

01177

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN  
INGENIERÍA

**DEGRADACIÓN FÚNGICA  
DEL COLORANTE  
NARANJA ÁCIDO 24**

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN INGENIERÍA  
( A M B I E N T A L )  
P R E S E N T A  
BIÓL. VALERIA DÁVILA SOLANO

DIRIGIDA POR:  
DRA. GABRIELA E. MOELLER CHÁVEZ

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la  
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el  
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: VALERIA DAVILA  
SOLANO  
FECHA: 21/Abril 05  
FIRMA: Valeria DS

MÉXICO 2005

m 343416



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# AGRADECIMIENTOS

## A LOS MIEMBROS DEL JURADO DE ESTA TESIS

DR. GERMAN BUITRÓN MENDEZ. INSTITUTO DE INGENIERIA.  
DRA. GABRIELA MOELLER CHAVEZ. FACULTAD DE INGENIERIA.  
DRA. MARTHA PATRICIA GARCIA CAMACHO. FACULTAD DE QUÍMICA.  
DR. SIMON GONZÁLEZ MARTINEZ, INSTITUTO DE INGENIERIA.  
DR. MARCO ANTONIO GARZON ZUÑIGA. FACULTAD DE INGENIERIA.

*Por el tiempo, los comentarios y sus valiosas observaciones para el enriquecimiento de ésta tesis.*

Al CONACYT por otorgarme la beca durante los estudios de maestría

A la DGEP de la UNAM por la beca otorgada durante los estudios de maestría y principalmente por el apoyo económico otorgado para presentar esta tesis en el congreso internacional del IWA Conference on Environmental Biotechnology: Advancement on water & wastewater applications in the tropics, celebrado en Kuala Lumpur, Malaysia.

A la Fundación TELMEX por otorgarme la beca durante mis estudios de licenciatura y maestría.

Al personal que labora en el Instituto Mexicano de Tecnología del Agua (IMTA) y que en alguna etapa de este camino me apoyo y me dejo sus enseñanzas, especialmente:

A la Dra. Gabriela Moeller Chávez por la oportunidad de realizar este trabajo, que me ha dejado muchas experiencias de vida y profesionales.

Al Dr. Marco A. Garzón por la asesoría en la utilización de biofiltros sobre medios orgánicos, específicamente en Turba, el cual es un proceso de reciente desarrollo en Canadá y Europa, siendo en México los primeros estudios asesorados por usted.  
Gracias por la confianza.

A la M. en I. Yolanda Pica, Ing. Gisel Trujillo y el Q.I. Armando Gómez, por la asesoría y la disponibilidad para la realización de los análisis de las muestras generadas en esta tesis.

Al Biol. Elizur Montiel y al personal del Laboratorio de Micología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), por proporcionar las cepas fúngicas utilizadas en esta investigación. Especialmente, agradezco a la M. en C. Ma. de Lourdes Urdapilleta por la capacitación, asesoría y confianza.

*A los Ingenieros José Cruz, Rosario Figueroa (Chayo), Ma. De los Ángeles Farfan (Gela) y Guillermo Capetillo (Memo), por sus invaluable enseñanzas, la ayuda en los experimentos, su paciencia, pero sobre todo por su amistad.*

A mis profesores y compañeros de la DEPPFI Campus Morelos, con los que coincidí, compartí y me dejaron grandes enseñanzas en esta etapa de formación.

*A la Dra. Ma. Laura Ortiz Hernández que desde mi alma mater me ha motivado para seguir en el área ambiental, dándome un ejemplo del profesionalismo, ética y humanidad, incentivándome a seguir adelante, y brindándome la oportunidad de pertenecer a su equipo de trabajo.*

A mis compañeros del PROGAU de la UAEM por su apoyo para culminar esta meta.

**A MIS AMIGAS** *que me han acompañado en estas travesías profesionales y personales, por su amistad, cariño, paciencia y comprensión. Por crecer y vivir conmigo estas experiencias. Por hacerme más ligero el camino.*

**A MIS PADRES** *que con su infinito amor me lo han dado todo con esfuerzo, sacrificio y dedicación. Por que me han permitido desarrollarme profesionalmente y personalmente. Por ser quienes y como son, y si la vida me diera la oportunidad de escoger a mis padres, los escogería a ustedes nuevamente.*

**AL AMOR DE MI VIDA** *que me ha ayudado a seguir creciendo formando así mi esencia, por cambiar mis esquemas y mis motivos, por querer y desear emprender caminos jamás recorridos. A partir de ti y de nuestro amor, aunque la palabra amor etimológicamente pueda quedar corta en comparación de todo lo que comprende y hace sentir.*

**A DIOS** *por todas y cada una de las bendiciones que le ha dado a mi vida, por la buena estrella que me ha otorgado, por la vida misma.*

**A TODOS**

**GRACIAS**

# ÍNDICE

RESUMEN	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Justificación	5
1.2. Hipótesis	7
1.3. Objetivo General	7
1.3.1. Objetivos Específicos	7
2. MARCO TEÓRICO	8
2.1 Colorantes	8
2.2 Clasificación de los colorantes	9
2.3 Importancia y problemática de los colorantes	15
2.4 Toxicidad de los colorantes	17
2.5 Colorantes tipo Azo	18
3. ANTECEDENTES	21
3.1 Degradación de colorantes	21
3.2 Experimentos de degradación de colorantes tipo Azo	24
3.3 Cepas fúngicas como degradadores de contaminantes	27
3.4 Experimentos de degradación de colorantes por <i>Pleurotus ostreatus</i> y <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	31
4. METODOLOGÍA	33
4.1 Primera Etapa	34
4.1.1. Selección del colorante tipo Azo	34
4.1.2 Análisis del colorante	36
4.1.3 Selección de los hongos	37
4.1.4 Obtención y crecimiento de las cepas fúngicas	37
4.2. Segunda etapa	38
4.2.1 Selección del mejor medio para el crecimiento fúngico	38
4.2.1.1 Evaluación de la velocidad de crecimiento fúngico	39
4.2.1.2. Evaluación de la biomasa generada	39
4.3. Tercera etapa	40

4.3.1	Contacto micelio-colorante	40
4.3.1.1.	En medio sólido	40
4.3.1.2.	En medio líquido	40
4.3.2	Reproducción masiva del micelio	41
4.4	Cuarta etapa	42
4.4.1	Montaje y arranque de reactores	42
4.4.2	Análisis realizados a los biofiltros	44
4.4.3	Análisis estadístico	45
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
5.1	Primera etapa	46
5.1.1	Caracterización del colorante	46
5.1.2	Selección, obtención y crecimiento de las cepas fúngicas	46
5.2	Segunda etapa	47
5.2.1	Selección del mejor sustrato	47
5.2.1.1.	Velocidad de crecimiento	47
5.2.1.2.	Biomasa generada	48
5.3	Tercera etapa	50
5.3.1	Contacto micelio colorante	50
5.3.1.1	En medio sólido	50
5.3.1.2.	En medio líquido	53
5.4	Cuarta etapa	63
5.4.1	Reactores	63
6.	CONCLUSIONES	84
7.	BIBLIOGRAFÍA	86
ANEXOS		95
Anexo 1: Características generales de las cepas fúngicas		95
Anexo 2: Técnicas para la propagación del micelio		97
Anexo 3: Turba, Características y origen		98
Anexo 4: Resultados		100
Glosario		114

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales contaminantes degradados por <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	30
Tabla 2. Técnicas de análisis para el naranja ácido 24.	36
Tabla 3. Parámetros monitoreados en los biofiltros	44
Tabla 4: Resultados de las pruebas de toxicidad	62
Tabla 5: Codificación y tipo de empaque de los reactores	63
Tabla 6: Resultados de toxicidad del colorante en reactores	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estructura general de un colorante azo	19
Figura 2. Procedimiento del trabajo experimental	33
Figura 3: Estructura química del naranja ácido 24	35
Figura 4. Esquema del reactor utilizado	43
Figura 5. Velocidad de crecimiento de las cepas en 2 medios de cultivo	48
Figura 6. Biomasa total generada a los 12 días por las cepas en los medios de cultivo	49
Figura 7. Velocidad de crecimiento de <i>Pleurotus ostreatus</i> en la mezcla sustrato-colorante de tres diferentes concentraciones	50
Figura 8. Velocidad de crecimiento de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> en la mezcla sustrato-colorante de tres diferentes concentraciones	51
Figura 9. Comparación del crecimiento entre las cepas en la mezcla sustrato colorante	52
Figura 10. Resultados de pH en <i>Pleurotus ostreatus</i>	54
Figura 11. Resultados del pH de <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	55
Figura 12. Remoción de color para <i>Pleurotus ostreatus</i> .	57
Figura 13. Remoción de color para <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	58
Figura 14. Remoción de la DQO por <i>Pleurotus ostreatus</i>	59
Figura 15. Remoción de la DQO por <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	60
Figura 16. Resultados de COT de <i>Pleurotus ostreatus</i>	61
Figura 17. Resultados de COT de <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	61
Figura 18. Resultados de pH del influente y de los efluentes de los 3 reactores	65
Figura 19. Resultados de color aparente en los tres reactores	68
Figura 20. Resultados de color real de los tres reactores	68
Figura 21. Coloración del influente y los efluentes de los tres reactores.	69
Figura 22. Disminución de la coloración de los efluentes a la acidificación del influente.	69
Figura 23. Diferencia de la coloración de los efluentes con respecto al influente.	70
Figura 24. Decoloración en el reactor "B" (empacado con turba).	73
Figura 25. Gama de colores obtenido del Reactor "B".	73
Figura 26. Resultados de la DQO de los 3 reactores	74
Figura 27. Resultados de Carbón orgánico total en los tres reactores	76

## Resumen

Los colorantes en los cuerpos de agua, absorben y reflejan la luz solar, pueden interferir en la fotosíntesis y en equilibrio ecológico del sistema acuático, por la disminución de oxígeno disuelto, lo cual interfiere en la autopurificación de los cuerpos de agua contaminados. Los colorantes azo son caracterizados por estar unidos mediante enlaces azo (-N=N-) en asociación con un núcleo aromático o heterocíclico. La mayoría de los colorantes de tipo azo no poseen normalmente ningún efecto citotóxico, mutagénico, o carcinogénico; pero las aminas producidas por el rompimiento de enlace probablemente si produzcan estas afectaciones. Por lo cual es conveniente dar alternativas de solución mediante diferentes tecnologías al problema de la descarga de efluentes con un alto grado de color y o toxicidad. La literatura reporta diferentes tecnologías para la remoción del color, entre los que se puede mencionar los métodos químicos, físicos y los biológicos, sin embargo estos últimos no están ampliamente estudiados. El propósito de este trabajo fue desarrollar un procedimiento a nivel laboratorio para la degradación del colorante azo, por medio de un proceso biológico de tipo fúngico. Debido a las características enzimáticas de *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium*, podrán decolorar al colorante naranja ácido 24. Como primera etapa, las cepas fúngicas se hicieron crecer en dos diferentes sustratos: agar de dextrosa de papa (PDA) y el agar de extracto de malta (EMA) para seleccionar el óptimo y utilizarlo en el crecimiento de las cepas. Posteriormente las cepas se pusieron en contacto con el colorante a 3 diferentes concentraciones (250, 500 y 1000 mg/L) para verificar la remoción del color y su grado de degradación por ambas cepas para seleccionar de esta manera la cepa más eficiente. Posteriormente esta cepa fue inoculada en reactores con tres diferentes sustratos de soporte. Como resultados se obtuvo que las cepas fúngicas presentaron un mayor crecimiento en el medio EMA, por lo cual se eligió este medio para el siguiente paso. La cepa que se desarrollo mejor en presencia del colorante en las tres diferentes concentraciones y en menor tiempo fue *Phanerochaete chrysosporium* provocando una mayor decoloración, por lo cual esta cepa fue inoculada en los reactores con el plástico, la paja y la turba como medios de soporte. El reactor con turba e inoculado con *Phanerochaete chrysosporium* fue el reactor que presentó mejores resultados en la decoloración del naranja ácido 24 obteniendo valores de remoción del color, DQO, COT y toxicidad mayores al 90%.



## **1. INTRODUCCIÓN**

El rápido e incontrolable crecimiento de la humanidad, las actividades industriales y la intensa elaboración de compuestos xenobióticos a nivel mundial, ha traído consecuencias indeseables para el ambiente debido a la presencia de diversos contaminantes que afectan el agua, aire, suelo, flora y fauna. A pesar de que se ha venido haciendo énfasis en el establecimiento de medidas de control y prevención para eliminar estas descargas de contaminantes al ambiente, no se puede ignorar la contaminación que aun sigue presentándose.

Debido al continuo aumento de la población, el suministro finito de agua dulce del planeta se explota hasta el límite y actualmente muchos países son afectados debido a la escasez del vital líquido. La escasez del agua tiene muchas causas, incluida la utilización poco eficiente, la degradación de la calidad del agua disponible a causa de la contaminación y el uso insostenible del agua almacenada en acuíferos subterráneos.

El hombre en la actualidad utiliza el agua con doble finalidad, primero para satisfacer sus necesidades: domésticas, agrícolas e industriales y segundo como medio de transporte y destino de sus residuos. Si la cantidad de residuos no es excesiva y su composición es básicamente orgánica, estos se descomponen debido a la acción de los microorganismos y los procesos que se llevan dentro del cuerpo de agua, efectuándose el proceso de autopurificación en los cuerpos de agua (Robles, 1998). Por el contrario, si sobrepasa en cantidad y suman en su composición residuos tóxicos no biodegradables, los cuerpos de agua sufren progresivamente un proceso de deterioro.

La alta demanda de agua de la población ha llevado al desarrollo y crecimiento industrial cuya actividad esta integrada por una variedad muy amplia de procesos, contándose entre ellos la industria azucarera, textil, alimenticia, agrícola, metalúrgica, petroquímica, celulosa y papel. Cada una de estas industrias descarga volúmenes considerables de desechos líquidos, sólidos y gaseosos generando la mayor parte de los desechos tóxicos que se vierten en los cuerpos de agua, además de polvos, humos y gases que son emitidos a la atmósfera.

Particularmente la industria textil después de sus procesos vierte en sus aguas residuales diferentes tipos de contaminantes que van desde los residuos de fibras hasta los colorantes, los cuales actualmente son más difíciles de degradar ya que se introducen al mercado colorantes sintéticos resistentes a la decoloración para su mayor comercialización. Actualmente existen cerca de 100 mil diferentes tipos de colorantes, de los cuales aproximadamente el 40% son colorantes tipo azo, que son los más comercializados. La industria textil consume grandes cantidades de agua de diferente calidad, y solo para el proceso de teñido de las telas el consumo promedio de agua va desde los 8 a los 151 litros por m<sup>2</sup> de tela (Bishop, 1996 y Kuppusamy, 1995).

Por otra parte, la industria de la elaboración de colorantes y pigmentos también vierten en sus efluentes, diferentes tipos de colorantes en diversas concentraciones, principalmente cuando este proceso de elaboración implica un cambio de fase (por ejemplo de líquido a sólido) o bien si no se hace con la maquinaria adecuada.

Estas aguas residuales con colorantes pueden ser vertidas en el alcantarillado que vaya a una planta de tratamiento o a cuerpos de agua directamente. En el primer caso el colorante representa un problema para la planta tratadora ya que puede colorear las unidades de tratamiento e incluso alterar el proceso. En el segundo caso, puede traer varias consecuencias para los organismos presentes en ese sistema acuático ocasionando un desequilibrio ecológico.

### **1.1. JUSTIFICACIÓN**

El colorante naranja ácido 24 se seleccionó para hacer los experimentos en este trabajo ya que de acuerdo a López (2004), este colorante representa un serio problema para ser eliminado del efluente de la industria productora de colorantes ubicada en Morelos, ya que no es degradado por procesos convencionales como el de los lodos activados y el cual es el utilizado en la planta tratadora de aguas residuales a la cual dicha industria manda su efluente, desencadenando problemas de coloración a las unidades de tratamiento y toxicidad al sistema.

Existen algunas investigaciones que incluyen procesos físicos y químicos para el tratamiento de aguas con altas concentraciones de colorante, sin embargo los autores suelen mencionarlos como procesos de pretratamiento y la necesidad de ser enviados a un posterior tratamiento biológico se hace inminente. Aunado a esto se tiene que tomar en cuenta el alto costo de las sustancias utilizadas en los procesos químicos, las consecuencias de generación de tóxicos orgánicos clorados (al adicionar cloro) que representan un peligro para el ambiente y el ser humano, y la alta producción de lodos residuales debido al empleo de agentes químicos (Moeller, *et al.*, 2000).

La utilización de microorganismos que degradan o transforman diferentes compuestos al ambiente ha tomado relevancia en las últimas décadas. De esta manera las investigaciones han sido dirigidas a explicar la versatilidad metabólica de algunos organismos que degradan contaminantes. Se ha experimentado con diversos tratamientos biológicos basados principalmente en consorcios bacterianos para la degradación de colorantes azo, como el proceso de lodos activados, filtros anaerobios de flujo ascendente, procesos discontinuos secuenciales y biofiltros empacados entre otros, sin embargo la mayoría de estos experimentos producen aminas secundarias que pueden llegar a ser tóxicas, por lo que se ha propuesto la utilización de sistemas secuenciados en condiciones anaerobio-aerobio para lograr una completa oxidación de los compuestos aromáticos generados (Reyes 1999).

Por otra parte, la experimentación con hongos para la degradación de los colorantes azo cada vez tienen mayor éxito. Las ventajas de la utilización de hongos es su rápida propagación y la gran cantidad de enzimas generadas por los hongos que pueden ser los responsables directos de la degradación de los colorantes (Bennett *et al.*, 2002). Se ha comprobado que la manganeso peroxidasa y la lignina peroxidasa producida por hongos como *Phanerochaete chrysosporium* y *Pleurotus ostreatus* oxida completamente a los colorantes de tipo azo, provocando así su decoloración (Ataca, 1994 y Pasti-Grigsby *et al.*, 1992).

Aunado a la capacidad por estos hongos para degradar a los colorantes azo vía enzimática se encuentran el potencial del micelio para absorber el colorante. Dichas características son la base de este experimento, partiendo también de la importancia de dar al hongo un medio de soporte que le proporcione una fuente de carbono adicional así como la ventaja que da un sistema de biopelícula fija (sobre

los de lecho suspendido) al ofrecer al micelio nichos especializado para un crecimiento sin competencia así como el de un mayor tiempo de retención biológica (Bennett, 2002 y Bishop, 1996).

## **1.2. HIPÓTESIS**

Los hongos *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium*, producen enzimas que son capaces de degradar algunos compuestos xenobióticos como los colorantes tipo azo. Con la aplicación de un proceso de tratamiento fúngico será posible degradar al colorante diazoico naranja ácido 24.

## **1.3. OBJETIVO GENERAL**

Desarrollar un proceso de tipo fúngico a nivel laboratorio para el tratamiento del colorante naranja ácido 24.

### **1.3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Evaluar la capacidad de decoloración y reducción de toxicidad del colorante diazo naranja ácido 24 mediante métodos fúngicos.

Comparar la capacidad de decoloración del naranja ácido 24 de *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium*.

Evaluar la capacidad de degradación del naranja ácido 24 en un sistema de biofiltro empacado con un medio de soporte inoculado con el micelio.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Colorantes

Los colorantes son tintes intensos o sustancias orgánicas fluorescentes las cuales imparten color a un sustrato. Los colorantes son solubles y/o pasan a través de un proceso de aplicación el cual al menos temporalmente destruye cualquier estructura de color. Se diferencian de los pigmentos pues estos son partículas sólidas orgánicas prácticamente insolubles de origen vegetal (Bishop, 1996).

Los colorantes se usaban desde tiempos prehispanicos, sin embargo estos colorantes eran naturales, ya sea de origen vegetal, animal o mineral. Los jeroglíficos en Egipto explican las técnicas de extracción y aplicación de los colorantes y al paso de los miles de años esto derivó a procesos de coloración más complicados y la utilización de productos cada vez más recalcitrantes como los colorantes sintéticos. En 1856 se creó el primer colorante sintético: "Mauve". Esto guió al rápido desarrollo de muchos colorantes sintéticos que hasta la fecha ha alcanzado la cifra de 100 mil colorantes; el primer colorante tipo azo fue desarrollado en 1861, siendo este tipo de colorantes los más comerciales actualmente, existiendo cerca de 40 mil colorantes azo en el mundo (Bishop, 1996; Kuppusamy, 1995 y Zollinger, 1987).

Los nuevos colorantes se caracterizan por su resistencia a la luz, al lavado, y al ataque microbiano, lo que los hace atractivos y funcionales a la industria pero dando lugar a compuestos más recalcitrantes (Razo-Flores, *et al.*, 1997; Michaels y Lewis, 1986 y 1985). Este es el caso de colorantes con sustituciones tales como azo, nitro y grupos sulfo (Pagga y Brown, 1986).

Algunos colorantes contienen metales como parte integral de su molécula, como el cobre, níquel, cromo, cobalto, entre otros. Lo cual es de especial interés por su toxicidad en sistemas acuáticos, y también por el daño potencial que representa para los mamíferos.

## **2.2 Clasificación de los colorantes**

Existe una gran variedad de colorantes, por lo cual se hace necesaria una clasificación, de acuerdo con el empleo que se les da y por la fibra en la cual es empleada, los colorantes son clasificados de acuerdo con López (2004), Moeller *et al.*, (2000) y Rodríguez (1998) en:

- 1) **Ácidos:** Los colorantes ácidos son compuestos aniónicos solubles en agua, tienen uno o más grupos sulfónicos o ácidos carboxílicos en su estructura molecular; se utilizan en la coloración del nylon, lana y seda, industria alimenticia y papel. Algunos de estos son contaminantes ambientales de cuidado. Generalmente son complejos azo, triarilmetano o de antraquinona. Este grupo se subdivide en colorantes ácidos simples y colorantes ácidos para mordiente.

Los colorantes ácidos simples tienen tonos diversos y propiedades de fijeza y solidez diferentes. Los diferentes tipos de colorantes que aquí se agrupan desde el punto de vista químico son:

- A) Derivados del trifenilmetano
- B) Derivados del santeño
- C) Colorantes nitro
- D) Colorantes nitroso
- E) Derivados de la antraquinona
- F) Colorantes azinicos
- G) Derivados de la quinolina
- H) *Colorantes azoicos* que contienen el grupo azo y se usan especialmente para colorear fibras de algodón.

En cuanto a los colorantes ácidos para mordiente son conocidos también como colorantes al cromo y su estructura molecular generalmente presenta un grupo hidroxilo en posición orto respecto a un grupo azo o a otro hidroxilo.

- 2) ***Básicos:*** Tiñen en baño neutro las fibras animales y las vegetales mordentadas con taninos. Se les llama básicos debido a que la molécula ionizada presenta una parte coloreada constituida por el catión. La mayor parte de estos colorantes son compuestos amino o amino sustituidos solubles en ácidos que se insolubilizan alcalinizando la solución. Casi todos son triarilmetanos o xantenos. Por lo general son colorantes catiónicos que se utilizan para colorear acrílicos, nylon y poliéster.
- 3) ***Directos:*** Se fijan directamente sobre la fibra, generalmente lana y seda, son con frecuencia compuestos aniónicos azo.



- 4) **Dispersos:** Los colorantes dispersos se aplican en forma de materiales finamente divididos que se absorben en las fibras con las que forman una solución sólida. Usado para colorear los productos sintéticos modernos difíciles de colorear como el acetato de celulosa, plásticos y poliéster. El grupo etanolamilo se encuentra con frecuencia en este tipo de colorantes y ayuda tanto en la dispersión como en la absorción.
  
- 5) **Mordentes:** Estos son los que se combinan con sales para formar materiales coloreados insolubles llamados lacas. Tiñen las fibras mordentadas con hidróxidos metálicos formando lacas.
  
- 6) **Reactivos:** Estos colorantes reaccionan para formar un enlace covalente entre el colorante y la fibra celulósica. Se preparan preferentemente haciendo reaccionar el cloruro de cianurilo con algunos colorantes de los grupos azoicos, antraquinones, ftalocianínicos, entre otros. También se usan como agente de condensación algunos derivados de la triclotriazina. Se tiñen así algodón, rayón y algunos nylons con una relativa velocidad y facilidad en una amplia gama de tonos y colores. Son sólidos a la luz y al lavado pero pocos resistentes al blanqueado.
  
- 7) **Sulfurados:** Son un grupo de colorantes de bajo costo que producen matices opacos en algodón. Obtenidos por fusión del sodio y azufre con diversas sustancias orgánicas, como aminas o fenoles. Tienen buena resistencia a la luz, al lavado y a los ácidos, pero son muy sensibles al cloro o hipoclorito.

- 8) **Tina o Cuba:** De estructura química compleja y por lo general son derivados de antraquinona o indantreno. Los compuestos incoloros se utilizan para impregnar fibras de algodón, las que después son tratadas con un oxidante o se exponen al aire para desarrollar color. Al reducirlos en solución se vuelven solubles en álcalis e incoloras, y se conocen como leucotinas. El colorante más conocido de esta clase es el índigo.

También existe una clasificación basada en la presencia de algunos grupos funcionales cromóforos y la estructura principal que de acuerdo con Moeller *et al.*, (2000) y Rodríguez (1998) se clasifican en:

- a) **Acridínicos:** presentan estructuras simétricas derivadas de la acridina o estructuras asimétricas derivadas de la difenila; generalmente son de tonos amarillos, rojo anaranjado o pardos. En su estructura molecular está presente un núcleo derivado de la acridina con grupos ácidos y sustituyentes amino.
- b) **Antraquinones:** tienen un núcleo antraquinónico con grupos auxóchromos, hidroxilo y/o sulfónicos y algunos sustituyentes que pueden ser incluso bencen-derivados. Su aplicación es extensa y variada a pesar de sus altos costos de fabricación, son de gran aceptación por su potencia tintórea y brillantez.

- c) **Azínicos:** en su estructura está presente un núcleo derivado de la fenazina. Son sustancias que por si mismas no son coloreadas hasta que se introduce un grupo auxócromo en su estructura. Han sido remplazados por los colorantes azoicos y actualmente se fabrican poco.
- d) **Azoicos:** en su estructura molecular está presente uno o más grupos azo. Estos colorantes se depositan directamente sobre la fibra mediante acoplamiento de materiales diazoicos durante su contacto con las fibras. Las bajas temperaturas evitan que el compuesto diazoico se descomponga hasta que está listo para acoplarse. Este grupo de colorantes es el más numeroso, variado e importante, son compuestos químicos xenobióticos, ya que no se encuentran en la biosfera, sino que han sido sintetizados por el hombre (este grupo de colorantes se describirán con más a detalle en el punto 2.5).
- e) **Ftalocianina:** grupo de colorantes que se relacionan con la clorofila y la hemina pero que no se encuentran de forma natural y esto se convierte en el primer cromóforo sintético cien por ciento. Su estructura molecular se deriva del ftalonitrilo o bien de la porfirazina presenta cuatro núcleos unidos por cuatro átomos de nitrógeno exentos de metal o formando una molécula resonante con un metal polivalente.
- f) **Indigoides:** en su estructura molecular está presente un núcleo de índigo con grupos auxócromo, hidroxilo y/o sulfónicos y sustituyentes amino,

halógeno, tio, entre otros; este grupo de colorantes son los más antiguos de manera natural y sintética.

- g) **Nitrosados:** presentan el grupo nitroso en su estructura molecular, este tipo de colorantes son de poca importancia comercial.
  
- h) **Sulfurados:** este tipo de colorantes se denominan así por tener un átomo de azufre en su estructura molecular además de que se solubilizan en una solución de sulfuro de sodio; sin embargo su estructura molecular es muy compleja y poco conocida. Son fácilmente oxidables. La mayoría de los miembros de este grupo son derivados de poliaminas aromáticas o hidroxiaminas. También existen en su estructura molecular grupos cromóforos constituidos por átomos de C y S.
  
- i) **Tiazólicos:** presentan el grupo cromóforo tiazol; sin embargo los derivados simples del tiazol no son sustancias coloreadas sino que el color se presenta al combinarse el tiazol con uno o más núcleos bencénicos; este grupo de colorantes son considerados como intermedios para la fabricación de otros colorantes que están clasificados en grupos diferentes por ejemplo, azoicos y antraquinónicos.
  
- j) **Trifenilmetano:** presenta grupos cromóforos y auxocrómicos y batocrómicos, pero es la insaturación de los enlaces conjugados y el arreglo quinonoide de su estructura la causa de su coloración; este grupo de

colorantes es muy numeroso y variado de colores brillantes poco fijos que se consideran como los precursores de los colorantes sintéticos.

- k) *Xanténicos*: en su estructura molecular se encuentra un grupo cromóforo ceto o amonio, son derivados del xanteno (dibencenpirano); es un grupo pequeño de colorantes que en los tonos amarillo y rojo presentan una fluorescencia extraordinaria.

### **2.3 Importancia y problemática de los colorantes**

Las descargas de los procesos industriales en el país contribuyen de manera importante a la contaminación ambiental. La industria de la fabricación de colorantes vierte sus aguas residuales al medio ambiente. Los colorantes son sustancias de uso cotidiano debido a que son materias primas de sectores tan derivados como el textil, plástico, pinturas, alimentos, cosméticas, farmacéuticas, entre otros. Esta industria en su conjunto engloba a dos grandes grupos: el sector de colorantes y el sector de pigmentos, tanto orgánicos como inorgánicos.

Los colorantes por lo general poseen estructuras complicadas que se logran mediante reacciones con componentes que se conocen como productos intermedios. Los productos intermedios no se utilizan únicamente para la fabricación de colorantes, sino que también se emplean para todo tipo de manipulación química con que se constituyeron estructuras complejas. Además para la síntesis de un colorante se requieren materiales inorgánicos y orgánicos. Posterior de la producción de los colorantes estos son utilizados en algunos procesos de las industrias principalmente la alimenticia y la textil principalmente.

La industria textil y la de los colorantes, al verter sus efluentes a cuerpos receptores sin ningún tratamiento previo crean un problema de contaminación ambiental debido a que sus aguas residuales contienen contaminantes inorgánicos y orgánicos entre los que se encuentran residuos de fibra, de blanqueo, de aprestos, de colorantes, entre otros, los cuales provienen de las diferentes etapas del proceso (Cruz *et al.*, 1996 y Kuppusamy, 1995).

Las aguas residuales que contienen color representan una problemática particular debido a que la concentración del colorante en cuerpos receptores puede ser menor a la de cualquier otro compuesto tóxico permitido por la legislación pero éste puede llegar a ser visible aún por debajo de 1ppm. La visibilidad de los colorantes en el agua depende del color, el coeficiente de extinción y las características del agua (como la turbidez y dureza), y puede llegar a colorear los sustratos, suelos y vegetación que se encuentra en los cuerpos receptores o lo que este en contacto con estos colorantes. Así mismo puede afectar de manera perjudicial la operación y las estructuras de las plantas de tratamiento de aguas residuales cuando los efluentes de aguas residuales con colorantes son conducidos a ellas (Moreno, 1995; Pagga y Brown, 1986; Hutzinger, 1980 y Nelson y Hites, 1980).

Los colorantes en los cuerpos de agua absorben y reflejan la luz solar, lo cual interfiere en los procesos de vida acuática y repercute en el crecimiento microbiano ocasionando una disminución en la capacidad de autopurificación de los cuerpos de agua contaminados. Las altas dosis de color pueden interferir en la fotosíntesis y en el equilibrio ecológico del sistema acuático; también influyen en la disminución de

oxígeno disuelto y el aumento de la demanda química de oxígeno (DQO) (Glynn y Gary, 1999; EPA, 1996 y Strikland y Perkins, 1995).

La producción mundial de colorantes al año llega a ser de hasta 700 000 toneladas, de la cual del 15 al 56 % es vertido al ambiente durante la síntesis y procesamiento de éstos, lo cual representa de 128 a 287 toneladas al día. Durante el proceso de coloración textil solo del 60 al 90% de los colorantes aplicados es aprovechado, el remanente es perdido durante las operaciones de lavado después de la coloración. Aproximadamente 100 mil toneladas de colorantes al año son descargados en los efluentes de los procesos de coloración. Todo esto hace que la magnitud del problema de los colorantes sea mayor (Kupussamy, 1995; Vaidya y Datye, 1982 y Anliker, 1977).

## **2.4 Toxicidad de los colorantes**

A pesar de que la mayoría de los colorantes tienen baja toxicidad, existen algunos que tienen metales pesados como parte integral de su molécula, tales como cobre, cromo, níquel, y cobalto entre otros; esto llega a ser de interés debido a la toxicidad en especies mamíferas y acuáticas. La toxicidad de los colorantes depende del tipo de colorante, la concentración y el tipo de exposición, ya que pueden ocasionar un efecto agudo o crónico al exponerse a los organismos (Slokar y Majcen, 1998; Cruz *et al.*, 1996; y Little y Lamb, 1973).

Algunos colorantes pueden ocasionar desde pequeñas alergias hasta efectos más severos. La repetida exposición a concentraciones de colorantes orgánicos ha sido asociada con hipersensibilidad pulmonar y dérmico, siendo los colorantes de

tipo azo los que ocasionan sensibilidad por contacto, por ejemplo al contacto de la piel con la ropa y uso de las prendas, así como el uso de los cosméticos que contienen colorantes (Correira y Brandao, 1986 y Brandao *et al.*, 1985).

Los xenobióticos (como en este caso los colorantes) son transportados por la sangre a distintos órganos del cuerpo en los que se distribuye y en algunos puede ocasionar daño. Desde el momento en que el xenobiótico penetra en el organismo empieza a ser transformado por enzimas. Al conjunto de estas reacciones que convierten los tóxicos en sustancias químicas distintas y que pueden ser mas o menos dañinas que el tóxico original, se le da el nombre de biotransformación; si los convierten en sustancias mas dañinas se dice que el proceso es de bioactivación mientras que si el proceso lo lleva a ser una sustancias menos dañina se habla entonces de un proceso de destoxificación (Peña *et al.*, 1998).

## 2.5 Colorantes tipo Azo

Los colorantes tipo azo son caracterizados por estar unidos mediante un enlace insaturado a moléculas de nitrógeno. Estos son los conocidos como enlaces azo (-N=N-) en asociación con un núcleo aromático o heterocíclico por un lado y por el otro pueden estar unidos a una molécula insaturada de tipo carbocíclica heterocíclica o alifática. Los grupos azo son generalmente adheridos a anillos de benceno o naftaleno. La Estructura general de un colorante azo se muestra en la figura 1. El color de estos compuestos azo se debe a los enlaces que están asociados a compuestos cromóforos (Rodríguez, 1998; Bishop, 1996; Kuppusamy, 1995 y Quezada y Buitrón, 1996).



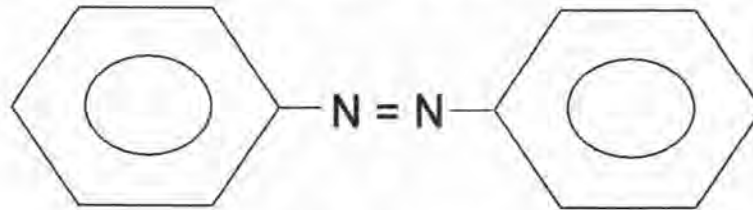


Figura 1. Estructura general de un colorante azo

Los colorantes azo debido a su síntesis simple y relativa, y al número extenso de sustituyentes son el grupo más numerosote los colorantes sintéticos. Este grupo se subdivide con relación al número de grupos azo presentes en la molécula del colorante:

- ⇒ Mono-azoicos: con un grupo azo
- ⇒ Di-azoicos: con dos grupos azo
- ⇒ Tri-azoicos: con tres grupos azo
- ⇒ Poli-azoicos: con cuatro o más grupos azo.

Por otra parte los colorantes pueden subdividirse también en dos grupos iónicos y no iónicos. Aunque el valor máximo de absorción está en el rango de luz UV-visible (240 a 300 nm), las presiones de vapor disponibles son muy bajas, en el rango de  $10^{-20}$  a  $10^{-8}$  mm Hg. La hidrólisis es, a excepción de colorantes reactivos, muy baja. Por lo general los colorantes azo iónicos son completa o parcialmente disociados en solución acuosa. Los colorantes azo no iónicos son poco solubles en agua (<100 mg/L) (López, 2004).

Los colorantes de tipo azo solubles en agua son metabolizados por las azoreductasas de la microflora gastrointestinal y los insolubles son metabolizados

por enzimas hepáticas. El primer paso catabólico de los colorantes azo, en el cual se presenta la disminución en el color es la reducción del doble enlace azo para producir aminas aromáticas. Estas arilaminas aparentemente no son mutagénicas por sí mismas, sin embargo, en el metabolismo de los mamíferos pueden ser oxidadas a N-hidroxiderivados, y esos son subsecuentemente transformados en electrófilos reactivos capaces de formar enlaces covalentes con el ADN (Cerniglia, *et al.*, 1982 y Combes y Haveland-Smith, 1982).

Bajo condiciones anaeróbicas muchos tipos de bacterias pueden reducir los colorantes rompiendo el enlace azo y formando aminas aromáticas tales como benzidina, acetil benzidina, naftilamina y aminobifenil. La mayoría de los colorantes de tipo azo no poseen normalmente ningún efecto citotóxico, mutagénico, o carcinogénico; pero las aminas producidas por el rompimiento de enlace probablemente sí produzcan estas afectaciones (Bishop, 1996).

En cuanto a la toxicidad de los colorantes azo, solo algunos muestran valores de  $DL_{50}$  superiores a 250 mg/Kg inferiores a 250 mg/L peso cuerpo mientras que la mayoría de los colorantes muestran valores de  $DL_{50}$  entre 250-2 000 mg/Kg. La mayoría de este tipo de colorantes por sí mismo no produce efectos mutagénicos o carcinogénicos (Clarke y Anliker, 1980).

### **3. ANTECEDENTES**

#### **3.1 Degradación de colorantes**

Los colorantes sintéticos son difíciles de degradar. Los colorantes tipo azo, por consecuencia, también son difíciles de degradar. Se han utilizado varias metodologías como neutralización, coagulación, degradación química y degradación fotocatalítica, ozonación, filtración por membranas, intercambio iónico, adsorción con carbón activado, precipitación y floculación. A pesar de que los procesos físicos y químicos producen efluentes de buena calidad en la mayoría de las ocasiones generan un alto costo en sus reactivos, procesos o regeneración. Por otra parte la disposición de los lodos generados en este tipo de tratamientos puede llegar a representar un grave problema. En comparación con los tratamientos mencionados, el tratamiento biológico resulta más económico (Quezada *et al.*, 1999; Cruz *et al.*, 1996; Kuppusamy, 1995; Mckay *et al.*, 1978 y Oswalt y Land, 1973).

Hoy en día hay un creciente interés en el área de la biotecnología para la protección y restauración del ambiente, especialmente en la prevención de la contaminación a través de procesos biotecnológicos llamados “tecnologías limpias” las cuales llegan a ser importantes para un desarrollo sustentable. La mayoría de los procesos biotecnológicos incluyen digestores aeróbicos y anaeróbicos utilizando poblaciones de microorganismos que están de manera natural en los ecosistemas. A través de una diversidad de especies, se puede degradar una serie de compuestos orgánicos creados por el hombre, incluyendo aquellos que no se pueden degradar por vía química (Ortiz-Hernández y Sánchez-Salinas, 1999).

La biotecnología ambiental se define como el desarrollo, uso y regulación de sistemas biológicos para la restauración de ambientes contaminados y para llevar a cabo procesos acordes con el equilibrio ambiental.

La presencia de los contaminantes en los suelos y en el agua ha ocasionado que muchos microorganismos ahí presentes hayan desarrollado la capacidad bioquímica para degradarlos. Esta capacidad es precisamente la base de las tecnologías de biorremediación que en los últimos años han surgido como una alternativa muy atractiva para la limpieza de diferentes ambientes contaminados.

Una de las principales características de la biorremediación es que los contaminantes realmente se pueden transformar en compuestos inocuos al ambiente y no solo se transfieren de lugar, como sucede en algunos tratamientos fisicoquímicos. En estas tecnologías se explota la capacidad de aclimatación que los microorganismos han logrado desarrollar bajo las condiciones que imperan en un lugar contaminado. Dichas condiciones pueden llegar a ser adversas para su sobrevivencia. Sin embargo, las diferentes poblaciones se adaptan organizando su interacción para actuar de manera sinérgica con lo cual se logra la degradación de compuestos contaminantes (Saval, 1995).

En la biorremediación se lleva a cabo la desintegración de componentes orgánicos por medio de microorganismos generando dióxido de carbono y agua o metano como productos. Es decir, el principal objetivo de la biorremediación es la degradación de desechos tóxicos para transformarlos en componentes más sencillos e inocuos al ambiente.

Las técnicas de biorremediación ofrecen ventajas como las de ser más económicas y rápidas en comparación con otros tratamientos fisicoquímicos. Tienen un costo aproximado de 100 a 250 dólares por metro cúbico y los métodos convencionales (incineración) cuesta entre 250 y 1000 dólares por metro cúbico de medio. El ecosistema del lugar tratado se recupera sin provocar más daño o efectos secundarios ya que no se generan desechos pues los contaminantes son realmente degradados. Por lo cual los procesos biológicos son una alternativa para tratar efluentes textiles (Eweis *et al.*, 1998).

Los colorantes azo son generalmente persistentes bajo condiciones aeróbicas, y en condiciones anaeróbicas este tipo de colorantes sufren una reducción produciendo aminas aromáticas, las cuales son recalcitrantes en los sistemas de tratamientos anaeróbicos y requieren condiciones aeróbicas para su degradación o bien en este tratamiento muchas veces se hace necesario la presencia de un cosustrato. La reducción anaeróbica de azo es no específica y se requiere un tratamiento anaeróbico y luego un aeróbico para la mineralización de las aminas. El grado de degradación de los colorantes va a estar determinado por la estructura de los mismos (Quezada *et al.*, 1999; Van der Zee *et al.*, 1999 y Bishop, 1996).

La degradación de los tintes que presentan un compuesto azo se realiza en dos pasos: el primero consiste en la penetración al enlace azo y la ruptura de éste y el segundo paso es la mineralización de los productos intermediarios. Este paso es de suma importancia ya que muchas de estas aminas aromáticas producidas como productos intermediarios pueden ser tóxicas, cancerígenas o mutagénicas (Quezada *et al.*, 1999; Bishop, 1996; Quezada y Buitrón, 1996 y Kuppusamy, 1995).

En la última década se han realizado diversos estudios para la degradación de colorantes en los efluentes textiles, tratando de sustituir a los métodos convencionales, que principalmente incluían métodos físicos y químicos, por métodos biológicos y, a pesar de que se han encontrado obstáculos, éstas investigaciones cada vez son más frecuentes obteniendo un mayor éxito.

### **3.2 Experimentos de biodegradación en los colorantes tipo azo**

Haug *et al.* (1991) reportaron la mineralización de un colorante azo sulfurado, amarillo mordente 3, en un proceso anaerobio-aerobio con un consorcio bacteriano de tipo anaerobio facultativo, y reportaron una amina aromática como producto. Por otra parte, Donlon *et al.* (1997) reportaron la mineralización parcial del colorante azo anaranjado mordante 1, en un reactor anaerobio de flujo ascendente alimentado con glucosa como sustrato. En esta investigación se llegó a obtener hasta el 90% de la mineralización de este colorante, ya que de forma constante obtuvieron un par de aminas aromáticas y que a través del tiempo se llegó a la mineralización de una de ellas hasta metano, lo cual no se logró con la otra amina producida, y para lo cual sugieren un tratamiento aerobio posterior para la mineralización de las aminas resultantes del colorante inicial.

Kuppusamy (1995) menciona una serie de estudios que han tenido como objetivo la decoloración de efluentes textiles en los cuales se usaron cepas puras de *Pseudomonas ssp.*, *Rhodotorula ssp.*, *Streptomyces spp.* y *Phanerochaete chrysosporium*. Así mismo menciona el tratamiento mediante humedales con la utilización de lirio acuático.

---

Cruz *et al.* (1996) hacen una comparación entre diversas tecnologías para el tratamiento de aguas residuales de la industria textil donde exponen que, a pesar de que el tratamiento biológico es más económico que el físico y el químico, el primero se ve restringido al presentarse sustancias resistentes a la biodegradación, lo cual mencionan podría ser resuelto por un pretratamiento químico o bien con la utilización de un inóculo suficientemente aclimatado y específico para alcanzar las mejores eficiencias del tratamiento biológico. Por otra parte mencionan la importancia que tiene un tratamiento generador de menor cantidad de lodos para lo cual la combinación de un tratamiento físico con un biológico solucionaría dicho problema.

Bishop (1996) menciona la ventaja sobre utilizar tratamientos con biopelícula fija sobre los de lechos de biomasa suspendida. Los primeros ofrecen nichos especializados para que los microorganismos crezcan sin mayor competencia, además de que también ofrecen un tiempo de retención microbiano más largo que los de biomasa suspendida. Además probó la biodegradación aerobia del colorante azo naranja ácido 7 y 8 obteniendo alrededor del 90% de biodegradación con un reactor de biopelícula a flujo continuo. Menciona la existencia de rangos límites para que la concentración de colorante no inhiba la respiración microbiana.

Buitrón (1996) discute sobre el uso de los procesos discontinuos secuenciales o SBR (del inglés Sequencing Batch Reactor) como alternativa para el tratamiento de aguas residuales textiles. Quezada y Buitrón (1996) reportan la biodegradación aerobia de colorantes tipo azo, específicamente el rojo ácido 151, por medio de un sistema aerobio en sistema SBR el cual es una buena alternativa para la aclimatación de los microorganismos a compuestos xenobióticos como los colorantes tipo azo.

Guerrero *et al.* (1996) reportan la biodegradación anaerobia de colorantes tipo azo vía sulfato reductoras del colorante azo marino terasil disperso, y señalan que la eliminación del color no necesariamente implica siempre una disminución de la materia orgánica, lo cual implicaría a su vez que el compuesto azo solo es degradado parcialmente quedando las aminas aromáticas correspondientes. La adición de sulfatos favorece la actividad de las bacterias sulfato-reductoras para que promueva la bioeliminación de las aminas resultantes.

Oxspring *et al.* (1996) realizaron experimentos en un filtro anaerobio de flujo ascendente con un consorcio microbiano inmovilizado y con el colorante azo negro remazol B. El proceso en batch consto de 96 horas y se observó una remoción de color hasta por encima del 95%. A través de electroforesis capilar encontraron que el grupo cromóforo no había sido disociado y se detectaron aminas aromáticas como productos.

Quezada *et al.* (1999) reportan la degradación aeróbica de algunos colorantes tipo azo como naranja ácido 7 y 8, amarillo ácido 151 y 36 y rojo ácido 18, 29 y 151, utilizando biofiltros empacados con roca volcánica porosa, trabajados en secuencia tipo batch, con un volumen de intercambio entre cada ciclo del 75% del volumen total. Reportaron que los colorantes iniciales fueron removidos hasta CO<sub>2</sub> en un 73%; mencionan que es necesario un tiempo de adaptación de los microorganismos al colorante antes de que empiece el proceso de biodegradación.

Kuppusamy y Briones (1999) probaron con un reactor anaeróbico de lodo granular expandido para el tratamiento de aguas residuales textiles, el cual funcionó



adecuadamente, sin embargo recomiendan el uso posterior de un tratamiento aeróbico para el pulimento del agua.

Cruz y Buitrón (2000) reportan la biodegradación del colorante azo azul disperso 79 el cual fue degradado por un proceso acoplado anaerobio-aerobio, removiendo el 98% del colorante; señalan que las aminas secundarias que se formaron en el filtro anaerobio fueron mineralizadas en el filtro aerobio.

Hasta el momento este tipo de experimentos solo se ha hecho con cultivos enriquecidos y adaptados a un solo colorante, o bien con consorcios bacterianos no identificados (Haug *et al.*, 1991 y Kulla *et al.*, 1983).

### **3.3. Cepas fúngicas como degradadores de contaminantes**

Por otra parte los hongos de la podredumbre blanca (como lo son *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium*) han sido utilizados ampliamente para la degradación de muchos contaminantes e incluso los más complejos; ésta capacidad de degradación de xenobióticos es ampliamente relacionada con la actividad lignolítica y las enzimas que segregan estos hongos. Su principal característica que los distingue de otros organismos es la de mineralizar los componentes de la lignina a bióxido de carbono y agua (Moreira *et al.*, 1998).

La utilización de hongos basidiomicetos del género *Pleurotus* para la degradación de xenobióticos, en este caso el colorante (Buitrón, 1996), se basa en la inespecificidad del sistema degradativo desarrollado por estos hongos para despolimerizar y mineralizar la lignina, polímero aromático estructuralmente

relacionado con muchos de los compuestos que causan problemas de contaminación al ambiente; ésta capacidad de *Pleurotus* y otros hongos se debe a la presencia de enzimas extracelulares como la veratryl alcohol oxidasa (Ander y Marzullo, 1997), glucosa oxidasa (Shin *et al.*, 1993), manganeso-peroxidasa (MnP), y la lacasa (Renhammar y Malstrom, 1981) (más una aril-alcohol oxidasa productora de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), siendo estas dos últimas las más predominantes en *Pleurotus sp.* (Hatakka, 1994).

*Phanerochaete chrysosporium* produce las enzimas de manganeso peroxidasa y lignino peroxidasa durante una etapa de metabolismo secundario, disparado principalmente por una limitación de la fuente de nitrógeno; por otra parte produce un sistema generador de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> glioxal oxidasa. (Kirk y Farrell, 1987 y Gold *et al.*, 1984).

La actividad enzimática es muy importante en el proceso de decoloración por este tipo de hongos y la literatura menciona constantemente dos enzimas responsables de esta decoloración, manganeso peroxidasa (MnP) y lignino peroxidasa (LiP). Sin embargo la lacasa a pesar de que no se han hecho estudios específicos ha sido reportada como una enzima también importante en este proceso de decoloración. Cameron *et al.* (2000) mencionan que este tipo de hongos de “pudrición blanca” degradan la lignina a través de la secreción de las peroxidases usadas como mediadores redox y el mecanismo utilizado es de radicales libres.

Generalmente los reportes de enzimas de *Phanerochaete chrysosporium* no incluyen a la lacasa por no encontrarse presente. Sin embargo, Srinivasan *et al.* (1995) la reportan presente en cultivos ricos con celulosa y no en glucosa como generalmente se hacen los experimentos.

La lacasa esta reportada principalmente para el metabolismo de *Pleurotus ostreatus* como una enzima extracelular y degradadora de lignina, Zohar *et al.* (1992) en su experimento reportan solo la aparición de ésta enzima en el cultivo de *Pleurotus ostreatus* en comparación de *Phanerochaete chrysosporium* y principalmente durante la colonización del micelio.

En anteriores experimentos *Phanerochaete chrysosporium* ha degradado a plaguicidas organoclorados tan persistentes como el dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), compuestos aromáticos plurinucleares, plásticos como el polietileno, bifenilos policlorados (PCB), hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) y colorantes (Bogan *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1991; Bumpus, 1989 y Bumpus y Aust, 1987).

Pointing (2001) menciona la viabilidad de la biorremediación mediante los hongos de la “pudrición blanca” haciendo énfasis en una gran variedad de contaminantes degradados por *Phanerochaete chrysosporium*. Cameron *et al.* (2000) hacen un recuadro de los principales contaminantes degradados por este hongo, mientras que Fu y Viraraghavan (2001) dan un listado de los principales hongos degradadores de colorantes, en los cuales incluyen a *Phanerochaete chrysosporium*. En la tabla 1, se conjunta la información de estos investigadores para dicho hongo.

Tabla 1. Principales contaminantes degradados por *Phanerochaete chrysosporium*.

TIPO DE CONTAMINANTE	NOMBRE ESPECIFICO
Biopolímeros	Celulosa, Lignina Kraft y Lignina
Polímeros Sintéticos	Policrilamina, Nylon, PVC
Compuestos Aromáticos Clorados	2,4 Diclorofenol, 2,4 Dicloroanilina, Pentaclorofenol, Triclorofenales
Colorantes	Colorantes azo, azul bromofenol, cristal violeta, Rojo congo, Indigo carmin, verde ácido 27, azul ácido 25, naranja ácido 74, negro ácido 24, naranja disperso3, amarillo ácido 9, Poly R 481, Poly S 119, Poly T 128, Poly Y 606 y Poly B 411. naranja I y II
Explosivos	TNT, DNT, RDX, NHM, Nitroglicerina
Plaguicidas	Organoclorados como el DDT, Clordanos, Lindanos, Aldrinos y Dieldrinos
Compuestos Aromáticos Policíclicos	Antraceno, Naftaleno, Bifenilos Policlorados (PBCs), Hidrocarburos, policíclicos aromáticos (PAH),
Otros	Azufre, Ácidos

Fuente: Fu y Viraraghavan 2001; Pointing, 2001 y Cameron *et al.*, 2000.

### **3.4. Experimentos de la degradación de colorantes por *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium***

La actividad lignolítica de este tipo de hongos se ha probado con colorantes como poly R478, azul de metileno, azul de coran y rojo fenol, entre otros (Chahal, *et al.*, 1995; Platt *et al.*, 1985 y Glenn y Gold, 1983).

Van der Waarde *et al.* (1996) emplearon una técnica donde se combinó la producción electroquímica in situ de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y la actividad degradadora de *Phanerochaete chrysosporium* para la decoloración de efluentes con colorantes dispersos y reactivos en un reactor continuo de flujo ascendente.

Young y Yu (1997) reportaron a *Phanerochaete chrysosporium* como un degradador versátil de las estructuras químicas de algunos colorantes sintéticos y mencionan a la lignina peroxidasa como la enzima responsable de esta reacción, principalmente con un pH ácido.

Así mismo *Pleurotus ostreatus* también es reportado como degradador de compuestos contaminantes como los colorantes azo. Kwang-Soo y Chang-Jin (1998) mencionan que este hongo decoloró a varios tintes recalcitrantes como el trifenilo de metano, heterocíclicos, poliméricos y de tipo azo. En sus experimentos el azul de bromofenol fue el colorante que obtuvo hasta el 98% de la decoloración. Ellos hicieron cultivos de *Pleurotus ostreatus* en medios limitados de nitrógeno para la obtención de las peroxidases y la actividad decoloradora fue determinada espectrofotométricamente.

Rodríguez *et al.* (1999) hicieron una comparación entre 15 diferentes cepas de hongos para evaluar su capacidad de decoloración sobre algunos colorantes. Entre los géneros estudiados se encontraban *Phanerochaete*, *Pleurotus* y *Trametes*. Siendo estos dos últimos los que más altos valores de decoloración presentaron. En este estudio se identificó a la lacasa como la enzima responsable de dicha decoloración.

## 4. METODOLOGÍA

El procedimiento experimental del presente trabajo se realizó de acuerdo con la Figura 2.



Figura 2. Procedimiento del trabajo experimental

## 4.1 PRIMERA ETAPA

### 4.1.1. Selección del colorante tipo azo

Una industria productora de colorantes azo, ubicada en CIVAC (Ciudad Industrial del Valle de Cuernavaca) en el municipio de Jiutepec, Morelos, presenta una problemática especial con los colorantes ya que, después de su elaboración, su efluente presenta una concentración elevada de color. Este efluente es vertido al alcantarillado para el tratamiento de aguas residuales en ECCACIV (Empresa para el Control de la Contaminación del Agua en la zona de CIVAC), representando un problema para la planta tratadora en sus procesos, debido por un lado a la inhibición de los microorganismos por el colorante en el proceso biológico, y por otra parte en la mala imagen que se da dado a que el colorante imparte color a las estructuras de los reactores.

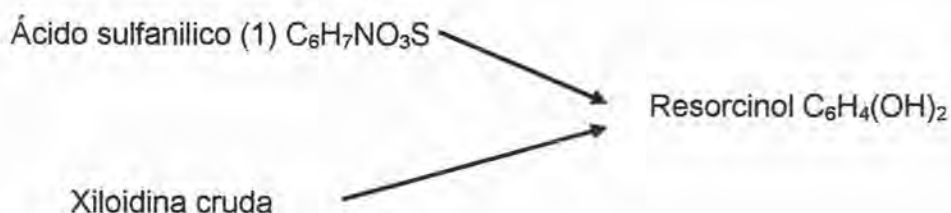
Uno de los colorantes producidos que mayores conflictos les causa a la industria en sus instalaciones por ser el que producen en mayores volúmenes es el naranja ácido 24, colorante diazo. Este colorante es vendido a industrias textiles y principalmente para el teñido de cuero en el estado de Morelos y Guanajuato entre otros, pero también es vertido en el efluente de la industria a la hora de elaborarse. Además, se ha visto que el uso de cloro y otros oxidantes no es efectivo para su remoción.

La coloración que imparte el naranja ácido 24 es intensa. Es oscuro por lo que, aunque sea a pequeñas concentraciones, es visible en el agua y, por lo tanto, persistente. Este colorante fue seleccionado para el trabajo del proyecto de tesis porque representa una problemática real en la industria productora de colorantes azo



así como también en ECCACIV. Así como por su disponibilidad, la alta intensidad que imparte aún en baja concentración y por su dificultad para ser degradado.

El naranja ácido 24 es un compuesto diazo descubierto por O. Wallach en 1881 (López, 2004). De matiz naranja a rojo naranja muy intenso sirve para colorear lana, nylon y cuero. Es soluble en agua y en etanol. Se sintetiza de la siguiente manera:



Es un compuesto formado por acoplamiento en las posiciones 2 y 4 del ácido sulfanílico y de la xiloidina respectivamente con el resorcinol. La estructura química de este colorante se muestra en la figura 3, en donde se observan dos enlaces azo asociados a tres anillos bencénicos.

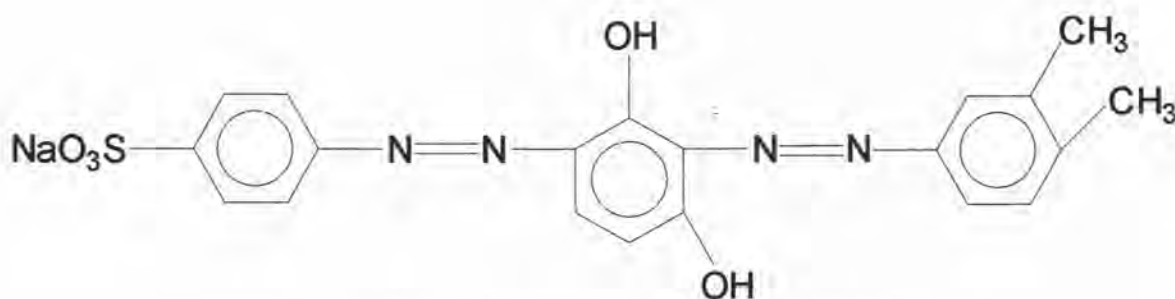


Figura 3: Estructura química del naranja ácido 24

Al rompimiento reductivo de uno o más grupo azo del colorante naranja ácido 24, se pueden liberar a las aminas 2, 4-xilidina y 2, 6-xilidina. Ambas aminas están clasificadas como carcinogénicas (López, 2004).

#### 4.1.2. Análisis del colorante

Las técnicas de los análisis realizados al naranja ácido 24 en los experimentos de este trabajo se muestran en la tabla 2. La caracterización del colorante utilizado fue realizada por López (2004), quien obtuvo el espectro de absorción para obtener el pico máximo de absorbancia, y la curva de calibración de éste colorante con la formula de Lamber-Beer relacionando la absorbancia con la concentración (en mg/L) del colorante.

Tabla 2. Técnicas de análisis para el naranja ácido 24.

PARAMETRO	METODO	EQUIPO
Espectro de Absorción	Barrido en la región UV-VIS del colorante a diferentes diluciones	Espectrofotómetro UV-VIS, CINTRA 5.
Curva de Calibración	Formula de Lamber-Beer	Espectrofotómetro HACH
Concentración del colorante	Medición de la absorbancia y utilización de la curva de calibración	Espectrofotómetro HACH
pH	Método Potenciometrico	Potenciómetro Orión serie 710A
Demanda Química de Oxígeno (DQO)	Método colorimétrico de Reflujo Cerrado	Reactor y Espectrofotómetro HACH
Carbón Orgánico Total (COT)	Método de combustión por oxidación catalítica y calentamiento.	Analizador de Carbono Orgánico Total TOC-5050 <sup>a</sup> SHIMADZU con automuestreador
Toxicidad	Disminución del 50% de la bacteria fluorescente <i>Photobacterium phosphoreum</i>	Equipo Microtox

#### 4.1.3. Selección de los Hongos

De acuerdo con el interés que en los últimos años se le ha tomado al grupo de basidiomicetos debido a la capacidad para degradar contaminantes orgánicos recalcitrantes a través de sus enzimas se eligió trabajar con *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium*, cuyas características generales son descritas en el anexo 1.

#### 4.1.4. Obtención y crecimiento de las cepas fúngicas

Las cepas de *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium* fueron proporcionadas por el Herbario Micológico de Morelos (HEMIM) del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB) de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM).

Ya obtenidas las cepas se procedió a la verificación de la viabilidad de los hongos y a su propagación. La propagación del hongo puede realizarse por dos técnicas de acuerdo a Montiel *et al.* (2001) la cual dependerá de la disponibilidad de la cepa:

1. *Aislamiento vegetativo*: Se toma un fragmento de aproximadamente de 2 a 3 mm del cuerpo fructífero y se coloca con la ayuda de unas pinzas de disección en cajas con medio previamente esterilizado (agar de extracto de malta o agar de dextrosa de papa); se incuba a 25° C por 4 días hasta observar el micelio.

2. Aislamiento multiespórico: De una esporada se corta aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> y se coloca en tubos de ensaye haciendo algunas diluciones para posteriormente sembrar en cajas de Petri. Se incuba a 25° C por una semana hasta observar el micelio (técnica usada para la obtención de *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium*).

## 4.2. SEGUNDA ETAPA

### 4.2.1. Selección del mejor medio para el crecimiento fúngico

Una vez que el micelio cubre toda la caja podemos utilizarlo para seguir propagándolo en diferentes medios de cultivo, escogiendo aquel medio que proporcione las mejores condiciones al organismo y éstas se muestren con un periodo corto de crecimiento así como el que le ayude a conservar las características iniciales de la cepa seleccionada.

Esta etapa del experimento consistió en el crecimiento de las cepas de *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium* en dos diferentes medios de cultivo: agar de extracto de malta (EMA) y agar de dextrosa de papa (PDA), ambos medios reportados por la literatura como los medios óptimos utilizados para el crecimiento de hongos y han sido recomendados para el crecimiento específico de *Pleurotus ostreatus* (Montiel *et al.*, 2001). Los medios de cultivo fueron preparados según las instrucciones del fabricante y fueron vertidos (20 mL por caja de Petri) en cajas de Petri de 8.8 cm de diámetro y fueron inoculados respectivamente con los hongos seleccionados. Este procedimiento se hizo por triplicado para cada una de las

cepas en los dos diferentes tipos de medio. Las cajas fueron encubadas a una temperatura de 28° C en condiciones de oscuridad por 12 días.

Los parámetros a evaluar en esta etapa fueron la velocidad de crecimiento y la biomasa generada de acuerdo a la metodología empleada por Sánchez-García (2004), Acosta-Urdapilleta (2000), Montiel *et al.* (2001) y Martínez (1984). Cabe aclarar que estos parámetros, metodología y denominaciones son específicos para evaluar el crecimiento de micelios.

#### **4.2.1.1. Evaluación de la velocidad del crecimiento fúngico**

Para determinar la velocidad de crecimiento se determinó midiendo con un vernier el número de cm avanzados diariamente (cada 24 hrs) por la colonia, a partir del inóculo (0.5 cm) colocado en la parte central de la caja de Petri hasta llenar su diámetro. Se reportó el promedio de las tres replicas por cada medio por cepa.

#### **4.2.1.2. Evaluación de la biomasa generada.**

La cuantificación de la biomasa consistió en la determinación del crecimiento de las cepas en EMA y en PDA en gramos. Al término del tiempo establecido (12 días) en un vaso de precipitado con 100 mL de agua destilada se depositó el micelio adherido al medio de cultivo y se fundió durante 1.5 minutos el medio de cultivo por calentamiento en un horno de microondas (Whirlpool). La biomasa micelial fue separada por filtración en caliente usando papel filtro previamente pesado (balanza analítica). El papel filtro que contiene el micelio se deshidrato a una temperatura de 65°C dentro de una mufla durante 24 horas, finalmente el papel filtro ya con el

micelio deshidratado se volvió a pesa y por diferencias de pesos se obtuvo la biomasa generada. Se sacó el promedio de las tres repeticiones y el resultado fue reportado en gramos por caja de Petri.

### **4.3. TERCERA ETAPA**

#### **4.3.1. Contacto micelio-colorante**

Una vez seleccionado el mejor medio de cultivo se procedió a realizar la parte experimental donde se puso por primera vez a las cepas fúngicas en contacto con el colorante. Esta etapa tuvo dos pruebas:

##### **4.3.1.1. En medio sólido (cajas de Petri):**

Se preparó el medio de cultivo (EMA) de manera regular, se adicionó colorante a tres diferentes concentraciones (250, 500 y 1000 mg/L). Esta mezcla se vertió en cajas de Petri de plástico de 8.8 cm de diámetro, cada concentración por triplicado. Una vez listas las cajas Petri se dispuso a inocular el micelio. Esto con ayuda de un horador de 0.5 cm de diámetro (para que el inóculo del micelio fuera homogéneo en todos los casos) y una aguja de disección previamente esterilizados. Una vez inoculadas las cajas se incubaron a 25°C durante 12 días. Diariamente se observaba y cuantificaba el crecimiento de las cepas fúngicas.

##### **4.3.1.2. En medio líquido (matraces):**

Se preparó de manera convencional el medio de cultivo seleccionado (extracto de malta) en forma de caldo con el colorante naranja ácido 24 en las tres

diferentes concentraciones (250, 500 y 1000 mg/L), cada una por triplicado. Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 1 L los cuales contenían 300 mL de esta mezcla cada uno. De la misma manera que en las cajas de Petri, los matraces fueron inoculados con las cepas fúngicas e incubados a 25°C durante 12 días. Diariamente se extrajeron muestras de los matraces para realizar los análisis. Los parámetros a evaluar fueron pH, color, demanda química de oxígeno (DQO) y carbón orgánico total (COT) descritos anteriormente en la Tabla 2. Estas pruebas determinaron el mejor tratamiento para así continuar con el montaje de reactores.

#### **4.3.2. Reproducción masiva del micelio**

Una vez analizados los resultados de la tercera etapa se seleccionó a la cepa que mejores resultados dio y se utilizó en la cuarta etapa del experimento (reactores) para la cual previamente se tuvo que producir el micelio suficiente para el arranque del experimento, esta producción masiva se hizo en matraces Erlenmeyer con caldo de extracto de malta y el inóculo de las cajas de Petri que ya contenían a la cepa adaptada al colorante. Los matraces se incubaron a temperatura ambiente durante 12 días. La agitación se recomienda para la mejor distribución de los nutrientes además de una mayor oxigenación, sin embargo la agitación debe ser moderada para no desactivar mecánicamente a las enzimas de los hongos (Moreira, *et al.*, 1998).

La metodología para la obtención masiva de *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium* se basa en la metodología reportada por Montiel *et al.* (2001) descrita brevemente en el anexo 2.

## 4.4. CUARTA ETAPA

### 4.4.1. Montaje y arranque de los reactores

Una vez obtenida la biomasa suficiente de *Phanerochaete c.* para la inoculación de los tres reactores, se drenó el micelio y se prepararon proporciones de 56 g para cada uno de los reactores. El micelio fue seccionado con un bisturí antes de ser inoculado para una mejor distribución en el biofiltro.

A la par se hizo el proceso de acondicionamiento de los sustratos de soporte, plástico, paja y turba. El plástico fue cortado de tal manera que ofreciera un soporte para el micelio y evitar al máximo espacios vacíos. La paja fue cortada en trozos de no más de 5 cm de longitud. La turba fue mezclada con viruta fina de madera de pino. Los sustratos fueron esterilizados antes de su inoculación. Se empacaron los reactores mezclando los sustratos de soporte y el micelio al ser introducidos en los reactores. A los cuales previamente se les instaló el sistema de aireación, influente y efluente del reactor. Se contó con 3 reactores de acrílico con dimensiones de 5.6 cm de diámetro, 30 cm de altura y una capacidad de 840 mL (Figura 4).

El diseño del reactor fue basado en los trabajos realizados por Garzón-Zuñiga (2001), el cual consiste en una torre donde se encuentra mezclado el medio de soporte con el micelio de *Phanerochaete c.* lo que abarca aproximadamente un 70 % de la torre. El reactor cuenta en la parte superior con una salida de aire y la entrada del influente y al inicio del medio de soporte se dispuso una delgada capa de viruta de madera para una mejor dispersión del influente. En la parte inferior del reactor cuenta con una cama de grava fina para evitar que el medio de soporte no bloquee la manguera de suministro de aire y la del efluente.



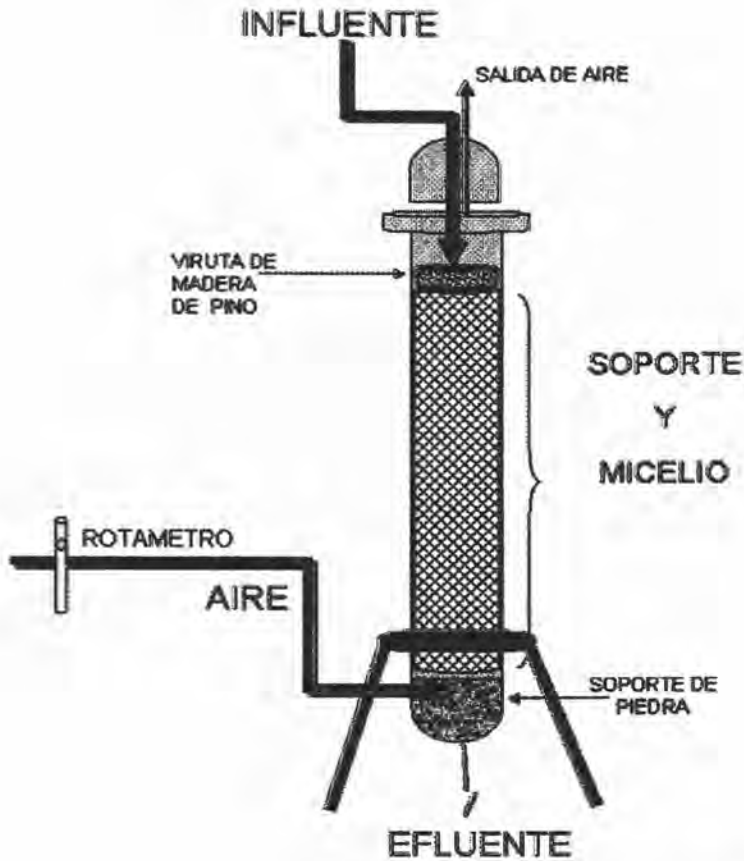


Figura 4: Esquema del reactor utilizado

Los reactores fueron alimentados con agua sintética con el colorante naranja ácido 24 a una concentración de 250 mg/L, con un tiempo de retención hidráulico (TRH) de 0.35 días (8.4 hrs) a un flujo de 0.69 mL/m (1L/día), este TRH fue calculado de acuerdo a la metodología dada por Garzón-Zuñiga *et al.* (2003), donde por medio del calculo de los espacios porosos del medio de soporte se calcula el TRH que se da por el medio de soporte. Debido a que el micelio es aerobio y la literatura menciona que el sistema degradativo de *Phanerochaete c.* demanda altas cantidades de oxígeno (Grant y Long, 1989), además en estudios anteriores se ha

demostrado que la falta de oxígeno puede llegar a limitar la productividad del micelio (Frederick *et al.*, 1992), los reactores fueron aireados a un flujo de 200 mL/m controlado por medio de un rotámetro.

Estos reactores funcionaron a manera de filtros percoladores en donde el mecanismo principal de remoción de la materia orgánica de este sistema no es la filtración sino la adsorción y asimilación biológica en el medio de soporte (Noyola *et al.*, 2000). Los filtros percoladores consisten en lecho formado por un medio sumamente permeable al que se adhieren los microorganismos y a través del cual se percola el agua, fenómeno del que recibe el nombre el proceso. Los tipos de empaque de uso común pueden clasificarse convencionalmente en dos grupos: medios minerales o “convencionales” y los medios especialmente fabricados, de reciente desarrollo, constituidos generalmente con materiales plásticos (Winkler, 1994 y Pürschel, 1976).

#### 4.4.2. Análisis realizados a los biofiltros.

Cada reactor se empacó a manera de biofiltro con tres diferentes sustratos de soporte: plástico, turba y paja de trigo. Durante los 84 días de operación de los reactores se controlaron y midieron los parámetros descritos en la tabla 3, utilizando los métodos y equipos mencionados anteriormente en la tabla 2.

Tabla 3: Parámetros monitoreados en los biofiltros

PARÁMETRO	FRECUENCIA
pH	Diario
Color y DQO	Cada tercer día
COT y Toxicidad	Esporádicamente

Para el análisis de toxicidad se realizaron una serie de diluciones de las muestras a las cuales se expone una población de la bacteria luminiscente marina (*Photobacterium phosphoreum* o *Vibrio fisheri*).

En las muestras, en caso de existir agentes tóxicos en ellos, las bacterias mostrarán cambios en la emisión normal de su luminosidad, reduciéndola en la medida en que la concentración de los tóxicos se incremente. Para este análisis se empleará el equipo de Microtox donde serán medidos por el sensor los cambios de luminosidad en caso de existir agentes tóxicos: El equipo relacionará estos datos gráficamente a la concentración de la muestra, lo que constituirá un gráfico logarítmico y la curva que explica el fenómeno y finalmente dará como resultado las unidades de toxicidad (UT) que presenten las muestras (Pica, 2004). Dicho procedimiento se realizó de acuerdo al método aprobado por SECOFI NMX-AA-112-1995, el cual está acreditado por la Entidad Mexicana de Acreditación.

#### **4.4.3. Análisis estadísticos**

Los datos obtenidos se procesaron en para realizar un análisis de varianza de un factor obteniendo una tabla de ANOVA para conocer la existencia de diferencias significativas en los experimentos realizados. Los resultados estadísticos dentro del texto solo se mencionaran resumidamente y las tablas del resumen estadístico hecho de cada experimento se muestra en el anexo 4 junto con los resultados.

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **5.1 RESULTADOS DE LA PRIMERA ETAPA**

#### **5.1.1. Caracterización del colorante**

Seleccionado el colorante se procedió a hacer un agua sintética para el experimento y la cual se caracterizó previamente. El naranja ácido 24 tiene un pH de 8.2. Presentó su pico máximo de absorción a los 420 nm, (por lo que, en este trabajo y para este colorante, los análisis que requirieron de mediciones espectrofotométricas fueron realizados a la longitud de referencia mencionada). La DQO promedio es de 1040 mg/L y el COT es de 490 mg/L, por cada 1000 mg/L de colorante presente en el agua sintética.

Estos datos fueron muy aproximados a los obtenidos por López (2004), Absorbancia, 420 nm, DQO de 1080 mg/L y COT de 492 mg/L. Quien realizó la caracterización de este colorante, además de someterlo a procesos de degradación por medio de oxidación química y biológica (fenton y lodos activados). También reportó que el efluente de la industria presentó una concentración promedio del colorante de 1000 mg/L, por lo que basándose este trabajo se escogieron las concentraciones de 250, 500 y 1000 mg/L, para tener una condiciones similares al efluente de la industria mencionada.

#### **5.1.2. Selección, obtención y crecimiento de las cepas fúngicas**

El Herbario Micológico de Morelos, del Centro de Investigaciones en Biología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, proporcionó las cepas

puras de *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium* en cajas de Petri como cepas Madre y de las cuales fueron tomados los inóculos para la propagación de estos micelios. Cabe aclarar que no se hicieron pruebas de confirmación de cepas y solo se partió de la información proporcionada por la Universidad mencionada quienes realizaron la identificación de las cepas en base a las características macro y microscópicas de los carpóforos (Urdapilleta 2000). Estas cepas se encuentran actualmente registradas en dicho herbario con las claves de HEMIM 50 para *Pleurotus ostreatus* y PC para *Phanerochaete chrysosporium*.

## **5.2. RESULTADOS DE LA SEGUNDA ETAPA**

### **5.2.1. Selección del mejor sustrato**

En la elección del mejor sustrato, al sembrarse ambos micelios en el agar EMA y PDA se obtuvo un crecimiento aceptable de *Pleurotus ostreatus* y de *Phanerochaete chrysosporium*.

#### **5.2.1.1. Velocidad de crecimiento**

La velocidad de crecimiento de cada una de las cepas fue similar en los medios utilizados, ya que el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* o *Phanerochaete chrysosporium* crecieron de manera indistinta en cualquiera de los medios utilizados. Por lo que al comparar el crecimiento en medio EMA contra el de PDA de *Pleurotus ostreatus* se observa que no existen diferencias estadísticamente significativas ( $F_{\alpha 0.005} = 0.0015 < F_{\text{tab}} = 4.96$ ). Así como tampoco existen diferencias significativas del crecimiento de *Phanerochaete chrysosporium* en los medios de cultivo mencionados ( $F_{\alpha 0.005} = 0.0012 < F_{\text{tab}} = 4.96$ ).

Por otra parte, al compara la velocidad de crecimiento de una cepa a otra se observó que *Pleurotus ostreatus* cubrió el diámetro total de la caja de Petri en 12 días, mientras que *Phanerochaete chrysosporium* lo cubrió en tan solo 8 días de incubación, dicho comportamiento se muestra en la figura 5. A pesar de que los resultados son evidentes, al procesar los datos estadísticamente se obtiene como resultado que no existen diferencias significativas entre *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium* al crecer en el medio EMA ( $F_{\alpha 0.005} = 0.042 < F_{\text{tab}} = 4.96$ ) o en el PDA ( $F_{\alpha 0.005} = 0.046 < F_{\text{tab}} = 4.96$ ).

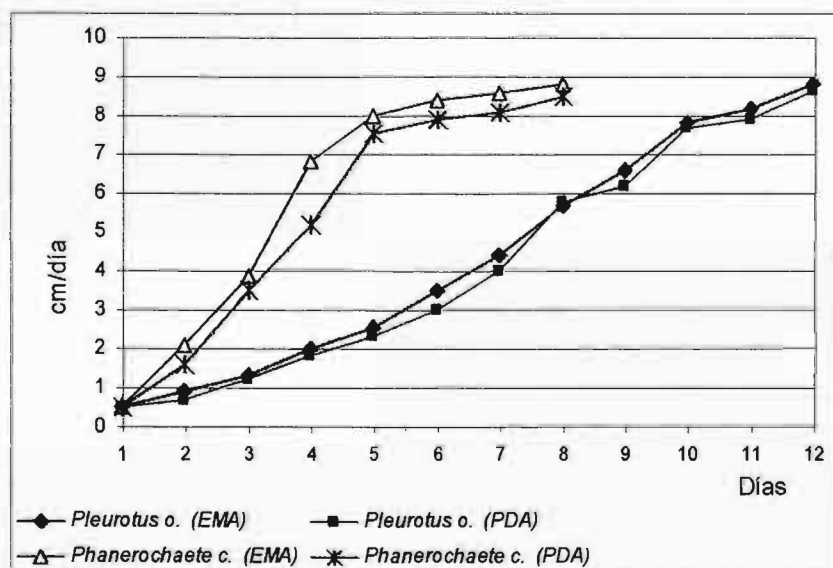


Figura 5: Velocidad de crecimiento de las cepas en 2 medios de cultivo

### 5.2.1.2. Biomasa generada

Las cepas presentaron valores de biomasa entre 0.2087g a 0.3080g. También se cuantificó al final del tiempo de incubación la biomasa total generada al final del

experimento, medido en gramos por cada caja de Petri, en los dos diferentes medios de cultivos, los promedios se presentan en la figura 6.

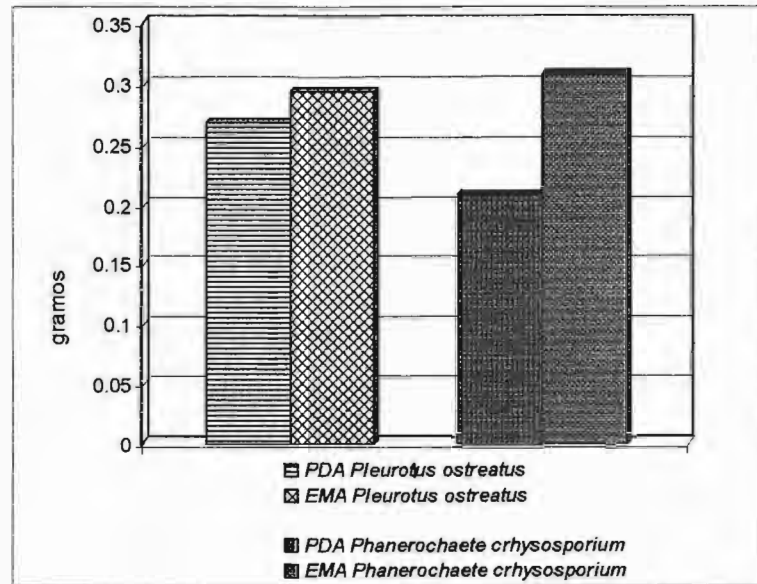


Figura 6: Biomasa total generada a los 12 días por las cepas en los medios de cultivo

*Pleurotus ostreatus* generó una cantidad de biomasa similar en los dos medios. Por su parte *Phanerochaete chrysosporium* generó una mayor biomasa en el medio EMA (0.3080 g) que en el PDA (0.2087), incluso los valores de biomasa generados en EMA son mayores que los dados por *Pleurotus ostreatus* en cualquiera de los dos medios (EMA 0.2933g y PDA 0.2676 g).

Con estos resultados se concluye que el mejor medio fue el EMA debido a que ambas cepas se adaptaron a él y crecieron favorablemente en menor tiempo generando mayor biomasa. Cabe aclarar que estadísticamente no existen diferencias significativas ( $F_{\alpha=0.005} = 0.0087 < F_{tab} = 4.96$ ) en la generación de biomasa de las cepas fúngicas en los dos medios, ni entre cepas.

De acuerdo con esto, se escogió el Agar Extracto de Malta, para realizar los experimentos ya que generó mayor biomasa en menor tiempo.

### 5.3. TERCERA ETAPA

#### 5.3.1. Contacto micelio-colorante

##### 5.3.1.1. En medio sólido (cajas de Petri)

Los resultados de la velocidad de crecimiento de los micelios con mezcla con el medio de cultivo y el colorante (EMA y el naranja ácido 24) a concentraciones de 250, 500 y 1000 mg/L inoculados se muestran para *Pleurotus ostreatus* en la figura 7 y para *Phanerochaete chrysosporium* en la figura 8.

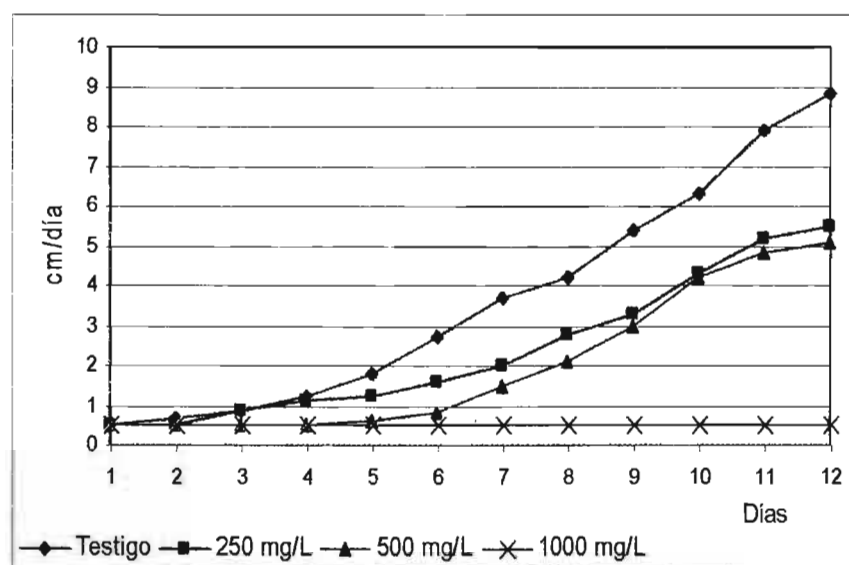


Figura 7: Velocidad de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en la mezcla sustrato-colorante a tres diferentes concentraciones.



*Pleurotus ostreatus* presentó un comportamiento de inhibición ya que solo creció en 2 de las 3 cajas de Petri inoculadas con la cepa a una concentración de 250 mg/L de colorante, en 1 caja de 3 a una concentración de 500 mg/L y en ninguna de las 3 cajas a una concentración de 1000 mg/L de colorante, haciendo la comparación estadística del crecimiento de esta cepa en las tres diferentes concentraciones del colorante si existen diferencias significativas [(250 mg/L:  $F_{\alpha 0.005} = 7.54 > F_{\text{tab}} = 4.41$ ) (500 mg/L:  $F_{\alpha 0.005} = 20.06 > F_{\text{tab}} = 4.41$ ) y (1000 mg/L:  $F_{\alpha 0.005} = 22.21 > F_{\text{tab}} = 4.41$ )]. Por lo tanto, con estos resultados se puede decir que *Pleurotus o.* requiere de mayor tiempo para poder adaptarse y crecer en el colorante a bajas concentraciones, y que, a concentraciones mayores de 500 mg/L el crecimiento de esta cepa es inhibido.

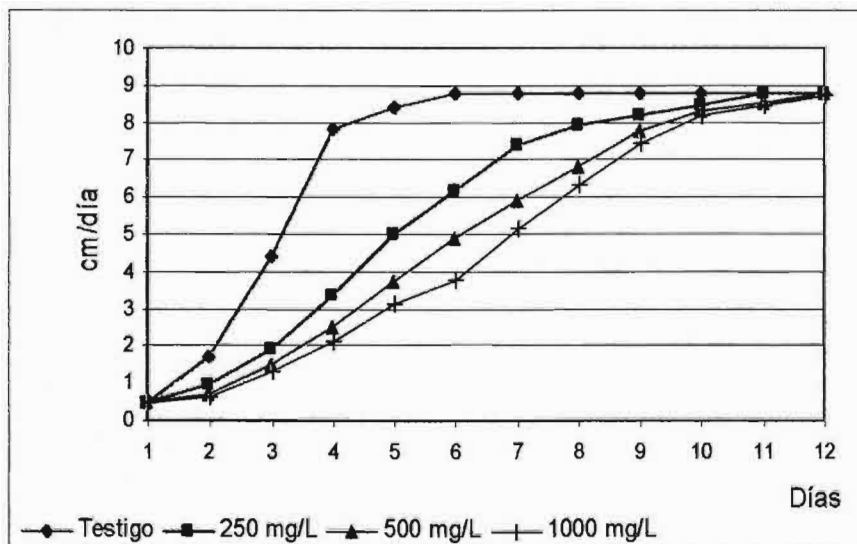


Figura 8: Velocidad de crecimiento de *Phanerochaete crhysosporium* en la mezcla sustrato-colorante a tres diferentes concentraciones.

*Phanerochaete crhysosporium* creció de manera satisfactoria en el colorante a las tres diferentes concentraciones (3 de 3 cajas en las 3 concentraciones) en 12 días, y aunque de manera más lenta que en la muestra control (blanco), logró abarcar todo

el diámetro de las cajas de Petri, dando como resultado que no existen diferencias estadísticamente significativas en cuanto al crecimiento de esta cepa en ninguna de las tres concentraciones del colorante [(250 mg/L:  $F_{\alpha 0.005} = 0.22 < F_{\text{tab}} = 4.41$ ), (500 mg/L:  $F_{\alpha 0.005} = 0.02 < F_{\text{tab}} = 4.41$ ) y (1000 mg/L:  $F_{\alpha 0.005} = 0.40 < F_{\text{tab}} = 4.41$ )]. Además se pudo observar en este experimento como el micelio adsorbió el color ya que, a diferencia del control, estas se tiñeron con el colorante.

La cepa de *Phanerochaete chrysosporium* se adaptó de manera eficiente al colorante en comparación con *Pleurotus ostreatus*, lo que se muestra en la figura 9 estas diferencias son estadísticamente significativas en las tres concentraciones del colorante [(250 mg/L:  $F_{\alpha 0.005} = 11.46 > F_{\text{tab}} = 4.41$ ) (500 mg/L:  $F_{\alpha 0.005} = 15.22 > F_{\text{tab}} = 4.41$ ) y (1000 mg/L:  $F_{\alpha 0.005} = 28.74 > F_{\text{tab}} = 4.41$ )].

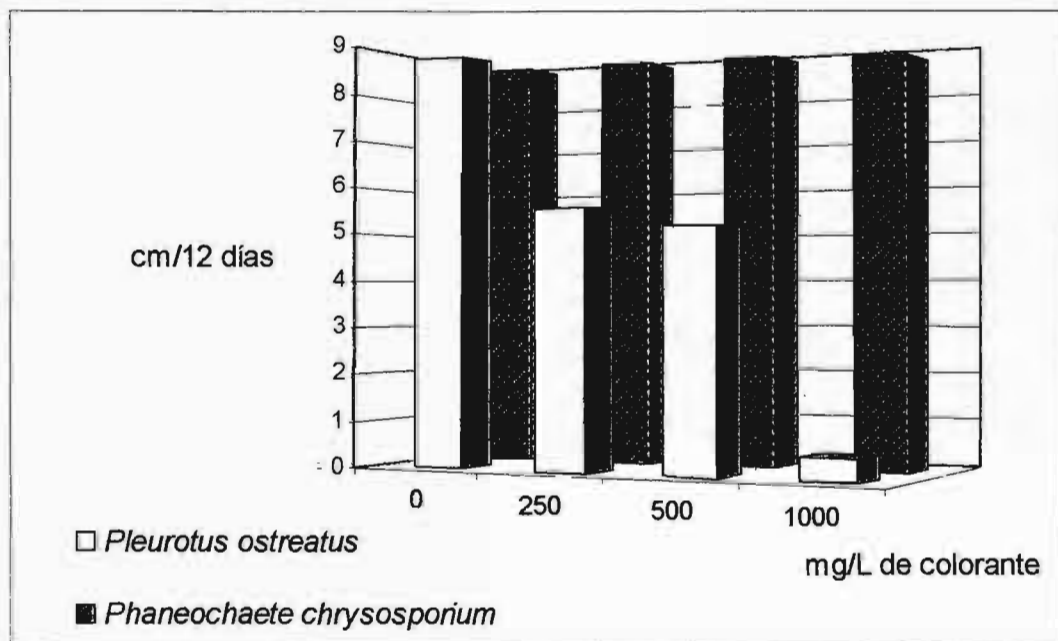


Figura 9: Comparación del crecimiento entre *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium* en la mezcla sustrato-colorante a tres diferentes concentraciones.

Este comportamiento concuerda con lo que en la literatura está reportado, ya que algunos investigadores reportan una mayor adaptabilidad y un visible crecimiento de *Phanerochaete chrysosporium* en comparación con *Pleurotus ostreatus*. Zohar *et al.* (1992) hicieron una comparación entre estos dos hongos en la degradación de lignocelulosa en estados de fermentación de manera sólida y mencionaron la observación de un crecimiento micelial más vigoroso e intenso por parte de *Phanerochaete chrysosporium*.

Fu y Viraraghavan (2001) mencionan en su revisión de decoloración de colorantes en aguas residuales por medio de hongos, que existen varios factores que influyen tanto en el crecimiento del micelio como en la actividad de decoloración. Estos factores están relacionados con las condiciones para el crecimiento del micelio o con las características del colorante. Dentro de los factores de influencia para el crecimiento del hongo se encuentra el tipo de medio ya que estos deben estar principalmente compuestos por una fuente de carbón, de nitrógeno y de otros nutrientes. Los medios más comunes son la levadura, el almidón, el extracto de malta y dextrosa de papa. Otros factores importantes para el crecimiento del micelio son el pH, la temperatura, la oxigenación y el tiempo de incubación.

### **5.3.1.2. Sustrato en medio líquido (matraz Erlenmeyer)**

Con la solución del caldo de extracto de malta y el colorante probado con tres diferentes concentraciones, 250, 500 y 1000 mg/L y en matraces con una capacidad de 1L, se determinaron las variables de control: pH, DQO, color, COT y toxicidad para ambas cepas. El tiempo de incubación en este experimento fue de 12 días.

## Resultados de pH en los matraces

Las cepas utilizadas se adaptaron y crecieron favorablemente en los medios utilizados presentando un pH inicial entre 4 y 5, ya que al mezclarse el colorante (pH de 8) con el agar de extracto de malta (pH de 4.5) hizo que el pH inicial variara ligeramente dependiendo de la concentración. Los resultados del comportamiento del pH en las tres diferentes concentraciones del colorante con *Pleurotus ostreatus* se muestran en la figura 10 y con *Phanerochaete chrysosporium* en la figura 11.

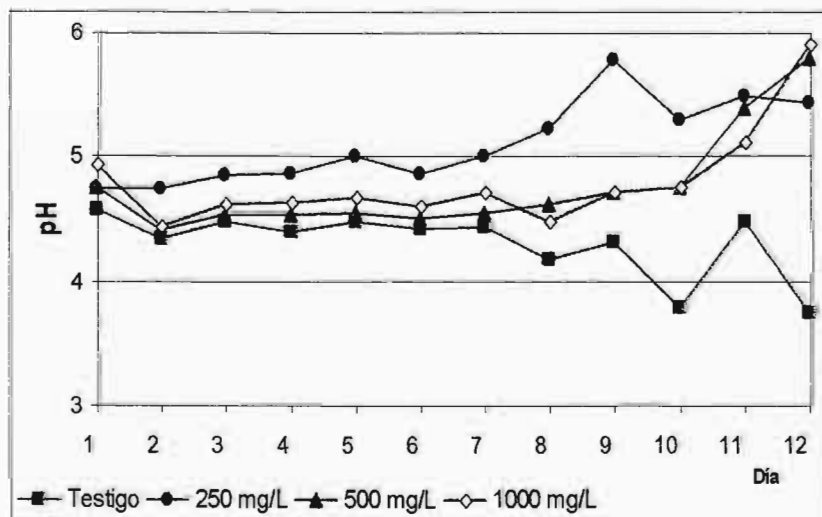


Figura 10: Resultados de pH en *Pleurotus ostreatus*

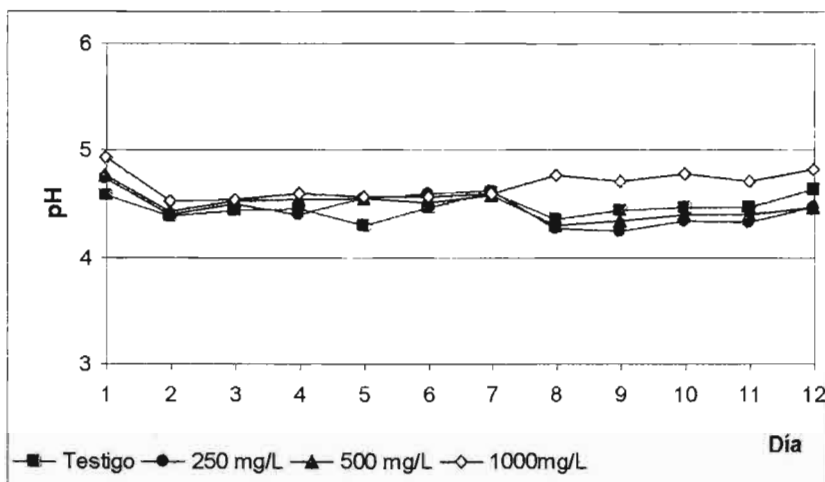


Figura 11: Resultados del pH de *Phanerochaete chrysosporium*

Como se muestra en las figuras 10 y 11 ambas cepas presentan un pH ácido, lo que es óptimo para el crecimiento de hongos, y éstos tienden a predominar en los entornos moderadamente ácidos (pH 3-5). Algunos hongos son acidotolerantes (pH <3) y otros toleran valores que fluctúan entre 2 y 9 (Solomon *et al.*, 2001 y Grant y Long, 1989).

Al finalizar el experimento *Pleurotus ostreatus* presentó una tendencia a aumentar el pH entre 5 y 6 en presencia del colorante y en el testigo mantuvo la tendencia de disminuir entre 4.5 y 3.5. *Phanerochaete chrysosporium* presentó una tendencia constante durante el experimento ya que mantuvo el pH entre 4 y 5.

### Resultados de color en los matraces

Se cuantificó el color en sus dos variedades: color aparente y color real. Debido a que al cuantificar el color los resultados son influenciados por la turbiedad, esto dado por el crecimiento de los microorganismos o células desprendidas de

estos, así como de otros factores, por lo que en este caso, el micelio y las enzimas liberadas en los reactores pueden interferir en los resultados de color.

El color aparente se obtiene de la determinación en la muestra pura, mientras el color real se obtiene al filtrar con papel Whattman la muestra para eliminar toda materia interferente (Greenberg *et al.*1992). Fueron muestreadas las tres repeticiones de cada concentración del colorante y se hizo un promedio por concentración y por micelio inoculado. Se determinó el porcentaje de remoción de color. La remoción de color se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Remoción} = \frac{\text{Color inicial} - \text{Color final}}{\text{Color inicial}} \times 100 \%$$

Ambas cepas removieron el color aparente hasta en un 70%. Utilizando el análisis de varianza con un solo factor se comparó el color aparente removido y se concluye que no existe diferencia estadísticamente significativas a ninguna concentración entre estas cepas colorante [(250 mg/L:  $F_{\alpha 0.005} = 0.10 < F_{\text{tab}} = 4.6$ ), (500 mg/L:  $F_{\alpha 0.005} = 0.18 < F_{\text{tab}} = 4.6$ ) y (1000 mg/L:  $F_{\alpha 0.005} = 0.02 < F_{\text{tab}} = 4.46$ )].

Por otra parte, al comparar las diferencias entre las concentraciones de color aparente en cada una de las cepas, se encontró que si existen diferencias significativas entre concentraciones para una misma cepa:

*Pleurotus ostreatus* removió el color aparente en un 74% en la concentración de 250 mg/L, el 55% en la de 500 mg/L y el 59% en la de 1000 mg/L; estadísticamente la diferencia si es significativa [(250 mg/L:  $F_{\alpha 0.005} = 13.86 > F_{\text{tab}} = 4.6$ ) (500 mg/L:  $F_{\alpha 0.005} = 12.25 > F_{\text{tab}} = 4.6$ ) y (1000 mg/L:  $F_{\alpha 0.005} = 31.83 > F_{\text{tab}} = 4.6$ )].

*Phanerochaete chrysosporium* removió el color aparente en un 67% en la concentración de 250 mg/L, el 60% en la de 500 mg/L y el 59% en la de 1000 mg/L; estadísticamente la diferencia si es significativa [(250 mg/L:  $F_{\alpha 0.005} = 10.86 > F_{\text{tab}} = 4.6$ ) (500 mg/L:  $F_{\alpha 0.005} = 15.74 > F_{\text{tab}} = 4.6$ ) y (1000 mg/L:  $F_{\alpha 0.005} = 37.92 > F_{\text{tab}} = 4.6$ )].

Los resultados del color real para *Pleurotus ostreatus* se muestran en la figura 12 y para *Phanerochaete chrysosporium* en la figura 13.

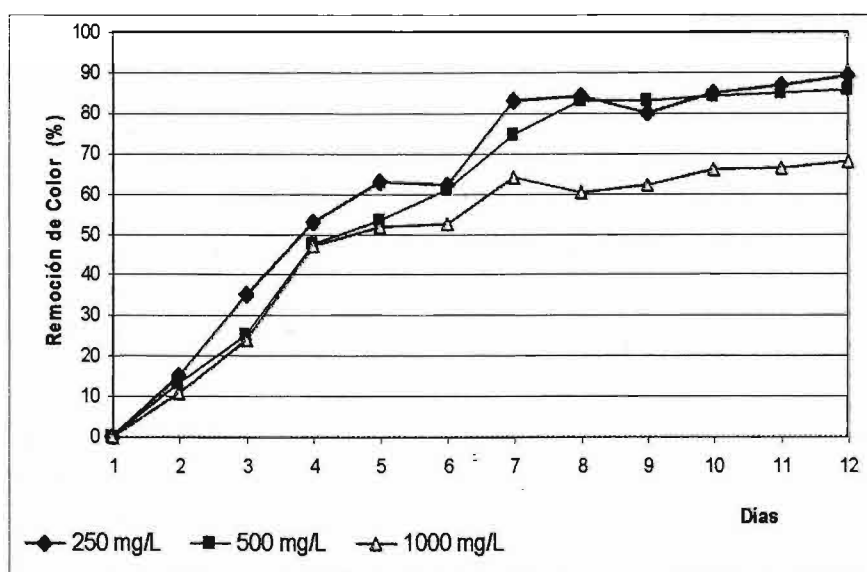


Figura 12. Remoción de color para *Pleurotus ostreatus*.

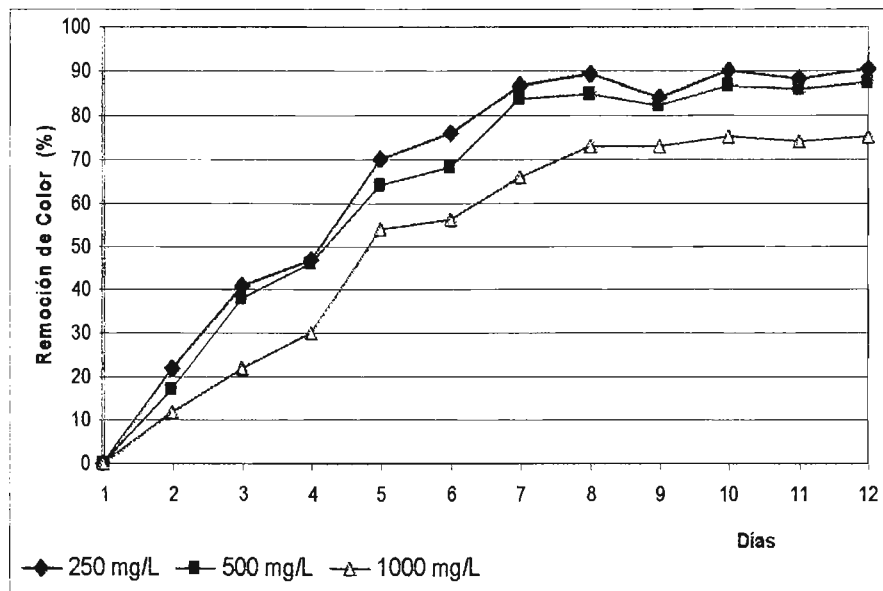


Figura 13. Remoción de color para *Phanerochaete chrysosporium*.

En cuanto a los resultados de color real tenemos que no existen diferencias significativas entre las cepas de *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium* en ninguna de las tres concentraciones colorante [(250 mg/L:  $F_{\alpha 0.005} = 0.012 < F_{tab} = 5.3$ ), (500 mg/L:  $F_{\alpha 0.005} = 0.015 < F_{tab} = 5.3$ ) y (1000 mg/L:  $F_{\alpha 0.005} = 0.099 < F_{tab} = 5.3$ )].

*Pleurotus ostreatus* removió el color real en un 89% en la concentración de 250 mg/L, el 86% en la de 500 mg/L y el 68% en la de 1000 mg/L; la comparación de la remoción de color, estadísticamente no es significativa, excepto en la comparación 250 contra la de 1000 mg/L colorante ( $F_{\alpha 0.005} = 8.9 > F_{tab} = 5.3$ ). *Pleurotus ostreatus* al ser inhibido por el colorante para su crecimiento no pudo decolorar al naranja ácido 24. Young y Yu (1997) mencionan que una alta concentración del colorante puede llegar a inhibirlo.



Por su parte *Phanerochaete chrysosporium* removió el color real en un 90% en la concentración de 250 mg/L, el 87% en la de 500 mg/L y el 75% en la de 1000 mg/L, estadísticamente no existen diferencias significativas en la remoción del color entre las concentraciones.

### Resultados de DQO en los matraces

En cuanto a la remoción de la DQO en las figuras 14 y 15 se puede observar que ambas cepas removieron entre el 40 y 60% de la demanda química de oxígeno. *Pleurotus ostreatus* removió el 46.5% de la DQO en la concentración de 250 mg/L y hasta el 59.9% del colorante a una concentración de 1000 mg/L. Por su parte *Phanerochaete chrysosporium* removió en la concentración de 250 mg/L el 50.3% y el 58.6% en la concentración mayor (1000 mg/L de colorante).

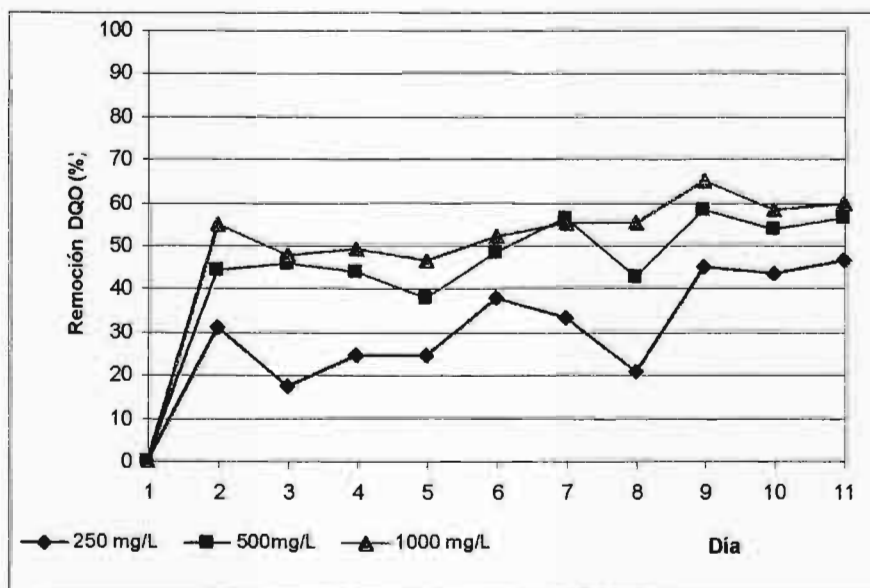


Figura 14: Remoción de la DQO por *Pleurotus ostreatus*

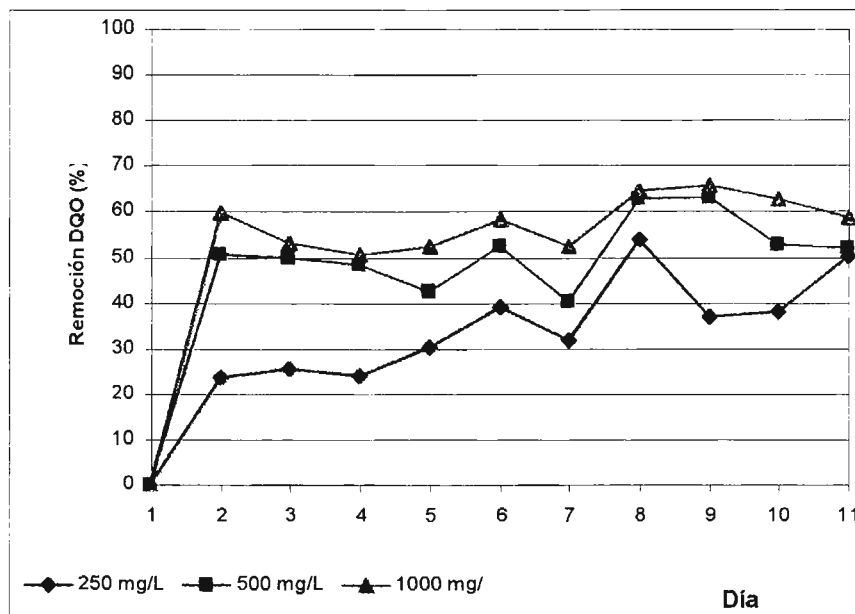


Figura 15: Remoción de la DQO por *Phanerochaete chrysosporium*

No existe diferencia significativa entre ambas cepas (*Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium*) ya que el promedio es de una remoción del 50% colorante [(250 mg/L:  $F_{\alpha 0.005} = 0.009 < F_{\text{tab}} = 4.35$ ), (500 mg/L:  $F_{\alpha 0.005} = 0.029 < F_{\text{tab}} = 4.35$ ) y (1000 mg/L:  $F_{\alpha 0.005} = 0.135 < F_{\text{tab}} = 4.35$ )]. Así como tampoco existen diferencias significativas entre ninguna de las tres diferentes concentraciones del colorante para cada cepa.

### Resultados de COT en los matraces

Los resultados de las pruebas de carbón orgánico total (COT) se muestran en las figuras 16 y 17.

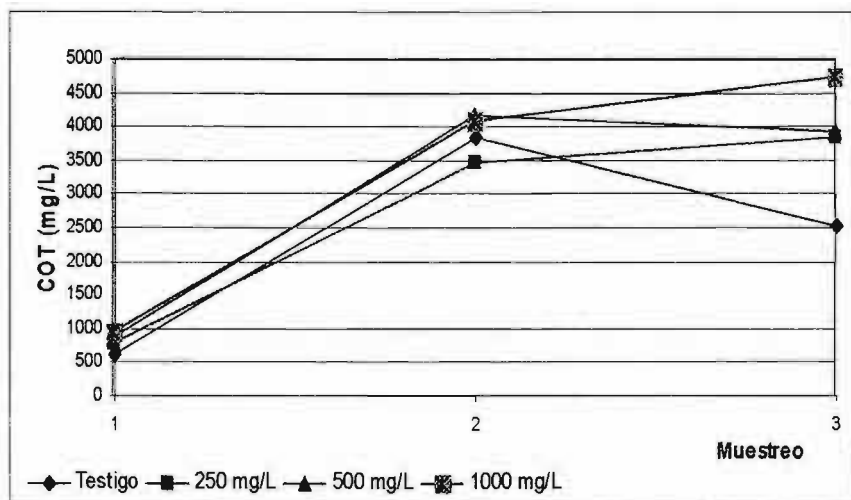


Figura 16: Resultados de COT de *Pleurotus ostreatus*

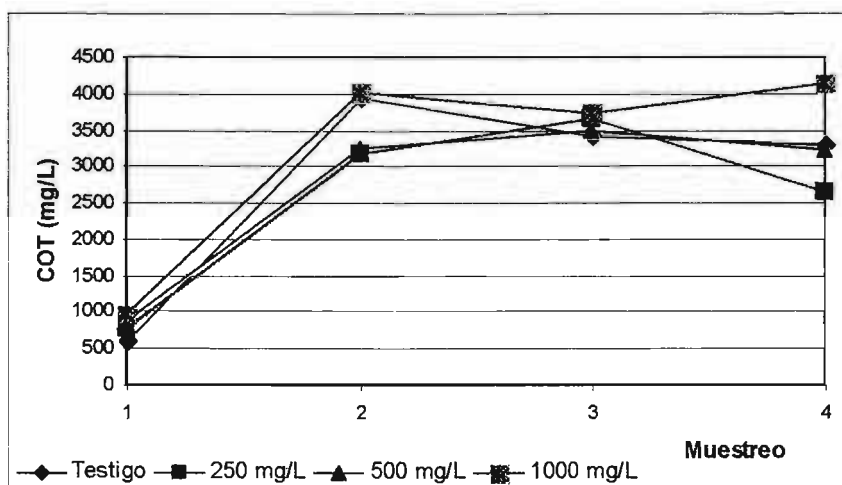


Figura 17: Resultados de COT de *Phanerochaete chrysosporium*

Como se observan en las figuras 16 y 17, el carbón orgánico total tiene una tendencia a aumentar en el transcurso del experimento; este comportamiento se explica ya que estos hongos (*Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium*) secretan oxidasas (enzimas extracelulares), muy probablemente solubles (proteínas), lo que aumenta el COT conforme se observa el crecimiento del micelio. Sin

embargo para poder confirmar y aclarar esta situación se deba medir la actividad enzimática y correlacionarlas con el aumento del COT y de la DQO.

### Resultados de toxicidad en los matraces

Los resultados obtenidos en relación con las pruebas de toxicidad realizadas a las muestras con *Vibrio fisheri* se muestran en la tabla 4:

Tabla 4: Resultados de las pruebas de toxicidad

Cepa	Concentración mg/L	UT iniciales*	UT finales*
<i>Pleurotus ostreatus</i>	250	40.626	10.253
	500	ND	ND
	1000	123.91	46.34
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	250	40.626	55.01
	500	ND	ND
	1000	123.91	73.88

ND: No Determinado

\* UT= Unidad de Toxicidad (*Vibrio fisheri*)

La tabla anterior nos muestra que *Pleurotus ostreatus* disminuyó la toxicidad del colorante en un 74.76% a una concentración de 250 mg/L, y un 62.60% a una concentración de 1000 mg/L. Mientras que *Phanerochaete chrysosporium* disminuyó la toxicidad del colorante en un 40.38% a una concentración de 1000 mg/L; sin embargo a una concentración de 250 mg/L aumenta la toxicidad.

Con estos resultados y en referencia a los resultados del COT, se concluye que esta toxicidad puede ser dada por las enzimas extracelulares que segregan este tipo de hongos, o bien que los compuestos intermedios generados en la decoloración

del naranja ácido 24 son de mayor toxicidad que el colorante inicial. Pero para rechazar o aceptar estas hipótesis se tendría que realizar pruebas específicas de las enzimas segregadas.

Dado los resultados en la remoción de color, DQO y la disminución de la toxicidad en algunas muestras dados por *Phanerochaete chrysosporium* en esta etapa preliminar se eligió trabajar con este tipo de hongo. Por lo cual para la siguiente etapa se seleccionó para ser inoculado en los medios de empaque a probar.

## 5.4. CUARTA ETAPA

### 5.4.1. Reactores

Los reactores se montaron y se inocularon con *Phanerochaete chrysosporium*, posteriormente se dejó transcurrir un periodo de aclimatación y ajuste de condiciones. Los tres reactores fueron codificados según el medio de empaque para su manejo como se muestra en la tabla 5:

Tabla 5: Codificación y tipo de empaque de los reactores

CÓDIGO	TIPO DE EMPAQUE	DESCRIPCIÓN
Reactor "A"	INORGÁNICO (inerte)	Plástico cónico con orificios
Reactor "B"	ORGÁNICO 1	Turba (materia orgánica parcialmente fosilizada)
Reactor "C"	ORGÁNICO 2	Paja de trigo

El propósito de los medios de empaque es el de proporcionar un soporte sólido y estable para la biomasa, y para exponer la máxima área superficial al flujo del líquido bajo tratamiento, y de la superficie mojada al contacto con el aire. La configuración del empaque debe permitir suficientes espacios entre las superficies adyacentes para que pueda crecer la biopelícula sin que los intersticios queden bloqueados, y permitir así el flujo de líquido y el aire a través del lecho. El aumento de la profundidad se hace posible por el empleo de medios más ligeros de plástico. La mayoría de estos filtros se constituyen por medio de torres y el flujo del caudal al filtro suele ser continuo a pesar de que se considera aceptable el riego intermitente del medio filtrante.

Estos tres reactores se inocularon con *Phanerochaete chrysosporium*, ya que a pesar de no mostrar diferencias significativas en la decoloración del naranja ácido 24 en la etapa anterior, sí presentó diferencias significativas en el crecimiento en cajas Petri en comparación con *Pleurotus ostreatus*, debido a que *Phanerochaete chrysosporium*, tiende a crecer de manera más rápida en diferentes tipos de sustratos, datos que concuerdan con la literatura.

El tiempo de la duración del experimento fue variado y determinado por los reactores. Ya que dada la eficiencia del reactor “B”, el experimento para dicho reactor fue de 84 días, mientras que para el reactor “A” y “C” fue solo de 57 días, ya que el reactor “A” no presentó ninguna eficiencia y el reactor “C” presentó contaminación y descomposición del empaque de éste reactor.

## Resultados de pH en los reactores

La figura 18 muestra los valores de pH del influente del sistema así como el de los efluentes de los tres reactores.

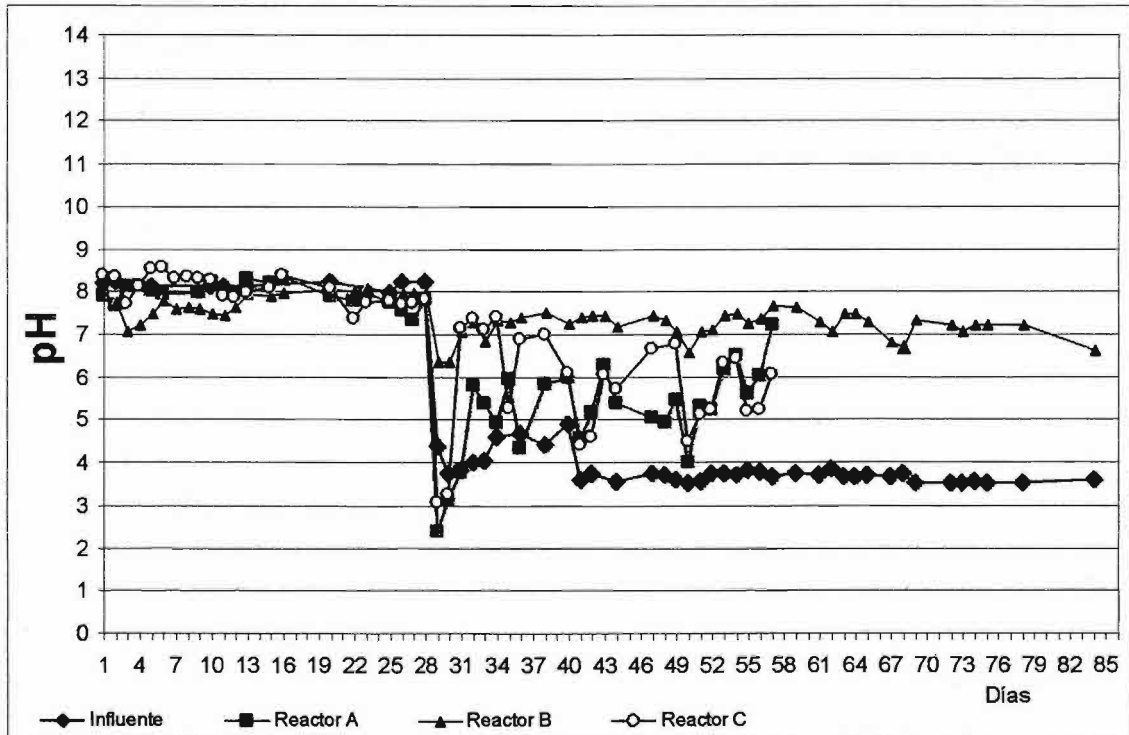


Figura 18: Resultados de pH del influente y de los efluentes de los 3 reactores

Como se observa en la figura 18, por 3 semanas se obtuvo un pH que fluctúan entre los valores neutros a los básico (no mayor de 8.5), esto debido a que en esta parte no se manipuló el pH del influente, ya que se pretendía manejar los reactores en condiciones lo más natural posible. Sin embargo al no obtener los resultados deseados se hizo una acidificación del influente al día 29 de operación de los reactores (hasta obtener un pH de 4). Para el día 41 de operación se volvió a modificar el pH a valores de 3.6.

Esta acidificación fue acorde a la literatura ya que Young y Yu (1997) mencionan que la lignina peroxidasa de *Phanerochaete chrysosporium* muestran un alto grado de decoloración en un rango de pH de 3.5 a 5. Así mismo Kwang-Soo *et al.* (1997) mencionan que el pH óptimo para la actividad enzimática es alrededor de 3.5 pero el rango de actividad va de 3 a 4, principalmente para *Pleurotus ostreatus*. Por otra parte los cultivos iniciales de este micelio fueron en pH ácido debido a que los medios de cultivo como el extracto de malta presentan un pH de 4.5 (Frederick *et al.*, 1992) por lo que el micelio se desarrolla óptimamente.

Fu y Viraraghavan (2001) mencionan que el pH puede llegar a influir en el proceso de biosorción, en el color de la solución e incluso en la solubilidad del colorante, por lo que este factor es importante para la remoción del colorante. Hacen mención de varias investigaciones donde el retiro del color se facilita en un pH ácido. Así mismo el pH influye en la turba ya que normalmente este tipo de material tiene un pH de alrededor de 4.0 debido a la presencia de ácidos húmicos. Sin embargo el funcionamiento de un reactor con turba puede ser bueno en un rango de pH entre 3 y 9 (Couillard, 1994).

Como se puede observar en la figura 18, a partir de que el pH del influente se acidificó, los valores de pH en los efluentes también disminuyeron, sin embargo cada reactor muestra un comportamiento diferente. Mientras que el influente general se mantuvo en valores de pH entre 3 y 4, el pH de los efluentes de los reactores “A” y “C” (plástico y paja respectivamente) variaba constantemente ya que iban desde valores de pH menores a 4 hasta valores de 7.5.



Por otra parte, el pH del efluente del reactor “B” (turba) mantuvo un patrón más o menos constante a partir del día 31, obteniendo un pH mínimo de 6.6 y un máximo de 7.68, en promedio el efluente del reactor empacado con turba mantenía un pH de 7.15, dicho valor es considerado neutro.

Piet *et al.* (1994) recomiendan que la turba tenga que ser mezclada con corteza o trozos de madera, para obtener efluentes neutrales debido a que la turba tiene valores de pH ácidos. Por lo que para este experimento, la turba previamente se mezcló con viruta fina de madera de pino a una proporción de 60% turba y 40% viruta, lo cual evita que la turba llegase a compactarse de tal manera que tapara el biofiltro, evitando la filtración. Así mismo, esta mezcla fue humedecida a un 60%.

### **Resultados de color en los reactores**

Los estudios sobre el color, que fueron analizados en sus dos modalidades (aparente y real) y cuantificados por espectrofotometría, se sometieron a una curva de calibración (concentración de colorante naranja ácido 24 vs absorbancia), lo cual emitió como resultado la concentración remanente del colorante. En la figura 19 se observan los resultados de color aparente y en la figura 20 los del color real.

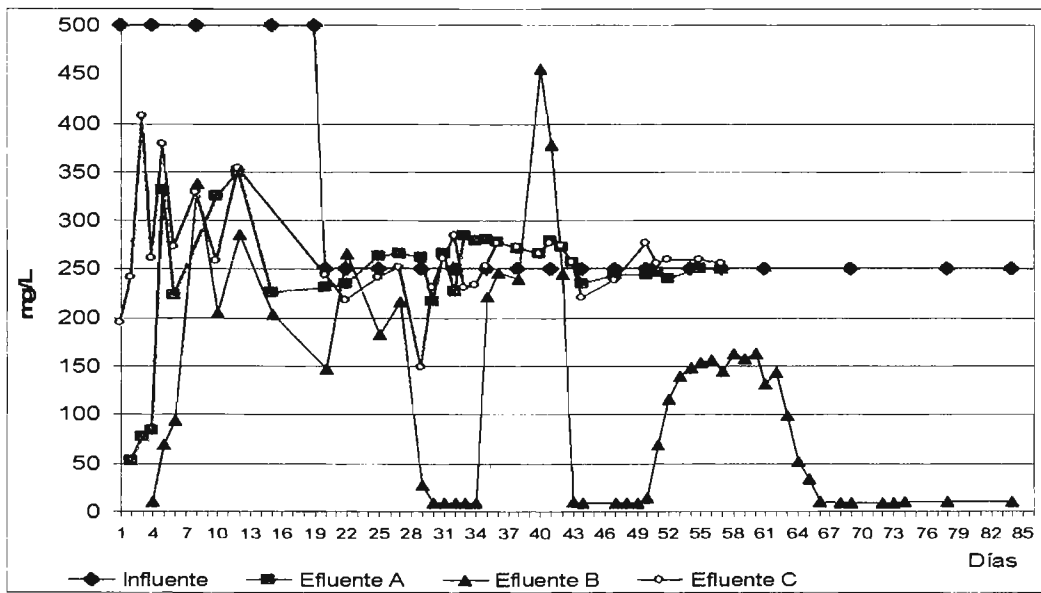


Figura 19: Resultados de color aparente en los tres reactores

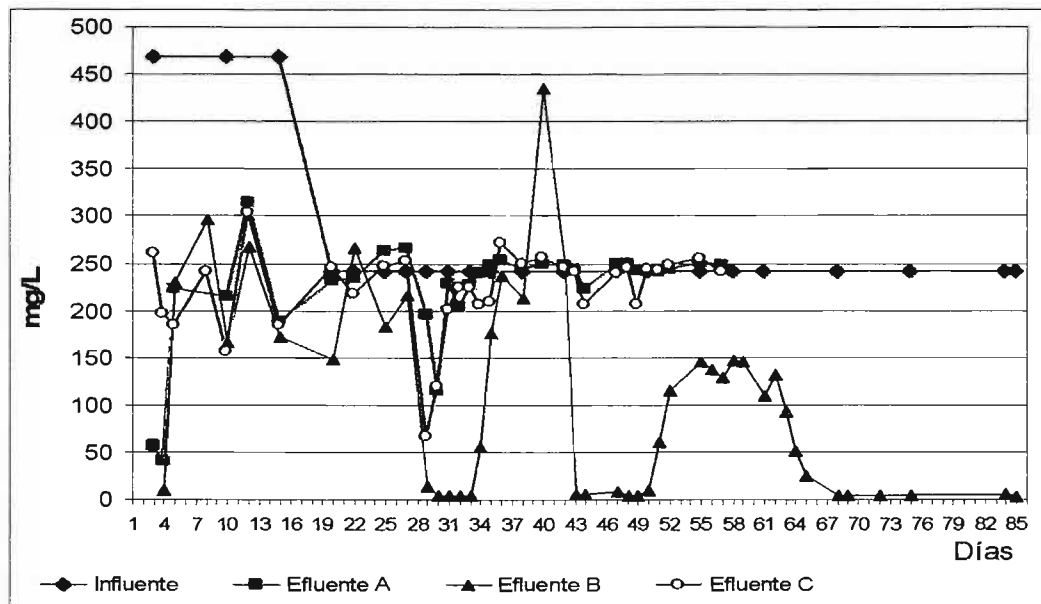


Figura 20: Resultados de color real de los tres reactores

En las figuras 19 y 20 se muestra como la tendencia del color, en los primeros 5 días, es aumentar en los reactores, hasta llegar a una saturación del material de

empaque. A partir del día 5 de operación y hasta el día 27, los tres reactores no presentaron una diferencia sustancial entre el color de influente con respecto a los colores de los efluentes de los tres reactores (figura 21).

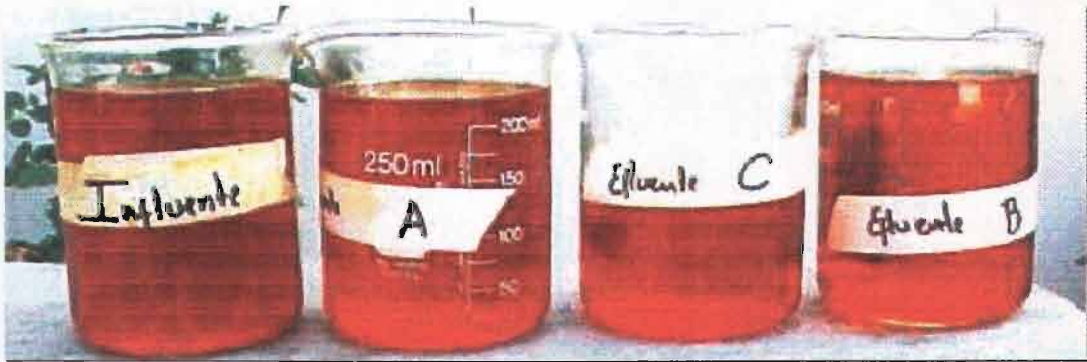


Figura 21: Coloración del influente y los efluentes de los tres reactores.

El día 29 de operación de los reactores fue el punto de acidificación, y el comportamiento de los tres reactores fue claramente a disminuir el color, como se muestra en la figura 22, posteriormente, el color en cada reactor sigue un comportamiento diferente.



Figura 22: Disminución de la coloración de los efluentes a la acidificación del influente.

En el reactor “A” (plástico) y “C” (paja) la concentración del colorante variay manteniéndose en concentraciones similares a la del influente (250 mg/L), es decir no hubo diferencias significativas entre el agua del influente y del efluente de cada reactor (figura 23), por lo que el tratamiento con estos medios de empaque no fue eficiente.



Figura 23: Diferencia de la coloración de los efluentes con respecto al influente.

A pesar de que en el reactor “C” (paja) disminuyó la concentración del colorante de 250 a 205 mg/L en el efluente en cuatro ocasiones (en los días de operación 34, 35, 44 y 49) no presentó una disminución de la concentración del colorante constante y eficiente, y en ningún momento se obtuvieron valores por debajo de los 200 mg/L, es decir que el reactor “C” que fue empacado con paja de trigo, solo tuvo una eficiencia del 18% en la remoción del colorante naranja ácido 24. Aunado a esto el reactor presentó en algunas ocasiones concentraciones mayores a las el influente (por ejemplo el día 55 de operación hubo una concentración del colorante de 255 mg/L) lo cual nos indica un fenómeno de adsorción –desorción del colorante en la paja y el micelio más que un proceso de degradación dado por el micelio.

Por otra parte el reactor “B” (turba) muestra claramente una eficiencia en la disminución de la concentración del colorante y por ende la decoloración del agua. Los cambios de color son observados hasta el día de operación número 29, esto justo corresponde cuando se hizo el cambio de pH ligeramente básico a ácido. Por lo cual nos indica que *Phanerochaete chrysosporium* trabaja en forma óptima a pH ácido, pero a valores menores de 4, ya que cuando el pH se mantiene arriba de este valor, el color tiende a aumentar nuevamente, por lo cual fue necesario un reajuste del pH a valores de 3.6, lo cual nuevamente trajo como consecuencia una disminución notable (98%) del color a partir del día 41 de operación de los reactores, lo que mantuvo relativamente constante, a excepción de un periodo de 15 días en el que se obtuvo un comportamiento distinto (del día 50 al 65 de operación), ya que a partir del día 50 de operación del reactor “B” se reportan valores de 4 mg colorante/L en el día 49 de operación hasta 158 mg/L al día 58, sin embargo a partir del día 59 la concentración del colorante para el día 68 de operación se encuentra en valores de 4 mg/L, concentración que se mantuvo hasta el final del experimento.

Un punto resaltante en las figuras 18 y 19 que nos muestran los resultados de color, es una alta concentración para el día 40, (similares a los resultados en la DQO y COT, resultados que posteriormente serán discutidos). Estos resultados pueden ser explicados por los mismos procesos de desorción del colorante pero influenciados por la concentración que en un inicio se manejo del colorante, 500 mg/L, que fue la concentración con la que se empezó a alimentar a los reactores y que fue disminuida a una concentración de 250 mg/L en el día 20 de operación de los reactores.

Con estos resultados se puede decir que el reactor “B” obtuvo una eficiencia, después de su estabilización, en la mayoría de su operación del 98% en la remoción del colorante naranja ácido 24, lo cual estadísticamente habla de una diferencia altamente significativa. Y que a pesar de que el sistema del reactor con turba pueda llegar a tener períodos de desorción del colorante, esta eficiencia aun puede llegar a ser del 37% (significativo estadísticamente), en lo que vuelve a estabilizarse el sistema.

Para comprobar que el cambio de coloración de los efluentes no fuera netamente por la adición del ácido sulfúrico al influente, se tomaron muestras del colorante antes y después de la acidificación, los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas en el cambio de coloración del agua, lo mismo resultó con los efluentes de los reactores “A” y “C” (plástico y paja respectivamente), en donde no hubo diferencias significativas entre la coloración del influente y el efluente, a pesar de que el agua del influente (acidificada) provenía de la misma alimentación para los tres reactores.

Es inminentemente la relación entre la acidificación del influente y el cambio en la intensidad de coloración, ya que esta fue un detonante para tener cambios tan radicales del color, caso que no se había logrado en los días anteriores. Y a pesar de que en los efluentes de los tres reactores se notó el cambio de coloración (en el segundo día después del cambio de pH), fue en el reactor “B”, empacado con turba, donde la decoloración fue evidente, como se muestra en la figura 24, ya que en este reactor se obtuvo una decoloración de hasta el 98% de color aparente y real. En el transcurso del experimento el efluente del reactor “B” presentó diversas coloraciones como se muestra en la figura 25, siendo los colores amarillos para una

remoción del color mayor al 90% y el color amarillo pálido y translucido (98) para la máxima remoción obtenida.

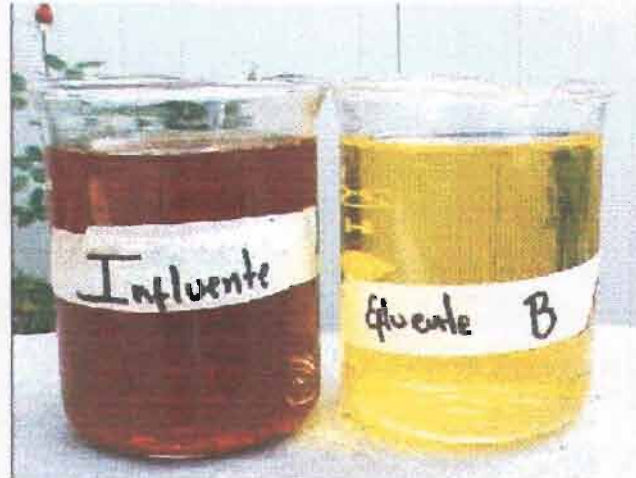


Figura 24: Decoloración en el reactor "B" (empacado con Turba).

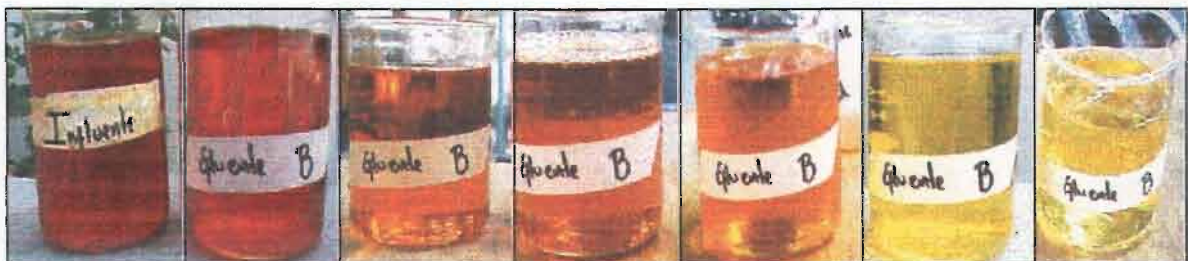


Figura 25: Gama de colores obtenido del Reactor "B".

### **Resultados de DQO en los reactores**

Los resultados del comportamiento de la demanda química de oxígeno (DQO) se presentan en la figura 26.

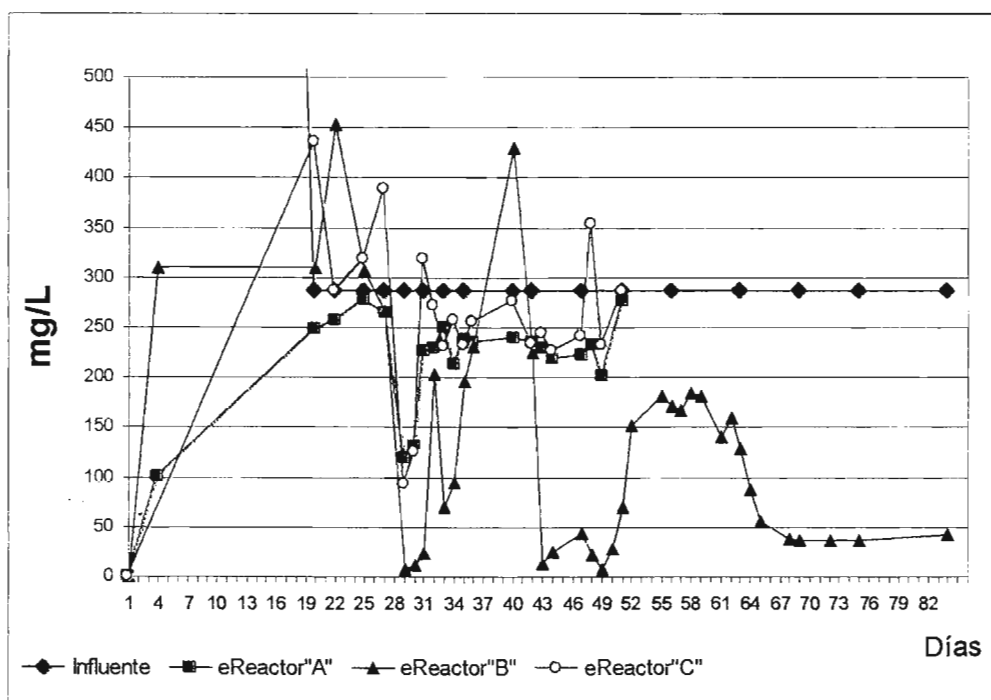


Figura 26: Resultados de la DQO de los 3 reactores

En cuanto a los resultados de la DQO se puede observar un comportamiento similar a los resultados de color, donde la disminución es notable a partir del cambio de pH a 3.6. Así mismo se observa que los reactores “A” y “C”, no presentan una buena eficiencia de remoción de la DQO.

Siendo en el reactor empacado con la turba (“B”) en el que mayor remoción de DQO se observa (97 % para el día 29 y 49 de funcionamiento de los reactores y el 95% para el día 30 y 43). En los períodos donde los resultados tienen una tendencia a aumentar en la concentración de color y DQO, hay una disminución del porcentaje de remoción del colorante, y por ende una mayor demanda química de oxígeno para la oxidación del colorante. En el período que va del día 50 al 65 de operación, en el reactor “B”, se obtiene en promedio una eficiencia de remoción del 36%. Por otra parte para la etapa final del funcionamiento de este mismo reactor (del



día 67 al 84 de operación) se obtuvo en promedio un 87% de la remoción de la DQO.

### Resultados de toxicidad en los reactores

En cuanto a las pruebas de toxicidad, se hicieron 5 muestreos en el tiempo de operación de los reactores (84 días), los resultados se muestran en la tabla 6:

Tabla 6: Resultados de toxicidad del colorante en reactores

Reactor	UT inicial Influente	UT final Efluente				
A	8.326	6.403	8.275	ND	ND	ND
B	8.326	0	1.793	0	0	0
C	8.326	5.896	7.997	ND	ND	ND
Día de operación del Reactor		29	34	43	49	72

ND: NO DETERMINADO

Estos resultados indican que el reactor "B" (turba inoculado con *Phanerochaete c.*) es el más eficiente para la disminución de la toxicidad del colorante, ya que puede disminuir hasta en un 100% la toxicidad dada por el colorante naranja ácido 24.

Little y Lamb (1973) mencionan que la mayoría de los colorantes tienen baja toxicidad acuática, ya que la concentración letal tóxica que causa mortalidad al 50% de la población probada ( $LC_{50}$ ) es mayor a 180 mg/L en muchos de estos colorantes, y solo algunos cuantos son tóxicos por debajo de esta concentración. La EPA (1996) reporta para el naranja ácido 24 una  $LC_{50}$  de 130 mg/L a una temperatura de 17°C. A menores concentraciones puede ocasionar a los humanos sensibilidad por contacto

dada principalmente por la exposición al colorante en la ropa, zapatos y cosméticos (Docker *et al.*, 1987; Correia y Brandao, 1986; Luczynska y Topping, 1986; Alanko *et al.*, 1978 y Calnan, 1976).

### Resultados de COT en los reactores

Los resultados de carbón orgánico total (COT) obtenidos de los tres reactores se muestran en la figura 27.

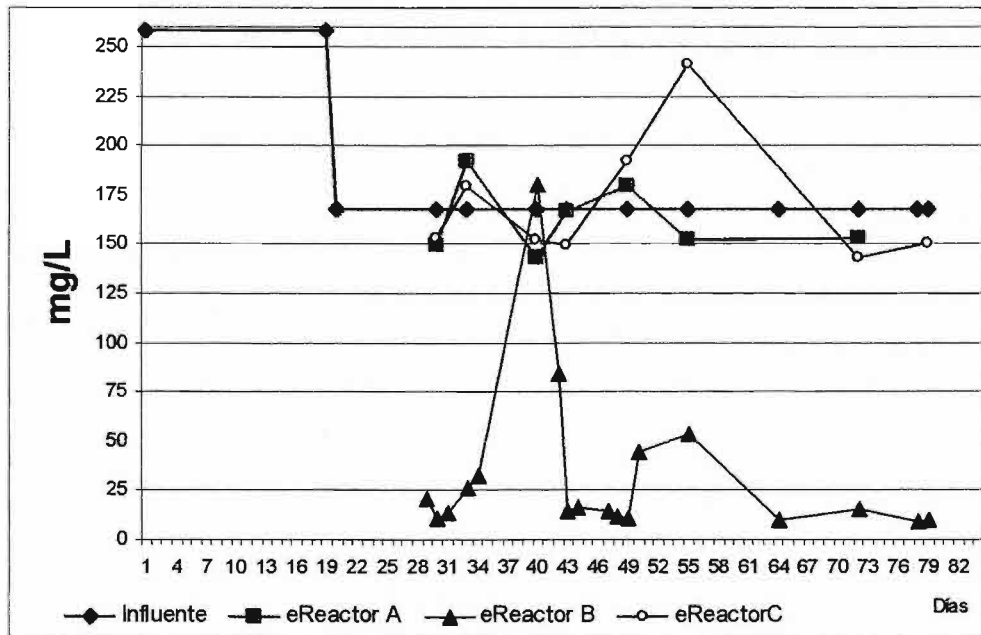


Figura 27: Resultados de Carbón orgánico total en los tres reactores

En la figura anterior se muestra que el reactor “B” es el más eficiente para la remoción de COT ya que remueve hasta el 94%. En los reactores “A” y “C” no

existe remoción del COT y las variaciones que se presentan en los resultados posiblemente nos indican procesos de sorción.

### **Resultados del material de empaque en los reactores**

Como muestran los resultados, el material de empaque de los reactores es muy importante en la retención y soporte del micelio lo que se vera reflejado en la decoloración del naranja ácido 24. El reactor "A", en donde fue usado un medio inerte, donde el soporte no proporcionaba nutriente alguno al micelio y la superficie de contacto era poca y con grandes espacios abiertos, fue el reactor en el que menor eficiencia se observó. El reactor "C", empacado con paja de trigo, pudo haber aportado los nutrientes y el soporte adecuado al micelio, ya que la paja de trigo es un medio utilizado para la producción masiva de hongos comerciales como *Pleurotus ostreatus*. Sin embargo, la alta humedad provocó un proceso de putrefacción en la paja y por ende un foco de contaminación.

El reactor "B", empacado con turba, fue en el que mejores resultados se obtuvieron. La turba proporcionó al micelio los nutrientes y el soporte adecuado. Posiblemente el atrapamiento y retardo de las enzimas en el lecho de turba fue la causa de estos resultados, ya que las enzimas al ser retenidas por la turba tenían mayor tiempo de contacto con el colorante, lo cual hizo posible una mayor decoloración; por otra parte se ha observado que no solo la actividad enzimática es responsable de la degradación del colorante, sino que también la adsorción de moléculas del colorante sobre la hifa fungal influye en la remoción total de éste en la solución acuosa, sin embargo los colorantes adsorbidos son difíciles de eliminar, lo que hace difícil la determinación de la concentración adsorbida del colorante en el

micelio (Wang y Yu, 1998). Por lo que no se puede dejar de tomar en cuenta los procesos de sorción tanto del micelio como de la propia turba.

En investigaciones anteriores se ha demostrado que el proceso de adsorción es un proceso eficaz para el retiro del color de aguas residuales. Siendo el uso de carbón activado uno de los métodos mas eficaces, pero muy costoso, por lo que se han hecho otros estudios para encontrar adsorbentes baratos y de amplia disponibilidad que incluyen bentonita, cenizas, arcilla, mazorca de maíz, virutas de madera y silicona (Fu y Viraraghavan, 2001), pero estos adsorbentes tienen capacidades bajas de adsorción, por lo que se requieren nuevas propuestas de adsorbentes económicos, disponibles y eficaces.

La turba puede llegar a ser una elección ideal como adsorbente y medio filtrante, ya que es un material polar y muy poroso, además de ser barato y fácil de usar (Couillard, 1994). Tiene la característica de adsorber aceites, nitrógeno, metales pesados como Fe, Mn, Zn, K, Na, Ca, Mg y Pb así como compuestos orgánicos polares de algunos efluentes; también se han hecho estudios de remoción de fenoles y deldrinos, gases aromáticos como la dimetil amina, el amonio y el sulfuro de hidrogeno, también la turba es muy efectiva para la remoción de colorantes de tipo básicos y ácidos, plaguicidas y materia radiactivo; además se ha comprobado la efectividad de la turba para le remoción de coliformes fecales y estreptococos fecales (Couillard, 1994; Piet *et al.*, 1994 y Viraraghavan y Ayyaswami 1987). Las características generales de la turba se describen en el anexo 3.

La turba ha sido comparada favorablemente contra carbón activado, silica y alumina en cuestión de adsorción; a pesar de que en comparación con el carbón activado la turba tiene una capacidad de adsorción de 2 a 3 veces menor, la turba tiene la ventaja de no requerir de activación como el carbón activado y su costo es menor, ya que de acuerdo a Couillard (1994) en 1991 un kilogramo de turba costaba alrededor de 9 centavos de dólar mientras que un kilogramos de resinas de intercambio iónico su costo variaba entre los 4 y 22 dólares. Además los filtros de turba tienen del 14 al 23% más vida efectiva que los del carbón activado. La turba gastada puede ser quemada y utilizada potencialmente como sustrato en estado de fermentación sólido para enriquecimiento proteínico (Robinson *et al.*, 2001 y Viraraghavan y Ayyaswami, 1987).

De acuerdo a Couillard (1994) existen cuatro fases esencialmente en el proceso de adsorción en la turba porosa:

- El transporte de impurezas del volumen de solución a la superficie exterior de la turba
- El movimiento del contaminante por la interfase y la adsorción hacia el sitio de la superficie externa
- La migración de moléculas del contaminante dentro de los poros de la turba
- La interacción de moléculas del contaminante con los sitios disponibles en las superficies interiores, limitando el poro y espacios del capilar de la turba

Uno o más de los pasos anteriores puede controlar la proporción en que los contaminantes son adsorbidos y la cantidad de adsorción de los contaminantes hacia la partícula sólida. Puede haber muchas posibles interacciones entre el contaminante y la turba: los grupos catiónicos se intercambian con los iones de  $H^+$  encontrados en el  $-COOH$ , hidróxidos de fenol y grupos heterocíclicos; la interacción de cationes metálicos para formar los complejos; la formación de ligaduras de hidrógeno entre el cationes polivalentes y el hidroxil, lignina, celulosa y el hemicelulosa se agrupa dentro de la estructura porosa; y la formación de grupos diversos con los átomos de oxígenos no saturados. Estas interacciones dependen de las características de la turba y de los contaminantes. El tratamiento con calor de la turba puede liberar algunos grupos funcionales y puede aumentar el número de sitios del intercambio disponibles (Couillard, 1994).

El proceso de atrapamiento e inmovilización de las enzimas en el medio de soporte, parece ser un factor importante para que las enzimas inmovilizadas puedan tener una estabilidad catalítica y por tanto una mayor decoloración del colorante. De acuerdo con Rodríguez (1998), existen varios métodos para poder inmovilizar a las enzimas, entre ellos el uso de materiales que pueden ser usados en reactores, ya sea de agitación o bien en columnas empacadas. De esta manera se podría tener a la enzima retenida por una reacción química con el medio de soporte al formar una unión covalente o bien, la enzima solo sea atrapada de manera física por el medio de soporte.

En caso del empaque del reactor "A", el plástico no brinda ninguna de las alternativas a las enzimas, por lo que estas salían libremente, no hubo retención de micelio y de las enzimas, por lo tanto la capacidad de remoción del colorante a causa

de la actividad enzimática disminuyó considerablemente. En cuanto al reactor "C", los resultados no se podrían evaluar debido a la contaminación de la paja.

En el reactor "B", la turba pudo fácilmente inmovilizar y acumular las enzimas del micelio de *Phanerochaete chrysosporium*, por lo que el proceso de decoloración del influente fue eficiente. Los procesos de inmovilización de las enzimas por la turba pudieron haber sido de adsorción, intercambio iónico, unión covalente o solo de forma física, de acuerdo a lo que reporta Rodríguez (1998). Sin embargo para poder confirmar esto se requieren estudios mas específicos con la turba y la retención del micelio y las enzimas de *Phanerochaete chrysosporium*, e incluso de otros hongos, lo cual es una línea de investigación para posteriores trabajos.

Por otra parte y de acuerdo a la literatura, el aporte de oxígeno es importante, ya que la presión parcial de oxígeno afecta fuertemente el índice y el grado de la degradación de los sustratos como la lignina o en este caso del colorante, La difusión del oxígeno en la biomasa micelial facilita la producción de las enzimas como la lignino peroxidasa y la manganeso peroxidasa (Frederick *et al.*, 1992). Sin embargo Zohar *et al.* (1992) mencionan que el oxígeno no es un factor limitante para el crecimiento de *Phanerochaete chrysosporium*, en cultivos con soporte sólidos, como el cultivo de tallos de algodón en los cuales trabajaron o bien aplicable a este trabajo, la turba.

Uno de los principales problemas en los reactores diseñados para la extracción de las enzimas de los hongos, radica principalmente en la naturaleza filamentosa de los hongos ya que son propensos a ramificarse. En un proceso de un

tiempo largo de operatividad del biorreactor, un gran numero de problemas operacionales tales como aumento de la viscosidad del medio de cultivo y formación incontrolada de agregados del micelio (Moreira *et al.*, 1998). Por otro lado también se ha investigado la adsorción de los colorantes en el micelio (vivo y muerto) donde se ha observado una rápida adsorción física del colorante en el micelio, en ambos casos, seguida por una lenta biodegradación solo en el micelio vivo, esto a causa de la actividad enzimática (intra y extracelular) (Wang y Yu, 1998), por lo que esta relación de adsorción y degradación de la molécula del colorante por medio del micelio puede proveer un mecanismo para facilitar la aplicación de este tipo de hongos en un tratamiento continuo de un influente con colorantes.

Los experimentos que se han realizado se basan o en la purificación de la enzima o en la extracción de las mismas, sin embargo con estos experimentos se puede demostrar que la eficiencia no solo proviene de las enzimas sino de la acción que tengan éstas y su retención en el medio filtrante así como la función de adsorción del micelio mismo, además de la función del medio de soporte como en este caso la turba.

A pesar de que la turba es reconocida como un medio filtrante efectivo para el control de la contaminación de agua, la investigación y estudios con turba es limitada, principalmente a escala real, ya que siempre ha existido la posibilidad de que sistemas basados en turba puedan declinar en su capacidad de adsorción, de acuerdo a Viraraghavan y Ayyaswami (1987), por lo que el uso de este tipo de sistemas tienen un buen potencial a pequeñas escalas para el uso en el tratamiento de aguas residuales industriales y sanitarias.



Por otra parte Piet *et al.* (1994), señalan un tiempo de vida pequeño alrededor de 150 días, ya que este tipo de sistemas tienden a inundarse por la pérdida de la capacidad de infiltración. Sin embargo Nichols y Boelter (1982) reportan un tiempo de operación efectivo de sistemas de camas de arena con turba como tratamiento secundario hasta de tres años, principalmente para la remoción de coliformes fecales, fósforo y nitrógeno.

La turba ha sido utilizada exitosamente en sistemas que contienen además un principio biológico activo que degrada los contaminantes que son retenidos por su capacidad de filtración, regenerándola. Estos sistemas son conocidos como biofiltros sobre turba (Buelna, 1990).

La decoloración de efluentes con naranja ácido 24 por medio de biorreactores que contengan *Phanerochaete chrysosporium* y turba es muy prometedora, sin embargo es necesario seguir la línea de investigación y empezar con el estudio de algunas variables y la automatización del sistema, así como otros estudios complementarios.

## 6. CONCLUSIONES

- ❖ *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium* son capaces de decolorar al naranja ácido 24. Estos hongos tuvieron crecimiento y a su vez decoloraron entre el 60 y 90% del naranja ácido 24 en medio de cultivo líquido, las diferencias entre estas cepas no son estadísticamente significativas. *Phanerochaete chrysosporium* demostró una mayor capacidad de adaptación y crecimiento en comparación con *Pleurotus ostreatus*, al ponerlas en contacto por primera vez en cultivos sólidos.
- ❖ El experimento en medio líquido en un sistema cerrado arrojó resultados inesperados como el aumento del COT, por lo que para darle una explicación se recomienda realizar experimentos para la extracción y purificación de las enzimas liberadas por *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium*, y probar la efectividad de enzimas purificadas en la decoloración del naranja ácido 24.
- ❖ La paja utilizada como medio de soporte en los reactores no es eficiente, ya que es muy susceptible a la contaminación biológica lo que impide un desarrollo favorable del micelio inoculado.
- ❖ El plástico utilizado como medio de soporte en los reactores no es favorable para el crecimiento del hongo, ya que al ser un medio de soporte inerte no proporciona al micelio una fuente alterna de nutrientes y el micelio no se desarrolla, por lo que no se da una remoción del naranja ácido 24.

- ❖ La turba como medio de empaque para los reactores funciona de manera óptima al servir como soporte al micelio además de representar una fuente alterna de nutrientes. Además la turba tiene procesos de sorción con el colorante.
  
- ❖ El reactor alimentado en continuo con una solución de 250 mg/L del colorante naranja ácido 24, inoculado con *Phanerochaete chrysosporium* y empacado con turba, demostró altas eficiencias en la decoloración del colorante (98%), así como en la disminución de la DQO (95%), COT (94%) y la eliminación de la toxicidad medida con *Vibrio fischeri* (100%).
  
- ❖ El pH es un factor importante en el crecimiento del micelio y de la decoloración del colorante. El pH óptimo para la decoloración del naranja ácido 24 en un reactor con empaque de Turba inoculado con *Phanerochaete chrysosporium* fue de 3.6, ya que a valores mayores de 4 no hay crecimiento fungal y por lo tanto no se dan cambios en el colorante. Por otra parte la turba actúa como un sustrato de amortiguación, ya que neutraliza el pH de entrada haciendo que el efluente del reactor salga con valores cercanos al neutro.
  
- ❖ A pesar de que los resultados arrojados por el reactor empacado con turba e inoculado con *Phanerochaete chrysosporium* evidenciaron una remoción del naranja ácido 24, se recomienda realizar algunos análisis por espectrofotometría para comprobar la degradación de la molécula del colorante e incluso detectar subproductos intermediarios, así como realizar estudios de adsorción del colorante en el micelio y en el medio de empaque y determinar la vida útil de la turba como empaque en este tipo de reactores.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Alanko, K., Keskinen, H. Bjorksten, F. y Ojanen, S. 1978. Immediate-type hypersensitivity to reactive dyes. *Clin. Allergy* 8, 25-31
- Ander, P. y Marzullo, L. 1997. Sugar oxidoreductases and veratryl alcohol oxidase as related to lignin degradation. *J. Biotechnol.* 53, 115-131.
- Anliker, R. 1977. Color chemistry and the environment. *Ecotoxicol. And Environ. Saf.* 1, 211-237.
- Bennett, W., Wunch, K. y Faison, B. 2002. Use of Fungi in biodegradation. En: Hursh, C., Crawford, R., Knudsen, G., McInerney, M. y Stetzenbach, L. (eds) *Manual of environmental microbiology*. USA. Pag 1138.
- Bishop, P. 1996. The Biodegradation of Textiles Dyes Using Biofilm Treatment Systems. En: Kuppusamy, I. Y Briones, R. (Eds) *Biodegradación de Compuestos Orgánicos Industriales*. 1:1-10 UNAM, Instituto de Ingeniería, Marzo 26 y 17. México, D.F.
- Bogan, W., Schoenike, B. Lamar, R. y Cullen D. 1996. Manganese preoxidase mRNA and enzyme activity levels during bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil with *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 62:2381-2387.
- Brandao, F., Altermatt, C., Pecegueiro, M., Bordalo, O. y Fousereau, J. 1985. Contac dermatitis to disperse bleu 106. *Contact Dermatitis*. 13, 80-84.
- Buelna, G. y Beélangier, G. 1990. Désodorisation, traitement et valorisation du lisier de porc par biofiltration sur lit organique. *Rapport techniques de l'eau*. 23: 259-264.
- Buitrón, G. 1996. Biodegradación Aerobia de Compuestos Xenobióticos. En: Kuppusamy, I. Y Briones, R. (Eds) *Biodegradación de Compuestos Orgánicos Industriales*. 1:1-10 UNAM, Instituto de Ingeniería, Marzo 26 y 17. México, D.F.
- Bumpus, A. 1989. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 55:154-158.
- Bumpus, A. y Aust, S. 1987. Biodegradation of DDT [1,1 l-trichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl) ethane] by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology* 53:2001-2028.

- Calnal, C. 1976. Quinazoline Yellow SS in cosmetics. *Contact Dermatitis* 2, 160-166.
- Cameron, M., Timofeevski, S. y Aust, S. 2000. Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. *Appl Microbiol Biotechnol.* 54: 751-758.
- Cerniglia, C., Freeman, J. Franklin, W. y Pack, L. 1982. Metabolism of benzidine and benzidine-congener based dyes by human, monkey and rat intestinal bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107, 1224-1229.
- Chahal, D., Kluepfel, D., Morosoli, R., Shareck, F., Laplante, S. Y Rouleau, D. 1995. Use of dyes in solid médium for screening lignolytic activity of selective actinomycetes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 51/52, 137-144
- Clarke, E. y Anliker. 1980. Organic dyes and pigments. *Handbook of enviromental chemistry*, Springer Verlag.
- Combes, R. y Haveland-Smith, R. 1982. A review of genotoxicity of food, drug and cosmetic colours and other azo, triphenylmethane and xanthene dyes. *Mutant. Res.* 98,101.
- Correia, S. y Brandao, M. 1986. Contact Dermatitis of the feet. *Derm Beruf Umwelt.* 34, 102-106.
- Couillard, D. 1994. The Use of Peat in wastewater treatment. *Wat. Res.* 28: 1261-1274.
- Cruz, A., Buitrón, G. y Kuppusamy, I. 1996. Desarrollo de la tecnología para el tratamiento de aguas residuales de la industria textil. X congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Toluca, México 14- 16. Febrero
- Cruz, A. y Buitrón, G. 2000. Biodegradación del colorante azo azul disperso 79, mediante un proceso acoplado anaerobio/aerobio. *Ingeniería y Ciencias Ambientales*, Año 12 Num. 46 Mayo- junio
- Cutis, H., Barnes, S. y Schnek. 2000. Los Hongos. En: Flores G. (ed). *Biología. Ed. Médica, Panamericana. México.* 1491 pp.
- Docker, A., Wattie, J., Topping, M., Luczynska, C., Newman Taylor, A., Pickering, C., Thomas, P. y Gompertz, D. 1987. Clinical and immunological investigations of respiratory disease in workers using reactive dyes. *Br. J. Ind. Med.* 44, 534-541.

- Donlon, B., Razo-Flores, E. Luijten, M., Swarts, H. Lettinga, G., y Field, J. 1997. Detoxification and partial mineralization of azo dye mordant orange 1 in a continuous upflow anaerobic sludge-blanket reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 83-90.
- EPA. 1996. Best Management Practices for Pollution Prevention in the Textile Industry, EPA, Office of Research and Development. U.S. EPA/8257R-96/004.
- Eweis, J., Ergas S., Chang, D. y Schroeder, E. 1998. *Bioremediation Principles*. The McGraw-Hill Companies, Inc. USA.
- Frederick, M. Grulke, E. y Reddy, C. 1992. Determination of the Respiration Kinetics for Mycelial Pellets of *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 1740:1745.
- Fu, Y. y Viraraghavan, T. 2001. Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. *Bioresource Technology*. 79: 251-262.
- Garzón-Zuñiga, M. 2001. Mécanismes D'eenlèvement de L'Azote du Lisier de porc par Biofiltration Aérée sur Tourbe. Thèse Philosophiae Doctorat. Département de Génie Civil, Faulté de Sciences et de Génie, Université Laval, Québec, Canada.
- Garzón-Zuñiga, M., Lessard, P. y Buelna, G. 2003. Determination of the Hydraulic Redidence Time in a Trickle Biofilter Filled with Organic Matter. *Environmental Technology*. 24 (5): 605-614.
- Glenn, J. y Gold, M. 1983. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1741-1747.
- Glenn, J. y Gold, M. 1985. Purification and characterization of an extracellular Mn(II) dependent peroxidase from the lignin-degrading basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 242, 329- 341.
- Glynn, H. y Gary, H. 1999. *Ingeniería Ambiental*. Prentice Hall, México, 800 pp.
- Gold, M., Kuwahara, M, Chiu, A. y Glenn, J. 1984. Purification and characterization of an extracellular hydrogen peroxide requiring diarylpropane oxygenase from white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 234, 353-362.
- Grant, W. y Long, P. 1989. *Microbiología Ambiental* Editorial Acribia. España. 222pp.

- Greenberg, A., Clesceri, L. y Eaton, A. 1992. Standard Methods. 18<sup>th</sup> edition. For the examination of water and wastewater. American Public Health Association. Washington, DC.
- Harvey, P., Schoemaker, H. y Palmer, J. 1986. Veratryl alcohol as a mediator and the role of radical cations in lignin biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Lett. 195, 242-246.
- Hatakka, A. 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi production and role in lignin degradation. FEMS Microbiol. Rev. 13, 125-135.
- Haug, W. Schmidt, A., Nortermann, B., Hempel, D., Stolz, A. y Knackmuss, H. 1991. Mineralization of sulfonated azo dye Mordant Yellow 3 by a 6-aminonaphthalene-2-sulfonate-degrading bacterial consortium. Appl. Environ. Microbiol. 57, 3144-3149.
- Huitzinger, O. 1980. The Handbook of Environmental Chemistry, Volume 3 part A. Verlag Berlin Heidelberg. 188 pp.
- Kirk, T., Croan, S., Tien, M., Murtagh, K. y Farrel. 1985. Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. Enzyme Microbiol. Technol. 8, 27.
- Kirk, T. y Farrel, R. 1987. Enzymatic "combustión": the microbial degradation of lignin. Annu. Rev. Microbiol. 41, 465-505.
- Kulla, H., Klausener, F., Meyer, U., Ludeke, B. y Leisinger, D. 1983. Interference of aromatic sulfa groups in the microbial degradation of the azo dyes Orange I y Orange II. Arch. Microbiol. 135, 1-7.
- Kuppusamy, I. 1995. Impacto Ambiental de la Industria Textil en México: Avances en la biodegradación anaerobia y precipitación de colorantes tipo azo. Segundo minisimposium Internacional sobre remoción de contaminantes de Aguas y Suelos. Instituto de Ingeniería, UNAM. México, Noviembre 17 Pp:144-158
- Kuppusamy, I y Briones, R. 1999. Anaerobic Treatment of Textile Wastewaters Using Expanded Granular Sludge Blanket Reactor. En Buitrón, G. y Macarrie, H. (eds). Waste Minimisation and end of pipe Treatment in chemical and Petrochemical Industries. IAWQ International Specialised. Conference of the chemical Industry Group. Merida, Yucatan, México, Noviembre 14 al 18 Pag. 644.

- Kwang-Soo, S. y Chang-Jin, K. 1998. Decolorisation of artificial dyes by peroxidase from the white-rot fungus, *Pleurotus ostreatus*. *Biotechnology Letters*, 20: 569-572.
- Kwang-Soo, S., ILL-Kyoon, O. y Chang-Jin, K. 1997. Production and purification of remazol brilliant blue R decolorizing Peroxidase from the culture filtrate of *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 1744-1748.
- Lee, B., Pometto, A. y Fratzke, A. 1991. Biodegradation of degradable plastic polyethylene by *Phanerochaete* and *Streptomyces* species. *Applied and Environmental Microbiology* 57:678-685.
- Little, L. y Lamb, J. 1973. ADMI: Dyes and the Environment, Vol. 1., Amer. Dye Manufactures Inst. Inc., New York.
- López, S. 2004. Degradación de un colorante diazo mediante procesos de oxidación química y Biológica. Tesis de Maestría en Ingeniería Ambiental. Programa de Maestría y Doctorado Ambiental. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 91 pp.
- Luczynska, C. y Topping, M. 1986. Specific IgE antibodies to reactive dye-albumin conjugates. *J. Immunol. Methods*. 95, 177-186.
- Martínez, D. 1984. Cultivo de *Pleurotus ostreatus* sobre desechos agrícolas. *Biotica* Volumen 9, Número 3. 243-248.
- McKay, G., Otterburn, M. y Sweeney, A. 1978. *J. Soc. Dyers Colour*. 93, 357.
- Michaels, G. y Lewis, D. 1985. Sorption and toxicity of azo and triphenylmethane dyes to aquatic microbial populations. *Environ. Toxicol Chem*. 4, 45-50.
- Michaels, G. y Lewis, D. 1986. Microbial transformation rates of azo and triphenylmethane dyes. *Environ. Toxicol Chem*. 5, 161-166.
- Moeller, G., Garzón, M. y Gómez, A. 2000. IMTA. Tratamiento y Reuso del agua en la Industria química de colorantes y pigmentos, informe interno. Convenio SGP-IMTA-2000. Instituto Mexicano de Tecnología del Agua.
- Montiel, E., Acosta, M., Portugal, D., López, L., Bautista, N., Mora, V., Medrano, F., Venegas, R. y Olivares G. 2001. 7º curso sobre el cultivo del hongo comestible *Pleurotus* spp. sobre residuos lignocelulósicos. Laboratorio de



- micología, Centro de Investigaciones Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México,
- Moreira, M., Palma, C., Feijoo, G. y Lema, J. 1998. Strategies for the continuous production of ligninolytic enzymes in fixed and fluidised bed bioreactors. *Journal of Biotechnology*. 66: 27-39.
- Moreno, A. 1995. Tratamiento electroquímico de efluentes simulados de la industria textil, reducción de color y de la demanda química de oxígeno. Tesis de Maestría. ITESM. Pp 259.
- Nelson, C. y Hites, R. 1980. Aromatic amines in and near the Buffalo River. *Environ. Sci Technol.* 14, 1147-1149.
- Nichols, S. y Boelter, H. 1982. Treatment of secondary sewage effluent with peat-sand bed. *Journal of Environmental Quality*, 11: 86-92.
- Noyola, A., Vega, E., Ramos, J. y Calderón, C. 2000. Alternativas de tratamiento de aguas residuales. *Filtros Percoladores*. IMTA, México.
- Ortiz-Hernández, M. y Sánchez-Salinas, E. 1999. La Biotecnología: su aplicación en el tratamiento y la disposición final de residuos. *Biotecnología Ambiental II*. En: Taboada, M. y Aguilar, A. (Eds) *Diplomado de Titulación en Ciencias Biológicas. Tópicos Selectos*. pag 153-162. México,
- Oswalt, Y. y Land, Y. 1973. Color removal from kraft pulp mill effluents by massive lime treatment, US Environmental Protection agency. EPA-r2-73-086; Washington, D.C.
- Oxspring, D., McMullan, G., Smyth, W. y Marchant, R. 1996. Decolourisation and metabolism of the reactive dye, Remazol Black, B by an immobilized microbial consortium. *Biotech. Lett.* 18, 527-530.
- Pagga, U. y Brown, D. 1986. The degradation of dyestuffs. Part II, Behavior of dyestuffs in aerobic biodegradation tests. *Chemosphere*. 15, 479-491.
- Pasti-Grigbsy, B., Paszczynski, A., Goszczynski, S. y Crawford, D. 1992. Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Peña, C., Carter, D. y Ayala-Fierro, f. 1998. *Toxicología Ambiental. Evaluación de riesgos y restauración ambiental*. Canter for toxicology. The Univesity of Arizona. Estados Unidos. 221 pp.

- Pica, Y. 2004. Procedimiento para la determinación de toxicidad por el método de evaluación con *Photobacterium phosphoreum* (*Vibrio fischeri*), en apego al protocolo aprobado por SECOFI NMX-AA-112-1995 y acreditado por la Entidad Mexicana de Acreditación (EMA). Instituto Mexicano de Tecnología del Agua
- Piet, N., Piet, M., Speleers, L. y Verstraete, W. 1994. Direct Treatment of domestic wastewater by percolation over peat, bark and woodchips. *Wat. Res.* 28: 17- 26.
- Platt, M., Hadar, Y. y Chet, I. 1985. The decolorization of the polymeric dye Poly-Blue (polyvinylamine sulfonate-anthraquinone) by lignin-degrading fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21, 394-396.
- Pointing, S. 2001. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57: 20-33.
- Pürschel, W. 1976. Depuración biológica natural. El tratamiento de las aguas residuales domesticas (técnicas de depuración). Urmos, S.A. Tomo 6 capitulo 6. España pag:84-112.
- Quezada, M. y Buitrón, G. 1996. Biodegradación Aerobia de Colorantes Tipo Azo (Rojo Ácido 151). XXV Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Tratamiento de Aguas Residuales. Memorias vol. 2. del 3 al 7 Noviembre; México,
- Quezada M., Linares, I. y Buitrón, G. 1999. Use of sequencing batch Biofilter for Degradation of Azo Dyes (acids and basics). En Buitrón, G. y Macarrie, H. (eds). Waste Minimisation and end of pipe Treatment in chemical and Petrochemical Industries. IAWQ International Specialised. Conference of the chemical Industry Group. Merida, Yucatan, México, Nov. 14 al 18. 644 pp.
- Razo-Flores, E., Luijten, M., Donlon, B., Lettinga, G. y Field, J. 1997. Complete biodegradation of the azo dye azodisalicylate under anaerobic conditions. *Environ. Sci. Technol.* 31, 2098-2103.
- Renhammar, B. y Malstrom, B. 1981. "Blue" copper-containing oxidases. In Copper proteins. Edited by Spiro, T. y Wiley, J. New York, N.Y. Metal ions in biology. 3, 109-149.
- Reyes, M. 1999. Evaluación de la decoloración de efluentes y colorantes de la industria textil utilizando lacasa inmovilizadora. Tesis de Maestría. División de estudios de posgrado de la Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional Autónoma de México.

- Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R. y 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.
- Robles, E. 1998. Contaminación química del agua. Memorias: Hacia una renovación ambiental en México. ED. Chio, R. Del, 14 al 17 de abril, México
- Rodríguez, E. 1998. Identificación de un sistema enzimático fúngico para la decoloración de colorantes de uso textil. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Rodríguez, E., Pickard, M. y Vazquez-Duhalt, R. 1999. Industrial dye decolorization by laccases from lignolytic fungi. *Current Microbiology*. 38, 27-32.
- Saval, S. 1995. Los microorganismos en el subsuelo: caracterización microbiológica del suelo aspectos bioquímicos de la biodegradación tecnologías de biorremediación de suelos y acuíferos. Instituto de Ingeniería: UNAM, México.
- Sánchez-García, A. 2004. Cultivo del Hongo comestible *Lentinula edodes* (Berk.) Pegler "Shiitake" sobre aserrín de abeto y encino en el Estado de Morelos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 57 pp.
- Sánchez-Salinas, E. 2000. De la atmósfera primitiva a los organismos eucariotes. En: Sánchez-Salinas, E. y Ortiz-Hernández, L. Ciencias Biológicas, del Origen de la vida a la terapia génica. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México. 250pp.
- Shin, K., Youn, H., Kang, S. y Hah, Y. 1993. Purification and characterization of D-glucose oxidase from white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Eur. J. Biochem*, 215, 747-752.
- Slokar, Y. y Majcen, A. 1998. Methods of Decoloration of textile wastewaters. *Dyes and Pigments*. 37 (4), 335-356.
- Solomon, E., Berg, L. Y Martín, D. 2001. *Biología*. McGraw-Hill. México. 1237 pp.
- Srinivasan, C., D'Souza, T., Boominathan, K. y Reddy, C. 1995. Demonstration of laccase in the white-rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ Microbiol* 61: 4274-4277.

- Striklan, A. y Perkins, W. 1995. Decoloration of Continuous dyeing wastewater by ozonation. *Textile Chemist and Colorist*. 27 (5), 11.
- Vaidya, A. y Datye, V. 1982. Environmental pollution during chemical processing of synthetic fibers. *Colourage* 14, 3-10.
- Van der Waarde, J., Henssen, M., Keuning, S., Harkes, M., Doddema, H. y Van der Lugt, J. 1996. Feasibility study of biological treatment of waste water from the textile industry with *Phanerochaete chrysosporium*. In Proc. Aquatech 96: Conf. Adv. Waste Wat. Treatment, Amsterdam, September 23-25, IAWQ-NVA, pp. 567-568.
- Van der Zee, F., Field, A. y Lettinga, G. 1999. The role of (auto) catalysis in the mechanism of anaerobic azo reduction. En Buitrón, G. y Macarrie, H. (eds). Waste Minimisation and end of pipe Treatment in chemical and Petrochemical Industries.. IAWQ International Specialised. Conference of the chemical Industry Group. Merida, Yucatan, México, Nov.14 al 18, 644 pp.
- Viraraghavan, T. y Ayyaswami, A. 1987. Use of peat in water pollution control: a review. *Civ. Eng.* 14: 230-233.
- Wang, Y. y Yu, J. 1998. Adsorption and Degradation of Synthetic Dyes on the Mycelium of *Trametes Versicolor*. IAWQ, *Wat. Sci. Tech.* Vol. 38, No. 4-5. pp 233-238. Gran Bretaña,
- Winkler, M. 1994. Tratamiento biológico de aguas de desecho. Limusa, México.
- Young, L. y Yu, J. 1997. Ligninase-catalysed decolorization of synthetic dyes. *Wat. Res.* 31, 1187-1193.
- Zohar, K., Friesem, D. y Hadar, Y. 1992. Lignocellulose Degradation using Solid-State Fermentation: *Pleurotus ostreatus* versus *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 58:1121-1127.
- Zollinger, H. 1987. *Color Chemistry*. VCH publishers, Weinheim, Germany. Citado por Bishop, P. The Biodegradation of Textiles Dyes Using Biofilm Treatment Systems. En: Kuppasamy, I. Y Briones, R. (Eds) 1996. Biodegradación de Compuestos Orgánicos Industriales.1:1-10 UNAM, Instituto de Ingeniería, Marzo 26 y 17. México, D.F.

## ANEXOS

## ANEXO 1: CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS CEPAS FÚNGICAS

Los hongos son organismos inmóviles y poseen pared celular. La mayoría de las especies están compuestas por masas de filamentos cenocíticos (muchos núcleos dentro de un citoplasma común) o multicelulares. Un filamento fúngico se llama hifa y todas las hifas de un solo organismo se llaman colectivamente micelio. Las paredes de las hifas están compuestas fundamentalmente por quitina, un polisacárido que nunca se encuentra en las plantas. Los hongos son heterótrofos y pueden tener como sustancias de reserva al glicógeno. Las estructuras visibles de los hongos representan solo una pequeña porción del organismo y es denominado cuerpo fructífero o fructificaciones y son hifas fuertemente compactadas, especializadas en la producción de esporas (Curtis *et al.*, 2000).

Un micelio se origina por la germinación de una sola espora. El crecimiento del micelio reemplaza la movilidad, poniendo al organismo en contacto con nuevas fuentes de alimentos y con diferentes cepas de apareamiento. Todos los hongos son heterótrofos, ya sean saprobios, parásitos facultativos, obligados o micorrizicos. Obtienen alimento absorbiendo sustancias orgánicas o inorgánicas disueltas. Generalmente el hongo secreta enzimas digestivas sobre la fuente alimenticia y luego absorbe las moléculas resultantes mas pequeñas, producto de la degradación, que son liberadas al medio. Los miembros del reino Fungi se clasifican generalmente en cuatro grupos principales o phyla: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* y *Basidiomycota*.

Los basidiomicetos forman el grupo de hongos más familiar, ya que incluyen a los hongos de sombrero (setas) Como *Pleurotus ostreatus*. Se conocen 1428 géneros y 22 244 especies. La seta (fuctificacion o basidiocarpo) es el cuerpo fructifero en donde se producen las esporas. El micelio, a partir del cual se producen los basidiocarpos, forman una trama difusa que puede crecer radialmente varios metros. Los Basidiomicetos se caracterizan por un micelio primario joven a base de hifas monocarióticas multinucleadas y aseptadas, que mas tarde desarrollan septos transversales incompletos que delimitan porciones uninucleadas; dos segmentos de hifas de signo opuesto se conjugan sin fusión de núcleos, dando una hifa dicariótica. Estos micelios dicarióticos desarrollan unas estructuras especiales, denominadas basidios, con forma de masa, en cuya superficie se forman las basidiosporas haploides por migración, a los esterigmas correspondientes, de los núcleos producidos tras la cariogamia y la subsiguiente meiosis. (Sánchez-Salinas, 2000). Otro tipo de basidiomiceto, el hongo de la podredumbre blanca o yesquero, destructor voraz de la madera, esta siendo investigado actualmente por su potencial de destrucción de desechos tóxicos. Este hongo contiene una enzima compleja que puede degradar, no sólo los polímeros que encuentra en la madera sino también sustancias como el DDT, la dioxina y una amplia gama de contaminantes orgánicos. Ejemplo de este tipo de hongos es el:

***Pleurotus ostreatus***

Reino: Fungi o Mycota

División: Eumycetes

Phylum: Basidiomycota

Subdivisión: Basidiomycotina

Clase: Homobaidiomycetes

Orden: Agaricales

Familia: Pleurotacea

Genero: Pleurotus

Especie: ostreatus

#### DESCRIPCION:

Sombrero: de 5-15 cm, muy excéntrico y variable, normalmente en forma de concha, con el margen primero incurvado y después recto, a menudo ondulado. La cutícula que es separable, es lisa brillante, de color variable (beig, gris claro, gris negruzco o gris azulado)

Laminas: juntas, decurrentes hasta la base del pie, de color crema

Esporada: de color gris liláceo.

Pie: muy corto de 1 a 4centímetros de largo por 1 a 2 cm de diámetro, muy excéntrico o completamente lateral, recubiertos de pelos blancos

Carne: firme y fibrosa, blanca, de olor agradable (a veces algo anizado) y sabor dulce

#### HABITAT:

Hongo parásito o saprofito que vive en tocones y ramas. Básicamente de planifolios muertos o debilitados, en bosques de ribera, parques y jardines. Fructifica en verano y en otoño.

#### COMESTIBILIDAD:

Es comestible y muy apreciado. En los últimos años se ha difundido mucho en su consumo al cultivarse a gran escala. Esto permite hallarlo en el mercado todo el año, aunque a veces con el impropio nombre de seta de cardo". La autentica seta de cardo "*Pleurotus eryngii* (De Cand.: Fr.) Quélet" es una especie silvestre que crece sobre umbelíferas.

#### OBSERVACIONES:

Puede cultivarse fácilmente sobre troncos de chopo, al aire libre, o sobre balas de paja mezcladas con aserrín, en invernaderos; pero es preciso advertir que, si no se mantiene la temperatura, la humedad y la luminosidad adecuadas, es difícil obtener las setas de forma continuada.

#### *Phanerochaete chrysosporium*

Reino: Fungi o Mycota

Clase: Baidiomycetes

Familia: Corticiaceae

Especie: chrysosporium

División: Eumycetes

Orden: Aphyllophorales

Genero: Phanerochaete

La lignino peroxidasa, enzima que ha sido purificada a partir de cultivos de este micelio, en condiciones limitadas de nitrógeno. Se han encontrado diez isoformas que presentan una alta analogía. Son glicoproteínas que contienen un grupo prostético de protoporfirina IX, con un peso molecular alrededor de los 41 kDa (kilodaltons). La ligninasa H8, es la isoenzima mayoritaria de PC (Kirk, *et al.*, 1985); La Mn (II) peroxidasa también ha sido localizada, es una hemoproteína glicosilada con la protoporfirina IX como grupo prostético, reportada con un peso molecular alrededor de los 46 kDa (Glenn y Gold, 1985).

## **ANEXO 2: TÉCNICAS PARA LA PROPAGACIÓN E INOCULACION DE MICELIOS**

*Reportada por Montiel y colaboradores (2001).*

### 1) Propagación del micelio en medio líquido o en medio sólido

Con un bisturí se cuadrícula el micelio contenido en la caja de Petri con la cepa escogida, con la finalidad de obtener porciones de más o menos 1 cm<sup>2</sup>, o bien con un horador.

Estas porciones se colocan en matraces de 250 mL con caldo fungal y se incuban a 70 rpm a 30°C por 6 días. Para sembrarlo en cajas de Petri, el inóculo sacado con el horador se pone directamente en el agar solidificado y se incuba a 30°C, por 6 días en oscuridad.

### 2) Propagación del micelio en sustrato de soporte

#### a) Preparación de la semilla

Limpiar la semilla (de trigo o arroz) mediante enjuagues con agua. Hervir el grano durante aproximadamente 15 minutos, transcurrido el tiempo de hidratación se escurre el exceso de agua, se agregan 20 g de yeso y 5 g de supercal por Kg en peso seco del grano utilizado. Colocar los granos en frascos de vidrio con boca ancha, llenarlos 2/3 partes o en bolsas de polipapel. Esterilizar en autoclave u olla de presión a 121 °C y/o 15 Lb de presión durante 60 minutos. Sacar los frascos y dejarlos enfriar a temperatura ambiente.

Agitar con la finalidad de separar los granos entre sí y favorecer una aeración e hidratación homogénea. Inocular con la cepa seleccionada, con proporciones de medio de cultivo de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>. Se incuban a 28°C durante aproximadamente 20 días.

A estas primeras semillas se llaman primarios o "master". Posteriormente se puede hacer una segunda siembra en semilla, siguiendo todos los pasos anteriores, con excepción de que el inóculo se sacará de los "master".

#### b) Inoculación en sustrato de soporte

Preparación del sustrato:

Paja: se pica, se limpia y se le da un proceso de aireación. Se pasteuriza a 80°C durante 1 hr y se le agrega 1kg de cal. Se escurre y se deja enfriar.

Plástico: Se limpia y se corta para rellenar el reactor

Turba: Se mezcla con viruta de aserrín y se humedece con agua esterilizada hasta obtener un 60% de humedad

Se empaquetan los reactores (cada uno con el sustrato seleccionado) y se inocula el micelio obtenido en el medio líquido del punto 1 previamente seccionado, de tal manera que el micelio quede distribuido en forma abundante y homogénea en todo el reactor.

### ANEXO 3: TURBA, CARACTERÍSTICAS Y ORIGEN

La turba puede ser descrita como materia vegetal parcialmente fosilizada, usualmente de color castaño oscuro, muy poroso y polar (Couillard, 1994). La turba es una sustancia compuesta de material orgánico originado por la descomposición incompleta de restos vegetales en lugares carentes de aire, en un medio altamente saturado de agua y bajas temperaturas. Sus principales componentes son la lignina y la celulosa. Estos componentes, especialmente la lignina producen grupos funcionales polares tales como alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos, hidróxidos fenólicos y éteres que pueden encontrarse en los enlaces químicos (Viraraghavan y Ayyaswami, 1987). Completan su composición restos de musgos (el más abundante es el género de *Sphagnum*), gramíneas, a veces mezclados con fragmentos leñosos y partículas de humus. La turba es de naturaleza fibrosa, permite una mayor aireación y mejor humedad que el suelo por su porosidad y ligereza. Algunas de las características fisicoquímicas se muestran a continuación:

PARAMETRO	VALOR	PARAMETRO	VALOR
pH	3.8 - 4.3	Cenizas	7%
Materia Orgánica	92 - 95%	Nitrógeno	0.82%
CIC	80 meq/100 g	Retención Hidráulica	180%
Ca	268 meq/100 g	Conductividad Eléctrica	0.1 mmhos/cm
Mg	48 meq/100 g	Espacio poroso total	96%
K	12 meq/100 g	Densidad Aparente	0.07 g/cc
Na	22 meq/100 g		

Es una reserva de combustible fósil conocida, potencialidad que por sí sola amerita su estudio y desarrollo, a lo que se añade la positiva información internacional acerca de su uso masivo en varios países desarrollados. En la actualidad es utilizada, entre otras cosas, como insumo en la industria perfumera y en jardinería; prácticamente exenta de malezas y agentes patógenos. Los estudios hasta ahora realizados evidencian posibilidades importantes de su uso como combustible en la generación de electricidad y la producción de cemento, y en cierta medida en la cocción de alimentos y otros usos locales. Como componente en la fabricación de fertilizantes y para el mejoramiento de suelos su potencial de uso es muy amplio. Sin embargo, su incorporación a la economía tendrá que estar precedida de trabajos de investigación y desarrollo en cuanto a su utilización, extracción, secado y transportación, así como de estudios y experiencias sobre aspectos ecológicos e hidráulicos asociados a su explotación. Industrialmente, la turba es utilizada en la confección de paneles de aislamiento térmico y acústica que se obtienen mediante un proceso de aglomeración. También hay quienes la utilizan como materia orgánica en suelos para cultivos de hongos, especialmente en la producción de champiñones aventajando a otros tipos de substratos por el color blanco que se obtiene en el producto final. La turba es extraída de las turberas. Las turberas, las cuales contienen aproximadamente 55% de carbono, representan un escape del ciclo biológico de este elemento. Las turberas actuales se desarrollan en situaciones en donde la saturación hídrica del estrato sujeto a degradación puede prolongarse durante periodos de tiempo significativos, bien como resultado de un drenaje inadecuado de las



regiones altas, o bien áreas de topografía baja con aporte abundante pero de lento movimiento de líquidos, incluyendo los valles fluviales, deltas, estuarios y marismas costeras de mangle. Las turberas tropicales costeras y las tierras bajas eran mucho más numerosas en el pasado geológico, y fueron los antecesores de los principales depósitos de lignina y de carbón (Grant y Long, 1989).

Las turberas desarrolladas retienen con frecuencia restos vegetales microscópicos reconocibles, pudiendo también estar presentes trazas de la microflora degradativa, de hecho, las hifas persistentes de los hongos son tan abundantes en algunas turberas de las zonas altas inglesas que frustran los intentos de análisis del polen. Los depósitos de turba pueden contener hasta 20% de lignina, 30% de celulosa y 36% de hemicelulosa, en base a su peso seco: la producción relativa de polisacáridos es con frecuencia inferior al de las paredes celulares no desorganizadas. En algunas turberas de valles fluviales puede evidenciarse hasta un 80% de ácido húmico, pero también se han registrado valores tan insignificantes como del 5% reflejado presumiblemente el grado de preservación de los restos vegetales. El ácido fúlvico se encuentra así mismo presente, y las turberas contienen muchos fenoles extraíbles, incluso taninos; otras moléculas de origen biológico incluyen lípidos y aminoácidos, tanto derivados de proteína como no proteicos.

Los perfiles en una turbera rara vez descubren un incremento de la descomposición con la profundidad, pero en vez revelan discretos estratos de material relativamente no alterado, intercalados entre restos vegetales más degradados; esto sugiere que los sucesos críticos que determinan la formación de la turbera tienen lugar en o cerca de la superficie del depósito. La descomposición activa de los restos orgánicos se verifica en las turberas en desarrollo, y solo una pequeña proporción del ingreso de la producción primaria necesita conservarse para que ocurra la acumulación; se calculó que para la formación de una turbera en Everglades sería suficiente el depósito del 7.5% de la producción vegetal. No está claro por qué las actividades microbianas sufren una restricción selectiva, aunque los estudios de la microflora indican que los numerosos microorganismos son más altos en la superficie, como pudo determinarse por recuento de gérmenes viables o por la observación directa, y se ha señalado que los hongos y las bacterias disminuyen cuantitativamente según se profundiza el perfil, aislándose muy pocos microorganismos que crezcan activamente en la profundidad. Las hipótesis posibles que intentan explicar esta declinación hacen referencia a tensiones bajas de oxígeno, presencia de sustancias inhibitorias y restricción de nutrientes, particularmente del aporte de nitrógeno inorgánico. De éstos, la escasa disponibilidad de oxígeno puede ser el factor más limitante; se cree que las proporciones más profundas de los depósitos son permanentemente anóxicas. Las sustancias inhibitorias no se encuentran de forma repentina en las turberas, y por el contrario, con frecuencia estimulan también el crecimiento microbiano. Gran parte del contenido de Nitrógeno de la turba puede encontrarse bloqueado en forma de complejos orgánicos, y esto puede determinar un efecto restrictivo sobre la actividad microbiana, aunque las turberas tropicales se desarrollan frecuentemente cuando el nitrógeno inorgánico procedente del aflojamiento de las algas verde-azuladas está disponible (Grant y Long, 1989).

La turba utilizada en este trabajo fue empaquetada por la Corporación Hyponex desde Canadá: *Spagnum Peat Moss*, 1998.

## ANEXO 4: RESULTADOS

### SEGUNDA ETAPA

CRECIMIENTO DE LAS CEPAS FUNGICAS EN DOS MEDIOS (cm acumulados/dfa)						
<i>Pleurotus ostreatus</i>			<i>Phanerochaete chrysosporium</i>			
DÍAS	EMA	PDA	DÍAS	EMA	PDA	
1	0.5	0.5	1	0.5	0.5	0.5
2	0.9	0.7	2	2.1	1.6	1.6
3	1.3	1.25	3	3.85	3.5	3.5
4	2	1.8	4	6.8	5.2	5.2
5	2.56	2.3	5	8	7.53	7.53
6	3.5	3	6	8.4	7.9	7.9
7	4.4	4	7	8.6	8.1	8.1
8	5.7	5.77	8	8.8	8.5	8.5
9	6.6	6.2				
10	7.8	7.7				
11	8.2	7.9				
12	8.8	8.65				

Análisis de varianza de un factor

2 DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO PARA *Pleurotus ostreatus*

#### RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	6	26.95	4.49166667	12.3444167
Fila 2	6	26.8	4.46666667	12.1316667

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.001875	1	0.001875	0.00015321	0.99036763	4.96459052
Dentro de los grupos	122.380417	10	12.2380417			
Total	122.382292	11				

Análisis de varianza de un factor

2 DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO PARA *Phanerochaete chrysosporium*

#### RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	3	11.9	3.96666667	14.3033333
Fila 2	3	11.8	3.93333333	12.2633333

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.00166667	1	0.00166667	0.00012547	0.9915992	7.70864972
Dentro de los grupos	53.1333333	4	13.2833333			
Total	53.135	5				

Análisis de varianza de un factor

COMPARACION DEL CRECIMIENTO EN EMA ENTRE *Pleurotus o.* y *Phanerochaete c.*

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	6	26.95	4.49166667	12.3444167
Fila 2	3	11.9	3.96666667	14.3033333

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.55125	1	0.55125	0.04271896	0.84213878	5.59145974
Dentro de los grupos	90.32875	7	12.9041071			
Total	90.88	8				

Análisis de varianza de un factor

COMPARACION DEL CRECIMIENTO EN PDA ENTRE *Pleurotus o.* y *Phanerochaete c.*

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	6	26.8	4.46666667	12.1316667
Fila 2	3	11.8	3.93333333	12.2633333

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.56888889	1	0.56888889	0.04674793	0.83498762	5.59145974
Dentro de los grupos	85.185	7	12.1692857			
Total	85.7538889	8				

BIOMASA TOTAL GENERADA (GR.) DE LAS CEPAS *Pleurotus ostreatus* Y *Phanerochaete chrysosporium* EN DOS MEDIOS DE CULTIVO:

CEPA	MEDIO	#CAJA	PESO PAPEL (g)	PESO PAPEL + MICELIO (g)	BIOMASA (diferencia)	PROMEDIO
HEMIM 50	PDA	1	1.0744	1.2902	0.2158	0.2676
		2	1.0356	1.3343	0.2987	
		3	1.0726	1.3608	0.2882	
HEMIN 50	EMA	1	1.0385	1.4133	0.3748	0.2933
		2	1.0359	1.2876	0.2517	
		3	1.0595	1.3128	0.2533	
PC	PDA	1	1.0507	1.2246	0.1739	0.2087
		2	1.0812	1.2683	0.1871	
		3	1.0691	1.3343	0.2652	
PC	EMA	1	1.0496	1.4078	0.3582	0.3080
		2	1.0591	1.3988	0.3397	
		3	1.0515	1.2775	0.2260	

TERCERA ETAPA

VELOCIDAD DE CRECIMIENTO (CM ACUMULADOS/DÍA) DE LA CEPA *Pleurotus ostreatus* Y *Phanerochaete chrysosporium* EN TRES DIFERENTES CONCENTRACIONES DE COLORANTE

Medio	caja	Cepa	1° día	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°
Blanco	1	HEMIM 50	0.5 cm	0.6	0.8	1.1	1.3	2.2	3.0	3.5	4.4	6.0	7.8
	2		0.5 cm	0.7	0.9	1.4	2.1	3.1	4.1	4.7	5.9	6.4	8.2
	3		0.5 cm	0.6	0.9	1.1	2.0	2.8	4.0	4.5	5.8	6.5	7.9
250 ppm	1	HEMIM 50	0.5 cm	0.5	0.9	1.0	1.1	1.5	1.9	2.5	3.0	4.2	5.1
	2		0.5 cm	0.5	0.8	1.3	1.4	1.7	2.1	3.0	3.6	4.4	5.3
	3		0.5 cm	0.5	x	x	x	x	x	x	x	x	x
500 ppm	1	HEMIM 50	0.5 cm	0.5	0.5	0.5	0.6	0.8	1.5	2.1	3.0	4.5	6.1
	2		0.5 cm	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
	3		0.5 cm	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
1000 ppm	1	HEMIM 50	0.5 cm	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
	2		0.5 cm	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
	3		0.5 cm	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Blanco	1	PC	0.5 cm	2.0	4.8	8.0	8.5	*	*	*	*	*	*
	2		0.5 cm	1.6	4.2	7.9	8.5	*	*	*	*	*	*
	3		0.5 cm	1.5	4.1	7.5	8.2	8.5	*	*	*	*	*
250 ppm	1	PC	0.5 cm	1.0	2.1	3.6	5.1	6.5	7.6	8.1	8.4	8.5	*
	2		0.5 cm	0.9	1.7	3.1	4.9	5.8	7.4	7.8	8.0	8.4	8.5
	3		0.5 cm	0.9	1.8	3.2	4.7	6.0	7.2	8.0	8.4	8.5	*
500 ppm	1	PC	0.5 cm	0.8	1.6	2.6	3.9	5.0	6.1	6.8	7.5	8.2	8.5
	2		0.5 cm	0.6	1.4	2.4	3.7	4.8	5.8	6.9	7.8	8.4	8.5
	3		0.5 cm	0.7	1.4	2.4	3.6	4.8	5.7	6.7	8.0	8.4	8.5
1000 ppm	1	PC	0.5 cm	0.6	1.3	2.0	2.9	3.5	4.8	6.1	8.1	8.4	8.5
	2		0.5 cm	0.6	1.2	2.0	3.0	3.9	5.2	6.2	6.8	8.0	8.4
	3		0.5 cm	0.7	1.5	2.3	3.4	4.1	5.5	6.6	7.5	8.3	8.5

x: No crecimiento \* :Caja llena

Análisis de varianza de un factor

COMPARACION DEL CRECIMIENTO DE *Pleurotus o.* EN 250 Y 500ppm

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	10	36.1	3.61	6.49433333
Fila 2	10	12.76	1.276	0.73287111

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	27.23778	1	27.23778	7.53757008	0.01330043	4.41386305
Dentro de los grupos	65.04484	18	3.61360222			
Total	92.28262	19				

Análisis de varianza de un factor

COMPARACION DEL CRECIMIENTO DE *Pleurotus o.* EN 250 Y 1000ppm

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	10	36.1	3.61	6.49433333
Fila 2	10	0	0	0

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	65.1605	1	65.1605	20.0668788	0.00028975	4.41386305

Dentro de los grupos	58.449	18	3.24716667
Total	123.6095	19	

Análisis de varianza de un factor

COMPARACION DEL CRECIMIENTO DE *Pleurotus o.* EN 500 Y 1000ppm

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	10	12.76	1.276	0.73287111
Fila 2	10	0	0	0

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	8.14088	1	8.14088	22.2164031	0.00017328	4.41386305
Dentro de los grupos	6.59584	18	0.36643556			
Total	14.73672	19				

Análisis de varianza de un factor

COMPARACION DEL CRECIMIENTO DE *Phanerochaete c.* EN 250 Y 500ppm

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	10	56.5	5.65	8.23833333
Fila 2	10	50.3	5.03	8.52233333

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	1.922	1	1.922	0.22934649	0.63777486	4.41386305
Dentro de los grupos	150.846	18	8.38033333			
Total	152.768	19				

Análisis de varianza de un factor

COMPARACION DEL CRECIMIENTO DE *Phanerochaete c.* EN 500 Y 1000ppm

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	10	50.3	5.03	8.52233333
Fila 2	10	48.4	4.84	8.14933333

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	0.1805	1	0.1805	0.0216535	0.88464828	4.41386305
Dentro de los grupos	150.045	18	8.33583333			
Total	150.2255	19				

Análisis de varianza de un factor

COMPARACION DEL CRECIMIENTO DE *Phanerochaete c.* EN 250 Y 1000ppm

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	10	56.5	5.65	8.23833333
Fila 2	10	48.4	4.84	8.14933333

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	3.2805	1	3.2805	0.40036206	0.53485869	4.41386305
Dentro de los grupos	147.489	18	8.19383333			
Total	150.7695	19				

Análisis de varianza de un factor

COMPARACION DEL CRECIMIENTO DE *Phanerochaete c.* Y *Pleurotus o.* EN 250ppm

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	10	21.7	2.17	2.32677778
Fila 2	10	56.5	5.65	8.23833333

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	60.552	1	60.552	11.4626338	0.00329454	4.41386305
Dentro de los grupos	95.086	18	5.28255556			
Total	155.638	19				

Análisis de varianza de un factor

COMPARACION DEL CRECIMIENTO DE *Phanerochaete c.* Y *Pleurotus o.* EN 500ppm

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	10	12.76	1.276	0.73287111
Fila 2	10	50.3	5.03	8.52233333

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	70.46258	1	70.46258	15.2265853	0.00104446	4.41386305
Dentro de los grupos	83.29684	18	4.62760222			
Total	153.75942	19				

Análisis de varianza de un factor

COMPARACION DEL CRECIMIENTO DE *Phanerochaete c.* Y *Pleurotus o.* EN1000ppm

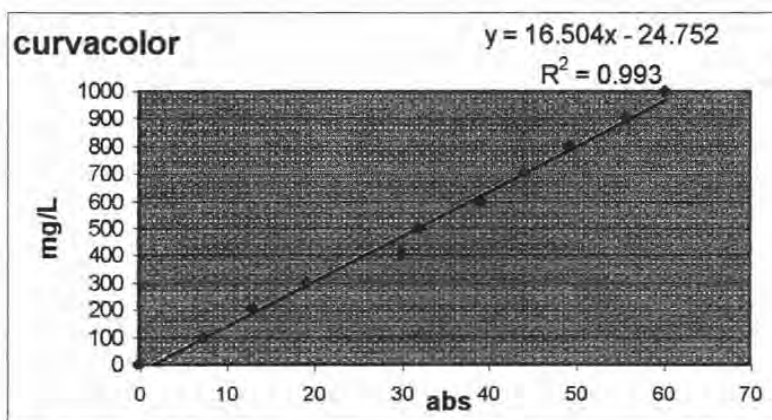
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Fila 1	10	0	0	0
Fila 2	10	48.4	4.84	8.14933333

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	117.128	1	117.128	28.7454188	4.2747E-05	4.41386305
Dentro de los grupos	73.344	18	4.07466667			
Total	190.472	19				

CURVA DE COLOR

abs	ppmcolorante
0	0
7.3	100
13.05	200
19.1	300
30.15	400
32.05	500
38.9	600
44.1	700
49.1	800
55.85	900
60.15	1000



	pH <i>Pleurotus ostreatus</i>											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Blanco	4.58	4.34	4.48	4.39	4.48	4.42	4.44	4.17	4.31	3.79	4.48	3.75
250 ppm	4.74	4.74	4.85	4.86	5	4.87	5.01	5.22	5.78	5.29	5.49	5.43
500 ppm	4.76	4.41	4.53	4.53	4.55	4.51	4.55	4.62	4.71	4.75	5.39	5.79
1000 ppm	4.94	4.44	4.62	4.63	4.67	4.6	4.71	4.48	4.71	4.75	5.12	5.91

PC	pH <i>Phanerochaete chrysosporium</i>											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Blanco	4.58	4.38	4.43	4.45	4.3	4.46	4.6	4.35	4.44	4.47	4.47	4.63
250 ppm	4.74	4.39	4.49	4.4	4.55	4.59	4.62	4.27	4.24	4.34	4.32	4.46
500 ppm	4.76	4.42	4.52	4.53	4.55	4.51	4.58	4.29	4.34	4.4	4.39	4.46
1000 ppm	4.94	4.52	4.54	4.59	4.56	4.56	4.59	4.76	4.7	4.78	4.71	4.82

Porcentajes de Remoción Total del color por *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium* después de 12 días de tratamiento

Cepa	Concentración	Remoción aparente	Remoción real
<i>Pleurotus o.</i>	250 ppm	74%	89%
	500 ppm:	55%	86%
	1000 ppm:	59%	68%
<i>Phanerochaete c.</i>	250 ppm:	67%	90%
	500 ppm	60%	87%
	1000 ppm:	59%	75%

Análisis de varianza de un factor

Comparación de la Remoción color real en 250 ppm entre *Pleurotus o.* y *Phanerochaete c.*

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza		
Fila 1	5	147000	29400	1.253E+09		
Fila 2	5	134266	26853.2	1.352E+09		
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F

Entre grupos	16215476	1	16215476	0.0124495	0.9139072	5.317645
Dentro de los grupos	1.042E+10	8	1.302E+09			
Total	1.044E+10	9				

Análisis de varianza de un factor

Comparación de la Remoción color real en 500 ppm entre Pleurotus o. y Phanerochaete c.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza			
Fila 1	5	298800	59760	4.077E+09			
Fila 2	5	272865	54573	4.404E+09			
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	
Entre grupos	67262423	1	67262423	0.0158613	0.9028857	5.317645	
Dentro de los grupos	3.393E+10	8	4.241E+09				
Total	3.399E+10	9					

Análisis de varianza de un factor

Comparación de la Remoción color real en 1000 ppm entre Pleurotus o. y Phanerochaete c.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza			
Fila 1	5	889133	177826.6	1.141E+10			
Fila 2	5	776132	155226.4	1.434E+10			
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	
Entre grupos	1.277E+09	1	1.277E+09	0.0991856	0.7608669	5.317645	
Dentro de los grupos	1.03E+11	8	1.287E+10				
Total	1.043E+11	9					

Análisis de varianza de un factor

Comparación de la Remoción color real en 250 y 500 ppm de Pleurotus o.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza			
Fila 1	5	147000	29400	1.253E+09			
Fila 2	5	298800	59760	4.077E+09			
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	
Entre grupos	2.304E+09	1	2.304E+09	0.864672	0.3796385	5.317645	
Dentro de los grupos	2.132E+10	8	2.665E+09				
Total	2.362E+10	9					

Análisis de varianza de un factor

Comparación de la Remoción color real en 500 y 1000 ppm de Pleurotus o.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza			
Fila 1	5	298800	59760	4.077E+09			
Fila 2	5	889133	177826.6	1.141E+10			
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	
Entre grupos	3.485E+10	1	3.485E+10	4.5004434	0.0866772	5.317645	
Dentro de los grupos	6.195E+10	8	7.744E+09				
Total	9.68E+10	9					



Análisis de varianza de un factor

Comparación de la Remoción color real en 250 y 1000 ppm de Pleurotus o.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza			
Fila 1	5	147000	29400	1.253E+09			
Fila 2	5	889133	177826.6	1.141E+10			
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	
Entre grupos	5.508E+10	1	5.508E+10	8.6989174	0.0184428	5.317645	
Dentro de los grupos	5.065E+10	8	6.331E+09				
Total	1.057E+11	9					

Análisis de varianza de un factor

Comparación de la Remoción color real entre 250 y 500 ppm de Phanerochaete c.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza			
Fila 1	5	134266	26853.2	1.352E+09			
Fila 2	5	272865	54573	4.404E+09			
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	
Entre grupos	1.921E+09	1	1.921E+09	0.6674215	0.4376024	5.317645	
Dentro de los grupos	2.303E+10	8	2.878E+09				
Total	2.495E+10	9					

Análisis de varianza de un factor

Comparación de la Remoción color real entre 500 y 1000 ppm de Phanerochaete c.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza			
Fila 1	5	272865	54573	4.404E+09			
Fila 2	5	776132	155226.4	1.434E+10			
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	
Entre grupos	2.533E+10	1	2.533E+10	2.7027195	0.1387993	5.317645	
Dentro de los grupos	7.497E+10	8	9.371E+09				
Total	1.003E+11	9					

Análisis de varianza de un factor

Comparación de la Remoción color real entre 250 y 1000 ppm de Phanerochaete c.

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza			
Fila 1	5	134266	26853.2	1.352E+09			
Fila 2	5	776132	155226.4	1.434E+10			
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F	
Entre grupos	4.12E+10	1	4.12E+10	5.251517	0.0511355	5.317645	
Dentro de los grupos	6.276E+10	8	7.845E+09				
Total	1.04E+11	9					

CUARTA ETAPA

pH

Día	INFLUENTE	EFLUENTE REACTOR A	EFLUENTE REACTOR B	EFLUENTE REACTOR C
1	8.21	7.91		8.4
2	8.22	7.68	7.74	8.35
3		8.14	7.08	7.71
4		8.13	7.23	8.12
5	8.11	8.01	7.47	8.53
6		7.95	7.78	8.57
7			7.6	8.32
8			7.64	8.35
9		7.96	7.6	8.3
10	8.13	8.25	7.47	8.28
11	8.13	8	7.46	7.91
12		7.99	7.64	7.85
13	8.11	8.3	7.94	7.98
15		8.2	7.89	8.09
16		8.34	7.97	8.37
20	8.24	7.88	8.04	8.07
22		7.8	8.02	7.38
23		7.98	8.1	7.74
25	7.98	7.74	8	7.77
26	8.24	7.58	7.96	7.72
27		7.32	7.97	7.73
28	8.24	7.83	7.98	7.83
29	4.39	2.38	6.36	3.08
30	3.76	3.14	6.35	3.24
31	3.8	3.78	7.06	7.15
32	4.01	5.82	7.3	7.36
33	4.05	5.39	6.86	7.13
34	4.6	4.93	7.33	7.41
35		5.95	7.3	5.28
36	4.67	4.36	7.4	6.9
38	4.41	5.85	7.53	7
40	4.91	5.99	7.25	6.1
41	3.61	4.55	7.41	4.4
42	3.75	5.17	7.45	4.61
43		6.3	7.45	6.08
44	3.54	5.39	7.18	5.71
47	3.75	5.05	7.46	6.66
48	3.72	4.95	7.32	
49	3.59	5.46	7.06	6.76
50	3.52	4	6.6	4.5
51	3.55	5.31	7.07	5.11
52	3.75	5.24	7.1	5.24
53	3.75	6.18	7.44	6.32
54	3.7	6.5	7.5	6.45

55	3.8	5.61	7.27	5.21
56	3.77	6.03	7.39	5.24
57	3.67	7.23	7.68	6.07
59	3.75		7.63	
61	3.7		7.31	
62	3.85		7.07	
63	3.67		7.5	
64	3.65		7.5	
65	3.71		7.3	
67	3.68		6.83	
68	3.73		6.71	
69	3.52		7.32	
72	3.52		7.24	
73	3.53		7.07	
74	3.55		7.23	
75	3.52		7.21	
78	3.53		7.24	
84	3.58		6.61	

Día	Colorante mg/L		APARENTE	
	Influyente	Efluente A	Efluente B	Efluente C
1	500.0752			194.7512
2		52.8168		240.9624
3		77.5728		407.6528
4	500.0752	84.1744	9.9064	260.7672
5		331.7344	69.3208	377.9456
6		222.808	94.0768	272.32
8	500.0752		338.336	328.4336
10		325.1328	204.6536	259.1168
12		349.8888	285.5232	353.1896
15	500.0752	226.1088	203.0032	
20	250.8648	231.06	147.7148	244.75832
22	250.8648	234.3608	265.7184	217.52672
25	250.8648	263.2428	182.3732	241.7876
27		266.5436	216.70152	252.5152
29	250.8648	262.08752	28.0608	149.3652
30		217.0316	9	231.39008
31		266.5436	9	261.5924
32	250.8648	227.42912	9	284.36792
33		284.36792	9	231.06
34		279.7468	9	233.123
35	250.8648	280.24192	221.9828	253.01032
36		277.76632	246.7388	276.446
38	250.8648	271.65984	240.1372	272.32
40		266.5436	455.1018	266.9562
41	250.8648	279.7468	377.9456	277.2712

42		273.1452	245.0884	274.383
43		257.0538	10.7316	256.6412
44	250.8648	235.186	9.4938	221.1576
47	250.8648	244.6758	9.3	238.8994
48			9	
50	250.8648	244.6758	14.8576	276.77608
51		246.7388	68.82568	255.32088
52		239.7246	116.7698	260.27208
53			139.0502	
54	250.8648		149.3652	
55		250.8648	153.9038	260.27208
56			156.3794	
57	250.8648	249.2144	145.2392	255.816
58			162.981	
59			158.4424	
60			163.3936	
61	250.8648		131.2108	
62			143.1762	
63			99.8532	
64			52.8168	
65			33.8372	
66			9.9	
69	250.8648		9	
73			9.5	
74			10.3	
78	250.8648		11	
84	250.8		10	

Colorante mg/L

REAL

$$y = 16.504x - 24.752$$

Dia	Influente	Efluente A	Efluente B	Efluente C
3	468.7176	56.1176		260.7672
4		39.6136	9.9064	196.4016
5		222.808	229.4096	184.8488
8			297.076	240.9624
10	468.7176	214.556	166.6944	156.792
12		314.4052	267.3688	303.6776
15	468.7176	188.1496	171.6456	184.0236
20	240.9624	231.06	147.7148	244.75832
22	240.9624	234.3608	265.7184	217.52672
25	240.9624	263.2428	182.3732	245.9136
27	240.9624	266.5436	216.70152	252.5152
29	240.9624	195.5764	13.2072	66.02
30		114.37672	4	119.658
31	240.9624	228.5844	4	200.5276
32		203.8284	4	224.12832
33	240.9624	227.7592	4	224.4584
34		239.80712	55.78752	206.79912

35	240.9624	247.23392	175.7716	208.7796
36		253.3404	237.33152	271.98992
38	240.9624	243.438	212.9056	249.2144
40		249.54448	435.297	255.816
42	240.9624	248.3892	247.564	245.0884
43		244.2632	6.193	241.375
44		223.6332	5.3678	205.8914
47	240.9624	249.2144	7.7	239.7246
48		248.71928	4	245.0884
49		242.6128	4	206.304
50	240.9624	240.9624	10.319	243.8506
51		240.79736	60.6562	242.6128
52		244.2632	114.2942	247.564
55	240.9624	250.53472	144.8266	254.9908
56			136.9872	
57		247.564	128.7352	240.9624
58	240.9624		147.3022	
59			145.6518	
61	240.9624		109.343	
62			131.2108	
63			92.839	
64			51.579	
65			24.3474	
68	240.9624		4	
69			4	
75	240.9624		4	
84	240.9		5	

**COT**

<b>Día</b>	<b>Influyente</b>	<b>Efluente A</b>	<b>Efluente B</b>	<b>Efluente C</b>
29	168		20.68	
30	168	149.49	11.18	153.2
31			13.9	
33	168	192.1	26.54	179.3
34			32.67	
40	168	143.2	179.9	151.9
42			84.49	
43	168	167	14.248	149.5
44			16.46	
47			14.54	
48			11.89	
49	168	179.3	10.94	192.1
50			44.09	
55	168	151.9	53.23	240.7
64	168		10	
72	168	153.2	15.2	143.2
78	168		9.49	
79	168		10	150.6

<b>DQOsoluble</b>				
<b>Día</b>	<b>Influente</b>	<b>Efluente A</b>	<b>Efluente B</b>	<b>Efluente C</b>
4	561.963	100.4473	309.2896	
20	286.0849	248.69955	309.2896	435.6263
22	286.0849	257.7236	453.6744	286.0849
25	286.0849	277.06085	306.7113	318.31365
27	286.0849	264.16935	266.74765	389.2169
29	286.0849	119.78455	7.6285	94.00155
30		131.3869	11.49595	126.2303
31	286.0849	226.784	23.35613	318.31365
32		229.3623	203.5793	271.90425
33	286.0849	249.9887	69.5077	230.65145
34		213.8925	95.2907	257.7236
35	286.0849	238.38635	195.8444	231.9406
36		235.80805	230.65145	256.43445
40	286.0849	239.6755	430.4697	275.7717
42	286.0849	235.80805	225.49485	233.22975
43		229.3623	12.7851	244.8321
44		219.0491	24.38745	226.784
47	286.0849	222.91655	43.7247	240.96465
48		231.9406	21.80915	353.1207
49		202.29015	7.98	231.9406
50			28.2549	
51	286.0849	275.7717	70.79685	286.0849
52			152.0133	
55			181.876	
56	286.0849		170.765	
57			166.323	
58			183.658	
59			181.543	
61			139.934	
62			159.112	
63	286.0849		128.1453	
64			87.468	
65			56.213	
68			37.7457	
69	286.0849		37.123	
72			37.0983	
75	286.0849		36.9879	
84			42.2	

## GLOSARIO

**Abiótico:** Ausencia de organismos vivos

**Absorción:** retención de un gas por un líquido, o de un líquido por un sólido; movimiento de sustancias hacia el interior de la célula; transferencia de energía de las ondas electromagnéticas a los enlaces químicos y/o de energía cinética.

**Acción bioquímica:** Es un cambio químico resultante del metabolismo de organismos vivientes.

**Acidófilo:** Microorganismo que crece mejor a pH bajo (ácido)

**Ácidos húmicos:** polímeros orgánicos irregulares de elevado peso molecular con carácter ácido; porción de materia orgánica del suelo soluble en álcali, pero no en ácido.

**Adaptación:** Cualquier característica controlada genéticamente que ayuda a un organismo a sobrevivir y reproducirse bajo una serie de condiciones medioambientales dadas. Suele ser el resultado de una mutación beneficiosa.

**Adsorción:** Fenómeno de superficie por el que las moléculas sólidas, líquidas o gaseosas quedan retenidas en la interfase.

**Aerobios:** Microorganismos cuyo crecimiento requiere la presencia de aire o de oxígeno libre y que lo utilizan como aceptor final de electrones en sus actividades metabólicas.

**Aguas negras.** Fluidos de desechos, ya sean industriales, domésticos y/o pluviales.

**Ambiente:** El conjunto de elementos naturales y artificiales o inducidos por el hombre que hacen posible la existencia y desarrollo de los seres humanos y demás organismos vivos que interactúan en un espacio y tiempo determinado.

**Anaeróbico.** Requerimiento de oxígeno combinado, tal como el  $\text{SO}_4^-$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$ ,  $\text{NO}_3^{-1}$ , y también un requerimiento de la ausencia de oxígeno molecular libre como aceptor de electrones.

**Asimilación:** Incorporación de nutrientes a la biomasa de un organismo.

**Bacteria:** Miembros unicelulares; grupo de procariotas diversos y ubicuo; organismos con células procariota (sin núcleo verdadero) pertenecientes al reino monera.

**Basidiomicetes:** Grupo de hongos que se distinguen por la formación de basidioporas sexuales en un basidio.

**Bioacumulación:** Un incremento en la concentración de un producto químico en órganos o tejidos específicos a un nivel más alto del que cabría esperar normalmente.

**Biodegradable:** sustancia que puede fragmentarse en moléculas más pequeñas por acción de los microorganismos.

**Biodegradación (Biodegradabilidad).** Es la oxidación biológica de materiales orgánicos naturales o sintéticos por microorganismos en suelos, cuerpos de agua o plantas de tratamiento de agua residual. Proceso químico de rotura de una sustancia en las moléculas menores por acción de los microorganismos o sus enzimas.

**Biófiltro:** Mecanismo utilizado para la biorremediación de contaminantes libres.

**Biomasa.** Materia biológica viviente.

**Biopelícula.** Película adherida a una superficie sólida, formada de diversos microorganismos.

**Biorremediación:** Uso de agentes biológicos para la recuperación de suelos y aguas contaminadas por sustancias peligrosas para la salud humana y/o para el ambiente.

**Cancerígeno:** Productos químicos, radiaciones ionizantes y virus que causan o potencian el desarrollo de cáncer.

**Colonias:** Crecimiento visibles macroscópicamente de microorganismos en un medio de cultivo sólido.

**Colonización:** Establecimiento, en un espacio determinado, de microorganismos que se reproducen sobre materia inerte o sobre algún ser vivo, sin que necesariamente se produzca la invasión o el deterioro de algún tejido.

**Compuesto:** Combinación de átomos o de iones de cargas opuestas que se mantienen unidos por fuerzas de atracción denominadas enlaces químicos.

**Compuesto inorgánico:** Todos los compuestos no clasificados como compuestos orgánicos.

**Compuesto orgánico:** Compuestos que contienen átomos de carbono combinados entre sí y con átomos de uno o más elementos tales como el hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo, cloro y flúor.

**Concentración:** Cantidad de una sustancia química en un volumen o peso.

**Contaminación:** La presencia en el ambiente de una o más contaminantes o de cualquier combinación de ellos que cause desequilibrio ecológico.

**Contaminante:** Toda materia y energía en cualquiera de sus estados físicos y formas, que al incorporarse o actuar en la atmósfera, agua, suelo, flora, fauna o cualquier elemento natural altere o modifique su composición y condición natural.

**Crecimiento, velocidad o tasa de:** Aumento en el número de microorganismos por unidad de tiempo

**Cultivo:** estimulación del crecimiento de microorganismos en condiciones controladas; crecimiento de tipos específicos de microorganismos sobre un medio, o en su interior, como resultado de su inoculación e incubación.

**Demanda biológica (bioquímica) de oxígeno (DBO):** cantidad de oxígeno disuelto que necesitan los microorganismos aerobios y facultativos para estabilizar la materia orgánica de las aguas residuales o del agua donde crecen.

**Demanda química de oxígeno (DQO):** Cantidad de oxígeno necesarios para oxidar de manera química, completamente la materia orgánica de una muestra de agua.

**Efluente.** Fluido que es retirado o sale del equipo de tratamiento o de la planta de tratamiento.

**Hongos:** Organismos eucarióticos, la mayoría pluricelulares, como setas, mohos y levaduras. Al ser agentes descomponedores, obtienen los elementos nutritivos que se necesitan segregando enzimas que aceleran la descomposición de la materia orgánica que se encuentra en los tejidos de otros organismos vivos o muertos. Después absorben los elementos nutritivos resultantes.

**Influente.** Es el fluido de entrada a alguna unidad de operación o equipo de tratamiento.

**Inhibidor.** Compuesto que interfiere con una reacción química, disminuyendo su velocidad de reacción.

**Lignina:** Grupo de polímeros complejos en el material leñoso de las plantas superiores, segundo en abundancia por detrás de la celulosa.

**Lodo residual:** Mezcla peligrosa de químicos tóxicos, agentes infecciosos y



sólidos sedimentados, extraídos de las aguas residuales en una planta de tratamiento de aguas residuales.

**Materia orgánica.** Sustancias químicas de origen animal y vegetal que son compuestos de carbono.

**Micelio:** masa entrelazada que forman las hifas de los hongos.

**Microorganismos:** Organismos que son tan pequeños que sólo pueden verse utilizando un microscopio.

**Mineralización:** Descomposición de la materia orgánica en materiales inorgánicos por acción de los diferentes microorganismos.

**Norma:** Valor o intervalo de concentración o lineamientos que para el cuidado ambiental debe de cumplir la empresa y cuyo cumplimiento lo controlan las autoridades.

**Nutrimiento:** Cualquier alimento o elemento que debe ingerir un organismo para vivir, crecer y reproducirse.

**Organismo:** Cualquier forma de vida.

**Organismo Anaerobio.** Organismo que puede prosperar en ausencia de oxígeno.

**Oxidación.** Reacción Química en la que un elemento o un ión aumentan su valencia positiva, perdiendo electrones que toman un agente oxidante.

**Oxidación bioquímica.** Una oxidación causada por actividad biológica como resultado de una combinación química de oxígeno con materia orgánica para producir productos finales relativamente estables.

**Percolación:** Paso de un líquido a través de los espacios de un material poroso.

**Polímero.** Cadena de moléculas orgánicas producidas por la unión de unidades primarias llamadas monómeros.

**Procesos aerobios.** Procesos o transformación de material orgánico en ausencia de oxígeno.

**Productos finales.** Sustancias creadas por crecimiento y metabolismo microbiano.

**Quelante:** Sustancia que une iones metálicos.

**Residuo:** Cualquier material generado en los procesos de extracción, beneficio, transformación, producción, consumo, utilización, control o tratamiento cuya calidad no permita usarlo nuevamente en el proceso que lo genero.

**Residuo peligroso:** Todos aquellos residuos, en cualquier estado físico que por sus características corrosivas, reactivas, explosivas, tóxicas, inflamable o biológico – infecciosas, representen un peligro para el equilibrio ecológico o el ambiente.

**Toxicidad:** Medida que indica la peligrosidad de una sustancia.

**TRH.** Tiempo de retención hidráulico.

**Xenobiótico:** Producto sintético que no está formado por procesos biosintéticos naturales; sustancia extraña o veneno.