



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUIMICAS

**“EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DEL HONGO *Pleurotus ostreatus*,
EN LA BIODEGRADACIÓN DE FENOLES EN EFLUENTES DE
PROCESOS DE TEÑIDO Y LAVADO DE JEAN”.**

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Presentado para optar por el grado académico de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORA: MADELEN KATHERINE NAJERA ARMIJO

TUTOR: DR. IVÁN RAMOS

RIOBAMBA – ECUADOR

2017

© 2017, NAJERA ARMIJO MADELEN KATHERINE

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 EFICIENCIA DEL HONGO *Pleurotus ostreatus*, EN LA BIODEGRADACIÓN DE FENOLES EN EFLUENTES DE PROCESOS DE TEÑIDO Y LAVADO DE JEAN**, de responsabilidad de la señorita Madelen Katherine Najera Armijo, ha sido prolijamente revisado por los Miembros del Tribunal de Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

NOMBRE

FIRMA

FECHA

Dr. Iván Ramos

DIRECTOR

Lic. Karen Acosta

MIEMBRO

Yo, MADELEN KATHERINE NAJERA ARMIJO, declaro que el presente trabajo de titulación es de mi autoría y que los resultados del mismo son auténticos y originales.

Los textos constantes en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autor asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este trabajo de titulación.

Riobamba, 30 de julio de 2017

MADELEN KATHERINE NAJERA ARMIJO

C.I. 020183046-0

Yo, Madelen Katherine Najera Armijo, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación; y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación, pertenece a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO.

Madelen Katherine Najera Armijo

DEDICATORIA

El presente trabajo de titulación está dedicado en especial, a mi querida madre Ana Armijo, cuyo sacrificio y entrega han sido parte indispensable de este importante objetivo, a mi bello hijo, Alessandro Guevara por ser mi fuente de inspiración y mi motivo de superación. A mi amado esposo, Alexander Guevara quien ha estado junto a mí en los buenos y malos momentos brindándome su apoyo y amor incondicional, a mi hermano Jonathan Nájera por su ayuda y compañía durante mi vida estudiantil.

Madelen Najera

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios, quien me ha guiado y derramado bendiciones en este largo camino, a mi madre querida, Ana Armijo, que con amor, sacrificio y entrega me ha brindado todo el apoyo necesario para alcanzar este objetivo, a mi tía Ninfa Armijo por su apoyo moral , por sus consejos en este transcurso de mi trabajo de titulación. Además agradezco a mi tutor Dr. Iván Ramos y mi asesora Lic. Karen Acosta por brindarme sus valiosos conocimientos y la guía académica necesaria para la realización de mi trabajo de titulación. A mi amiga de mi vida estudiantil por su apoyo incondicional para que nunca me rinda, por estar juntas a lo largo de todos estos años la chica del 1798 Alejandra Paredes.

Madelen Najera

TABLA DE CONTENIDOS

Contenido	Página
RESUMEN.....	xvi
SUMMARY	xvii
 CAPÍTULO I	
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Justificación de la investigación.....	3
1.2. Objetivos	4
1.2.1. <i>Objetivo general:</i>	4
1.2.2. <i>Objetivos específicos:</i>	4
 CAPÍTULO II	
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1. Contaminación del agua	5
2.1.1. <i>Contaminación de la industria textil</i>	5
2.1.1.1. <i>Uso de compuestos fenólicos en la industria textil</i>	6
2.2. Fenol	7
2.2.1. <i>Propiedades físicas y químicas</i>	7
2.2.2. <i>Tipos de Fenol</i>	8
2.2.2.1. <i>Fenoles naturales</i>	9
2.2.2.2. <i>Fenoles sintéticos</i>	9

2.2.3. <i>Efectos ambientales y en la salud humana</i>	9
2.2.4. <i>Normativa ambiental para la descarga de aguas residuales</i>	10
2.2.5. <i>Tratamientos para aguas residuales con presencia de compuestos fenólicos</i>	11
2.2.5.1. <i>Tratamientos Físicos</i>	11
2.2.5.2. <i>Tratamientos Químicos</i>	12
2.2.5.3. <i>Tratamientos biológicos</i>	13
2.2.5.3.1. <i>Degradación por enzimas</i>	13
2.2.5.3.2. <i>Degradación por algas y plantas</i>	13
2.2.5.3.3. <i>Degradación por microorganismos</i>	14
2.3. Biorremediación	14
2.3.1. Tipos de biorremediación	15
2.3.1.1. <i>Biorremediación in situ</i>	15
2.3.1.2. <i>Biorremediación ex situ</i>	15
2.3.2. Aplicaciones de hongos en biorremediación	16
2.3.2.1. <i>Hongos de la podredumbre blanca</i>	16
2.3.2.2. <i>Principales enzimas involucradas en la biorremediación por hongos de la podredumbre blanca</i>	17
2.3.2.2.1. <i>Lacasas</i>	17
2.3.2.2.2. <i>Manganeso Peroxidasas</i>	17
2.3.2.2.3. <i>Lignina peroxidasas</i>	18
2.3.2.3. <i>Efectos de la suplementación de co-sustratos</i>	18
2.4. Pleurotus ostreatus	19
2.4.1. Clasificación taxonómica	19

2.4.2. <i>Morfología</i>	19
2.4.3. <i>Ciclo de vida</i>	20
CAPÍTULO III	
3. METODOLOGIA	22
3.1. <i>Zona de estudio</i>	22
3.1.1. <i>Lugar de la investigación</i>	22
3.1.2. <i>Materiales</i>	22
3.2. <i>Tipo de investigación</i>	23
3.2.1. <i>Hipótesis e identificación de variables</i>	23
3.2.1.1. Variables	23
3.2.1.1.1. Variable dependiente.....	23
3.2.1.1.2. Variable independiente.....	23
3.2.1.2. Hipótesis.....	24
3.2.1.2.1. Hipótesis Alternante.....	24
3.2.1.2.2. Hipótesis Nula.....	24
3.2.2. <i>Diseño experimental</i>	24
3.2.2.1. <i>Tipo de diseño</i>	24
3.2.3. <i>Esquema del proceso</i>	25
3.2.3.1. <i>Procedimientos</i>	26
3.2.3.1.1. Recolección y preservación de la muestra de efluente.....	26
3.2.3.1.2. Cuantificación de la concentración de fenol en la muestra de efluente	26
3.2.3.1.3. Obtención de micelio de <i>Pleurotus ostreatus</i>	28

3.2.3.1.4. Preparación del medio líquido	29
3.2.3.1.5. Elaboración del extracto acuoso de paja de trigo	29
3.2.3.1.6. Preparación del inóculo líquido	30
3.2.3.1.7. Implementación de tratamientos para la biodegradación del fenol	30
3.2.3.1.8. Determinación de la concentración de fenol posterior a la aplicación de los tratamientos	32
3.2.3.1.9. Determinación de peso húmedo y peso seco.....	33

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	34
4.1. Análisis de resultados.....	34
4.1.1. <i>Cuantificación de la concentración de fenol en la muestra de efluente</i>	34
4.1.2. <i>Obtención de micelio de Pleurotus ostreatus</i>	35
4.1.2.1. <i>Morfología de P. ostreatus en cultivo sumergido en la fase experimental</i>	36
4.1.3. <i>Determinación de la concentración de fenol posterior a la aplicación de los tratamientos</i>	38
4.1.4. <i>Determinación de peso húmedo y peso seco</i>	45
4.2.- Prueba de hipótesis	46
4.3.- Discusión de resultados	49

CONCLUSIONES

RECOMENDACIONES

BIBLIOGRAFÍA

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-2. Límites máximos permisibles del fenol a distintos receptores	11
Figura 2-2. Cuerpo de fructífero de <i>Pleurotus ostreatus</i>	20
Figura 3-3. Ciclo de Vida de <i>Pleurotus ostreatus</i> : 1. Basidiosporas, 2. Germinación de basidiosporas, 3. Micelio monocarión, 4. Plasmogamia, 5. Dicarión, 6-7. Cuerpo fructífero. 8. Cariogamia y meiosis y 9. Liberación de basidiosporas.	21
Figura 1-3. Esquema del proceso.....	25
Figura 2-3. Semilla de <i>P. ostreatus</i> inoculada en medio PDA.	29
Figura 3-3. Tratamientos con efluente y a concentraciones de 10 mg/L y 100 mg/L de fenol sin extracto de paja de trigo	31
Figura 4-3. Tratamientos con efluente y a concentraciones de 10 mg/L y 100 mg/L de fenol con extracto de paja de trigo.	32
Figura 5-3. Filtración del medio de cultivo para la separación de la biomasa.	33
Figura 1-4. Curva de calibración para la determinación de la concentración de fenol en la muestra de efluente y en cada tratamiento.....	35
Figura 2-4. Cultivo de <i>P. ostreatus</i> en medio PDA 3 días posteriores a la inoculación.....	35
Figura 3-4. Crecimiento del micelio de <i>P. ostreatus</i> en medio PDA al octavo día posterior a la inoculación.....	36
Figura 4-4. Morfología de <i>P. ostreatus</i> en cultivo sumergido con 100 mg/L de fenol sin extracto de paja de trigo (Izq.) y con extracto de paja de trigo (Der.) al finalizar el proceso de agitación.	37
Figura 5-4. Morfología de <i>P. ostreatus</i> en cultivo sumergido con 10 mg/L de fenol al finalizar el proceso de aireación.	37
Figura 6-4. Morfología de <i>P. ostreatus</i> en cultivo sumergido con 10 mg/L de fenol, suplementado con extracto de paja de trigo al finalizar el proceso de aireación.....	38

Figura 7-4. Comparación entre la concentración inicial y media de las concentraciones finales de fenol registradas en los tratamientos con agua proveniente del efluente.	41
Figura 8-4. Comparación entre la concentración inicial y media de las concentraciones finales de fenol registradas en los tratamientos con medio líquido suplementado con 10 mg/L (Fenol)....	41
Figura 9-4. Comparación entre la concentración inicial y media de las concentraciones finales de fenol registradas en los tratamientos con medio líquido suplementado con 100 mg/L (Fenol)..	42
Figura 10-4. Tasa de degradación en porcentaje de los distintos tratamientos.	44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-2. Características físico/químicas del fenol	8
Tabla 2-2. Taxonomía de <i>Pleurotus ostreatus</i>	19
Tabla 1-3. Disoluciones obtenidas a partir de la solución stock de fenol.....	27
Tabla 2-3. Diluciones de fenol para la elaboración de la curva de calibración.....	28
Tabla 3-3. Diseño experimental	31
Tabla 1-4. Absorbancias obtenidas para distintas concentraciones de fenol para la elaboración de la curva de calibración.....	34
Tabla 2-4. Calculo de las concentraciones iniciales de fenol en cada tratamiento.....	38
Tabla 3-4. Absorbancias y concentraciones finales de fenol de cada uno de los tratamientos posterior al proceso experimental.	39
Tabla 4-4. Promedio de las concentraciones finales de fenol.	40
Tabla 5-4. Calculo de la tasa de degradación de fenol.....	43
Tabla 6-4. Promedio de las tasas de degradación.....	44
Tabla 7-4. Biomasa de <i>P. ostreatus</i> posterior a 34 días de cultivo, expresada en peso húmedo y peso seco.	45
Tabla 8-4. Promedio de biomasa en peso seco de <i>P. ostreatus</i>	46
Tabla 9-4. Análisis de varianza para la tasa de degradación en el efluente	46
Tabla 10-4. Prueba de Tukey para la tasa de degradación en el efluente.....	47
Tabla 11-4. Análisis de varianza para la tasa de degradación para los tratamientos con una concentración inicial de fenol de 10 mg/L.....	47
Tabla 12-4. Prueba de Tukey para la tasa de degradación para los tratamientos con una concentración inicial de fenol de 10 mg/L.....	47

Tabla 13-4. Análisis de varianza para la tasa de degradación para los tratamientos con una concentración inicial de fenol de 100 mg/L..... 48

Tabla 14-4. Prueba de Tukey para la tasa de degradación para los tratamientos con una concentración inicial de fenol de 100 mg/L..... 48

RESUMEN

Se evaluó la eficiencia del hongo *Pleurotus ostreatus*, en la biodegradación de fenoles en efluentes de procesos de teñido y lavado de jean, en el cantón Pelileo, provincia de Tungurahua. Para esto se conservó, almacenó, limpió y determinó la concentración de fenol de las muestras recolectadas, con los protocolos establecidos por el *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* 5530; para la obtención del micelio de *Pleurotus ostreatus*, se cultivó el hongo en Agar PDA y se incubó a 28 °C por ocho días. Posterior al crecimiento del hongo, se preparó el inoculó líquido con los discos de agar, homogenizando la muestra con 250 mL de agua destilada. La capacidad biodegradativa de *Pleurotus ostreatus* en medio líquido se evaluó sobre una muestra de efluente textil en soluciones fenólicas concentradas a 10 mg/L y 100 mg/L, complementariamente se determinó si la adición de un inductor de la capacidad enzimática mejoraba la capacidad de biodegradación del hongo; para esto se implementó un diseño experimental de tipo Diseño completamente al azar (DCA) con tres repeticiones para cada experimento establecido. Se determinó una concentración de fenol de 0.652 mg/L en el efluente analizado, la misma que se encuentra sobre el límite máximo permisible de descarga hacia cuerpos de agua dulce que es de 0.2 mg/L. En cada uno de los experimentos, se determinaron tasas de degradación mayores a 0.5, resultados concluyentes que demuestran la capacidad de biodegradación de fenol por *Pleurotus ostreatus* cultivado en un medio líquido, además se determinó que el extracto de paja de trigo tiene un efecto positivo en la producción de enzimas lignolíticas de *P. ostreatus* necesarias para la degradación de fenol, al obtener una mayor tasa de degradación (0.642) en comparación al experimento donde no se usó el extracto (0.556). Se recomienda realizar mediciones diarias de la concentración de fenol para determinar el tiempo en el que *P. ostreatus* degrada completamente el fenol.

Palabras clave: <BIOTECNOLOGÍA>, <MICROBIOLOGÍA>, <INDUSTRIA TEXTIL>, <FENOL> <EFICIENCIA> <BIODEGRADACIÓN> <HONGO (*Pleurotus ostreatus*)> <INDUCTOR>.

SUMMARY

The efficacy of the fungi *Pleurotus ostreatus*, in the biodegradation of phenols in effluents from the process of dyeing and washing jeans, in the canton of Pelileo, province of Tungurahua. For that, the phenol concentration of the collected samples was conserved, stored, cleaned and determined with the protocols established by the Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater 5530; to obtain mycelium *Pleurotus ostreatus* the fungus was cultivated in agar PDA and incubated at 28 °C for 8 days. After the growth of the fungus, the liquid inoculum is prepared with the agar plates, homogenizing the sample with 250 ml of distilled water. The biodegradable capacity of *Pleurotus ostreatus* in liquid medium was evaluated on a sample of textile effluent in concentrated phenolic solutions at 10 mg/L and 100 mg/L, complementarily it was determined if the addition of an inducer of the enzymatic capacity improved the biodegradation capacity of the fungus; for this a randomized experimental design was implemented with three replicates for each experiment. A phenol concentration of 0.652 mg/L was determined in the analysed effluent, which is above the maximum allowable discharge into fresh water bodies, which is 0.2 mg/L. In each of the experiments, degradation rates greater than 0.5 were determined, conclusive results demonstrating the biodegradability of phenol by *Pleurotus ostreatus* grown in a liquid medium, in addition it was determined that the extract of wheat straw has a positive effect on the production of lignolytic enzymes of *P. ostreatus* necessary for the degradation of phenol, by obtaining a higher rate of degradation (0.642) in comparison to the experiment where the extract was not used (0.556). It is recommended to perform daily measurements of the concentration of phenol to determine the time in which *P. ostreatus* completely degrades the phenol.

Key words: <BIOTECHNOLOGY>, <MICROBIOLOGY>, <TEXTILE INDUSTRY>, <PHENOL> <EFFICIENCY> <BIODEGRADATION> <HONGO (*Pleurotus ostreatus*)> <INDUCTOR>.

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN

Por el aumento de la actividad industrial en el mundo, los cuerpos de agua reciben de forma continua descargas de contaminantes tóxicos que exceden la capacidad de autodepuración de los ecosistemas, acarreado como consecuencia graves problemas de contaminación ambiental y un alto riesgo toxicológico para el hombre y los animales (Gómez, et al., 2008). Sin importar las presiones ambientales hacia los países industrializados, los productos químicos tóxicos siguen llegando a los ríos y arroyos, de forma deliberada o accidental (Rodríguez, et al., 1997). En la actualidad existe un gran interés y preocupación por la persistencia en el ambiente de estos contaminantes, lo que demanda la intervención científica y tecnológica, para hallar técnicas efectivas que permitan eliminarlos (Gayosso, et al., 2007).

Más de diez mil diferentes tipos de pigmentos y colorantes sintéticos son aplicados en industrias como la textil, papelera, cosmética y farmacéutica; muchas de las técnicas implementadas en estas industrias liberan ingentes cantidades de efluentes contaminados al ambiente. La principal fuente emisora de colorantes es la industria textil, los efluentes de la industria textil se caracterizan por presentar fluctuaciones extremas en parámetros como: la demanda química de oxígeno, la demanda bioquímica de oxígeno, pH, color y salinidad, estas variaciones dependerán de las sustancias químicas que se usen en el proceso (Cortazar, et al., 2010).

Los fenoles son sustancias que no se encuentren en aguas naturales en proporciones consideradas peligrosas para el ambiente y el ser humano; sin embargo, se encuentran notables concentraciones en efluentes derivados de aguas residuales de diferentes industrias como consecuencia de los procesos que se aplican en la elaboración de sus productos (Torres y Calva, 2002). Se utilizan principalmente en el proceso de teñido o como auxiliares que mejoran la implementación de otros componentes químicos, su alta toxicidad ha hecho que la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos de América y Comunidad Económica Europea, los consideren como contaminantes prioritarios, por esta razón la remoción de fenoles en aguas residuales industriales tiene gran importancia ambiental (Díaz, et al., 2005). A pesar de las características tóxicas de los compuestos fenólicos, varias especies de microorganismos han sido capaces de utilizar el fenol en condiciones aerobias como única fuente de carbono y de energía (Buitrón, et al., 2009).

En la actualidad existen tratamientos fisicoquímicos para la eliminación de los contaminantes en el agua, con un alto porcentaje de remoción, pero que poseen la desventaja de requerir elevados costos operacionales y la generación de nuevos residuos contaminantes (Rodríguez, et al., 2006). Una alternativa a los tratamientos fisicoquímicos son las tecnologías de biorremediación, que resultan atractivas para la recuperación del suelo y el recurso hídrico, por ser económicas, limpias, efectivas y seguras (Saval, 1998). El término biorremediación, se implementó a inicios de la década de los 80, que se desprende del concepto de remediación y se define como el uso de técnicas físico-químicas para impedir el daño y contaminación del ambiente, para el caso de la biorremediación, se centró los esfuerzos en la remediación biológica, basándose en la capacidad de los microorganismos para degradar de forma natural los compuestos contaminantes, lo que permite transformar dichos compuestos en otros químicamente diferentes e inoocuos, los sistemas biológicos generalmente usados son las bacterias, hongos o vegetales (Di paola y Vicién, 2010).

El interés por el uso de los hongos de pudrición blanca (HPB) ha ido en aumento con propósitos de biorremediación, debido a los sistemas enzimáticos ligninolíticos que poseen, que degradan un amplio grupo de contaminantes ambientales, motivo por el cual se los considera como un método biológico no convencional de alta eficiencia (Fernández, et al., 2009). En un inicio los estudios se centraron en *Phanerochaete chrysosporium*; a medida que los estudios avanzaron especies de otros géneros mostraron también gran potencial para la biorremediación, como por ejemplo *Trametes*, *Bjerkandera* y *Pleurotus* (Gayosso, et al., 2007). Entre las enzimas lignolíticas se encuentran la lacasa, la manganeso-peroxidasa, lignina peroxidasa y otras oxidasas, estas son catalizadoras de la oxidación de la lignina, gracias a su comportamiento inespecífico son capaces de degradar compuestos xenobióticos con estructura química semejante a la lignina, como: colorantes y efluentes textiles, contaminantes como dicloro-difenil, bifenilos policlorados entre otros (Domínguez, et al., 2010).

En este contexto, el presente trabajo de titulación tiene como objetivo principal “Evaluar la eficiencia del hongo *Pleurotus ostreatus*, en la biodegradación de fenoles en efluentes de procesos de teñido y lavado de jean”.

1.1.- Justificación de la investigación

El cantón Pelileo es uno de los mayores productores de Jean a nivel nacional se encuentra ubicado la zona centro del país, en la provincia de Tungurahua, posee múltiples fábricas dedicadas a la elaboración de textiles, esto ha generado trabajo y un crecimiento socioeconómico notable para sus habitantes, transformándose en una de las actividades económicas más relevantes del cantón, esto se ve contrastado debido a los problemas ambientales que se producen por esta actividad productiva, ya que los efluentes producidos por los procesos industriales que conlleva la industria textil, son altamente contaminantes por la diversidad de compuestos químicos que son aplicados; estos son descargados sin recibir un tratamiento previo a quebradas, ríos, acequias y riachuelos, ocasionan un grave problema ecológico, por el uso extendido de los fenoles presentes en colorantes y sus fuertes repercusiones. Por tal motivo, el sector textil genera un alto impacto ambiental, pues la estabilidad de algunos anillos aromáticos hace que estos compuestos sean resistentes a su degradación en el ambiente y que se conviertan en contaminantes muy persistentes que resultan de alto peligro para la conservación y preservación del ambiente. Además, los fenoles son potencialmente riesgosos para los seres humanos y la vida acuática, fundamental en el equilibrio de los ecosistemas, son considerados por la agencia de protección ambiental de los Estados Unidos como un compuesto toxico/contaminante

Los tratamientos convencionales como los físicos y químicos, a pesar de limpiar el agua de contaminantes, generan residuos que siguen siendo un problema al ser aún más tóxicos, por esta razón es necesario la generación de nuevas técnicas, que sean amigables con el ambiente; la biorremediación es una importante alternativa, para la biodegradación del fenol, campo de estudio en el que se ha avanzado, pero no lo necesario, utilizando procesos aerobios como anaerobios, tanto bacterias como hongos se han utilizado en una variedad de estudios, con resultados positivos y alentadores. Uno de los principales obstáculos para este tipo de tratamientos es que el crecimiento de los microorganismos se puede ver limitado por las altas concentraciones de los contaminantes, para reducir este problema se ha implementado, fuentes convencionales de carbono, también llamados co-sustratos, que aumentan la tolerancia al contaminante, optimizando su biodegradación.

La industria textil en su mayoría no tiene implementadas plantas de tratamiento para las aguas residuales generadas durante los procesos de manufactura, principalmente por los altos costos que implica este tipo de tratamientos; el presente trabajo investigativo propone una alternativa para el tratamiento de aguas residuales contaminadas con fenol, buscando la biodegradación de este contaminante mediante el aprovechamiento de las capacidades enzimáticas de los hongos de la

putrefacción blanca, para degradar compuestos fenólicos y sus semejantes como *Pleurotus ostreatus*, utilizando un cultivo líquido para el hongo, que permite producir una mayor cantidad de biomasa de mejor calidad y en menor tiempo, en contraposición a un cultivo sólido donde los tiempos se alargan y se corre más riesgos de contaminación por manipulación, además favorece la dispersión y adaptación del hongo, facilitando su manipulación al ser aplicado en el efluente, este proceso representa una alternativa amigable con el ambiente, ya que no genera compuestos secundarios tóxicos.

1.2.- Objetivos

1.3.1.- Objetivo general:

- Evaluar la eficiencia del hongo *Pleurotus ostreatus*, en la biodegradación de fenoles en efluentes de procesos de teñido y lavado de jean.

1.2.2.- Objetivos específicos:

- Determinar los fenoles presentes en una muestra de efluente de procesos de teñido y lavado de jean.
- Evaluar la tasa de degradación de fenol en cultivos sumergidos de *Pleurotus ostreatus*.
- Determinar el efecto de un agente inductor en la capacidad de degradación de fenol por *Pleurotus ostreatus* en cultivos sumergidos.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Contaminación del agua

En la actualidad el progresivo desarrollo de la industria ha ocasionado una gran dependencia del recurso hídrico, generando como resultado aguas residuales con altas concentraciones de contaminantes tóxicos y persistentes, siendo esta la principal amenaza para modificar la calidad del agua. Uno de los principales desafíos es determinar las sustancias químicas que puede ser perjudiciales para las aguas dulces y marinas tanto superficiales como subterráneas, requiriendo un control que se dificulta por la poca cantidad de información disponible. La contaminación proveniente de sustancias químicas con metales pesados, disolventes o colorantes, llegan alcanzar el medio acuático de varias formas, como efluentes vertidos de forma directa por la industria o procedentes de estaciones depuradoras de aguas residuales, mismas que no cumplen con los tratamientos adecuados (Carrera, 2001).

2.1.1. Contaminación de la industria textil

La contaminación de aguas resultantes de actividades domésticas e industriales, es uno de los principales causantes de la contaminación del ambiente, entre las industrias que más proporción de agua residuales produce esta la textil; dentro de la variada composición de elementos químicos provenientes del proceso global de su manufactura se encuentran los siguientes: sales, ácidos, almidones, peróxidos, pigmentos dispersos, enzimas, colorantes, metales y otros compuestos químicos y orgánicos de variada estructura. En general las corrientes de agua de descarga son generadas principalmente del desgomado (15%), descrude y macerado (20%) y del blanqueo, teñido y lavado (65%) (Chacón, et al., 2002).

La generación de agua residual en una instalación de teñido para la coloración se encuentra en una proporción de 15 a 20 galones por libra, la principal fuente de agua residual es del baño de tinta y el agua de lavado, mismos que contienen subproductos como colorantes hidrolizados, algo de tinte intacto y sustancias químicas auxiliares. En la elaboración de productos textiles se realizan un gran número de procedimientos unitarios retroalimentados que usan variadas materias primas, como algodón, lana, fibras sintéticas o una combinación de estas cuyo impacto ambiental es

mínimo y más controlable, pero el daño causado por sus efluentes líquidos contrasta por la mayor variedad de materias primas y reactivos que cambian de acuerdo al método de producción, siendo tóxicos y altamente perjudiciales para la salud y el ambiente. (Garcés, et al., 2001).

De forma general las moléculas de los colorantes que se ocupan en la actualidad son de estructura variada y compleja, en su mayoría de origen sintético, muy solubles en agua, altamente resistentes a la acción de agentes químicos y poco biodegradables, alrededor de un 60% de los colorantes en uso en la industria textil actual son reactivos, cuya característica es formar una unión éter con la fibra, lo que garantiza una duración mayor del color en el tejido (Garcés, et al., 2001).

2.1.1.1. Uso de compuestos fenólicos en la industria textil

En la industria textil se utilizan grandes variedades de colorantes sintéticos, los más comunes son: nonil-fenol, o-octil-fenol y o-fenil-fenol, parte del proceso textil está conformado por el teñido, las etapas de desengomado, tinturado y estampado para el acabado de telas y prendas, siendo el tinturado la más compleja y en donde se excluye el agua residual con grandes concentraciones de sulfuros, detergentes y fenoles, con una temperatura superior a los 35 °C (Echeverri, 2011). En el proceso de tinturado se usa colorantes sintéticos, los cuales habitualmente son de la clase azoico, estos son tintes hidrosolubles, colorantes que se preparan uniendo una amina aromática diazotada con un fenol.

El rojo fenol es usado como colorante textil, a pesar de esto el fenol es más utilizado como un auxiliar durante el proceso de teñido, mejorando la adsorción del colorante al tejido actuando fenil, fenoles y bencenos clorinados, otra clase de auxiliar en el teñido son los compuestos provenientes del éter de alquil fenoles, actuando como igualadores retardantes, formando complejos agregados de reducida estabilidad con las moléculas del colorante, que se va descomponiendo, liberando moléculas individuales de colorante a medida que se cambian factores externos como pH, temperatura, entre otros (Fritschi, et al., 2004).

Los fenoles también son aplicados como colorantes aniónicos en la tintura de fibras poliestéricas a temperaturas entre 125 °C y 135 °C, a pesar de estar a estas temperaturas conservan sus características detergentes, dispersantes y tensoactivas, durante esta etapa de tintura, dispersan las sustancias solidas o los colorantes precipitados o coagulados. Los acelerantes de teñido son otros auxiliares conformados por compuestos fenólicos como orto y para fenil fenol, su gran carga contaminante ha ocasionado que estos productos sean prohibidos dentro de la industria textil (Acosta, 2010).

En la industria textil, uno de los problemas a tener en cuenta está relacionado con los surfactantes, emulsificantes y dispersantes, en cuya composición se encuentra el fenol. Los surfactantes generalmente son usados para mejorar la solubilidad y dispersión de los compuestos químicos en el agua, además aseguran la humectación, mejorando la penetración de químicos y tintes, la humectación se mejora ya que reducen la tensión superficial de la tela. Su toxicidad se encuentra fuertemente influenciada por su biodegradabilidad, los surfactantes relacionados con el fenol son el nonifenol y alquifenoletoxilato (Acosta, 2010).

En forma general, los compuestos químicos y colorantes usados en los procesos que lleva a cabo la industria textil son creados para ser resistentes a las variadas condiciones climáticas, como consecuencia aumenta la dificultad para ser removidos de las aguas residuales provenientes del proceso de teñido.

2.2. Fenol

Fue aislado por primera ocasión en 1834, a partir del alquitrán de carbón, este fue la principal fuente explotada para la obtención de este compuesto hasta la primera guerra mundial, más tarde la producción se realizó a partir de síntesis química y el uso de catalizadores, el fenol también se produce de forma natural, pues se encuentra en la lignina de las especies vegetales y a partir de la descomposición de materia orgánica (Lacorte y Barcelo, 1995).

El fenol es un componente químico largamente usado en la obtención de bisfenol-A, que es un intermediario en la producción de resinas epóxicas y fenólicas, las que ocupan el 70% del fenol generado por la industria. Otros usos del 25% de la producción de fenol son la síntesis de caprolactamas, anilina, alquifenoles y xilenoles. El 5% restante está destinado a la elaboración de agentes desinfectantes y la elaboración de medicinas como ungüentos, gotas y lociones antisépticas (ATSDR, 1998).

2.2.1. Propiedades físicas y químicas

De acuerdo a lo mencionado por Rodríguez (2003) a continuación, se muestran las principales características físico/químicas del fenol (Tabla 1).

Tabla 1-2. Características físico/químicas del fenol

Propiedad	Valor
Punto de fusión (°C)	41 material ultra puro / 43
Punto de Ebullición (°C)	182
Densidad (gr/cm ³)	1049
Solubilidad a 25 C (%)	8.7
Coeficiente de partición	
Log K _{ow}	28840
Log K _{oc}	52
Presión de vapor a 25 C (Pa)	47
pH	4.8 – 6.0 al 5% en agua
Color	Sin color a un rosado bajo
Olor	Aromas definidos, algo repugnante, dulce y picante
Estado físico	Sólido
Peso molecular	94.11

Fuente: Rodríguez, (2003)

Log K_{ow} = Coeficiente octogonal/agua

Log K_{oc} = Coeficiente de partición octanol/carbono

El punto de fusión para los fenoles es bajo, pudiendo ser líquidos y sólidos; posee un punto de ebullición alto, por la formación de puentes de hidrógeno. Es sensible con agentes oxidantes, sufre varias reacciones de sustitución electrofílica, como la halogenación y sulfonación, la formación de las resinas fenólicas son producto de la hidroximetilación produciendo la condensación del fenol en presencia de formaldehído, además el fenol se quema en presencia de oxígeno, produciendo monóxido de carbono, consecuencia de la combustión incompleta (Morrison y Boyd, 1998).

2.2.2. Tipos de Fenol

Existen dos tipos de fenol, los naturales sintetizados por la naturaleza y los sintéticos elaborados por la industria.

2.2.2.1. Fenoles naturales

Son un grupo de sustancias químicas orgánicas de importancia biológica, forman parte de una variedad de estructuras celulares de plantas y árboles, otros se forman como producto del metabolismo celular o a su vez son producidos por ciertos vegetales como compuestos bactericidas. Los fenoles naturales se clasifican en:

1. Fenoles vegetales simples, algunos son secretados como sustancias antibacterianas por macroalgas, mientras otros se generan como producto de la transformación metabólica de compuestos aromáticos.
2. Materiales de tinción, se ubican en las vacuolas de los tejidos vegetales, acumulándose en grandes cantidades en los tejidos secos. Pueden ser hidrosolubles y condensados, se disuelven en agua; por su bajo grado de polimerización son utilizados en la industria peletera (Torres y Calva, 2002).

2.2.2.2. Fenoles sintéticos

Son todos los producidos por el hombre para las actividades industriales, dentro de los más comunes tenemos los clorofenoles altamente tóxicos y persistentes, son usados en la elaboración de plaguicidas y en la industria de la pulpa de papel; los polifenoles con sustituyente alquílicos forman parte de la industria de materias plásticas y de textiles (Torres y Calva, 2002).

2.2.3. Efectos ambientales y en la salud humana

El fenol y sus derivados como los orto, meta y p-cresol fenoles en conjunto con los tres difenoles isómeros: pirocatequina, resorcina e hidroquinona, tienen una toxicidad altamente considerable, se los puede encontrar generalmente en las aguas residuales evacuadas por las distintas industrias. Son contaminantes habituales y los que producen mayor daño al medio ambiente modificando la cadena alimentaria, son complejos de biodegradar, el tiempo de vida media de desintegración está entre 2 y 72 días, presentan una elevada toxicidad para la vida acuática, tiene un olor fuerte y desagradable, la EPA estableció un nivel de preocupación de 0.002 µg/L, concentraciones de 5 a 25 mg/L pueden llegar a ser tóxicas y/o letales para los peces, estudios con animales han considerado al fenol como embriotóxico y fetotóxico pero no teratogénico, en concentraciones bajas no se mantiene ni en el aire, suelo o aguas superficiales ya que reacciona fotoquímicamente

en el aire y agua superficial, siendo biodegradado de forma aeróbica y anaeróbica (Kirk y Othmer, 2012).

En la salud humana, al ser un compuesto corrosivo fuerte, causa quemaduras y es irritante para los ojos, membranas y mucosas; si se ingiere de forma accidental provoca convulsiones, afectando al hígado y los riñones, causa diarrea, dolor de garganta y coloración oscura de la orina. Se registran muertes en adultos después de ingerir 1 g, a nivel sanguíneo una concentración de 4.7 a 130 mg, 100 mg es letal. La principal fuente de exposición toxica al fenol es el contacto directo con la piel, el vapor y líquido son absorbidos por la piel de forma rápida y fácil, ocasiona quemaduras graves, efecto analgésico, convulsiones y shock. De la misma forma soluciones diluidas < 2% ocasionan quemaduras severas si el contacto es extenso, en ciertos casos la absorción por la piel de estas sustancias puede ocasionar la muerte. Si es inhalado será absorbido por los pulmones, produciendo una toxicidad sistemática, por su baja volatilidad, el riesgo de inhalación es mínimo a temperatura ambiente, ocasiona síntomas no inmediatos como: vértigo, tos dolor de cabeza jadeo y pérdida de conocimiento (Kirk y Othmer, 2012).

2.2.4. Normativa ambiental para la descarga de aguas residuales

El fenol, al ser uno de los principales contaminantes de las aguas residuales de la industria textil, es incluido por el ministerio del ambiente en el Acuerdo N° 061 de la Reforma del Texto Unificado de Legislación Ambiental Secundaria, Libro VI: Anexo 1, donde se presenta la Norma de Calidad Ambiental y de descarga de efluentes recurso agua, los límites máximos permisibles del fenol a distintos receptores se describen en el Figura 1-2.

Cuerpo receptor	Parámetro	Expresado como	Unidad	Límite máximo permisible	
Aguas de consumo humano y uso doméstico, que únicamente requieren tratamiento convencional	Compuestos fenólicos	Fenol	mg.L ⁻¹	0.002	
Aguas de consumo humano y uso doméstico que únicamente requieran desinfección	Compuestos fenólicos	Fenol	mg.L ⁻¹	0.002	
Criterios de Calidad admisibles para la preservación de la flora y fauna en:	Agua fría dulce	Fenoles	Fenoles	mg.L ⁻¹	0.001
	Agua cálida dulce	Fenoles	Fenoles	mg.L ⁻¹	0.001
	Agua marina y de estuario	Fenoles	Fenoles	mg.L ⁻¹	0.001
Aguas subterráneas, considerando un suelo con contenido de arcilla entre (0-25,0) % y de materia orgánica entre (0 - 10,0)%.	Fenol	--	µg.L ⁻¹	1000	
Aguas destinadas para fines recreativos	Compuestos fenólicos	Fenol	mg.L ⁻¹	0.002	
Sistema de alcantarillado público	Compuestos fenólicos	Fenol	mg.L ⁻¹	0.200	
Cuerpo de agua dulce	Compuestos fenólicos	Fenol	mg.L ⁻¹	0.200	
Cuerpo de agua marina	Compuestos fenólicos	Fenol	mg.L ⁻¹	0.200	

Figura 1-2. Límites máximos permisibles del fenol a distintos receptores

Fuente: Texto Único de Legislación Ambiental Secundario

A nivel internacional, en el caso de los Estados Unidos ha impuesto una concentración de una parte por billón (1 µg/L) de fenol para aguas superficiales, en el continente europeo la Unión Europea acordó un límite máximo de fenoles para agua potable y mineral de 0.5 µg/L, en lo que respecta al límite de fenol en aguas residuales es de 0.5 mg/L para aguas superficie y 1 mg/L para el alcantarillado

2.2.5. Tratamientos para aguas residuales con presencia de compuestos fenólicos

Existe una diversidad de tratamientos para aguas residuales, que son aplicados tomando en cuenta aspectos como los niveles de contaminación que presente el agua, la cantidad, el tipo de contaminante, el destino final que tendrá el agua tratada, entre otros.

2.2.5.1. Tratamientos Físicos

Dentro de las técnicas empleadas en los tratamientos físicos esta la adsorción mediante resina de intercambio iónico, es una técnica efectiva ya que permite remover hasta un 99.9 % de anilatos, con una capacidad de captación de boro, arsénico, compuestos fenólicos y aromáticos entre otros, esta técnica emplea una columna que posee el material de intercambio iónico, los contaminantes quedan atrapados cuando el efluente pasa por la columna, la principal desventaja de esta técnica

es el ser demasiado selectiva, por lo que no es adecuada cuando el agua contiene grandes cantidades de sólidos suspendidos, las resinas usadas en este tratamiento son de tipo orgánico, por su fácil regeneración, como: las resinas carbonaceas sulfonadas o polímeros por concentración y adición (Jiménez, 2001).

En la adsorción mediante carbón activado, las aguas afectadas con fenol son tratadas mediante un proceso de eliminación que se ejecuta en una columna, que en su interior contiene un filtro de carbón activado, este es un lecho de carbón granular microporoso, por este atraviesa de forma continua el agua contaminada; una de las ventajas del carbón activado para suprimir el fenol es su elevada superficie interna y carácter apolar, que permite capturar sustancias apolares como el fenol, además es necesario controlar factores como el pH, temperatura, concentración de fenol y tiempo de contacto (Gómez, et al., 2006).

La extracción con disolventes, se recomienda para elevadas concentraciones de fenol hasta de 9 mg/l. ya que es un método económico y eficiente, y uno de los utilizados para recuperar fenol, por lo que de acuerdo a la clase de industria si esta necesita recuperar fenol, lo más idóneo es recuperarlo por este método y el remanente de agua tratarlo con una técnica biológica o química, el principal inconveniente es que se tiene pérdida de los disolventes, siendo estos otros tipos de contaminantes (Gómez, et al., 2006).

2.2.5.2. Tratamientos Químicos

Los procesos químicos son de utilidad y costosos de acuerdo a la técnica elegida para la eliminación del fenol, como los procesos de oxidación húmeda, dentro de estos tenemos la oxidación húmeda catalítica, que se aplica a temperaturas, presiones moderadas y catalizadores de tipo inorgánico como metales nobles, óxidos metálicos, complejos metálicos, difíciles de conseguir si se toma en cuenta el efluente a ser tratado (Quintanilla, et al., 2014).

La oxidación húmeda subcrítica es una técnica de bajo costo, donde las condiciones de trabajo son más simples a la de la supercrítica, a pesar de esto siguen siendo condiciones de operación con temperaturas que varían entre 125 y 300 °C, con presiones de 0.5 a 2 MPa, uno de los problemas es la formación de material polimérico difícil de degradar, este proceso se puede tomar a consideración cuando se tienen caudales mayores a 1 m³/h y altas concentraciones de compuestos orgánicos (Bacardit, et al., 2007).

Por su parte los procesos de oxidación avanzada requieren la generación de especies transitorias como el grupo hidroxilo, este actúa de forma correcta para degradar materia orgánica como el

fenol, en consecuencia, se dan cambios profundos en la estructura química de los contaminantes, generando subproductos que no necesitan procesos de descontaminación posteriores, su uso es recomendable cuando la materia orgánica contaminante es elevada superando el 1 g/L (Forero, et al., 2005).

2.2.5.3. *Tratamientos biológicos*

Consiste en la implementación de organismos con capacidades específicas naturales para eliminar sustancias contaminantes, una de las principales ventajas es que no existen daños colaterales con el ambiente al momento de su implementación, ya que, durante el proceso de eliminación de los contaminantes, no se produce sustancias secundarias que lo afecten; los principales tratamientos biológicos se describen a continuación:

2.2.5.3.1. Degradación por enzimas

La implementación de enzimas puras para degradar contaminantes específicos ha demostrado ser más efectiva que los organismos intactos, ofreciendo grandes ventajas sobre los tratamientos convencionales, dentro de estas tenemos la peroxidasa del rábano, peroxidasa de soja o polifenol oxidasa, que actúan como biocatalizadores permitiendo la obtención de reacciones a mayor velocidad, con condiciones suaves de operación y trabajando con variedades amplias de fenoles, las enzimas se usan cuando existe una concentración elevada de contaminantes tóxicos donde los microorganismos no pueden crecer (Gómez, et al., 2006).

2.2.5.3.2. Degradación por algas y plantas

Conocida como fitodegradación, las plantas a usarse pueden ser acuáticas o terrestres, encargándose de transformar los contaminantes en subproductos no tóxicos o de inferior toxicidad, para ser arrojados al medio ambiente. Las plantas se usan como bombas extractoras que limpian el suelo y agua, siendo un proceso que actúan más rápido que tratamientos implementados con microorganismos, al igual que estas las algas también usan el carbón del fenol, formando con ello sus aminoácidos, lípidos y ácidos nucleicos (Ereno, 2010).

2.2.5.3.3. Degradación por microorganismos

La degradación de fenol por microorganismos tiene como principio la biorremediación, aprovechando las concentraciones de fenol en el agua residual como una fuente de carbono y energía para la carga bacteriana, este proceso se lo hace comúnmente en condiciones aeróbicas, se basa en el uso de oxígeno molecular para romper el anillo aromático, es una técnica biológica que es efectiva y amigable con el medio ambiente, se requiere de bacterias y hongos que a nivel de laboratorio son adecuados para altas concentraciones del contaminante, es importante suplementar el sistema con fuentes de carbono extra como extractos de levadura o glucosa (Echeverri, 2011).

2.3. Biorremediación

Es un proceso que hace uso de las capacidades catalíticas de los organismos vivos para degradar y transformar contaminantes en ecosistemas terrestres y acuáticos, tienen un gran potencial en la mitigación de la contaminación ambiental. La biorremediación se ha concentrado en la explotación de la diversidad genética y versatilidad metabólica característica de las bacterias, para transformar contaminantes en productos inocuos o a su vez menos tóxicos, que puedan formar parte de los ciclos biogeoquímicos naturales, sumándose en la actualidad otros organismos como los hongos y las plantas (Garbisu, et al., 2002).

Dentro de las ventajas de los procesos de biorremediación podemos mencionar que mientras los tratamientos físico y químicos convencionales están basados en transferir la contaminación entre medios gaseoso, líquido y sólido, en la biorremediación se transfiere poca contaminación de un medio al otro, además es una tecnología poco intrusiva en el medio, que no requiere de componentes estructurales o mecánicos a destacar, lo que conlleva a que sea un método económico, que al ser un proceso natural ha tenido la aceptación de la opinión pública (Martín y Gallego, 2005).

Como todo proceso de descontaminación la biorremediación presenta inconvenientes y limitaciones, como puede ser la biodegradación incompleta, misma que genera intermediarios metabólicos inaceptables, con una capacidad contaminante similar o incluso superior al producto inicial, por otra parte existen compuesto resistentes o inhibidores de estos procesos, que sumado a los tiempos requeridos y procesos de seguimiento y control laboriosos, pueden dificultar su aplicabilidad (Martín y Gallego, 2005).

El campo de aplicabilidad de la biorremediación es amplio, donde se considera como objeto cada estado de la materia:

- Sólido. - aplicable a medios contaminados como suelo, sedimentos, lodo o residuos.
- Líquido. - aguas superficiales y subterráneas o agua residuales
- Gases. - emisiones industriales y productos provenientes del tratamiento de aguas y suelos (Rojas, 2011).

En cuanto a lo correspondiente a los contaminantes propiamente dichos, existen numerosos estudios de biodegradación de compuestos orgánicos tóxicos, de tipo aerobia y anaerobia de hidrocarburos aromáticos policíclicos en suelo; la biodegradación de clorofenoles y derivados fenólicos o de otros hidrocarburos mono-aromáticos como el tolueno y xileno por bacterias y hongos (Rojas, 2011).

2.3.1. Tipos de biorremediación

La implementación de las técnicas de biorremediación se las realiza de dos formas, que se describen a continuación:

2.3.1.1. Biorremediación in situ.

Consiste en el tratamiento de los compuestos tóxicos en el lugar donde se produjo la contaminación, esto se puede aplicar a partir de dos técnicas:

- Bioaumentación. Adición de microorganismos naturales o manipulados genéticamente al medio.
- Bioestimulación. Cuando el medio es modificado para estimular el crecimiento de los microorganismos (Rodríguez, 2005).

2.3.1.2. Biorremediación ex situ

Los residuos tóxicos son tratados en biorreactores vía suspensión, se usan para la biorrecuperación de terrenos contaminados, el suelo se introduce en un recipiente de contención con el agua necesaria que permita una mezcla continua, generalmente se optimiza la biorrecuperación añadiendo nutrientes orgánicos o inorgánicos, con un control continuo de pH y temperatura, finalizado el proceso los suelos son retirados y devueltos al lugar de origen, los líquidos se evaporarán o se usan en un nuevo proceso (Rodríguez, 2005).

2.3.2. Aplicaciones de hongos en biorremediación

Aunque buena parte de los estudios realizados se han centrado en bacterias por la facilidad que ofrecen para analizar sus vías metabólicas y llevar a cabo construcciones genéticas que permitan degradar contaminantes específicos, la capacidad de los hongos para actuar sobre una variedad de compuestos orgánicos, brinda un potencial innegable para su uso en la eliminación de contaminantes, ese potencial radica en las características de su sistema enzimático y su crecimiento vigoroso que le permite a partir del crecimiento del micelio, colonizar diferentes tipos de medios, por otra parte los hongos poseen una capacidad muy notable para acumular metales pesados y una gran variedad de especies viven en ríos con altas concentraciones de minerales y bajo pH (Moreno, et al., 2004).

Para la biorremediación de efluentes contaminados la variedad de hongos más utilizados son los hongos de la podredumbre blanca (HBP) como *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* y *Phanerochaete chrysosporium*, dentro de las enzimas caracterizadas de los HBP se identificaron las de tipo oxidasas (lacasas y MnP), estas enzimas se han implementado de forma mayoritaria en el tratamiento de aguas residuales o productos recalcitrantes, su acción sobre los colorantes se basa en su no especificidad del sistema enzimático para despolimerizar y mineralizar la lignina (Moeller y Garzón, 2003).

2.3.2.1. Hongos de la podredumbre blanca

Es un grupo heterogéneo de microorganismos, que tienen en común la capacidad de degradar la lignina y varios componentes de los árboles como la celulosa, además son capaces de producir enzimas extracelulares que oxidan varios compuesto fenólicos incluyendo los asociados con la lignina, la proporción de lignina y polisacáridos degradados y ocupados por estos hongos a partir de enzimas varía al igual que el orden de ataque de ellas, generalmente los hongos de la podredumbre blanca ataca al mismo tiempo la celulosa y lignina, transformando la última hasta un 70% en CO₂ y H₂O, existiendo la evidencia de que la energía utilizada para la degradación es suministrada por fuentes accesibles como polisacáridos y azúcares de bajo peso molecular (Manzano, et al., 2011).

2.3.2.2. Principales enzimas involucradas en la biorremediación por hongos de la podredumbre blanca.

Formando parte del sistema enzimático extracelular están las lacasas, manganeso peroxidasa (MnP), lignina peroxidasa (LiP), enzimas generadoras de peróxido, metabolitos de bajo peso molecular y sistemas reductores, con la capacidad de degradar compuestos complejos como la lignina, en general una gran parte de los hongos se ha visto que la ligninólisis se genera en el metabolismo secundario, es decir en la limitación de nutrientes, lo que ocasiona que el hongo solo sintetice y secrete agentes ligninolíticos que empiezan a desintegrar el polímero (Sathiya, et al., 2007).

2.3.2.2.1. Lacasas

Son enzimas que forman parte del sistema enzimático ligninolítico producido por los hongos de la podredumbre blanca, es un fenol oxidasa con cobre que oxida anillos de lignina en ausencia de Lip, poseen un grupo N-glicosilato que tiene en su estructura dos monosacáridos: Manosa y N-acetilglucosamina, además de cadenas glicosídicas adjuntas a oxígeno y nitrógeno (Call y Mucke, 1997).

La enzima necesita de peróxido de hidrogeno que oxida al ion hierro para incrementar el estado de oxidación en el cual la enzima puede despolimerizar lignina y sus derivados para realizar su ciclo catalítico, además reduce el oxígeno a agua y muchos sustratos aromáticos, al mismo tiempo cataliza la remoción de un átomo de hidrogeno por un grupo hidroxilo (Zille, et al., 2003). Para poder oxidar fenoles, polifenoles y aminas aromáticas, lo que permite que se realice la polimerización, dipolimerización, metilación y/o dimetilación de compuesto fenólicos (Claus, 2003). Para una actividad optima el pH del medio puede varias de 3 a 7, con una media de 4.5 donde es totalmente estable a una temperatura de 37 °C por un mínimo de 5 días (Gayosso, et al., 2007).

2.3.2.2.2. Manganeso Peroxidasas

La enzima manganeso peroxidasa MnP es una hemo proteína que cataliza la oxidación de Mn^{+2} a Mn^{+3} dependiente de peróxido (H_2O_2), su capacidad de oxidación es solo para absorber electrones de estructuras fenólicas, el Mn^{+3} es quelado por varios ácidos orgánicos como glicolato, capaz de oxidar una variedad amplia de compuestos fenólicos (Gayosso, 2004). En elevadas concentraciones de manganeso se produce una inhibición de la enzima, debido a la generación de grandes cantidades de peróxido de hidrogeno que detienen el ciclo catalítico de la enzima, afectando la cantidad de biomasa fúngica y el desarrollo de los micelios del hongo (Gómez, et al., 2005).

La actividad de la MnP es incitada por la acción de lignina peroxidasa, en presencia de CuSO_4 y por sustratos como el lactato, este contribuye a la oxidación de Mn^{+2} a Mn^{+3} , el pH es un factor de importancia a tener en cuenta ya que la enzima es inestable a pH mayores a 7.5, donde la actividad es nula (Gómez, et al., 2005).

2.3.2.2.3. Lignina peroxidadas

Es la primera enzima en descubrirse y se parece a otras peroxidadas en que posee el grupo hemo férrico y funciona siguiendo la vía catalítica en que Lip es oxidada por H_2O_2 , produciendo un intermediario deficiente de electrones, este vuelve a su estado natural de reposo inicial por medio de oxidaciones posteriores (Gómez, et al., 2005).

Es una glicoproteína monomérica que tiene 11% de carbohidratos, su pH óptimo se encuentra entre 2.5 y 3, catalizando la oxidación de la lignina y compuestos que tengan estructuras homologas a esta, la lignina peroxidasa por síntesis endógena de peróxido es capaz de oxidar compuestos aromáticos no fenólicos y cliva cadenas laterales de aril propano y enlaces éter, abriendo el anillo aromático e hidroxilandolo (Cullen, 1997).

2.3.2.3. Efectos de la suplementación de co-sustratos

Los microorganismos no son capaces de metabolizar un sustrato como única fuente de carbono y energía, pero es capaz de transformarlo si se les suministra un sustrato de crecimiento alternativo, a esto se lo conoce como co-sustrato, este fenómeno es conocido como co metabolismo y se realiza cuando un microorganismo convierte a un compuesto, pero sin que este sea su fuente primaria de carbono y energía. En diferentes trabajos se ha evaluado la capacidad de degradación aeróbica de colorantes azo utilizando hongos de pudrición blanca y variadas fuentes de carbono como glucosa, almidón y lactosa (Padmavathy, et al, 2003).

De acuerdo con lo realizado por (Wang, et al., 2001) la presencia de una fuente de carbono sencilla como glucosa favorece a la decoloración de residuales papeleros en los hongos de podredumbre blanca por la inducción que genera frente a enzimas de tipo oxidadas y lacasa. Por su parte (DU, et al., 2004) estudiaron el comportamiento de co-sustratos como glucosa, almidón, celulosa y glicerol en *Pleurotus ostreatus* determinando cuál de ellos genera una mayor actividad lacasa.

2.4. *Pleurotus ostreatus*

La palabra *Pleurotus* proviene del griego “*Pleuro*”, que significa desarrollado lateralmente, en referencia a la posición que adopta el pie del hongo con respecto a su sombrero. La palabra *ostreatus*, significa en forma de ostra, en referencia a la forma y color del cuerpo fructífero (Stamets, 2000). También llamado de forma vulgar pleuroto en forma de concha, seta de chopo, seta de ostra o orellana. Es una especie saprofita o parasita débil de árboles caducifolios, raramente fructifica en coníferas (Zanón, et al., 2005). Actualmente es utilizado en biorremediación ya que el sistema ligninolítico de *Pleurotus ostreatus* está conformado por enzimas oxidativas no específicas, con la capacidad de metabolizar y mineralizar hidrocarburos policíclicos aromáticos y colorantes artificiales derivados de la industria textil. Esta actividad se encuentra relacionada a la producción de enzimas como manganeso peroxidasa, lignina peroxidasa y lacasa (Gayosso, et al., 2004).

2.4.1. Clasificación taxonómica

Según IMA (2016) (Asociación Internacional de Micología) la clasificación taxonómica del hongo *Pleurotus ostreatus* es la descrita en la Tabla 2, presentada a continuación.

Tabla 2-2. Taxonomía de *Pleurotus ostreatus*

Reino	Fungí
División	Basidiomycota
Clase	Agaricomycetes
Subclase	Agaricomycetidae
Orden	Agaricales
Familia	Pleurotaceae
Género	<i>Pleurotus</i>
Especie	<i>ostreatus</i>

Fuente: IMA, (2016)

2.4.2. Morfología

El cuerpo fructífero (Figura 2-2) posee un sombrero redondeado, de superficie lisa y abombada. Presenta una forma convexa cuando es joven, pero se aplana en la madurez, a su vez el borde es

enrollado inicialmente. El diámetro fluctúa entre 5 y 15 cm en función de la edad del hongo. El color varía entre tonalidades gris claro hasta pardo, sin embargo, obtiene una coloración amarillenta con el tiempo. En la parte inferior del sombrero se sitúan las laminillas distribuidas de manera radial, separadas entre sí, que van desde el pie hasta el borde y de color blanco o crema (Barbado, 2003).



Figura 2-2. Cuerpo de fructífero de *Pleurotus ostreatus*

Fuente: Barbado (2003)

El pie también denominado estípote es corto y grueso, de 0.5 a 3.0 centímetros de longitud y un espesor de 0.5 a 2.0 centímetros. Es excéntrico o lateral, con pubescencia densa de color blanco en la base. No presenta anillo ni volva (Ardón, 2007). La forma y longitud del pie depende de la situación del hongo. Cuando crecen varios hongos juntos, forman repisas laterales superpuestas en el costado de los árboles, en tal caso los pies se encuentran unidos unos con otros, son cortos y están contiguos al borde de los sombreros. Sin embargo, al desarrollarse de manera aislada sobre una superficie horizontal, el pie puede ser largo y central (García, 1985).

2.4.3. Ciclo de vida

Presenta un ciclo de vida de un basidiomiceto “típico” dividido en dos fases (Figura 3-2), crecimiento vegetativo (esporas y micelio) y crecimiento reproductivo en el que se da la formación del cuerpo fructífero. Las esporas denominadas basidiosporas, son estructuras reproductoras que cumplen una función análoga y propagativa. Las esporas al germinar forman hifas que en grupo toman el nombre de micelio.

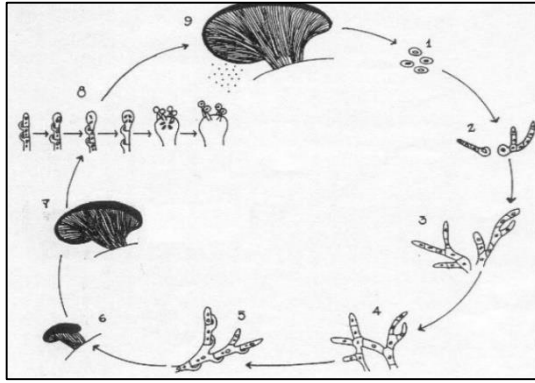


Figura 3-3. Ciclo de Vida de *Pleurotus ostreatus*: 1. Basidiosporas, 2. Germinación de basidiosporas, 3. Micelio monocarión, 4. Plasmogamia, 5. Dicarión, 6-7. Cuerpo fructífero. 8. Cariogamia y meiosis y 9. Liberación de basidiosporas.

Fuente: Meztizo-Valdés (1997)

La espora germinada genera el micelio primario, posteriormente por plasmogamia (fusión de hifas) se genera el micelio secundario, el cual metaboliza los componentes del sustrato y lo coloniza. El crecimiento vegetativo se detiene cuando las condiciones ambientales son favorables como lo es humedad alta, baja temperatura, mucho oxígeno y luz; lo que inicialmente permite el desarrollo de primordios que generaran finalmente el cuerpo fructífero.

CAPÍTULO III

3. METODOLOGIA

3.1. Zona de estudio

La presente investigación se realizó en un efluente de la industria textil del cantón Pelileo, provincia de Tungurahua.

3.1.1. Lugar de la investigación

El desarrollo de la investigación se realizó en los laboratorios de biotecnología de la Facultad de Ciencias, en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

3.1.2. Materiales

Los materiales utilizados durante la presente investigación se enlistan a continuación:

- Agitadores magnéticos
- Algodón
- Asa microbiológica
- Balanza analítica
- Balones de aforo
- Cabina de bioseguridad – Nivel II
- Cajas Petri
- Celdas para espectrofotómetro
- Equipo de aireación
- Equipo de destilación
- Erlenmeyer
- Espátula
- Espectrofotómetro

- Gasa
- Mechero de alcohol
- Papel filtro
- Papel toalla
- Parafilm
- pH-metro
- Plancha de agitación
- Probetas
- Reactivos químicos
- Tubos de ensayo
- Vasos de precipitación

3.2. Tipo de investigación

La presente investigación es de tipo experimental ya que se desconoce el efecto de *Pleurotus ostreatus* en la biodegradación del fenol existente en un efluente de agua y si la implementación de un agente inductor mejora el porcentaje de fenol biodegradado. Además, se trata de una investigación explicativa ya que se identificaron y analizaron los efectos causales de las variables independientes sobre las dependientes.

3.2.1. Hipótesis e identificación de variables

3.2.1.1. Variables

3.2.1.1.1. Variable dependiente

- Porcentaje de concentración de fenol biodegradado
- Biomasa de *Pleurotus ostreatus*

3.2.1.1.2. Variable independiente

- pH
- Medio Líquido
- Agente inductor (Extracto de paja de trigo)

3.2.1.2. Hipótesis

3.2.1.2.1. Hipótesis Alternante

La concentración de fenol en un medio líquido simple y suplementado, se reduce por la acción de *Pleurotus ostreatus*.

3.2.1.2.2. Hipótesis Nula

La concentración de fenol en un medio líquido simple y suplementado, no se reduce por la acción de *Pleurotus ostreatus*.

3.2.2. Diseño experimental

Se evaluó la actividad biodegradativa de *Pleurotus ostreatus* en medio líquido sobre una muestra de agua de efluente textil y sobre soluciones fenólicas concentradas a 10 mg/L y 100 mg/L. Se determinó si la adición de un inductor de la capacidad enzimática mejora la capacidad de biodegradación del hongo.

3.2.2.1. Tipo de diseño

Se utilizó un diseño de tipo Diseño completamente al azar (**DCA**).

3.2.3. Esquema del proceso

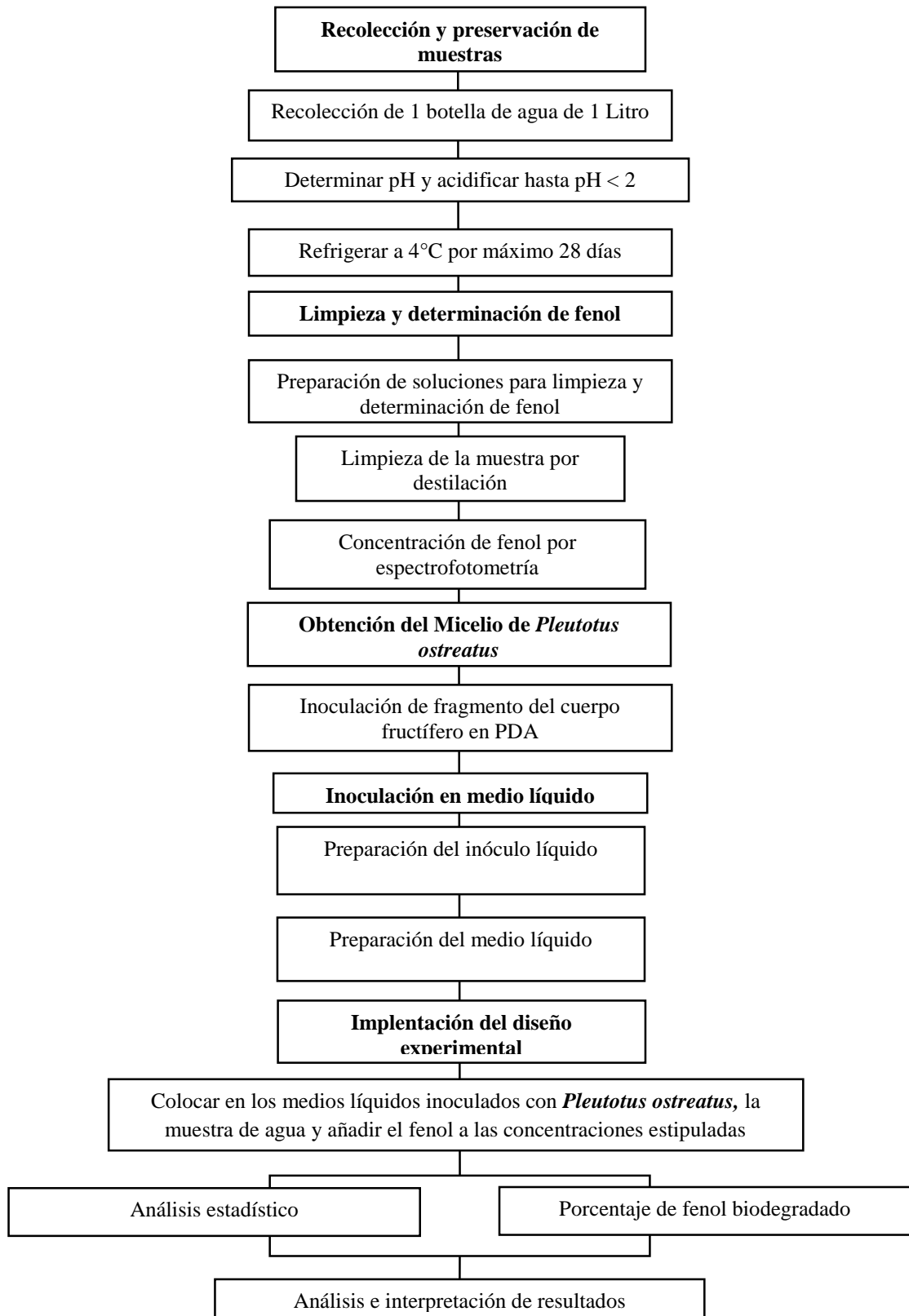


Figura 1-3. Esquema del proceso

Elaborado por: Nájera, M. (2017)

3.2.3.1. Procedimientos

3.2.3.1.1. Recolección y preservación de la muestra de efluente

La muestra se recolectó en el tanque de captación de efluentes de procesos de teñido y lavado de jean previo a su ingreso a una planta de tratamiento de la industria textil (Anexo A - Figura 1). Se utilizó 1 botella de plástico de 1 L de capacidad previamente desinfectada, se retiró la tapa de la botella y se la sumergió en el agua, se enjuagó el envase de 2 a 3 veces con el agua a ser recolectada, se colocó la botella de manera horizontal hasta llenarla con el volumen requerido.

Para la preservación de la muestra, primero se midió su pH, esto se realizó para evitar la degradación bioquímica del fenol, se acidificó con 2 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) por litro de muestra hasta alcanzar un $pH < 2$, se selló herméticamente y se colocó en un cooler para su transporte. Posteriormente, en el laboratorio se la refrigeró a $4^\circ C$, por un máximo de 28 días.

Para la conservación, almacenamiento, limpieza y determinación de fenol en las muestras recolectadas se siguió los protocolos establecidos por el *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* 5530 (1998).

3.2.3.1.2. Cuantificación de la concentración de fenol en la muestra de efluente

3.2.3.1.2.1. Preparación de reactivos

Se prepararon las soluciones necesarias para el proceso de limpieza y de determinación de la concentración del fenol, las cuales se detallan a continuación:

- Solución de ácido fosfórico (H_3PO_4) (10%): Se diluyó 10 mL de ácido fosfórico al 85% con agua destilada hasta completar 100 mL.
- Hidróxido de amonio (NH_4OH) 0.5 N: Se diluyó 1.872 mL de hidróxido de amonio al 26 % en 25 mL de agua destilada.
- Solución tampón fosfato: Se disolvió 34 g cloruro amónico y 200 mg de tartrato de sodio y potasio en agua destilada hasta completar un volumen de 1000 mL. Se reguló el pH a 9.5 mediante la adición de una disolución de hidróxido de amonio.

- Solución de ferrocianuro de potasio: Se pesó 2 g de ferrocianuro de potasio ($K_2Fe(CN)_6$) y se disolvió en 100 mL de agua. Se almacenó en un frasco ámbar y se preparó por segunda ocasión para el análisis final, ya que se recomienda su preparación semanal.
- Solución de 4-aminoantipirina: Se pesó 20 g de 4-aminoantipirina y se disolvió en 1000 mL de agua destilada. Su preparación se realizó antes de su uso.
- Solución de hidróxido de sodio a 2.5 N: Se disolvió 10 g de NaOH en 100 mL de agua destilada.
- $CuSO_4$ al 10%: Se pesó 10 g de $CuSO_4$ y se disolvió en 100 mL de agua destilada.

3.2.3.1.2.2. Limpieza de la muestra

La limpieza de la muestra se realizó mediante destilación, para eliminar impurezas no volátiles. En un vaso de precipitación se tomaron 250 mL de muestra y se ajustó el pH a 4.0 con NaOH a 2.5 N; a continuación, se adicionó 1 mL de $CuSO_4$ al 10% y se transfirió la muestra al equipo de destilación con núcleos de ebullición (Anexo A - Figura 2).

3.2.3.1.2.3. Obtención de curva de calibración

Para cuantificar la concentración de fenol en la muestra recolectada se realizó una curva de calibración, a partir de una solución stock de fenol de 5 mg/l en agua destilada, partir de la cual se obtuvieron 8 diluciones (Tabla 1-3) y se elaboró la curva de calibración (Tabla 2-3):

Tabla 1-3. Disoluciones obtenidas a partir de la solución stock de fenol

0.2	0.5	1	1.5	2	5	6
-----	-----	---	-----	---	---	---

Realizado por: Nájera, M. (2017)

Tabla 2-3. Diluciones de fenol para la elaboración de la curva de calibración

	B	I	II	III	IV	V	VI	VII
Solución patrón de fenol (mL)	0	0.2	0.5	1	1.5	2	5	6
Agua destilada (mL)	10	9.8	9.5	9	8.5	8	5	4
Correspondencia de mg/L de fenol (mL)	0	0.1	0.25	0.5	0.75	1	2.5	3

Realizado por: Nájera, M. (2017)

Para la determinación de las absorbancias de cada dilución, se tomaron 10 mL de muestra (o de las soluciones estándar) y se añadió 0.5 mL de solución tampón de fosfato de potasio. Posteriormente, en oscuridad se adicionó 0.1 mL de solución de 4-aminoantipirina; después se añadió 0.2 mL de solución de ferrocianuro de potasio ($K_2Fe(CN)_6$). A continuación, se homogenizó la muestra, se dejó en reposo 15 minutos y se tomaron las lecturas de absorbancia de cada muestra a una longitud de onda de 510 nm (Anexo A - Figura 3). Para la lectura de las muestras a analizar, se procedió de forma idéntica; las absorbancias resultantes se compararon con las absorbancias de la curva de calibración y se determinó la concentración de fenol presente.

3.2.3.1.3. Obtención de micelio de *Pleurotus ostreatus*

El medio de cultivo seleccionado para el aislamiento de *Pleurotus ostreatus* fue Agar Papa Dextrosa (PDA). Se preparó 300 mL de medio, cuya composición fue de 1.2 g de almidón de papa, 6 g de dextrosa, 4.5 g de agar y 150 μ L de bencilpenicilina (antibiótico) para evitar el desarrollo de bacterias en el medio, el pH del medio se reguló a 5.5. Se optó por regular el pH del medio a 5.5, ya que Sánchez y Royse (2001) citan que el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* se da en rangos de pH entre 4.0 y 7.0, con un óptimo entre 5.0 y 6.5. Tanto el medio de cultivo como las cajas petri (8) fueron esterilizados en autoclave a 121 °C, durante 15 min, a una presión de 15 psi, para luego ser vertido en las cajas petri.

Posterior a la solidificación del medio, la placa se dividió en cuatro cuadrantes y se inoculó en cada cuadrante una semilla de trigo la que se encontraba colonizada por micelio de *Pleurotus ostreatus*, se incubó a 28 °C por ocho días (Rojas, et al., 2010) (Figura 2-3).



Figura 2-3. Semilla de *P. ostreatus* inoculada en medio PDA.

Realizado por: Nájera, M. (2017)

El proceso previamente descrito se realizó dentro de una cámara de bioseguridad nivel II (Anexo A - Figura 4). Las cajas fueron observadas cada 24 horas macroscópicamente para descartar cualquier tipo de contaminación.

3.2.3.1.4. Preparación del medio líquido

Para el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* se preparó en total 3 L de medio líquido base, con la siguiente composición: 5.5 g de glucosa, 1.05 g de tartrato de sodio y potasio, 20 g de KH_2PO_4 , 5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 1 g de CaCl_2 por litro de suspensión (Babič, et al., 2012). Se preparó los 3 L de medio por separado en Erlenmeyers de 1 L de capacidad, en el primer Erlenmeyer no se le añadió ningún componente adicional, en el segundo se añadió 10 mg de fenol y al tercero 100 mg de fenol.

Se reguló el pH del medio a 5.5 con hidróxido de sodio 0.1 N. Los Erlenmeyers se esterilizaron en una autoclave a 121 °C, durante 15 min a una presión de 15 psi.

3.2.3.1.5. Elaboración del extracto acuoso de paja de trigo

El extracto acuoso de paja de trigo se preparó con 150 g de paja de trigo y 1500 mL de agua destilada, incubado en un frasco de vidrio de 2 L, en agitación a 150 rpm durante 5 h a 25°C (Anexo A - Figura 5). Para obtener el extracto acuoso, se filtró el contenido del frasco utilizando

papel filtro. Este extracto se utilizó como un inductor de la actividad enzimática en el medio base inoculado con *Pleurotus ostreatus* (Redin, 2010).

3.2.3.1.6. Preparación del inóculo líquido

En un Erlenmeyer de 500 mL se colocó de manera aséptica 5 discos de micelio de 5 cm de diámetro con 250 mL de agua destilada estéril y se procedió a homogenizar (Cabezas, 2014), para lo cual se colocó la mezcla en un vaso de licuadora previamente desinfectado con alcohol al 70% y enjuagado con agua destilada. Finalmente se licuó por 15 segundos a velocidad baja (Anexo A - Figura 6).

3.2.3.1.7. Implementación de tratamientos para la biodegradación del fenol

Se retiró la muestra de agua del refrigerador hasta que alcanzó la temperatura ambiente, posteriormente se reguló su pH a 5.5 (Monge et al., 2009), asegurando así la supervivencia del hongo durante el experimento. Para la implementación del experimento se colocó 10 mL de inóculo líquido en un Erlenmeyer de 250 mL en los que se añadió medio líquido base como se detalla a continuación. Se evaluaron tres experimentos con tres repeticiones cada uno (Tabla 3-3), el primer experimento contenía 150 mL de medio sin fenol con 40 mL de efluente, el segundo experimento contenía 150 mL de medio base con fenol a una concentración de 10 mg/L y 50 mL de medio base sin fenol, y el tercero contenía 150 mL medio base con fenol a una concentración de 100 mg/L y 50 mL de medio base sin fenol (Figura 3-3)

Experimentos

- T1 = Agua de efluente
- T2 = Concentración de fenol a 10 mg/L
- T3 = Concentración de fenol a 100 mg/L

Tratamiento

***Pleurotus ostreatus* en Medio Líquido / Nomenclatura = A**

- A1 = *Pleurotus ostreatus* en medio Líquido
- A2 = *Pleurotus ostreatus* en medio Líquido + inductor

Repeticiones / Nomenclatura = R - Se realizó un total de tres repeticiones

Tabla 3-3. Diseño experimental

T1			
Tratamiento	R1	R2	R3
A1	A1T1R1	A1T1R2	A1T1R3
A2	A2T1R1	A2T1R2	A2T1R3

T2			
Tratamiento	R1	R2	R3
A1	A1T2R1	A1T2R2	A1T2R3
A2	A2T2R1	A2T2R2	A2T2R3

T3			
Tratamiento	R1	R2	R3
A1	A1T3R1	A1T3R2	A1T3R3
A2	A2T3R1	A2T3R2	A2T3R3

Elaborado por: Nájera, M



Figura 3-3. Tratamientos con efluente y a concentraciones de 10 mg/L y 100 mg/L de fenol sin extracto de paja de trigo

Realizado por: Nájera, M

Se obtuvieron 9 unidades experimentales en total. Se replicó lo anteriormente descrito, pero para este caso se adicionó 50 mL de extracto acuoso de paja de trigo en cada unidad experimental. Cada Erlenmeyer fue tapado con una torunda de gasa y algodón (Figura 4-3).



Figura 4-3. Tratamientos con efluente y a concentraciones de 10 mg/L y 100 mg/L de fenol con extracto de paja de trigo.

Realizado por: Nájera, M

Finalmente, las unidades experimentales se incubaron en un agitador orbital a 25°C en oscuridad a 150 rpm por 8 días (Anexo A - Figura 7) y se mantuvieron en agitación por 34 días. Posteriormente, se determinó el pH y la concentración final de fenol (Anexo A - Figura 8).

3.2.3.1.8. Determinación de la concentración de fenol posterior a la aplicación de los tratamientos

Una vez finalizado el proceso, se filtró el contenido de cada Erlenmeyer (se pesó previamente el papel filtro), y a la solución obtenida se ajustó el pH a aproximadamente 4.0 añadiendo gotas de ácido fosfórico (H₃PO₄) 10% v/v. A continuación, se siguió el protocolo del apartado 3.2.3.1.2. Se valoró la tasa de fenol biodegradado, al comparar la concentración inicial y final de fenol en el efluente, utilizando la siguiente ecuación (Monge et al., 2009):

$$Tasa\ de\ degradación = \frac{[]\ inicial\ de\ fenol - []\ final\ de\ fenol}{[]\ inicial\ de\ fenol}$$

Finalmente, se determinaron las diferencias significativas de los tratamientos, implementando un ANOVA con las concentraciones finales de fenol en el software Infostat, para la separación de medias se utilizó la prueba de TUKEY.

3.2.3.1.9. Determinación de peso húmedo y peso seco

La biomasa retenida en el papel filtro se pesó (Figura 5-3) y expresó como biomasa húmeda, en función de la siguiente ecuación:

$$W \text{ húmedo} = W \text{ papel con biomasa} - W \text{ papel filtro}$$



Figura 5-3. Filtración del medio de cultivo para la separación de la biomasa.

Realizado por: Nájera, M

Para la determinación del peso seco, el papel filtro con biomasa se llevó a un horno a 80°C hasta que se obtuvo un peso constante (Anexo A - Figura 9). Al obtener un peso constante se empleó la ecuación:

$$W \text{ seco} = W \text{ papel con biomasa seca} - W \text{ papel filtro seco}$$

CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Análisis de resultados

4.1.1. Cuantificación de la concentración de fenol en la muestra de efluente

En la tabla 1-4 se muestra las absorbancias obtenidas a partir de soluciones de fenol de concentración conocida que se utilizaron para la generación de la curva de calibración.

Tabla 1-4. Absorbancias obtenidas para distintas concentraciones de fenol para la elaboración de la curva de calibración

Concentración de fenol (mg/L)	Absorbancia (nm)
0	0.001
0.1	0.021
0.25	0.042
0.5	0.072
0.75	0.103
1	0.135
2.5	0.333
5	0.693

Realizado por: Nájera, M

En la figura 1-4 se muestran las Absorbancias (nm) vs Concentración de fenol (mg/L), ejecutando la regresión lineal de los datos se obtuvo la ecuación $y = 0.1369x + 0.0021$ con un R^2 de 0,9993.

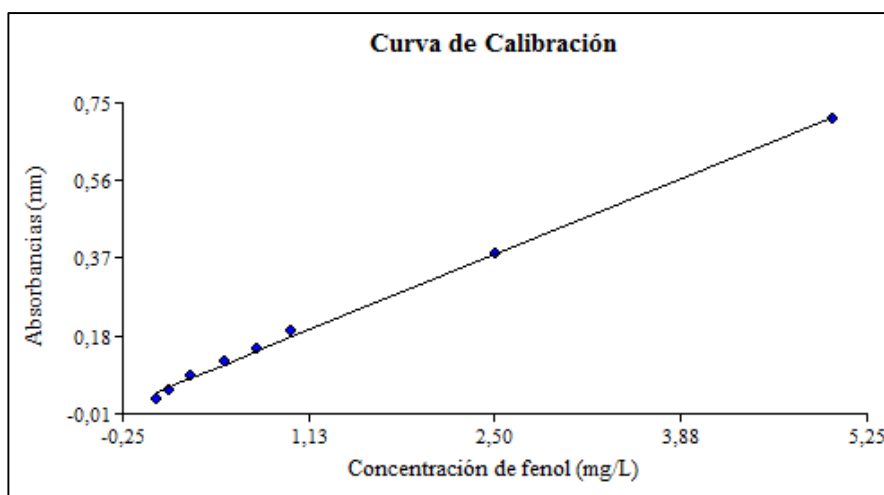


Figura 1-4. Curva de calibración para la determinación de la concentración de fenol en la muestra de efluente y en cada tratamiento.

Realizado por: Nájera, M. (2017)

La concentración de fenol determinada para la muestra de efluente en la repetición 1 fue de 0.648 mg/L, de la repetición 2 fue 0.658 mg/L y la repetición 3 fue de 0.650 mg/L; el promedio final fue de 0.652 mg/L correspondiente a una absorbancia de 0.091 nm; la desviación estándar para los datos es de 0.0043, este valor tiende a cero ya que los valores obtenidos se acercan a la media calculada.

4.1.2. Obtención de micelio de *Pleurotus ostreatus*

Al tercer día posterior de la inoculación de las semillas en el medio PDA, se observó el crecimiento de micelio de color blanco y apariencia algodonosa alrededor de cada una de las semillas colocadas en las cajas Petri. Ninguna de las cajas Petri presentó contaminación por bacterias u otros tipos de hongos (Figura 2-4).



Figura 2-4. Cultivo de *P. ostreatus* en medio PDA 3 días posteriores a la inoculación.

Realizado por: Nájera, M. (2017)

Al octavo día posterior a la inoculación, se observó la colonización completa del micelio en las cajas Petri. Sin embargo, se visualizó dos diferentes tipos de crecimiento del micelio: algodonoso con alta densidad y crecimiento abundante, por sobre las semillas y en sus alrededores cercanos; y algodonoso con densidad y crecimiento regular en el resto del medio presente en las cajas Petri (Figura 3-4). El envés del cultivo presentó una coloración blanquecina uniforme y se observó que el crecimiento del micelio proviene exclusivamente a partir de la semilla inoculada, con lo cual se confirma la no contaminación del cultivo (Anexo B - Figura 1). Estos resultados indicaron el crecimiento del micelio de *P. ostreatus*



Figura 3-4. Crecimiento del micelio de *P. ostreatus* en medio PDA al octavo día posterior a la inoculación.

Realizado por: Nájera, M. (2017)

El inóculo líquido se preparó en el doceavo día posterior a la inoculación, ya que en ese momento el micelio presentó una apariencia algodonosa de alta densidad y crecimiento abundante que cubría de manera uniforme toda la caja Petri (Anexo B – Figura 2).

4.1.2.1. Morfología de P. ostreatus en cultivo sumergido en la fase experimental

El inicio de la fase de experimentación se realizó el día 1 de febrero del 2017 y finalizó el día 6 de marzo del 2017, por lo que *P. ostreatus* estuvo en cultivo en medio líquido un total de 34 días. Inicialmente durante los ocho días de agitación, el micelio se observó en forma de grumos superficiales y turbidez en el caldo de cultivo (Figura 4-4).

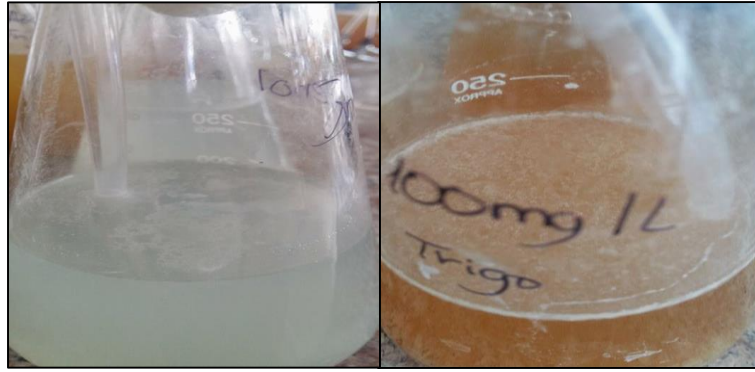


Figura 4-4. Morfología de *P. ostreatus* en cultivo sumergido con 100 mg/L de fenol sin extracto de paja de trigo (Izq.) y con extracto de paja de trigo (Der.) al finalizar el proceso de agitación.

Realizado por: Nájera, M. (2017)

Posterior al periodo de aireación en cada uno de los experimentos, se observó el desarrollo de micelio a manera de un velo denso en la superficie del medio de cultivo, además parte del micelio se localizó en la parte inferior del medio en forma de sedimentos (Figura 5-4 – 6-4). En ninguno de los experimentos existió la formación de pellets (agregados esféricos) durante el proceso de cultivo.



Figura 5-4. Morfología de *P. ostreatus* en cultivo sumergido con 10 mg/L de fenol al finalizar el proceso de aireación.

Realizado por: Nájera, M. (2017)



Figura 6-4. Morfología de *P. ostreatus* en cultivo sumergido con 10 mg/L de fenol, suplementado con extracto de paja de trigo al finalizar el proceso de aireación.

Realizado por: Nájera, M. (2017)

4.1.3. Determinación de la concentración de fenol posterior a la aplicación de los tratamientos

Para la comparación entre las concentraciones iniciales y finales de fenol y para el cálculo de la tasa de degradación se realizó el cálculo de la concentración inicial de fenol presente en cada tratamiento, debido a que por adición del medio líquido base, del inóculo líquido y del extracto de paja de trigo, el volumen final en cada tratamiento se modificó y consecuentemente la concentración de fenol disminuyó (Tabla 2-4).

Tabla 2-4. Cálculo de las concentraciones iniciales de fenol en cada tratamiento.

Tratamiento	V_i (mL)	$[]_i$ (mg/L)	V_f (mL)	$[]_f$ (mg/L)
A1T1	40	0.652	250	0.104
A2T1				
A1T2	150	10	210	7.142
A2T2				
A1T3	150	100	210	71.428
A2T3				

Realizado por: Nájera, M. (2017)

V_i : Volumen de la solución inicial que contiene fenol.

$[]_i$: Concentración inicial de fenol.

V_f : Volumen final de cada experimento a base del cual se calcula la nueva concentración de fenol.

$[]_f$: Concentración final de fenol.

En la Tabla 3-4 se detalla la medición de la absorbancia (nm) y la concentración final de fenol (mg/L) de cada uno de los tratamientos una vez finalizado el proceso de cultivo de *P. ostreatus* en medio sumergido, bajo las distintas condiciones detalladas en el diseño experimental.

Tabla 3-4. Absorbancias y concentraciones finales de fenol de cada uno de los tratamientos posterior al proceso experimental.

Tratamiento	Repetición	Absorbancia (nm)	Concentración de fenol (mg/L)
A1T1	R1	0.000	0.000
	R2	0.003	0.006
	R3	0.000	0.000
A1T2	R1	0.007	0.036
	R2	0.000	0.000
	R3	0.001	0.000
A1T3*	R1	0.421	30.571
	R2	0.451	32.786
	R3	0.409	29.714
A2T1	R1	0.000	0.000
	R2	0.001	0.000
	R3	0.001	0.000
A2T2	R1	0.004	0.013
	R2	0.000	0.000
	R3	0.002	0.000
A2T3*	R1	0.374	27.165
	R2	0.323	23.440
	R3	0.359	26.071

Realizado por: Nájera, M. (2017)

* Para la medición de las absorbancias se realizó una dilución 1:10 por tanto, para el cálculo de la concentración de fenol mostrada en tabla se aplicó el factor de dilución.

A continuación, se muestra un promedio de las concentraciones finales de fenol en cada uno de los tratamientos (Tabla 4-4), para posteriormente compáralos de manera gráfica con sus respectivas concentraciones iniciales y poder visualizar el efecto de degradación de *P. ostreatus*.

Tabla 4-4. Promedio de las concentraciones finales de fenol.

Tratamiento	[]_i (mg/L)	[]_f (mg/L)
A1T1	0.104	0.002
A1T2	7.142	0.012
A1T3	71.428	31.023
A2T1	0.104	0.000
A2T2	7.142	0.004
A2T3	71.428	25.558

Realizado por: Nájera, M. (201

[]_i: Concentración inicial de fenol.

[]_f: Concentración final de fenol posterior al cultivo de *P. ostreatus*.

En las figuras 7-4, 8-4 y 9-4 se observa una reducción de la concentración de fenol en cada uno de los experimentos, demostrando la degradación de fenol por parte de *P. ostreatus*. En relación al efecto del extracto de paja de trigo como un inductor de enzimas lignolíticas, en las figuras 7-4 y 8-4 que corresponden a la muestra de efluente y al medio líquido suplementado con 8 mg/L de fenol, no es apreciable una diferencia significativa entre las medias de la concentración final de fenol al añadirlo u omitirlo. Sin embargo, en el caso del medio líquido suplementado con 100 mg/L de fenol (Figura 9-4), se puede apreciar que la adición del extracto de paja de trigo en medio genero un incremento en la degradación de fenol (31.023 mg/L – sin inductor y 25.558 mg/L con inductor).

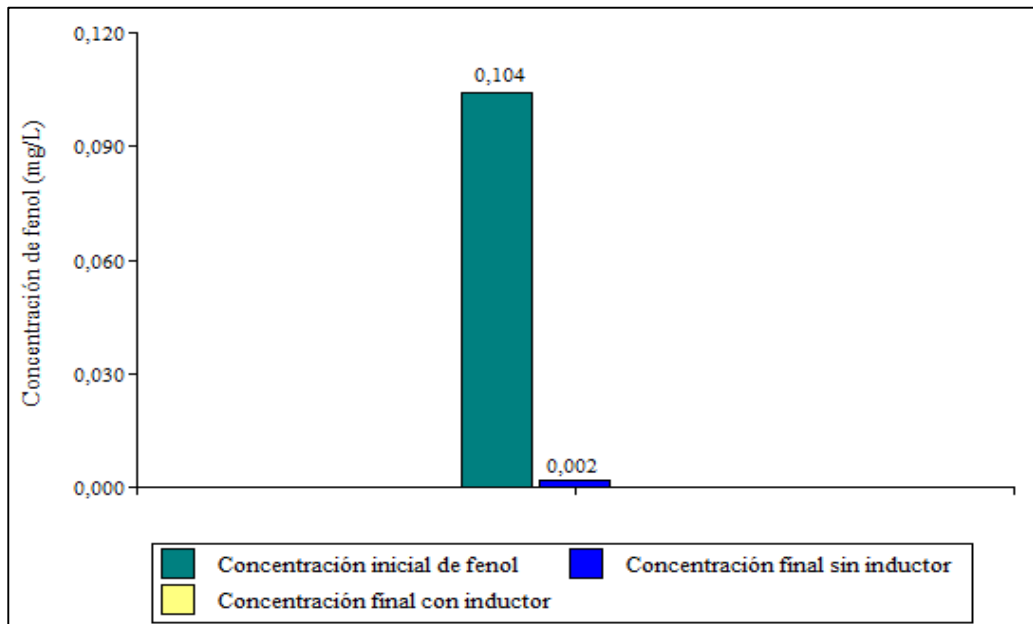


Figura 7-4. Comparación entre la concentración inicial y media de las concentraciones finales de fenol registradas en los tratamientos con agua proveniente del efluente.

Realizado por: Nájera, M. (2017)

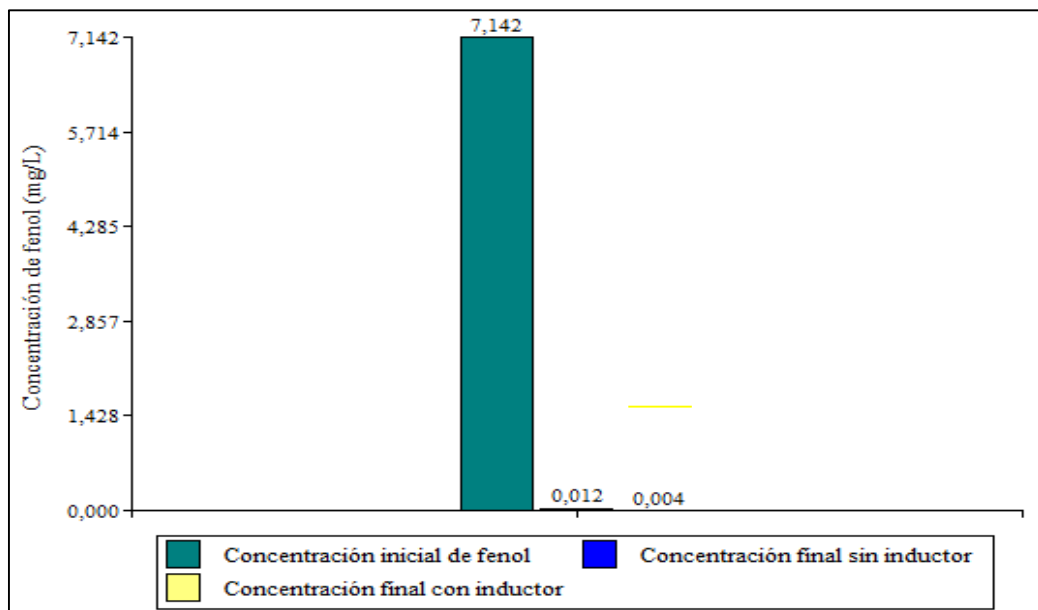


Figura 8-4. Comparación entre la concentración inicial y media de las concentraciones finales de fenol registradas en los tratamientos con medio líquido suplementado con 10 mg/L (Fenol).

Realizado por: Nájera, M. (2017)

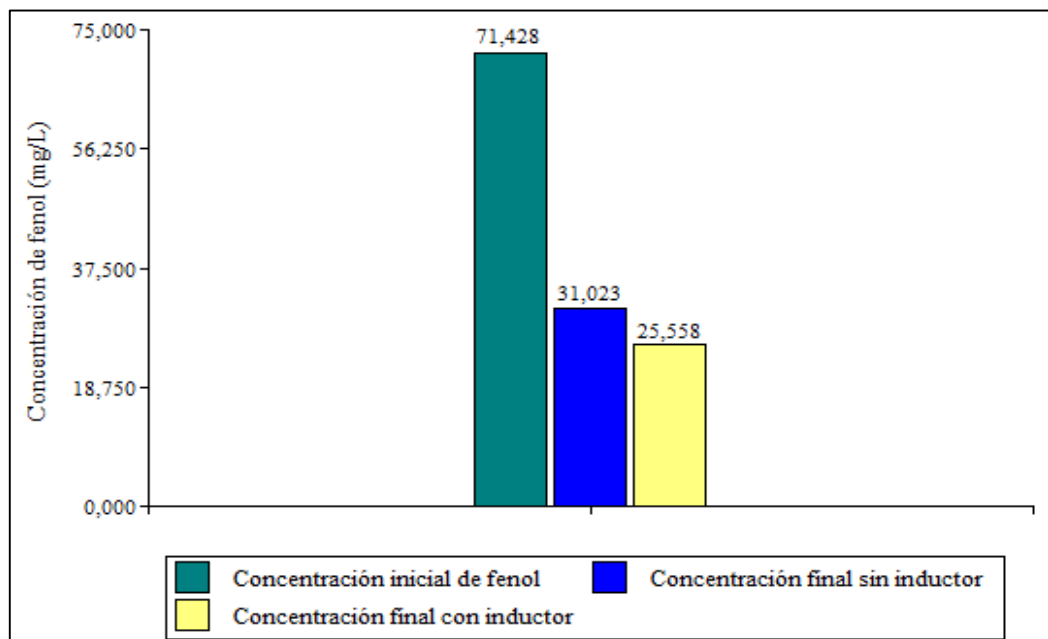


Figura 9-4. Comparación entre la concentración inicial y media de las concentraciones finales de fenol registradas en los tratamientos con medio líquido suplementado con 100 mg/L (Fenol).

Realizado por: Nájera, M. (2017)

Para la valoración de la eficiencia de *P. ostreatus* en la degradación de fenol se realizó el cálculo de la tasa de degradación de fenol de cada uno de los tratamientos (Tabla 5-4), a partir de la concentración inicial y final de fenol (mg/L).

En función de los datos generados en este apartado, se procedió a la ejecución de pruebas ANOVA y Tukey que se muestran posteriormente. De esta forma se buscó determinar la existencia de diferencia significativa en la tasa de degradación de fenol, al añadir u omitir el extracto de paja de trigo.

Tabla 5-4. Cálculo de la tasa de degradación de fenol.

Tratamiento	Repetición	[] _i (mg/L)	[] _f (mg/L)	Tasa de degradación
A1T1	R1	0.104	0.000	1.000
	R2		0.006	0.946
	R3		0.000	1.000
A1T2	R1	7.142	0.036	0.995
	R2		0.000	1.000
	R3		0.000	1.000
A1T3	R1	71.428	30.571	0.572
	R2		32.786	0.541
	R3		29.714	0.584
A2T1	R1	0.104	0.000	1.000
	R2		0.000	1.000
	R3		0.000	1.000
A2T2	R1	7.142	0.013	0.999
	R2		0.000	1.000
	R3		0.000	1.000
A2T3	R1	71.428	27.165	0.620
	R2		23.440	0.672
	R3		26.071	0,635

Realizado por: Nájera, M. (2017)

[]_i: Concentración inicial de fenol.

[]_f: Concentración final de fenol.

Finalizados los 34 días de incubación, los tratamientos A2T1 y A2T2 presentaron 100% de degradación de fenol, mientras que A1T1 el 98.2%, A1T2 el 99.8%, A1T3 el 56.6% y A2T3 el 64.2%. Aunque en los cuatro primeros tratamientos mencionados existe una degradación completa o casi completa en ciertos casos del fenol, no se pudo determinar la variación de los tiempos de degradación probablemente existentes por acción del extracto de paja de trigo. Al igual a lo mencionado anteriormente, la adición del extracto de paja de trigo muestra un incremento del 7.6% en la degradación de fenol entre el tratamiento A1T3 y A2T3 (Tabla 6-4).

Tabla 6-4. Promedio de las tasas de degradación.

Tratamiento	Tasa de degradación	Porcentaje (%)
A1T1	0.982	98.2
A1T2	0.998	99.8
A1T3	0.566	56.6
A2T1	1.000	100
A2T2	1.000	100
A2T3	0.642	64.2

Realizado por: Nájera, M. (2017)

Además, se denota que los tratamientos que presentaban una menor concentración de fenol se demoraron menos tiempo en el proceso de degradación, en relación a los tratamientos con una concentración más alta de fenol (Figura 10-4).

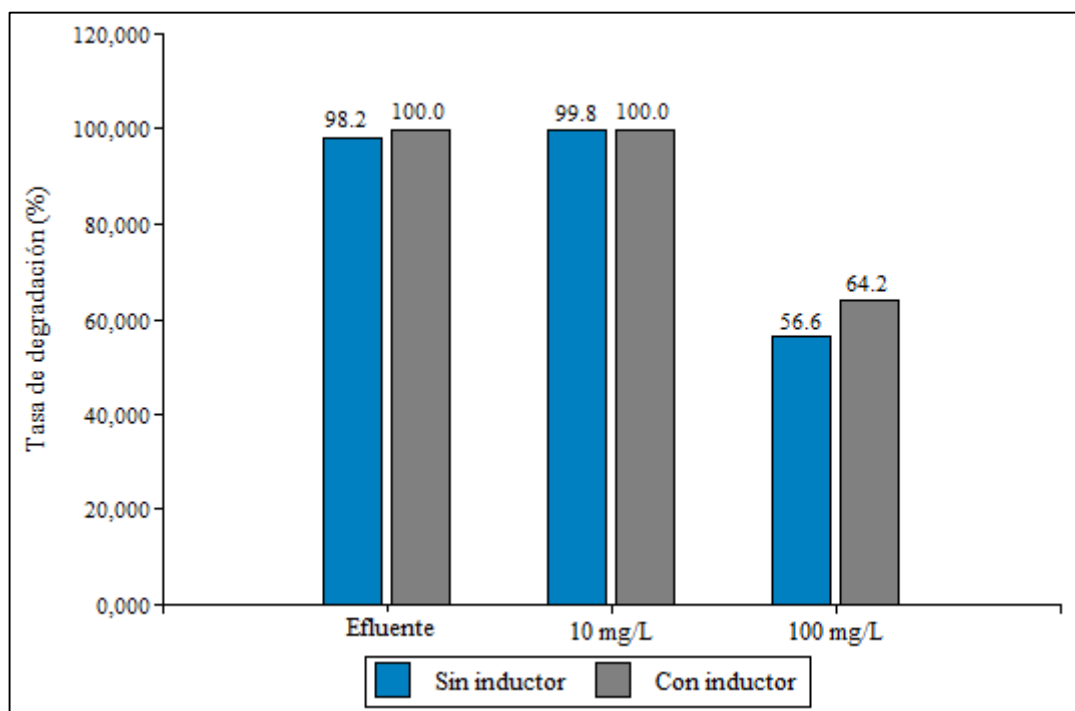


Figura 10-4. Tasa de degradación en porcentaje de los distintos tratamientos.

Realizado por: Nájera, M. (2017)

4.1.4. Determinación de peso húmedo y peso seco

En la tabla 7-4 se muestra el peso tanto húmedo como seco de la biomasa generada después de 34 días de cultivo sumergido bajo las diferentes condiciones previamente detalladas.

Tabla 7-4. Biomasa de *P. ostreatus* posterior a 34 días de cultivo, expresada en peso húmedo y peso seco.

Tratamiento	Repetición	Peso Húmedo (g)	Peso Seco (g)
A1T1	R1	1,0214	0,8504
	R2	0,9593	0,8606
	R3	1,0715	0,8523
A1T2	R1	1,4157	0,9602
	R2	1,3255	0,9519
	R3	1,4555	0,9623
A1T3	R1	1,9155	1,7090
	R2	1,9593	1,7387
	R3	1,9534	1,7221
A2T1	R1	1,0314	0,8656
	R2	1,0611	0,8775
	R3	1,0598	0,8714
A2T2	R1	1,6145	1,3240
	R2	1,6005	1,2701
	R3	1,6359	1,3529
A2T3	R1	2,0225	1,9006
	R2	2,1642	1,9721
	R3	2,0442	1,9202

Realizado por: Nájera, M. (2017)

Se observó un incremento en la cantidad de biomasa en función del aumento de la concentración de fenol y de igual manera en cada concentración entre los tratamientos con inductor y sin él (Tabla 8-4).

Tabla 8-4. Promedio de biomasa en peso seco de *P. ostreatus*.

Tratamiento	Peso seco (g)
A1T1	0.854
A1T2	0.958
A1T3	1.723
A2T1	0.871
A2T2	1.316
A2T3	1.930

Realizado por: Nájera, M. (2017)

4.2.- Prueba de hipótesis

Ho: Todos los tratamientos son iguales; $p > 0.05$

Hi: Al menos un tratamiento es diferente; $p \leq 0.05$

Se realizó un análisis de varianza para determinar la existencia de diferencia significativa entre la tasa de degradación de fenol en cada uno de los tratamientos, al añadir u omitir el extracto de paja de trigo.

Como el p-valor es mayor a 0.05 ($p = 0.3739$) se acepta la hipótesis nula, por tanto, no existe una diferencia significativa entre la tasa de degradación de fenol en el efluente al añadir u omitir el extracto de paja de trigo (Tabla 9-4), lo cual se comprobó al realizar una prueba de Tukey, en la que las medias de los respectivos tratamientos son colocadas en un mismo grupo por tanto no son significativamente diferentes (Tabla 10-4).

Tabla 9-4. Análisis de varianza para la tasa de degradación en el efluente

F.V.	SC	Gl	CM	F	p-valor
Modelo	4.9E-04	1	4.9E-04	1.00	0.3739
Tratamiento	4.9E-04	1	4.9E-04	1.00	0.3739
Error	1.9E-03	4	4.9E-04		
Total	2.4E-03	5			

Realizado por: Nájera, M. (2017)

Tabla 10-4. Prueba de Tukey para la tasa de degradación en el efluente

Tratamiento	Medias	N	E.E.	
Sin extracto de paja de trigo	0.982	3	0.01	A
Con extracto de paja de trigo	1.000	3	0.01	A

Realizado por: Nájera, M. (2017)

En el caso del análisis de varianza para la tasa de degradación de fenol en los tratamientos con una concentración inicial de 10mg/L de fenol, de igual manera al caso anterior se acepta la hipótesis nula al obtener un p-valor mayor a 0.05 ($p = 0.6072$) (Tabla 11-4), por tanto, las medias no son significativamente diferentes (Tabla 12-4).

Tabla 11-4. Análisis de varianza para la tasa de degradación para los tratamientos con una concentración inicial de fenol de 10 mg/L

F.V.	SC	Gl	CM	F	p-valor
Modelo	1.5E-06	1	1.5E-06	0.310	0.6072
Tratamiento	1.5E-06	1	1.5E-06	0.310	0.6072
Error	1.9E-05	4	4.8E-06		
Total	2.1E-05	5			

Realizado por: Nájera, M. (2017)

Tabla 12-4. Prueba de Tukey para la tasa de degradación para los tratamientos con una concentración inicial de fenol de 10 mg/L

Tratamiento	Medias	N	E.E.	
Sin extracto de paja de trigo	0.998	3	0.001	A
Con extracto de paja de trigo	0.999	3	0.001	A

Realizado por: Nájera, M. (2017)

Los resultados mostrados en la tabla 13-4 exhiben un p-valor menor a 0.05 ($p = 0.0188$) por tanto las medias de la tasa de degradación para los tratamientos con concentraciones iniciales de fenol de 100 mg/L al añadir u omitir el extracto de paja de trigo son significativamente diferentes. Los resultados obtenidos se comprobaron al ejecutar una prueba de Tukey (Tabla 14-4) en la cual cada tratamiento fue ubicado en un grupo diferente, además se muestra que el tratamiento que contenía extracto de paja de trigo tuvo una mayor capacidad de degradación de fenol frente a los tratamientos en los cuales se omitió el extracto.

Tabla 13-4. Análisis de varianza para la tasa de degradación para los tratamientos con una concentración inicial de fenol de 100 mg/L

F.V.	SC	GI	CM	F	p-valor
Modelo	0.01	1	0.01	14.59	0.0188
Tratamiento	0.01	1	0.01	14.59	0.0188
Error	2.4E-03	4	6.0E-04		
Total	0.01	5			

Realizado por: Nájera, M. (2017)

Tabla 14-4. Prueba de Tukey para la tasa de degradación para los tratamientos con una concentración inicial de fenol de 100 mg/L

Tratamiento	Medias	N	E.E.	
Sin extracto de paja de trigo	0.57	3	0.01	A
Con extracto de paja de trigo	0.64	3	0.01	B

Realizado por: Nájera, M. (2017)

4.3.- Discusión de resultados

El Acuerdo N° 061 de la reforma del Texto Unificado de Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente: Norma de Calidad Ambiental y de Descarga de Efluentes al Recurso Agua – Libro VI – Anexo 1, establece los límites permisibles, disposiciones y prohibiciones para las descargas hacia los cuerpos de agua o sistema de alcantarillado, además de criterios de calidad de agua para su uso y los métodos y procedimientos para la determinación de contaminantes en agua.

En el caso de la muestra analizada proveniente de un efluente de una industria textil localizada en el cantón Pelileo, la concentración de fenol determinada fue de 0.652 mg/L. La norma técnica cita que el límite máximo permisible para compuestos fenólicos es de 0.2 mg/L (Texto Unificado Legislación Secundaria: Medio Ambiente, 2015). Por tanto, al comparar este dato con el obtenido en el análisis, se determina que el valor se encuentra sobre el límite máximo permisible, por lo que resulta factible analizar la capacidad de degradación de fenol por parte de *P. ostreatus*.

Existen diferentes métodos de tratamientos para reducir el contenido de fenol en aguas residuales, entre los que se encuentran la cloración, ozonización, adsorción, extracción con disolventes, tratamientos biológicos, entre otros. Sin embargo, los tratamientos fisicoquímicos resultan ser costosos y presentan diversos inconvenientes debido a la tendencia de formación de compuestos secundarios tóxicos. Por lo que los métodos biológicos de tratamiento son considerados como una alternativa favorable para la degradación de fenol (Arutchelvan, et al., 2006).

En los últimos años *Pleurotus ostreatus* ha sido utilizado ampliamente en procesos de biodegradación, debido a que ostentan la capacidad de producir enzimas ligninolíticas, que al ser extracelulares, no hidrolíticas y presentar una baja especificidad por el sustrato, tienen la capacidad de degradar lignina y otros compuestos recalcitrantes con estructuras similares a la de este polímero (Saparrat et al., 2008). Las enzimas relacionadas con esta actividad son la manganeso peroxidasa (potencial de oxidación suficiente para absorber únicamente electrones de estructuras fenólicas), lignino peroxidasa (oxidación de sustratos fenólicos aromáticos y diversos compuestos no fenólicos) y lacasa (oxidación de sustratos fenólicos y compuestos aromáticos no fenólicos con la presencia de mediadores redox) (Gayosso et al., 2004). Estas enzimas fueron las encargadas de degradar el fenol presente en las muestras, como se observó en los resultados obtenidos la eficiencia a una concentración de 10 mg/L fue la mejor alcanzando un 99% de degradación, esto no ocurrió a los 100 mg/L donde la degradación no fue total, esto se debe a que la maquinaria enzimática alcanzó su máxima capacidad de degradación, concordando por lo dicho por Melendez

et al. (2015), el cual reporto que en altas concentraciones de fenol existe una inhibición de las enzimas, que desactiva su capacidad degradativa.

La capacidad de degradar compuestos de xenobióticos aromáticos por parte de los hongos de pudrición blanca se asocia con su capacidad para degradar lignina, polímero aromático presente en las paredes celulares de las plantas. La lignina se degrada fuera de la célula fúngica a través de un complejo sistema de oxidación que involucra enzimas extracelulares (lacasas y peroxidasas), siendo este sistema inespecífico de degradación de lignina el mismo que se encuentra implicado en la oxidación de contaminantes aromáticos (Rodríguez, et al., 2004). Adicionalmente, se ha reportado que el sistema enzimático de este tipo de hongos se activa por la presencia de compuestos tales como polifenoles, aminas aromáticas y dimetil-trimetilfenoles (Fountoulakis, et al., 2002).

La concentración de fenol en los tratamientos A1T1 (0.002 mg/L), A1T2 (0.012 mg/L), A2T1 (0.00 mg/L) y A2T2 (0.004 mg/L) se redujo por debajo del límite máximo permisible (0.2 mg/L) establecido en la norma técnica, donde T1 corresponde a la concentración por defecto del efluente y T2 a la concentración de 10 mg/L, determinando así la efectividad de *P. ostreatus* en la degradación de fenol. En el caso de los tratamientos A1T3 y A2T3 donde T3 es el agua suplementada con 100 mg/L de fenol se registraron unas concentraciones de 31.02 y 25.55 respectivamente, con tasas de degradación de 0.566 y 0.642, cabe recalcar que la concentración inicial de fenol fue mayor que la de los otros tratamientos, ya que con estos tratamientos se requería determinar el efecto del inductor enzimático.

Adicionalmente, Fernández-Larrea y Stahl (1996) reportaron que, al generar estrés oxidativo sobre el hongo *Podospora anserina* por medio de la adición de compuestos aromáticos en el sustrato, la enzima Lac opera como un mecanismo de defensa, lo expuesto se evidenció en dicho experimento al registrar un aumento considerable de los niveles de ARNm de la enzima. En consecuencia, al promover la generación de enzimas tipo Lac, se generaría un aumento en la degradación de compuestos en el medio de cultivo.

En relación al efecto del extracto de paja de trigo como un inductor enzimático, se evaluó su acción a partir de la tasa de degradación en los tratamientos A1T3 (0.566) y A2T3 (0.642), ya que, en los A1T1 (0.982), A1T2 (0.998), A2T1 (1.000) y A2T2 (1.000) no se encontró diferencias significativas, lo cual no determina un juicio final de su efecto en dichos tratamientos. En los tratamientos A1T3 y A2T3 se encontró una diferencia significativa en sus tasas de degradación (0.566 y 0.642), por lo que se infiere que la mayor tasa de degradación de fenol generada en A2T3 fue consecuencia del efecto del extracto de paja de trigo sobre la producción de enzimas

lignolíticas. Corroborando los resultados obtenidos por Redin (2010) que evidenció un efecto positivo en la inducción de la actividad lacasa en cepas de *P. ostreatus* al añadir extracto acuoso de paja de trigo.

La cantidad de biomasa generada aumenta en función de la cantidad de fenol presente en el medio y es mayor en los tratamientos que contuvieron en el medio de cultivo extracto de paja de trigo. Sin embargo, no se puede establecer una relación directa de estos dos factores ya que no se estableció la cinética de crecimiento de *P. ostreatus* bajo las diferentes condiciones de cultivo, por lo que no se determinó el inicio de la fase muerte celular y no se puede definir en qué momento la cantidad de biomasa comenzó a disminuir o por el contrario cual tratamiento tuvo una tasa de crecimiento mayor, por lo que los resultados no son concluyentes.

En relación con otros ensayos relacionados con degradación de compuestos presentes efluentes textiles por parte de *P. ostreatus*. Moreno y Ospina (2008) realizaron la evaluación de inductores metálicos y co-sustratos para la remoción de negro de reactivo 5 inmovilizado en fique, estableciendo que *P. ostreatus* inmovilizado en fique aumentó su capacidad de decoloración asociada con la adición de inductores como sulfato de cobre y sulfato de manganeso, además seleccionaron al almidón como un co-sustrato alternativo adecuado para la remoción de colorante NR5. De igual manera Garzón (2009) demostró que *P. ostreatus* inmovilizado en fibra de fique presentó una gran capacidad de remoción del colorante antraquinóide Azul disperso 3, al presentar una remoción de 62.39%, con una tasa de remoción diaria de 7.8 mg/L.

En función a los resultados obtenidos en el presente estudio y los generados por diversos estudios, *P. ostreatus* presenta un alto espectro de acción sobre los compuestos presentes en los efluentes generados en la industria textil, por lo que se debería considerar el uso potencial de *P. ostreatus* en procesos de biodegradación de compuestos xenobióticos.

CONCLUSIONES

- La concentración de fenol determinada en una muestra de agua proveniente de un proceso de teñido y lavado de jean del cantón Pelileo fue de 0.652 mg/L, la misma que se encuentra por sobre el límite máximo permisible de descarga hacia cuerpos de agua dulce de 0.2 mg/L.
- Cada uno de los tratamientos evaluados mostraron tasas de degradación mayores al 0.5, lo que asevera la capacidad de degradación de fenol de *Pleurotus ostreatus* cultivado en medio sumergido.
- El efecto del extracto de paja de trigo sobre la tasa de degradación de fenol no se pudo visualizar en los tratamientos A1T1 - A2T1 y A1T2 - A2T2 debido a que no existió una diferencia significativa entre sus medias.
- La tasa de degradación en el tratamiento A2T3 (0.642) fue significativamente mayor que en tratamiento A1T3 (0.556), lo que infiere un efecto positivo del extracto de paja de trigo en la producción de enzimas lignolíticas en *P. ostreatus* necesarias para la degradación de fenol.
- La utilización de *P. ostreatus* generaría una degradación total de fenol en aguas residuales de procesos de teñido y lavado de jean con concentraciones menores a 100 mg/L pudiendo ser potenciado su efecto mediante la adición de extracto de paja de trigo, con lo que se cumpliría con los valores requeridos en la norma técnica.

RECOMENDACIONES

- Realizar mediciones diarias de la concentración de fenol para de esta forma poder determinar el tiempo en el que *P. ostreatus* degrada completamente el fenol a distintas concentraciones y la influencia de los inductores enzimáticos, y de esta forma poder determinar su factibilidad de implementación a nivel industrial.
- Analizar la actividad de las enzimas lignolíticas diariamente bajo distintas condiciones de cultivo para poder establecer el periodo y bajo qué estado se obtiene la mayor actividad enzimática.
- Probar distintos tipos de inductores enzimáticos a diferentes concentraciones para así poder determinar la relación existente entre la concentración y la actividad enzimática generada, que promueva una degradación más eficiente de compuestos xenobióticos como lo es el fenol.
- Evaluar la cinética y tasa de crecimiento del hongo bajo las distintas condiciones expuestas en el presente ensayo, para poder determinar los periodos de crecimiento exponencial y estacionario, así como el inicio de la fase de muerte celular.

BIBLIOGRAFÍA

ACOSTA, E. *Sustitución de Materias Primas para la Industria Textil*. Bogotá : Departamento Técnico Administrativo Medio Ambiente, 2010.

ARCE, Ana, CALDERÓN, César Y TOMASINI, Ana. *Fundamentos técnicos para el muestreo y análisis de aguas residuales*. 2007, Serie autodidáctica de medición de la calidad del agua, págs. 33-48.

ARDÓN, C. Producción de los hongos comestibles. [En línea] (Tesis Pregrado), *Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala, Guatemala*. 2007. [Consulta: 20 de Mayo de 2017]. Disponible en: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/07/07_1932.pdf.

ARUTCHELVAN, V. et al., *Kinetics of high strength phenol degradation using Bacillus brevis*. [En línea] *Journal of Hazardous Materials*. 2006. págs. 216-222. [Consulta: 20 de Mayo de 2017]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030438940500525X>

ATSDR. 1998. *Toxicological profile for phenol*. Agency for toxic substances and disease registry. Atlanta : U.S. Department of health and human services, 1998. págs. 127-133.

BABIČ, Janja, LIKOZAR, Blaž Y PAVKO, Aleksander. *Optimization of Ligninolytic Enzyme Activity and Production Rate with Ceriporiopsis subvermispora for Application in Bioremediation by Varying Submerged Media Composition and Growth Immobilization Support*. [En línea] *International Journal of Molecular Sciences*. 2012. págs. 11365-11384. . [Consulta: 20 de Mayo de 2017]. Disponible en: <http://www.mdpi.com/1422-0067/13/9/11365/hm#b30-ijms-13-11365>

BACARDIT, J. et al., *Coupled photochemical-biological system to treat biorecalcitrant wastewater*. 2007, *Water science and technology*, págs. 95-100.

BARBADO, J. *Hongos Comestibles*. Buenos Aires : Albatros, 2003.

BUITRÓN, Germán, MORENO, Gloria y MORENO, Iván. *Eliminación biológica de altas concentraciones de fenol presente en aguas residuales*. 2009, *Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: investigación, desarrollo y práctica*.

CABEZAS, K. 2014. Obtención de un extracto enzimático con actividad lacásica por fermentación líquida del hongo *Pleurotus ostreatus* en un medio con bagazo de maíz a escala de laboratorio para decoloración de colorantes textiles. Quito [En línea] *Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador*. 2014. Revista de la Facultad de Ingeniería y Agroindustria. [Consulta: 20 de Mayo de 2017]. Disponible en: <http://bibdigital.epn.edu.ec/bitstream/15000/8614/3/CD-5790.pdf>

CALL, H Y MUCKE, L. *History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym®-process)*. 1997, *Journal of Biotechnology*, págs. 163-202.

CARRERA, C. *Tratamiento de aguas residuales*. Madrid : s.n., 2001. págs. 95-107.

CHACÓN, J. et al., *Tratamiento de agua residual proveniente de la industria textil mediante fotocatalisis solar*. 2002, Congreso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, Cancún, México.

CLAUS, H. *Laccases and their occurrence in prokaryotes*. 2003, *Archives of Microbiology*, págs. 145-150.

CORTAZAR, Adriana. et al., Contaminación generada por colorantes de la industria textil. [En línea] *Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Estado de Hidalgo, México*. 2010. [Consulta: 20 de Mayo de 2017]. Disponible en: <https://www.uaeh.edu.mx/scige/boletin/prepa4/n3/e1.html>.

CULLEN, D. *Recent advances on the molecular genetics of ligninolytic fungi*. 1997, *Journal of Biotechnology*, págs. 273-289.

DI PAOLA, María Y VICIÉN. Biorremediación: vinculaciones entre investigación, desarrollo y legislación. *CONICET*. [En línea] 2010. [Consulta: 20 de Mayo de 2017]. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Carmen_Vicien/publication/261986733_Documento_de_Trabajo_52010_Octubre_Biorremediacion_vinculaciones_entre_investigacion_desarrollo_y_legislacion/links/0c9605361519b68791000000.pdf.

DÍAZ, Altamira. et al., *Degradación de fenoles totales durante el tratamiento biológico de aguas de producción petroleras*. 2005, *Ciencia*.

DOMÍNGUEZ, Osmel. et al., *Degradación biológica de contaminantes orgánicos persistentes por hongos de la podredumbre blanca.* 2010, Revista CENIC Ciencias Biológicas, págs. 51-59.

DU, C. et al., *Enhancement of laccase production by Pleurotus ostreatus and its use for the decolorization of anthraquinone dye.* 2004, Process Biochemistry, págs. 1415-1419.

ECHEVERRI, Gustavo. *Adaptación de bacterias a diferentes concentraciones de fenol en el laboratorio: aspectos esenciales para un proceso de biodegradación.* 2011, NOVA, págs. 60-69.

ERENO, Dinorah. Versatilidad marina. *Pesquisa.* [En línea] 2010. [Consulta: 20 de Mayo de 2017]. Disponible en: <http://revistapesquisa.fapesp.br/es/2010/12/01/versatilidad-marina/>.

FERNÁNDEZ, Jorge. et al. *Inmovilización de hongos ligninolíticos para la remoción del colorante negro reactivo 5.* 2009, Revista Colombiana de Biotecnología, págs. 59-72.

FERNÁNDEZ-LARREA, J Y STAHL, U. *Isolation and characterization of a laccase gene from Podospora anserina.*[En línea] Molecular & General Genetics. págs. 539-551. 1996. [Consulta: 21 de Mayo de 2017]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8914515>

FORERO, J, ORTIZ, O Y RIOS, F. *Aplicación de procesos de oxidación avanzada como tratamiento de fenol en aguas residuales industriales de refinería.* 2005, CT&F-Ciencia, Tecnología y Futuro, págs. 97-109.

FOUNTOULAKIS, M. et al., *Removal of phenolics in olive mill wastewaters using the white-rot fungus Pleurotus ostreatus.*[En línea] Water Research. 2002. págs. 4735-4744. [Consulta: 21 de Mayo de 2017]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135402001847>

FRITSCHI, L, LAKHANI, R Y NADON, L. *Short Communication, Cancer Incidence in Textile Manufacturing Workers in Australia.* 2004, J Ocuup Health, págs. 493-496.

GARBISU, Carlos, AMÉZAGA, Ibone y ALKORTA, Itziar. *Biorremediación y ecología.* 2002, Revista Ecosistemas.

GARCÉS, Luis. et al., *Degradación de aguas residuales de la industria textil por medio de fotocatalisis.* 2001, Revista Lasallista de Investigación, págs. 15-18.

GARCÍA, Mariano. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente - Gobierno de España. *Nuevas Técnicas de Cultivo de Pleurotus Ostreatus* . [En línea] 1985. [Consulta: 22 de Mayo de 2017]. Disponible en: http://www.mapama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1985_08.pdf.

GARZÓN, Rossana. *Cinetica de degradación de colorantes textiles de diferentes clases químicas por hongos y bacterias inmovilizados sobre fibra de Agave tequilana*. Bogotá : Pontificia Universidad Javeriana, 2009.

GAYOSSO, M, LEAL, E Y RODRÍGUEZ, R. *Evaluación de la actividad enzimática de Pleurotus ostreatus en presencia de bifenilos policlorados*. 2004, Revista Iberoamericana , págs. 76-81.

GÓMEZ, C. et al., *Estudio de efecto de dos inductores y un protector enzimático sobre la actividad lacasa y MnP producida por T. versicolor y su efecto en la decoloración de efluentes papeleros*. 2005, Universitas Scientiarum, págs. 37-45.

GÓMEZ, Elisa. et al., *Eliminación de compuestos fenólicos en aguas residuales*. 2006, Ingeniería Química, págs. 136-146.

GÓMEZ, Sandra. et al., *Evaluación de tres hongos lignolíticos y de Aspergillus niger como alternativa para el tratamiento de aguas residuales del curtido de pieles*. 2008, Rev. Int. Contam. Ambient, págs. 93-106.

JIMÉNEZ, Blanca. *La contaminación ambiental en México: Causas, efectos y tecnología apropiada*. Mexico D.F : Limusa, 2001.

KIRK, R Y OTHMER, D. *Enciclopedia de tecnología química. Fenol y fenoles*. Quinta. México : Hispano Americana, 2012.

LACORTE, S Y BARCELO, D. *Determination of organophosphorous pesticides and their transformation products in river waters by automated on-line solid-phase extraction followed by thermospray liquid chromatography-mass spectrometry* . 1995, J. Chromatogr, págs. 103-112.

MANZANO , Ana. et al., *Isolation and selection of white-rot fungi for decolourisation of industrial dyes*. 2011, Revista Cenic Ciencias Biológicas, págs. 17-23.

MARTÍN, Jesús y GALLEGO, José. *Biorremediación: conceptos esenciales y ámbitos de aplicación.* 2005, Biotecnología y medioambiente, págs. 61-76.

MOELLER , G Y GARZÓN, M. *Desarrollo de tecnologías no convencionales para el tratamiento de efluentes de la fabricación de colorantes del tipo azo.* 2003, Anuario IMNTA, págs. 123-129.

MONGE, Onofre. et al., *Efecto del pH en el Proceso de Biosorción de Cobre con Bacterias Aerobias.* 2009, Bio Tecnología, págs. 24 - 47.

MORENO, Carmen, BECERRA, Aldo y BLANCO, María. *Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación.* 2004, Rev Iberoam Micol, págs. 103-120

MORENO, Nataly Y OSPINA, Ximena. *Evaluación de inductores metálicos y co-sustratos para la remoción de negro de reactivo 5 empleando Pleurotus ostreatus inmovilizado en fique.* Bogotá : Pontificia Universidad Javeriana, 2008.

MORRISON, R Y BOYD, R. *Química orgánica.* México : Pearson, 1998.

PADMAVATHY, S. et al., *Aerobic decolorization of reactive azo dyes in presence of various cosubstrates.* 2003, Chemical and biochemical engineering quarterly, págs. 147-152.

QUINTANILLA, A. et al., *Aplicación de materiales carbonosos en Procesos de Oxidación Húmeda catalítica con peróxido de hidrógeno.* 2014, Sección de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Madrid.

REDIN, Amaia. *Efecto de la inducción con extractos acuáticos de paja de trigo sobre la producción de enzimas lignolíticas en Pleurotus ostreatus.* Navarra : Universidad Pública de Navarra, 2010.

RODRÍGUEZ , M, SOSA, S Y GARZA, G. *Tratamiento de aguas contaminadas con residuos fenólicos mediante células de C. freundii con actividad tirosinofenolasa.* 1997, Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ciencias Ambientales, págs. 1-8.

RODRÍGUEZ, E. et al., *Degradation of phenolic and non-phenolic aromatic pollutants by four Pleurotus species: the role of laccase and versatile peroxidase.* [En línea] Soil Biology &

Biochemistry. 2004. págs. 909-916. [Consulta: 22 de Mayo de 2017]. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0038071704000550>

RODRÍGUEZ, francisco. *Biotecnología Ambiental*. Madrid : TÉBAR, 2005. págs. 366-367.

RODRIGUEZ, M. Fenton and UV-vis based advanced oxidation processes in wastewater treatment: Degradation, mineralization and biodegradability enhancement. [En línea] (Tesis). (Titulación). *Universitat de Barcelona, Barcelona, España*. 2003. [Consulta: 21 de Mayo de 2017]. Disponible en http://www.tdx.cesca.es/TESIS_UB/AVAILABLE/TDX-0718103-.

RODRÍGUEZ, Suyén. et al., *Selección de cepas de Pleurotus ostreatus para la decoloración de efluentes industriales*. 2006, Revista Mexicana de Micología, págs. 9-15.

ROJAS, Edwin. *Concepto y estrategias de biorremediación*. 2011, Tendencias en la Ingeniería.

ROJAS, Guadalupe. et al., *Decoloración del Azul Brillante de Remazol R (RBBR) en presencia de sulfato de cobre por dos nuevas cepas de Trametes sp.* 2010, Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal, págs. 143-154.

SANCHÉZ, E Y ROYSE, D. *La biología y el cultivo de Pleurotus ssp. San Cristóbal de las Casas*. Chiapas : Noriega Editores, 2001.

SATHIYA, Moorthi. et al., *Decolorization of textile dyes and their effluents using white rot fungi*. 2007, African Journal of biotechnology, págs. 424-429.

SAVAL, Susana. Situación actual y perspectivas de la biorremediación de suelos y acuíferos en México. [En línea] *Revista Voces*. 1998. [Consulta: 21 de Mayo de 2017]. Disponible en http://www.smbb.com.mx/revista/Revista_1998_2/voces.pdf.

STAMETS, P. *Growing gourmet and medicinal mushrooms*. Tercera. Berkeley : Ten Speed Press, 2000. pág. 574.

Libro VI - Anexo 1. *Texto Unificado Legislación Secundaria: Medio Ambiente*. Quito : s.n., 2015.

TORRES, Rocío y CALVA, Laura. *Compuestos fenolicos: origen, distribucion y efectos en los ecosistemas marinos*. 2002, Departamento de Hidrobiología, págs. 31-43.

WANG, Y, VAZQUEZ, R Y PICKARD, M. *Effect of growth conditions on the production of manganese peroxidase by three strains of Bjerkandera adusta.* 2001, Canadian journal of microbiology, págs. 277-282.

ZANÓN, M. et al., *Estudio del síndrome de decaimiento en el cultivo de " Pleurotus ostreatus"(Jack.: Fr.) P. Kumm.* 2005, Boletín de sanidad vegetal. Plagas, págs. 431-442.

ZILLE, A. et al., *Immobilized laccase for decolourization of Reactive Black 5 dyeing effluent.* 2003, Biotechnology letters, págs. 1473-1477.

ANEXOS

ANEXO A. MEMORIA FOTOGRÁFICA DE LA IMPLEMENTACIÓN DE LOS PROCEDIMIENTOS METODOLÓGICOS.



Figura 1. Toma de muestra proveniente de un efluente textil.

Realizado por: Nájera, M. (2017)

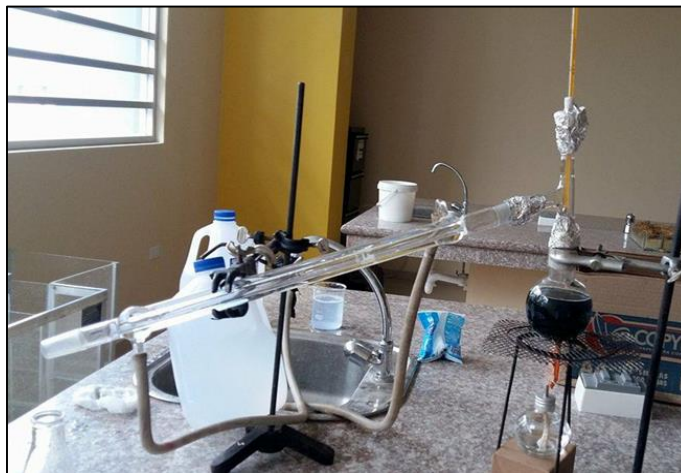


Figura 2. Proceso de limpieza de la muestra por destilación

Realizado por: Nájera, M. (2017)



Figura 3. Elaboración de la curva de calibración para la determinación de fenol.

Realizado por: Nájera, M. (2017)

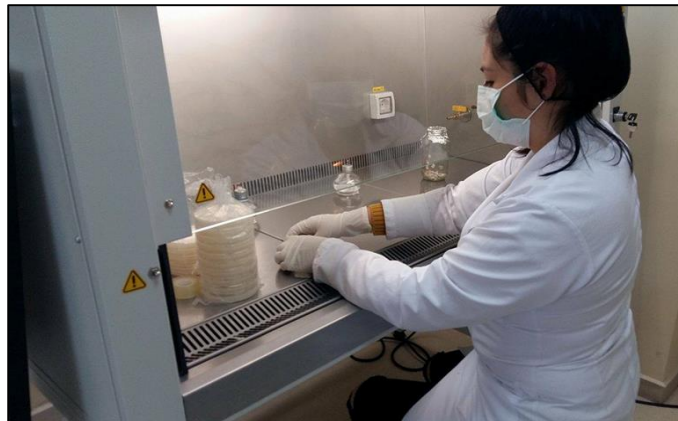


Figura 4. Utilización de una cámara de bioseguridad nivel II para la inoculación de semillas de *P. ostreatus* en medio PDA.

Realizado por: Nájera, M. (2017)



Figura 5. Preparación del extracto de paja de trigo

Realizado por: Nájera, M. (2017)



Figura 6. Elaboración del inóculo líquido

Realizado por: Nájera, M. (2017)



Figura 7. Agitación de los tratamientos a 150 rpm por un periodo de 8 días.

Realizado por: Nájera, M. (2017)



Figura 8. Periodo de aireación de los experimentos

Realizado por: Nájera, M. (2017)



Figura 9. Proceso de secado de la biomasa recolectada.

Realizado por: Nájera, M. (2017)

ANEXO B. MEMORIA FOTOGRÁFICA DE RESULTADOS



Figura 1. Envés de las cajas Petri con cultivo de *P. ostreatus* en medio PDA al octavo día posterior a la inoculación.

Realizado por: Nájera, M. (2017)



Figura 2. Crecimiento del micelio de *P. ostreatus* en medio PDA al doceavo día posterior a la inoculación.

Realizado por: Nájera, M. (2017)