



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DEL HONGO *Phanerochaete chrysosporium* EN LA BIODEGRADACIÓN DE COLORANTES AZOICOS DEL EFLUENTE DE LA INDUSTRIA TEXTIL

Trabajo de titulación para optar por el grado académico de:
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTOR: ÁNGEL GABRIEL VALLEJO CUZCO

TUTORA: DRA. JENNY MARINA MORENO MORA

Riobamba-Ecuador

2017

© 2017, Ángel Gabriel Vallejo Cuzco

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor.

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

El Tribunal del Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: **EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DEL HONGO *Phanerochaete chrysosporium* EN LA BIODEGRADACIÓN DE COLORANTES AZOICOS DEL EFLUENTE DE LA INDUSTRIA TEXTIL**, de responsabilidad del señor Ángel Gabriel Vallejo Cuzco, ha sido minuciosamente revisado por los Miembros del Tribunal del Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

NOMBRE

FIRMA

FECHA

Dra. Jenny Marina Moreno Mora
**DIRECTORA DEL TRABAJO
DE TITULACIÓN**

Ing. Sofía Carolina Godoy Ponce
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Yo, Ángel Gabriel Vallejo Cuzco, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en esta Tesis y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo

Ángel Gabriel Vallejo Cuzco
C.C.: 0603409574

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi madre, quien ha sido la mayor inspiración para la continua búsqueda de superación, fuente de enseñanzas de vida, ejemplo de trabajo y dedicación a los pequeños detalles de la vida.

A la memoria de todos quienes partieron mientras nos esforzábamos en llegar hasta aquí. A todos con quienes aún nos es posible compartir los triunfos que están por venir.

Ángel Gabriel Vallejo Cuzco

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar el más profundo de mis agradecimientos a mi Dios, por cuyo intermedio me ha sido posible concluir exitosamente este importante momento de mi vida.

A mi madre, por todos los esfuerzos y sacrificios que ha realizado hasta el momento para brindarme todo lo necesario, por estar a mi lado para poder celebrar los triunfos y por motivarme a que jamás me rinda.

A mi familia, por el permanente apoyo, las muestras de afecto y confianza durante los momentos más difíciles.

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, por haberme brindado un espacio de acercamiento al conocimiento de manera especial a Mtr. Sofia Godoy, Dra. Gina Álvarez, Lic. Fausto Tapia, por sus valiosos aportes durante el desarrollo del presente trabajo.

A la Dra. Jenny Moreno, por la asesoría, paciencia y acompañamiento que supo brindarme durante el interesante proceso que significó trabajar en esta investigación, por compartir la alegría de los resultados exitosos y por impulsarme a seguir adelante.

A la Mtr. Paola Chiluiza, por todo el soporte académico en el área de la Microbiología, cuya trascendencia permitió elevar la calidad de este trabajo.

Al Laboratorio de Bioprocesos de la Escuela Politécnica Nacional, en la Dirección de la Ing. Neyda Espín, por las facilidades brindadas en la consecución del organismo biológico empleado.

Ángel Gabriel Vallejo Cuzco

TABLA DE CONTENIDO

	Páginas
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
INTRODUCCIÓN.....	1
Identificación del problema.....	1
Justificación del proyecto.....	2
Objetivos.....	4
Objetivo general.....	4
Objetivos específicos.....	4
CAPÍTULO 1	
1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL.....	5
1.1. Antecedentes de la Investigación.....	5
1.2. Marco Conceptual.....	6
1.2.1. Colorantes.....	6
1.2.1.1. Clasificación de los colorantes.....	7
1.2.2. Colorantes Azo.....	10
1.2.2.1. Síntesis.....	11
1.2.2.2. Clasificación.....	11
1.2.3. Efectos ambientales de los colorantes.....	11
1.2.4. Métodos de tratamiento de efluentes textiles con colorantes.....	13
1.2.4.1. Tratamientos Biológicos.....	13
1.2.5. Hongos de la pudrición blanca.....	14
1.2.5.1. Sistema de enzimas de los hongos de la pudrición blanca.....	14
1.2.6. <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	15
1.2.6.1. Morfología de <i>P. chrysosporium</i>	18
1.2.6.2. Taxonomía de <i>P. chrysosporium</i>	18
1.2.7. Biodegradación enzimática de colorantes.....	19
1.2.8. Factores que influyen en la decoloración fúngica.....	19
1.2.8.1. Nutrientes.....	20
1.2.8.2. Oxígeno, pH y Temperatura.....	20
1.2.8.3. Concentración.....	21
1.2.8.4. Estructura química del colorante.....	21
1.2.9. Métodos de detección de colorantes.....	21
1.2.9.1. Espectrofotometría UV.....	22

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO EXPERIMENTAL.....	24
2.1. Caracterización fisicoquímica del efluente.....	26
2.1.1. Obtención de muestras.....	26
2.1.2. Análisis Físicos.....	26
2.1.2.1. Determinación de temperatura en campo.....	26
2.1.2.2. Determinación de temperatura en laboratorio.....	26
2.1.2.3. Sólidos Suspendidos Totales.....	26
2.1.2.4. Sólidos Totales Disueltos.....	27
2.1.2.5. Determinación de la Conductividad.....	27
2.1.2.6. Determinación de Color.....	27
2.1.3. Análisis Químicos.....	27
2.1.3.1. Determinación del Potencial de Hidrógeno en campo.....	27
2.1.3.2. Determinación del Potencial de Hidrógeno en laboratorio.....	27
2.1.3.3. Determinación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO5).....	28
2.1.3.4. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO).....	28
2.1.3.5. Determinación del Nitrógeno Orgánico Total.....	28
2.1.3.6. Determinación de Cromo VI (Cr6+).....	28
2.1.3.7. Determinación de Cobre (Cu).....	28
2.1.3.8. Determinación de grupos funcionales.....	28
2.1.4. Análisis Microbiológicos.....	29
2.2. Cultivo del organismo fúngico <i>P. chrysosporium</i>	29
2.2.1. Obtención de la cepa.....	29
2.2.2. Condiciones de cultivo.....	29
2.2.3. Cultivo en sustrato lignocelulósico.....	29
2.2.4. Pruebas de toxicidad de las muestras.....	30
2.2.5. Comportamiento frente a suplementos.....	30
2.2.6. Preparación del baño de efluente.....	31
2.2.7. Fermentación en medio líquido.....	31
2.3. Evaluación de la decoloración.....	32
2.3.1. Presencia de grupos Azo y color.....	32
2.3.2. Cambio en el contenido de color.....	33
2.3.3. Cambio en el contenido de grupos azo.....	33
CAPÍTULO III	
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
3.1. Caracterización fisicoquímica del efluente.....	34

3.1.1.	Obtención de la muestra.....	34
3.1.2.	Análisis Físicos.....	36
3.1.2.1.	Mediciones <i>in situ</i>	36
3.1.2.2.	Análisis en laboratorio.....	39
3.1.3.	Análisis Químicos.....	40
3.1.4.	Análisis Microbiológicos.....	41
3.2.	Uso del hongo <i>P. chrysosporium</i>	42
3.2.1.	Pruebas de toxicidad de la muestra.....	42
3.2.2.	Comportamiento frente a suplementos.....	44
3.3.	Evaluación de la decoloración.....	46
3.3.1.	Concentración del baño de efluente.....	47
3.3.2.	Medios nutritivos.....	47
3.3.2.1.	Medio A.....	48
3.3.2.2.	Medio B.....	50
3.3.2.3.	Medio C.....	51
3.3.3.	Suplementos adicionales.....	52
3.3.3.1.	Lignina.....	52
3.3.3.2.	Almidón.....	53
3.3.3.3.	Sulfato de Manganeso (MnSO ₄).....	56
	CONCLUSIONES.....	58
	RECOMENDACIONES.....	59
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Relación entre el color y la longitud de onda de la luz absorbida.....	7
Tabla 2-1: Grupos cromóforos presentes en colorantes orgánicos.....	9
Tabla 3-1: Carga contaminante aportada por algunos colorantes.....	12
Tabla 4-1: Propiedades biológicas de <i>P. chrysosporium</i>	16
Tabla 5-1: Clasificación taxonómica de <i>P. chrysosporium</i>	18
Tabla 6-1: Características de absorción de algunos cromóforos.....	23
Tabla 1-2: Diseño experimental para análisis cuantitativos.....	24
Tabla 2-2: Descripción de tratamientos aplicados.....	32
Tabla 1-3: Resultados de las mediciones <i>in situ</i> del efluente del proceso de teñido.....	37
Tabla 2-3: Resultados de la caracterización de la muestra del efluente del proceso de teñido.....	39
Tabla 3-3: Desarrollo radial, en centímetros, del micelio fúngico y halo de decoloración sobre medio sólido de agar PDA.....	42
Tabla 4-3: Resultados de la medición del crecimiento miceliar radial y el halo decolorativo, en centímetros, durante la exposición a suplementos.....	45
Tabla 5-3: Resultados de color, contenido de grupos azoicos, análisis ANOVA y porcentaje de decoloración (%D) obtenidos con la aplicación de cada tratamiento.....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Mecanismo de reacción de LiP y MnP para la degradación de lignina.....	17
Figura 1-2: Metodología de investigación.....	25
Figura 1-3: Ubicación geográfica de lugar de toma de muestra.....	34
Figura 2-3: Proceso de teñido para gama de rojos.....	35
Figura 3-3: Recolección de muestra.....	35
Figura 4-3: Medición de pH <i>in situ</i>	36
Figura 5-3: Efecto del pH del baño de efluente sobre la tasa de decoloración usando <i>P. chrysosporium</i>	38
Figura 6-3: Análisis físicos mediante equipo CONSOR C562.....	40
Figura 7-3: Preparación de muestras para el análisis DBO de acuerdo al método HACH 8043.....	41
Figura 8-3: Efecto de la glucosa sobre la tasa de decoloración del baño de efluente utilizando <i>P. chrysosporium</i>	48
Figura 9-3: Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la tasa de decoloración del baño de efluente al utilizar <i>P. chrysosporium</i>	49
Figura 10-3: Efecto de la fuente de carbono sobre la decoloración de azul everzol turquesa por <i>C. versicolor</i>	54
Figura 11-3: Comparación de los perfiles de decoloración del Rojo Drimarene y Azul Drimarene en presencia de glucosa y almidón.....	54
Figura 12-3: Efecto de diferentes fuentes de carbono en la decoloración del amaranto.....	55
Figura 13-3: Efecto del sulfato de manganeso sobre la decoloración del baño de efluente utilizando <i>P. chrysosporium</i>	56

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3: Crecimiento radial de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> inoculado en cajas petri con PDA + efluente al 40%.....	43
Gráfico 2-3: Halo de decoloración generado por <i>Phanerochaete</i> <i>chrysosporium</i> mediante fermentación en estado sólido sobre agar PDA + efluente al 40%.....	44

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO A:** MÉTODO APHA 2550 B-1
- ANEXO B:** MANUAL CONSORT C562
- ANEXO C:** MÉTODO HACH 8006
- ANEXO D:** MÉTODO HACH 8025
- ANEXO E:** MÉTODO APHA 4500-H+ B
- ANEXO F:** MÉTODO HACH 8043
- ANEXO G:** MÉTODO HACH 8000
- ANEXO H:** MÉTODO HACH 10072
- ANEXO I:** MÉTODO HACH 8023
- ANEXO J:** MÉTODO HACH 8506

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

λ : longitud de onda

°C: grados Celsius

%Cc: Porcentaje de cambio de color

%Ca: Porcentaje de cambio de grupos azo

Alm: Almidón

DBO5: Demanda Bioquímica de Oxígeno a los 5 días

DQO: Demanda Química de Oxígeno

g: gramos

LAC: Lacasa

LDP: (Lignin-Degrading Proteins) Proteínas Degradadoras de Lignina

Lig: Lignina

LiP: Lignino peroxidasa

mg/L: miligramos/Litro

mL: mililitros

mmol: milimol

MnP: Manganeso peroxidasa

mS: miliSiemens **nm**: nanómetros

PDA: (Potato Dextrose Agar) Agar de Papa y Dextrosa

pH: potencial de hidrógeno

PtCo: Unidades de color Platino-Cobalto

S.L.: Sustrato lignocelulósico

Sum: Sulfato de manganeso

T: Temperatura

TDS: (Total Dissolved Solids) Sólidos Disueltos Totales

TSS: (Total Suspended Solids) Sólidos Suspendidos Totales

UFC: Unidades formadoras de colonias

RESUMEN

Se evaluó la eficacia del hongo *Phanerochaete chrysosporium* en la biodegradación de colorantes azoicos en el efluente de una tintorera artesanal de la parroquia La Providencia cantón Guano. El organismo fúngico fue inicialmente cultivado en placas Potato Dextrose Agar (PDA) a 27°C. Posteriormente se cortó asépticamente el micelio y se sembró por triplicado sobre dos sustratos lignocelulósicos (cebada, trigo). Para analizar la toxicidad de la muestra se inocularon los micelios anteriores en 6 placas de PDA + efluente (3:2) en un volumen final de 20mL. A continuación se analizó el comportamiento de los micelios frente a los promotores enzimáticos, se prepararon 6 cajas tripetri con PDA para adicionar Ácido tartárico, Alcohol bencílico o Peróxido + 5mL de muestra y se inoculó cada uno con una de las tres clases de micelios cultivados inicialmente. Finalmente, se utilizaron tres medios, A: Glucosa, Amonio tartrato y Tween 80; B: Glicerol, Amonio Tartrato y Tween80; C: Alcohol bencílico, Ácido tartárico y Peróxido de hidrógeno en un total de 19 tratamientos y sus réplicas. Los tratamientos T1-T8 usaron los medios A o B suplementados con lignina, almidón y MnSO₄; en T9-T13 se utilizaron los anteriores suplementos sin ningún medio; T14-T16 utilizaron los medios A, B o C sin suplemento, en todos los anteriores el micelio provino de S.L; T17-T19 se ensayaron con medio A, B o C con micelio de PDA. La concentración del efluente se mantuvo al 40%. Se evaluó periódicamente el cambio en el contenido de color (PtCo) y grupos azo ($\lambda=350\text{nm}$) determinándose, mediante análisis ANOVA de un factor, la existencia de diferencia significativa entre los valores iniciales y finales de éstos. De los resultados se concluyó que todos los tratamientos exhibieron diferencias significativas, donde T16 reúne las condiciones para degradar en un 90% el contenido de grupos azo. Se recomienda modificar el contenido de nitrógeno propio de la muestra, en cuya deficiencia se verá potenciada la eficiencia degradativa del hongo *P. chrysosporium*.

PALABRAS CLAVE: <BIOTECNOLOGÍA>, <MICROBIOLOGÍA>, <HONGO (*Phanerochaete chrysosporium*)>; <TRATAMIENTO DE AGUAS>; <COLORANTES AZO>; <SUSTRATO LIGNOCELULÓSICO>, <BIODEGRADACIÓN DE COLORANTES>; <EFLUENTE TEXTIL>.

ABSTRACT

It tested the efficacy of the fungus *Phanerochaete chrysosporium* in the biodegradation of azo dyes in the effluent of an artisanal dyeing, located in “Parroquia La Providencia” Guano County. The fungal organism was initially grown on laboratory dishes (PDA) Potato, Dextrose, Agar at 27 ° C. After that, it cut the mycelium and seeded in triplicate onto two lignocellulosic substrates (barley and wheat). To analyze the toxicity of the sample, it inoculated the same mycelium in 6 laboratory dishes of PDA + effluent (3:2) in a final volume of 20mL. Then the behavior of the mycelium against the enzyme promoters were analyzed and prepared 6 laboratory with PDA to add tartaric acid, benzyl alcohol or peroxide + 5mL of the sample, and the inoculated each of the three classes of mycelium cultivated initially. Finally, it used three media, A: glucose, ammonium tartrate and Tween 80; B: Glycerol, Ammonium Tartrate and Tween 80; C: Benzyl alcohol, tartaric acid, besides hydrogen peroxide in a total of 19 treatments and their replicates. The T1-T8 treatments used the media A or B that are supplemented with lignin, starch and MnSO₄, with T9-T13 that used the above supplements without any other, T14-T16 used media A, B or C without supplement, taking into account that all the above mycelium came from S.L.; T17-T19 and tested trough A, B or C with PDA mycelium. The concentration of effluent was maintained at 40%. On the other hand, it tested periodically the change in color content (PtCo) and azo groups ($\lambda=350\text{nm}$), thus determining by means of the analysis ANOVA of a factor the existence of a significant difference between the initial and final values of these factors. From the results, it concluded that all treatments showed significant differences, in which T16 collects the conditions to degrade the content of azo groups at 90%. It recommends modifying the nitrogen content of the sample, whose deficiency will enhance the degradation efficiency of fungus *P. chrysosporium*.

KEYWORDS

BIOTECHNOLOGY, MICROBIOLOGY, FUNGUS (*Phanerochaete chrysosporium*), WATER TREATMENT; AZO DYES, LIGNOCELLULOSIC SUBSTRATE, BIODEGRADATION OF DYES, TEXTILE EFFLUENT

INTRODUCCIÓN

Identificación del problema.

Según la OMS, la contaminación del agua provoca más de 502 000 muertes al año; para el año 2025 la mitad de la población mundial vivirá en zonas con escasez de agua (OMS, 2015).

Entre las fuentes de contaminación del agua se encuentran los colorantes textiles. Anualmente se descargan unas 280 000 toneladas de colorantes textiles en aguas residuales alrededor del mundo (Jin et al., 2007: pp.239-243). Alrededor del 10-15% de los colorantes usados en los procesos de teñido no se unen a las fibras y se hallan libres en el ambiente (Asad etl al., 2007: pp.2082-2088).

Dentro de la amplia diversidad de colorantes textiles se hallan los colorantes azoicos que son compuestos químicos xenobióticos deficientes en electrones, poseen grupos aceptores de electrones que generan una deficiencia electrónica en la molécula, volviéndola resistente a la escisión y consecuente degradación (Singh et al., 2014: pp.160-166). Representan alrededor de la mitad de los colorantes que han sido sintetizados, además de ser los más ampliamente usados en la industria textil, alimenticias, papeleras, gráficas, cosméticas, entre otras (Chuang y Lin, 2001: pp.631-636).

Varios métodos fisicoquímicos han sido utilizados para la degradación de colorantes azoicos con marcadas desventajas: adsorción, tratamiento químico y extracción de pares iónicos, que son métodos costosos, además que producen grandes cantidades de lodos; el uso extensivo de coagulación o floculación generan cantidades considerables de fangos los cuales deben ser dispuestos de manera segura; las técnicas de filtración de membrana conducen a corrientes secundarias que requieren tratamientos posteriores (Churchley, 1994; Vandevivere et al., 1998; Swaminathan et al., 2003; Behnajady et al., 2004; Wang et al., 2004).

En los tratamientos bacterianos aerobios, su degradación es muy poco eficiente ya que el oxígeno es un aceptor electrónico más fuerte que los colorantes azoicos; por otro lado, los tratamientos anaerobios inmovilizados generalmente no son específicos con respecto a los microorganismos implicados en el proceso (Stolz, 2001: pp.69-80).

La liberación de los colorantes es perjudicial para los ecosistemas, no solamente por la coloración sino por el hecho de que varios colorantes azoicos y sus productos de descomposición son tóxicos y/o mutagénicos para los organismos vivos (Weisburger, 2002: pp.506-507).

En Ecuador se considera a la actividad textil, dentro de la cual se incluye la tintorería como una de sus operaciones; como una fuente generadora de empleo que demanda mano de obra no calificada; es una industria integrada que requiere insumos de otros sectores (agrícola, ganadero, industria de plásticos, industria química, etc.) (Carrillo, 2010: p.2).

La distribución de la actividad textil nacional es amplia. Chimborazo desarrolla esta actividad con un nivel elevado y su aporte representa el 15.02%. En esta provincia, la actividad textil se concentra en algunos cantones como Guano, Penipe y Riobamba, donde se elaboran diversos artículos como: ponchos, alfombras, fajas, cintas para envolver cabello, etc. La demanda de estos artículos conlleva a la improvisación de talleres dedicados al teñido de fibras, cuyos procedimientos se hallan fuera del marco del cuidado ambiental (MIPRO, 2012).

El Ministerio del Ambiente del Ecuador (MAE), mediante un estudio realizado, afirma que dentro del proceso de elaboración de lana se encuentra la operación de teñido cuya salida se conforma por residuos sólidos (como residuo no peligroso) y agua residual de teñido considerada como peligrosa; este proceso genera un impacto sobre el factor Calidad del Agua valorado en (-45.00) cuyo nivel es medianamente significativo (MAE, 2013).

Justificación del proyecto

Como consecuencia del notable desarrollo de los procesos industriales que buscan satisfacer las necesidades requeridas por sus mercados, se liberan al medio una gran cantidad de residuos, que, al no tener ningún tratamiento previo, generan efectos nocivos a los ecosistemas, por lo que es necesario encontrar alternativas de solución a este grave problema.

Los colorantes azoicos utilizados por las industrias textiles durante los procesos de teñido al integrarse al efluente residual, constituyen una importante fuente de contaminación, reduciendo la calidad del agua del cuerpo receptor que al tener una limitada capacidad de autodepuración requiere la aplicación de un eficaz sistema de tratamiento que permita cumplir con los parámetros establecidos por la normativa ambiental vigente.

La mayoría de estudios acerca de la decoloración de compuestos azoicos se han centrado en las bacterias debido a su extenso uso, alta actividad, fácil adaptación y amplia distribución (Pearce et al., 2003: pp.179-196), sin embargo, la descomposición de productos tales como las aminas aromáticas puede resultar en una inhibición de la actividad bacteriana (Qu et al., 2010: pp.8016-8023).

Los hongos aerobios de la pudrición blanca son capaces de degradar una amplia variedad de compuestos resistentes, incluidos los colorantes textiles, mediante enzimas extracelulares de baja especificidad (Yang et al., 2013: pp. 97-108). Tal es el caso del hongo *Phanerochaete chrysosporium*, el cual reporta la degradación o secuestro de colorantes azoicos, heterocíclicos, entre otros. (Solís et al., 2012: pp.1723-1748).

La aplicación de procesos biológicos eficientes constituye un aporte a la Política de Ecoeficiencia Industrial promulgada por el Ministerio de Industrias y Productividad (MIPRO) respecto de la mejora tecnológica en la cual la empresa invierte para reducir el volumen de toxicidad de los residuos generados.

Por este motivo, se ha seleccionado el hongo de la pudrición blanca *Phanerochaete chrysosporium* que posee un sistema metabólico enzimático extracelular, conformado por lignina peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP), capaz de degradar un amplio rango de contaminantes orgánicos estructuralmente diversos. Al ser un hongo que puede desarrollarse en medio líquido, se ensayará la reducción de estos compuestos en el agua residual.

La presente investigación, constituye una alternativa de solución ecológicamente amigable para el tratamiento de aguas de descarga con contenidos representativos de colorantes azoicos, reduciendo su potencial contaminante en el efluente y permitiendo conservar la capacidad de autodepuración del cuerpo hídrico receptor. Su pertinencia es evidente de acuerdo a la concordancia con las líneas de investigación de la Facultad de Ciencias y la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Es completamente viable debido a la localización geográfica, que ubica a la investigación en el área donde las estadísticas nacionales definen la actividad industrial textil como considerable, de donde se obtendrán los datos necesarios para la obtención de muestras e información de interés.

Objetivos.

Objetivo general.

Evaluar la eficacia del hongo *Phanerochaete chrysosporium* en la biodegradación de colorantes azoicos del efluente de la industria textil.

Objetivos específicos.

- Caracterizar a nivel físico y químico el efluente de la industria textil.
- Emplear el hongo *Phanerochaete chrysosporium* en unidades experimentales para la biodegradación de colorantes azoicos.
- Determinar el porcentaje de degradación de colorantes azoicos obtenido con el tratamiento.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1 Antecedentes de la investigación

La información bibliográfica e investigaciones realizadas en la Facultad de Ciencias de la ESPOCH en los que se ha trabajado con hongos de pudrición blanca como *P. ostreatus* y *P. chrysosporium*, han determinado que sean estudiados como potenciales agentes para tratamientos de biodegradación de diferentes contaminantes.

Las enzimas extracelulares encargadas de mediar esta degradación fueron halladas en *P. chrysosporium* durante estudios realizados sobre la degradación de la lignina a la cual denominaron lignina peroxidasa (LiP) (Tien y Kirk, 1983: 661-663), posteriormente la LiP fue detectada en otros hongos (Hatakks et al., 1994: pp.82-88).

Wang et al. (2009: pp.327-333) utilizaron una cepa de *Phanerochaete sp.* HSD para determinar los factores que influyen la producción de Proteínas Degradadoras de Lignina (LDP's). Para la evaluación se prepararon medios nutritivos pobres en Nitrógeno o Carbono. Los resultados demostraron que la actividad MnP al 5 día en el medio deficiente de N fue de 1913 ± 59 U/L, además que la decoloración fue rápida y eficiente para todos los colorantes azoicos, a aquellos di azoicos les toma mayor tiempo poder degradarse

Un medio compuesto por 0.5% glicerol, 0.184% tartrato de amonio, 0.1 Tween 80 y suministro de oxígeno puede llegar a inducir una actividad enzimática LiP: 12-13.9 U/mg y MnP: 144U/mg al suministrar 35°C, agitación de 60 rpm y ajustar el pH a 4.5 (Bono et al., 1990: pp. 189-193).

Khiyami et al. (2006: pp. 1693-1698) proponen un medio constituido por 2% glucosa, 0.022% tartrato de amonio y 0.1% Tween 80. Al mantener una agitación de 300 rpm la actividad enzimática resulta ser LiP: 0.05 U/mL y MnP: 0.0063U/mL.

Senthilkumar et al., (2011: pp.845-853) evaluaron la decoloración del colorante Negro Amido 10B mediante *Phanerochaete chrysosporium*, cuyo micelio creció en agar PDA. Los resultados demostraron porcentajes de decoloración cercanos al 60% a los 10 días del tratamiento con

concentraciones del 20, 40 y 60% del efluente. Además se alcanzaron porcentajes superiores al 90% de decoloración con un pH neutro (7), 0.5% de glucosa, 0.1% de sulfato de manganeso (MnSO_4), 0.5% de iones amonio (NH_4^+) en experimentos individuales. La adición de lignina aceleró el inicio del proceso.

En el estudio realizado por Sukhwinder y Kannan (2010: pp.146-150) para biodegradar los colorantes (DR-80) y (MB-9) mediante *Phanerochaete chrysosporium*, se elaboró una mezcla con 5 concentraciones de los colorantes. El hongo fue mantenido en agar PDA a 25°C, mientras que para la producción de esporas se utilizó un medio de Kirk (Tien y Kirk, 1983). El medio utilizado para el análisis fue el sugerido por Rhada et al., (2005 citado por Sukhwinder y Kannan, 2010). La longitud de onda utilizada correspondió al máximo de absorbancia de cada color. Los resultados demostraron que para los sistemas de un solo colorante tomó diferentes tiempos para la decoloración en función de su naturaleza y concentración existiendo una relación inversa entre la decoloración y la concentración inicial. En los sistemas combinados se utilizó la expresión del modelo de ecuación obtenida con el método de mínimos cuadrados. Se concluye que la eficiencia en la decoloración varía dependiendo de la concentración inicial del colorante, así como la relación existente entre la actividad enzimática y la decoloración.

1.2. Marco Conceptual

1.2.1. Colorantes

Los colorantes son sustancias orgánicas fluorescentes o de color intenso que imparten color a un sustrato incoloro por medio de absorción selectiva de la luz (Moeller y Mazón, 2003). Sus moléculas están constituidas por tres grupos funcionales: el cromóforo, responsable de la absorción de luz, brindando la propiedad de la luz a la molécula; el auxócromo, el cual da afinidad a la fibra e intensifica el color; el solubilizador, que determina su afinidad por diversos solventes, está dado por iones $-\text{SO}_3^- \text{Na}^+$, $-\text{NH}_3^+ \text{Cl}^-$, $-\text{SO}_2^- \text{NH}_2^-$, entre otros (Marcano, 1990: pp.26-28).

La Asociación Ecológica y Toxicológica de Fabricantes de Colorantes y Pigmentos Orgánicos (ETAD, por sus siglas en inglés), define al colorante como: sustancias orgánicas intensamente coloreadas o solamente fluorescentes que imparten color a un sustrato mediante la absorción selectiva de la luz. Son solubles o pasan a través de un proceso de aplicación que, temporalmente, destruye cualquier estructura cristalina por absorción, solución, y retención mecánica o por enlaces químicos iónicos o covalentes (ETAD, 2013).

Tabla 1-1. Relación entre el color y la longitud de onda de la luz absorbida.

Longitud de onda (nm)	Color absorbido	Color observado
400-435	Violeta	Amarillo verdoso
435-480	Azul	Amarillo
480-490	Azul verdoso	Naranja
490-500	Verde azulado	Rojo
500-560	Verde	Púrpura
560-580	Amarillo Verdoso	Violeta
580-595	Amarillo	Azul
595-605	Naranja	Azul verdoso
605-700	Rojo	Verde azulado

Fuente: (Gürses et al., 2016)

La industria emplea colorantes aprovechando sus características como las diferentes tonalidades que pueden proporcionar, la gama brillante que ofrecen, los diferentes métodos de aplicación y la rápida humectación de la prenda (Pearce et al., 2003: pp.179-196).

Los colorantes usados industrialmente poseen una compleja estructura química encontrando así a aquellos que contienen grupos azo, diazo, antraquinonas y complejos metálicos, que generalmente se aplican como mezclas. Según sus propiedades pueden ser clasificados como ácidos, básicos, dispersos, reactivos y directos (Moeller y Mazón, 2003; Rodríguez et al., 2003).

1.2.1.1. Clasificación de los colorantes.

Existen siete categorías en las cuales se clasifican los colorantes azoicos, de acuerdo a su naturaleza y el modo para fijarse en las fibras: ácidos, directos, reactivos, dispersos, mordantes, solventes y básicos. Los tres primeros tienen características aniónicas, los tres siguientes son no iónicos y el último es catiónico. (Tan et al., 2000: pp.337-344).

Moeller et al., (2013) sugieren la siguiente clasificación:

Colorantes Naturales

Son colorantes que se encuentran de manera natural, para su obtención se hace uso de procesos físicos como evaporación, molienda, tamizaje. El índigo es el colorante natural más utilizado debido a su resistencia a la luz, al lavado, álcalis y ácidos.

Según su origen pueden ser:

- Vegetales: Índigo, Nogal, Eucalipto, Maíz morado, Molle.
- Animales: Cochinilla, Púrpura.
- Minerales: Cinabrio, Plomo, Cobalto.

Colorantes Artificiales

Constituye el tipo de colorante más utilizado por la industria textil. Varios de ellos se sintetizan en el laboratorio a partir de los mismos colorantes en su estado natural. Estos se clasifican como sigue:

Colorantes ácidos: Se utilizan para el teñido de fibras proteicas en medio acidificado, para lo que se requiere un nivel de pH entre las 2 y 6 unidades. Su grupo cromóforo es aniónico, por lo cual requiere de sitios catiónicos para su fijación mediante interacciones de carga. En este grupo se ubican los azoicos amarillos, anaranjados, rojos, escarlatas, marinos sólidos y combinaciones que dan lugar a marrones

Colorantes básicos: De forma directa son útiles para teñir fibras animales como lana y seda. Durante el teñido se utilizan agentes catiónicos-aniónicos adicionales para poder controlar el proceso. Los agentes son sales de bases orgánicas cuyo objetivo es forzar la unión del grupo cromóforo con el catión, resultando un anión incoloro. Los resultados de esta reacción química son tres grupos nuevos de colorantes básicos:

- Colorantes de carga positiva deslocalizada, derivados del di y trifenilmetano.
- Colorantes con carga catiónica localizada, tipo azo o antroquinónico.
- Colorantes de estructura heterocíclica menos hidrosolubles conteniendo nitrógeno cuaternario.

Colorantes directos: Su nombre se debe al hecho de prescindir de productos secundarios que actúen como mordientes. Se distinguen dos familias:

- a) Colorantes azoicos: Son derivados de las aminas del difenilo.
- b) Colorantes tiazólicos: Contienen en su molécula el anillo tiazólico. Su coloración presenta la gama del amarillo, anaranjado y pardo.

Colorantes a la tina: Este tipo de colorantes son insolubles en agua pero tienen diferente constitución química entre sí. Cuando son expuestos a medios alcalinos se reducen transformándose en leucoderivados hidrosolubles. Al finalizar el tinturado se aprecian tonos más

brillantes, sin embargo son fácilmente oxidables por el oxígeno del aire y presentan menor solidez al lavado y la luz.

Colorantes dispersos: Se llaman dispersos al requerir aplicarse conjuntamente con un dispersante para facilitar su insolubilidad en agua. Son compuestos no iónicos. Se emplean para procesos de tintura de rayón, acetato y poliésteres.

Colorantes sulfurosos: Estos colorantes poseen una molécula de azufre el cual puede ser oxidado con facilidad, a diferencia de su presencia en los demás colorantes. Tienen la posibilidad de teñir las fibras directamente en su estado reducido, así como de combinarse con colorantes básicos para producir lacas no solubles.

Tabla 2-1: Grupos cromóforos presentes en colorantes orgánicos.

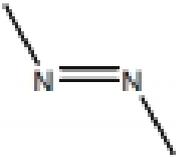
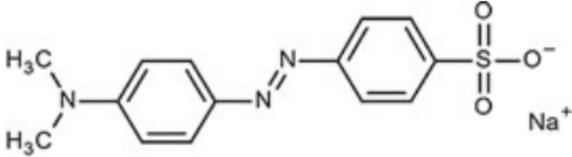
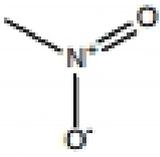
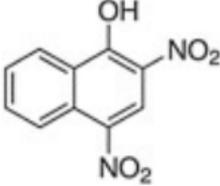
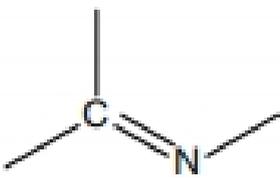
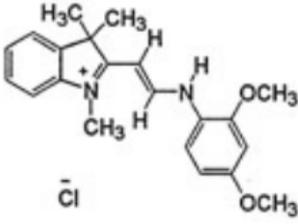
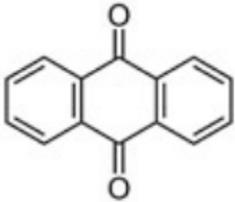
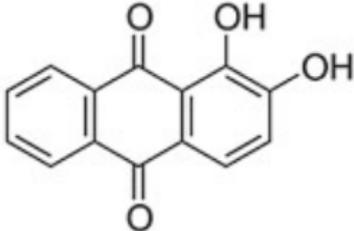
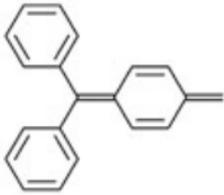
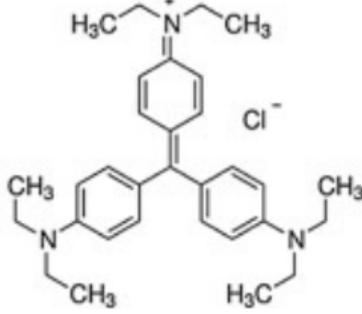
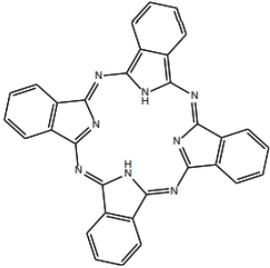
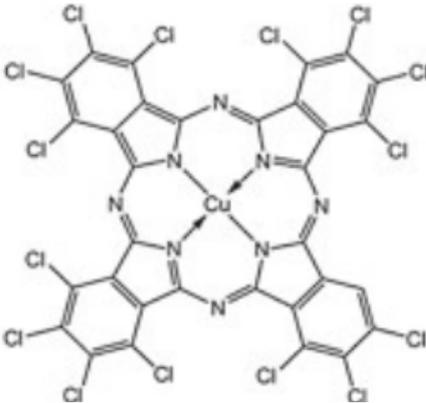
Grupo Cromóforo	Colorante
 <p data-bbox="443 1196 501 1227">Azo</p>	 <p data-bbox="938 1196 1150 1227">Naranja de metilo</p>
 <p data-bbox="443 1476 501 1507">Nitro</p>	 <p data-bbox="938 1480 1145 1512">Amarillo Maritus</p>
 <p data-bbox="432 1816 520 1848">Metino</p>	 <p data-bbox="930 1823 1155 1854">Amarillo básico 11</p>

Tabla 2-1 (Cont.): Grupos cromóforos presentes en colorantes orgánicos.

 <p>Antraquinona</p>	 <p>Alizarina</p>
 <p>Triarilmetano</p>	 <p>Cristal violeta</p>
 <p>Ftalocianina</p>	 <p>Pigmento verde 7</p>

Fuente: (Gürses et al., 2016)

Elaborado por: Ángel Gabriel Vallejo, 2016

1.2.2. Colorantes Azo

El sistema cromóforo de estos colorantes consiste esencialmente del grupo azo (-N=N-) en asociación con uno o más sistemas aromáticos, grupos hidroxilo o amino auxocrómicos (Lorimer et al., 2001: pp.1957-1968); su estructura puede contener uno o varios de estos grupos.

1.2.2.1. Síntesis

Cualquier amina aromática primaria puede generar un azo compuesto al ser sometida al proceso de acoplamiento. El acoplamiento es una reacción de sustitución electrofílica aromática que requiere una especie positiva y un sustrato o acoplamiento; la especie positiva puede ser un átomo de nitrógeno de la sal de diazonio y el sustrato es un receptor activado por un grupo donador de electrones que incrementa la densidad electrónica (Moeller et al., 2013).

1.2.2.2. Clasificación

Los colorantes azoicos se pueden subdividir en dos grupos: iónicos y no iónicos. A pesar de que el máximo de absorción está dentro del rango UV-Visible del espectro electromagnético, sus presiones de vapor son muy bajas, entre 10^{-20} a 10^{-8} mmHg, La hidrólisis es muy baja, exceptuando a los colorantes reactivos (Øllgaard et al., 1998).

Los colorantes azoicos iónicos son disociados en solución acuosa parcial o casi completamente, el coeficiente de partición K_{ow} es muy bajo (Naranja ácido 10: 10-5, Negro directo 38: 100). Por su parte, los colorantes no iónicos presentan bajas solubilidades en rangos menores a 100mg/L, sin embargo, sus coeficientes de partición son muy altos (Azul disperso 79: 3630m Amarillo solvente 2: 11220) (Øllgaard et al., 1998).

En consideración de los grupos azo presente en la molécula pueden ser mono, diazo, triazo, y policondensados. Dado que los representantes de cada familia son abundantes, su identificación por su estructura química sería compleja, para su simplificación el Colour Index adiciona la notación acerca de su síntesis a partir de la sal de diazonio, el sustrato, y las condiciones de reacción (alcalina o ácida); utiliza un sistema de flechas para indicar la secuencia de sus condensaciones. Finalmente, de acuerdo a su estructura molecular pueden ser ácidos, básicos, dispersos, directos o reactivos (Moeller et al., 2013).

1.2.3. Efectos ambientales de los colorantes.

La reducción de la incidencia lumínica y del oxígeno disuelto constituyen los principales problemas ambientales asociados al aporte de color en los cuerpos hídricos, como consecuencia de la dificultad para ejecutar la acción fotosintética vegetal. Varios estudios han comprobado que algunos colorantes azoicos exhiben propiedades cancerígenas potenciales, catalogando unos 3000 colorantes comerciales de este tipo como cancerígenos (Guaratini y Zanoni, 2000: pp.71-78).

Procesos como oxidación, reducción o hidrólisis del enlace azo pueden generar aminas aromáticas incrementando su toxicidad. Así mismo, algunas de las aminas aromáticas que son usadas en la síntesis de tintes se reconocen como carcinógenos (Weisburger, 2002; Walters et al., 2005).

La actual industria textil requiere de colorantes con elevada estabilidad química y fotolítica, hecho que lleva al mejoramiento del diseño volviéndolos resistentes a la escisión causada por el agua, jabones, luz; consecuentemente dificultando su degradación. Los efluentes generados representan alrededor del 92% de agua que ingresa al proceso, así como los vertidos por la incompleta fijación del colorante en la fibra constituyen un porcentaje de 200t/d de este tipo de compuestos liberados al medio ambiente (McMullan et al., 2001; Guaratini y Zanoni, 2000; Blánquez et al., 2004).

Lavado, tintura, estampado y acabado, constituyen las operaciones textiles que registran las mayores descargas de desechos líquidos. Estos vertidos son irregulares y variables en su composición, pues dependen del proceso y operación efectuados.

Así, la industria textil es contaminante en términos de complejidad y volumen, generando aguas residuales de diversas características. Estas aguas se caracterizan por sus altos valores de DBO, DQO, color, turbiedad, sólidos suspendidos, temperatura, además de un pH que varía según el proceso. Aguas residuales con DQO sobre los 1600mg/L se las considera altamente contaminadas y de significativa fuente de contaminación (Aristizábal y Bermúdez, 2007: pp.77-78).

Tabla 3-1:I Carga contaminante aportada por algunos colorantes.

Colorante	Litros de agua por kg de tela	DQO (ppm)
Reactivo	74-210	150-400
Directo	14-53	440-1200
Sulfuroso	24-212	4200-14100
Tina	8-16	250-3000

Fuente: (Rodríguez & Roldan, 1997)

Una correcta evaluación de los efectos negativos que pueden causar los colorantes al ser descargados en un cuerpo receptor considera la concentración de los colorantes y el tipo de molécula descargada, la toxicidad a organismos macro y microscópicos y su posible acumulación en las cadenas alimenticias (Leist, 1982: pp.45-63).

1.2.4. Métodos de Tratamiento de efluentes textiles con colorantes.

Diversos estudios reportan la existencia de tecnologías para la remoción de color, así se citan procesos químicos, procesos físicos y procesos biológicos. Los procesos biológicos, que incluyen sistemas anaerobios y aerobios de biomasa suspendida y fija, entre otros; resultan ser los más económicos y amigables con el medio ambiente. Por su parte, los procesos químicos tales como oxidación con cloro, ozonización, y otros; así como los físicos (electroquímica, adsorción con carbón activado, radiación UVA) se constituyen como los más sencillos y costosos a la vez (Moeller et al., 2013).

1.2.4.1. Tratamientos Biológicos.

Dado que los tratamientos fisicoquímicos presentan desventajas, el interés por la búsqueda de nuevos procesos y condiciones operativas mediante las cuales sea posible mineralizar colorantes azo se ha ido incrementando.

Tratamiento Biológico Convencional.

(Quezada y Buitrón, 1996; Van der Zee y Villaverde, 2005) aseguran que los sistemas de tratamiento de aguas residuales municipales e industriales se basan en la aplicación de un consorcio bacteriano conformado mayoritariamente por bacterias heterótrofas. Sin embargo, los colorantes azoicos presentan cierto grado de persistencia en condiciones aeróbicas; en condiciones anaeróbicas, la reducción da lugar a aminas aromáticas, que resultan ser recalcitrantes.

Así mismo, mencionan que para el tratamiento de este tipo de compuestos (tóxicos), se requiere la adición de co-sustratos. Siendo la reducción del grupo azo no específica, es requerida una etapa anaeróbica seguida de una aeróbica; este proceso secuencial rompería inicialmente el grupo azo, el cromóforo y a continuación la mineralización de las aminas producidas

Tratamiento Fúngico.

En la actualidad se ha dado importancia al grupo de hongos del filo *Basidiomycetos*, pues ciertas enzimas del grupo de las oxidasas que son producidas por estos hongos tienen la capacidad de oxidar moléculas recalcitrantes, entre ellas las moléculas de los colorantes.

Bumpus & Brock, (1998 citados en Garzón, 2009) determinaron que la lignina peroxidasa (LiP) es responsable de la N-des-metilación del cristal violeta. Así mismo, otros colorantes del

trifenilmetrano (bromofenol, rojo, cresol y otros) y del grupo azo (Rojo congo, Tropaeolin) son degradados por *Phanerochaete chrysosporium* en cultivos limitantes de nitrógeno.

Pasti-Grigsby et al., (1992: pp.3605-3613), comparando la capacidad decolorativa de *Streptomyces spp* y *P. chrysosporium* en condiciones de limitación de nitrógeno con 22 colorantes azoicos, demostraron la capacidad de decolorar colorantes que también eran oxidados por MnP.

1.2.5. Hongos de la pudrición blanca

Los hongos de la podredumbre blanca, llamados también hongos lignolíticos son *Basidiomycetes* pertenecientes a la división de los *Eumycetes* y se caracterizan por reducir sus esporas en forma de clava a la cual se les denomina basidios. El nombre ha sido asignado a estos hongos a razón de la capacidad de deslignificación de la madera, degradando preferentemente la lignina de la madera por lo cual su sustrato se torna de coloración blanquecina dando testimonio de la presencia del micelio blanco característico de estos hongos.

Entre los hongos de la pudrición blanca hay géneros comestibles como *Pleurotus* y *Lentinula*, que pueden ser cultivados en sustratos lignocelulósicos. Otros hongos de este grupo son: *Bjerkandera adusta*, *Calocybe indica*, *Daedaleopsis sp*, *Hypholoma cadnoides*, *Panellus mitis*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Tricholomopsis rutilans* (Arias-Carbajal et al., 2005: pp. 77-78).

1.2.5.1. Sistema de enzimas de los hongos de la podredumbre blanca

Las tres enzimas extracelulares que participan en la degradación de la lignina, conocidas comúnmente como modificadoras de lignina son: mangneso peroxidasa, lignina peroxidasa y lacasa.

La manganeso peroxidasa (MnP) fue descubierta en 1984, su peso molecular varía de 38 a 62 kDa. La enzima es producida exclusivamente por algunos basidiomicetes. Es una peroxidasa extracelular que contiene el grupo hemo y requiere Mn^{+2} en el sustrato para ser oxidado a Mn^{+5} que a su vez oxida anillos fenólicos a radicales fenoxil (Molinanen et al., 1996: pp.792-799). El Mn^{+2} producido es altamente reactivo y forma complejos con ácidos orgánicos quelantes como el oxálico o el málico (Kishi et al., 1994: pp.8694-8701).

La lignina peroxidasa (LiP), es una peroxidasa extracelular que contiene un grupo hemo dependiente de H_2O_2 con un potencial redox inusualmente alto y un pH óptimo bajo (Gold y Alic, 1993: pp.605-622), muestra poca especificidad a los sustratos y degrada gran variedad de ligninas y

otros compuestos (Barr y Aust, 1994: pp.78-87). Oxida preferiblemente anillos aromáticos metoxilados sin grupo fenólico libre (Kersten et al., 1990: pp.475-480).

La lacasa (LAC), es una fenoloxidasa que contiene cobre y no requiere H₂O₂ pero emplea oxígeno molecular (Thurson, 1994). Es muy semejante a la MnP, prefiriendo compuestos con un grupo fenólico libre e igualmente forma radicales fenoxil que reducen el oxígeno a agua durante la oxidación de sustratos fenólicos creando un radical libre que puede ser ligado a un radical catiónico de un carbono central formado en una reacción de la enzima MnP (Kersten et al., 1990: pp.475-480). No se halla presente en *P. chrysosporium*.

1.2.6. *Phanerochaete chrysosporium*

Es un hongo perteneciente al filo *Basidiomycota*. Es un descomponedor de amplios tipos de madera y se lo encuentra comúnmente en bosques templados de América del Norte, Europa e Irán (Burdasall H. , 1985). Produce numerosas esporas asexuales, y excreta LDP's para degradar lignina de manera selectiva (Kirk T., 1985: pp.27-42).

Es el hongo modelo de la pudrición blanca a razón de su habilidad especial para degradar el polímero aromático lignina. Su modo de acción se basa en liberar enzimas extracelulares para romper la compleja estructura tridimensional de la lignina degradándola hasta componentes que puedan ser utilizados por su metabolismo. Las enzimas extracelulares son agentes oxidantes no específicos usados para la escisión de las bandas de lignina (Eaton, 1985: pp.194-196).

Su estructura genómica se compone de aproximadamente 29.6 millones de pares de bases agrupadas en diez cromosomas lineales. La importancia de su estudio en el campo biotecnológico recae en el análisis de los genes para secuenciar monooxigenasa citocromo P450 y obtener información acerca de la interacción con proteínas complejas y en los componentes involucrados en la producción de enzimas extracelulares degradadoras de compuestos poliaromáticos (Venkataramanan y Jagjit, 2009: pp. 5570-5580).

Además de las enzimas celulolíticas, *P. chrysosporium* produce otras enzimas que degradan sustancias orgánicas complejas. De este modo, el hongo puede descomponer varias sustancias tóxicas tales como pesticidas, hidrocarburos poliaromáticos, bifenilos policlorados, trinitrotolueno, cianidas, azidas, tetracloruro de carbono, y pentaclorofenol (Kullman y Matsumura, 1996; Hawari et al., 1999; Cameron et al., 2000; Reddy y Gold, 2000).

La variedad de reacciones químicas que es capaz de llevar a cabo, revela el mecanismo de degradación del complejo lignina. El mecanismo de degradación sugiere que la despolimerización de la lignina es una reacción radicalaria en la cual se generan cantidades de radicales catiónicos que consecuentemente proceden a ejercer la función de sustrato para los LDP's (Kersten et al., 1990; Kirk T., 1987).

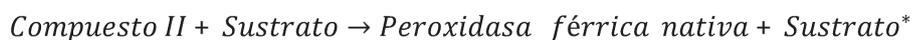
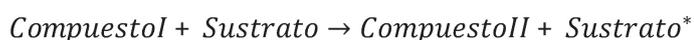
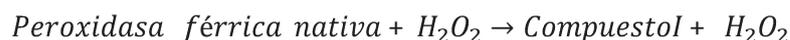
El proceso de degradación de lignina es llevado a cabo por reacciones de escisión. Las enzimas extracelulares liberan radicales libres para iniciar la descomposición espontánea hasta unidades de fenil propano como resultado del metabolismo secundario (Lestan et al., 1993: pp. 606-612).

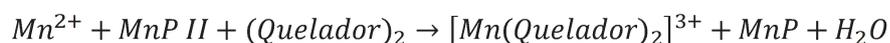
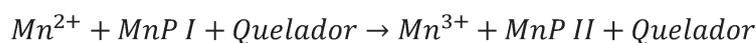
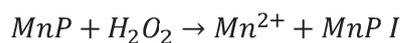
Tabla 4-1: Propiedades biológicas de *P. chrysosporium*.

Sustrato	Metabolitos secundarios
Lignina alcalina de paja y pino.	Lignino peroxidasa
Agua residual papelera.	Manganeso peroxidasa
Alcohol veratrílico y su éter metílico.	Glioxal oxidasa
Agua residual textil.	Peroxidasas
Triclorofenol, pentaclorofenol, touleno.	Xilanasa
Rojo congo, Amaranto, Antrazina.	Celulasas
Colorantes azoicos.	Succinimidas
DDT, Benceno, Tolueno, Xileno.	Aril-alcohol deshidrogenasa
Ácido húmico.	Celobiosa deshidrogenasa Agente solubilizado de carbón

Fuente: (Singh y Chen, 2008)

Durante la reacción de deslignificación se lleva a cabo una oxidación mediada por peróxido de hidrógeno dirigida por las LDP's. Estas enzimas utilizan un compuesto monomérico (alcohol veratrílico) como inductor para la reacción catalítica, la función de la enzima se muestra a continuación:





De manera general, el peróxido de hidrógeno oxida la enzima férrica por dos electrones para dar lugar a un Compuesto I intermedio; el Compuesto I intermedio oxida sustratos aromáticos como el alcohol veratrílico por un electrón generando el Compuesto II, que nuevamente oxida los sustratos aromáticos para devolver la enzima a su estado de reposo. Además, cataliza la hidroxilación de grupos metil bencílicos, la oxidación alcoholes bencílicos a sus correspondientes aldehídos o cetonas, y la oxidación de fenoles. LiP también cataliza la reacción para la escisión de anillos aromáticos no fenólicos en compuestos tipo lignina (Tien y Kirk, 1984; Leisola et al., 1985; Renganathan et al., 1985; Umezawa y Higuchi, 1989).

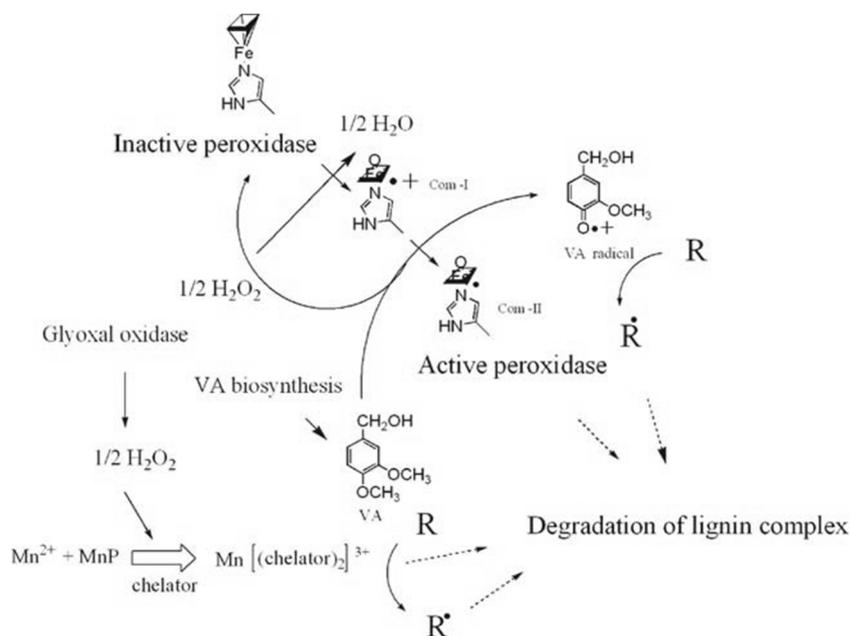


Figura 1-1. Mecanismo de reacción de LiP y MnP para la degradación de lignina.

Adaptado de (Kersten & Cullen, 2007). Fuente: (Singh & Chen, 2008).

1.2.6.1. Morfología de *P. chrysosporium*

De acuerdo a su estructura celular, es un hongo de corteza que forma cuerpos fructíferos de reproducción aplanados en lugar de una estructura voluminosa. Exhibe un patrón interesante de hifa septada que provee de una fuerte línea de defensa en momentos de ausencia de condiciones favorables. La red de hifas presenta ramificaciones con diámetros oscilantes entre 3 y 9 μm . En las puntas de las hifas descansan clamidosporas, esporas de pared gruesa de unos 50 a 60 μm . El conidióforo da lugar a una blastoconidia asexual la cual posee entre 6 a 9 μm de diámetro (Saiz Jimenez, 1983).

1.2.6.2. Taxonomía

Phanerochaete chrysosporium posee un ciclo de vida inusual durante el cual exhibe dos estados: uno anamorfo y otro teleomorfo. El primero de estos estados se ha descrito en las diferentes publicaciones bajo el nombre de *Sporotrichum pulverulentum* así como todos los nombres de sus cepas correspondientes (Burdvall, 1998).

Sin embargo, posterior al descubrimiento del estado teleomorfo de las especies, la taxonomía se organiza de acuerdo a éste. Así, con la publicación del nombre *Phanerochaete chrysosporium* Burds (Burdvall y Eslyn, 1974: pp.123-133) para el estado teleomorfo, todos los nombres del estado anamorfo se consideran secundarios (Singh y Chen, 2008: pp.399-417).

Tabla 5-1: Clasificación taxonómica de *P. chrysosporium*.

Taxa	Denominación
Dominio	<i>Eukarya</i>
Reino	<i>Fungi</i>
División	<i>Basidiomycota</i>
Clase	<i>Agaricomycetes</i>
Orden	<i>Polyporales</i>
Familia	<i>Phanerochaetaceae</i>
Género	<i>Phanerochaete</i>

Fuente: (NCBI, s.f.)

1.2.7. Biodegradación enzimática de colorantes.

El principal mecanismo de decoloración usado por las células vivas es la biodegradación, proceso durante el cual se producen enzimas modificadoras de lignina, lacasa, manganeso peroxidasa y lignino peroxidasa (Raghukumar et al., 1996: pp.105-106).

La degradación de compuestos azoicos mediante reductasas es un proceso exclusivamente anaeróbico que se desarrolla en la naturaleza. Estas reacciones requieren la presencia de cofactores reductores para la catálisis reductiva tales como NAD^+ , NADP^+ , etc. Dado que las reductasas son enzimas citosólicas, se asume que los colorantes azoicos deben ser transportados hacia el interior de la célula para ahí ser degradados por las bacterias anaerobias. Sin embargo, para colorantes de altos pesos moleculares que no pueden atravesar la membrana celular, se cree que existe un mecanismo reductor que no depende de la internación de la macromolécula (Robinson et al., 2001: pp.247-255).

El mecanismo propuesto sugiere la reducción electrónica del colorante en el ambiente extracelular. Inicialmente se requiere el enlace entre el sistema de transporte electrónico celular y la molécula del colorante, esto requiere que el componente de transporte electrónico se halle presente en el exterior de la membrana celular fúngica, generando un contacto directo entre el colorante y el agente redox. Incluso, si el agente redox actuase como transportador de electrones, se incrementaría sustancialmente la degradación de la molécula azoica por las azo reductasas (Robinson et al., 2001: pp.247-255).

Durante la degradación mediante lacasas, se utiliza oxígeno molecular para oxidar varios compuestos aromáticos y no aromáticos por abstracción creando radicales durante el proceso. Estos radicales entonces, participan en otras reacciones como polimerización, hidratación o abstracción protónica (Majeau et al., 2010: pp.2331-2350).

1.2.8. Factores que influyen en la decoloración fúngica.

Tanto la tasa de degradación como la eficiencia de la decoloración enzimática del colorante son dependientes de varios parámetros operacionales que dominan el la degradación de la molécula orgánica.

1.2.8.1. *Nutrientes del medio de crecimiento.*

Mediante el mejoramiento de las condiciones iniciales de crecimiento, se puede optimizar la biodegradación de colorantes. Sustancias como glucosa, maltosa, celobiosa o almidón han demostrado ser buenas fuentes de carbono para los hongos de la pudrición blanca en la decoloración de efluentes (Zhang et al., 1999: pp.48-53).

Mientras la decoloración por *Phanerochaete chrysosporium* se lleva a cabo en condiciones de metabolismo secundario, la limitación en fuentes de carbono o nitrógeno induce la producción de LiP. Por otro lado, una alta dosis de nitrógeno resulta inhibitoria en la decoloración (Zhen y Yu, 1998; Tatarko y Bumpus, 1998).

1.2.8.2. *Oxígeno, pH y Temperatura.*

Condiciones aerobias o anaerobias pueden existir para que se lleve a cabo la degradación de colorantes por diferentes microorganismos. En condiciones anaerobias, algunas fuentes de carbono como glucosa, almidón, acetato y etanol influyen en el proceso decolorativo (der Zee y Villaverde, 2005: pp.1425-1440).

En anaerobiosis, la actividad reductiva enzimática es generalmente mayor, sin embargo, se requiere una cantidad de oxígeno para la regeneración de los cofactores reductores. Los intermediarios formados durante la reducción azoica, son degradados mediante la hidroxilación y la apertura del anillo aromático en la presencia de oxígeno. La falta de oxígeno y el uso de aceptores electrónicos altamente energéticos resultan ser las principales razones limitantes a la tasa de degradación (Pandey et al., 2007: pp.73-84).

El potencial de hidrógeno es un factor altamente determinante. El crecimiento fúngico se reporta óptimo a pH bajo, generalmente entre 4 y 5 unidades. Las formas iónicas de la solución coloreada así como la carga eléctrica de la superficie de la biomasa dependen del pH de la solución. Por tanto, el pH de la solución ejerce influencia tanto sobre los sitios de unión superficial entre la biomasa fúngica y el colorante como la química del colorante en el medio (Fu y Viraraghavan, 2002: pp.239-247).

La temperatura es otro parámetro que parece tener un efecto sobre la degradación enzimática de colorantes. Para la mayoría de hongos, la temperatura óptima de crecimiento se encuentra alrededor 25-35°C. El elevado incremento en la temperatura de incubación conduce a la

inhibición del crecimiento debido a la desnaturalización enzimática, hecho que se refleja en la reducción de la eficiencia degradativa (Liu et al., 2006: pp.81-86).

1.2.8.3. Concentración del colorante.

Existe un efecto sobre la degradación de los colorantes que es generado por su concentración inicial y por la actividad enzimática. El incremento de la concentración de la tintura retrasa significativamente el crecimiento fúngico, lo cual sugiere que elevados porcentajes de colorantes reducen la degradación del colorante debido a su toxicidad hacia los microorganismos (Wells et al., 2006; Niebisch et al., 2010).

A pesar de que el proceso de decoloración, *in vitro* o *in vivo*, es versátil, se usan frecuentemente sustancias mediadoras redox, entre ellas el alcohol veratrílico (Husain y Husain, 2011: pp.1-42). La oxidación de un sustrato por enzimas lacasa peroxidasa es posible debido a que el mediador genera cationes, que pueden formarse mediante dos mecanismos.

Durante el primero, el sustrato puede someterse a la oxidación de un electrón en presencia del mediador redox y dar lugar al catión; el segundo sugiere la abstracción de un átomo de hidrógeno desde el sustrato para convertirlo en un radical que puede ser nuevamente usado por el sustrato para co-oxidarlo (Fabbrini et al., 2002: pp.231-240).

1.2.8.4. Estructura química del colorante.

Otro de los factores que afectan la degradación de efluentes lo constituye la estructura del colorante. Anillos aromáticos con sustituyentes como los grupos hidroxilo, amino, acetamida, o nitro son mineralizados en mayor medida que aquellos anillos no sustituidos, de manera especial si se usa *P. chrysosporium*. Dado que la degradación enzimática está basada en la unión de los colorantes a las enzimas, es lógico que exista una fuerte relación entre la composición química y la eficiencia decolorativa. Sin embargo, la definición de un mecanismo molecular es difícil de sugerir puesto que la estructura del colorante y la eficiencia de los mediadores Redox contribuyen a la catálisis (Almansa et al., 2004: pp.315-324).

1.2.9. Métodos de Detección de Colorantes.

Los esfuerzos enfocados en la búsqueda y desarrollo de métodos precisos, reproducibles y de bajo límite de detección para la localización y cuantificación de aminas aromáticas dieron inicio con

el reconocimiento inicial de los peligros a la salud que representan al encontrarse en las matrices como aire, agua natural, agua residual, suelos, agua y fluidos corporales. Existen métodos basados en voltametría, potenciometría con electrodos específicos y cuantificación espectrofotométrica (Chey y Adams, 1977; Norwitz y Keliher, 1998; Verma et al., 1988).

Otros métodos que permiten la caracterización de muestras respecto a su contenido de aminas incluyen la cromatografía de papel, electromigración, cromatografía de gases (GC), cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y electroforesis capilar (Oguri, 2000; Franc y Koudelkova, 1979; Chiavari y Giumanini, 1981; Skarping et al., 1983; Björkqvist, 1981).

1.2.9.1. Espectrofotometría UV.

La absorción de radiaciones ultravioleta y visible se limita a grupos cromóforos, los cuales tienen electrones de valencia con bajas energías de excitación. Este proceso consiste de dos etapas: excitación electrónica y relajación; en él pueden participar electrones responsables de la formación de enlaces atómicos o electrones que se localizan alrededor de los átomos, es decir, electrones enlazantes y electrones no enlazantes, respectivamente. Los espectros electrónicos resultantes del análisis de moléculas orgánicas compuestas por cromóforos son complejos, la compleja combinación de líneas solapadas es producto de la superposición de las transiciones vibracionales sobre las transiciones electrónicas (Skoog et al., 1992: p.322).

La espectrofotometría en el rango del Ultravioleta (UV) ha demostrado ser un método confiable y de bajo costo en el monitoreo de la calidad de aguas residuales urbanas e industriales (Thomas et al., 1996; El Khorassani et al., 1999).

En el caso de efluentes textiles, el uso del espectro en el rango del UV (200-350 nm) puede ser particularmente útil si lo que se desea es evitar las interferencias por el color visible, factor que limitaría la aplicabilidad de otros métodos espectrofotométricos (Norwitz y Keliher, 1998; Verma et al., 1988).

Tabla 6-1: Características de absorción de algunos cromóforos.

Cromóforo	Disolvente	$\lambda_{\text{máx}}(\text{nm})$	$\epsilon_{\text{máx}}$	Transición
Alqueno	<i>n</i> -Heptano	177	13 000	$\pi - \pi^*$
Alquino	<i>n</i> -Heptano	178	10 000	$\pi - \pi^*$
		196	2 000	-
		225	160	-
Carbonilo	<i>n</i> -Hexano	186	1 000	$n - \sigma^*$
		280	16	$n - \pi^*$
	<i>n</i> -Heptano	180	grande	$n - \sigma^*$
		293	12	$n - \pi^*$
Carboxilo	Etanol	204	41	$n - \pi^*$
Amido	Agua	214	60	$n - \pi^*$
Azo	Etanol	339	5	$n - \pi^*$
Nitro	Isooctano	280	22	$n - \pi^*$
Nitroso	Etil éter	300	100	-
		665	20	$n - \pi^*$
Nitrato	Dioxano	270	12	$n - \pi^*$

Fuente: (Skoog et al., 1992)

Hasta el momento, el análisis directo mediante el espectro UV en relación a la detección de aminas resultantes de la reducción de los compuestos azoicos no ha sido estudiado a profundidad; sin embargo varias publicaciones incluyen espectros del rango UV-Visible como evidencia de la acumulación o eliminación de metabolitos de compuestos azoicos (Pinheiro et al., 2004).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO EXPERIMENTAL

De acuerdo a la naturaleza de los objetivos, este estudio se enmarca dentro del tipo de investigación correlacional, aplicada a la biorremediación de xenobióticos en el agua, es prospectiva, de laboratorio, no documental y bibliográfica

Tabla 1-2: Diseño experimental para análisis cuantitativos.

Factores	Niveles	Repeticiones	Unidades Experimentales
Blanco	1	3	6
Medio Nutritivo	Medio A	3	6
	Medio B*	3	6
	Medio C	3	6
Suplementos	Lignina	3	6
	Almidón	3	6
	MnSO ₄	3	6
Origen de micelio	Agar PDA	3	6
	Trigo	3	6
	Cebada	3	6

Medio A: Glucosa (2%), Amonio Tartato (0,022%), Tween 80 (0,1%). Medio B: Glicerol (0,5%), Amonio Tartrato (0,184%), Tween 80 (0,1%). Medio C: Alcohol Bencílico (2,0 mmol/L), Peróxido de hidrógeno (4,0 mmol/L), Ácido tartárico (0.1mol/L).

*: requiere agitación

Elaborado por: Ángel Gabriel Vallejo

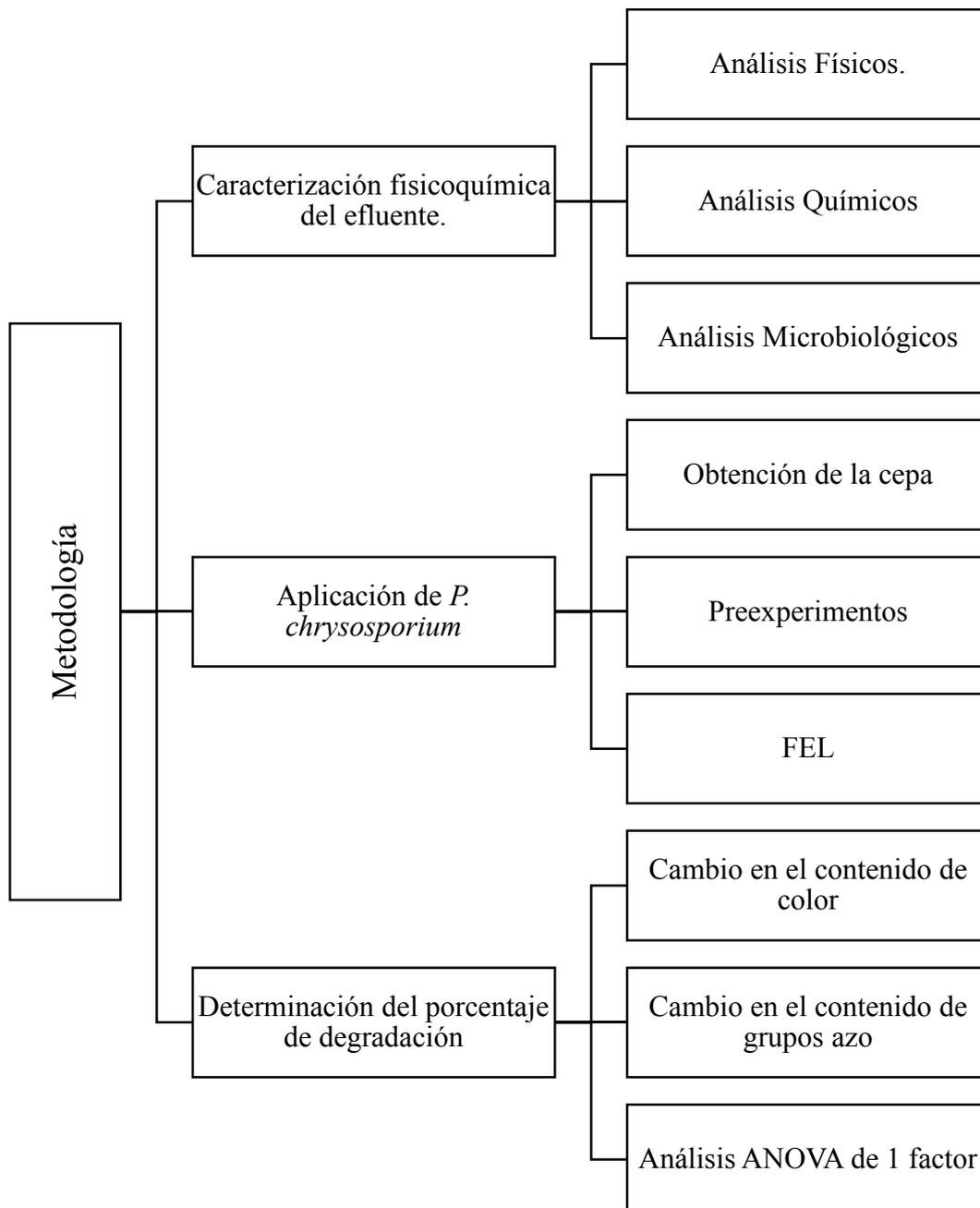


Figura 1-2. Metodología de Investigación.

Elaborado por: Angel Vallejo Cuzco, 2016.

2.1. Caracterización fisicoquímica del efluente.

2.1.1. Obtención de muestras.

Considerando que el volumen de agua utilizado se mostraba variable, la descarga del baño de colorantes tardaba entre los 5 y 10 minutos. Por tanto, la recolección de las muestras se realizaba en tres momentos: al inicio de la descarga, cuando el volumen del baño de colorante era aproximadamente la mitad y finalizando la descarga.

Una vez recolectado el volumen necesario, se dejó enfriar para ser almacenado en botellas de vidrio color ámbar y posteriormente transportado en una hielera portátil hasta el laboratorio para los análisis respectivos.

Cada muestreo fue registrado en el inventario correspondiente (Véase APÉNDICE 1).

2.1.2. Análisis Físicos.

2.1.2.1. Determinación de temperatura en campo

La temperatura determinada en campo se obtuvo según se establece en el método APHA 2550 B-1 (Anexo A) mediante un termómetro de mercurio con graduación en grados Celsius.

2.1.2.2. Determinación de temperatura en laboratorio

La medición de temperatura en el laboratorio se llevó a cabo mediante un equipo multiparamétrico CONSORT C562, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante respecto a la medición de temperatura (Ver Anexo B). Los resultados fueron reportados en grados Celsius.

2.1.2.3. Sólidos Suspendidos Totales.

El contenido de sólidos suspendidos totales (TSS) se determinó siguiendo el protocolo establecido en el método HACH 8006 (Véase Anexo C). Para este método fotométrico se hizo uso de un fotómetro HACH DR 2800, cuyos resultados son expresados en unidades de mg/L SST.

2.1.2.4. Sólidos Totales Disueltos.

Para la determinación de la cantidad de sólidos totales disueltos (TDS) presentes en las muestras, se recurrió al método potenciométrico mediante un equipo multiparamétrico CONSORT C562 (ANEXO B). El procedimiento seguido fue el recomendado por el fabricante, expresando sus resultados en g/L TDS.

2.1.2.5. Determinación de la Conductividad.

Respecto a este parámetro, se procedió con el método potenciométrico haciendo uso del equipo multiparámetro CONSORT C562. El protocolo seguido fue el sugerido por el fabricante (Ver Anexo B). Los resultados fueron expresados en unidades mS/cm.

2.1.2.6. Determinación de Color

La medición del color verdadero se realizó en el laboratorio de acuerdo al método HACH 8025 en un espectrofotómetro HACH DR 2800 a una longitud de onda de 465 nm (Véase Anexo D). Las mediciones son expresadas en unidades Platino – Cobalto (PtCo).

2.1.3. Análisis Químicos

2.1.3.1. Determinación del Potencial de Hidrógeno en campo

La medición de pH en campo se realizó mediante papel indicador HIMEDIA HiIndicator con un rango entre 1 y 14 unidades.

2.1.3.2. Medición en laboratorio

Mediante el método electrométrico descrito en APHA 4500-H⁺ B (Anexo E), se determinó la actividad de los iones hidrógeno presentes en las muestras recolectadas. La medición se llevó a cabo mediante un equipo multiparamétrico CONSOR C562.

2.1.3.3. Determinación de la Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO₅)

HACH 8043 fue el método utilizado para la determinación de la DBO a los 5 días en cada una de las muestras obtenidas (Ver Anexo F). Se utilizó un medidor VELP SCIENTIFICA BOD TRACK SENSOR SYSTEM 6.

2.1.3.4. Determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO)

Se determinó la Demanda Química de Oxígeno mediante la metodología descrita en el método HACH 8000 (Ver Anexo G). Se utilizó un espectrofotómetro HACH DR 2800 y un reactor VELP ECO 16 Thermoreactor.

2.1.3.5. Determinación del Nitrógeno Orgánico Total

El método HACH 10072 (Anexo H) fue utilizado para la determinación del nitrógeno total de las muestras, mediante un espectrofotómetro HACH DR 2800 y un reactor VELP ECO 16 Thermoreactor.

2.1.3.6. Determinación de Cromo VI (Cr 6+)

El contenido de Cromo hexavalente fue determinado mediante el Método HACH 8023 (Ver Anexo I). Las lecturas fueron obtenidas mediante un espectrofotómetro HACH DR 2800.

2.1.3.7. Determinación de Cobre (Cu)

La determinación del contenido de Cobre en las muestras se llevó a cabo de acuerdo a lo establecido en el Método HACH 8506 (Véase Anexo J). Un espectrofotómetro HACH DR 2800 permitió obtener los resultados.

2.1.3.8. Determinación de grupos funcionales

Se determinó la presencia del grupo Azo mediante espectrofotometría en el rango UV-VIS a 350nm haciendo uso de un espectrofotómetro Thermo HELIOS B y una celda de vidrio.

2.1.4. Análisis Microbiológicos

Se evaluó la presencia de heterótrofos aerobios siguiendo el proceso establecido en la norma INEN 1205. Los resultados se expresan en UFC/100 mL.

2.2. Uso del hongo *P. chrysosporium*.

2.2.1. Obtención de la cepa.

La cepa del hongo *Phanerochaete chrysosporium* para esta investigación, fue donada por el Laboratorio de Bioprocesos de la Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria, perteneciente a la Escuela Politécnica Nacional.

2.2.2. Condiciones de cultivo.

Para todos los casos, el hongo se cultivó en placas Petri estériles desechables con medio PDA sin modificación intencional de su pH. La concentración del medio fue la recomendada por el fabricante, es decir 39 gramos de medio PDA por cada litro de medio requerido.

La incubación se desarrolló en una incubadora marca Memmert, en posición invertida, a una temperatura de 27°C hasta que el micelio cubrió completamente la superficie del agar.

Los procedimientos de esterilización por calor húmedo se desarrollaron en un esterilizador de vapor marca Tuttnauer 2540 MK a 121°C (1 bar) por el lapso de 20 minutos. En general, la manipulación del microorganismo y de las muestras se realizó en una cámara de flujo laminar acompañada por mecheros de alcohol y de instrumental previamente esterilizado. En todo momento se contó con el equipo de protección personal necesario.

2.2.3. Cultivo en sustrato lignocelulósico

600 gramos de cebada y 600 gramos de trigo fueron desinfectados mediante exposición a una solución fungicidas de uso agrícola a una concentración de 0.4 mg/L durante 15 minutos. Al término de este tiempo, se retiró la solución mediante enjuague con agua destilada por cuatro veces consecutivas, A continuación, se distribuyeron 200 gramos de cada sustrato en 6 frascos de vidrio de boca ancha, se taparon y sometieron a esterilización por calor húmedo a 121°C durante 30 minutos.

Se cortó asépticamente el micelio de una caja Petri en 6 partes iguales, cada una de las cuales se fue colocando al azar en cada uno de los frascos anteriores. Los frascos se incubaron horizontalmente a 27°C, además se incluyó una bandeja con agua para conservar la humedad en el interior de la incubadora.

2.2.4. Pruebas de toxicidad de las muestras.

Considerando la complejidad fisicoquímica y biológica que constituye el efluente de tintorería textil, se procedió a evaluar cualitativamente la posible toxicidad que pueden presentar las muestras en perjuicio del crecimiento y desarrollo fúngico.

Se prepararon 120,0 mL de agar PDA los cuales fueron distribuidos en 6 cajas Petri para, posteriormente, agregar a cada una de éstas 8,0 mL de muestra. Una vez solidificado el medio se inocularon dos cajas con micelio desarrollado en agar, las siguientes con micelio desarrollado en los dos sustratos lignocelulósicos, dos por cada uno. En todo momento se conservaron condiciones asépticas. Se incubaron todas las cajas a 27°C en sentido invertido.

Se midieron tanto el crecimiento radial del micelio como el halo de decoloración, ambos a partir del segundo día.

2.2.5. Comportamiento frente a suplementos.

De la diversidad de promotores del metabolismo enzimático sugeridos por la bibliografía consultada, se tomaron 3 para observar cualitativamente su efecto en las muestras obtenidas.

A 6 cajas tripetri se colocaron 2,0 mL de muestra y 5,0 mL de agar PDA en cada uno de los espacios disponibles. Dos cajas se suplementaron con alcohol bencílico (2,0 mmol/L), otras dos con ácido tartárico (0,1 mol/L) y las restantes con peróxido de hidrógeno (4 mmol/L); únicamente en dos de los espacios, quedando el tercero como blanco.

En todos los casos el espacio testigo y uno de los espacios suplementados se inoculó con micelio proveniente de agar PDA, mientras que el otro espacio suplementado se inoculó con micelio proveniente del sustrato de trigo o sustrato de cebada, uno en cada repetición.

Se incubaron todas las cajas invertidas a una temperatura de 27°C, se midieron el crecimiento radial miceliar y el halo de degradación a partir del tercer día.

2.2.6. Preparación del baño de efluente.

A razón de recrear, de la manera más real posible, las condiciones de acumulación de descargas, se preparó un baño de efluente conformado por una mezcla homogénea de cada una de las muestras recolectadas.

De acuerdo a la bibliografía consultada, la concentración ideal para una adecuada evaluación de la decoloración es del 40%, la cual no resulta en una inhibición del crecimiento fúngico, se prepararon todas las diluciones bajo este criterio.

2.2.7. Fermentación en medio líquido.

Para la evaluación de la eficacia del hongo *P. chrysosporium*, se prepararon las unidades experimentales con un volumen individual final de baño de efluente de 100 mL, constituyéndose la base para el cálculo de los suplementos. En todos los casos, las mediciones de las cantidades de masa se llevaron a cabo en balanzas analíticas de sensibilidad mayor o igual a 0.01 gramos.

En un medio completamente aséptico, se inocularon los matraces con el micelio procedente del sustrato lignocelulósico o de cajas de agar PDA de acuerdo al diseño experimental propuesto.

Para la aireación fue acondicionada una pequeña bomba de oxigenación de peceras capaz de suministrar un flujo volumétrico de 2 L/min, conducida a través de mangueras plásticas transparentes asépticamente limpiadas y ensambladas.

Se denominó "A" al medio compuesto por Glucosa, Amonio tartrato y Tween 80. El medio "B" contenía Glicerol, Amonio tartrato y Tween 80. El medio "C" estuvo conformado por Alcohol bencílico, Ácido tartárico, Peróxido de hidrógeno. Los suplementos utilizados fueron Lignina (Lig), Almidón (Alm), Sulfato manganoso (Sum). Cuando el micelio provenía de sustrato lignocelulósico se registró como S.L., y si su procedencia era de medio PDA fue registrado como tal.

Tabla 2-2: Descripción de los tratamientos aplicados.

Denominación	Medio	Suplementos	Micelio
Tratamiento 1	A	Lig	S.L.
Tratamiento 2	A	Lig + Sum	S.L.
Tratamiento 3	A	Alm + Sum	S.L.
Tratamiento 4	A	Alm	S.L.
Tratamiento 5	B	Lig	S.L.
Tratamiento 6	B	Lig + Sum	S.L.
Tratamiento 7	B	Alm + Sum	S.L.
Tratamiento 8	B	Alm	S.L.
Tratamiento 9	Ninguno	Lig	S.L.
Tratamiento 10	Ninguno	Lig + Sum	S.L.
Tratamiento 11	Ninguno	Alm + Sum	S.L.
Tratamiento 12	Ninguno	Alm	S.L.
Tratamiento 13	Ninguno	Ninguno	S.L.
Tratamiento 14	A	Ninguno	S.L.
Tratamiento 15	B	Ninguno	S.L.
Tratamiento 16	C	Ninguno	S.L.
Tratamiento 17	A	Ninguno	PDA
Tratamiento 18	B	Ninguno	PDA
Tratamiento 19	C	Ninguno	PDA

Elaborado por: Ángel Vallejo Cuzco, 2016.

2.3. Evaluación de la decoloración.

2.3.1. Presencia de Grupos Azo y Color.

Periódicamente, mediante instrumental estéril, se tomaron alícuotas de cada uno de los tratamientos. Las alícuotas fueron diluidas con agua destilada hasta alcanzar concentraciones acordes a la sensibilidad de los instrumentos de medición.

Para reducir la posible interferencia por sólidos en suspensión, la muestra a medir fue sometida a filtración a través de una membrana de papel. A continuación se expuso a medición en el instrumento óptico correspondiente, espectrofotómetro UV/VIS para los grupos azo a 350 nm y Fotómetro para el color verdadero a 465 nm.

2.3.2. Cambio en el contenido de color

Para cada tratamiento se ejecutó un análisis de varianza ANOVA de un factor, determinando así si el cambio existente en el color tenía o no un carácter significativo, de acuerdo a las hipótesis establecidas para este estudio.

El porcentaje de decoloración estuvo dado por la siguiente expresión matemática:

$$\%C_c = \frac{\text{Color inicial} - \text{color observado}}{\text{color inicial}} \times 100$$

2.3.3. Cambio en el contenido de grupos azo

Considerando que la absorbancia está directamente relacionada con la cantidad de grupos azo presentes en la muestra, pero que no todos los colorantes aplicados podrían tener naturaleza azoica, se calculó la diferencia matemática entre los valores de absorbancia al iniciar y al finalizar el tratamiento aplicado a la unidad experimental.

$$\%C_a = \frac{\text{Absorbancia inicial} - \text{absorbancia observada}}{\text{absorbancia inicial}} \times 100$$

CAPÍTULO III.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Caracterización fisicoquímica del efluente.

3.1.1. *Obtención de la muestra.*

Las muestras del efluente fueron obtenidas de una empresa tintorera familiar ubicada en la Parroquia La Providencia del Cantón Guano cuyas coordenadas son: -1.561723, -78.540955 (1°33'42.2"S, 78°32'27.4"W). Su proximidad al Río Chambo, (0.81 kilómetros en línea recta) la convierte en un punto de interés en función de la descarga que se podría realizar a este cuerpo de agua.



Figura 1-3: Ubicación geográfica del lugar de toma de muestra.

Fuente: Google Earth. DATUM: UTM WGS84 17S.

Se realizó el muestreo compuesto del efluente una vez finalizado el lote semanal de teñido conformado principalmente por 2 gamas de color: azules (morado, azul y negro) y rojos (lacre claro, café, lacre oscuro y rojo). Recolectar la muestra al finalizar la aplicación del colorante más oscuro aseguró una reproducción lo más cercana posible a condiciones reales de color a las cuales se enfrentaría el organismo fúngico en los ensayos.



Figura 2-3: Proceso de teñido para gama de rojos.

Realizado por: Ángel Vallejo Cuzco, 2016.

En la figura anterior se puede apreciar el momento en el cual se han depositado los filamentos de lana sobre el recipiente que contiene al baño de tintura de gama roja. Así mismo es notable que el proceso se desarrolla en condiciones de calor que elevan la temperatura de la solución coloreada para que su aplicación sea efectiva.



Figura 3-3: Recolección de muestra.

Realizado por: Ángel Vallejo Cuzco, 2016.

En la figura que precede, se observa el momento en el cual la muestra compuesta recolectada se dispone en un frasco de vidrio color ámbar para su traslado al laboratorio de Calidad del Agua de la Facultad de Ciencias de la ESPOCH para su análisis previo registro en la Cadena de Custodia anexa al presente documento.

3.1.2. *Análisis Físicos.*

3.1.2.1. *Mediciones in situ*

Una vez obtenida la muestra, se procedió a la toma de mediciones *in situ* de los parámetros que los equipos disponibles permitieron (Temperatura y pH).



Figura 4-3: Medición de pH in situ.

Realizado por: Ángel Vallejo Cuzco, 2016.

La Figura 4-3 muestra el momento en el cual se procede a tomar lectura del nivel de pH alcanzado por una de las muestras recolectadas. La lectura *in situ* es realizada mediante papel indicador de

pH. La parte inferior del papel se encuentra coloreada por la solución de tintorería, sin embargo al ascender por la columna ya se puede distinguir el color asociado el valor de pH correspondiente.

Tabla 1-3: Resultados de las mediciones *in situ* del efluente del proceso de teñido.

Parámetro	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
pH	7	7	7
Temperatura (°C)	72	69	70

Realizado por: Ángel Vallejo Cuzco, 2016.

De la observación de la tabla anterior (Tabla 1-3) se puede asegurar que el valor de pH es constante y se mantiene en la neutralidad entre las 3 muestras compuestas recolectadas. Así, al aplicarse un tratamiento fúngico por lotes al efluente, cada carga que reciba el biorreactor no modificaría el valor del pH del mismo. Por su parte, la temperatura exhibe cierto grado de variabilidad la cual no es considerable. Cada uno de estos parámetros se discuten en las correspondientes secciones subsiguientes.

Del pH *in situ*.

Como se reporta en la Tabla 1-3, los valores de pH exhiben una tendencia a la neutralidad, por tanto ni el ácido cítrico aplicado para mejorar la fijación del color (acidez) ni los colorantes (basicidad) adicionados al baño de tinte alterarían la concentración de iones hidrógeno en el efluente pudiéndose considerar la aplicación directa de los tratamientos; inclusive si el pH se mantiene en un rango ácido, Kapdan et al (2000: pp.381-387) aseguran que la producción de enzimas se verá beneficiada incrementando la actividad enzimática, lo que se evidencia, consecuentemente, por una mayor y más rápida decoloración del efluente.

En tanto que Arora y Gill (2001: pp.602-6045), encontraron que trabajando a pH de 4.5, cuando emplearon glucosa y tartrato de amonio como fuentes de carbono y nitrógeno respectivamente, se mejoró la actividad enzimática (LiP: 2.4 U/mL). Por su parte, Fujian et al. (2001: pp.149-151), demuestran que trabajando a un pH de 5.5, la actividad enzimática es muy semejante (LiP: 2.6 U/mL). Sin embargo, cuando los valores de pH fueron menores que 3 y mayores que 7, la eficiencia en la biodecoloración no se muestra significativamente afectada (Senthilkumar et al., 2011: pp. 845-853).

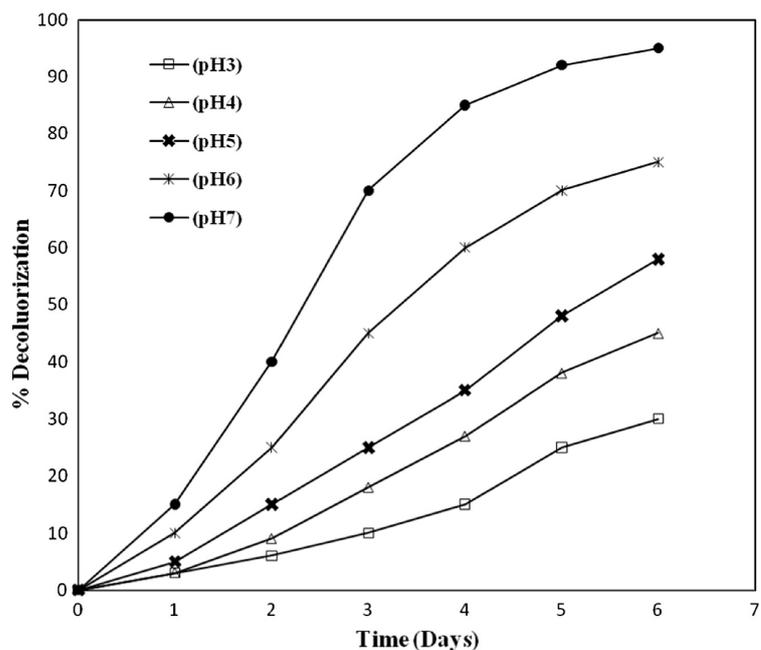


Figura 5-3. Efecto del pH del baño de efluente sobre la tasa de decoloración usando *P. chrysosporium*.

Fuente: (Senthilkumar et al., 2011)

En la figura anterior Senthilkumar et al. muestran que existe un efecto del pH sobre el porcentaje de decoloración. Por tanto, al aplicar esta consideración en nuestro estudio, manteniendo un pH alrededor de 7, sería de esperar un porcentaje de decoloración cercano al 100% al cabo de 6 días de aplicado el tratamietno.

De la temperatura *in situ*

La alta temperatura a la que se encuentra cada muestra del efluente: 72, 69 y 70°C, respectivamente, constituye un factor negativo capaz de desnaturalizar las enzimas producidas por el organismo fúngico, responsables de la degradación. En contraste, las altas temperaturas que alcanza el agua de tinte podrían reducir la posible presencia microbiana y por tanto la competencia ante la cual se vería expuesto el hongo.

En un reciente estudio, Liu et al. (2006: pp.81-86) utilizan el sistema HRP/H₂O₂ para decolorar bromofenol y naranja de metilo, obteniendo una reducción simultánea de la eficiencia en la decoloración cercana al 50% al elevar la temperatura desde los 50 hasta los 80°C.

La temperatura óptima para que la mayoría de los hongos de la pudrición blanca tengan un crecimiento óptimo, desarrollen adecuadamente su actividad lignolítica y puedan decolorar, se encuentra dentro de los 25 – 37°C (Asgher et al., 2007: pp.311-316). La afirmación que precede concuerda con los resultados obtenidos en las condiciones de trabajo en la presente investigación.

3.1.2.2. Análisis en laboratorio.

Tabla 2-3: Resultados de la caracterización fisicoquímica y microbiológica de la muestra de efluente del proceso de teñido.

Parámetro	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3
pH	7,66	7,94	7,85
Temperatura (°C)	16,16	19,53	19,33
Conductividad (ms/cm)	15,67	13,11	2,37
Sólidos Disueltos (g/L)	8,30	7,13	1,26
Sólidos Suspendidos (mg/L)	453,33	446,67	123,00
Nitrógeno Orgánico Total (mg/L)	141,53	14,33	14,33
Color (PtCo)	81200	5470	4383,33
DBO5 (mg/L)	853,33	646,67	543,33
DQO (mg/L)	3246,66	1453,33	1543,33
Cobre (mg/L)	<0,03	<0,03	<0,03
Cromo VI (mg/L)	<0,01	<0,01	<0,01
Heterótrofos totales (UFC/100 mL)	68000	69000	68000

Realizado por: Ángel Vallejo Cuzco, 2016.

En la tabla anterior se han resumido los valores obtenidos para cada uno de los parámetros considerados en la caracterización inicial en cada una de las muestras evaluadas. Puesto que cada uno de los parámetros considerados ejercerá su actividad en el proceso global, su derivación individual es discutida al detalle en las secciones subsiguientes.

Los datos obtenidos de los análisis físicos (Tabla 2-3), correspondientes a la caracterización del efluente, revelan una alta conductividad expresada en el orden de 10^{-3} , hecho que se explica por la adición de sales de sodio (NaCl) que junto al ácido cítrico, son utilizados para mejorar la retención del colorante en la fibra.

Este factor, sal, conjuntamente con el incremento de pH, anteriormente discutido, son factores que inhiben el desarrollo del micelio fúngico, reduciendo entonces la capacidad decolorativa del hongo (Banat et al., 1996: pp.217-227).

Residuos de fibra que se desprenden durante la inmersión del textil en el baño de color explican la cantidad elevada de sólidos suspendidos, a lo que nuevamente se suma el cloruro de sodio en forma de sal en grano que se añade en el proceso.

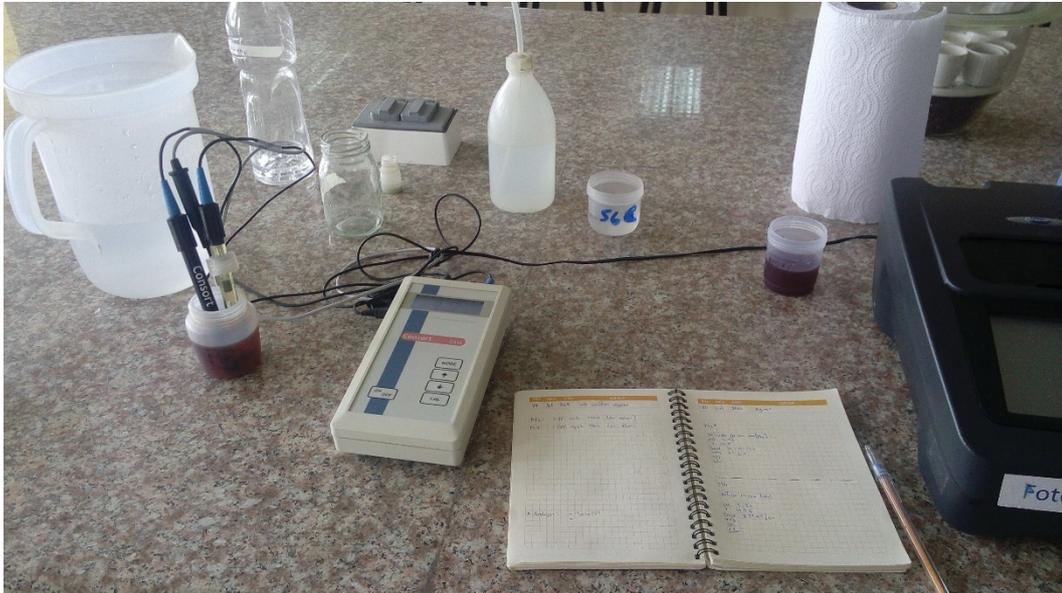


Figura 6-3: Análisis físicos mediante equipo CONSOR C562.

Realizado por: Ángel Vallejo Cuzco, 2016.

3.1.3. Análisis Químicos.

Los resultados de los análisis químicos (Tabla 2-3) demuestran que el aporte de nitrógeno orgánico de la primera muestra es elevado, 141.53 mg/L, mientras que para las otras muestras se tienen valores medios de 14.33 mg/L, debido a que para el tinturado del lote correspondiente a la primera muestra se utilizaron hojas y frutos del árbol de nogal (*Juglans neotropica*).

Fenn y Kirk (1981: pp.59-65) en su trabajo concluyen que la limitación de nitrógeno es importante para inducir la actividad enzimática (LDP's) de *Phanerochaete chrysosporium*; así como reducir el tiempo durante el cual las enzimas empiezan a actuar (Tien y Kirk, 1984: pp.2280-2284).

Considerando la posibilidad de que tanto el recipiente de cobre que contiene el baño de tintura como alguno de los colorantes utilizados, aporten cantidades de Cobre o Cromo respectivamente, se analizó su contenido resultando en cantidades debajo del límite de detección del método (Cu: 0.04 – 5.00 mg Cu/L; Cr: 0.01 – 0.06 mg Cr⁶⁺/L).



Figura 7-3: Preparación de muestras para el análisis DBO de acuerdo al método HACH 8043.

Realizado por: Ángel Vallejo Cuzco, 2016.

En función de los resultados resultantes de la DQO analizada, se podría hacer la consideración de que los valores obtenidos reflejan el proceso de oxidación propio de la determinación.

3.1.4. Análisis Microbiológicos

En cuanto a los análisis microbiológicos, citados en la tabla 2-3, se aprecia la presencia de heterótrofos totales que no ejercieron mayor interferencia durante la realización de la investigación, solamente en el 2% de la totalidad de las placas agar PDA preparadas se apreció el crecimiento de levaduras que no inhibieron el desarrollo miceliar normal del hongo *Phanerochaete chrysosporium*.

3.2. Uso del hongo *P. chrysosporium*.

3.2.1. Pruebas de toxicidad de la muestra.

Tabla 3-3: Desarrollo radial, en centímetros, del micelio fúngico y halo de decoloración sobre medio sólido de agar PDA suplementado con un volumen constante de muestra.

Día	MC				MT				MP			
	Rojos		Negros		Rojos		Negros		Rojos		Negros	
	CR	HD	CR	HD	CR	HD	CR	HD	CR	HD	CR	HD
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0,2	0	0,2	0	0,3	0	0,4	0	0	0	0	0
5	0,5	0,5	0,6	0,4	0,8	0,5	1,2	0,6	0	0	0	0
6	3,0	2,0	2,5	2,0	1,2	1,0	1,4	1,0	0	0	0	0
10	8,0	4,5	8,0	5,0	4,5	3,0	4,2	3,8	0	0	0	0
11	8,0	5,1	8,0	5,0	4,8	4,2	4,6	4,0	0	0	0	0
12	8,0	5,9	8,0	5,2	5,0	4,6	4,8	4,2	0	0	0	0
16	8,0	6,0	8,0	6,1	5,9	5,1	5,9	4,5	0	0	0	0
17	8,0	7,8	8,0	6,5	6,5	6,2	6,2	5,9	0	0	0	0

MC: Micelio desarrollado en cebada, **MT:** Micelio desarrollado en trigo, **MP:** Micelio desarrollado en agar PDA. **CR:** Crecimiento radial **HD:** Halo de decoloración.

Realizado por: Ángel Vallejo Cuzco, 2016.

La diversidad de colorantes utilizados en el teñido de cada gama hizo deseable el análisis de cada uno de ellas, razón por la cual en la Tabla 3-3 correspondiente a los de resultados de las Pruebas de Toxicidad se aprecia los encabezados “Rojos” y “Negros”.

Los micelios desarrollados en sustratos lignocelulósicos pudieron crecer en el medio con efluente, mientras que los micelios que previamente crecieron en agar PDA no lograron colonizar las placas, en concordancia con la información bibliográfica, esto significa que una vez que el hongo se ha adaptado a crecer en presencia de lignina, estaría generando mayor cantidad de enzimas (Villa y Espín, 2010: p.72); y dado que la lignina constituye una fuente secundaria de energía, requiere de un metabolito secundario (LiP) para su aprovechamiento (Kerem et al., 1992: pp- 2232-1127).

Además, los micelios que fueron extraídos de cebada lograron un crecimiento más rápido que aquellos extraídos de trigo; sin embargo, cuando se inocularon los sustratos lignocelulósicos, el micelio colonizó de manera más rápida y abundante el trigo. Duarte (2004: pp61-65) sostiene que el sustrato cebada presenta un contenido de proteína mayor, permitiendo una mayor generación de biomasa fúngica

Por otro lado, la dextrosa, cumple satisfactoriamente su papel de fuente de carbono principal para la obtención de energía; así mismo el almidón de papa propio de la formulación del medio agar PDA, podría estar promoviendo la generación de enzimas lignolíticas responsables de la generación del halo decolorativo observado en las placas Petri.

Se estudió el desarrollo radial del micelio fúngico y el halo de decoloración (en centímetros) sobre medio sólido de agar PDA, mismo que fue suplementado con un volumen constante de muestra. De estas consideraciones se puede evidenciar que la muestra no presenta un efecto inhibitorio sobre el crecimiento y desarrollo del microorganismo.

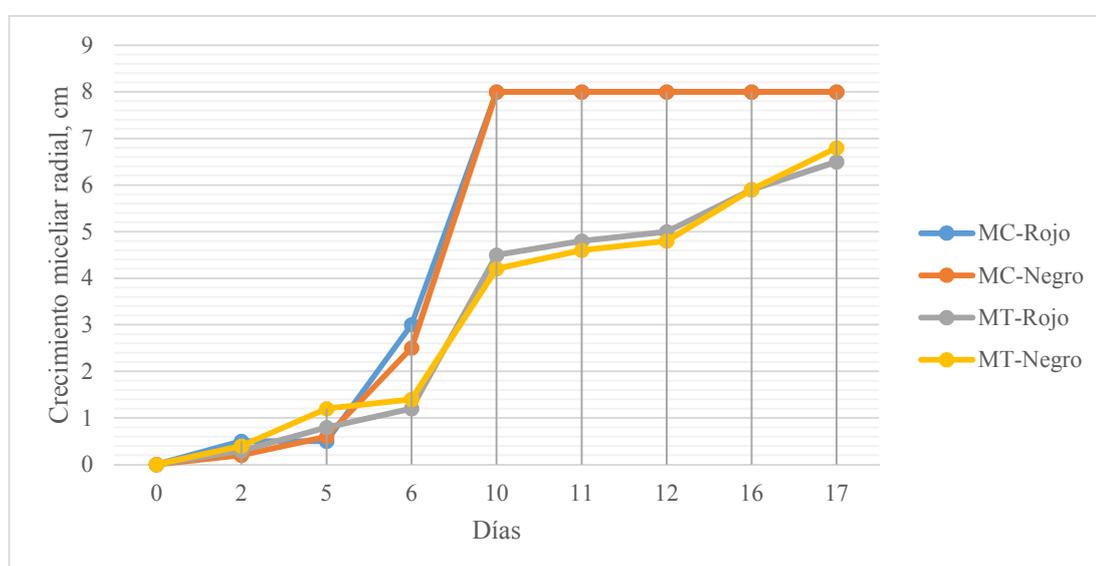


Gráfico 1-3: Crecimiento radial de *Phanerochaete chrysosporium* inoculados en cajas Petri con PDA + efluente al 40%.

Realizado por: Ángel Vallejo Cuzco, 2016.

En el gráfico que precede, se puede apreciar la diferencia existente en el crecimiento radial del mismo hongo con un desarrollo previo en dos sustratos lignocelulósicos diferentes. Los micelios extraídos de cebada exhiben un crecimiento muy rápido a partir del 6to día de inoculación hasta colonizar toda la superficie de la placa de agar. Se puede afirmar que no existe influencia representativa del tipo de colorantes sobre el crecimiento micelial.

El halo de decoloración generado, guarda una estrecha relación con el desarrollo micelial. Los micelios desarrollados en S.L. cebada generaron halos de decoloración mayores que los generados por los micelios del S.L. trigo. Adicionalmente, la aparición del halo de decoloración (interpretado

como oxidación del cromóforo del colorante) de los micelios de trigo es menor respecto a los de cebada, hecho posiblemente atribuible a la pronta actividad lignolítica generada por la composición química del sustrato.

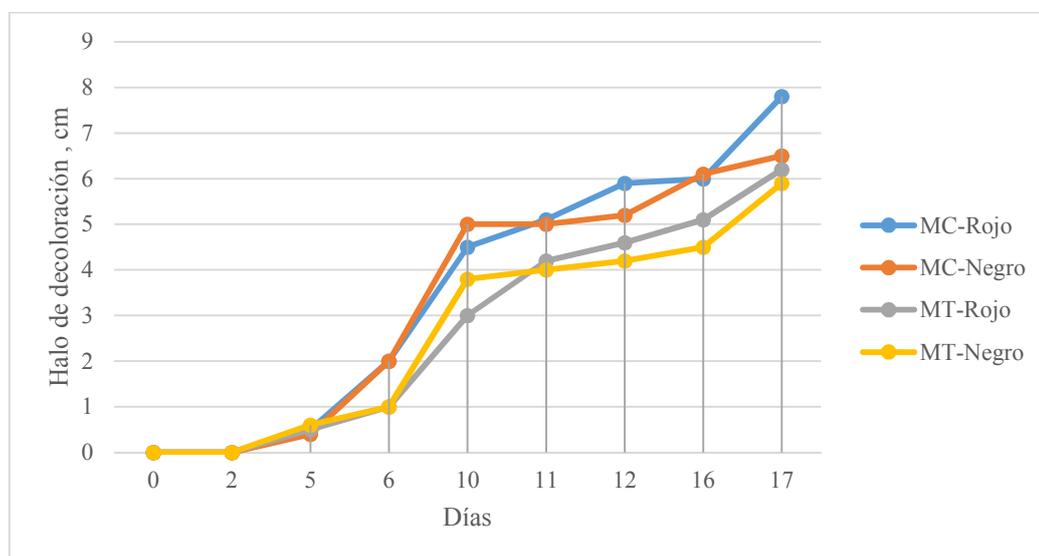


Gráfico 2-3: Halo de decoloración generado por *Phanerochaete chrysosporium* mediante fermentación en estado sólido sobre agar PDA + efluente al 40%.

Realizado por: Ángel Vallejo Cuzco, 2016.

3.2.2. Comportamiento frente a suplementos.

De la evaluación cualitativa del comportamiento fúngico frente a la adición de suplementos, se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 5-3. El alcohol bencílico no pudo ser degradado por el micelio extraído de agar PDA, la complejidad de la estructura química y la alta estabilidad que le proporciona la presencia del núcleo bencénico al compuesto, demanda la activación de un sistema de producción de enzimas de mayor complejidad.

Por su parte, el ácido tartárico no posee un anillo aromático, por tanto al exponer los micelios, éstos no exhiben dificultad al desarrollarse, sin embargo, se puede notar que el micelio extraído de cebada coloniza el medio de manera más rápida que los demás.

Respecto a la exposición al peróxido de hidrógeno, en la cual a partir del día 6 el micelio extraído de cebada muestra una aceleración en su desarrollo. Odier y Artaud (1992; citados por Singh y Chen, 2008) sostienen que la LiP es más sensible al exceso de peróxido de hidrógeno que la MnP. En consecuencia, cualquier sobre dosificación podría dar paso a la inhibición de la enzima.

Tabla 4-3: Resultados de la medición del crecimiento miceliar radial y el halo decolorativo, en centímetros, durante la exposición a diversos suplementos.

Día	Alcohol Bencílico								Ácido Tartárico								Peróxido de Hidrógeno							
	B		MP		MT		MC		B		MP		MT		MC		B		MP		MT		MC	
	CR	HD	CR	HD	CR	HD	CR	HD	CR	HD	CR	HD	CR	HD	CR	HD	CR	HD	CR	HD	CR	HD	CR	HD
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0,3	0	0,2	0,2	0,2	0	0	0,2	0,2	0,2	0,3	0	0	0,3	0,4	0,1	0,4	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2
4	0,2	0,5	0,1	0,3	1,1	1,3	0	0	1,6	1,7	1,1	1,9	0,3	0,6	1,4	2,5	0,7	1,4	1,3	1,4	1,1	1,1	1,6	1,5
5	0,2	0,8	0,1	0,3	1,2	1,4	0	0	1,7	2,1	1,5	2,0	0,8	1,1	1,4	2,5	1,0	1,2	1,4	1,6	1,3	1,4	1,9	2,1
6	0,2	1,0	0,1	0,3	1,4	1,6	0	0	1,7	2,2	1,9	2,2	0,9	1,2	1,9	2,8	1,3	1,3	1,5	1,8	1,6	1,9	2,2	2,5
10	1,6	2,5	0,1	0,3	2,6	3,3	0	0	4,0	3,2	3,0	2,6	2,5	2,4	4,4	4,0	3,3	2,9	3,7	3,1	4,2	3,6	4,5	5,1
11	2,4	3,1	0,1	0,3	2,9	3,5	0	0	4,1	4,4	3,5	3,8	2,5	2,5	4,6	4,3	3,4	2,9	3,7	3,4	4,5	3,8	5,3	5,5

B: Blanco, sin adición del suplemento, **MC:** Micelio desarrollado en cebada, **MT:** Micelio desarrollado en trigo, **MP:** Micelio desarrollado en agar PDA, **CR:** Crecimiento radial, **HD:** Halo de decoloración.

Realizado por: Ángel Vallejo Cuzco, 2016.

3.3. Evaluación de la decoloración.

Con el objetivo de explorar el potencial decolorador del hongo *Phanerochaete chrysosporium*, muestras reales de efluente de tintorería fueron evaluadas mediante la adición de diferentes fuentes de carbono y suplementadas con agentes potenciadores de expresión enzimática según se describe en la Tabla 2-2.

Investigaciones previas realizadas por Koyani et al., (2013: pp.1-9) y Senthilkumar et al. (2001: pp.845-853) reportan la existencia de los efectos: concentración del efluente, tipo y concentración de la fuente de carbono, las concentraciones de manganeso y nitrógeno, la adición de lignina y almidón, entre otros, sobre la decoloración llevada a cabo por *Phanerochaete chrysosporium*, cuya manipulación beneficia globalmente el proceso.

Tabla 5-3: Resultados de color, contenido de grupos azoicos, análisis ANOVA y porcentaje de decoloración (%D) obtenidos con la aplicación de cada tratamiento.

Tratamiento	Color (Pt-Co)		% D	Absorbancia		% D
	Inicial	Final		Inicial	Final	
Blanco	10380	10350 ^{NS}	0,29	0,985	0,985 ^{NS}	0
T1	10380	4117 ^{***}	60,34	0,985	0,256 ^{***}	74,01
T2	10380	8953 ^{***}	13,75	0,985	0,262 ^{***}	73,37
T3	10380	9693 ^{***}	6,62	0,985	0,247 ^{***}	74,96
T4	10380	3737 ^{***}	64,00	0,985	0,214 ^{***}	78,27
T5	10380	9827 ^{***}	5,33	0,985	0,268 ^{***}	72,83
T6	10380	9967 ^{NS}	32,88	0,985	0,275 ^{***}	72,08
T7	10380	4953 ^{***}	52,28	0,985	0,269 ^{***}	72,69
T8	10380	4917 ^{***}	52,63	0,985	0,269 ^{***}	72,72
T9	10380	2970 ^{***}	71,39	0,985	0,232 ^{***}	76,48
T10	10380	6280 ^{***}	39,50	0,985	0,231 ^{***}	76,51
T11	10380	2497 ^{***}	75,94	0,985	0,269 ^{***}	72,69
T12	10380	2577 ^{***}	75,17	0,985	0,141 ^{***}	85,72
T13	10380	3403 ^{***}	67,22	0,985	0,322 ^{***}	67,31
T14	10380	3290 ^{***}	68,30	0,985	0,312 ^{***}	68,32
T15	10380	4101 ^{***}	60,49	0,985	0,389 ^{***}	60,51
T16	10380	995 ^{***}	90,41	0,985	0,094 ^{***}	90,46
T17	10380	7283 ^{***}	29,84	0,985	0,048 ^{***}	95,13
T18	10380	4950 ^{***}	52,31	0,985	0,037 ^{***}	96,24
T19	10380	6417 ^{***}	38,18	0,985	0,047 ^{***}	95,23

NS: No significativo, *** significativo a P<0.001.

Realizado por: Ángel Gabriel Vallejo, 2016.

En la Tabla 5-3 se resumen los resultados obtenidos para cada uno de los tratamientos aplicados. Nótese que el Tratamiento T3 exhibe el menor porcentaje de decoloración, mientras que el Tratamiento T16 ha logrado alcanzar un porcentaje de decoloración superior al 90%, esta diferencia radica en las condiciones que fueron dadas a cada uno de ellos. A continuación se discute cómo ha influido cada una de estas condiciones para arrojar estos resultados.

3.3.1. Concentración del baño de efluente.

La concentración del efluente juega un papel muy importante en el proceso, Kadapan et al (2000: pp.381-387) argumentan en su estudio que una alta concentración de efluente puede ser tóxica para el crecimiento fúngico, consecuentemente teniendo un efecto adverso en la eficiencia decolorativa que exhibe el hongo. Con este antecedente se recurrió a la bibliografía disponible para seleccionar aquella que mejores resultados arrojó.

Senthilkumar et al., (2011: pp.845-853) concluyeron que el crecimiento de la biomasa fúngica se reduce con el incremento de la concentración del baño de efluente; consecuentemente, la tasa de decoloración decrece con el incremento de la concentración desde el 20% al 100%. De manera específica, el estudio revela que concentraciones entre el 20% y el 60% de efluente generan decoloraciones entre el 50% y el 60%.

Por su parte, Koyani et al., (2013: pp. 1-9), en su estudio sostienen que la concentración más apropiada se encuentra en los 10 mg/L para lograr una decoloración considerable al cabo de 11 días tanto para cultivos sólidos como líquidos; señalan además que concentraciones mayores (50, 100, 250 y 500 mg/L) infieren en el tiempo requerido para completar el proceso decolorativo, mas no sobre el crecimiento miceliar.

A partir de ello, para este estudio, se seleccionó el valor medio de concentración (40%) el cual no representa un valor considerablemente elevado de dilución el cual no dificulte la lectura en los equipos ópticos y permita un control en el uso de agua de dilución en el caso de un posible escalamiento a nivel industrial.

3.3.2. Medios nutritivos

Respecto a la fuente de glucosa, se seleccionaron 3 tipos diferentes en cada uno de los medios en las concentraciones que se citan a continuación. En relación a la fuente de nitrógeno, solamente se modificó su concentración. Los medios citados se seleccionaron de acuerdo a los criterios de

disponibilidad de reactivos, accesibilidad a las condiciones de aplicación y actividad enzimática reportada.

3.3.2.1. Medio A

El primer medio (A) fue utilizado por Kihayami et al. (2006: pp: 1693-1698), sus componentes mayoritarios son Glucosa al 2%, Tartrato de amonio al 0,022% y Tween 80 al 0.1%; la aplicación de estos componentes reporta la generación de una actividad enzimática de 0,05 y 0,063 U/mL para la LiP y MnP respectivamente.

De acuerdo a la Tabla 2-2, el Medio de cultivo A fue utilizado en los tratamientos T1, T2, T3, T4, T14 y T17 para los cuales se obtuvieron porcentajes de reducción de color del 60.34, 13.75, 6.62, 64.00, 68.30 y 29.84; mientras que la reducción en grupos azo fue del 74.01, 73.37, 74.96, 78.27, 68.32 y 95.13 respectivamente.

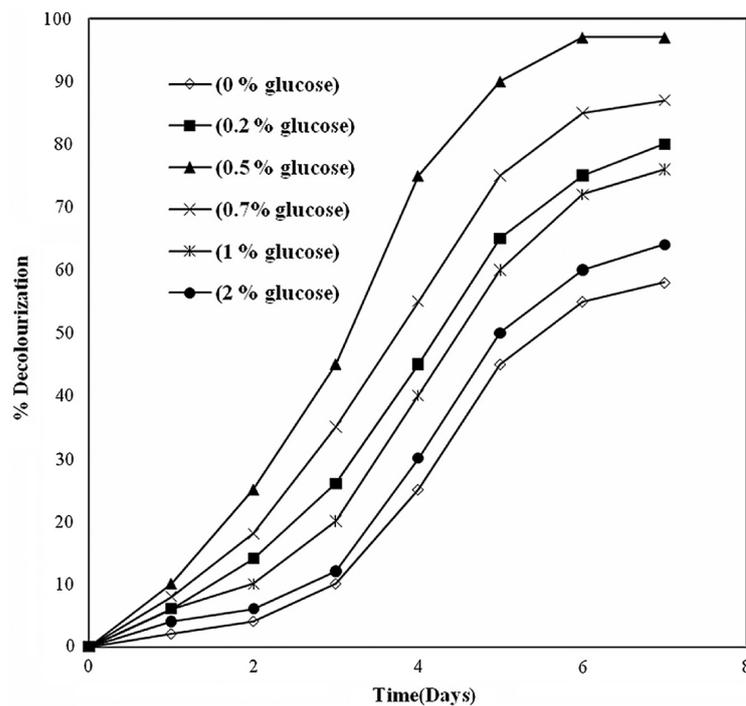


Figura 8-3: Efecto de la glucosa sobre la tasa de decoloración del baño de efluente utilizando *P. chrysosporium*.

Fuente: (Senthilkumar et al., 2011)

Los valores obtenidos para el porcentaje de decoloración, en general, se encuentran en concordancia con el estudio realizado por Senthilkumar et al., (2011: pp.845-853), respecto a la fuente de carbono, cuando al utilizar glucosa al 2% el porcentaje de decoloración a los 6 días alcanza valores sobre el 60%. Los autores sugieren que al utilizar una concentración de glucosa del 0.5% se podría obtener un porcentaje de decoloración superior al 90%.

El efecto que está generando el exceso de glucosa puede responder a la razón de que el micelio fúngico metaboliza únicamente esta molécula cuya cantidad le basta para sobrevivir y por tanto no requiere degradar las moléculas de color, las cuales presentan mayor complejidad.

En cuanto a la fuente de nitrógeno, Pease et al. (1989: pp.13531-535) reportan que la acumulación de LiP y MnP en cultivos líquidos depende de una adecuada limitación en la cantidad de nitrógeno, cuando la glucosa es la principal fuente de carbono.

En el caso específico de la decoloración, Senthilkumar et al., (2011: pp.845-853), encontraron que si la cantidad de nitrógeno utilizado era del 0.5%, la decoloración podría alcanzar valores cercanos al 100%; contrastando con los resultados del presente estudio que utilizó el 0.022% de amonio tartrato, los valores de decoloración mostrados en la Tabla 4-3 para los tratamientos 1, 2, 3, 4, 14 y 17 serían los esperados.

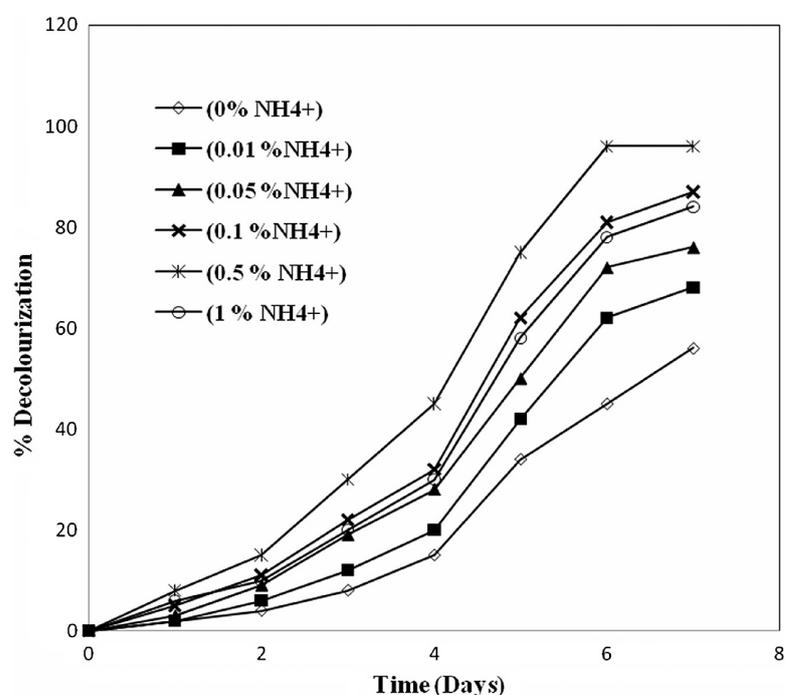


Figura 9-3: Efecto de la fuente de nitrógeno sobre la tasa de decoloración del baño de efluente utilizando *P. chrysosporium*.

Fuente: (Senthilkumar, Perumalsamy, & Janardhana Prabhu, 2011)

Dado que los tratamientos T1, T2, T3 y T4 contienen suplementos adicionales, su discusión se tratará en cada apartado correspondiente al suplemento adicionado.

En cuanto a los tratamientos T14 y T17, de la información que muestra la Tabla 4-3 se puede apreciar una clara diferencia entre los valores del porcentaje de decoloración obtenido de éstos dos. El T14 posee un porcentaje mayor de decoloración (68.30%) frente a su homólogo (29.84%), comprobando lo expuesto en la sección 3.4. donde se menciona que una exposición previa del inóculo a un medio lignocelulósico aporta al incremento de la actividad lignoperoxidásica del hongo, cuando la fuente de carbono es glucosa.

3.3.2.2. Medio B

El medio B fue formulado por Bono et al., (1990: pp.189-193) y se compuso principalmente de Glicerol, Tartrato de amonio y Tween 80 en porcentajes del 0.5%, 0.184% y 0.1% respectivamente, requiere una agitación cercana a las 60 rpm con suministro de oxígeno. La actividad enzimática reportada por la bibliografía es de 12 - 13.9 U/mg y de 144 U/mg para la enzimas lignino peroxidasa y manganeso peroxidasa respectivamente.

Los tratamientos que recibieron estos medios, de acuerdo a la Tabla 2-2 fueron T5, T6, T7, T8, T15 y T18 obteniendo reducciones de color del 5.33, 32.88, 52.28, 52.63, 60.49 y 52.31%, así como reducciones de grupos azo del 72.83, 72.08, 72.69, 72.72, 60.51 y 96.24%, respectivamente.

Sin embargo, los tratamientos T5, T6, T7, T8 no serán discutidos en esta sección puesto que la adición de suplementos les merece una discusión más detallada, misma que se ofrece en las subsiguientes secciones correspondientes.

En comparación a los resultados obtenidos en la sección anterior, sin adición de suplementos: cuando el micelio proviene de un medio lignocelulósico, el porcentaje de decoloración resulta ser 7.81% menor; mientras que si el micelio proviene de un medio no lignocelulósico el porcentaje de decoloración con glicerol es significativamente mayor con un 22.47%.

Singh y Chen, (2008: pp.399-417) mencionan que este hecho puede deberse a que el *P. chrysosporium* tiene afinidad por el glicerol para secretar gran cantidad de LDPs en presencia de inductores, o que el glicerol preserva a las enzimas de ser mecánicamente inactivadas. Por tanto, esta fuente de carbono estaría reduciendo la actividad de las enzimas al ser liberadas en el medio y consecuentemente reduciendo la eficacia del hongo en el proceso.

La cantidad de nitrógeno que ha sido añadida para este medio es evidentemente mayor a la utilizada en el medio A, comparando esta información con la figura (Figura 9-3) es de esperarse que el experimento en general arroje porcentajes de decoloración mayores, superiores al 80%. Sin embargo la limitación de la fuente de nitrógeno no siempre se relaciona con la elevada actividad lignolítica.

El tipo de cepa también juega un rol en el proceso, de acuerdo con Faison & Kirk, (citados en Buswell et al., 1984) encontraron que la cepa de *P. chrysosporium* INA-12 es capaz de generar niveles de actividad lignolítica considerablemente mayores que la cepa ME-446, produciendo enzima en condiciones de nitrógeno no limitado.

Paralelamente, Kirk y Fenn (1982) sugieren que el desarrollo de la actividad lignolítica es el resultado de un mecanismo regulatorio basado en la fuente de nitrógeno y no en el cambio de niveles de represión del catabolismo de la glucosa. Así, Fenn y Kirk, (1981: pp.59-65) reportan escenarios de represión en cultivos incluidos el etanol y glicerol como fuentes de carbono, que no son conocidos como fuentes represoras.

Sin embargo, en sus estudios, Arst y Bailey, (1977; citados en Smith y Pateman, 1977) han demostrado que la represión de los catabolitos de nitrógeno y carbono no operan necesariamente de manera independiente.

3.3.2.3. Medio C

La dosificación del medio C se basó en el método de Tien & Kirk (1983) para la enzima LiP, con las siguientes modificaciones: 2 mmol/L de alcohol bencílico, 0.1 mol/L de tartrato de amonio y 0.1% ácido tartárico, 0.1% de Tween 80 y 4 mmol/L de Peróxido de Hidrógeno.

De acuerdo a la Tabla 2-2, el medio C fue únicamente utilizado para nutrir los tratamientos T16 y T19, los cuales lograron respectivamente los siguientes porcentajes de decoloración: 90.41% y 38.18%.

El tratamiento T16 es el que mejores resultados ha revelado frente a los demás tratamientos del presente estudio. La sustitución del alcohol veratrílico por alcohol bencílico resultó en la eliminación de la protección a la inactivación por peróxido de hidrógeno de la LiP, permitiendo que únicamente la MnP actúe en la decoloración.

Haemmerli et al., (1986: pp.6900-903), mientras evaluaban la oxidación de Benzo(a)Pireno por la LiP encontraron que la presencia de alcohol veratrílico permite proteger la LiP de la inactivación

por adición de H₂O₂. Así mismo, cualquier exceso de en la concentración de peróxido de hidrógeno puede destruir las ligninasas (LiP), probablemente porque el compuesto genera una sobre oxidación de la enzima.

Respecto a los resultados del tratamiento T19, el cual contiene los mismos elementos bajo las mismas condiciones, el resultado obtenido es menor frente a su par (T16) dado que el micelio que fue inoculado no tuvo un tratamiento lignolítico previo (Véase sección 3.4.) y, como es de esperarse, no metabolizará correctamente los nutrientes para la producción enzimática deseada.

Para todas las dosificaciones:

El uso de surfactantes, como Tween80, beneficia la producción de LDPs. (Senthilkumar, et al., 2011:845-853), al degradarse el Tween80 se liberan ácidos grasos saturados e insaturados los cuales parecen ser utilizados para la producción en enzimas lignolíticas, además de proteger estas enzimas de ser mecánicamente inactivadas.

Así mismo, el Tween80 parece actuar sobre la membrana celular transformándola y promoviendo que se faciliten el transporte de la MnP de la célula fúngica hasta el medio en el que se encuentra; sin embargo, el mecanismo del mejoramiento de la producción enzimática en los hongos filamentosos no ha sido aún establecido (Asther et al., 1987: pp.245-249).

El uso de quelantes, tales como malonato, tartrato, lactato, oxalato, succinato, entre otros, aseguran Wariishi et al. (1992: pp.23668-695), permiten retener la actividad catalítica de la MnP.

3.3.3. Suplementos adicionales

3.3.3.1. Lignina

En concordancia con la Tabla 2-2, se puede identificar que los tratamientos que fueron enriquecidos con lignina corresponden a T1, T5, y T9; los valores de decoloración resultantes para cada uno de ellos fueron de 60.34, 5.33, y 71.39%.

En ausencia de sulfato de manganeso, cuando la fuente de carbono era glucosa, la adición de lignina permitió obtener un porcentaje de decoloración del 60.34% (T1); al utilizar glicerol como fuente de carbono, solamente el 5% de decoloración pudo obtenerse (T5). Sin embargo, cuando ninguna sustancia fue utilizada como fuente de carbono, la decoloración resultante asciende al 71.39% (T9). De esta aproximación se puede observar que la fuente de carbono, antes discutida, ejerce una importante influencia sobre el metabolismo de las sustancias inductoras.

Comparando el Medio A y el Medio B con los tratamientos ausentes de medio específico se puede asegurar que los propios componentes de éstos podrían estar actuando como agentes del cambio de la ruta metabólica siempre y cuando el micelio haya crecido previamente en sustrato lignocelulósico.

Por otro lado, dado que la lignina fue suministrada en forma de filamentos alargados de madera de bambú, es de esperarse que esta presentación haya dificultado el contacto con el hongo el cual al no sentir la presencia del agente estresante no se ve obligado a iniciar la producción enzimática.

3.3.3.2. Almidón

De acuerdo a la Tabla 2-2, el almidón fue añadido en los tratamientos T4, T8 y T12. Al finalizar los ensayos, los porcentajes de degradación obtenidos fueron del 64.0, 52.63 y 75.17, como se ha registrado en la Tabla 4-3. En este experimento se han utilizado dos fuentes de carbono para cada tratamiento, el almidón se añadió en forma de polvo del procesamiento de la yuca (*Manihot esculenta*).

En cuanto al tratamiento T4, se obtiene un porcentaje de degradación muy por debajo del esperado, aunque mantiene una diferencia significativa respecto al blanco. En contraste al exceso de fuente de carbono, la fuente de nitrógeno del medio A se mantiene en los niveles necesarios para la producción enzimática requerida.

Al respecto, Kadapan et al, (2000: pp.381-387) cuando utilizaron almidón como única fuente de carbono para decolorar Azul Everezol Turquesa mediante *C. versicolor*, encontraron que los valores de absorbancia decrecen lentamente logrando una reducción del 65% a los 9 días de incubación. Además mencionan que una parte de este resultado es despreciable debido a que una parte del colorante es adsorbida en la fracción insoluble del almidón.

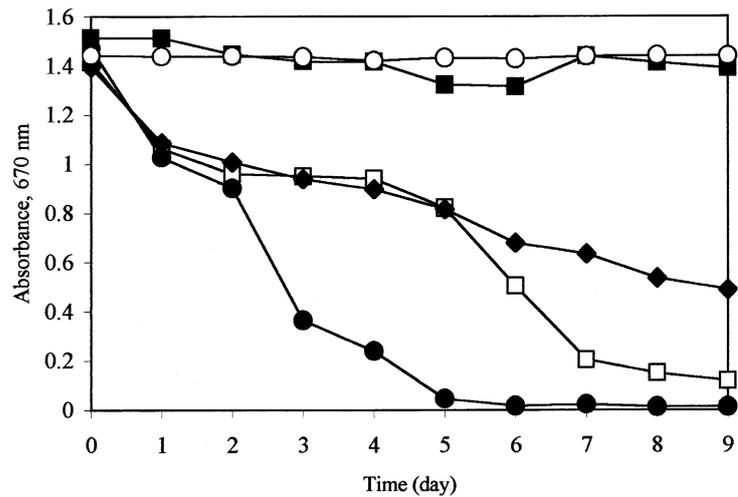


Figura 10-3. Efecto de la fuente de carbono sobre la decoloración de Azul Everzol Turquesa por *C. versicolor*. (●: glucosa; ◆: almidón; ■: molasas; □: fructosa; ○ control con glucosa)

Fuente: (Kadapan et al., 2000)

Por su parte, en la degradación de los colorantes Rojo Drimarene y Azul Drimarene, Sumathi y Manju (2000: pp. 347-355) compararon glucosa y almidón como fuentes de carbono, al cabo de 60 horas el porcentaje de degradación fue bastante similar (cercano al 100%), sin embargo, el almidón exhibe un tiempo de latencia previo al inicio de la decoloración, como puede verse en la figura que procede:

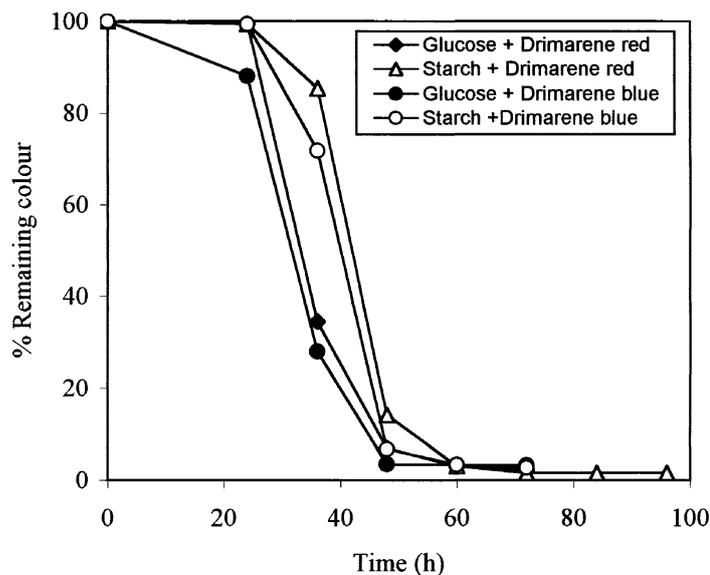


Figura 11-3: Comparación de los perfiles de decoloración del Rojo Drimarene y Azul Drimarene en presencia de glucosa y almidón.

Fuente: (Sumathi y Manju, 2000)

El Tratamiento T8 exhibe el menor de los tres experimentos que corresponden a esta sección. Como se discutió en la sección 3.6.2.2., el glicerol no permite un desarrollo adecuado del micelio fúngico, además que la cantidad de amonio tartrato como fuente de nitrógeno no tiene la suficiente limitación para inducir adecuadamente una mayor producción enzimática. Sin embargo, el tratamiento previo que ha recibido el micelio (como se discute en la sección 3.4.) permite que se obtenga un resultado que exhibe diferencia significativa respecto a su blanco.

Por su parte, el tratamiento T12 es el que mejores resultados presenta en esta categoría. La única fuente de carbono suministrada es el almidón y la cantidad de nitrógeno orgánico que muestra el análisis inicial podría estar actuando como única fuente de nitrógeno.

En soporte de lo anterior, Revankar y Lele (2007: pp.775-780) utilizaron otro hongo de la pudrición blanca, *Ganoderma sp.*, para evaluar la decoloración del amaranto. Sus fuentes de carbono fueron Fructosa, Sacarosa, Glicerol, Almidón+Glucosa, Glucosa y Almidón, para los cuales obtuvieron porcentajes de decoloración que se muestran en la Figura 12-3.

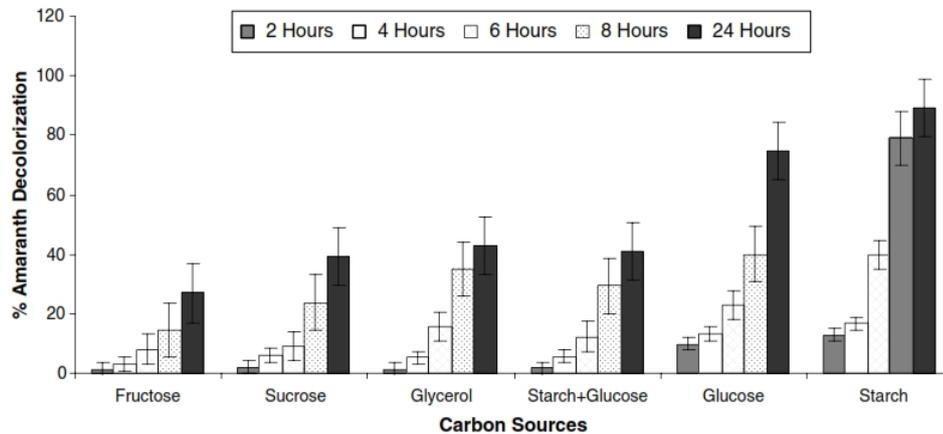


Figura 12-3. Efecto de diferentes fuentes de carbono en la decoloración del amaranto.

Fuente: (Revankar y Lele, 2007)

Como puede notarse en el gráfico que precede, de manera general, el almidón brinda el mejor nivel de decoloración (cercano al 100%); a continuación la mezcla almidón+glucosa y glicerol brindan un valor muy semejante de decoloración, mayor al 70%. Los autores sostienen que los resultados obtenidos en el mencionado estudio se deben al metabolismo productor de lacasa que cada una de estas fuentes brinda al hongo de pudrición blanca. Además apuntan que estos valores son superiores a los que *P. chrysosporium* obtendría en las mismas condiciones.

3.3.3.3. Sulfato de Manganeso ($MnSO_4$)

De acuerdo a lo expuesto en la Tabla 2-2, los tratamientos que incluyen Sulfato de Manganeso en su dosificación son aquellos identificados como T2, T3, T6, T7, T10 y T11 en combinación con lignina o almidón. Al finalizar los ensayos, los porcentajes de decoloración resultantes, en el mismo orden, fueron 13.75, 6.62, 32.88, 52.28, 39.50 y 75.94.

Los porcentajes más bajos se han obtenido cuando se utilizó glucosa como fuente de carbono (T2 y T3). En este contexto, el resultado de la combinación de sulfato de manganeso con lignina apenas logra superar el 13%.

Por su parte, la aplicación de este suplemento junto con almidón (T3) ha dado paso a una pobre decoloración (6.62%).

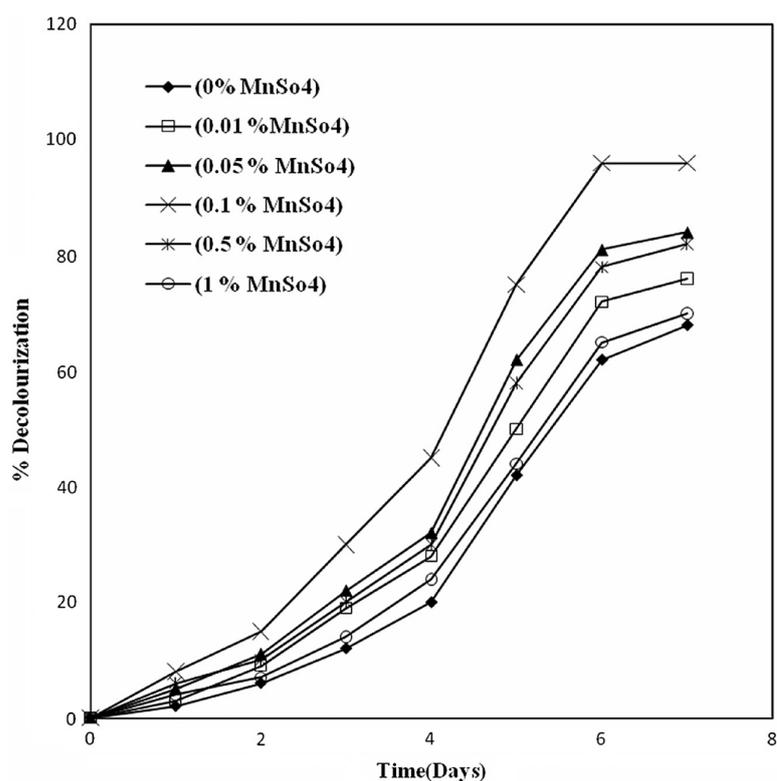


Figura 13-3: Efecto del sulfato de manganeso sobre la tasa de decoloración del baño de efluente utilizando *P. chrysosporium*.

Fuente: (Senthilkumar et al., 2011)

La producción de MnP en hongos de la pudrición blanca, se ve inducida por la adición de iones de manganeso (MnSO_4); Senthilkumar et al. (2011: pp. 845-853) concluyen en su estudio que el 0.1% de MnSO_4 es la cantidad óptima para alcanzar decoloraciones próximas al 100%; cantidad que fue adicionada en los tratamientos indicados.

Kariminiaae-Hamedani et al. (2007: 157-162) decoloraron 12 colorantes azo, diazo y antraquinónicos mediante una cepa de *P. chrysosporium* que produjo MnP, obteniendo un porcentaje del 84.9-99.6% mediante una actividad manganeso peroxidásica del 10 U/mL a los 14 días partiendo de una concentración inicial del colorante de 40 mg/L.

Ramsay y Goode (2004: pp.197-201) describen en los resultados de su estudio que en las primeras horas se lleva a cabo una decoloración del 25%, probablemente debida a la absorción. Un vez iniciada la decoloración, la tasa de decoloración es similar al medio que sólo contiene glucosa pero es más lenta que aquella que no tiene nutrientes adicionados. Dado que el Mn^{2+} a pesar que se encuentra en cantidad suficiente (0.5 mg/L) para inducir la máxima producción de MnP, no juega un rol significativo en la decoloración bajo estas condiciones.

Keyser et al. (1978: pp.790-797) encontraron que el inicio de la actividad lignolítica se veía demorada por la adición de NH_4^+ a cultivos limitados de nitrógeno.

En su estudio, Urek y Pazarlioglu (2008: pp.83-87) observaron un incremento de la actividad MnP con el incremento de la concentración de Mn^{2+} . Aseguran que la adición de MnSO_4 en los cultivos, mejora notablemente la actividad MnP. Este efecto responde al hecho que el Mn^{2+} es el sustrato para la producción de MnP.

Para todos los casos anteriores, dado que no existe decoloración en ninguno de los tratamientos sin inocular (blancos), se puede afirmar que los posibles microorganismos autóctonos no contribuyen en la decoloración.

CONCLUSIONES

- El hongo *Phanerochaete chrysosporium* es eficaz en la biodegradación de colorantes azoicos del efluente de la industria textil al haber sido capaz de reducir significativamente el contenido de color y de grupos azo en el 94.7% de tratamientos bajo las condiciones a las que fue expuesto.
- De los análisis físicos y químicos de la muestra de efluente tratada, se determinó que ésta demanda la aplicación de un proceso biotecnológico para su descontaminación al haber encontrado que el contenido de color fue de 30351 unidades Pt-Co superando los límites aplicables a la legislación ambiental ecuatoriana.
- Empleando la técnica de Fermentación en Estado Líquido (FEL) a la muestra de afluente, se concluye que en las unidades experimentales tratadas con *Phanerochaete chrysosporium* existen diferencias significativas tanto en el color como en la presencia de grupos azo sin haber dispuesto de un medio de inmovilización.
- De las 19 unidades experimentales empleadas para la biodegradación de colorantes azoicos con el hongo *Phanerochaete chrysosporium*, el resultado óptimo se obtuvo en el tratamiento T16 con un 90,46% de reducción de grupos azo, consecuentemente, la condiciones suministradas a este tratamiento permiten que este hongo genere de manera rápida una cantidad de enzimas lignolíticas suficientes para este fin.
- La oxidación (degradación) de los grupos azo, responsable de la pérdida de color en cada unidad experimental, se evidencia del análisis de la información reportada por el método analítico empleado, exhibiendo entonces una relación entre el color (Pt-Co) y la absorbancia medida, siendo la primera de más fácil interpretación.

RECOMENDACIONES

- Puesto que la intensidad de color dada por la mezcla de colorantes en el fluente puede considerarse una interferencia para el instrumento óptico utilizado, se recomienda el uso de un método instrumental diferente para la detección del grupo cromóforo.
- Modificar el contenido de nitrógeno propio de la muestra, en cuya deficiencia se verá potenciada la eficiencia degradativa del hongo *P. chrysosporium*.
- Proveer residuos agroindustriales como sustratos lignocelulósicos, evitando el uso de semillas (frutos) que están destinadas a la alimentación humana.
- Considerar el tamaño del micelio que se inocular en el medio líquido como factor que influye en la degradación.
- Utilizar un adecuado medio de inmovilización para el micelio o las enzimas lignolíticas que permita la preservación de éstos cuando condiciones de agitación son incluidas en el tratamiento.
- Profundizar el estudio del exudado que se genera cuando el organismo fúngico es expuesto a ácido tartárico o peróxido de hidrógeno.

BIBLIOGRAFÍA

1. **ALMANSA, Eva; et al.** “Influence of structure on dye degradation with laccase mediator systems”. *Biocatalysis and Biotransformation* [en línea], 2004, (United States of America) 22(5/6), pp. 315-324. [Consulta: 10 de noviembre de 2016]. ISSN 1024-2422. Disponible en: <http://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/2652/1/bb4.pdf>
2. **APHA Method 2550.** *Temperature. Parte B: Laboratory and Field Methods.*
3. **APHA Method 4500-H+.** *pH Value. Parte B: Electrometric Method.*
4. **ARIAS-CARBAJAL, G.; et al.** “Biotransformacion de Residuos Lignocelulósicos con hongo *Pleurotus*”. *CENIC Ciencias Biológicas*, [en línea], 2005, (Cuba) 36. [Consulta: 25 de enero de 2016]. ISSN 0253-5688. Disponible en: <http://www.redalyc.org/pdf/1812/181220525083.pdf>
5. **ARISTIZÁBAL, A.; & BERMÚDEZ, M.** Estudio de la factibilidad de un sistema de electrocoagulación para tratamiento de aguas procedentes de lavanderías industriales con fines de reuso” [En línea] (Tesis). (Ingeniería) Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia. pp. 77-78. [Consulta: 2016-05-05]. Disponible en: <http://www.cntq.gob.ve/cdb/documentos/quimica/220.pdf>
6. **ARORA, D.; & GILL, P.** “Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase”. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 28, n° 7-8 (2001), (India), pp. 602-605.
7. **ASAD, S.; et al.** “Decolorization of textile azo dyes by new isolated halophilic and halotolerant bacteria”. *Bioresource Technology* [En línea], 2007, (United States of America) 98, pp. 2082-2088. [Consulta: 24 de agosto de 2016]. ISSN 0960-8524. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852406004184>
8. **ASHGER, M.; et al.** “Decolorization potential of mixed microbial consortia for reactive and disperse textile dyestuffs”. *Biodegradation*, vol. 18, n° 3 (2007), (Pakistan), pp. 311-316.
9. **ASGHER, M.; et al.** “Laccase mediated decolorization of vat dyes by *Coriolus versicolor* IBL-04. *International Biodeterioration & biodegradation*, vol. 62, n° 4 (2008), (Pakistan), pp. 465-470.

10. **BARR, D.; & AUST, S.** “Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants”. *Environmental Science & Technology*, n° 28, (1994), (United States of America) pp. 320-328.
11. **ASTHER, M.; et al.** “Effect of Tween 80 and oleic acid con ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium* INA-12”. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 9, n° 4 (1987), (France), pp. 245-249.
12. **BANAT, I.; et al.** “Microbial decolourization of textile dye containing dye effluents: a review”. *Bioresource Technology*, vol. 58, n° 3 (1996), (India) pp. 217-227.
13. **BARR, D.; & AUST, S.** “Mechanisms white-rot fungi use to degrade pollutants”. *Environmental Science & Technology*” vol. 28, n° 2 (1994), (United States of America) pp. 78A-87A.
14. **BANCO CENTRAL DEL ECUADOR BCE.** “Información Estadística Mensual (IEM)”. *Boletín Mensual* [En línea], 2016, (Ecuador) 1978. Disponible en: <https://contenido.bce.fin.ec/home1/estadisticas/bolmensual/IEMensual.jsp>
15. **BEHNAJADY, M.; et al.** “Photodestruction of Acid Orange 7 (AO7) in aqueous solution by UV/H₂O₂: influence of operational parameters”. *Chemosphere*, n° 55 (2004), (Iran) pp. 129-134.
16. **BJÖRKQVIST, B.** “Separation and determination of aliphatic and aromatic amines by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection”. *Journal of Chromatography A*, n° 204 (2002), (Finlandia) pp. 109-114.
17. **BLÁNQUEZ, P.; et al.** “Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*”. *Water Research*, vol. 15, n° 38 (2004), (España) pp. 2166-2172.
18. **BONO, J.; et al.** “Effect of Mn(II) on reactions catalyzed by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*”. *European Journal of Biochemistry* [En línea], 1990, (Francia) 192(1), pp. 189-193. [Consulta: 15 de mayo de 2016]. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1432-1033.1990.tb19213.x/pdf>

19. **BURDSALL, H.** “A contribution to the taxonomy of the Genus *Phanerochaete* (Corticaciae, Aphyllophorales)”. *Mycologia Memoir No. 10*, vol. 28, n° 8 (1985), (Alemania) pp. 61-63.
20. **BURDSALL, H.; & ESLYN, W.** “A new *Phanerochaete* with a chrysosporium imperfect state”. *Mycotaxon* [En línea], 1974, (United States of America) 1(2), pp. 123-133. [Consulta: 12 de abril de 2016]. Disponible en: <https://www.fpl.fs.fed.us/documnts/pdf1974/burds74d.pdf>
21. **BUSWELL, J.; et al.** “Ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* under conditions of nitrogen sufficiency”. *FEMS Microbiology Letters*, vol. 25 (1984), (United States of America) pp. 295-299.
22. **CAMERON, M.; et al.** “Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to degradation of recalcitrant compound and xenobiotics”. *Applied Microbiology and Biotechnology*, n° 54 (2000), (United States of America) pp. 751-758.
23. **CARRILLO, D.** *Diagnóstico del Sector Textil y de la Confección* [en línea]. Ecuador: Instituto Ecuatoriano de Estadísticas y Censos, 2010. [Consulta: 10 de octubre de 2016]. Disponible en: <http://www.uasb.edu.ec/UserFiles/381/File/TEXTIL.pdf>
24. **CHEY, W.; & ADAMS, R.** “Anodic differential pulse voltammetry of aromatic amines and phenols at trace levels”. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, n° 75 (1977), (United States of America) pp. 731-738.
25. **CHIAVARI, G.; & GIUMANINI, A.** “Gas chromatographic analysis of aromatic amines as N-permethylated derivatives” *Journal of Chromatography A*, n° 206 (1981), (United Stated of America) pp. 555-561.
26. **CHUANG, J.; & LIN, C.** “Decolorization kinetics of recombinant *Escherichia coli* strain harboring azo-dye-decolorizing determinants for *Rhodococcus* sp”. *Biotechnology Letters*, n° 23 (2001), (Taiwan) pp. 631-636.
27. **CHURCHLEY, J.** “Removal of dye waste color from sewage effluent the use of a full scale ozone plant”. *Water Science & Technology* [en línea], 1994, (Great Britain) 30(3), pp. 275-284. [Consulta: 10 de octubre de 2016]. Disponible en: <http://wst.iwaponline.com/content/30/3/275.full.pdf>

28. **CONSORT.** *Multiparameter analysers. Operation manual C561/C562 models* [en línea]. Turnhout - Bélgica, 2009. [Consulta: 19 de junio de 2016]. Disponible en: http://www.consort.be/data/uploads/manuals/old-manuals/c56x_hl.pdf
29. **DER ZEE, F.; & VILLAVERDE, S.** “Combined anaerobic-aerobic treatment of azo dyes - A short review of bioreactor studies”. *Water Research*, vol. 39, n° 8 (2005), (United States of America) pp.1425-1440.
30. **DUARTE PUENTES, Alejandra Marina.** *Evaluación de la producción de enzimas lignolíticas por hongos de pudrición blanca en fermentación semisólida, utilizando desechos agroindustriales como sustrato* [En línea] (tesis). (Maestría) Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. 2004. pp. 61-65. [Consulta: 22 de abril de 2016]. Disponible en: <http://repositorio.uis.edu.co/jspui/bitstream/123456789/7347/2/114396.pdf>
31. **EATON, D.** “Mineralization of polychlorinated byphenils by *Phanerochaete chrysosporium*: a lignolytic fungus”. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 7, n° 5 (1985), (United States of America), pp. 194-196.
32. **EL KHORASSANI, H.; et al.** “A simple UV spectrophotometric procedure for the survey of industrial sewage system”. *Water Science and Technology* [En línea], 1999, (South Africa) 39(10-11), pp. 77-82. [Consulta: 10 octubre 2016]. ISSN . Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0273-1223\(99\)00256-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0273-1223(99)00256-5)
33. **ETAD.** “Dye Definition.” [En línea]. SDC, 2013. [Consulta: 12 de octubre de 2016]. Disponible en: <http://www.colour-index.com/assets/files/upl/ETAD-definition-of-Dyes.pdf>
34. **FABBRINI, M.; et al.** “Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase”. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 16, n° 5-6 (2002), (Italy) pp. 231-240.
35. **FENN, P.; & KIRK, T.** “Relationship of nitrogen to the onset and suppression of lignolytic activity and secondary metabolism in *Phanerochaete chrysosporium*. *Archives of Microbiology*, vol. 130 (1981), (United States of America) pp. 59-65.

36. **FRANC, J.; & KOUDELKOVA, V.** “Thin-layer chromatography of aromatic amines and their derivatives after reactions with 1-fluoro-2,4-dinitrobenzene”. *Journal of Chromatography A*, vol. 170, n° 1 (1979), (Czechoslovakia) pp. 89-97.
37. **FU, Y.; & VIRARAGHAVAN, T.** “Removal of Congo Red from an aqueous solution by fungus *Aspergillus niger*”. *Advances in Environmental Research*, vol. 7, n°1 (2002), (Canada) pp. 239-247.
38. **FUJIAN, X.; et al.** “Solid-state production of lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase MnP) by *Phanerochaete chrysosporium* using steam-exposed straw as substrate”. *Bioresource Technology*, vol. 80, n° 2 (2001), (United States of America) pp. 149-151.
39. **GANGANI, Bavesh B.** (2006). Synthesis and physico-chemical studies of 1,1'-substituted phenyl cyclohexane [en línea] (tesis). (Doctorado) Universidad de Saurashtra, Rajkot, India. 2006. pp.53-56. [Consulta: 16 marzo 2016]. Disponible en: http://etheses.saurashtrauniversity.edu/413/1/gangani_bj_thesis_chemistry.pdf
40. **GARZÓN JIMÉNEZ, Rossana C.** Cinética de degradación de colorantes textiles de diferentes clases químicas por hongos y bacterias inmovilizados sobre fibra de *Agave tequilana* Webber var. Azul [en línea] (tesis). (Microbiólogo) Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. 2009. pp.19-21. [Consulta: 25 mayo 2016]. Disponible en: <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis217.pdf>
41. **GOLD, M.; & ALIC, M.** “Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*”. *Microbiological Reviews* [en línea], 1993, (United States of America) 57(3), pp. 605-622. [Consulta: 19 octubre 2016]. ISSN 0146-0749. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC372928/pdf/microrev00026-0107.pdf>
42. **GUARATINI, C.; & ZANONI, M.** “Colorantes texteis”. *Química Nova* [en línea], 2000, (Brasil) 23(1), pp. 71-78. [Consulta: 12 octubre 2016]. ISSN 1678-7064. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v23n1/2146.pdf>
43. **GÜRSES, A.; et al.** *Dyes and Pigments*. Switzerland : Springer, 2016 pp. 69-83.

44. **HACH Method 8000.** *Oxygen Demand, Chemical. USEPA Reactor Digestion Method (multi-range).*
45. **HACH Method 8006.** *Suspended Solids. Photometric Method (750mg/L).*
46. **HACH Method 8023.** *Chromium, Hexavalent. USEPA 1,5-Diphenylcarbohydrazide Method (0.700 mg/L).*
47. **HACH Method 8025.** *Color, True and Apparent. Platinum-Cobalt Method (500 units)*
48. **HACH Method 8043.** *Oxygen Demand, Biochemical. Dilution Method.*
49. **HACH Method 8506.** *Cooper (CuVer1). USEPA Bicinchoninate Method (5.00 mg/L)*
50. **HACH Method 10072.** *Nitrogen, Total. Persulfate Digestion Method (150 mg/L)*
51. **HAEMMERLI, S.; et al.** “Oxidation of Benzo(a)pyrene by extracellular ligninases of *Phanerochaete chrysosporium*”. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 261, n° 15 (1986), (United States of America) pp. 6900-6903.
52. **HAILEI, W.; ET AL.** “Rapid decolourization of azo dyes by a new isolated higher manganese peroxidase producer: *Phanerochaete* sp. HSD”. *Biochemical Engineering Journal*, vol. 46, n° 3 (2009), (China) pp. 327-333.
53. **HATAKKS, A.; et al.** “The effect of quinone-reducing and phenol-methylating enzymes on the yellowing of mechanical pulp”. *Holzforschung*, vol. 48, n°1 (1994), (Finland) pp- 82-88.
54. **HAWARI, J.; et al.** “Biotransformation of 2,4,6-trinitrotoluene by *Phanerochaete chrysosporium* in agitated cultures at pH 4.5”. *Applied Environmental Microbiology* [en línea], 1999, 65(7), pp. 2977-2986. [Consulta: 13 octubre 2016]. ISSN 2977-2986. Disponible en: <http://aem.asm.org/content/65/7/2977.full>
55. **HUSAIN, M.; & HUSAIN, Q.** “Applications of redox mediators in the treatment of organic pollutants by using oxidoreductive enzymes: a review”. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* [en línea], 2011, 38(1), pp. 1-42. [Consulta: 15 octubre 2016]. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/10643380701501213>

56. **INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICAS Y CENSOS INEC.** Censo Nacional Económico. *Instituto Nacional de Estadísticas y Censos* [En línea], 2010. [Consulta: 02 octubre 2016]. Disponible en <http://redatam.inec.gob.ec/cgibin/RpWebEngine.exe/PortalAction?&MODE=MAIN&BASE=CENEC&MAIN=WebServerMain.inl>
57. **JIN, X.; et al.** “Decolorization of a dye industry effluent by *Aspergillus fumigatus* XC6”. *Applied Microbiology ad Biotechnology*, vol. 74, n° 1 (2007), (China) pp. 239 - 243.
58. **KADAPAN, I.; et al.** “Effect of environmental conditions on biological decolorization of textile dyestuff by *C. versicolor*”. *Enzyme & Microbial Technology*, vol. 74, n° 5-6 (2000), (United States of America) pp. 381-387.
59. **KARIMINIAAE-HAMEDAANI, H.; et al.** “Decolorization of synhtetic dyes by a new manganese-producing white rot fungus”. *Dyes and Pigments*, vol. 72 (2007), (United States of America) pp. 157-162.
60. **KEREM, Z.; et al.** “Lignocellulose degradation during solid-state fermentation: *Pleurotus orsteatus* vs *Phanerochaete chrysosporium*”. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 58, n° 4 (1992), (United States of America) pp. 1121-1127.
61. **KERSTEN, P.; & CULLEN, D.** “Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*”. *Fungal Genetics and Biology*, vol. 44, n° 2 (2007), (United States of America) pp. 77-87.
62. **KERSTEN, P.; et al.** “Comparison of lignin peroxidase, horseradish peroxidase and laccase in the oxidation of methoxybenzenes”. *Biochemical Journal* [en línea], 1990, (Great Britain) 268(2), pp. 475-480. [Consulta: 22 octubre 2016]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1131457/pdf/biochemj00182-0224.pdf>
63. **KEYSER, P.; et al.** “Lignolytic enzyme system of *Phanerochaete chrysosporium*: synthesized in absence of lignin un response to nitrogen starvation”. *Journal of Bacteriology*, vol. 135, n° 3 (1978), (United States of America) pp.790-797.
64. **KHIYAMI, M.; et al.** “Lignolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* in plastic composite support film stirred tank biorreactors”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 8, n° 5 (2006), (United States of America) pp. 1693-1698.

65. **KIRK, T.** “The discovery and promise of lignin-degrading enzymes”. *The Marcus Wallenberg Foundation symposia proceedings: 2, New horizons for biotechnological utilization of the forest resource*, (Sweden) pp. 27-42.
66. **KIRK, T.; & LYNCH, J.** “Lignin degrading enzymes”. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series A Mathematical and Physical Sciences*, vol. 321, n° 1561 (1987), (Great Britain) pp. 461-474.
67. **KIRK, T.; & FENN, P.** “Formation and action of the lignolytic system in basidiomycetes”. Citado en FRANKLAND, J.; et al. “4th Symposia of British Mycological Society”: London, United Kingdom: Cambridge University Press. [Consulta: 18 de mayo de 2016]. Disponible en: <http://www.cambridge.org/catalogue/catalogue.asp?isbn=9780521106801>
68. **KISHI, K.; et al.** “Mechanism of manganese peroxidase compound II reduction. Effect of organic acid chelators and pH. *Biochemistry*, vol. 33, n° 29 (1994), (United States of America) pp. 8694-8701.
69. **KOYANI, R.; et al.** “Contribution of lignin degrading enzymes in decolourization and degradation of reactive textile dyes”. *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 77 (2013), (United States of America) pp. 1-9
70. **KULLMAN, S.; & MATSUMURA, F.** “Metabolic pathways utilized by Phanerochaete chrysosporium for degradation of the cyclodiene pesticide endosulfan”. *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 62, n°2 (1996), (United States of America) pp. 593-600.
71. **LEISOLA, M.; et al.** “Aromatic ring cleavage of veratryl alcohol by Phanerochaete chrysosporium”. *FEBS Letters*, vol. 189, n° 2 (1985), (Switzerland) pp. 267-270.
72. **LEIST, K.** “Subacute toxicity studies of selected organic colorants”. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 6, n° 5 (1982), (West Germany) pp. 45-63.
73. **LESTAN, D.; et al.** “Physiological aspects of biosynthesis of lignin peroxidases by Phanerochaete chrysosporium”. *Applied and Environmental Microbiology* [en línea], 1993, (United States of America) 60(2), pp. 606-612. [Consulta: 22 Enero 2016]. ISSN 0099-2240. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/7421206_Physiological_Aspects_of_Biosynthesis_of_Lignin_Peroxidases_by_Phanerochaete_chrysosporium

74. **LIU, J.; et al.** “Enhanced dye decolorization efficiency by citraconic anhydride-modified horseradish peroxidase”. *Journal of Molecular Catalysis B*, vol. 41, n° 3-4 (2006), (China) pp. 81-86.
75. **LORIMER, J.; et al.** “Degradation of dye effluent”. *Pure and Applied Chemistry* [en línea], 2001, (United Kingdom) 73(12), pp. 1957-1968. [Consulta: 12 octubre 2016]. Disponible en:
<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.606.37&rep=rep1&type=pdf>
76. **MINISTERIO DEL AMBIENTE DEL ECUADOR MAE.** “Estudio de potenciales impactos ambientales y vulnerabilidad relacionada a las sustancias químicas y tratamiento de desechos peligrosos en el sector productivo del Ecuador”. *Ministerio del Ambiente del Ecuador* [en línea], 2013, (Ecuador). [Consulta: 16 octubre 2016]. Disponible en:
<http://www.ambiente.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2013/03/PART11.pdf>
77. **MAJEAU, J.; et al.** “Laccases for removal of recalcitrant and emerging pollutants”. *Bioresource Technology*, vol. 101, n° 7 (2010), (Canada) pp. 2331-2350.
78. **MARCANO, D.** *Introducción a la química de los colorantes*. Caracas, Venezuela: Reverte, 1990 pp. 26-28.
79. **MCMULLAN, G.; et al.** “Microbial decolorization and degradation of textile dyes”. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 56, n° 1-2 (2001), (United Kingdom) pp. 81-87.
80. **MINISTERIO DE INDUSTRIAS Y PRODUCTIVIDAD MIPRO.** “Análisis sectorial de textiles y confecciones”. Ministerio de Industrias y Productividad: Instituto De Promoción De Exportaciones E Inversiones [en línea], 2012, (Ecuador). [Consulta: 19 octubre 2016]. Disponible en: http://www.proecuador.gob.ec/wp-content/uploads/2013/11/PROEC_AS2012_TEXTILES.pdf
81. **MOELLER, G.; & MAZÓN, M.** “Desarrollo de tecnologías no convencionales para el tratamiento de efluentes de la fabricación de colorantes del tipo azo”. *Anuario Imta*.

- 82. MOELLER, G.; et al.** “Evaluación de diferentes procesos de tratamiento para la remoción de colorantes sintéticos utilizados en la industria textil”. *Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales: Instituto Mexicano de Tecnología del Agua* [En línea], 2013, (México). [Consulta: 23 octubre 2016]. Disponible en: <http://repositorio.imta.mx:8080/cenca-repositorio/bitstream/123456789/1406/1/TC-1223.1.pdf>
- 83. MOLIANEN, A.; et al.** “Manganese and melonate are individual regulators for the production of lignin and manganese peroxidase isozymes and in the degradation of lignin by *Phlebia radiata*”. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 45, n° 6 (1996), (Finland) pp. 792-799.
- 84. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION NCBI.** “*Phanerochaete chrysosporium*”. *National Center for Biotechnology Information: Taxonomy Browser* [en línea]. (United States of America). [Consulta: 12 marzo 2016]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=5306&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
- 85. NIEBISCH, C.; et al.** “Decolorization and biodegradation of reactive blue 220 textile dye by *Lentinus crinitus* extracellular extract”. *Journal of Hazardous Materials*, vol. 180, n° 1-3 (2010). (Brazil), pp. 316-322.
- 86. NORWITZ, G.; & KELIHER, P.** “Continued investigation of the diazotization and coupling spectrophotometric technique for the determination of aromatic amines with 8-amino-1-hydroxynaphthalene-3,6-disulphonic acid and N-(1-naphthyl)ethylene-diamine as coupling agents”. *Talanta*. Vol. 33, n° 4 (1986), (United States of America) pp. 311-314.
- 87. NTE INEN-ISO 690:2010.** *Información y documentación. Directrices para la redacción de referencias bibliográficas y de citas de recursos de información (ISO 690:2010, IDT)*
- 88. NTE INEN-ISO 690-2:2008.** *Información y documentación. Referencias bibliográficas. Parte 2: Documentos electrónicos o parte de ellos.*
- 89. NTE INEN 1205:2013.** *Agua. Determinación del número total de bacterias en placas.*

90. NTE INEN 2402:2010. *Documentación. Presentación de tesis, trabajos de grado y otros trabajos de investigación.*
91. OGURI, S. "Electromigration methods for amino acids, biogenic amines and aromatic amines". *Journal of Chromatography B:Biomedical Sciences and Applications*, vol, 747, n° 1-2 (2000), (Japan) pp. 1-19.
92. ØLLGAARD, H.; et al. "Survey of azo-colorants in Denmark: Consumption, use, health and environmental aspects". *Danish Environmental Protection Agency*, 1998, (Denmark).
93. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD OMS. "Agua". *Organización Mundial de la salud: Nota Descriptiva N° 391* [en línea], 2015. [Consulta: 12 abril 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs391/es/>
94. PANDEY, A.; et al. (2007). "Bacterial decolorization and degradation of azo dyes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 59, n° 2 (2007), (India) pp. 73-84.
95. PASTI-GRIGSBY, M.; et al. "Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete Chrysosporium*". *Applied Environmental Microbiology* [en línea], 1992, (Moscow) 58(11), pp. 3605-3613. [Consulta: 22 octubre 2016]. ISSN 0099-2240. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC183151/pdf/aem00052-0173.pdf>
96. PEARCE, C.; et al. "The removal of color from textile wastewater using whole bacterial cells: a review". *Dyes and Pigments*, vol. 58, n° 3 (2003), (United Kingdom), pp. 179-196.
97. PEASE, E.; et al. "Manganese-dependent Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Primary structure deduced from cDNA sequence". *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 264, n° 23 (1989), (United States of America) pp.13531-13535.
98. PINHEIRO, H.; et al. "Aromatic amines from azo dye reduction: status review with emphasis on direct UV spectrophotometric detection in textile industry wastewaters". *Dyes and Pigments*, vol. 61, n° 2 (2004), (Portugal) pp. 121-139.
99. QU, Y.; et al. "Decolorization of reactive dark blue K-R by the synergism of fungus and bacterium using response surface methodology". *Bioresource Technology*, vol 101, n° 21 (2010), (China) pp. 8016-8023.

100. **QUEZADA, M.; & BUITRÓN, G.** “Biodegradación aerobia de colorantes tipo azo (rojo ácido 151)”. CEPIS/OPS [en línea], 1996, (Mexico). [Consulta: 22 octubre 2016]. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/aresidua/mexico/01385e14.pdf>
101. **RAGHUKUMAR, C.; et al.** (1996). “Degradation of lignin and decolorization of paper mill bleach plant effluent (BPE) by marine fungi”. *Biotechnology Letters*, vol. 18, n° 1 (1996), (India) pp. 105-106.
102. **RAMSAY, J.; & GOODE, C.** “Degradation of pentaclorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: intermediates and reactions involved”. *Microbiology*, vol. 146 (1985), (United States of America) pp. 197-201.
103. **REDDY, G.; & GOLD, M.** “Degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: intermediates and reactions involved”. *Microbiology*, vol. 146, n° 2-2 (2000), (United States of America) pp. 405-413.
104. **RENGANATHAN, V.; et al.** (1985). Multiple molecular forms of diarylpropane oxygenase, an H₂O₂-requiring, lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*”. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 241, n° 1 (1985), (United States of America) pp. 304-314.
105. **REVANKAR, M.; & LELE, S.** “Synthetic dye decolorization by white rot fungus, *Ganoderma sp.* WR-1”. *Bioresource Technology*, vol. 241 (2007), (United States of America) pp. 775-780.
106. **ROBINSON, T.; et al.** “Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative”. *Bioresource Technology*, vol. 77, n° 3 (2001), (United Kingdom) pp. 247-255.
107. **RODRÍGUEZ, O.; & ROLDAN, J.** *Alternativas para el tratamiento de aguas residuales en tintorerías textiles: Caso PANTEX S.A.* (tesis). (Doctoral) Universidad Pontificia Bolivariana, Medellín, Colombia. 1997. p. 189.
108. **RODRÍGUEZ, S.; et al.** “Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus spp.*”. *Revista Iberoamericana de Micología*, vol. 20 (2003), (Cuba) pp. 164-168.

- 109. SAIZ JIMENEZ, C.** “Posibles aplicaciones del hongo *Phanerochaete chrysosporium* Burds en biotecnología”. *Consejo Superior de Investigaciones Científicas* [en línea], 1983, España. [Consulta: 22 enero 2016]. Disponible en: <http://digital.csic.es/bitstream/10261/74063/1/Posibles%20aplicaciones%20del%20hongo%20Phanerochaete%20chrysosporium%20Burds.%20en%20Biotecnolog%C3%ADa.pdf>
- 110. SENTHILKUMAR, S.; et al.** “Decolourization potential of white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* on synthetic dye bath effluent containing Amido black 10B”. *Journal of Saudi Chemical Society*, vol. 18, n° 6 (2011), (India) pp. 845 - 853.
- 111. SINGH, D.; & CHEN, S.** “The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes”. *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 81, n° 3 (2008), (India) pp. 399-417.
- 112. SINGH, R.; et al.** “Bacterial decolorization of textile azo dye Acid Orange by *Staphylococcus hominis* RMLRT03”. *Toxicology International* [en línea], 2014, (India) 21(2), pp. 160-166. [Consulta: 12 febrero 2016]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4170557/>
- 113. SINGH, S.; & PAKSHIRAJAN, K.** “Enzyme activities and decolourization of single and mixed azo dyes by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*”. *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 64, n° 2 (2010), (India) pp. 146-150.
- 114. SINGHAL, V.; & RATHORE, V.** “Effects of ZN^{2+} and Cu^{2+} on growth, lignin degradation and lignolytic enzymes in *Phanerochaete chrysosporium*”. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 71 (2001), (United States of America) pp. 235-240.
- 115. SKARPING, G.; et al.** “Trace analysis of amines and isocyanates using glass capillary gas chromatography and selective detection: I. Determination of aromatic amines as perfluoro fatty acid amines using electron-capture detection”. *Journal of Chromatography A*, vol. 267, (Sweden) pp. 315-327.
- 116. SKOOG, D.; et al.** *Principios de Análisis Instrumental*. 5° ed. Aravaca, España: McGraw Hill, 1992 p. 322.
- 117. SMITH, John; & PATEMAN, John.** *Genetics and Physiology of Aspergillus*. Minnesota-Estados Unidos: Academic Press, 1977, pp. 131-146.

118. SOLÍS, M.; et al. "Microbial decolouration of azo dyes: A review." *Process Biochemistry*, vol. 47, n° 12 (2012), (Mexico) pp. 1723-1748.
119. STOLZ, A. "Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes". *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 56, n° 1-2 (2001), (Germany) pp. 69-80.
120. SUKHWINDER, S.; & KANNAN, P. "Enzyme activities and decolourization of single and mixed azo dyes by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*". *International Bioremediation and Biodegradation*, vol. 64 (2010), (United States of America) pp. 146-450.
121. SUMATHI, S.; & MANJU, B. "Uptake of reactive textile dyes by *Aspergillus foetidus*". *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 27 (2000), (United States of America) pp. 347-355.
122. SUBRAMANIAN, S.; & YADAV, J. "Role of P450 Monooxygenases in the Degradation of the Endocrine-Disrupting Chemical Nonylphenol by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*". *Applied Environmental Microbiology*, vol. 75, n° 17 (2009), (United States of America) pp. 5570-5580
123. SWAMINATHAN, K.; ET AL. "Decolorization and degradation of H-acid and other dyes using ferrous-hydrogen peroxide system". *Chemosphere*, vol. 50, n° 5 (2003), (India) pp. 619-625.
124. TAN, N.; et al. "Degradation of azo dye Mordant Yellow 11 in a sequential anaerobic and bioaugmented aerobic bioreactor". *Water Science & Technology*, vol. 42, n° 5-6 (2000), (United States of America) pp. 337-344.
125. TATARKO, M.; & BUMPUS, J. "Biodegradation of Congo Red by *Phanerochaete chrysosporium*". *Water Research*, vol. 32, n° 5 (1998), (United States of America) pp. 1713-1717.
126. THOMAS, O.; et al. "Advanced UV examination of wastewater". *Environmental Technology*, vol. 17, n° 3 (1996), (France) pp. 251-261.

127. **THURSON, C.** “The structure and function of fungal laccases”. *Microbiology* [en línea], 1994, (United Kingdom) 140, pp. 19-26. [Consulta: 14 octubre 2016]. Disponible en: <http://www.microbiologyresearch.org/docserver/fulltext/micro/140/1/mic-140-1-19.pdf?expires=1486005448&id=id&accname=guest&checksum=F16E4CB65B92A62E36B5930441BB9625>
128. **TIEN, M.; & KIRK, T.** “Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*”. *Methods in Enzymology*, vol. 161 (1988), (United States of America) pp. 238-249.
129. **TIEN, M.; & KIRK, T.** “Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds”. *Science*, vol. 221, n° 4611 (1983), (United States of America) pp. 661-663.
130. **TIEN, M.; & KIRK, T.** “Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring peroxidase”. *Proceedures of the National Academy of Sciences* [en línea], 1984, (United States of America) 81, pp. 2280-2284. [Consulta: 21 febrero 2016]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC345042/pdf/pnas00609-0012.pdf>
131. **UMEZAWA, T.; & HIGUCHI, T.** “Cleavages of aromatic ring and beta-O-4 bond of synthetic lignin (DHP) by lignin peroxidase”. *FEBS Letters*, vol. 242, n° 2 (1989), (Japan) pp. 325-329.
132. **UREK, R.; & HIGUCHI, T.** “Production and stimulation of manganese peroxidase by immobilized *Phanerochaete chrysosporium*”. *Process Biochemistry*, vol. 40 (2008), (United States of America) pp. 83-87.
133. **VAN DER ZEE, F.; & VILLAVERDE, S.** “Combined anaerobic-aerobic treatment of azo dyes – A short review of bioreactor studies”. *Water Research*, vol. 39, n° 8 (2005), (Portugal) pp. 1425-1440.
134. **VANDEVIVERE, P.; et al.** “Treatment of wastewater from textile wet-processing industry: Review of emerging technologies”. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, vol. 72, n° 4 (1998), (Belgium) pp. 289-302.

135. VENKATARAMANAN, S.; & JAGJIT, S. “Role of P450 Monooxygenases in the degradation of the endocrine-disrupting chemical nonylphenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*”. *Applied Environmental Microbiology*, vol. 75, n° 17 (2009), (United States of America) pp. 5570-5580.
136. VERMA, K.; et al. “Spectrophotometric determination of primary aromatic amines with 4-N-methylaminophenol and 2-iodylbenzoate”. *Talanta*, vol 35, n° 5 (1988), (India) pp. 409-411.
137. VILLA, Y.; & ESPIN, N. “Determinación de la cinética de crecimiento del hongo *Phanerochaete chrysosporium* en residuos lignocelulósicos y determinación de la actividad ligninoperoxidásica”. *Revista Politécnica*, vol. 31, n° 1 (2010), (Ecuador) pp. 70-74.
138. WALTERS, A.; et al. *El tratamiento de textiles y sus repercusiones ambientales* [en línea]. Exeter-United Kingdom: *GreenPeace.org*, 2005. [Consulta: 23 agosto 2016]. Disponible en: <http://www.greenpeace.org/espana/Global/espana/report/other/el-tratamiento-de-textiles-y-s.pdf>
139. WANG, A.; et al. “Degradation of azo dye Acid Red 14 in aqueous solution by electrokinetic and electrooxidation process”. *Chemosphere*, vol. 55, n° 9 (2004), (China) pp. 1189-1196.
140. WANG, H.; et al. “Rapid decolourization of azo dyes by a new isolated higher manganese peroxidase producer: *Phanerochaete sp.* HSD”. *Biochemical Engineering Journal*, vol. 46 (2009), (United States of America) pp. 327-333.
141. WARIISHI, J.; et al. “Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycetes *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators.” *Journal of Biological Chemistry*, vol. 26 (1992), (United States of America) pp. 23688-23695.
142. WEISBURGER, J. (2002). “Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health”. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, vol. 506-507 (2002), (United States of America) pp. 9-20.

143. **WELLS, A.; et al.** “Green oxidations with laccase-mediator systems”. *Biochemical Society Transactions*, vol. 34, n° 2 (2006), (United Kingdom) pp. 304-308. Disponible en: <http://www.biochemsoctrans.org/content/34/2/304>
144. **WONG, Y.; & YU, J.** “Laccase catalyzed decolourization of synthetic dyes”. *Water Research*, vol. 33 (1999), (United States of America) pp. 304-308.
145. **YANG, S.; et al.** “Understanding the factors controlling the removal of trace organic contaminants by white-rot fungi and their lignin modifying enzymes: a critical review”. *Bioresource Technology*, vol. 141 (2013), (United States of America) pp. 97-108.
146. **YOUNG, Raymond A.; & AKHTAR Masood.** *Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry*. New York: Wiley, 1997, pp. 259-272.
147. **ZHANG, F.; et al.** “Development of bioreactor systems for decolorization of Orange II using white rot fungus”. *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 24, n°1-2 (1999), (United Kingdom) pp. 48-53.
148. **ZHEN, Z.; & YU, J.** “Stresses on immobilized Phanerochaete chrysosporium hyphae in submerged cultures for ligninase production” *Canadian Journal of Chemical Engineering*, vol. 76, n°4 (1998), (China) pp. 784-789.