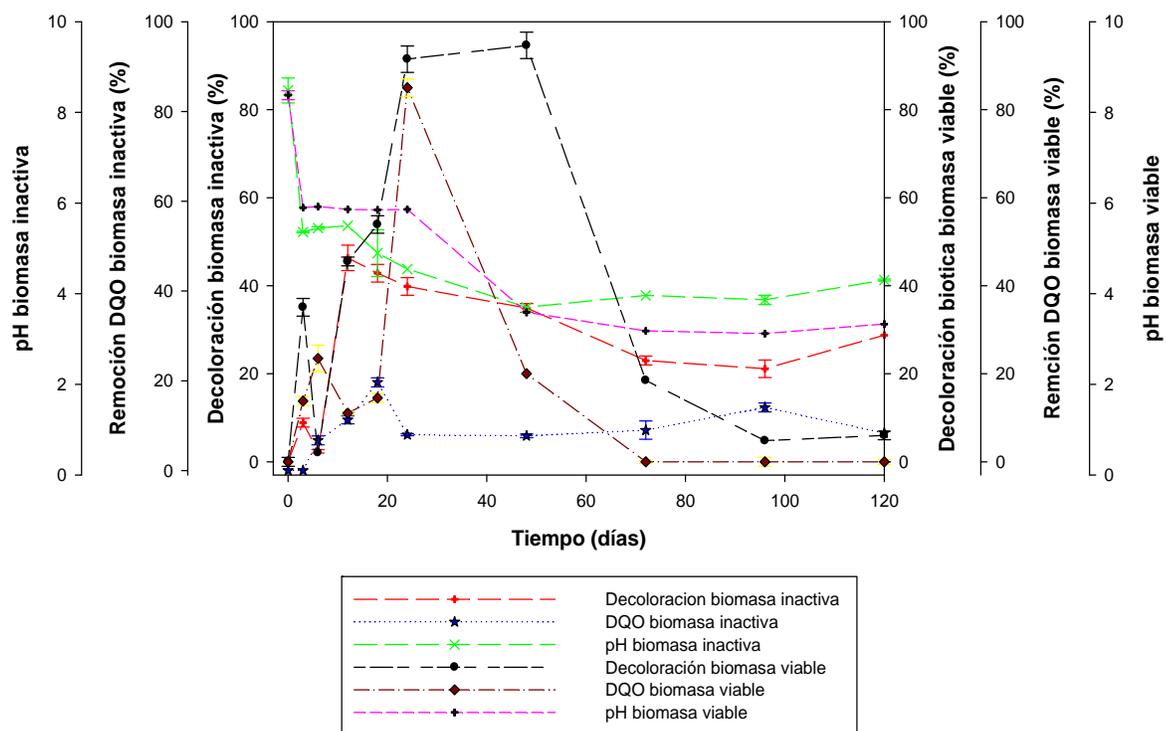


Figura 13. Decoloración, remoción de DQO y pH para la biomasa viable e inactiva. Condiciones de operación: 5 días, pH, 8, 120 rpm y 2 vvm.

6.7.4. Conductividad y pH

Se ha reportado que la oxidación del índigo, esta mediada por la enzima lacasa (EC 1.10.3.2), donde por sustracción de dos electrones se oxida a dihidroíndigo y por sustracción de 4 electrones se oxida completamente a isatín, que posteriormente con una hidrólisis se convierte en ácido antranílico, producto final de la oxidación (Campos et al., 2001, Wang et al., 2002).

Con base en esto se observa que durante el proceso de decoloración por medio de biomasa viva, una notable disminución del pH que partiendo de pH 8,4 paso a 3,36, resaltando que esta disminución drástica del pH es debida a la formación de subproductos mencionados anteriormente obtenidos a razón del metabolismo del *P. ostrearius* ya que el mecanismo enzimático tiene pH óptimo entre (5 y 6). Por esta razón la conductividad tiende a bajar entre las horas (3-18h) partiendo de una conductividad de 11,77mS/cm a 3.36mS/cm (figura 14), se comprueba que la conductividad se ve afectada por el pH dado que a pH ácidos disminuye este factor, resaltando que en la hora 24 en la cual se obtuvo una mayor decoloración y remoción de DQO el pH es de 5,86 encontrándose dentro de los parámetros permitidos por la resolución que son pH (5-9), corroborando que la hora 24 es la más adecuada para el proceso evaluado.

Por otro lado para la biomasa inactiva se observan disminuciones menos drásticas en el pH pasando de (8 a 5) esta disminución es atribuida a la presencia de bacterias heterótrofas comprobada

mediante el aumento de la concentración de las mismas en el tiempo pasando de 1,2 a 3,5 Log10ufc/mL, bajo estas condiciones de biomasa la remoción del índigo es llevada a cabo netamente por la adsorción del colorante a la pared fúngica de igual manera la conductividad mostró leves disminuciones pasando de 11,77mS/cm a 10,71mS/cm al cabo de la hora 6 (figura 14) dado a que las disminuciones en el pH no fue tan drástica, posteriormente se observaron incrementos y descensos que no sobre pasan los 10,26mS/cm al cabo de la hora 96. Por esta razón se puede inferir que la biomasa viable coopera no solo en la disminución de la remoción del color y DQO sino también en la disminución de la conductividad aunque los datos obtenidos en esta investigación no cumplan con los parámetros de reúso de agua residual al proceso de teñido 1000µS/cm (Erkan et al., 2008).

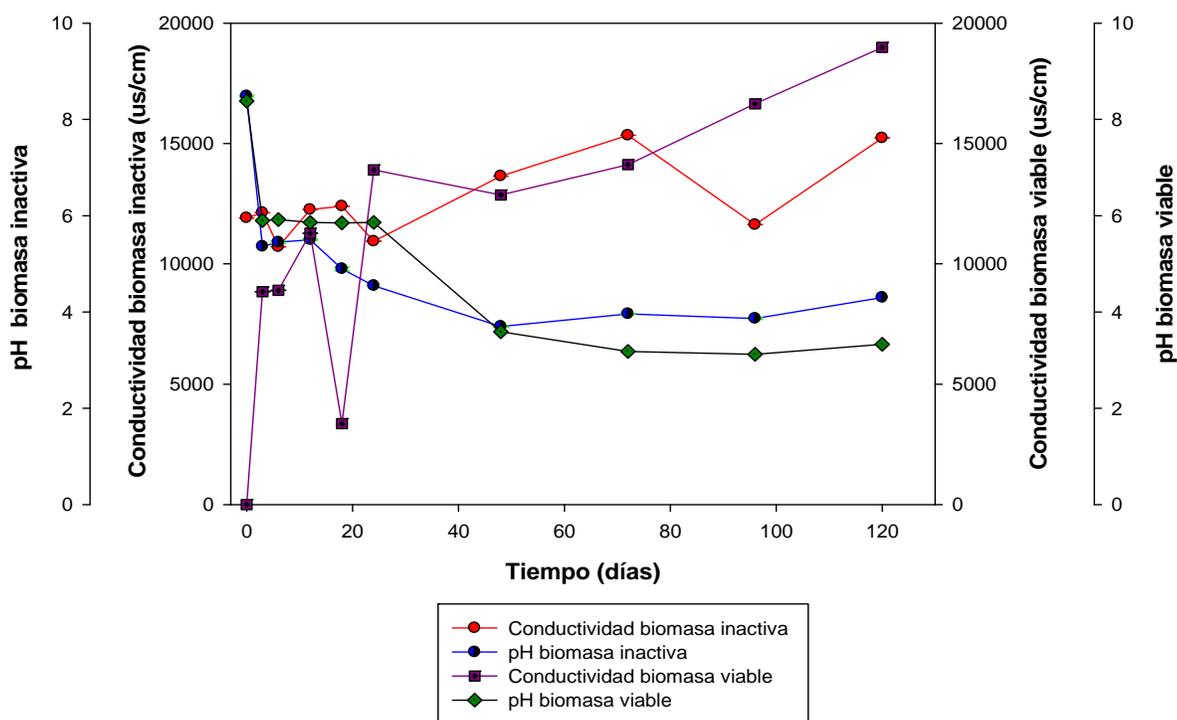


Figura 14. Cambios de pH y conductividad durante la cinética. Condiciones de operación: pH 8, 120rpm y 2vvm, 5 días

6.7.5. Actividad enzimática, pH y azúcares totales

La actividad de la enzima lacasa incrementó en las primeras horas de muestreo, presentándose una fuerte inducción hasta las 24 horas (866U/L), valores que se correlacionan con la decoloración y remoción de DQO para estos mismos intervalos de muestreo. Los resultados permitieron evidenciar que el colorante efectivamente realizó una inducción de la enzima dadas sus características de aromaticidad similares a los anillos de fenil propano que conforman la lignina. Un resultado muy interesante obtenido en este estudio es que la enzima lacasa fue inducida y actuó eficientemente bajo unas condiciones de alcalinidad, ya que el pH del agua inicial era de 8,2 y a medida que transcurrió la cinética fue disminuyendo hasta llegar a un valor de 5,8 en el tiempo de mayor

actividad lacasa. Esto demuestra que la enzima lacasa producida por *P. ostreatus* fue estable en rango amplios de pH siendo un resultados opuesto a lo que reportan diferentes autores como (Abadulla et al., 2000; Rancano et al., 2003; Pedroza et al., 2010; Fernández et al., 2009). Esto deja abierta la posibilidad de emplear el hongo y su proteína catalítica en aguas residuales con pHs fuertemente alcalinos y coloreados aun no siendo reportados.

Tanto en los experimentos con biomasa viable e inactiva se presentó una disminución en la concentración de azúcares reductores totales (glucosa), siendo más marcada en el tratamiento con biomasa viable, durante las primeras 24 horas de tratamiento. Tendencia que confirma la necesidad de una fuente de carbono sencilla para llevar de manera paralela la transformación del colorante por las ligninasas. Adicionalmente, parte del consumo de azucares fue llevado a cabo por las poblaciones de heterótrofos presentes en el agua residual sintética en los dos experimentos ya que al cuantificarlas a los 5 días se observó un incremento notorio en los dos tratamientos mostrando ser más marcado en los experimentos con biomasa viable.

Otro parámetro que se relacionó con el consumo del azúcar fermentable fue el pH, el cual fue disminuyendo en los dos reactores hasta dejarlo en el rango de $5,8 \pm 0,2$ a las 24 horas de tratamiento. Los hongos de podredumbre blanca son organismos heterotróficos que asimilan la glucosa por la ruta de Embden Meyerhof Parnas para dejar como intermediario el piruvato, el cual posteriormente ingresa al ciclo de los ácidos tricarboxílicos y por último a cadena respiratoria para formar ATP. Las bacterias acompañantes posiblemente también comparte el mismo tipo de metabolismo por esta razón se observó consumo y acidificación en los reactores con biomasa inactiva. Aunque el consumo es un poco menor en estos reactores, lo que podría relacionarse con un posible efecto adverso del colorante sobres estas poblaciones que si bien no las inhiben si les genera una disminución en el crecimiento ya que a los 5 días los recuentos fueron de 3, 4 unidades logarítmicas, 50 veces menor que los obtenidos en los reactores con biomasa viable.

En el presente trabajo se utilizó la glucosa como co-sutrato (10,1g/L) para el sistema biótico, se midió el comportamiento de los azucares totales en el tiempo por medio de la técnica DNS (Miller, 1959) encontrando que disminuye en el transcurso de las 120h (5días) del experimento. Hofritcher, 2002; Swamy y Ramsay, 1999 estudiaron el comportamiento de la decoloración del color Amaranta por medio de *Trametes versicolor* y encontraron que la glucosa disminuía en el tiempo, de igual manera realizaron la adiciones de 5g/L de glucosa cada 15 días para realizar un proceso continuo de decoloración, demostrando que se hace necesaria la adición de glucosa para que el microorganismo active su capacidad decolorante en el tiempo.

De igual manera la producción de lacasa se favoreció con la disminución del pH ya que esta enzima tiene pH óptimo entre (5 -6) (Yuxin et al., 2002; Khlifi et al., 2010), lo que se puede observar en este rango de pH en la (figura 15) en el intervalo de tiempo (0- 40h) se obtuvo la máxima producción de enzima al igual que una disminución en la concentración de azucares reductores en conjunto con la disminución de pH, evidenciando la acción metabólica de *P. ostreatus*.

Generalmente la adición de una fuente de fácil degradación como la glucosa es necesaria para que los hongos activen su metabolismo frente al proceso de decoloración de colorantes como el índigo. Zourari et al., 2002 centraron su estudio en la evaluación de la adición de co - sustratos de fácil degradación por lo hongos de la podredumbre blanca con viabilidad económica ya que la glucosa es costosa y no viable a nivel industrial, este autor demuestra que la adición de un co- sustrato favorece la decoloración del colorante azul turquesa G por medio de *C. versicolor* donde evaluó la

decoloración sin co - sustrato, pasando de 65% en 9 días 92% en 9 días , confirmando una vez más que la adición de un co - sustrato favorece la decoloración.

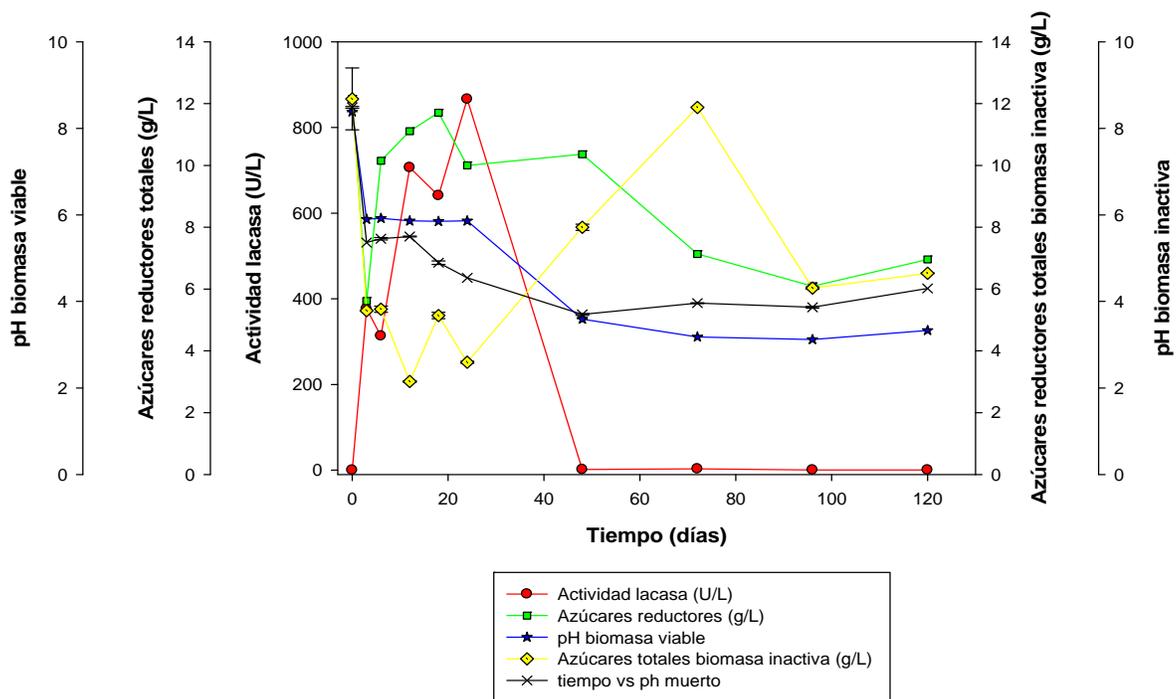


Figura 15. Lacasa, azúcares reductores y pH. Condiciones de operación: 5 días, pH 8, 1200 rpm y 2 vvm.

6.7.6. Barridos UV/VIS

Mediante barridos uv/vis se evidenció el comportamiento de la decoloración tanto para sistema biótico y abiótico (figura 16). Para el sistema abiótico el área bajo la curva del pico representativo para el colorante índigo es de 0,76 luego de haber pasado del proceso de adsorción el área bajo la curva disminuyó a 0,650, donde se puede observar que los tiempos de mayor remoción de colorante están dentro de las (24-48h), al igual que el comparado con el proceso biótico (biomasa viva) se obtienen disminuciones elevada pasando a 0,106 área bajo la curva del pico característico del colorante índigo, en este sistema igualmente se evidencia que las horas con mayor remoción de color son las (24-48h), donde se puede observar (figura 16) el aumento del área bajo la curva de 0,71 a 1.6 para el pico de 260nm para los dos sistemas tanto biótico como abiótico, demostrando la aparición de subproductos obtenidos durante el proceso de decoloración, es conocido que durante la degradación de índigo se obtienen posiblemente los siguientes compuestos perteneciente al ácido insatín 5 sulfónico el cual tiene una longitud de onda de 235nm, y el pico característico de 260nm de los grupos *p*-dinitrobenceno (Eugene, 1990; Gursharan et al., 2007) (figura 16).

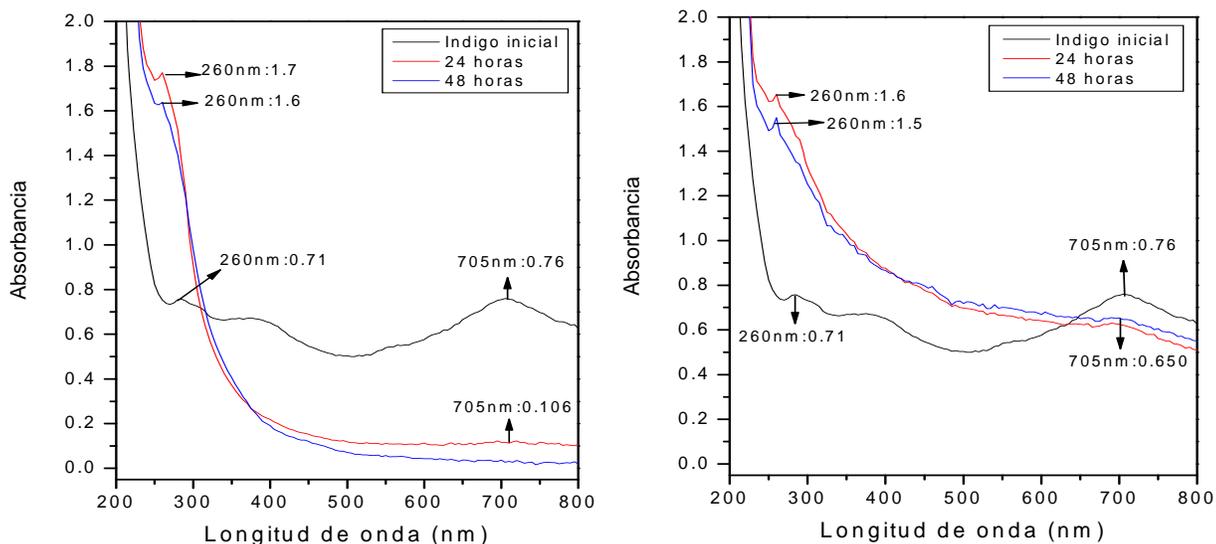


Figura 16. Barridos UV /VIS para biomasa viable (izquierda) y biomasa inactiva (derecha)

6.7.7. Recuento de microorganismos heterótrofos totales y pruebas de viabilidad para la biomasa de *P. ostreatus* pos tratamiento

Adicionalmente se valoró la presencia de microorganismos acompañantes en el reactor tanto para los experimentos con biomasa viable e inactiva, observando que al operar sin control de esterilidad el agua tenía una población inicial de 1,3 unidades logarítmicas, las cuales incrementaron al final de los tratamientos. Siendo más notorio en los reactores que tenían biomasa viable de *P. ostreatus* (6.5 unidades logarítmicas). La razón por la cual se presentó este comportamiento se pudo relacionar con las biotransformación que realiza el hongo, convirtiendo al residual en un líquido con menor concentración del compuesto tóxico, dejando intermediarios que podrían ser utilizados por las bacterias. Por otro, lado el agua tiene un suplemento de carbono que también pudo ser utilizado por estos microorganismos (figura 17).

La morfología macroscópica y microscópica concuerda con la reportada para bacilos Gram positivos y bacilos Gram negativos (figura 18).

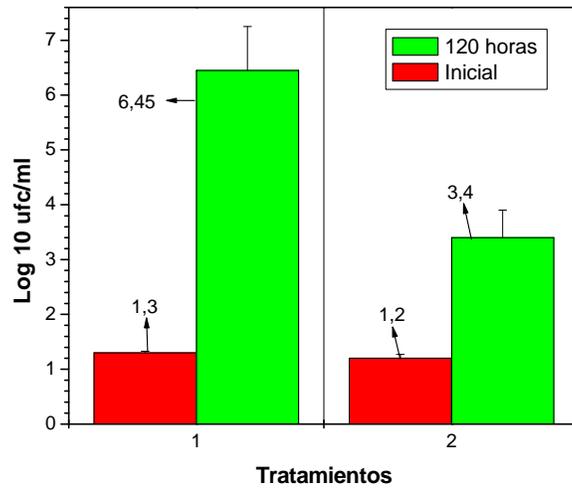


Figura 17. Recuento iniciales y finales para bacterias heterótrofas totales en los tratamientos con biomasa viable e inactiva. Biomasa viable (1), biomasa inactiva (2). Condiciones de operación: 5 días, pH 8, 120rpm y 2vvm.

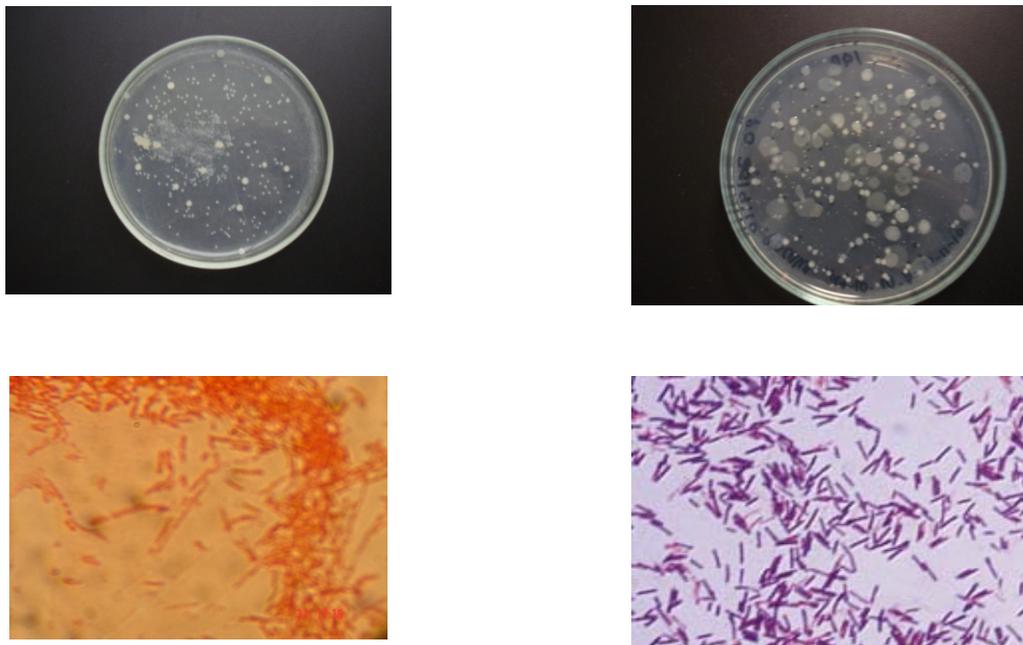


Figura 18. Características macroscópicas y microscópicas de las bacterias heterótrofas recuperadas en los dos reactores. Bacilos Gram negativos (izquierda), bacilos Gram positivos (derecha). Condiciones: Agar nutritivo, 37°C, 48 horas

La capacidad de recuperación del hongo relacionada con la formación de nuevo micelio aéreo pos tratamiento en reactor se valoró, sembrando una microesfera de biomasa fúngica recuperada del reactor a las 120 horas e incubando a 30°C. Inicialmente se observó el micelio oscuro compacto, esta morfología fue cambiando a medida que transcurrió el tiempo de incubación, ya que empezó a

visualizarse micelio algodonoso, blanco y esporulación. Características que indican viabilidad, actividad metabólica y por consiguiente crecimiento. Esta reactivación era importante demostrarla para confirmar que la remoción no solo se llevó a cabo por adsorción sino que también por biotransformación gracias a que el hongo aún continuaba viable en el reactor al cabo de las 120h de experimentación.

Tiempo horas pos tratamiento	Crecimiento y re establecimiento de micelio aéreo
0	
48	
72	

Figura 19. Cambios morfológicos y crecimiento del micelio pos tratamiento en reactor. Agar rosa de bengala, 30°C, 5 días.

6.8 Estudios de tratabilidad con residuos industriales reales

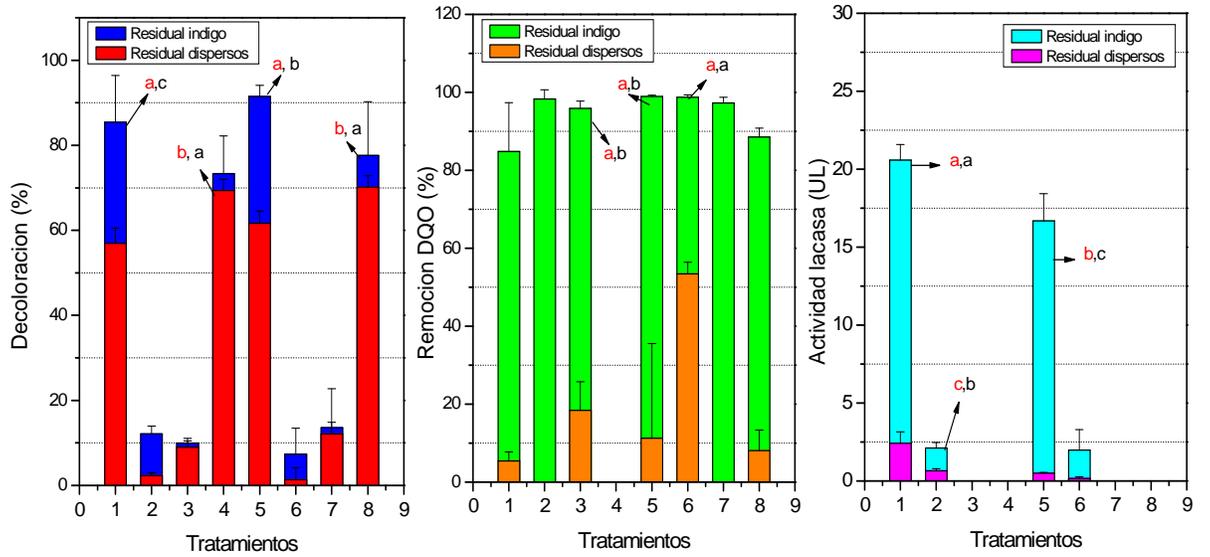


Figura 20. Remoción de color, DQO y actividad lacasa para residuos índigo y dispersos

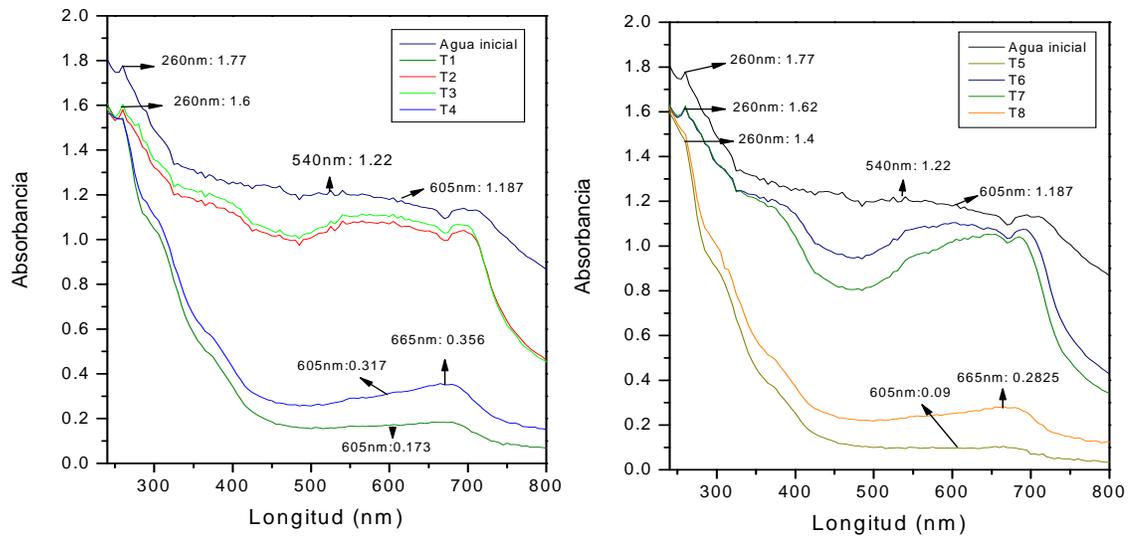


Figura 21. Barridos UV/Vis para residuos índigo

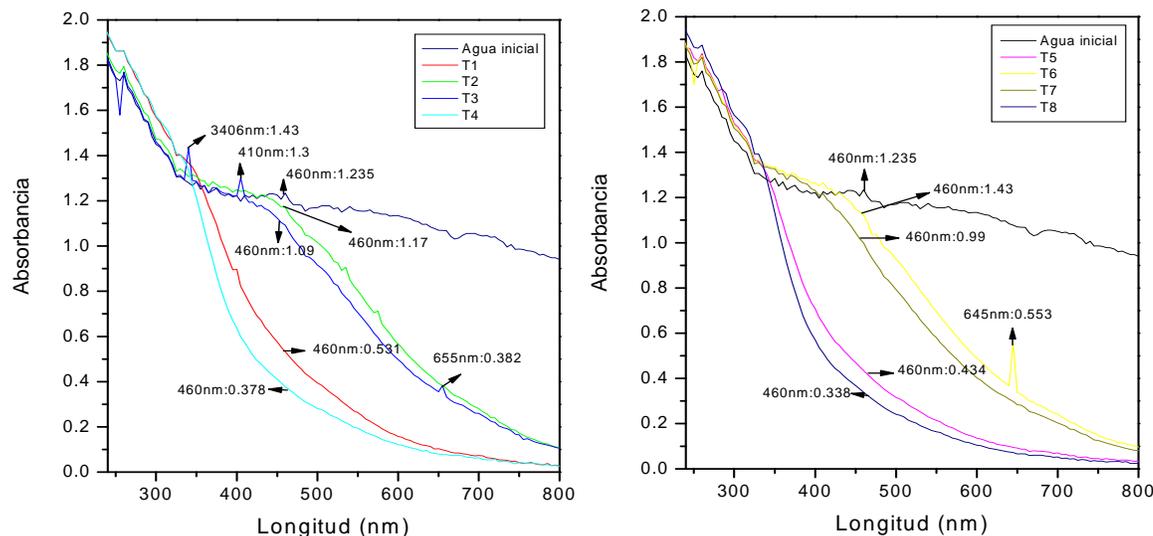


Figura 22. Barridos UV/Vis para residuales dispersos

Por medio de pruebas de tratabilidad se validaron las condiciones de remoción de DQO, porcentaje de remoción de color y producción de lacasa encontradas para el colorante índigo preparado a nivel laboratorio, los tipos de efluentes tratados provenían de dos empresas textiles una dedicada a la producción de telas tipo DENIM y otra donde se trabajan con mezclas de colorantes dispersos para su proceso. A estas aguas residuales no se les realizó ningún tratamiento previo, las muestras fueron tomadas directamente del punto de salida de la máquina de teñido (Tina y Jet) dando certeza del contenido de altas concentraciones de colorante remanente y demás productos auxiliares presentes en el proceso de teñido. Estos ensayos se realizaron por triplicado en erlenmeyer de 100mL con un volumen efectivo de trabajo de 50mL, 1% de inóculo, 30°C, 120rpm, con un total de ocho tratamientos donde se evaluó la biomasa viable e inactiva. Tabla 14.

Tabla 14 Condiciones iniciales del proceso de tratabilidad

AGUA REAL DENIM				
	T1	T2	T3	T4
100%	10g/l glucosa, 160 µMol/L MnSO ₄ , con biomasa viable, pH 8,93, 17624 DQO, 4503 UC	Sin adición de glucosa ni MnSO ₄ con biomasa viable, pH 13,97, 33034 DQO, 4602 UC	10g/l glucosa, 160 µMol/L MnSO ₄ , con biomasa inactiva pH 8,93, 17624 DQO, 4503 UC	Sin adición de glucosa ni MnSO ₄ con biomasa inactiva pH 13,97, 33034 DQO, 4602 UC
80%	10g/l glucosa, 160 µMol/L MnSO ₄ , con biomasa viable pH 8,93, 26691 DQO 4515 UC	Sin adición de glucosa ni MnSO ₄ con biomasa viable pH 13,23, 3938 DQO 4287 UC	10g/l glucosa, 160 µMol/L MnSO ₄ , con biomasa inactiva pH 8,93, 26691 DQO, 4515 UC	Sin adición de glucosa ni MnSO ₄ con biomasa inactiva pH 13,23, 3938 DQO 4287 UC

AGUA REAL MEZCLA DE DISPERSOS

	T1	T2	T3	T4
100%	10g/l glucosa, 160 μMol/L MnSO ₄ , con biomasa viable, pH 8,14, 4678 UC, 117891,4 DQO	Sin adición de glucosa ni MnSO ₄ con biomasa viable pH 3,87, 4545,8UC, 10234,3 DQO	10g/l glucosa, 160 μMol/L MnSO ₄ , con biomasa inactiva pH 8,14, 4545,8UC, 117891,4 DQO	Sin adición de glucosa ni MnSO ₄ con biomasa inactiva pH 3,87, 4545,8UC, 10234,3 DQO
	T5	T6	T7	T8
80%	10g/l glucosa, 160 μMol/L MnSO ₄ , con biomasa viable pH 8,14, 4287,8 UC, 114120 DQO	Sin adición de glucosa ni MnSO ₄ con biomasa viable pH 3,87, 4306,8 UC, 5777,1 DQO	10g/l glucosa, 160 μMol/L MnSO ₄ , con biomasa inactiva pH 8,14, 4306,8 UC 114120 DQO	Sin adición de glucosa ni MnSO ₄ con biomasa inactiva, pH 3,87, 4287,8 UC 5777,1 DQO

En cuanto a los ensayos de tratabilidad con el agua residual proveniente de las empresa evaluadas se realizó una metodología con base en la dilución del efluente residual (100 y 80% v/v) y evaluando el efecto de la adición de una fuente de carbono e inductores (10 g/L de glucosa y 160 μMol/ MnSO₄) sobre la decoloración, actividad lacasa y la remoción de DQO. Los resultados del análisis estadístico permitieron inferir que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos ($p < 0.0001$) siendo los tratamientos el 5, 1, 8 y 4, con los valores de 91, 85, 77 y 73% a las 72 horas con pHs iniciales ajustados a 8,9, 8,9, 8,9 quienes presentaron los mejores valores frente a las variables de respuesta evaluadas con diferencias estadísticas altamente significativas. Por el contrario en los tratamientos en los que se trabajo con el valor inicial del agua (pH 14 y 13,2) se encontró que la decoloración fue muy baja tanto en la biomasa viable como inactiva con y sin adición de fuente de carbono e inductores. Para los tratamientos T2, T3, T6 y T7 se obtuvieron porcentajes de decoloración inferiores al 13%. Comportándose como grupo heterogéneo e independiente.

Con respecto a los valores de la variable de respuesta DQO no se presentaron diferencias significativas ($p > 0.0001$) para los tratamientos 2, 5, 6 y 7 (98,2, 99, 98,7 y 97%), determinando que cualquiera de las combinaciones podría ser utilizada. No obstante, en el tratamiento 5 (agua residual al 80%, con suplemento nutricional y pH 8,9) se obtuvo el valor más alto de remoción (99%); el cual coincide con la mayor decoloración y una de las actividades lacasa más altas (16,6 U/L).

Por tal razón podemos concluir que el tratamiento 5 conformado por la combinación de factores evaluados durante todo el estudio (120rpm, 10g/L de glucosa, μMol/ MnSO₄, pH 8, fue eficiente al haberse sometido frente a un efluente residual industrial real demostrando que *Pleurotus ostreatus* es un microorganismo con amplia capacidad para remover el color y DQO, por otro lado es necesario realizar una dilución del 80% v/v para obtener porcentajes elevados.

Al analizar los resultados de decoloración del agua con mezcla de dispersos se encontró que la mejor decoloración se presentó en los tratamientos 8, 4 y 5 (70, 69 y 62%) al ajustar el pH inicial del agua a 8,9. Siendo estadísticamente diferentes de los tratamientos 1, 2, 3, 6, 7 y 8 ($p < 0.0001$). Pero con respecto a la remoción de DQO en general fue más baja que las obtenidas con el agua residual del índigo con valores de 53, 18 y 11% para los tratamientos 6, 3 y 5. Con estos resultados se puede inferir que el tratamiento 5 estandarizado en este estudio demostró ser versátil al haberse sometido a un efluente residual con mezcla de colorantes diferentes al índigo, aunque no se obtuvieron los valores más altos en cuanto a porcentaje de remoción.

Al evaluar la remoción de DQO y actividad lacasa se evidenció un efecto inhibitorio al emplear una mezcla de colorantes dispersos y demás carga contaminante como tensoactivos y estabilizantes, presentado un mayor grado de complejidad no obstante los resultados obtenidos permitieron demostrar la versatilidad de *Pleurotus ostreatus* frente a esta clase de aguas residuales.

En cuanto a la actividad enzimática la enzima lacasa solo se cuantificó en los tratamientos 1, 5, 6 y 2. En los cuales se tenía biomasa viable a diferentes pH y su actividad fue baja comparada con los valores obtenidos con el agua residual índigo.

Cabe resaltar que para los tratamientos T2 (100% v/v) y T4 (80% v/v) (tabla 14) realizados con los dos tipos de aguas residuales sin ninguna manipulación, en el T2 se evidenció que el hongo *P. ostreatus* fue sometido a pH's extremos de (pH 13,97 - pH 3,87), resaltando que para el agua residual de índigo a pH de 13,97 hasta el momento no se ha encontrado reporte alguno de tener actividad metabólica, aunque no se obtuvieron resultados satisfactorios en cuanto a decoloración y remoción de DQO obteniendo actividades lacasa de entre 20,6 U/L para el tratamiento T1 agua al 100%v/v y 16U/L para el T5 80% v/v (tabla 14) los cuales contenían suplemento de glucosa 10g/L, 160 μ Mol/L $MnSO_4$, biomasa viable al 1%, temperatura de 30°C, agitación de 120rpm .

Para el agua de mezcla de dispersos pH 3,87 se obtuvo una actividad lacasa de entre 2,4 U/L para el tratamiento 1 al 100%v/v y 0.17 U/L para el tratamiento 5 80% v/v a su vez estos contenían suplemento de glucosa 10g/L, 160 μ Mol/L $MnSO_4$, biomasa viable al 1%, temperatura de 30°C, agitación de 120rpm . Una de las razones por las cuales no se obtuvieron resultados satisfactorios para el agua de mezcla de dispersos comparado con los resultados obtenidos con el agua real DENIM es debido a la gran variedad de colorantes y auxiliares textiles presentes en la muestra ya que dicha se tomó directamente en la etapa de agotamiento del colorante en el proceso de teñido, donde confirmamos que el agua venía con toda su carga contaminante sin ser diluida en el proceso de lavado post teñido.

7. CONCLUSIONES

En las pruebas en medios agarizados se observó que el colorante índigo a concentraciones (160ppm-320ppm) no inhibió el crecimiento de *Pleurotus ostreatus*. Pero las altas concentraciones del mismo (320ppm) produjeron cambios en la morfología del microorganismo que alteraron los % de decoloración obtenidos, al parecer por procesos de saturación y toxicidad de algunos de los compuestos del colorante. Razón por la cual se determinó que la mejor concentración en cuanto a tiempo de crecimiento y decoloración fue de 160ppm, donde se obtuvo una decoloración del 90% sin observar cambios drásticos en la morfología y el metabolismo del microorganismo, obteniendo un proceso adsorptivo que se ajustó al modelo matemático de *Langmuir*, con un coeficiente de correlación de 0,9903(R²) para biomasa viable y de 0,9927(R²) para biomasa inactiva donde se obtuvieron constantes de saturación máximas del adsorbente 55.2(mg/g) y 80(mg/g) respectivamente haciéndolo un modelo interesante para la determinación decolorativa de colorantes índigo a nivel de laboratorio.

Por medio de un diseño Plackett Burman a escala erlemeyer y un diseño de paso de ascenso /descenso se encontró que las condiciones de operación más adecuadas en cuanto a la remoción del colorante índigo, remoción de DQO y producción de lacasa por medio de *Pleurotus ostreatus* fueron, pH 8.0, 160ppm de colorante índigo, 1% de inóculo, 120rpm, 30°C, con adición nutricional de 10g/L de glucosa y 160µmol/L MnSO₄, sin suplemento de nitrógeno y sin suplemento de cobre; con 83% de decoloración, 78% remoción de DQO y 21.1 U/L Lacasa. Por medio de un diseño factorial 2³ se encontró que a nivel banco (1L), las condiciones más favorables fueron 2vvm de aireación, 120 rpm, 10% de inóculo, con resultados de (57%) remoción de DQO, (97%) de decoloración, (31d U/L) lacasa al cabo de 48 h permaneciendo iguales las condiciones nutricionales de glucosa, MnSO₄, concentración de colorante, pH encontradas a escala erlemeyer.

Mediante cinéticas de remoción a escala banco (1L) bajo condiciones no estériles se encontró que el tiempo de mayor remoción se encuentra entre las (24-48h) para biomasa viable donde se encontraron valores de porcentaje de decoloración 91y 94% (340UC y 215UC) valores que en dilución 1/20 Pt-Co se encuentran dentro de la resolución (50 UC 1/20 Pt-Co), con remoción de DQO de 85 y 20% respectivamente, 866,21U/L de lacasa para la hora 24 siendo esta la hora de máxima producción, para la biomasa inactiva se encontró que las horas de mayor remoción se encuentran entre (12y 18h) obteniendo 48 y 25% en cuanto a decoloración, 11y 19% para la remoción de DQO. Razón por la cual se demostró que *Pleurotus ostreatus* puede biodegradar el colorante índigo bajo condiciones no estériles

Al realizar las pruebas de tratabilidad con los diferentes tipos de agua residual, se encontró que es necesaria la adición de 10g/L glucosa, 160 µMol/L MnSO₄, con biomasa viable y un pH 8 para el agua residual textil real diluida al (80 v/v). *Pleurotus ostreatus* no demostró inhibición por la presencia de los demás componentes existentes en el agua residual, obteniendo valores de 91% de decoloración, 99% remoción de DQO con 16,6UL/L, para el agua real DENIM y 70% de decoloración 53% de remoción de DQO 20,6UL/L para la mezcla de dispersos. A su vez se demostró la capacidad de decoloración y remoción de DQO de este microorganismo y su potencial uso en la biorremediación de este tipo de efluentes en el agua real DENIM diluida al 80%, aunque no se alcanzaron los mismos porcentajes de remoción en el agua con mezcla de dispersos.

8. RECOMENDACIONES

Realizar estudios para evaluar el efecto de la disminución del co-sustrato con la finalidad de encontrar el valor mínimo permitido donde no se vea afectado el metabolismo del hongo *P. ostreatus*, pudiendo obtener valores mejores o iguales a los obtenidos en este estudio teniendo como punto de partida 8691mg/L de glucosa.

Realizar cinéticas a pHs alcalinos controlados para ver si bajo estas condiciones el hongo es capaz de decolorar residuales reales ya este tipo de aguas son vertidas a pH muy alcalinos, de igual manera realizar estudios a temperaturas elevadas con la finalidad de evaluar si el microorganismo y las enzimas asociadas a la decoloración son capaces de decolorar aguas obtenidas directamente de los procesos de tintura

Realizar pruebas eco toxicológicas con por lo menos 3 microorganismos para evaluar el efecto del agua tratada con biomasa viable de *P.ostreatus* no solo disminuya los porcentajes de DQO, color, si no que de igual manera los intermediarios obtenidos no sean más tóxicos que el colorante inicial

Determinar el número de ciclos que soporta la biomasa viable con la finalidad de reutilizar la biomasa y decolorar la mayor cantidad de agua posible.

9. ANEXOS

ANEXO 1

Composición del agar extracto de salvado

Glucosa (alimetaria)	10 g/L
Extracto de Levadura	2g/L
Peptona Universal	5g/L
Fosfato de Potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)	0.1g/L
Sulfato de Magnesio Heptahidratado (MgSO ₄ . 7 H ₂ O)	0.05g/L
Sulfato de Manganeso Monohidratado (MnSO ₄ . H ₂ O)	0.076g/L
Salvado de Trigo	175g/L
Cloranfenicol	0.1g/L
Agar- Agar	18g/L
Extracto de salvado líquido	1L

Preparación

Para preparar 1000mL de medio extracto de salvado, se introducen en un recipiente 350g de salvado de trigo y 2000mL de agua destilada, dejando en remojo 1 hora, posteriormente colando y exprimiendo se obtiene el extracto líquido. En 100mL de esta solución se adicionan 10g de glucosa, 5g de peptona, 2g de extracto de levadura, 0,1g de fosfato de potasio monobásico, 0,05g de sulfato de magnesio, 0,076g de sulfato de manganeso, ajustando pH a 6,5, esta solución es llevada esterilización en autoclave a 121°C, 15 lb por 15min.

ANEXO 1B

Composición del agar Rhada

Glucosa	2g/L
Fosfato de Potasio monobásico (KH ₂ PO ₄)	2g/L
Sulfato de Magnesio Heptahidratado (MgSO ₄ . 7 H ₂ O)	0,5g/L
Sulfato de Manganeso Monohidratado (MnSO ₄ . H ₂ O)	0,5g/L
Agar- Agar	15g/L
Vitaminas	100mg/L
Cloruro de Calcio Dihidratado CaCl ₂ . 2H ₂ O	0.1g/L
Cloruro de Amonio NH ₄ Cl	0,05 g/L

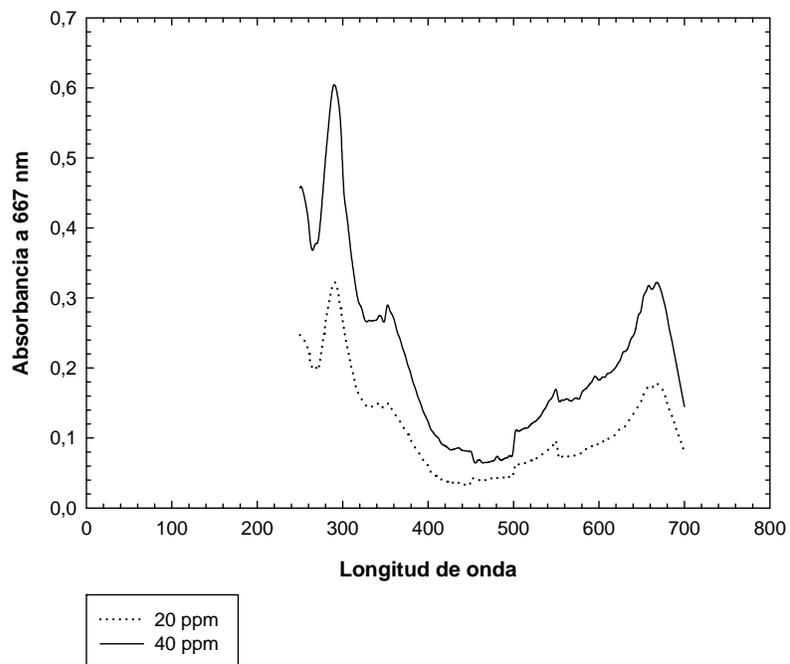
ANEXO 2

Preparación del colorante índigo

En un balón aforado de 500mL, se colocaron 50mL de agua destilada con 0,05g de dispersante cecanol y se calentaron en un baño termostático a 30 °C hasta su total dilución. Posteriormente se adicionaron 2,44g de NaOH al 50% m/v y 3,36g de hidrosulfito de sodio, agitando constantemente, finalmente se adicionaron 4g de índigo y se aforaron con agua destilada a 500mL, la mezcla se calentó por 1h a 30°C en un baño termostatado.

ANEXO 3

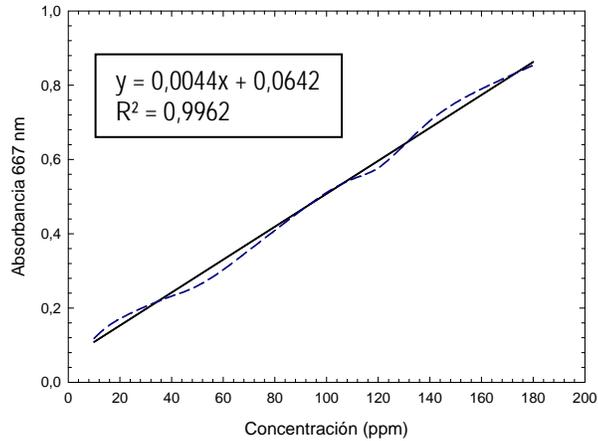
Barrido UV/VIS del colorante índigo



ANEXO 4

Curva de calibración del colorante índigo.

Se realizó una curva de calibración para el colorante índigo con el fin de cuantificar la concentración de este en el proceso de remoción con intervalos de concentración entre 20ppm – 180ppm se obtuvo un $R^2 = 0,9962$



$$y = 0.0044x + 0.0642 \quad (5)$$

ANEXO 5

Información complementaria para soporte de estudios de adsorción

ANEXO ESTUDIOS DE ADSORCIÓN BIOMASA VIABLE

DATOS EXPERIMENTALES Y GRAFICADOS

Hora	Conc. Colorante ppm	Adsorbido	C	Cs	C/Cs
0	144.7063492	0	0	79.5089831	0
0.5	130.3412698	14.3650794	7.89290075	75.1722244	0.10499757
1	135.1825397	9.52380952	5.23286238	76.633784	0.06828401
1.5	117.2460317	27.4603175	15.0880865	71.2188257	0.21185531
2.5	101.9285714	42.7777778	23.5042735	66.5945471	0.35294592
3	102.3253968	42.3809524	23.2862376	66.7143471	0.34904393
3.5	99.15079365	45.5555556	25.030525	65.7559473	0.38065796
4	101.452381	43.2539683	23.7659166	66.4507871	0.35764688
4.5	90.8968254	53.8095238	29.5656724	63.2641081	0.46733722
5	102.2460317	42.4603175	23.3298448	66.6903871	0.3498232
5.5	84.23015873	60.4761905	33.2286761	61.2514687	0.54249599
6	74.62698413	70.0793651	38.5051456	58.3523096	0.65987355

6.5	70.26190476	74.4444444	40.9035409	57.0345101	0.71717178
7	64.62698413	80.0793651	43.9996511	55.3333506	0.79517417

Test of SS Whole Model vs. SS Residual (Spreadsheet2 in REGRESION LINEAL.stw)

	Multipl e R	Multipl e R ²	Adjust ed R ²	SS	D f	MS	SS	d f	MS	F	p
C/C	0.9951	0.9903	0.9893	0.4260	1	0.4260	0.0041	1	0.0004	1022.9	0.0000
S	48	19	51	46		46	65	0	17	15	01

Univariate Tests of Significance for C/CS (Spreadsheet2 in REGRESION LINEAL.stw)

Sigma-restricted parameterization

Effective hypothesis decomposition

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	0.005804	1	0.005804	13.934	0.003892
C	0.426046	1	0.426046	1022.915	0.000000
Error	0.004165	10	0.000417		

Parameter Estimates (Spreadsheet2 in REGRESION LINEAL.stw)

Sigma-restricted parameterization

	C/CS	C/CS	C/CS	C/CS	-95.00%	+95.00%	C/CS	C/CS	-95.00%	+95.00%
Intercept	-0.055389	0.014838	-3.73283	0.003892	-0.088451	-0.022327				
C	0.018065	0.000565	31.98305	0.000000	0.016806	0.019324	0.995148	0.031115	0.925819	1.064476

DATOS EXPERIMENTALES Y GRAFICADOS BIOMASA MUERTA

Hora	Conc. Colorante ppm	Adsorbido	C	Cs	C/Cs
0	203.3571429	0	0	111.734694	0
1	197.6428571	5.71428571	3.13971743	110.009574	0.0285404
2	187.0873016	16.2698413	8.93947323	106.822895	0.08368499
3	171.3730159	31.984127	17.5736961	102.078817	0.17215811
4	155.0238095	48.3333333	26.5567766	97.1430584	0.27337802
5	125.1031746	78.2539683	42.9966859	88.1101412	0.48798793
6	131.2142857	72.1428571	39.6389325	89.9550606	0.44065261
7	106.8492063	96.5079365	53.0263387	82.5993429	0.64197047
8	102.484127	100.873016	55.424734	81.2815433	0.68188585
9	95.18253968	108.174603	59.4365952	79.077224	0.75162723

10	80.57936508	122.777778	67.4603175	74.6685854	0.90346318
11	80.65873016	122.698413	67.4167103	74.6925454	0.90258954
12	117.1666667	86.1904762	47.3574045	85.714142	0.55250398

Test of SS Whole Model vs. SS Residual (Spreadsheet2 in REGRESION LINEAL MUERTA.stw)

	Multipl e R	Multipl le R ²	Adjust ed R ²	SS	D f	MS	SS	d f	MS	F	p
C/C	0.9951	0.9927	0.9893	0.4260	1	0.4260	0.0041	1	0.0004	1022.9	0.0000
S	48		51	46		46	65	0	17	15	00

Univariate Tests of Significance for C/CS (Spreadsheet2 in REGRESION LINEAL MUERTA.stw)

Sigma-restricted parameterization

Effective hypothesis decomposition

	SS	Degr. of	MS	F	p
Intercept	0.005804	1	0.005804	13.934	0.003892
C	0.426046	1	0.426046	1022.915	0.000000
Error	0.004165	10	0.000417		

Parameter Estimates (Spreadsheet2 in REGRESION LINEAL MUERTA.stw)

Sigma-restricted parameterization

	C/CS	C/CS	C/CS	C/CS	- 95.00 %	+95.00 %	C/CS	C/CS	- 95.00 %	+95.00 %
Interc ept	-	0.0148	-	0.0038	-	-				
	0.0553	38	3.7328	92	0.0884	0.0223				
	89		3		51	27				
C	0.0180	0.0005	31.983	0.0000	0.0168	0.0193	0.9951	0.0311	0.9258	1.0644
	65	65	05	00	06	24	48	15	19	76

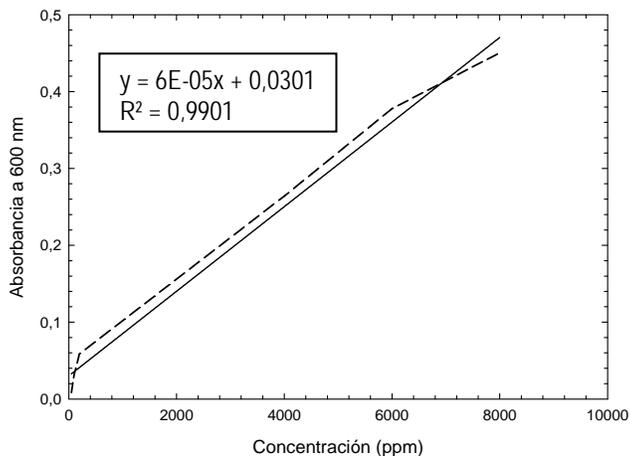
ANEXO 6

Preparación de reactivos para DQO

Preparación del Dicromato de potasio

Para realizar las pruebas de DQO inicialmente se pesan 15 g de dicromato, se secan en mufla por 2 horas a 105 grados, se dejan enfriar en un desecador, de estos 15g, se pesan 13g y se aforan a 1L con agua des ionizada, se guardan en frasco ámbar posterior a una agitación por 10h, finalmente se realiza una cura de calibración con diferentes concentraciones (0-8000ppm) $R^2 = 0,9901$, posteriormente se realiza la digestión en tubos de digestión: HACH comerciales de 16 x 100 mm cuya capacidad es de 10 ml y permiten medir DQO en un rango de 3-150ppm, a estos tubos se les adiciono 0,5mL de dicromato, 1,25mL de muestra y 1,8mL de acido sulfúrico concentrado para la determinación de DQO de las muestras evaluadas, como blanco se tomaron 0,5mL de dicromato, 1,25mL de agua destilada, 1,8mL de acido sulfúrico concentrado

Curva de calibración del dicromato



ANEXO 7

Porcentaje de humedad y peso seco de la biomasa fungica de *P. ostreatus*.

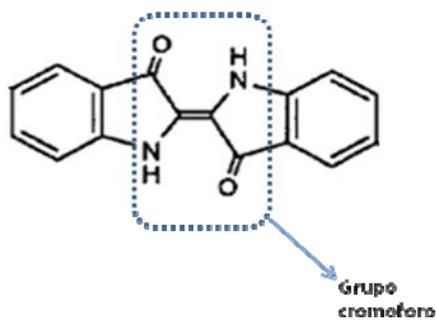
Los hongos, presentan requerimientos nutricionales y ambientales para un óptimo desarrollo del metabólico. Pero la humedad o el contenido intracelular de aguas es un factor determinante en el caso de *P. ostreatus*, se reporta un rango de aproximadamente del 88-90%. Lo anterior, se asemeja, con lo obtenido en la presente investigación, donde se obtuvo, una humedad del 91%.

Este factor se tuvo en cuenta en las etapas posteriores de la investigación, debido a que se buscaba la homogeneidad de las condiciones expresadas (peso húmedo y seco) como % (p/p) de

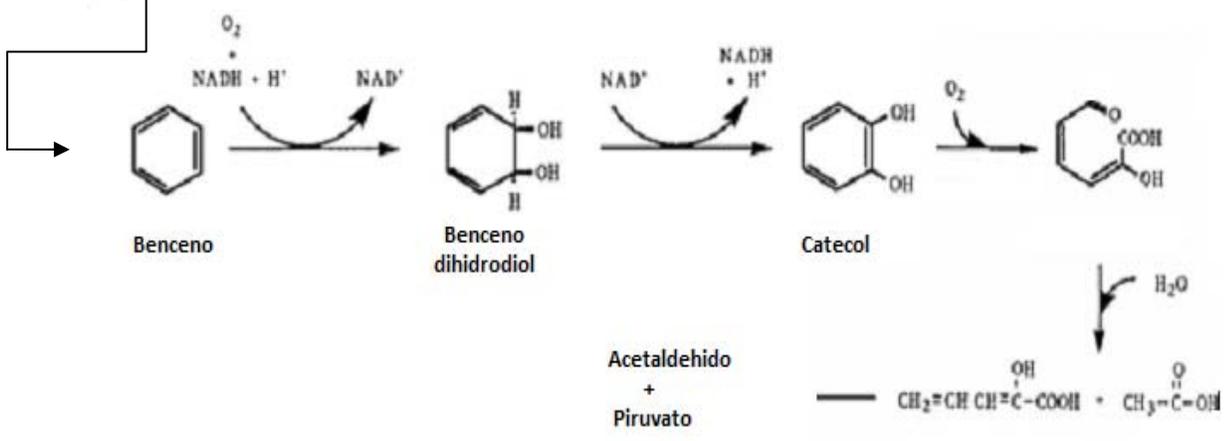
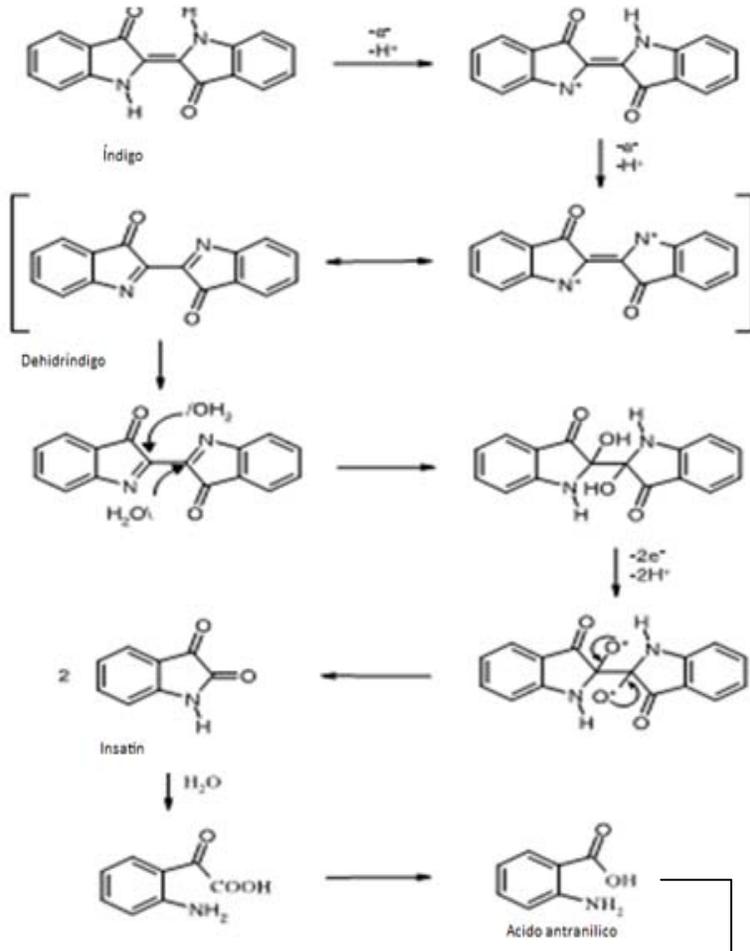
biomasa, debido al mecanismo adsorptivo de *P. ostreatus* descrito por diversos autores, la importancia descrita de este factor se debe a que la adición de diferentes cantidades de este podría generar la falta de homogeneidad en los datos obtenidos y la reproducibilidad del mismo.

ANEXO 8

Estructura del grupo cromóforo presente en el índigo



ANEXO 9
Mecanismo de degradación del colorante índigo por medio de la lacasa



CICLO DE KREPS

ANEXO 10

Vista de la biomasa antes y después del proceso de decoloración



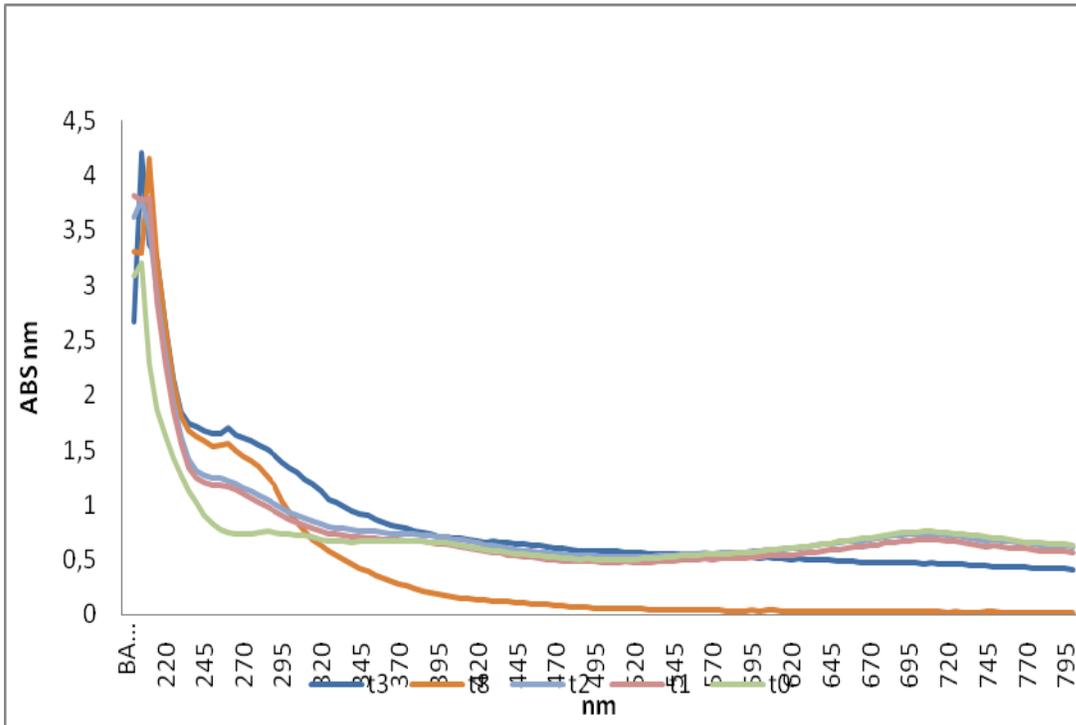
Biomasa pelletizada antes del tratamiento de decoloración



Biomasa pelletizada despues del tratamiento de decoloración

ANEXO 11

Barridos uv/vis para el diseño experimental factorial 2^3 para determinar las condiciones de operación del reactor (1,5 L)



ANEXO 12

Publicaciones y Eventos

Esta investigación participo por medio de poster en el 14th Simposio internacional de biotecnología

Participación con poster en el 14th international biotechnology symposium and exhibition. biotechnology for the sustainability of human society. Tema: Índigo removal by *pleurotus ostreatus* under different nutritional conditions. septiembre de 2010 Rimini- Italia

Title:

INDIGO REMOVAL BY *Pleurotus ostreatus* UNDER DIFFERENT NUTRITIONAL CONDITIONS.

Authors & affiliations:

S.E. Ruíz Balaguera^{1,2}, L. Rincón-Chisino¹, E. Herrera-Sastoque¹, A.M. Pedroza-Rodríguez².

¹Environmental and Industrial Biotechnology Group. University Javeriana. Carrera 7 No. 43-82, Bogotá, Colombia.

²Sabana University. Bogotá Colombia.

Abstract: (Your abstract must use **Normal style** and must fit in this box. Your abstract should be no longer than 300 words. The box will 'expand' over 2 pages as you add text/diagrams into it.)

Waste water from the denim industry represents a major environmental and health problem because it contains indigo dyes whose carcinogenic effect. Decolorization of this dye in solid and liquid medium was tested with ligninolytic basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. The decolorization in solid medium started in a few days and after 11 days the removal was 58 and 77% at 320 and 160 ppm at 30° C. The factors and culture conditions that affect the biological decolorization were studied by a Plackett Burman experimental design; showing that, for the conditions evaluated the decolorization (100%) and COD removal (100%) were favored ($p < 0.049$ and $p < 0.046$) by growing *P. ostreatus* in a synthetic medium composed of: Indigo dye 320 ppm, 150 μ M CuSO₄, 160 μ M MnSO₄, 0.5 g/L NH₄Cl₂ and pH 5.0. under operating conditions of 120 rpm, 30° C, 12 h and 1% w/v as percentage of inoculum.

Finally, an investigation was made on the adsorption and kinetics of indigo in an aqueous suspension of *P. ostreatus* pellets biomass. One model was used to describe the adsorption process (Langmuir-Hinshelwood). The results of the adsorption was fitted to the model proposed showing that the viable biomass had mayor adsorption capacity (4.21 mg/g) with respect to inactive biomass (3.28 mg/g).

14th International
Biotechnology
Symposium
and Exhibition

IBS 2010



Biotechnology for
the Sustainability of
Human Society

14 -18 September 2010
Palacongressi,
Rimini - Italy

Certificate of Attendance

This is to certify that

**S.E. Ruíz Balaguera., L. Rincón-Chisino., E. Herrera-
Sastoque., L. Castillo-Carvajal, B. Barragán-Huerta A.M.
Pedroza-Rodríguez.**

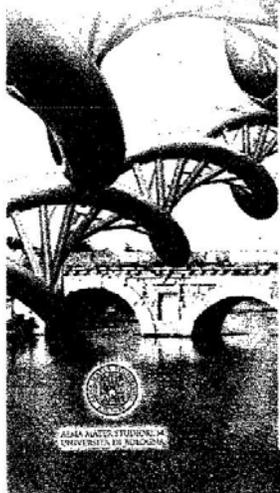
has attended the

14th International Biotechnology Symposium and Exhibition
Biotechnology for the Sustainability of Human Society

on 14th - 15th - 16th SEPTEMBER 2010

Professor Fabio Fava
*Alma Mater Studiorum -
University of Bologna, Italy*

Professor Francesco Nicotra
*University of Milano-Bicocca
& IUPAC, Italy*



Publicación en revista indexada

Parte de esta investigación será presentada como artículo para ser sometido a la revista *Interciencia*, es una revista multidisciplinaria cuyos temas prioritarios son Agronomía y Bosques Tropicales, Alimentos y Nutrición, Ciencias del Mar y de la Tierra, Educación Científica, Ecología y Problemas Ambientales, Energía, Estudio y Sociología de la Ciencia, Política Científica, Recursos Renovables y No Renovables, Salud y Demografía, Tierras Áridas, Transferencia de Tecnología, esta revista publica escritos en idioma español, inglés o portugués, siempre que se relacionen con el desarrollo regional y su calidad sea certificada a través de arbitraje por pares.

Esta revista esta indexada en:

AGRICOLA, AGRICULTURAL ENGINEERING ABSTRACTS, AGRI 2000, AGROFORESTRY ABSTRACTS, AQUATIC SCIENCES & FISHERIES ABSTRACTS (PARTS 1, 2), BIOLOGICAL ABSTRACTS, CHICANO INDEX, CROP PHYSIOLOGY ABSTRACTS, CURRENT ADVANCES IN ECOLOGICAL AND ENVIRONMENTAL SCIENCES, CURRENT CONTENTS, ENERGY INFO. ABSTR., ENERGY INFORMATION ABSTRACTS ANNUAL, ENVIRONMENT ABSTRACTS, ENVIRONMENTAL SCIENCES & POLLUTION MANAGEMENT, FISHERIES REVIEW, FORESTIY ABSTRACTS, GRASSLANDS AND FORAGE ABSTRACTS, HELMINTHOLOGICAL ABSTRACTS & NEMATOLOGICAL ABSTRACTS, HISPANIC AMERICAN PERIODICALS INDEX, HORTICULTURAL ABSTRACTS, INDEX VETERINARIUS, INDEX TO SCIENTIFIC REVIEWS, INTERNATIONALE BIBLIOGRAPHIE DER REZENSIONEN WISSENSCHAFTLICHER LITERATUR, INTERNATIONAL BIBLIOGRAPHY OF BOOK REVIEWS OF SCHOLARLY LITERATURE, OCEANOGRAPHIC LITERATURE REVIEW, PLANT GROWTH REGULATOR ABSTRACTS, PROTOZOOLOGICAL ABSTRACTS, REPINDEX, RESEARCH ALERT (PHILADELPHIA), REVIEW OF AGRICULTURAL ENTOMOLOGY & REVIEW OF MEDICAL AND VETERINARY ENTOMOLOGY, REVIEW OF PLANT PATHOLOGY, SCIENCE CITATION INDEX, SOCIAL SCIENCES CITATION INDEX, VETERINARY BULLETIN, WATER RESOURCES ABSTRACTS (BETHESDA), WILDLIFE REVIEW ABSTRACTS, WORLD AGRICULTURAL ECONOMICS & RURAL SOCIOLOGY ABSTRACTS, CLASE, PERIÓDICA, REVENCYT.

Remoción del colorante índigo presente en agua residual sintética y real bajo condiciones no estériles usando biomasa viable e inactiva de *Pleurotus ostreatus*

Sonia Ruíz-Balaguera^{1,2}, Erika Herrera-Sastoque¹, Laura-Rincón Chisino¹, Luis Eduardo Díaz Barrera² Aura Marina Pedroza-Rodríguez*¹

¹ Laboratorio de Microbiología Ambiental y Suelos. Grupo de Biotecnología Ambiental e Industrial. Facultad de Ciencias. Pontificia Universidad Javeriana. Cra 7 N° 43-82, Bogotá-Colombia.

² Grupo de Procesos Agroindustriales. Facultad de Ingeniería. Universidad de la Sabana, Bogotá-Colombia.
*apedroza@javeriana.edu.co

Resumen

En este estudio se utilizó a *Pleurotus ostreatus* viable e inactivo para la remoción de color y DQO presentes en un agua residual sintética con 160 ppm del colorante índigo. Se realizó a escala de erlenmeyer un diseño experimental Plackett Burman para seleccionar los factores que favorecieron la remoción, estableciendo que la velocidad de agitación 120rpm, concentración de índigo de 160ppm, pH 8.0, 30°C, adición de 10 g/l de glucosa y 160 µMol/l de MnSO₄ fueron los más significativos (p<0.0001). Para realizar los estudios en reactor (1,5l) de mezcla completa primero se realizó un diseño factorial 2³ para seleccionar las condiciones de operación en términos de velocidad de agitación, aireación y porcentaje de inóculo. Determinando que al utilizar 10% (m/v) de inóculo 2 vvm y 120rpm se obtuvo la mayor remoción de color y DQO 98% y 57% con una actividad lacasa 31U/l. Bajo estas condiciones de operación se realizaron cinéticas por 5 días con biomasa viable e inactiva observando una remoción máxima de 91 y 85% para color y DQO a las 24h con biomasa viable y 46% de remoción de color y 20% remoción DQO con biomasa inactiva a las 48 h.

Finalmente se evaluó la capacidad de remoción de *P. ostreatus* empleando aguas residuales reales de dos empresas textiles (colorante índigo y colorantes dispersos) evidenciando que el hongo decoloró y removió DQO en un 91%, 70% 99% y 53% el agua residual con índigo y dispersos, diluida al 80% (v/v) con actividades lacasa de 16,6 U/l y 20,6 U/l a las 48h con suplemento de 10 g/l de glucosa, 160 µMol/l MnSO₄, pH 8,0 y 30°C.

Palabras claves: Indigo, lacasa, decoloración, demanda química de oxígeno y *Pleurotus ostreatus*.

10. BIBLIOGRAFIA

- Abdula E., Tzanov T., Costa S., Robra K., Cavaco A., Gubitz, G.(2000). Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*. Applied and Environmental Microbiology. 66: 8. 3357-3362.
- Aguedach A., Brosillon S., Morvan J., Lhadi E. (2005). Photocatalytic degradation of azo-dyes reactive black 5 and reactive yellow 145 in water over a newly deposited titanium dioxide. Applied Catalysis B: Environmental. 57: 55-62.
- Alonso -Vante N. (2006). Comunicación personal. Universidad de Poitiers. Francia.
- Anto H., Trivedi U.B., Patel K.C. (2006). Glucoamylase production by solid-state fermentation using rice flake manufacturing waste products as substrate. Bioresource Technology. 97: 1161-1166.
- Antonella Anastasi, Valeria Prigione, Giovanna Cristina Varese. (2009). Industrial dye degradation and detoxification by basidiomycetes belonging to Different eco-physiological groups. Journal of Hazardous Materials. No of pages 8.
- Antonella Anastasi, Federica Spina ,Valeria Prigione , Valeria Tigini, Pietro Giansanti Giovanna Cristina Varese. (2010). Scale-up of a bioprocess for textile waste water treatment using *Bjerkandera adusta*, bioresource technology journal.
- Annadurai , G., Chellapandian, M. and Krishnan M. (1999). Adsorption of reactive dye on chitin. Environmental Monitoring and Assessment 59:111–119.
- Anjaneyulu Y, Sreedhara N, Raj S. (2005). Decolourization of industrial effluents available methods and emerging technologies a review. Environmental Science and Bio/Technology. 4: 245–273.
- APHA . In: A. E, Greenberg, L.S, Cleceri and A.D. Eeon. (1999). Editors, Standard Methods for the examination of water and wastewater (18th ed) American Public Health Association, Washington D.C.
- Abadulla Elias, Tzanko, Silgia. Karl Heinz. (2000). Decolorization and Detoxification of textile Dye with a lacasa from *Trametes hirsuata*, Applied and Enviromental Microbiology 3357-3362
- Arora D and Gill P. (2001). Effects of various media and supplements on laccase production by some white rot fungi. Bioresource Technology. 77: 89-91.
- Ahluwalia S. y Goyal D. (2007). Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. Bioresource Technology. 98:2243–2257.
- Alvares de Lima, R. O, Bazona, 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.

- Asgher M, Nawaz H, Ashraf M, Legge R. (2008). Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme. *Biodegradation* springerlink; 19, 771 – 783.
- Avendaño C. El poder de la química. Disponible en línea www.analesranf.com/index.php/ie/article/view/849/819. Consultado el 17 de Mayo de 2010.
- Balan D, Monteiro R. (2001). Decolorization of textile indigo dye by ligninolytic fungi. *Journal of Biotechnology on ScienceDirect* 89: 141-145.
- Bakardjieva S., Subrta J., Steng La V., Dianez M.J., Sayagues, M.J. (2005). Photoactivity of anatase rutile TiO₂ nanocrystalline mixtures obtained by heat treatment of homogeneously precipitated anatase. *Applied Catalysis B: Environmental*. **58**: 193–202.
- Banat I., Nigam P., Singh D., Marchant, R. (2006). Microbial decolorization of textile dye containing effluents: A review. *Bioresource Technology*. 58: 217-227.
- Barragán B., Costa, C., Márques, M.C. (2006). Biodegradation of azo dyes by bacteria inoculated on solid media. *Dyes and Pigments* 20: 1-9.
- Bayramo G., Elik G., Yalcin E., Yilmaz M., Arica. Y. (2005). Modification of surface properties of *Lentinus sajor-caju* mycelia by physical and chemical methods: evaluation of their Cr6+ removal efficiencies from aqueous medium. *Journal of Hazardous Materials B* 119: 219–229.
- Bayramoglu G, Arica MY. (2007). Biosorption of benzidine based textile dyes “DirectBlue And Direct Red 128” using native and heat-treated biomass of *Trametes versicolor*. 143:135–43.
- Brown J., Alic M., Gold M. (1991). Manganese peroxidase gene transcription in *Phanerochaete chrysosporium*: Activation by manganese. *Journal bacteriology*. 173: 4101-4106.
- Caesar T.C., Fintan V., Geesey G., Henson J. (1995). Melanin production by a filamentous soil fungus in response to copper and localization of copper sulfite by sulfide- silver staining. *Applied and Environmental Microbiology*. **61**: 1968- 1975.
- Cervantes C. Gutierrez F. (1994). Cooper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *FEMS Microbiology Reviews*. 14: 121-138.
- Chang N., Shih M., Cheng G., Chao A. (2004). Decolorizing of lignin wastewater using the photochemical UV/TiO₂ process. *Elsevier Chemosphere*. **56**: 1011-1017.
- Chávez N, Rincón J, Castañeda B.(2006). Biodegradación de los colorantes índigo y verde presentes en un efluente de la industria textil utilizando hongo ligninolíticos. Universidad Autónoma de Aguascalientes. México D.F. 1-6.
- Choi S., Moon S., Gu M. (2002). Biodegradation of chlorophenols using the cell-free culture broth of *Phanerochaete chrysosporium* immobilized in polyurethane foam. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **77**: 999-1004.

- CAR/PL, (2006). Prevención de la contaminación en la Industria textil en los países del Mediterráneo. Centro de Actividad Regional para la producción limpia. Plan de acción para el Mediterráneo. 1-248p.
- Castillo D. (2004). Aislamiento de hongos degradadores de colorantes empleados en la industria textil. Trabajo de Grado de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Tepetitla de Lardizabal, Tlaxcala, 62 p.
- Campos R, Kandelbauer A, Robra K, Cavaco A, Gübitz G. (2001). Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Biotechnology*; 89, 131–139.
- Christie , R. (2001). *Colour chemistry*. Royal society of chemistry. Cambridge. United Kingdom. pp. 1-5, 23-26, 45-46, 118-120, 135- 137,191.
- Dávila A. y Vázquez-Duhalt R. (2006). Enzimas ligninolíticas fúngicas para fines ambientales. *Mensaje Bioquímico*. 30:29-55.
- Departamento Técnico Administrativo del Medio Ambiente DAMA. República de Colombia. (1997). Norma 1074/97. Estándares Ambientales en términos de vertimientos. 1-2.
- Díaz -Báez, M.C., Bustos-López M.C., Espinosa-Ramírez A.J. (2004). Pruebas de toxicidad acuática. Fundamentos y métodos. Universidad Nacional de Colombia. Primera Edición. Bogotá Colombia. 64-73.
- 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.
- Doralice S.L. Balan and Regina T.R. Monteiro. (2001). Decolorization of textile índigo dye by ligninolytic fungi. *Faculdade de Tecnologia de Americana, Brazil* no tiene revista y paginas
- Dosoretz, C.; Chen, A.; Grethlein, H. (1990). Effect of oxygenation conditions on submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34: 131-137
- Decreto 1594 de 1984. Para aguas residuales. Ministerio del Medio Ambiente. Colombia.
- Días A., Becerra R., Pereira N. (2003). Activity and elution profile of laccase during biological decolorization of olive mill wastewater. *Bioresource Technology*, Elsevier. **92**: 7-13.
- Eltaief Khelifi, Lamia Ayed ,Hassib Bouallagui. (2009). Effect of nitrogen and carbon sources on Indigo and Congo red Decolourization by *Aspergillus alliaceus strain 121C*: *Journal of Hazardous Materials*: 163: 1056–1062
- Erkan Sahinkaya, Nigmet Uzal, Ulku Yetis, Filiz B. Dilek. (2008). Biological treatment and nanofiltration of denim textile wastewater for reuse. *Journal Hazardous Materials*. 153: 1142-1148

- Eugene D. Olsen. (1990). Metodos opticos de analisis. Reverte España. 100-101
- Eremektara , G., Selcukb, H., Mericc, Sureyya. (2007). Investigation of the relation between COD fractions and the toxicity in a textile finishing industry wastewater: Effect of preozonation. Desalination. 211:314–320.
- Esther Forgacs, Tibor Cserhati, Gyula Oros. (2004). Removal of synthetic dyes from wastewaters : a review 953–971
- Enshasy . A. Dba, M. el Demellawy, A. Ibrahim, S. El Sayed and L El badry. (2010). Bioprocess Development for large scale production of anticancer expo polysaccharide by *Pleurotus ostreatus* in submerged culture. Journal of Applied Sciences Research, 2523-2529
- Enshasy, A Daba, M Demellawy, A. Ibrahim. 2010. Bioprocess development for Large scale Produccion of Anticancer Expo- Polysaccharide by *Pleurotus ostreatus* in Submerged Culture. Journal of Applied Sciences. 10: 2523-2529
- Fernández , J., Henao, L., Quvedo, B., Pedroza, A.M. (2009). Inmovilización de hongos ligninolíticos para la remoción del colorante negro reactivo 5. Revista Colombiana de Biotecnología. 11: 59-73.
- Fu Y ., Viraraghavan T. (2001). Fungal decolorization a review. Bioresource Technology, Elsevier 79: 251-261.
- Fieser L . (2010). Colorantes: Preparación y uso del índigo. Práctica de Química orgánica. Disponible en línea http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/ojuanes/poster_indigo.pdf. Consultado el 6 de Febrero de Química orgánica fundamental. Editorial Reverté S.A. 1964, 373
- Foust Alan, Leonard A, Curtis W, Lous M, L. Bryce. (2001). PRINCIPIOS DE OPERACIONES UNITARIAS.
- Faraco, C. Pezzella, A. Miele, P. Giardina and G. Sannia. (2009). Bio-Remediation of Colored Industrial Waste-waters by the White-Rot Fungi *Phanerochaete Chrysosporium* and *Pleurotus Ostreatus* and their Enzymes, Biodegradation Journal , 20: 209-220.
- García -Cortés, U. Jáuregui-Haza. (2006). Hidrodinámica en tanques agitados con turbinas de disco con paletas planas Revista Facultad de Ingeniería N.º 38. pp. 97-113.
- Galhaup C., Haltrich D. (2001). Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. Applied Microbiology and Biotechnology. 56: 225-232.
- García -Arrazola R., Rodríguez-Vázquez R., Manrique-Ramírez E., García-Barajas R.J., Díaz Cervantes Ma. D., Fernández-Sánchez J.M. (2002). Bioprocess of wastewater Aromatic Dyes: Cost and Significant Variables. Proceedings In situ and on site bioremediation. 57477-116-7.
- Gomez S., Freire R., Durán N. (2000). Degradation and toxicity reduction of textile effluent by combined photocatalytic and ozonation processes. Chemosphere Journal. 40: 369-373.

- Gómez Bertel, S., Amaya-Bulla, D., Maldonado-Saavedra, C., Martínez-Salgado, M.M., Quevedo-Hidalgo, B., Soto-Gúzman, A., Pedroza-Rodríguez, A.M. (2008). Evaluación de *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger* como alternativa para el tratamiento de aguas residuales del curtido de pieles. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 24(3):93-106.
- Gao , D., Wen, X., Zeng, Y., Qien, Y. (2006). Decolourization of a textile reactive dye with *Phanerochaete chrysosporium* incubated un different ways under non-sterile conditions. *Water Practice & Technology*. 1(3):1-6.
- Gómez -Dorado C., Martínez-Salgado M.M., Nieto-Mosquera D., Pedroza-Rodríguez A., Rodriguez Vazquez R. y Rosas-Acosta J. (2005). Estudio de efecto de dos inductores y un protector enzimática sobre la actividad lacasa y MnP producida por *T. versicolor* y su efecto en la decoloración de efluentes papeleros. *Universitas Scientiarum*. 10:37-45.
- 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.
- Guaratini , C.C.I., Zanoni, M.V,M. (2000). Textile Dyes. *Química Nova*. 23:71-78.
- Gursharan Singh, Neena Capalash, Rashmi Goel, Prince Sharma . (2007). A pH-stable laccase from alkali - toleran proteo bacterium JB : Purification, characterization and indigo carmine degradation . *Enzyme and microbial Technology*: 41: 794-799.
- Gregorio Crini. (2005). Non-conventionallow-cost adsorbents for dye removal : A review. Centrede Spectromerie, SERAC, Universite de Franche-Comte RoutedeGray, *Bioresource Technology Journal*
- Ha H-C., Honda Y., Watanabe T., Kuwahara M. (2001). Production of Manganese Peroxidase by pellet culture of the lignin-degrading basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 55: 704-711.
- Hazrat , A. (2010). Biodegradation of Synthetic Dyes A Review. *Water Air Soil Pollut Journal*. 1-23.
- Hofritcher ., M. (2002). Review: Lignin Conversion by Manganese Peroxidase (MnP), *Enzyme and Microbial Technology*. 30:454-466.
- Henao , L y Fernández, J. (2007). Hongos de la podredumbre blanca y fotocatalisis homogénea nanoestructurada con dióxido de titanio como alternativa Biotecnológica para la remoción del colorante negro reactivo 5. Tesis de Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia.
- Husseiny . (2008). Biodegradation of the Reactive and Direct Dyes Using Egyptian Isolates. *Applied Sciences Research*, 4: 599-606.
- Husain Q. (2009). Peroxidase mediated decolorization and remediation of wastewater containing industrial dyes: a review. *Environmental Science Biotechnology*
- Harald Claus. (2004). Laccases:structure,reactions,distribution, *Micron ScienceDirect* 35: 3–96

- Hernandez D. (2004). Aislamiento de hongos degradadores de colorantes empleados en la industria textil. Tesis de maestría. Instituto politécnico nacional CIBA, Tlaxcala.Mexico.
- Iqbal M. y Saeed A. (2007). Production of an immobilized hybrid biosorbent for the sorption of Ni(II) from aqueous solution. *Process Biochemistry*. 42:148–157.
- José Pedro S. Valente , Pedro M. Padilha , Ariovaldo O. Florentino. (2006). Studies on the adsorption and kinetics of photodegradation of a model compound for heterogeneous photocatalysis on to TiO₂. *Chemosphere Journal* 64: 1128–1133
- José C. Lazo , Abel E. Navarro , María R. Sun-Kou , Bertha P. Llanos. 2008. Síntesis y caracterización de arcillas organofílicas y su aplicación como adsorbentes del fenol, *Revista de la Sociedad Química del Perú*. 74, Nº 1 (3-19)
- Karuppuchamy S., Jeong J.M. (2005). Super-hydrophilic titanium dioxide thin film deposited by cathodic electrodeposition. *Materials Chemistry and Physics*. **93**: 251-254.
- Kirk K., Farrell R. (1997). Enzymatic combustion: The microbial degradation of lignin. *Annual. Reviews*. **41**: 465-505.
- Kunz A., Reginatto V., Durán N. (2001). Combined treatment of textile effluent using the sequence *Phanerochaete chrysosporium* ozone. *Chemosphere Journal*. **44**: 281-287.
- Khelifi R, Belbahri L, Woodward S, Ellouz M, Dhoub A, Sayadi S, Mechichi T. (2010). Decolorization and detoxification of textile industry wastewater by the laccase-mediator system. *Journal of Hazardous Materials*. 175, 802-808.
- Kumari K, Abraham TE. (2007). Biosorption of anionic textile dyes by nonviable biomass of fungi and yeast. *Bioresource Technology*, Elsevier. 98:1704–10.
- Kariminiaae -Hamedaani, H.R., Sakurai, A., Sakakibara, M. (2007). Decolorization of synthetic dyes by a new manganese peroxidase-producing white rot fungus. *Dyes and Pigments* 72: 157-162.
- Kandelbauer A, Guebitz G. (2005). Bioremediation for the Decolorization of Textile Dyes A Review. *Environmental Chemistry* .26
- Knapp S, Newby P, Reece L. (1995). Decolorization of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. *Enzyme and Microbial Technology*. 17: 664.668.
- Kaushik P, Malik A. (2009). Fungal dye decolorization: Recent advances and future potential. *Environment International*; 31, 127-141.
- Kirby , N., Marchant, Roger., McMullan, G. (2000). Decolourisation of synthetic textile dyes by *Phlebia tremellosa*. *FEMS Microbiology Letters*. 188:93-96.

- Khelifi E, Gannoun H, Touhami Y. (2010). Aerobic decolorization of the indigo dye containing textile wastewater using continuous combined bioreactors. *Hazardous Materials* 152: 683-689.
- Lestan D., Lestan M., Perdih A. (1994). Physiological aspects of biosynthesis of lignin preoxidases by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 606-612.
- 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.
- Lakshami U, Chandra V, Deo I, Lataye D. (2009). Rice husk ash as an effective adsorbent: Evaluation of adsorptive characteristics for Indigo Carmine dye. *Journal of Environmental Management*; 90, 710-720.
- Limura Y., Hartikainen K., Tatsami. (1996). Dechlorination of tetrachloroguaiacol by laccase of white-rot basidiomycete *Coriolus versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 45: 434-439.
- Lorenzo M., Moldes D., Couto S., Sanromá Ma. S. (2005). Inhibition of laccase activity from *T. versicolor* by heavy metals and organic compounds. *Chemosphere Journal*. 63: 912-917.
- Mansilla H, Lizama C, Gutarra A, Rodríguez J. Tratamiento de residuos líquidos de la industria de celulosa y textil. Disponible en línea <http://www.cnea.gov.ar/xxi/ambiental/CYTED/20cap13.pdf>. Consultado el 24 de Enero de 2010.
- Manzano Ana., León Teresa., Argüelles Juan., Leal Miguel., (2004). Hongos de la podredumbre blanca con capacidad ligninolítica y acción decolorante sobre el violeta cristal. *Revista de Biología* 18 No 2; pp 123-126.
- MHW , Japan (1993) Unpublished Report on Mutagenicity Test of Indigo Blue. (HPV/SIDS test conducted by MHW, Japan)
- Martínez MM., Rosas J., Pedroza A., Rodríguez R., Gómez C., Nieto D. (2005). Estudio del efecto de dos inductores y un protector enzimático sobre la actividad de las enzimas MnP y Lacasa producidas por *T. versicolor* y su efecto en la decoloración de efluentes de la industria papelera. *Universitas Scientiarum* 10: 37- 45.
- Morales Fonseca, D., Ruiz-Tovar, C., Matínez-Salgado, M.M., Soto-Guzmán A.B., Falcony-Guajardo, C., Rodríguez-Vázquez, R., Pedroza-Rodríguez, A.M. (2010). Desarrollo de un bioadsorbente laminar con *Phanerochaete chrysosporium* hipertolerante a Cd, Ni y Pb para el tratamiento de aguas residuales industriales. *Revista Iberoamericana de Micología*. Aceptado.
- Martinez Salgado, M.M. Gutierrez. V. Pedroza-Rodríguez AM. (2011). Métodos Microbiológicos, físicos y químicos con aplicación ambiental. *Manual de Microbiología Ambiental*. Editorial Universidad Federico Lleras San María. Valparaíso. Chile. Pg 1-132.
- 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.

- Montoya Valencia Fabio Alonso. 2005. Química de los procesos textiles. Ed Universidad Pontificia Bolivariana. Pag 86-89
- Mendoza A., Albores A., Fernández L., Rodríguez-Vázquez R. (2000). Pentachlorophenol biodegradation and detoxification by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal Environmental Toxicology and Water Quality*. 15:107-113.
- Mandeel Q, Laith A, Mohamed S. (2005). Cultivation of oyster mushrooms (*Pleurotus spp.*) on various lignocellulosic wastes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 21, 601 – 607.
- Michel F., Balachandra S., Grulke E., Adinarayana C. (1991). Role of manganese peroxidases and lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of kraft bleach plant effluent. *Applied and Environmental Microbiology*. **57**: 2368-2375.
- Mielgo I., Moreira M., Feijoo G., Lema J. (2002). Biodegradation of a Polymeric Dye in a Pulsed Bed Bioreactor by Immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. *Water Research*. **36**: 1896 – 1901.
- Miller G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar *Ann. Chemistry Journals*. **31**: 426-428.
- Ministerio de Salud Republica de Colombia. 1984. Decreto 1594. Usos del agua y residuos líquidos. 1-52p.
- Mouso N, Diorio L, Forchiassin F. (2007). Acción de *Stereum hirsutum* en la degradación de colorantes. *Revista iberoamericana de micología*. 24: 294-298.
- Morales D. y Ruiz K. (2008). 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
- Mongomery . (2000). Diseño y Análisis de experimentos. Editorial Limusa. Segunda edición. 218- 276.
- Moreno Sandoval, M., Ospina-Velandia, X., Puentes-Cárdenas, J., Pedroza-Rodríguez, A.M. (2009). Efecto del cobre, manganeso y co-sustratos sobre la decoloración del NR5 empleando *Pleurotus ostreatus* inmovilizado en un soporte lignocelulósico. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. In press.
- Morgan G. Vázquez (2010) Biorreactor de tanque agitado www.imgv.es
- Lucasa Marcos, AlbinoA.Diasb, Ana Sampaio, Carla Amaral, Jose A.Peresa. (2007). Degradation of a textile reactive Azo dye by a combined. *Water Research chemical biological process: Fenton s reagent yeast*. 1103-1109
- Maurya NS, Mittal AK, Cornel P, Rother E. (2006). Biosorption of dye using dead macrofungi: effect of dye structure, ionic strength and pH. *Bioresource Technology*. 97:512–21.

- Nyanhongo G., Gomes J., Gübitz G., Zvauya R., Read J., Steiner W. (2002). Decolorization of textile dyes by Laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Water Research*. **36**: 1449-1456.
- Nilsson , I., Möller, A., Mattiasson, B., Rubindamayugi, M. and Welander. (2006). Decolorization of Synthetic and Real Textile Wastewater by the Use of White-rot Fungi. *Enzyme and Microbial Technology*. 38:94-100.
- Nielsen J., Villadsen J. and Lidén, G. (2003). *Bioreaction Engineering Principles*, 2nd edn, Academic / Plenum Publishers
- Novotny C, Svobodova K, Erbanova P, Cajtham L T, Kasinath A, Lang E. (2004). Lignolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biology and Biochemistry*. 36: 1545–1551.
- Ozturk R., Kaikara N. (2005). Production and stimulation of manganese peroxidase by immobilized *Phanerochaete chrysosporium*. *Process Biochemistry* . **40**: 83-87.
- O'Mahony T, Guibal E, Tobin JM. (2002). Reactive dye biosorption by *Rhizopus arrhizus* biomass. *Enzyme Microbial Technology*. 31 :456–63.
- Palmieri G., Bianco C., Cennamo G., Giardina P., Marino G., Monti M., Sonnia G. (2001). Purification, characterization, and functional role of a novel extracellular protease from *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**: 2754-2759.
- Parshetti GK, Kalme SD, Gomare SS. (2007). Biodegradation of reactive blue-25 by *Aspergillus ochraceus* NCIM-1146. *Journal Biotechnology*. 98:3638–42.
- Pazarlıog Lu N. K., Sarişik K., Telefoncu A. (2004). Lignolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate *Soil Biology & Biochemistry* **36**: 1545–1551.
- Pedroza Rodríguez A.M., Campos-Pinilla, C., Quevedo-Hidalgo, B. (2010). Evaluación de un sistema biológico no convencional utilizando un consorcio fúngico para el tratamiento de aguas residuales de la industria textil. Informe Técnico Final. Proyecto 2414 financiado por la Fundación Banco de la República. 57 pgs.
- 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.
- Peiro A.M. (2003). Nuevas aportaciones al desarrollo de metodología en química verde. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. España.
- Podgornik H, Perdih A. (2001). Transformation of Indigo carmine by *Phanerochaete chrysosporium* lignolytic enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*. 29: 166-172.

- Prachi K, Anushree M. (2008). Fungal dye decolorization: Recent advances and future potential. *Environment International*. 35: 127-141.
- Pirkanniem K and Sillanpää P. (2002). Heterogeneous water phase catalysis as an environmental application: A review. *Journal Chemosphere*. **48**. 1047-1060.
- Quintero Luz y Cardona. (2009). Technologies for the decolorization of dyes: indigo and indigo carmine *Escuela de Geociencias y Medio Ambiente. Facultad de Minas. Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín*.
- Rancano, G., Lorenzo. M., Molares, N., Rodriguez, S., San Roman, M. (2003). Production of laccase by *T. versicolor* in an Air lift fermentor. *Process Biochemistry* 39: 467-473
- Ramsay J., Mok W., Luu Y., Savage M. (2005). Decoloration of textile dyes by alginate-immobilized *T. versicolor*. *Journal Chemosphere*. **69**: 956-964.
- Rancaño G., Lorenzo M., Morales N., Rodríguez S., Sanromán A. (2003). Production of Laccase by *T. versicolor* in an airlift fermentor. *Process Biochemistry*. **20**: 467-473.
- Radha , K.V, Regupathi, I, Arunagiri, A , Murugesan,T. (2004). Decolorization of synthetic dyes using *Phanerochaete chrysosporium* and their kinetics, *Process Biochemistry*. 40:3337-3345.
- Rigas F, Dritsa V. (2006). Decolourisation of a polymeric dye by selected fungal strains in liquid cultures. *Enzyme Microbial Technology*. 39:120–4.
- Rekuc Adirana, Bryjak Jolanta, Szyman Katarzyna, AndrzejB.Jarze.(2010).Very stable silica gel bound laccase biocatalysts for the elective oxidation Incontinuous systems *University of Technology, Faculty of Chemistry, Department of Bioorganic Chemistry Institute of Chemical Engineering*, 5 :44-46
- Romero , S., Blázquez, 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.
- Roessler A, Crettenand D, Dossenbatch O, Marte W, Rys P. (2002). Direct electrochemical reduction of indigo. *Electroquímica*. 47: 1989-1995.
- Rodríguez S, Fernández M, Bermúdez R, Morris H. (2003). Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus* spp. *Revista Iberoamericana de Micología*. 20, 164-168.
- Robinson T, McMullan G, Marchant R, Nigam P. (2001). Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology*. 77, 247-255.
- Sahoo D., Gupta R. (2005). Evaluation of ligninolytic microorganisms for efficient decolorization of a small pulp and paper mill effluent. *Process Biochemistry*. **40**: 1573- 1578.

- Sarnthima R, Khammuang S, Svasti J. 2009. Extracellular ligninolytic enzymes by *Lentinus polychrous* Lev. Under solid-state fermentation of potential agro-industrial wastes and their effectiveness in decolorization of synthetic dyes. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 14: 513–522
- Sandoval F. 2005. Caracterisation de la production et optimisation du processus d'extraction des colorants de la plante de añil (*Indigofera suffruticosa* mill). These Doctorale. L' Institut National Polytechnique de Toulouse. 166 p.
- Schmidt . (2005). Optimization and scale up of industrial fermentation processes *Appl Microbiology and Biotechnology* (2005) 68: 425–435.
- Sukumara , A .Sivasamy, G. Swaminathan. (2009). In situ biodecolorization kinetics of Acid Red 66 in aqueous solutions by *Trametes versicolor*. *Journal of Hazardous Materials*. 67.
- Savant , D.V., Rahman, R and Ranade, D.R. (2008). Anaerobic degradation of adsorbable organic halides (AOX) from pulp and paper industry wastewater. *Bioresource Technology*. 52: 189-198.
- Sarika Diwaniyan , Deepti Kharb , Chandralata Raghukumar, Ramesh Chander Kuhad. (2009) Decolorization of Synthetic Dyes and Textile Effluents by Basidiomycetous Fungi1-9
- Salame , T. M., Yarden, O. and Hadar Y. (2010). *Pleurotus ostreatus* manganese dependent peroxidase silencing impairs decolourization of Orange. *Microbial Biotechnology*: 3: 93-106.
- Shaul , G.M., Holdsworth, T.J., Dempsey, C.R., Dostall, K.A. (1991). Fate of water soluble azo dyes in the activated sludge process. *Chemosphere*. 22:107–119.
- Sedarati M. (2003). Transformation of high concentrations of chlorophenols by the white-rot basidiomycete *T. versicolor* immobilized on nylon mesh. *Process Biotechnol*. 6: No 2.
- Sirianuntapiboon , S., Chairattanawan, K., Jungphungsukpanich, S. (2006). Some properties of a sequencing batch reactor system for removal of vat dyes. *Bioresource Technology*. 97: 1243–1252.
- Shen D, Fan J, Zhou W, Gao B, Yue Q, Kang Q. Adsorption kinetics and isotherm of anionic dyes onto organo-bentonite from single and multisolute systems. *Journal of Hazardous Materials* 2009; 172, 99–107.
- Solís M. (2005). Estudio del mecanismo de acción del ABTS y la Lacasa para la oxidación de compuestos orgánicos. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma metropolitana unidad Iztapalapa, México D.F. 112p.
- Sathishkumar , Murugesan, Palvannan. (2010). Production of laccase from *Pleurotus florida* using agro wastes and efficient decolorization of Reactive blue 198. Article first published on line: 28 JUN. 50: 360–367
- Swamy J. and Ramsay J. A. (1999). Effects of Mn^{2+} and NH_4^+ concentrations on laccase and manganese peroxidase production and Amaranth decoloration by *T. versicolor*. *Applied Microbiology Biotechnology*. 51: 391-396.

- Tavares A, Cristóvão R, Loureiro J, Boaventura R, Macedo E. (2009). Application of statistical experimental methodology to optimize reactive dye decolourization by commercial laccase. *Journal of Hazardous Materials*. 162, 1255–1260.
- Tinoco R., Pickard M.A., and Vazquez-Duhalt R. (2001). Kinetic differences of purified laccase from six *P. ostreatus* strains. *Letter Applied Microbiology*. **32**: 331-335.
- Titus M., Molina V., Baños M. (2004). Degradation of chlorophenols by means of advanced oxidation processes: A general review. *Applied Catalysis B: Environmental*. **47**; 219-256.
- Tien M. y Kirk T.K. (1988). Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods Enzymology*. 161:238–249.
- Trujillo M, Valdez N. (2006) El estrés hidrodinámico: Muerte y daño celular en cultivos agitados *Revista Latinoamericana de Microbiología* ; 48 (3-4), 269-280.
- Tauber , M., Guebitz, G. and Rehorek, A. (2005). Degradation of azo dyes by laccase and Ultrasound treatment. *Applied Microbiology Biotechnology*. 71(5):2600-2607.
- Ullah M., Bedford C. and Evans C. (2000). Reactions of pentachlorophenol with laccase from *Coriolaria versicolor*. *Applied Microbiology Biotechnology*. **53**: 230-234.
- Unlu , H.Yukseler, U.Yetis. (2009). Indigo dyeing wastewater reclamation by membrane based filtration and coagulation processes. Middle East Technical University.
- Vautier M., Guillard Ch., Herrmann J. M. (2001). Photocatalytic Degradation of Dyes in Water : Case Study of Indigo and of Indigo Carmine *Journal of Catalysis* **201**: 46-59.
- Valente J, Padilha P. Florentino A. (2006). Studies on the adsorption and kinetics of photodegradation of a model compound for heterogeneous photocatalysis onto TiO₂. *Journal Chemosphere*. 64, 1128-1133.
- 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.
- Waring , D. R. and Hallas, G. (1990). The chemistry and application of dyes. New York and London
- Walter M., Wilso K., Boul L., Ford C., McFadden D., Chong B., Pinfold J. (2006). Field-scale bioremediation of pentachlorophenol by *T. versicolor*. **56**: 51-57.
- Wang Y., Vazquez-Duhalt R. and Pickard M.A. (2002). Effect of growth conditions on the production of manganese peroxidase by three strains of *Bjerkandera adusta*. *Can. Journal Microbiology*. **47**: 277-282.
- Wu J., Zhong-Ya X., Han-Qing Y. (2005). Degradation of lignin in pulp mill wastewaters by white-rot fungi on biofilm. *Bioresource. Technology*. **95**: 1357-1363.

Wong Y and Yu, J. (1999). Laccase catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Water Research*. 33:16:3512-3520

Xian Chun Jin & Gao-QiangLiu & Zheng-HongXu & Wen-YiTao. (2006). Decolorization of a dye industry effluent by *Aspergillus fumigatus* XC6. *Environmental Biotechnology*. 1-5.

Yesilada , O., Asma, D., Cing, S. (2003). Decolorization of textile dyes by fungal pellets. *Process Biochemistry*. 38: 933.938.

Yuxin Wang,Vazquez-Duhalt R., Pickard M. (2002). Purification, Characterization, and Chemical Modification of Manganese Peroxidase from *Bjerkandera adusta* UAMH 8258. *Current Microbiology*. 45: 77–87.

Yuzhu Fu, T. Viraraghavan. (2001). Fungal decolorization of dye easterwater: a review. *Bioresource Technology*. 79: 251.262

Zhao X., Hardinb I., Hwanga H. (2007). Biodegradation of a model azo disperse dye by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 57 1–6.

Zourari H., Labat M., Sayadi S. (2002). Degradation of 4-chlorophenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* in free and immobilized cultures. *Bioresource Technology*. 84: 145-150.

Zeroual Y, Kim BS, Kim CS, Blaghen M, Lee KM. (2006). Biosorption of Bromophenol blue from aqueous solutions by *Rhizopus stolonifer* biomass. *Water Air Soil Pollut*. 177:135–46.

www.EPA.gov.com Environmental Proteccion Agency. Revisado enero 2006

www.degussa.com. 2006.

www.minwconomia.gob.mx . Ministerio de Economía. México. Revisado septiembre 2006