



BUAP

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Escuela de Biología

EVALUACIÓN DE HONGOS CON CAPACIDAD

BIODEGRADADORA DE

COLORANTES INDUSTRIALES

Tesis Profesional

Que para obtener el título de

Lic. Biología

Presenta: Ricardo Sánchez Blanco

ASESOR DE TESIS.

Dra. Martha Dolores Bibbins Martínez.

Puebla, Puebla.

ENERO 2016

ÍNDICE.

LISTA DE FIGURAS.	iii
LISTA DE TABLAS.	vi
RESUMEN.	viii
1. INTRODUCCIÓN.	1
2. MARCO TEORICO.	4
2.1 Colorantes textiles.	4
2.1.1 Clasificación de los colorantes.	4
2.2 Sistemas de Tratamiento de agua.	7
2.2.1 Tratamientos Físicos.	7
2.2.2 Tratamientos Químicos.	9
2.2.3 Tratamientos Biológicos.	10
2.3 Hongos de la pudrición.	12
2.4 Enzimas.	17
2.5 Enzimas ligninolíticas de hongos.	20
2.5.1 Lignina peroxidasa.	21
2.5.2 Manganese peroxidasa.	22
2.5.3 Alcohol Veratril Oxidasa.	23
2.5.4 Lacasa.	23
2.6 Genero <i>Pleurotus</i>	24
2.6 Genero <i>Oxiporus</i>	25
3. ANTECEDENTES.	29
4. JUSTIFICACIÓN.	35
5. HIPÓTESIS.	36

6. OBJETIVO GENERAL.	37
6.1 OBJETIVOS PARTICULARES.	37
7. MATERIAL Y MÉTODOS.	38
7.1 CEPAS BAJO ESTUDIO.	39
7.2 ENSAYOS DE DECOLORACIÓN EN MEDIO SÓLIDO ADICIONADO Y LIMITADO EN FUENTE DE CARBONO.	39
7.3 DEGRADACIÓN DE COLORANTES INDUSTRIALES EN FERMENTACIÓN LIQUIDA CON MEDIO LIMITADO EN FUENTE DE CARBONO.	40
8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.	42
8.1 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LACASA.	42
8.2 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE MANGANESO PEROXIDASA.	43
8.3 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE ALCOHOL VERATRIL OXIDASA.	43
8.4 PARÁMETROS CINÉTICOS.	44
9. RESULTADOS.	45
9.1 ENSAYOS DE DECOLORACIÓN EN PLACA CON MEDIO SÓLIDO LIMITADO DE FUENTE DE CARBONO.	47
9.2 ENSAYOS DE DECOLORACIÓN EN PLACA CON MEDIO SÓLIDO ADICIONADO EN FUENTE DE CARBONO.	53
9.3 DECOLORACIÓN EN MEDIO LÍQUIDO LIMITADO DE FUENTE DE CARBONO.	61
9.4 ENSAYO DE MICROSCOPIA COMPROBATORIO DE LA BIOSORCIÓN DE COLORANTES INDUSTRIALES.	66
9.5 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE <i>P. ostreatus</i> Y <i>O. latemarginatus</i> DURANTE FERMENTACIÓN LÍQUIDA Y PRESENCIA DE COLORANTES.....	68
9.6 ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EN FERMENTACION LIQUIDA EN PRESENCIA DE COLORANTES INDUSTRIALES.	71
10. DISCUSIÓN.	78

11. CONCLUSIONES.	82
12. BIBLIOGRAFIA.	83
Abreviaturas.	vii
Apendice A1.	95
Apendice B1.	96

LISTA DE FIGURAS.

Fig. 1. Ejemplos estructurales de compuestos textiles.	5
Fig. 2. Alcoholes <i>p</i> -hidroxicinamílicos.	14
Fig. 3. Estructura cristalina de lacasa activa.	17
Fig. 4. <i>Pleurotus ostreatus</i>	25
Fig. 5. <i>Oxiporus latemarginatus</i>	26
Fig. 6. <i>Oxiporus latemarginatus</i>	26
Fig. 7. Ciclo de vida de la clase Basidiomycetes (<i>Pleurotus ostreatus</i>).	27
Fig. 8. Ciclo de vida de clase Zygomycetes (<i>Rizophus stolonifer</i>).	28
Fig. 9. Diagrama de flujo de actividades.	38
Fig. 10. Morfología macroscópica y microscópica de <i>Pleurotus ostreatus</i>	45
Fig. 11. Morfología macroscópica y microscópica de <i>Oxyporus latemarginatus</i>	45
Fig. 12. Morfología macroscópica y microscópica de <i>Rizhomucor variabilis</i>	46
Fig. 13. Morfología microscópica de <i>Rizhomucor variabilis</i>	46
Fig. 14. Morfología macroscópica y microscópica de <i>Regularior sp.</i>	47
Fig. 15. Morfología microscópica de <i>Regularior sp.</i>	47
Fig. 16. Decoloración de colorante R RMZ por <i>Pleurotus ostreatus</i> en (MLFC).	38
Fig. 17. Decoloración de colorante AZ RMZ por <i>Pleurotus ostreatus</i> en (MLFC).	38
Fig. 18. Decoloración de colorante NEGRO RDT por <i>Pleurotus ostreatus</i> en (MLFC).	39
Fig. 19. Decoloración de colorante R RMZ por <i>Oxiporus latemarginatus</i> en (MLFC).	40

Fig. 20. Decoloración de colorante R RMZ por <i>Pleurotus ostreatus</i> en (MAFC).	56
Fig. 21. Decoloración de colorante AZ RMZ por <i>Pleurotus ostreatus</i> en (MAFC).	56
Fig. 22. Decoloración de colorante NEGRO RDT por <i>Pleurotus ostreatus</i> en (MAFC).	56
Fig. 23. Decoloración de colorante R DNX por <i>Oxiporus latemarginatus</i> en (MAFC).	45
Fig. 24. Decoloración de colorante AZ RMZ por <i>Oxiporus latemarginatus</i> en (MAFC).	58
Fig. 25. Decoloración de colorante NEGRO RDT por <i>Oxiporus latemarginatus</i> en (MAFC).	58
Fig. 26. Decoloración de colorante R DNX por <i>Rhizomucor variabilis</i> en (MAFC).	59
Fig. 27. Decoloración de colorante NEGRO RDT por <i>Rhizomucor variabilis</i> en (MAFC).	60
Fig. 28. Decoloración de colorante AZ RMZ por <i>Regularior sp.</i> en (MAFC).	61
Fig. 29. Decoloración de colorante NEGRO RDT por <i>Regularior sp.</i> en (MAFC).	61
Fig. 30. Ensayo de fermentación en (MLLFC) para cepa <i>Pleurotus ostreatus</i> y colorantes industriales.	63
Fig. 31. Porcentajes de decoloración por la cepa <i>Pleurotus ostreatus</i> , obtenidos en ensayo de fermentación.	63
Fig. 32. Ensayo de fermentación en (MLLFC) para cepa <i>Oxiporus latemarginatus</i> y colorantes industriales.	65
Fig. 33. Porcentajes de decoloración por la cepa <i>Oxiporus latemarginatus</i> , obtenidos en ensayo de fermentación.	65
Fig. 34. Evidencia de la presencia del colorante azul remazol encontrado en el interior del micelio de cepa <i>Oxiporus latemarginatus</i> microscopia (100x).	66
Fig. 35. Evidencia de la presencia del colorante azul remazol encontrado en el interior del micelio de <i>Oxiporus latemarginatus</i> microscopia (100x).	67
Fig. 36. Evidencia de la presencia del colorante azul remazol encontrado en el interior del micelio de <i>Oxiporus latemarginatus</i> microscopia (100x).	67
Fig. 37. Evidencia de la presencia del colorante rojo dianix encontrado en el interior del micelio de <i>Pleurotus ostreatus</i> microscopia (100x).	68
Fig. 38. Biomasa generada por <i>P. ostreatus</i> durante fermentación en (MLLFC) y colorantes industriales.	69
Fig. 39. Biomasa generada por <i>O. latemarginatus</i> durante fermentación en (MLLFC) y colorantes industriales.	70

Fig. 40. Actividad enzimática de lacasa (U/L), generada por <i>P. ostreatus</i> y <i>O. latemarginatus</i> en presencia de el colorante azul remazol.	72
Fig. 41. Actividad enzimática de lacasa (U/L), generada por <i>P. ostreatus</i> y <i>O. latemarginatus</i> en presencia de el colorante rojo dianix.	72
Fig. 42. Actividad enzimática de lacasa (U/L), generada por <i>P. ostreatus</i> y <i>O. latemarginatus</i> en presencia de el colorante Indigo.	73
Fig. 43. Actividad enzimática de Manganese peroxidasa (U/L), generada por <i>P. ostreatus</i> y <i>O. latemarginatus</i> en presencia de el colorante AZ RMZ.	74
Fig. 44. Actividad enzimática de Manganese peroxidasa (U/L), generada por <i>P. ostreatus</i> y <i>O. latemarginatus</i> en presencia de el colorante R DNX.	74
Fig. 45. Actividad enzimática de Manganese peroxidasa (U/L), generada por <i>P. Ostreatus</i> y <i>O. latemarginatus</i> en presencia de el colorante Indigo.	75
Fig. 46. Actividad enzimática de Alcohol veratril oxidasa (U/L), generada por <i>P. ostreatus</i> y <i>O. latemarginatus</i> en presencia de el colorante AZ RMZ.	76
Fig. 47. Actividad enzimática de Alcohol veratril oxidasa (U/L), generada por <i>P. ostreatus</i> y <i>O. latemarginatus</i> en presencia de el colorante R DNX.	76
Fig. 48. Actividad enzimática de Alcohol veratril oxidasa (U/L), generada por <i>P. ostreatus</i> y <i>O. latemarginatus</i> en presencia de el colorante ÍNDIGO.	77

LISTA DE TABLAS.

Tabla 1. Clasificación de los colorantes por sus propiedades y aplicación.	6
Tabla 2. Enzimas que contienen o requieren elementos inorgánicos como cofactores.	18
Tabla 3. Las seis clases principales de enzimas.	19
Tabla 4. Decoloración de colorantes en medio sólido limitado en fuente de carbono (MSLFC).	48
Tabla 5. Velocidad de crecimiento de cepa <i>Pleurotus ostreatus</i> en (MSLFC) y colorante.	49
Tabla 6. Velocidad de crecimiento de cepa <i>Oxiporus latemarginatus</i> en (MSLFC) y colorante.	51
Tabla 7. Velocidad de crecimiento de cepa <i>Rhizomucor variabilis</i> en (MSLFC) y colorante.	52
Tabla 8. Velocidad de crecimiento de cepa <i>Regularior sp.</i> en (MSLFC) y colorante.	53
Tabla 9. Decoloración de colorantes en medio sólido adicionado en fuente de carbono (MSAFC).	54

Tabla 10. Velocidad de crecimiento de cepa <i>Pleurotus ostreatus</i> en (MSAFC) y colorante.	55
Tabla 11. Velocidad de crecimiento de cepa <i>Oxiporus latemarginatus</i> en (MSAFC) y colorante.	57
Tabla 12. Velocidad de crecimiento de cepa <i>Rhizomucor variabilis</i> en (MSAFC) y colorante.	59
Tabla 13. Velocidad de crecimiento de cepa <i>Regularior sp.</i> en (MSAFC) y colorante.	60

ABREVIATURAS.

nm: nanómetros.	R DNX: Rojo dianix.
H ₂ O ₂ : peróxido de Hidrogeno.	A DNX: Amarillo dianix.
TiO ₂ : Di oxido de titanio.	R RMZ: Rojo remazol.
Å: Amstrong.	A RMZ: Amarillo remazol.
Fe ²⁺ : Hierro.	AZ RMZ: Azul remazol.
Cu ²⁺ : Cobre.	N RDT: Negro RDT.
Zn ²⁺ : Zinc.	MLLFC: Medio liquido limitado en fuente de carbono.
Mg ²⁺ : Magnesio.	SO ₃ H: ácido sulfónico.
Mn ²⁺ : Manganeseo.	RBBR: Remazol Brilliant Blue R.
K ⁺ : Potasio.	MSLFC: Medio sólido limitado en fuente de carbono.
pH: potencial de hidrogeno.	MSAFC: Medio sólido adicionado en fuente de carbono.
Ni ²⁺ : Nitrato.	X: Biomasa.
Mo: Morbideno.	μ: Velocidad específica "mu".
Se: Selenio.	ABTS: 2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico).
EC: Enzyme comisión.	Km: Constante de Michaelis-Mentel.
LiP: Lignino peroxidasa.	EE: Extracto Enzimático
MnP: Manganeseo peroxidasa.	
AVO: Alcohol veratril oxidasa.	
AH: Substratos reductores.	
TNT: Trinitrotolueno.	
PCB: Bifenilo policlorado.	
CO ₂ : Dioxido de carbono.	
N: nitrógeno.	
N DNX: Negro dianix.	

ABSTRACT.

This work was focused to evaluate the biodegradative capacity of industrial dyes through selected cepas of *Pleurotus ostreatus*, *Oxyporus latemarginatus*, class Basidiomycetes, against *Rhizomucor variabilis* and *Regularior sp.* class Zygomycetes, in two different solid media, one enriched with carbone sources and other limited in carbone source (discoloration tests); In both media the selected cepas were capable to grow in the presences of the dyes but only two fungus *P. ostreatus* and *O. latemarginatus* showed more significantly degrading of red remazol, blue remazol and black RDT; it was also evaluated only for the two Basidiomycetes cepas the enzymatic activity of lacasa, manganese peroxidasa and alcohol veratril oxidasa generated in liquid fermentation with bleu remazol, dianix red, and indigo dyes. *P. ostreatus* and *O. latemarginatus* was capable to degrade largely all of the dyes being the best results with the indigo dye; with a final concentration of 2.85% for both strains, *P. ostreatus* register its maximum laccase activity of 1700 U/L, in presence of blue remazol dye, and *O. latemarginatus* the maximum value was for the enzyme (MnP) in the presence of bleu remazol dye 2800 U/L. *O. latemarginatus* was highlighted in degradation of dianix red with 23.91% which was reported in the 2700 U/L of (MnP) at 100 h of fermentation, these values show that the fungal organisms are served by different unspecific extracellular enzymes that together may be responsible for the degradation of dyes although "atypical" evidence and even subsequent discharge as a new enzyme (AVO) can be evidence of other cometabolics processes may be involved in the digestion of dyes as cytochromes P450, and biosorption processes.

KEY WORDS: white rot fungi, lignine, industrial dyes, enzymes, decolorization.

RESUMEN.

Este trabajo se enfocó en evaluar la capacidad biodegradadora de colorantes industriales mediante cepas seleccionadas de *Pleurotus ostreatus* y *Oxyporus latemarginatus*, clase basidiomicetes, contra *Rhizomucor variabilis* y *Regularior sp.* clase Zygomycetes, en dos diferentes medios sólidos, uno adicionado y otro limitado en fuentes de carbono (ensayos de decoloración); En ambos medios las cepas seleccionadas fueron capaces de crecer en presencia de los colorantes pero solo dos cepas *P. ostreatus* y *O. latemarginatus* mostraron degradar de manera más significativa los colorantes rojo remazol, azul remazol y negro RDT; también se evaluó solo para las dos cepas de Basidiomycetes la actividad enzimática de lacasa, manganese peroxidasa y alcohol veratril oxidasa generada en fermentación liquida con colorante azul remazol, rojo dianix e índigo. *P. ostreatus*. Y *O. latemarginatus* fueron capaces de degradar en buena medida todos los colorantes siendo el de mejores resultados el colorante índigo con 2.85% de concentración final para las dos cepas, *P. ostreatus* registró para lacasa su máxima actividad siendo de 1700 U/L en presencia del colorante azul remazol; para *O. latemarginatus* el valor máximo fue para la enzima MnP en presencia del colorante azul remazol con 2800 U/L. *O. latemarginatus* se destacó en la degradación del colorante rojo dianix con 23.91% en el cual se reportó 2700 U/Lde MnP a las 100 hrs de fermentación; estos valores demuestran que los organismos fúngicos presentan distintas enzimas extracelulares inespecíficas que en conjunto pudieran ser las responsables de la degradación de los colorantes aunque las evidencias "atípicas" e incluso secreciones posteriores de una nueva enzima como la AVO, puede ser evidencia de que otros procesos cometabolicos pueden estar implicados en la digestión de colorantes como citocromos reductores P450, y procesos de biosorción.

PALABRAS CLAVE: Hongos de pudrición blanca, lignina, colorantes industriales, enzimas, decoloración.

1. INTRODUCCIÓN.

La contaminación es la introducción de una sustancia o forma de energía con potencial para provocar daños, irreversibles o no en un medio inicial cualquiera (Nebel y Wriqth 1999). Los problemas medioambientales relacionados a aguas residuales se han hecho más complejos con el aumento de productos industriales (Chun y Yizhong 1991). En la industria textil los residuos colorantes son los más difíciles de tratar debido a que la gran mayoría de los colorantes son de origen sintético y poseen estructuras moleculares aromáticas complejas las cuales brindan resistencia a agentes oxidantes, la acción de sustancias químicas y a algunos procesos físicos, además de que son altamente solubles en agua; estos se consideran compuestos xenobióticos ya que no se encuentran de forma natural en la biosfera y en buen numero algunos son muy resistentes ante factores como la luz, temperatura, y a la degradación microbiana (Pagga y Brown 1986; Moeller y Garzon 2003). Existen más de 100,000 tipos de colorantes disponibles en el mercado, con una producción de más de 7×10^5 toneladas métricas de residuos colorantes producidos anualmente donde al menos del 10 al 15% es perdido y liberado en efluentes industriales (Zollinger 1991; Meyer 1981; Ruiz 2010). Se estima que el 90 % de los reactivos colorantes entran activos a los sedimentos de plantas de tratamiento, estos pasan sin cambios a través y se descargan en los ríos (Pierce 1994; Meyer 1981; O' Neil *et al.*, 1999). Los colorantes usados industrialmente poseen una compleja estructura química encontrándose así aquellos que contienen grupos azo, diazo, antraquinonas, y complejos metálicos, los cuales generalmente se aplican como mezclas. Según sus propiedades pueden ser clasificados como ácidos, básicos, dispersos, reactivos y directos (Moeller y Garzon 2003; Rodríguez y Toca 2006).

Se ha reportado que estos colorantes pueden contener sustancias como ácido benzoico y ácido acetilsalicílico, las cuales pueden inducir alergias y reacciones asintomáticas en personas sensibles (Pereira y Regina 2001). Estos efluentes contienen altas concentraciones de sólidos disueltos, sodio, cloro, sulfatos, tintes recalcitrantes y cancerígenos, estos últimos pueden alcanzar valores de hasta 400

mg/L⁻¹ (Mc Mullan *et al.*, 2001; Bochart y Libra 2001). El color está generalmente asociado a la presencia de compuestos tóxicos con grupos cromóforos o polímeros de alto peso molecular, los desechos industriales con un alto grado de color, tienen un gran poder de bio-acumulación y una baja velocidad de despolimerización, esto supone su acumulación a largo plazo en lagos y bahías, provocando una disminución del poder absorbente del agua y en consecuencia una disminución en la actividad fotosintética de los organismos presentes en dichos ecosistemas acuáticos, reduciendo el contenido de oxígeno disuelto y favoreciendo procesos de eutrofización por el aumento de carga orgánica (Rodríguez y Toca 2006; Robinson *et al.*, 2001; Feijoo y Lema. 1999; Verma 1976). Pese a que las concentraciones de metales no son tan altas, las concentraciones involucradas pueden producir acumulación en los tejidos de los organismos acuáticos, que a largo plazo llegan a ser tóxicos. Las descargas también pueden aumentar la población de algunos peces y algas debido a su alto contenido de nitrógeno, contribuyendo así al agotamiento del oxígeno disuelto (Mancilla *et al.*, 2012).

Recientemente han surgido aplicaciones biotecnológicas con potencial aplicación contra fuentes de contaminación de una manera más eficiente, que incluyen el uso de bacterias y hongos, a menudo en combinación con procesos fisicoquímicos (Mc Mullan *et al.*, 2001).

Se han reportado numerosas enzimas oxidativas presentes en bacterias, hongos, y plantas que juegan un destacado rol en numerosos tratamientos aplicados a desechos (Duran 1997). Los hongos pertenecientes a la clase Basidiomycetes (Fig. 7) conocidos como de pudrición blanca son un grupo heterogéneo de microorganismos pero tienen en común la capacidad de degradar lignina así como otros compuestos de la madera como celulosa y hemicelulosa (Kirk y Farrel 1987; Wesenberg *et al.*, 2003; Shah y Nerud 2002), esta propiedad está basada en la capacidad de producir enzimas extracelulares con baja especificidad de sustrato, capaces de degradar un amplio rango de componentes xenobióticos (Lund y Ragauskas 2001). Las enzimas más importantes son Lacasa (Lac), Manganese

peroxidasa (MnP) y Lignina peroxidasa (LiP) (Wesenberg *et al.*, 2003), estas son secretadas durante el metabolismo secundario (idiofase) cuando el nitrógeno, carbono o azufre es limitado (Kirk y Farrel, 1987). Las técnicas de oxidación enzimática tienen potencial dentro de una gran variedad de campos industriales como la del papel, pulpa, textiles y de alimentos (Cordi *et al.*, 2012; Gianfreda y Xu 1999).

2. MARCO TEORICO.

2.1 Colorantes textiles.

Una gran variedad de colorantes sintéticos son usados para la tinción textil, y otras aplicaciones industriales, la diversa estructura de los colorantes deriva de la presencia de algún grupo cromóforo, por ejemplo azo, antraquinona, triarilmetano, y los grupos de ftalocianina, así como la aplicación de diferentes tecnologías (reactivos, directos, dispersos, y de teñido) (Zollinger 1991).

Los colorantes dan color a los materiales porque retienen radiaciones de longitudes de onda dentro de la región visible del espectro de absorción (400-800 nm), que inciden en la superficie del material y que son reflejados en la longitud de onda de un color visible. Aunque todos los compuestos orgánicos absorben radiación, solo los llamados cromóforos (nitro, nitroso, azo o quinonoides entre otros) tienen bandas de absorción dentro del rango de radiación al cual es sensible el ojo humano (Christie 2001).

2.1.1 Clasificación de colorantes.

Su clasificación se hace con base en el grupo cromoforo principal que constituye el colorante: Nitroso, nitro, azo, azoico, estibileno, diarilmetano, triarilmetano, santeño, quinoleína, metino, acridina, azufre, tiazol, tiamina, indamina, azina, oxacina, lactona, antraquinona, indigoide, y ftalocianina (Fig.1).

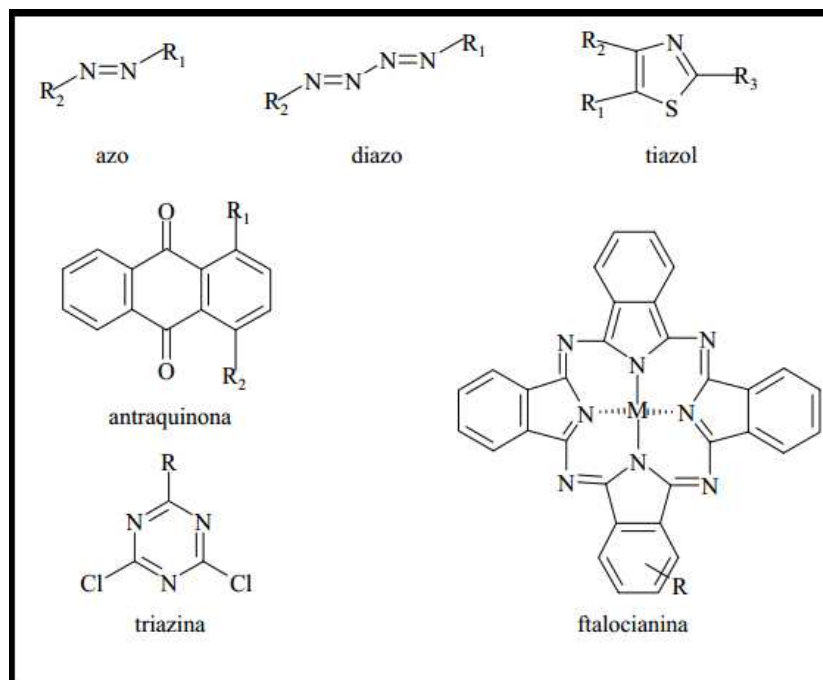


Fig. 1. Ejemplos estructurales de compuestos textiles (Mancilla *et al.*, 2012).

Con base a su estructura química y el método de aplicación los colorantes se pueden clasificar también en ácidos, básicos, directos y dispersos como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación de los colorantes por sus propiedades y aplicación. (Trutman y Edward 1990)

TIPO	PROPIEDADES	APLICACIONES
Acido.	Aniónico y solubles en agua debido a la presencia de grupos hidroxilo. Grupo cromóforo característico -SO ₃ H-, incluye colorantes de tipo azo.	Tinción de lana, nylon, piel y acrílicos modificados. Usados en menor proporción en cosméticos y en alimentos.
Básico.	Catiónicos y solubles en agua. Poseen grupos amino que les dan un carácter catiónico en solución ácida diluida. Incluyen derivados de difenilmetano y trifenilmetano principalmente.	Tinción de acrílicos, nylon y poliéster modificado, se usa poco en la industria textil.
Directo.	Aniónicos e hidrosolubles debido a la presencia de grupos sulfónicos. Casi todos son del tipo azo.	Tinción de algodón, celulosa, papel, piel y fibras como lino, cáñamo, seda, lana.
Disperso	Catiónicos e insolubles en aguas. Incluyen derivados de atraquinona y de tipo azo.	Tinción de poliéster, nylon, acetato de celulosa, fibras acrílicas.

2.2 Sistemas de Tratamiento de agua.

El desarrollo tecnológico adecuado para el tratamiento de efluentes textiles ha sido objeto de gran interés en los últimos tiempos, debido a un incremento en la reglamentación ambiental. Los constituyentes presentes en el agua residual se remueven por mecanismos de tipo físico, químico y biológico (Robinson *et al.*, 2001; Forgacs *et al.*, 2004).

Los métodos se clasifican por lo general en operaciones físicas unitarias, procesos químicos unitarios y procesos biológicos unitarios. En los sistemas de tratamiento se realizan combinaciones de estas operaciones y procesos; los métodos de tratamiento en los cuales predominan la aplicación de fuerzas físicas se conocen como operaciones físicas unitarias. Se cuentan como ejemplos de operaciones físicas unitarias la floculación, sedimentación, flotación, filtración, tamizado, mezcla y transferencia de gases. Los métodos de tratamiento en los cuales la remoción o transformación de contaminantes se produce por adición de insumos químicos o por reacciones químicas se conocen como procesos químicos unitarios así también la precipitación, adsorción y desinfección se catalogan como procesos químicos. Los métodos de tratamiento donde la remoción de contaminantes se lleva a cabo gracias a la actividad biológica se denominan procesos biológicos unitarios. La principal aplicación de los procesos biológicos unitarios es en la remoción de contaminantes orgánicos como los de las aguas residuales. Estas sustancias se transforman en gases que escapan a la atmosfera, y en tejido celular biológico -biomasa- (X), que puede ser removido por sedimentación. Además existen otros tratamientos biológicos empleados para remover nutrientes como nitrógeno y fosforo, de aguas residuales (Crites y Tchobanoglous 2000).

2.2.1 Tratamientos Físicos.

Adsorción: La eficacia del proceso de adsorción está influenciada por una gran variedad de parámetros, entre ellos la interacción entre el tinte y el soporte, superficie específica, tamaño de la partícula, temperatura, pH o tiempo de

contacto (Kumar *et al.*,1998). La eficacia del método depende en gran medida del tipo de soporte elegido. Se emplean tanto soportes inorgánicos como orgánicos. Los primeros tienen una gran estabilidad mecánica y química, alta superficie específica y alta resistencia a la degradación microbiana. Los soportes orgánicos se generan a partir de fuentes renovables o son residuos industriales. Los procesos de adsorción generan efluentes de alta calidad, pero tienen una serie de desventajas que los hace ineficaces para el tratamiento de efluentes coloreados: son procesos lentos; no selectivos, de manera que hay una competición entre las moléculas de tinte y otros compuestos presentes en el efluente, no destructivos generándose así un residuo que debe ser eliminado; la desorción es un proceso muy difícil y costoso; los adsorbentes suelen ser caros y en ocasiones requieren un proceso de activación previo (Forgacs *et al.* 2004).

Membranas de filtración: Los métodos de tratamiento basados en el empleo de membranas permiten una separación efectiva de las moléculas de colorante y otros compuestos de tamaño mayor al del poro de la membrana seleccionada. Principalmente se emplean las técnicas de ósmosis inversa y nano filtración (Reife y Freeman 1996). Se logra tratar grandes volúmenes de efluente en continuo, de un modo rápido y satisfactorio. La generación de un residuo con una alta concentración de contaminante, la dificultad y coste de substitución de las membranas son las principales desventajas de estas técnicas (Robinson *et al.*, 2001).

Coagulación-floculación: Los métodos de coagulación-floculación se basan en la adición de polielectrolitos o floculantes inorgánicos (sales de hierro o aluminio), que forman flóculos con las moléculas de colorante facilitando su eliminación por sedimentación. Las eficacias de eliminación son altas, pero en el proceso se generan lodos que deben ser eliminados. Además los mejores rendimientos se logran al aplicar un exceso de coagulante, que aumenta la concentración de contaminante en el efluente (Gahr *et al.*, 1994).

Intercambio iónico: El efluente pasa a través de las membranas de intercambio iónico hasta su saturación. La principal ventaja de esta técnica es que no hay

pérdida de adsorbente durante su regeneración. Sin embargo, el coste es elevado, los disolventes necesarios para la limpieza son caros y es un método no apto para todo tipo de tintes (Slokar y Le, 1997).

2.2.2 Tratamientos Químicos.

Oxidación fotoquímica: Este método se basa en la combinación de la radiación UV con otros compuestos, tales como H_2O_2 ó catalizadores como TiO_2 de manera que los rayos UV activan dichos compuestos y los hacen capaces de oxidar los tintes. Este método presenta una elevada eficacia y no genera lodos ni olores. Sin embargo las necesidades de una fuente de radiación, el coste, la lentitud del proceso y las dificultades de implementación a gran escala hacen que este método sea poco efectivo a nivel industrial (Kunz *et al.*, 2002).

Oxidación electroquímica: Los procesos electroquímicos se basan en la hidrólisis del colorante mediante un potencial o corriente controlada o a través de agentes secundarios generados electrolíticamente. Los procesos son limpios, operan a baja temperatura y en muchos casos no requieren la adición de productos químicos a las aguas residuales (Ochoa, 1995). El alto consumo de energía y la generación de compuestos secundarios por reacciones paralelas disminuyen la potencialidad del método (Guaratini y Zanoni, 2000).

Oxidación por ozonación: El ozono (O_3) es un oxidante en extremo fuerte que ha sido utilizado para la desinfección de aguas residuales. Debido a que el ozono es químicamente inestable, se descompone en oxígeno con mucha rapidez después de su generación. Como resultado, el ozono debe ser generado en el sitio o muy cerca del punto donde se va a usar.

El ozono es generado a partir del aire o del oxígeno puro mediante la aplicación de alto voltaje a lo largo del estrecho espaciamiento de los electrodos. La corona de alta energía creada por este arreglo disocia una molécula de oxígeno, la cual reacciona con otras dos moléculas de oxígeno para crear otras dos moléculas de ozono. Cuando el ozono se agrega al agua los radicales libres formados HO_2 y

HO, tienen grandes poderes oxidantes y son probablemente las formas activas del proceso de desinfección, estos radicales libres también poseen poder oxidante para reaccionar con otras impurezas de soluciones acuosas (Crites y Tchobanoglous, 2000).

2.2.3 Tratamientos Biológicos.

El uso de tratamientos biológicos tuvo en un principio como objetivo principal la eliminación de la materia orgánica del agua residual. Posteriormente se les ha ido dando otros usos como son: la oxidación de nitrógeno amoniacal (nitrificación), la eliminación del nitrógeno de las aguas residuales mediante la conversión de las formas oxidadas en N₂ (desnitrificación) o la eliminación del fósforo.

En todos estos tipos de procesos se utilizan reacciones asociadas a los organismos vivos, Los microorganismos crecen utilizando los contaminantes del agua como fuente de carbono y/o como fuente de energía, convirtiéndolos en nuevos microorganismos (biomasa), dióxido de carbono, y otros compuestos inocuos. La fuente de carbono y/o energía se denomina sustrato, por lo que en estos tratamientos la eliminación de contaminantes se conoce como “consumo de sustrato”. Los procesos de crecimiento de biomasa y de consumo de sustrato están totalmente relacionados, denominándose rendimiento a la cantidad de biomasa generada por unidad de sustrato eliminado.

Los tratamientos biológicos se prestan a diversas clasificaciones, cabe distinguir entre dos tipos claramente diferenciados.

1.-Procesos biológicos de cultivo en suspensión.

2.-Procesos biológicos de soporte sólido.

En los de cultivos de suspensión se suele recurrir a una decantación y recirculación de la biomasa, mientras que en los de soporte sólido la retención de la misma queda asegurada por las características del propio proceso.

Los sistemas más característicos de los primeros son los fangos activados, las lagunas aireadas y el lagunaje. Entre los segundos se encuentran los filtros percoladores, los biodiscos y los lechos de turba (Ferrer y Seco, 2008).

Tratamiento bacteriano anaerobio: La eficacia de los tratamientos anaerobios en la degradación de tintes ha sido ampliamente estudiada y demostrada, tanto con cultivos mixtos como con cepas aisladas. Los cultivos mixtos de microorganismos presentan la ventaja de que las distintas cepas presentes en el consorcio atacan a las moléculas de tinte en diferentes posiciones e incluso ayudan a la descomposición de los productos generados por las otras cepas. Sin embargo los consorcios generalmente varían en el transcurso del proceso de descomposición, de manera que sobreviven las cepas que mejor se adaptan al medio, dificultando los procesos de control (Banat *et al.*, 1996; Forgacs *et al.*, 2004).

Tratamiento bacteriano aerobio: Por lo general, los tratamientos aerobios basados en consorcios de bacterias en sistemas convencionales no son capaces de degradar tintes procedentes de efluentes textiles (Robinson *et al.*, 2001). En estos procesos la eliminación de tintes es debido frecuentemente a la adsorción sobre los lodos. Sin embargo se ha conseguido aislar cepas de bacterias que sí son capaces de degradar algunas clases de tintes (Mc Mullan *et al.*, 2001). El mecanismo por el cual bacterias aerobias podrían degradar los tintes sintéticos sería mediante la secreción de azo reductasas aerobias (Russ *et al.*, 2000).

Tratamiento fúngico: los hongos exhiben una versatilidad suficiente para ser capaces de degradar una variedad de compuestos xenobióticos como hidrocarburos aromáticos, pesticidas organoclorados, explosivos y colorantes, de manera eficaz estos han sido degradados a dióxido de carbono (Barr y Aust 1997; Young y Yu 1997). En asociación con el crecimiento micelial algunas enzimas están involucradas en la degradación de desechos de lignino-celulosa, debido a que las enzimas son moléculas protéicas que no metabolizan colorantes pero catalizan un tipo específico de transformación con ellos, la mineralización nunca debe esperarse de estas enzimas, sin embargo la modificación enzimática de

colorantes a menudo puede ser suficiente para ciertos estados en el sentido de destruir enlaces y reducir la toxicidad. Adicionalmente la modificación enzimática puede hacer a los colorantes más susceptibles a una subsecuente degradación en plantas de tratamiento donde tomará lugar la completa eliminación. Aunque las moléculas de los colorantes muestran una elevada variedad estructural, estos son degradados solo por unas pocas enzimas diferentes (Cavaco y Gubitz, 2000).

En síntesis por tres razones los procesos de degradación empleando enzimas difieren de la catálisis química.

1.-Las reacciones catálisis-enzima, son al menos en bastantes ordenes de magnitud más rápidas, que la reacciones catalizadas químicamente, cuando se compara con la reacciones no catalizadas correspondientes, las enzimas típicamente incrementan los rangos de 10^6 a 10^{13} veces la reacción.

2.-Las enzimas tienen mayor especificidad en sus reacciones que la catálisis química y estas raramente forman sub-productos.

3.-Las enzimas catalizan reacciones bajo condiciones comparativamente medias, tales como temperaturas debajo de los 100°C , presión atmosférica y pH generalmente neutros, inversamente a la catálisis química que frecuentemente necesita de altas temperaturas, presión y pH extremos (Cavaco y Gubitz, 2000).

Además la remoción de colorantes vía biosorción es usualmente alcanzada por micelios fúngicos, las células fúngicas pueden ser usadas en crecimiento o en biomasa muerta; esta decoloración toma lugar con o sin una biodegradación concomitante. Aunque la degradación con biomasa activa es más efectiva debido a una digestión paralela (Artexaga *et al.*, 2000).

2.3 Hongos de pudrición.

Los hongos como agentes patógenos y de biodegradación tienen a su disposición toda la gama de compuestos producidos por los organismos vivos, estos los

pueden utilizar como fuentes de carbono y energía. Su capacidad para usar estos compuestos depende de la digestión de materiales poliméricos y oligoméricos, el transporte de los monómeros a través del plasmalema y la fosforilación de carbohidratos o gluconeogenesis de materiales no carbonados (Griffin, 1994).

Los materiales lignocelulósicos incluyendo los productos de origen agrícola y forestal, están constituidos por tres polímeros estructurales: -celulosa, hemicelulosa y lignina- además de una serie de compuestos de bajo peso molecular solubles en agua o en solventes orgánicos. La celulosa es el componente mayoritario (alrededor de un 50%), seguida de la lignina (alrededor de un 20%) y de la hemicelulosa (15%) (Fengel y Wegener, 1984); La lignina es la forma más abundante de carbonos aromáticos, y es el segundo carbón orgánico más abundante en la tierra rebasada solo por celulosa (Robbinson y Hervey, 1960). Es uno de los compuestos orgánicos más resistentes a la biodegradación, a diferencia de la celulosa o las hemicelulosas, en la lignina no existen cadenas que contengan subunidades repetidas, lo cual hace la hidrólisis enzimática de este polímero extremadamente difícil (Malherbe y Cloete, 2002). Esta molécula contiene C, H y O, pero la estructura es aromática a diferencia de los polisacáridos (Stevenson *et al.*, 1965). Cuando las plantas mueren, su biomasa se incorpora al suelo, y este material debe ser biodegradado y reciclado por los microorganismos, para mantener el ciclo natural del carbono (Crawford, 1981; Eriksson *et al.*, 1990; Kirk y Cullen., 1998; Pérez *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2005; Goodell *et al.*, 2006).

La lignina es un polímero aromático tridimensional, de estructura compleja y amorfa, con un porcentaje elevado de ramificaciones. Está compuesta por subunidades fenilpropanoicas unidas por enlaces C-C y C-O no hidrolizables, sintetizadas a partir de la fenilalanina a través de la ruta de los ácidos cinámicos (Reddy y Fommey, 1978; Higuchi, 1997; Boerjan *et al.*, 2003). De esta forma se sintetizan los alcoholes, *p*-cumarílico (4-hidroxicinámico), coniferílico (4-hidroxi-3-metoxicinámico) y sinapílico (4-hidroxi-3,5 dimetoxicinámico), que actúan como precursores de la lignina (Fig. 2). La copolimerización por radicales libres de estos alcoholes, iniciada por peroxidasas vegetales, da lugar al polímero de lignina.

Químicamente este polímero es heterogéneo, amorfo, ópticamente inactivo, y altamente ramificado. (Kirk y Farrel 1987; Fritsche y Hofrichter 1999).

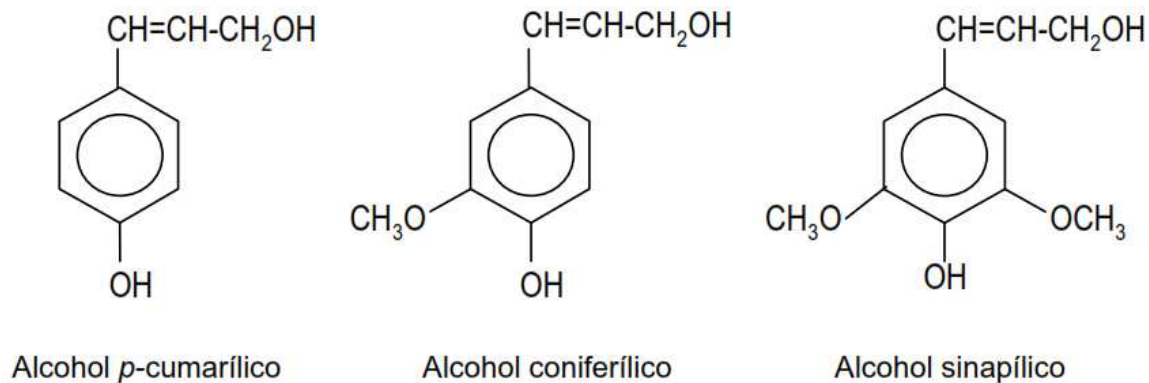


Fig. 2. Alcoholes *p*-hidroxicinamílicos (Molina S, 2006).

La degradación de lignina es especialmente importante, ya que es un material impregnado en la madera que protege los componentes polisacáridos del ataque enzimático y actúa para conferir fuerza mecánica además de resistencia al ataque microbiano. La descomposición de la madera y la utilización de los carbohidratos para el desarrollo de hongos pueden ocurrir solo con la degradación coordinada de lignina (Griffin, 1994).

Tres aspectos en la descomposición de lignina, le apartan de otros procesos biodegradativos.

1. la capacidad para catabolizar la celulosa y hemicelulosa es una característica común para diversos hongos y otros microorganismos. Por el contrario, al ser la lignina un heteropolímero muy recalcitrante, solamente es mineralizado (transformado hasta dióxido de carbono y agua) en forma limitada por algunas bacterias y extensivamente por un grupo de hongos.

2. La degradación de lignina se produce predominantemente por oxidación más que por una catalisis hidrolítica; en la oxidación no se liberan compuestos monoméricos dentro de la solución, al igual que en la digestión de polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos.

3. La degradación de lignina no provee una fuente primaria de carbono y energía para el crecimiento fúngico, pero es probablemente un paso necesario para la utilización de polisacáridos en la pared celular de plantas (Kirk y Farrel, 1987).

Estos hongos ligninolíticos, denominados hongos de la pudrición blanca de la madera, comprenden un grupo de organismos cuya característica es su capacidad para mineralizar eficientemente la lignina. Presumiblemente, esta degradación selectiva les permite tener acceso a la celulosa y hemicelulosa, las cuales finalmente representan su fuente de carbono y energía (Bruswell, 1991; Have y Teunissen, 2001).

Los términos pudrición blanca, pudrición parda, y pudrición blanda son usados frecuentemente para entender diferentes tipos de mecanismos de degradación de celulosa, hemicelulosa y lignina (Zabel y Morrel, 1992).

Hongos de pudrición blanca. Basidiomicetes y unos pocos Ascomicetos, son los mejores estudiados, pareciendo ser los únicos organismos capaces de mineralizar completamente lignina, el nombre de pudrición blanca se deriva de la apariencia blanquecina en la madera al remover lignina, celulosa y hemicelulosa. Estos son aerobios obligados, su nutrición es por medio de la combustión biológica de la madera usando oxígeno molecular como aceptor terminal de electrones, los hongos de pudrición blanca rompen la lignina mediante un proceso oxidativo por medio de fenoxidasas que son formadas y liberadas por la hifa, tales como Lacasas, Manganese Peroxidasas, Lignina peroxidasas, Tirosinasas y Peroxidasas, simultáneamente la descomposición remueve todos los componentes bajo casi el mismo tiempo, y selectivamente la descomposición remueve lignina y polisacáridos no celulósicos, (hemicelulosa) más rápido que celulosa (Deverall, 1965). La vía metabólica de producción de energía interna es a partir de la glucólisis en el citoplasma y ciclo de Krebs en la mitocondria que es la misma que la mayoría de los organismos aeróbicos (Kirk y Cullens, 1998). Los hongos de pudrición blanca son conocidos por ser capaces de degradar lignina aunque no pueden crecer en ella como única fuente de carbono incluso aunque se

pensara que la lignina es potencialmente capaz de proveer energía para el crecimiento (Bruswell, 1991).

Hongos de pudrición parda. Esta pudrición es usada por hongos Basidiomicetes principalmente, se presenta principalmente en madera de coníferas, la cual adquiere un aspecto cuarteado (cubico). Atacan los polisacáridos de la madera degradan celulosa y hemicelulosa preferentemente con una limitada degradación de lignina. La madera toma una coloración marrón debido a la presencia de lignina oxidada (Schwarze *et al.*, 2000).

Hongos de pudrición blanda. Efectuada principalmente por Ascomicetes y Deuteromicetos, el nombre hace referencia a la consistencia suave que adquiere la madera después de su degradación, la destrucción de la pared celular siempre ocurre en lugares cercanos a la hifa, lo que ocasiona la formación de cavidades sin la pared celular (Deverall, 1965).

2.4 Enzimas.

Los enzimas, catalizadores de los sistemas biológicos, son moléculas de gran interés que determinan la pauta de las transformaciones químicas. También intervienen en la transformación de un tipo de energía a otro. Las características más sobresalientes de los enzimas son su poder catalítico y especificidad. La catálisis tiene lugar en un centro específico del enzima llamado *centro activo*. Casi todos los enzimas conocidos son proteínas. Sin embargo, las proteínas no tienen el monopolio absoluto de la catálisis; el descubrimiento de moléculas de RNA catalíticamente activas proporciona una evidencia concluyente de que el RNA fue un biocatalizador primitivo (Stryer *et al.*, 2003).

Los enzimas son altamente específicos, tanto en la reacción que catalizan como en la selección de las sustancias reaccionantes, denominadas *sustratos*. Una enzima cataliza normalmente una sola reacción química o un grupo de reacciones estrechamente relacionadas. En contraposición con las reacciones no catalizadas, en las reacciones catalizadas por enzimas son raras las reacciones colaterales que conducen a la producción de productos secundarios. La especificidad de la enzima se debe a la interacción precisa del sustrato con la enzima. Esta precisión es el resultado de la compleja estructura tridimensional de la proteína enzimática (Stryer *et al.*, 2003).

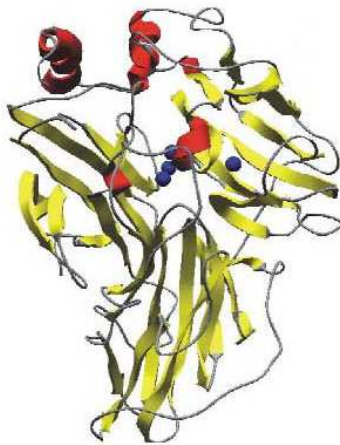


Fig. 3. Estructura cristalina de Lacasa activa, a 1.90 Å de resolución, con sus 4 cobres catalíticos (Martinez *et al.*, 2005).

La actividad catalítica de muchas enzimas depende de la presencia de pequeñas moléculas llamadas *cofactores*, aunque su papel concreto varía con el cofactor y el enzima. Así, una enzima sin su cofactor se denomina *apoenzima*; el enzima completo activo catalíticamente se llama *holoenzima*. Los cofactores se subdividen en dos grupos: metales y moléculas orgánicas pequeñas (Stryer *et al.*, 2003).

Tabla 2. Enzimas que contienen o requieren elementos inorgánicos como cofactores (Stryer *et al.* 2003).

COFACTORES	ENZIMAS
Fe^{2+} ó Fe^{3+}	Citocromo oxidasa, Catalaza, Peroxidasa.
Cu^{2+}	Citocromo oxidasa
Zn^{2+}	Carbónico anhidrasa, Alcohol deshidrogenasa.
Mg^{2+}	Hexoquinasa, Glucosa 6-fosfatasa, Piruvato quinasa.
Mn^{2+}	Arginasa, Ribonucleotido reductasa
K^{+}	Piruvato quinasa
Ni^{2+}	Ureasa
Mo	Dinitrogenasa
Se	Glutación peroxidasa

Para dar consistencia a la clasificación de los enzimas, en 1964 la IUB (“Internacional Union of Biochemistry”) estableció una Comisión de Enzimas con el fin de establecer una nomenclatura para la clasificación de enzimas y se les asignó un código numérico, basado en la reacción catalizada. Las reacciones se dividieron en seis clases principales numeradas del 1 al 6 (Tabla 3). Estas clases

se subdividieron para poder identificar con precisión mediante un código de cuatro dígitos precedido por las letras EC (“Enzyme Comisión”).

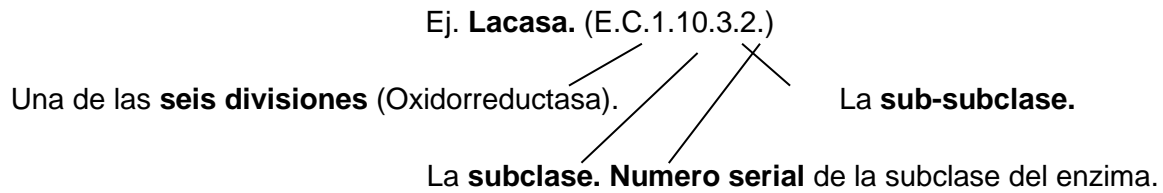


Tabla 3. LAS SEIS CLASES PRINCIPALES DE ENZIMAS (Stryer *et al.*, 2003).

CLASE	TIPO DE REACCIÓN	EJEMPLO
1.Oxidorreductasas	Oxidación-reducción	Manganeso peroxidasa, lactato deshidrogenasa
2.Tranferasas	Transferencia de grupo	Nucleósido monofosfato quinasa (NMP quinasa)
3.Hidrolasas	Reacciones de hidrólisis (transferencia de grupos funcionales al agua)	Quimotripsina
4.Liasas	Adición o separación de grupos para formar dobles enlaces	Fumarasa
5.Isomerasas	Isomerización (transferencia intramolecular de grupo)	Triosa fosfato isomerasa
6. Ligasas	Unión de dos sustratos a expensas de la hidrólisis del ATP.	Aminoacil-tRNA sinteasa

2.5 Enzimas ligninolíticas de hongos.

Las unidades fundamentales del metabolismo son las enzimas, las cuales catalizan pasos individuales en la compleja red de reacciones químicas; Una gran variedad de enzimas son secretadas por hongos y la particular batería de enzimas secretadas depende de su patrimonio evolutivo adaptado a su particular nicho ecológico y a las condiciones ambientales del momento en que pueden inducir o reprimir la síntesis de las enzimas (Griffin, 1994).

El desarrollo de la habilidad de degradar cultivos de lignina ha demostrado demandar varios nutrientes y condiciones del medio. Incluyendo un substrato co-metabolico, altos niveles de oxígeno, limitación de nitrógeno, y otras varias condiciones del cultivo (Kirk y Farrel. 1987, Bruswell, 1991).

El contenido en nitrógeno juega un papel importante en la descomposición de los restos vegetales (Mc Clagherty *et al.*, 1985; Aber *et al.*, 1990). Un alto contenido en nitrógeno regula las primeras fases de la descomposición ya que, además de mejorar el crecimiento de los microorganismos de crecimiento rápido que degradan los compuestos lábiles de la hojarasca, inhibe la producción de enzimas ligninolíticas (Keyser *et al.*, 1978). A pesar de que normalmente el nitrógeno favorece la descomposición en las fases tempranas, a veces en las fases tardías va a ejercer un efecto retardante (Fog, 1988).

La descomposición de lignina es un proceso bioquímico complejo y a diferencia de la mayoría de los procesos fúngicos de descomposición y de digestión llevados a cabo, estos no se basan en enzimas hidrolíticas, por el contrario la descomposición de lignina es realizada por enzimas oxidativas: las cuales incluyen la lignina peroxidasa (LIP), manganeso peroxidasa (MnP), y en algunos hongos Lacasa (Eriksson, 1990). En algunos casos, la transformación de compuestos xenobióticos en los cultivos no es mediada por las enzimas ligninolíticas extracelulares. Por ejemplo, el fenantreno y el 1,1,1- tricloro-2, 2-bis (4-clorofenil) etano; no son sustratos para las peroxidases extracelulares (Fernando, 1990), sin embargo estos son degradados por cultivos de *Phanerochaete chrysosporium*, un

sistema enzimático intracelular, la monoxigenasa citocromo P450, que está presente en todos los hongos, parece estar involucrado en la degradación de algunos compuestos como el fenantreno, el benzo(α)pireno y DDT (Hammel *et al.* 1992).

A partir de los estudios realizados con hongos ligninolíticos en los años setenta, se comprobó que la degradación de la lignina daba lugar a productos que provenían de la ruptura oxidativa de anillos aromáticos. Por lo que se pensó que las oxigenasas extracelulares podían estar involucradas en la transformación de la lignina (Kirk y Chang, 1975). Algunos años después, se reportó el descubrimiento de una ligninasa capaz de oxidar y despolimerizar la lignina y compuestos modelo (Glen J. 1983; Shimada y Higuchi, 1983) y cuya actividad enzimática depende del peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Se calcularon pesos moleculares de entre 41-42 kDa y se encontró que contenía un grupo prostético hemo (Tien y Kirk, 1984). Estudios espectroscópicos mostraron que esta ligninasa era distinta de las oxigenasas P450, compartía algunas características con las hemoproteínas transportadoras de oxígeno y que era en realidad una peroxidasa (Kirk y Farrel, 1987). A esta enzima se le denomina ahora como lignino peroxidasa (LiP).

2.5.1 Lignino peroxidasa.

La lignina peroxidasa es una hemo proteína perteneciente a la familia de las peroxidasas, (LiP) (E.C.1.11.12.14); son capaces de oxidar una variedad de compuestos usando un solo mecanismo, denominado la oxidación de un solo electrón de núcleos aromáticos (Cullen y Kersten, 2004). Esta enzima tiene semejanza con las otras peroxidasas en que tiene un grupo hemo-férrico y funciona siguiendo la vía catalítica en que la LiP es oxidada por el peróxido de hidrógeno, generando un intermediario deficiente de electrones el cual es conocido como compuesto I; dicho componente puede ser reducido ya sea por un donador de electrones o por sustratos fenólicos, generando el compuesto II el cual

regresará a su estado de reposo inicial por medio de una reducción posterior, que dará como resultado un compuesto fenolico oxidado y agua.

Las peroxidasas lignolíticas difieren en los sustratos reductores (AH) en que son oxidados por la transferencia de un electrón a los compuestos I y II. La LiP es relativamente inespecífica en sus sustratos reductores. Puede oxidar compuestos aromáticos de alto potencial redox tales como el alcohol veratrílico, metoxibencenos y modelos diméricos no fenólicos de lignina.

El amplio rango de sustratos para la LiP, que incluye moléculas aromáticas pequeñas y de mayor peso, sugiere que debe haber al menos un sitio de unión localizado en la superficie de la enzima (Davila y Vázquez, 2006).

2.5.2 Manganeso peroxidasa.

La enzima manganeso peroxidasa (MnP) (E.C.1.11.1.13), es una hemoproteína que cataliza la oxidación de Mn^{+2} a Mn^{+3} , la cual es dependiente de H_2O_2 ; El Mn^{+3} , es quelado por diferentes ácidos orgánicos como glicolato u oxalacetato, y puede oxidar a una amplia variedad de compuestos fenólicos, entre ellos a los anillos aromáticos de los colorantes azo. El centro activo de la enzima es oxidado por el peróxido de hidrógeno, para generar un intermediario deficiente de un par de electrones, conocidos como el componente I; Dicho componente puede ser reducido ya sea por Mn^{+2} o por sustratos fenólicos, generando el componente II. El ciclo es completado cuando el componente II gana un electrón, produciendo que la enzima detenga su actividad. La MnP es específica en sus sustratos reductores y solamente el Mn^{+2} puede completar eficientemente su ciclo catalítico. Estudios cinéticos han mostrado que el compuesto I de la MnP puede ser reducido tanto por Mn^{+2} como por compuestos fenolicos, mientras que solamente Mn^{+2} reduce el compuesto II (Davila y Vázquez, 2006).

2.5.3 Alcohol Veratril Oxidasa. (AVO)

La AVO (E.C.1.1.3.7), es una flavoproteína extra celular, su peso molecular se sitúa alrededor de 68 y 78 kDa, estas variaciones son debidas fundamentalmente a distintos grados de glicosilación (Ferreira *et al.* 2002), estas oxidasas catalizan la oxidación de alcoholes aromáticos primarios a sus correspondientes aldehídos con producción de H₂O₂, se caracteriza por poseer una baja especificidad de sustrato oxidando una amplia gama de alcoholes aromáticos con diferentes sustituyentes. Además de ser el co-sustrato de las peroxidasas lignolíticas, el H₂O₂, Podría participar en la degradación de la lignina a través de la generación de otras especies activas de oxígeno. Entre estas se encuentran el OH, el cual es un fuerte oxidante que podría estar implicado en el ataque inicial de la lignina, cuando las enzimas ligninolíticas no pueden penetrar en la pared celular debido a su compacta arquitectura molecular (Guillen *et al* 2000., Evans *et al.*, 1994). Por otra parte también se ha descrito que la AVO evita la repolimerización de los productos liberados durante la biodegradación de la lignina. (Marzullo *et al.*, 1995).

2.5.4 Lacasa.

Las enzimas lacasas (ρ -difenol: oxígeno oxido-reductasas E.C.1.10.3.2), son fenol-oxidases y al igual que todas las enzimas “azules” portadoras de cobre es una glicoproteína (Thurston, 1994), estas enzimas requieren cobre y oxígeno para oxidar fenoles, polifenoles, aminas aromáticas y diferentes sustratos no fenólicos mediante la transferencia de un electrón del sustrato y se acopla a la reducción de cuatro electrones de oxígeno, resultando en la formación de radicales libres y agua, (Claus, 2003) lo que permite que se lleve a cabo la polimerización, depolimerización, metilación y/o dimetilación de compuestos fenólicos (Edens *et al.*, 1999). Se encuentran ampliamente distribuidas en plantas superiores, diversas clases de hongos, algunas bacterias e insectos donde desarrollan una gran variedad de funciones, incluyendo la síntesis de pigmentos, la morfogénesis de la fruta y la detoxificación (Galhaup y Haltrich, 2001; Mayer y Staples, 2002). Su presencia constituye una característica típica de los hongos de podredumbre

blanca (Käärik, 1965). Presentan un bajo potencial rédox, que permite sólo la oxidación directa de las unidades fenólicas de la lignina, que constituyen menos del 10% del polímero, el producto inicial es inestable y puede sufrir una segunda oxidación enzimática o de lo contrario una reacción no enzimática tal como la hidratación o polimerización. La vía metabólica de producción de energía interna es a partir de la glucólisis en el citoplasma y ciclo de Krebs en la mitocondria que es la misma en la mayoría de los organismos aeróbicos (Kirk y Cullens, 1998). El interés por las aplicaciones biotecnológicas de lacasas aumenta, cuando se descubre su capacidad de oxidar sustratos de alto potencial redox en presencia de mediadores como el ABTS (2,2'-azino-bis [3-etilbenztiazolina-6-ácido sulfónico]), así como iones metálicos como Cu^{+2} (Galhaup y Haltrich 2001); Estos intermediarios de la degradación de la lignina entre los que se encuentra el alcohol veratrílico se comportan como transportadores de electrones difusibles entre la lignina y la enzima y permite la degradación de compuestos xenobióticos llegando incluso a polimerizarlos, provocando así su precipitación y eliminación de efluentes contaminados por la industria petroquímica en la oxidación de hidrocarburos polinucleoaromáticos (Rodríguez *et al.*, 1998; Bohmer *et al.*, 1998), textileras, de colorantes, pinturas y para el blanqueo de la pulpa de papel (Mayer y Staples. 2002) entre otras como son: clarificación del vino (remueve compuestos fenólicos), análisis de drogas para distinguir morfina de codeína. (Bourbonnais y Paice, 1990; Davila y Vázquez, 2006; Gianfreda y Xu, 1999, Moreira *et al.*, 1999).

2.6 Genero *Pleurotus*.

Los hongos de este género conocidos como seta, oreja blanca, hongo ostra, etc.; En su mayoría son de color blanquecino, amarillento o rosado y a veces de color grisáceo o azul oscuro. *Pleurotus. osteratus* presenta un sombrero en forma de repisa, de 4-14 cm de diámetro, blanquecino, gris o de color café grisáceo; Las laminillas son lisas, decurrentes, blanquecinas, prolongadas inferiormente, por debajo del punto de inserción sobre la base del estípite, con frecuencia unidas repetitivamente al nivel de la inserción del pie. Las esporas son de color blanco,

crema o lila pálido, presentan una forma cilíndrica (raramente elipsoides); presenta un pie lateral corto, que en ocasiones puede ser excéntrico; la carne de los cuerpos fructíferos es blanca o blanquecina, con sabor y olor agradables, crecen en forma gregaria y por lo general imbricados, Es un hongo saprófito, el cuál crece en diversos restos vegetales, sobre troncos caídos o en pie, algunas veces se encuentra en el suelo sobre raíces podridas (Fig. 4) (Guzmán *et al.*, 1993).



Fig.4. *Pleurotus ostreatus*. (Kuo, M., 2005).

El género es cosmopolita está distribuido en Europa, Asia, África, Australia, Estados Unidos, Canada y Latino América (Guinberteau, 1990). La temperatura óptima de desarrollo de las especies de este género es variable. *Pleurotus ostreatus* se desarrolla en climas templados con una temperatura óptima de crecimiento de 25°C, mientras que *Pleurotus pulmonarius* se desarrolla en climas semitropicales y temperaturas entre 15 – 28 °C.

2.7 Genero *Oxiporus*.

Pertencientes a la clase Basidiomycetes; Poseen cuerpos fructíferos anuales, de forma resupinada, adheridos al sustrato, pileado-sésil, de consistencia corchosa

(Fig. 5 y 6). Píleo de color anaranjado pálido a naranja brillante. Poros de tamaño y forma variables, de 0,3 - 2 mm de diámetro.



Fig. 5. *Oxyporus latemarginatus*. (Durieu y Mont 1996).

Hongos parásitos de *Phoenix canariensis* (Fig. 6). *Oxyporus populinus* crece sobre *Quercus* en bosque de *Quercus–Pinus*, ocasionando pudrición blanca. Esta especie se caracteriza por presentar basidiomas de color crema a anaranjado y por el tamaño y forma de las esporas, aunque los especímenes mexicanos sólo presentan una capa de tubos, el resto de los caracteres concuerda con la descripción de Gilbertson y Ryvarden (1987). Una especie parecida es *Oxyporus nobilissimus*, que presenta basidiomas muy grandes, himenóforo con poros más grandes y cistidios con paredes engrosadas; además, sólo se ha encontrado creciendo sobre coníferas.



Fig. 6. *Oxyporus latemarginatus* (M. P. Martin, 2004).

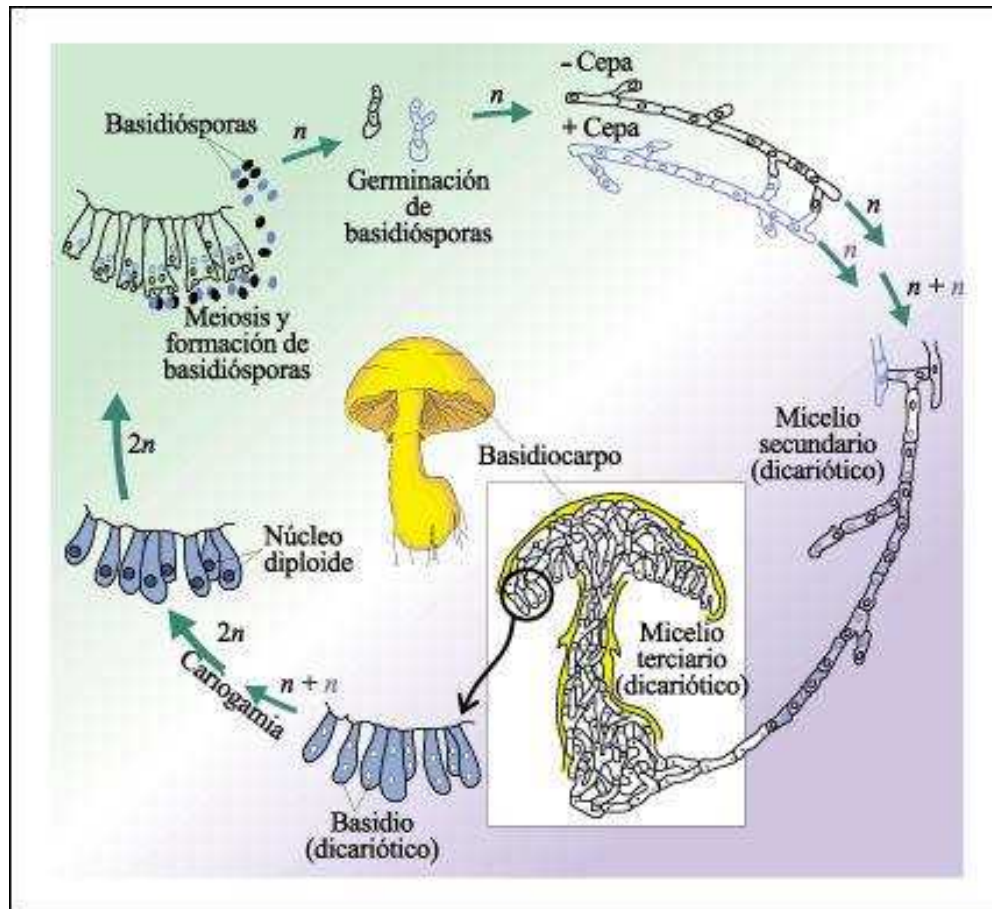


Fig. 7. Ciclo de vida de la clase Basidiomycetes. En la parte superior izquierda basidiósporas que germinan y producen micelios monocarióticos primarios (n), la fusión de hifas monocarióticas ($n + n$) forman micelios secundarios dicarióticos, El micelio secundario crece y se diferencia para formar estructuras reproductivas (basidios). El estado $2n$ es muy breve; casi inmediatamente ocurre la meiosis, que da como resultado la formación de cuatro núcleos; de cada uno de ellos se desarrolla una basidióspora (n). (Tomado de Curtis, 2006). La diversidad de la vida capítulo 29.

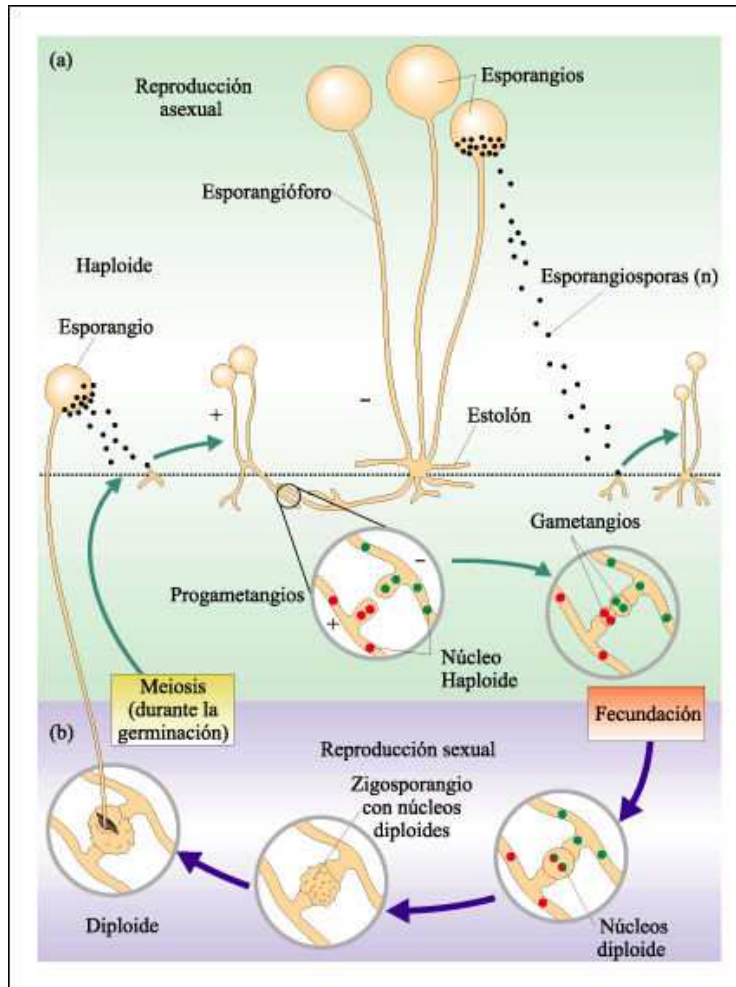


Fig. 8. Ciclo de vida de *Rizophus stolonifer*, Clase Zygomycetes. La reproducción sexual ocurre cuando 2 progametangios (+ y -), se fusionan por medio de dos células apicales (los gametangios). Una de las células contiene numerosos núcleos (+) y la otra (-), produciendo núcleos diploides. La célula multinucleada resultante forma una pared dura, pigmentada y verrugosa, y se transforma en un zigosporangio latente que contiene una única zigospora (b). Cuando las condiciones ambientales son favorables, justo antes de la germinación, los núcleos diploides sufren meiosis. Luego ocurre la germinación, se rompe la pared del zigosporangio y emerge el esporangióforo a partir de la zigospora. a) (Fase asexual). En su extremo, el esporangióforo porta un esporangio que dará origen a esporas (esporangiosporas) las que al germinar forman un nuevo micelio (+) ó (-). (Tomado de Curtis, 2006). La diversidad de la vida capítulo 29.

3. ANTECEDENTES.

A partir de la década del 80 se propuso el empleo de hongos de pudrición blanca, como alternativa para realizar la decoloración de efluentes, así como para la degradación de compuestos xenobióticos y recalcitrantes (Eggen T., 2000; Higson F., 1991; Rodríguez *et al.*, 1998). Los hongos de pudrición blanca se conocen bien por su sobresaliente habilidad para producir enzimas oxidativas extracelulares, las cuales están involucradas en la degradación de sus sustratos ligninocelulósicos naturales. La aceptación creciente de estos organismos en procesos de tratamiento y biorremediación se debe a que los hongos de pudrición blanca poseen un sistema enzimático extracelular de carácter no específico (Kirk y Farrel. 1987). Debido a su baja especificidad y a la fuerte habilidad oxidativa de los sistemas de degradación ligninolítica, los hongos de pudrición blanca degradan un amplio espectro de químicos orgánicos y contaminantes que contienen esqueletos similares a aquellos encontrados en la lignina, tales como hidrocarburos aromáticos policíclicos (Collins y Dobson, 1999; Bogan, 1996; Hammel *et al.*, 1992; Lewandowski *et al.*, 1990), TNT (Thorn *et al.*, 1996), PCB (Ruckeintein y Wang, 1994; Yadav *et al.*, 1995), dioxinas (Takada *et al.*, 1996; Bumpus *et al.*, 1985), pesticidas (Kullman y Matzumura, 1996; Kenedy, 1990), explosivos (Gorontzy *et al.*, 1994; Spiker *et al.*, 1992), dicloroanilina (Arjmand y Sandermann, 1985, Morgan *et al.*, 1991) y colorantes (Field *et al.*, 1993; Glen, 1983; Kirby *et al.*, 1995).

El requerimiento de una fuente primaria de carbono y energía para degradar otro compuesto es llamado co-metabolismo, Kirk y Farrel en 1987 exponen que la conversión de lignina a CO₂ por *Phanerochaete chrysosporium* es proporcional a la cantidad de sustratos de soporte para el crecimiento por ejemplo de glucosa; menciona también que la adición de lignina a cultivos limitados en fuentes de carbono no causa aumento de la producción de peso seco y que una de las implicaciones para activar enzimas lignolíticas es la disminución de ciertos nutrimentos como lo es (N). *Phanerochaete chrysosporium* en medio limitado de nitrógeno, produce actividad de ligninasa, metabolitos secundarios, y alcohol

veratrílico, durante la fase estacionaria de crecimiento. *Lentinus edodes* y *Pleurotus ostreatus* no mostraron efectos represivos por la disminución de nitrógeno en este estudio indicando que este fenómeno no es general.

Téllez y Fernández en el 2008 registraron el crecimiento y la actividad enzimática de *Pleurotus ostreatus* demostraron que la actividad enzimática de Lacasa tiene un comportamiento “atípico”, esto fue determinado después de comparar su crecimiento en dos variables de fermentación la primera en estado sólido donde de manera inmediata el organismo carece de agua libre dentro del medio; contra los resultados de una fermentación sumergida, el ensayo en soporte sólido fue llevado a cabo en cubos de espuma de poliuretano de baja densidad (17 Kg m^{-3}), con dimensiones de aproximadamente ($0.5 \times 0.5 \times 0.5$); este medio inerte fue impregnado con 30 ml de medio de cultivo estéril el cual contenía en g/L (10 g glucosa; Extracto de levadura 5 g; KH_2PO_4 , 0.6g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g; K_2HPO_4 , 0.4g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.25 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.05g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.05g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.001g,) el pH fue ajustado con NaOH a 0.1M; Las dos variables del cultivo fueron inoculadas con 3 pelletes de micelio en crecimiento estéril sobre medio PDA a 25°C por 7 días. Los cultivos fueron incubados por 25 días en un agitador rotatorio a 120 rpm. El cultivo sumergido fue en matraces de 250 ml con solo 30 ml del mismo medio de cultivo descrito. En las lecturas de actividad enzimática se encontró que los niveles de producción de enzima Lacasa en fermentación líquida superaba por mucho a lo encontrado en la fermentación de estado sólido en el cual la cepa generó una actividad enzimática de $2,430 \text{ U/L}^{-1}$, alcanzando 4.5 g L^{-1} de peso seco, además de 3 isoformas de lacasa que fueron identificadas; mientras que en la fermentación en estado líquido se registraron $13,000 \text{ U/L}^{-1}$ de valor máximo para la misma enzima y un peso seco generando de 4.5 g L^{-1} , con 4 isoformas de la enzima lacasa identificadas demostrando así que la producción de enzimas para la degradación depende del tipo de substrato y condiciones de cultivo. La fermentación sumergida es posible que favorezca la síntesis de enzimas gracias al intercambio de oxígeno propio de la fermentación en estado líquido.

Ivana y colaboradores en el 2005 evaluaron en placas de agar la habilidad de decolorar ocho diferentes tipos químicos de colorantes (Naranja G, Amaranto, Naranja I, Azul R brillante Remazol (RBBR), Ftalocianina Cu, Poly R-478, Verde malquita y cristal violeta.) por el hongo de pudrición blanca *Dicothomus squalens*; El hongo mostró una alta capacidad degradativa de todos los colorantes probados, pero no tan extensa fue la degradación para todos los colorantes algunos de estos mostraron tener un efecto negativo en el crecimiento miceliar demostrando así una correlación positiva entre el rango de crecimiento y la habilidad de decoloración. Incluso la cepa fue viable en concentraciones de 2 g/L de colorante; El experimento de decoloración también fue evaluado en cultivo líquido con los colorantes naranja G, y RBBR, se evidenció un incremento de enzima lignolítica y en la producción total de peróxido de hidrógeno, acompañado de una disminución de la producción de la biomasa. RBBR fue removido de manera más eficaz del medio líquido que el colorante naranja G.

Rodríguez *et al.* en 1998 examinaron 16 cepas de hongos lignolíticos en la degradación de 23 colorantes industriales con un rango de pH 3-11; así determinó en extractos crudos de medios en estado sólido la actividad enzimática de lacasa, manganeso peroxidasa, lignino peroxidasa y aryl alcohol oxidasa. Demostró que *P. ostreatus* es capaz de degradar 12 de los 23 colorantes, exhibiendo actividad elevada de lacasa y manganeso peroxidasa aunque los niveles más altos de actividad volumétrica fueron encontrados en *Trametes hispida* en medio sólido, esta capacidad decolorativa se asoció a enzimas extracelulares, sin embargo los extractos crudos de *P. ostreatus* fueron viables para degradar solo 5 colorantes; mostrando que otros mecanismos enzimáticos bien pueden estar involucrados en procesos degradativos de colorantes como citocromos P450 o peroxidases. Ambos hongos exhibieron altas actividades enzimáticas de lacasa y manganeso peroxidasa; aunque la más alta actividad volumétrica fue encontrada en *Trametes hispida*. En cultivo sólido de avena se evidenció una actividad más alta de lacasa y manganeso peroxidasa comparada con la obtenida en el medio líquido complejo. Sólo la actividad de lacasa fue relacionada con la decoloración de los extractos crudos. Dos isoenzimas de lacasa de *Trametes hispida* fueron purificadas y su

actividad de decoloración fue caracterizada y evidenciada en 11 colorantes de los 23 usados.

Cardona *et al.* en el 2009 evaluaron siete cepas de hongos ligninolíticos en función de su capacidad para degradar el colorante Orange II y también los colorantes industriales Rojo Cibacrón®, Rojo Erionyl®, Azul Terasil® y Turquesa Erionyl® en medio semisólido y líquido. *Phanerochaete chrysosporium* y *Phanerochaete sordida* mostraron buena capacidad degradativa, alcanzando 98% de decoloración en medio líquido para Orange II y entre 82% y 86% para los otros colorantes industriales después de ocho días de tratamiento. En medio semisólido todos los colorantes se eliminaron completamente, durante el tratamiento en medio líquido se observó que los hongos crecieron con un comportamiento diáuxico presentando adsorción parcial del Orange II durante la primera etapa de crecimiento exponencial, en la fase estacionaria el colorante fue finalmente degradado.

Knappy y Newby (1998) probaron una gran cantidad de cepas en un efluente que contenía colorantes pertenecientes al grupo di azo y cromóforo, seleccionaron 5 cepas con las mejores características para la decoloración, todas ellas presentaban rangos de 70 a 80 % de decoloración en medio Sabouraud Dextrosa Agar; Posteriormente se evaluó su potencial de degradación en un nuevo medio de cultivo nitrógeno-limitado. Se destacó la cepa *Coriolus versicolor*, aunque todas las demás cepas mostraron una decoloración de entre 5 a 40%; La mejor decoloración se llevó a cabo en la concentración más baja del efluente pero el rango inicial y final de decoloración fue de 40%. v/v. La mejor reducción de color mostró una absorbancia de 119 y 147 unidades (en max), registrados en el 3° y 7° día respectivamente.

Lee *et al.* (1998); Nsereko *et al.* (2000); y Park *et al.* (2002) mencionaron que el tipo y actividad de las enzimas producidas puede variar dependiendo del microorganismo, del sustrato de crecimiento y de las condiciones de cultivo, así como del tiempo empleado para la producción de las enzimas. Adicionalmente se ha observado en diversos estudios, que gracias a la composición de la pared

celular de estos hongos, y a la afinidad de algunos compuestos de estas con los colorantes, se puede dar un proceso de biosorción a través del micelio ya sea de manera de biomasa viva o muerta (Robinson *et al.*, 2001); Sumathi y Manju en el 2000 demostraron que *Aspergillus niger* es capaz de remover hasta en un 95% colorantes de tipo azo; un cultivo estacionario también de *Aspergillus niger* fue usado para decolorar un complejo de agua residual de una industria textil por medio de un biorreactor "airlift", sobre un amplio rango de pH (pH 3 - 7) la decoloración fue de un 100%, con un pH 12 se obtuvo aún un valor del 60% de decoloración, este proceso demuestra una alta tolerancia a través de cambios bruscos de pH, además de que no está limitado a este tipo de colorantes tipo azo; también ácidos, básicos, directos, dispersos y reactivos han sido removidos de una solución dentro de unas pocas horas. (Assadi y Jahangiri, 2001).

Tlecuitl *et al.* (2008) estudiaron la producción de lacasa durante las fases lag, exponencial y estacionaria de crecimiento de *Pleurotus ostreatus* en fermentación sumergida. La actividad de lacasa fue correlacionada positivamente con el crecimiento del hongo. El rango específico de crecimiento fue de 0.02 h^{-1} y el monto máximo de biomasa seca alcanzado (7.8 g/L^{-1}) fue obtenido después de 480 h. de crecimiento, cuatro isoformas de lacasa fueron secretadas por el hongo, llamadas, L₁, L₂, L₃ y L₄. L₂, L₃ y L₄ y producidas en la fase estacionaria (entre las 408 y 456 h aproximadamente). Mientras L₁ se produjo durante la fase lag, exponencial y estacionaria de crecimiento. La actividad máxima de lacasa (12 200 UL^{-1}) fue observada al inicio de la fase estacionaria (a 432 h de crecimiento).

Palmieri en el 2003 investigó la habilidad de *P. ostreatus* para degradar el colorante Remazol Brilliant Blue R (RBBR) en placas de agar, la decoloración fue medida visualmente directamente de las placas y en los cultivos líquidos, esto fue medido usando un espectrofotómetro marca Jasco V530 con un rango de longitud de onda 200-800 nm, y la absorbancia a 592 nm, la cual corresponde a la máxima longitud de onda visible de absorbancia. Cuando el organismo creció en medio líquido fue suplementado con alcohol veratrílico, el hongo degradó completamente RBBR en 3 días. En estas condiciones *P. ostreatus* produce entre otras enzimas,

lacasas, Alcohol Veratril Oxidasa, y peroxidases. Pero sólo lacasa parece responsable de la transformación de RBBR. Dos lacasas purificadas (POXC y POXA3), y reconocidas viables, para degradar *in vitro* el colorante, esto en ausencia de algún mediador redox. Estas lacasas difirieron significativamente en la eficiencia de decoloración del colorante probado, sugerido por la comparación de sus eficiencias catalíticas (K_m). Además usando una mezcla de ambas lacasas POXC y POXA3 fue observada una remarcable mejora en la reacción y en el nivel final de decoloración. El alcance de la decoloración de RBBR depende también de la temperatura de incubación y concentración enzimática, esto bajo condiciones ácidas. El tratamiento con la mezcla de enzimas redujo la toxicidad en un 95%.

4. JUSTIFICACIÓN.

Uno de los contaminantes de mayor impacto en el medio ambiente son los colorantes producidos en diversas industrias, principalmente textiles. Se estima que entre el 10-15% de los colorantes usados en industrias son arrojados a aguas residuales. Muchos de estos compuestos son estables al ataque de la luz, la temperatura y a procesos fisicoquímicos convencionales.

Actualmente no existen métodos estandarizados para el tratamiento de efluentes contaminados con colorantes industriales, esto debido a la complejidad de los procesos empleados y a las muy diversas estructuras químicas de estos compuestos recalcitrantes. En países con mayor desarrollo utilizan métodos fisicoquímicos para la remoción de los contaminantes, pero estos usualmente son de elevado costo, haciéndose así aun más difícil de implementarse en países como México.

Es importante por esta razón implementar el uso de nuevas tecnologías amigables con el medio ambiente, como son los procesos biológicos de degradación; Algunos micromicetes y macromicetos como los hongos de pudrición blanca, tienen la capacidad de degradar estos contaminantes, gracias a la producción de enzimas extracelulares de baja especificidad de sustrato y a la capacidad aparente que tienen los organismos fúngicos de bioabsorber los componentes recalcitrantes, siendo así esta una alternativa viable en tecnologías de biorremediación.

5. HIPÓTESIS.

Los micromcetos y macromicetos capaces de crecer en efluentes contaminados con colorantes industriales son competentes para biodegradar un rango variable de colorantes.

6. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar y comparar la capacidad de degradación de colorantes industriales usando cepas seleccionadas de *Pleurotus ostreatus* y *Oxyporus latemarginatus* (MP3) del orden Basidiomicetos, contra cepas de *Rhizomucor variabilis* var. (MP1) y *Regularior* (MP2) del orden Zygomycetos.

6.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

- Evaluar el potencial de cepas seleccionadas para degradar colorantes industriales y registrar la velocidad específica de crecimiento en medio sólido suplementado y limitado en fuentes de carbono.
- Analizar los procesos de degradación de colorantes a través de cepas seleccionadas sometidas a fermentaciones en medio líquido limitando la fuente de carbono.
- Evaluar la actividad enzimática de Lacasa, Manganese peroxidasa y Alcohol veratril oxidasa; además de la biomasa generada en fermentación líquida en presencia de colorantes industriales.

7. MATERIAL Y MÉTODOS.

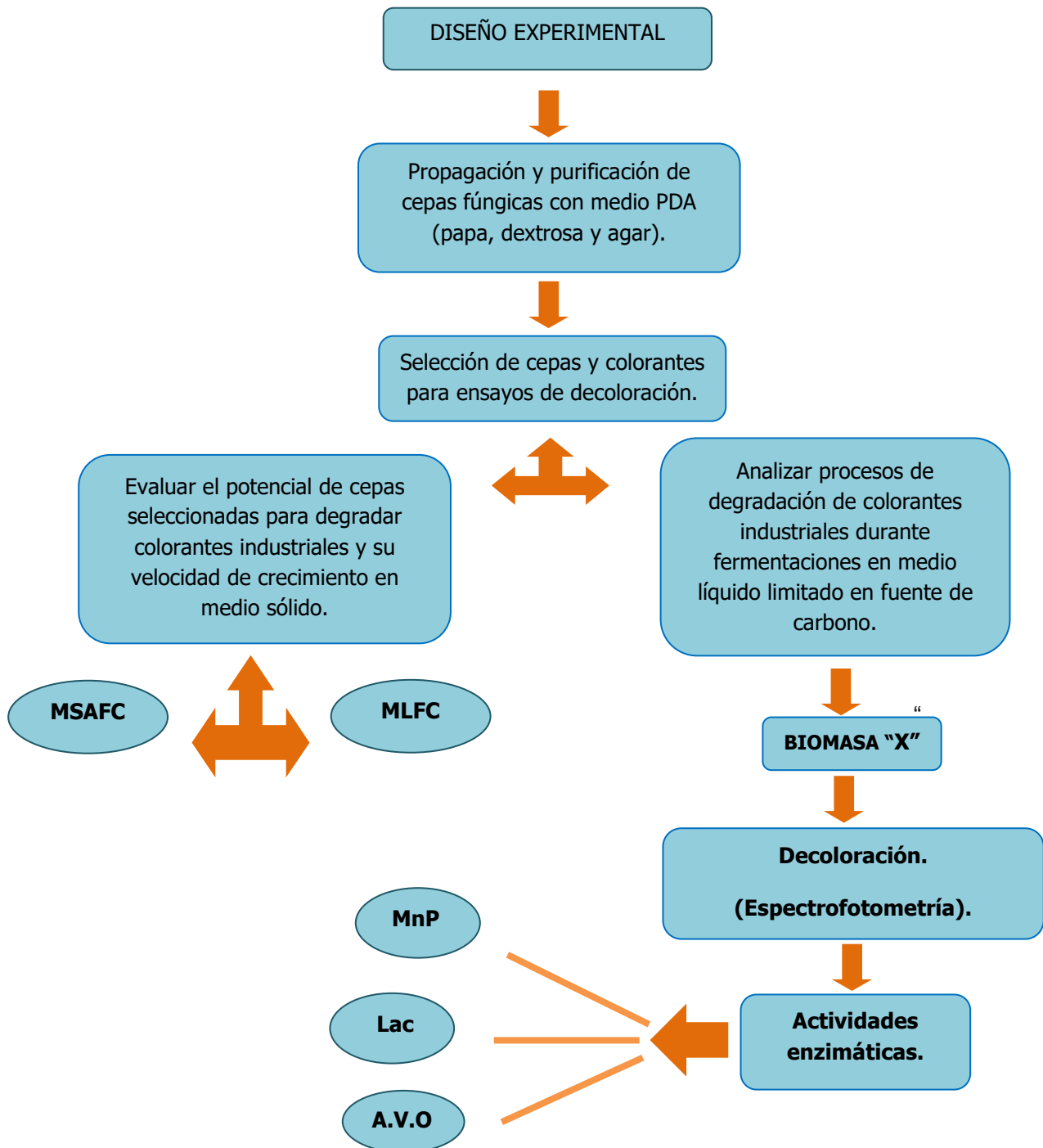


Fig. 9. Diagrama de flujo, de las actividades principales que se desarrollaron para la investigación.

7.1 CEPAS BAJO ESTUDIO.

Una de la cepas utilizadas para el presente estudio fue *Pleurotus ostreatus* ATCC 32783, (American Type Culture Collection, Maryland USA). Este hongo se propagó en agar, papa, dextrosa (PDA) a 25°C por 7 días y se mantuvo a una temperatura de 4°C, resemebrándose periódicamente.

Las tres cepas restantes de hongos denominadas MAP01 (*Rhizomucor variabilis* var.), MAP02 (*Regularior* sp.) y MAP03 (*Oxyporus latemarginatus*), (M= muestra; A= agua; P= Puebla; 01, 02, 03, = número de aislamiento) fueron aisladas de una zona contaminada con efluentes textiles. En estudios previos se reportó que estas cepas poseen la capacidad de degradar colorantes textiles sintéticos de los grupos azo, índigo y sulfónico, los colorantes más empleados en la industria textil. Las tres cepas aisladas seleccionadas se conservaron y propagaron en cajas petri con PDA (Agar papa-dextrosa) y fueron almacenadas a 4°C.

Se realizaron exámenes macroscópicos y micro cultivos que corroboraron la pureza e identificación esto consistió en el montaje de una cámara estéril de incubación. Se usó una varilla de vidrio en forma de V, que se colocó dentro de la base de una caja Petri y sobre esta se situó un porta objetos. En aproximadamente 10 mm de largo con un espesor de 5mm; a los lados del cubo se inocularon muestras del hongo a examinar, finalmente encima se colocó el cubre objetos. La cámara se hidrató con 10 ml de agua destilada estéril; el ensayo se incubó a 30 °C por 72 h. en ausencia de luz.

7.2 ENSAYOS DE DECOLORACIÓN EN MEDIO SÓLIDO ADICIONADO Y LIMITADO EN FUENTE DE CARBONO.

Las cepas se sometieron a dos variables de medio sólido, el primero limitado en fuente de carbono (MSLFC) siendo la proporción de colorante 150 mg por L, (500 ppm) adicionado sólo con 20 g de agar. El segundo medio adicionado con fuente de carbono (MSAFC), se elaboró con 20 g de agar, 3.5 g de extracto de malta, 10 g de almidón, y 150 mg de colorante por L (500 ppm). Se tomó una muestra de

aproximadamente 0.78 cm/ \varnothing (diámetro), por medio de un horador, esta muestra se inoculo en las dos variables del medio incubando a 29° C; Para evaluar la velocidad de crecimiento y degradación se midió el crecimiento micelar con halos de decoloración usando un vernier marca Pretful.

Los colorantes industriales usados para el ensayo fueron: índigo clarient 94 (NDIGO), negro RDT (NEGRO RDT), (proporcionado por la empresa parras), negro dianix (N DNX), rojo dianix (R DNX), amarillo dianix (A DNX), rojo remazol (R RMZ), amarillo remazol (A RMZ) y azul remazol (AZ RMZ), (donados por la empresa BASF).

El colorante índigo clarient 94 es un colorante de naturaleza insoluble el cual se sometió a un proceso de solubilización. El volumen obtenido fue de un litro en la siguiente proporción: 750 ml de agua, 1 g de setamol WS previamente disuelto en agua caliente, se dispersó a la solución 80 g de añil, tras agregar 130 g NaOH al 50 %, posteriormente se agregó hidrosulfito de sodio hasta disolverse, evitando que penetrara en demasía aire al colorante "madre" al agitar. Posteriormente se aforo a 1 litro y se agito nuevamente. El proceso de reducción del añil termina al cabo de 2 a 3 h. Esta información fue proporcionada por la empresa BASF.

7.3 DEGRADACIÓN DE COLORANTES INDUSTRIALES EN FERMENTACIÓN LÍQUIDA CON MEDIO LIMITADO EN FUENTE DE CARBONO.

Las cuatro cepas demostraron la habilidad de crecer en el medio sólido limitado en fuente de carbono (MSLFC) y en el medio sólido adicionado con fuente de carbono (MSAFC) con los ocho distintos colorantes industriales, sin embargo *Pleurotus ostreatus* y *Oxiporus latemarginatus*, se destacaron en la degradación de los distintos colorantes. Es así que estas dos cepas con el mejor desempeño se evaluaron en su capacidad para degradar colorantes industriales en un medio líquido limitado en fuente de carbono (MLLFC) este contenía por litro, d- glucosa 3 g; tartrato di amonio, 0.66 g; MgSO₄. 7H₂O, 0.15g; CaCl₂. 2H₂O, 30 mg; FeSO₄.7H₂O, 5.55 mg; H₃PO₄ (2N), 3.27 ml; y en ensayos separados se adicionó

150 mg/L de los colorantes, azul remazol (AZ RMZ), índigo clarien 94 (ÍNDIGO) y rojo dianix (R DNX), el pH se ajustó a 4.5. Esta metodología se adaptó de Janshekar y Fiechter 1988.

Bajo condiciones de esterilidad por medio de un horador se cortaron pellets de la periferia de las cepas puras propagadas en medio PDA de aproximadamente 0.78 cm/∅ (diámetro), y posteriormente por duplicado se inocularon 3 muestras en matraces Erlenmeyer de 250 ml que contenían 50 ml del (MLLFC) y en ensayos separados los 3 distintos colorantes.

Las muestras se incubaron a 29 °C con agitación orbital de 190 rpm, durante un periodo de 22 días. Se muestrearon 6 puntos de la fermentación con intervalos de 48 y 120 h, filtrándose las muestras a través de un papel filtro Watman No. 4 mantenido en peso seco constante mediante una estufa a 40°C, de estas muestras se obtuvo el caldo enzimático o de fermentación y la biomasa generada (micelio); las muestras en el papel filtro fueron desecadas en estufa a 40°C durante 24 h, para obtener el peso seco.

La decoloración en medio líquido fue medida por medio de espectrofotometría usando un espectrofotómetro marca Jasco, con un rango de longitud de onda de 200-900 nm. El porcentaje de decoloración para una mezcla de colorantes puede ser calculado por medio de las mediciones de las absorbancias en la región visible (350 nm - 650 nm) tanto para la muestra original como para la tratada; la diferencia entre estos dos espectros brinda la información acerca de la reducción del colorante. Se determinó el porcentaje de decoloración por medio de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Decoloración} = \frac{\sum Aa - \sum Ab}{\sum Aa} \times 100$$

Dónde: Aa: absorbancia de la muestra original Ab: absorbancia de la muestra tratada (Londoño *et al.*, 2001).

8. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

Los sobrenadantes del cultivo fueron obtenidos por la filtración del medio, el cual se vertió a un vaso bridado sujeto con unas pinzas a un embudo de vidrio con membrana milliporo (0.45 μm), el medio de cultivo fue succionado por una bomba de vacío hasta depositarse en un matraz kitasato de 250 ml. Se realizó la determinación de la actividad enzimática de Lacasa, (E.C.1.10.3.2); Manganese peroxidasa, (MnP) (E.C.1.11.1.13), y Alcohol Veratril Oxidasa, (AVO) (E.C.1.1.3.7); a partir de los sobrenadantes obtenidos por filtración del (MLLFC). Para lacasa la determinación se basó en el cambio de absorbancia del sustrato DMP (2,6-dimetoxifenol) 2mM, adicionado a cada muestra por triplicado; para manganese peroxidasa se usó 100 μL de colorante rojo fenol al 0.01% como sustrato, y para la enzima (AVO), se usaron 125 μL de alcohol veratrílico, en estos se evidenció la actividad enzimática mediante la utilización de un equipo de espectrofotometría UV/Vis Jenway 6405 a una longitud de onda de 240 nm; Una unidad (U) de actividad de Lac., MnP., y AVO; se consideró como la cantidad de enzima necesaria que provoca un incremento de una unidad de absorbancia por minuto.

8.1 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LACASA

La actividad enzimática de lacasa (E), se determinó con el sobrenadante del extracto extracelular (EE) obtenido en diferentes tiempos de la fermentación utilizando DMP como sustrato. La mezcla de reacción se preparó con 900 ml de DMP 2mM en buffer de fosfatos a pH 6.5 a 0.1 M y 100 ml de EE. La absorbancia se leyó en un espectrofotómetro Jenway 6405 UV/Vis a una longitud de onda de 468 nm después de 1 minuto de incubación a 40 °C en una celda Peltier. Una unidad de actividad de lacasa (U) se considera como la cantidad de enzima que provoque un incremento de una unidad de absorbancia por minuto.

8.2 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE MANGANESO PEROXIDASA.

Se midió la actividad enzimática de MnP usando la metodología descrita por Kuwahara *et al.*, 2004. La mezcla de reacción contenía 100 µL de rojo fenol al 0.01%, 100 µl de lactato de sodio 250 mM, 200 µL de albumina sérica bovina al 0.5%, 50 µl de MgSO₄ · 7 H₂O 2mM, 50 µl de peróxido de hidrógeno preparado en buffer de succinato de sodio 20 mM (pH 4.0) y 100 µl de muestra. La reacción se mantuvo en incubación a 30 °C durante 5 minutos y posteriormente se leyó a una longitud de onda de 610 nm.

8.3 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE ALCOHOL VERATRIL OXIDASA.

La actividad enzimática de Alcohol Veratril Oxidasa (AVO) se determinó agregando 375 µL de buffer de tartrato de sodio 0.33 M a pH 3, 125 µL de alcohol veratrílico 70 mM, 50 µL de peróxido de hidrógeno a 10 mM, 400 µL de agua y 100 µL de muestra. La absorbancia se leyó en un equipo de espectrofotometría UV/Vis Jenway 6405 a una longitud de onda de 240 nm después de 30 minutos de incubación a 40 °C.

8.4 PARÁMETROS CINÉTICOS.

Para determinar los parámetros de crecimiento se consideró que la producción de biomasa $X = X(t)$ por la ecuación logística (1), y la minimización del error cuadrático con la herramienta solver de la hoja electrónica de Microsoft Excel. (Díaz *et al.* 2001., Tleutl *et al.*, 2003).

$$\frac{dX}{dt} = \mu \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right) X \dots\dots\dots (1)$$

La solución de la ecuación logística es (2):

$$X = \frac{X_{\max}}{(1 + C \exp^{-\mu t})} \dots\dots\dots (2)$$

Donde μ es la velocidad específica de crecimiento X_{\max} es el valor de biomasa máxima o de equilibrio y:

$$C = \frac{X_{\max} - X_0}{X_0} \quad \text{Con } X=X_0$$

9. RESULTADOS.

Para *P. Ostreatus* se observó un crecimiento rápido, después de 8 días de inoculado el medio sólido (PDA), se observó macroscópicamente en él, un micelio aéreo algodonoso de color blanco y denso (Fig. 10 a), también por medio de microscopia se pudieron apreciar micelios semitabicados y ramificados (Fig. 9 b y c).

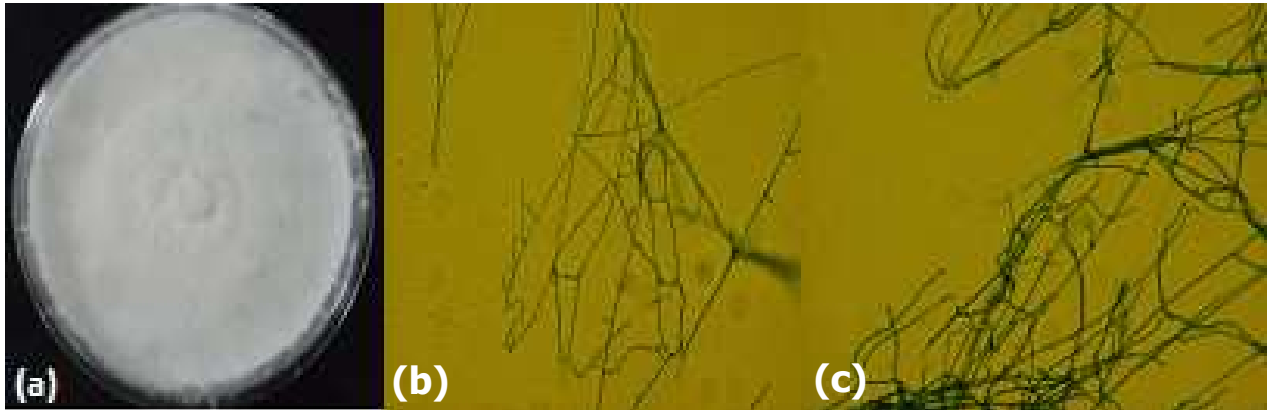


Fig. 10. (a) Se muestra morfología macroscópica de *Pleurotus ostreatus*, (b y c); micelios teñidos con colorante azul algodón que evidencian micelios semitabicados característicos de hongos basidiomicetos (40 x).

Para la cepa *O. latemarginatus* se obtuvo un crecimiento en placa relativamente rápido después de 8 días de inoculado el hongo; se observó macroscópicamente un micelio aéreo cremoso, de apariencia algodonosa (Fig. 11 a). El ensayo de microscopia reveló la presencia de micelios semitabicados y ramificados (Fig. 11 b y c).



Fig. 11. (a) *Oxyporus latemarginatus* imagen macroscópica, (b y c) micelio teñido con colorante azul algodón, observados con aumento (40 x), evidenciando micelios semitabicados.

De la cepa *Rhizomucor variabilis* se obtuvo un crecimiento un tanto lento después de 10 días de inoculado el hongo en placas con medio PDA, se observó el desarrollo de un micelio semiaéreo de coloración marrón, con esporas grisáceas (Fig. 12 a), del ensayo microscópico se puede observar hifas delgadas sin septos, además de estructuras reproductivas como esporangios y conidios (Fig. 12 b y c y Fig. 13).

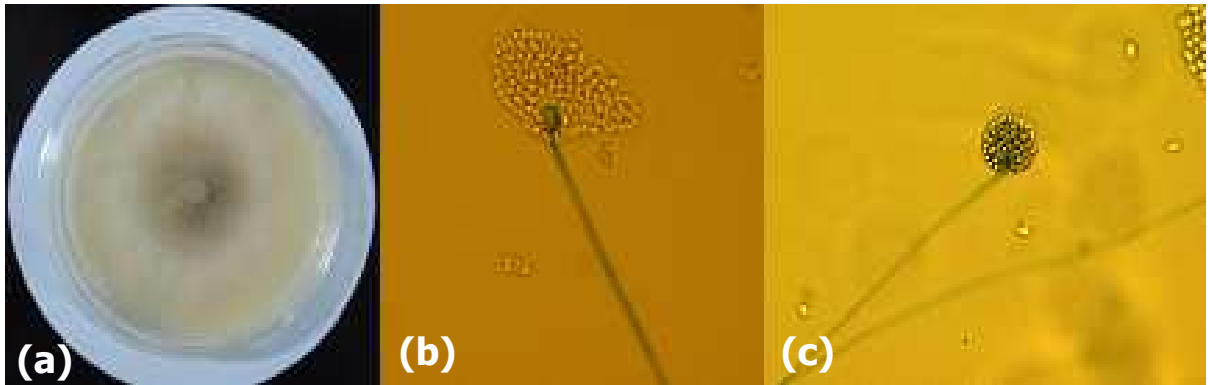


Fig. 12. (a) Se muestra morfología macroscópica de cepa *Rhizomucor variabilis* (b) hifas cenocíticas y un esporangio diseminado, (c) esporangio globoso de esporas elípticas (40 x).

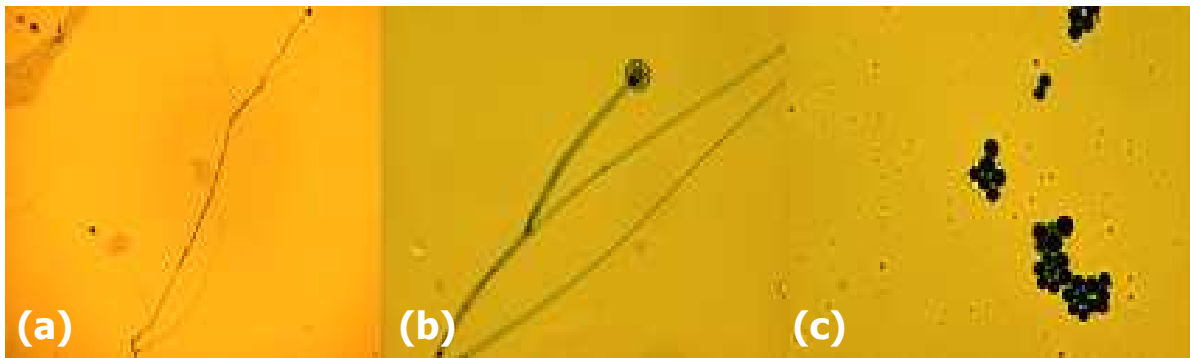


Fig. 13 (a) De *Rhizomucor variabilis*, se muestra una hifa ramificada desde su base finalizando en su parte apical con un esporangio globoso; (b) se muestran hifas cenocíticas y un esporangio globoso, (c) conidios diseminados microscopia (40 x).

Respecto a la cepa *Regularior sp.* La morfología observada macroscópicamente revela un micelio poco denso de coloración marrón y esporas blanquecinas. Fig. 14 (a); microscópicamente se observaron hifas delgadas sin septos, además de estructuras reproductivas como esporangios, columnelas y conidios. (Fig. 14 b y c; y Fig. 15.)

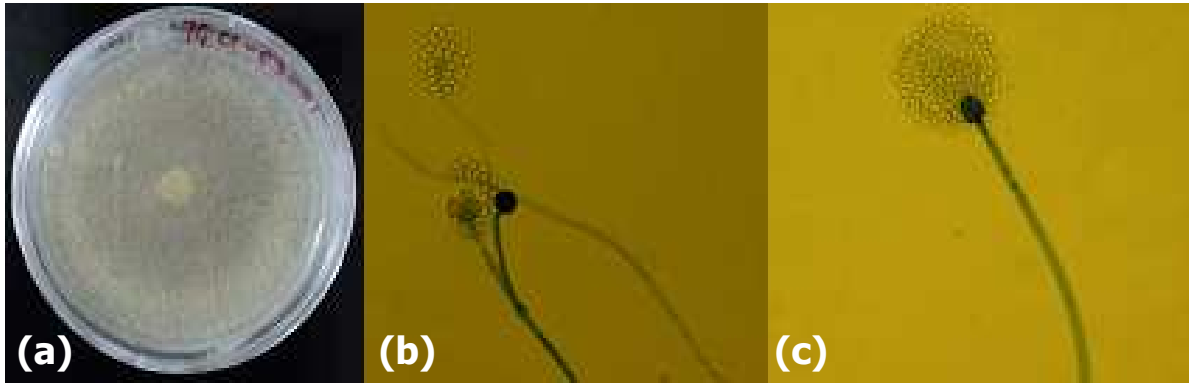


Fig. 14. (a) Se muestra morfología macroscópica de cepa *Regularior* sp. (b), morfología microscópica (40 x) muestra 3 hifas cenocíticas, (c) esporangio globoso de esporas elípticas y columela esférica.

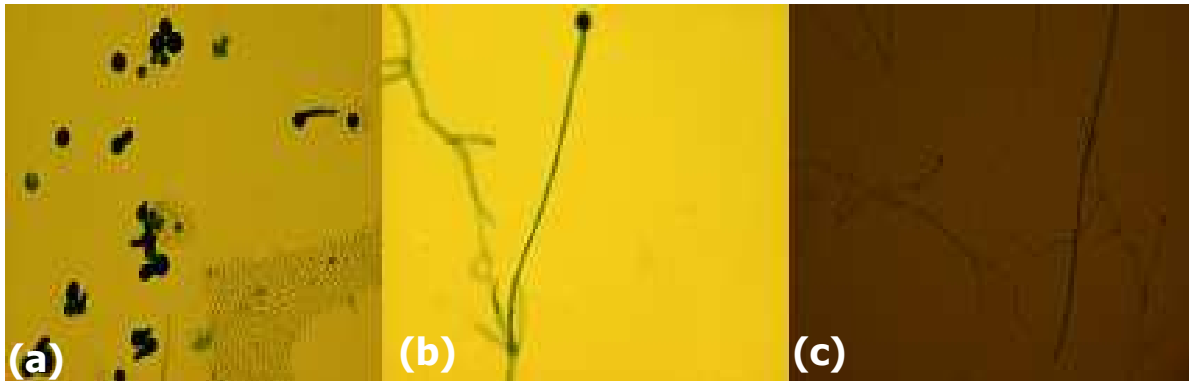


Fig. 15. Se muestra morfología microscópica (40 x) de cepa *Regularior* sp. (a) conidios elípticos, (b) y (c) hifas cenocíticas.

9.1 ENSAYOS DE DECOLORACIÓN EN PLACA CON MEDIO SÓLIDO LIMITADO DE FUENTE DE CARBONO.

Para probar la capacidad de las cepas seleccionadas de biodegradar los colorantes industriales se evaluó el crecimiento micelial con halos de decoloración formados en un medio de cultivo sólido el cual tenía como única posible fuente de carbono el colorante.

Aunque las cuatro cepas crecieron en el Medio Sólido Limitado en Fuente de Carbono (MSLFC) solo *Pleurotus ostreatus* y *Oxiporus latemarginatus* presentaron de manera más evidente un proceso de degradación de los distintos colorantes. Estos resultados se obtuvieron mediante la valoración y comparación ante un ensayo control, que consistía en el MSLFC, sin inocular y de manera

independiente con las 8 variantes de colorante industrial, es así que se calificaron los resultados como: +++ Decoloración total, ++ Decoloración media, + Decoloración mínima, X inhibición de crecimiento (Tabla 4).

Tabla 4. Decoloración de colorantes en medio sólido limitado en fuente de carbono.

CEPA	COLORANTE	INTESIDAD DE DECOLORACION
<i>P. Ostreatus.</i>	NEGRO DIANIX	+
	ROJO DIANIX	+
	AMARILLO DIANIX	+
	ROJO REMAZOL	++
	AMARILLO REMAZOL	+
	AZUL REMAZOL	+++
	ÍNDIGO	+
	NEGRO RDT	+++
<i>O. Latemarginatus.</i>	NEGRO DIANIX	+
	ROJO DIANIX	+
	AMARILLO DIANIX	+
	ROJO REMAZOL	++
	AMARILLO REMAZOL	+
	AZUL REMAZOL	+
	ÍNDIGO	+
	NEGRO RDT	+
<i>R. variabilis.</i>	NEGRO DIANIX	+
	ROJO DIANIX	+
	AMARILLO DIANIX	+
	ROJO REMAZOL	+
	AMARILLO REMAZOL	+
	AZUL REMAZOL	X
	ÍNDIGO	+
	NEGRO RDT	++
<i>Regularior sp.</i>	NEGRO DIANIX	+
	ROJO DIANIX	+
	AMARILLO DIANIX	+
	ROJO REMAZOL	+
	AMARILLO REMAZOL	+
	AZUL REMAZOL	+
	ÍNDIGO	X
	NEGRO RDT	X

+++ Decoloración total, ++ Decoloración media, + Decoloración mínima, X inhibición.

De la cepa de *P. ostreatus* se valoró el crecimiento micelial radial observado en placa, de este ensayo se destacó el crecimiento en tres distintos colorantes siendo A DNX y AZ RMZ donde alcanzó en el día 8 su Máximo Crecimiento Radial (MCR), y en el día 10 para el colorante N RDT (Tabla 5).

Tabla 5. Velocidad de crecimiento de cepa *Pleurotus ostreatus* en medio MSLFC y colorantes.

DIAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
N DNX	0.44	0.65	0.7	0.92	1.22	1.28	1.57	1.77	2.65	2.65
R DNX	0.51	0.59	0.74	1.61	1.78	1.82	2.1	2.38	3.16	3.16
A DNX	0.57	0.66	0.78	1.31	1.68	2.04	2.54	2.54	MCR	MCR
R RMZ	0.42	0.48	0.56	0.75	1.02	1.19	1.35	1.5	1.62	1.62
A RMZ	0.53	0.82	0.59	1.02	1.31	1.58	1.69	1.77	2.1	2.1
AZ RMZ	0.45	0.57	0.67	0.98	1.2	1.5	1.9	1.9	MCR	MCR
ÍNDIGO	0.51	0.59	0.73	1.02	1.4	1.43	1.49	1.64	1.64	1.64
N RDT	0.47	0.55	0.63	0.9	1.19	1.38	1.65	1.65	1.65	MCR

Los colorantes fueron añadidos a una concentración de 500 ppm antes de esterilizar el medio sólido. (MCR) Máximo Crecimiento Radial, unidades en (cm).

Del ensayo en MSLFC, con la cepa *P. ostreatus*, pese a que no en todos los colorantes se obtuvo una decoloración significativa si se observó en algunos ensayos como en el ensayo con colorante R RMZ la presencia de halos de decoloración, esto puede ser una evidencia de la capacidad de utilizar el colorante como única fuente de carbono, aunque bien puede no ser una fuente suficiente para sustentar su crecimiento y por ende permitirle la utilización de todo el colorante dispuesto en la placa (Fig. 16 b y c); Se muestra también en la Fig. 17 (b y c) y 18 (b y c), los procesos de degradación del colorante AZ RMZ Y NEGRO RDT respectivamente, donde se puede observar que el crecimiento micelial puede bien estar acompañado de la decoloración del compuesto xenobiótico.

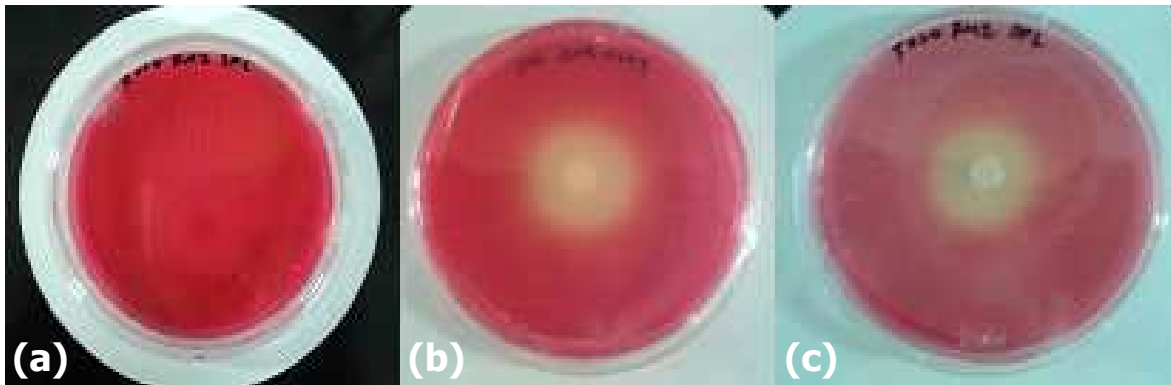


Fig. 16. Decoloración de colorante R RMZ en MSLFC. (a) control rojo remazol, (b y c) crecimiento de *P. ostreatus* y proceso de degradación de colorante R RMZ despues de 10 días.

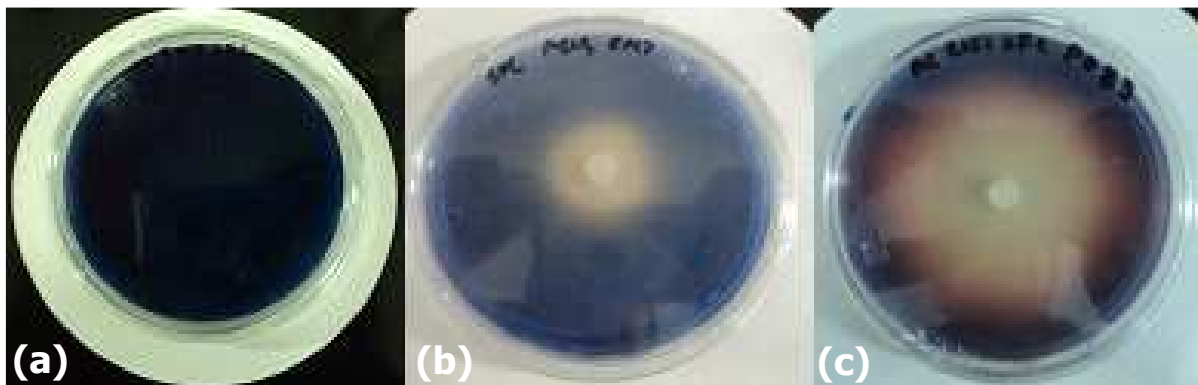


Fig. 17. Decoloración de colorante AZ RMZ en MSLFC. (a) control azul remazol, (b y c) crecimiento de *P. ostreatus* y proceso de degradación de colorante AZ RMZ despues de 10 días.



Fig. 18. Decoloración de colorante NEGRO RDT en MSLFC. (a) control NEGRO RDT, (b y c) crecimiento de *P. ostreatus* y proceso de degradación del colorante NEGRO RDT despues de 10 días de inoculado el medio.

El crecimiento micelial observado en el MSLFC por la cepa *O. latemarginatus* fue relativamente rapido ya que este alcanzó su MCR en 4 distintos colorantes, siendo el más rápido el ensayo en presencia de el colorante NEGRO RDT al alcanzar en

el día 7 su MCR, seguido por los colorantes AZ RMZ, A RMZ, e ÍNDIGO el día 8 del ensayo (Tabla 6).

Tabla 6. Velocidad de crecimiento de cepa *Oxiporus latemarginatus* en MSLFC y colorante.

DIAS	1	2	3	4	5	6	7	8
N DNX	0.66	1.61	2.46	3.06	3.75	4.21	4.21	4.21
R DNX	0.81	1.68	2.53	2.93	3.65	4.1	4.1	4.1
A DNX	0.77	1.46	2.25	2.74	3.06	3.8	3.8	3.8
R RMZ	0.84	1.74	2.66	3.43	3.75	4.31	4.31	4.31
A RMZ	0.79	1.58	2.41	3.49	3.49	3.49	3.49	MCR
AZ RMZ	0.72	1.52	2.16	3.27	3.81	3.81	3.81	MCR
ÍNDIGO	0.64	0.97	1.5	1.88	2.36	2.36	2.36	MCR
N RDT	0.65	1.69	2.6	3.85	3.85	3.85	MCR	MCR

Los colorantes fueron añadidos a una concentración de 500 ppm antes de esterilizar el medio sólido. (MCR) Máximo Crecimiento Radial unidades (cm).

Aunque la cepa *O. latemarginatus* fue capaz de crecer en el MSLFC, solo en presencia de el colorante R RMZ, se observó un halo de decoloración, prueba de que la cepa es capaz de utilizar el colorante como única fuente de carbono. (Fig. 19 c).

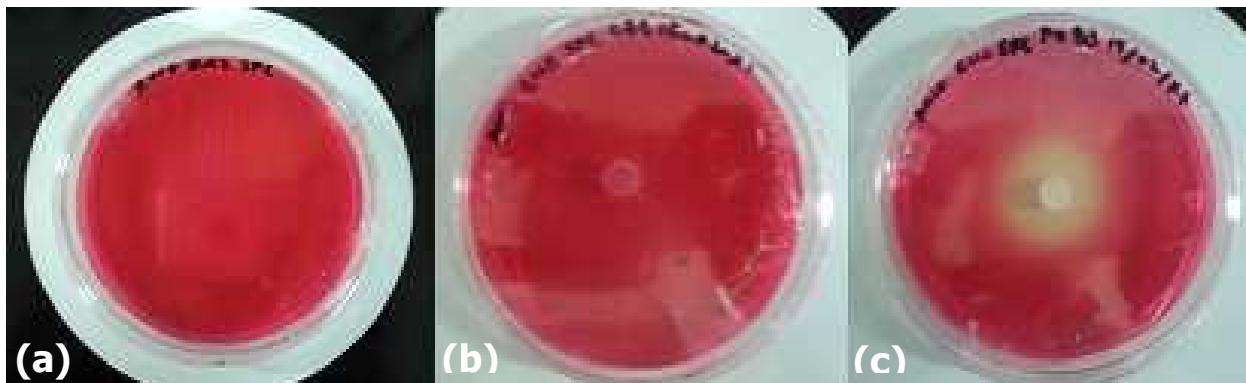


Fig. 19. Decoloración de colorante R RMZ en MSLFC. (a) control R RMZ, (b y c) crecimiento de *O. latemarginatus* y proceso de degradación de colorante R RMZ después de 8 días de inoculado el medio.

La cepa *Rhizomucor variabilis* de igual manera fue capaz de crecer en el MSLFC con los distintos colorantes, solo en el colorante AZ RMZ aparentemente al día 7 del ensayo detuvo su crecimiento, en ninguno de los ensayos para esta cepa se observó halos de decoloración (Tabla 7).

Tabla 7. Velocidad de crecimiento de cepa *Rhizomucor variabilis* en MSLFC y colorante.

DIAS	1	2	3	4	5	6	7	8
N DNX	0.7	1.57	2.04	2.43	2.75	3.23	3.23	3.23
R DNX	0.99	1.58	2.39	3.13	3.59	3.95	3.95	3.95
A DNX	1.34	2.22	3.11	3.39	3.95	3.95	3.95	MCR
R RMZ	0.87	1.63	2.58	3.07	3.56	3.56	3.56	MCR
A RMZ	1.25	1.71	2.57	3.17	3.69	4.25	4.25	4.25
AZ RMZ	1.04	1.6	2.51	3.01	3.82	3.82	3.82	X
ÍNDIGO	0.68	1.1	1.61	1.87	1.83	2.18	2.18	2.18
N RDT	1.01	1.68	2.50	3.19	3.59	3.89	3.89	3.89

Los colorantes fueron añadidos a una concentración de 500 ppm antes de esterilizar el medio sólido. (MCR) Máximo Crecimiento Radial, (X) inhibición de crecimiento, unidades en (cm).

La cepa *Regularior sp.* Fue capaz de crecer en todos los ensayos con los distintos colorantes industriales, aunque al parecer los colorantes ÍNDIGO y N RDT, tuvieron un efecto negativo en el desarrollo de esta cepa inhibiendo su crecimiento en el día 4 y 5 respectivamente (Tabla 8).

Tabla 8. Velocidad de crecimiento de cepa *Regularior sp.* En MSLFC y colorante.

DIAS	1	2	3	4	5	6	7	8
N DNX	0.86	1.54	2.27	2.31	2.45	2.69	3.26	3.26
R DNX	0.91	1.6	2.26	2.97	3.57	3.92	3.915	X
A DNX	1.09	1.85	2.62	2.85	2.965	2.97	MCR	MCR
R RMZ	1.43	1.87	2.39	3.11	3.64	3.64	MCR	MCR
A RMZ	0.92	1.6	2.23	3.2	3.53	3.78	3.78	MCR
AZ RMZ	0.85	1.47	2.57	3.17	3.65	3.82	3.82	MCR
ÍNDIGO	0.68	1.13	1.48	1.48	X	X	X	X
N RDT	1.09	1.67	1.67	X	X	X	X	X

Los colorantes fueron añadidos a una concentración de 500 ppm antes de esterilizar el medio sólido. (MCR) máximo crecimiento radial, (X) inhibición de crecimiento, unidades en (cm).

9.2 ENSAYOS DE DECOLORACIÓN EN PLACA CON MEDIO SÓLIDO ADICIONADO EN FUENTES DE CARBONO.

Se ha reportado que existe en la degradación fúngica procesos de co-metabolización en presencia de compuestos xenobióticos como los colorantes sintéticos y otras fuentes de carbono. El ensayo en placa con medio sólido se enriqueció con almidón, extracto de malta y colorante. Las cuatro cepas seleccionadas presentaron un mayor crecimiento miceliar aunque nuevamente los mejores resultados de decoloración fueron presentados por *Pleurotus ostreatus* y *Oxiporus latemarginatus*; para *Rhizomucor variabilis* y *Regularior sp.* se evidenció solo un mejor crecimiento en presencia de los 8 distintos colorantes sintéticos (Tabla 9).

Tabla 9. Decoloración de colorantes en medio sólido limitado en fuente de carbono.

CEPA	COLORANTE	INTESIDAD DE DECOLORACION
<i>P. Ostreatus.</i>	NEGRO DIANIX	+
	ROJO DIANIX	++
	AMARILLO DIANIX	+
	ROJO REMAZOL	+++
	AMARILLO REMAZOL	++
	AZUL REMAZOL	+++
	ÍNDIGO	++
	NEGRO RDT	+++
<i>O. Latemarginatus.</i>	NEGRO DIANIX	+
	ROJO DIANIX	++
	AMARILLO DIANIX	+
	ROJO REMAZOL	+++
	AMARILLO REMAZOL	++
	AZUL REMAZOL	+++
	ÍNDIGO	++
	NEGRO RDT	+++
<i>R. variabilis.</i>	NEGRO DIANIX	+
	ROJO DIANIX	++
	AMARILLO DIANIX	+
	ROJO REMAZOL	+
	AMARILLO REMAZOL	+
	AZUL REMAZOL	+
	ÍNDIGO	+
	NEGRO RDT	++
<i>Regularior sp.</i>	NEGRO DIANIX	+
	ROJO DIANIX	+
	AMARILLO DIANIX	+
	ROJO REMAZOL	+
	AMARILLO REMAZOL	+
	AZUL REMAZOL	++
	ÍNDIGO	+
	NEGRO RDT	++

+++ Decoloración total, ++ Decoloración media, + Decoloración mínima.

En el MSAFC *P. ostreatus* mostró una mayor capacidad de decoloración y crecimiento, alcanzando un MCR en el día 10 para los colorantes A RMZ, AZ RMZ, ÍNDIGO Y NEGRO RDT (Tabla 10). En general el crecimiento miceliar se presentaba más denso, y los procesos de decoloración se vieron más acentuados de manera particular en los colorante R RMZ, A RMZ, y NEGRO RDT (Fig. 20 b y c; Fig. 21 b y c; y Fig. 22 b y c respectivamente).

Tabla 10. Velocidad de crecimiento de cepa *Pleurotus ostreatus* en MSAFC y colorante.

DIAS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
N DNX	0.41	0.61	1.14	1.6	1.7	1.76	2.37	2.56	3.64	3.64
R DNX	0.43	0.75	1.24	1.71	2.47	2.84	3.6	4.09	4.09	4.09
A DNX	0.55	0.64	1	1.96	2.58	2.99	3.33	3.75	3.75	3.75
R RMZ	0.43	0.62	0.94	1.87	2.53	2.99	3.35	3.69	3.69	3.69
A RMZ	0.41	0.53	1.2	2.07	2.81	3.26	3.91	3.91	3.91	MCR
AZRMZ	0.55	0.72	0.76	1.1	1.64	2.21	2.81	3.67	3.67	MCR
ÍNDIGO	0.44	0.75	1.1	1.62	2.19	2.73	3.22	3.22	3.22	MCR
N RDT	0.49	0.65	1.76	1.9	2.2	3.07	3.91	3.91	3.91	MCR

Los colorantes fueron añadidos a una concentración de 500 ppm antes de esterilizar el medio sólido. (MCR) máximo crecimiento radial. Unidades en (cm).

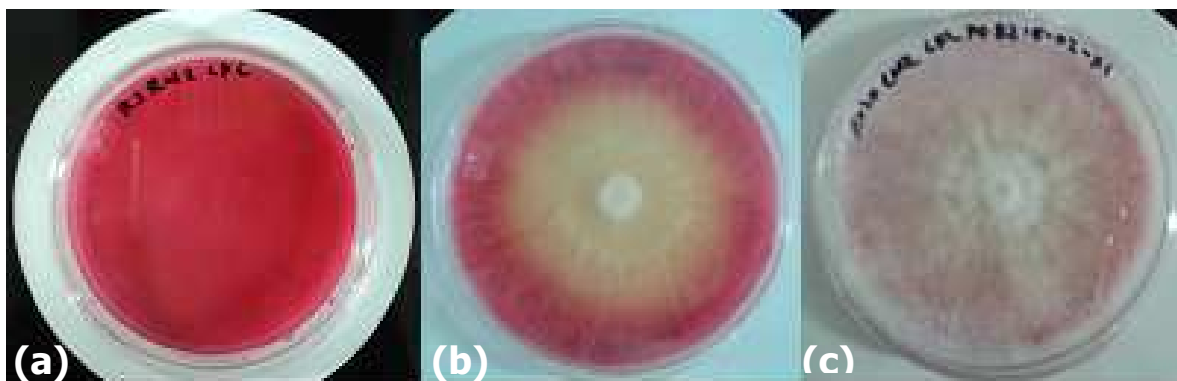


Fig. 20. Decoloración de colorante R RMZ en MSAFC. (a) control R RMZ, (b y c) crecimiento de *P. ostreatus* y proceso de degradación de colorante R RMZ después de 10 días.

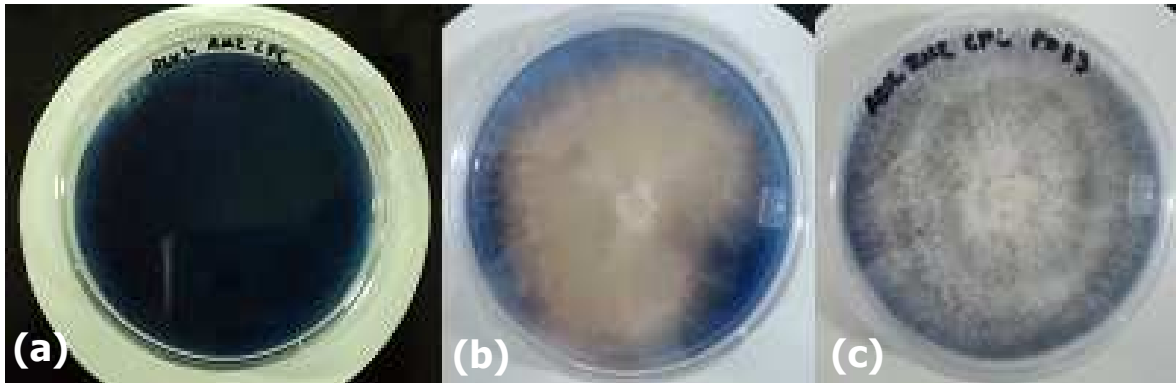


Fig. 21. Decoloración de colorante AZ RMZ en MSAFC. (a) control AZ RMZ, (b y c) crecimiento de *P. ostreatus* y proceso de degradación de colorante AZ RMZ después de 10 días.

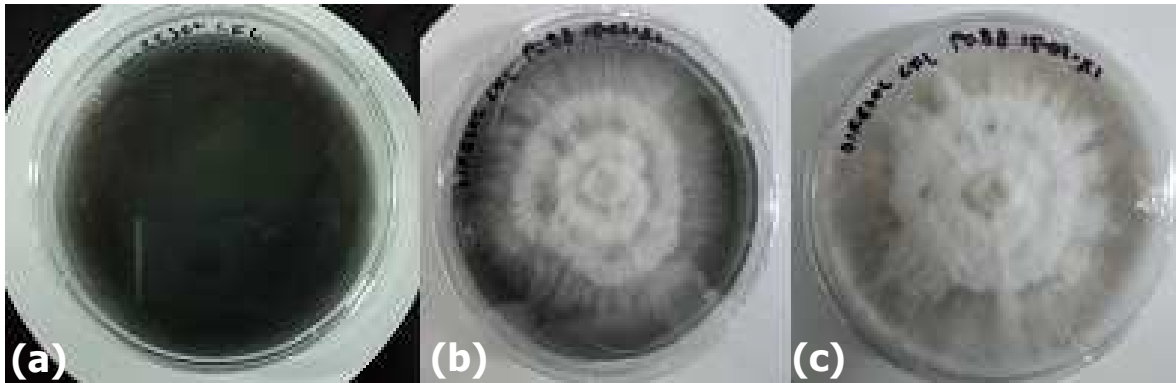


Fig. 22. Decoloración de colorante NEGRO RDT en MSAFC. (a) control NEGRO RDT, (b y c) crecimiento de *P. ostreatus* y proceso de degradación de colorante NEGRO RDT después de 10 días.

Para la cepa *Oxiporus latemarginatus* se observa en la tabla 11 el crecimiento radial desarrollado en el MSAFC en este ensayo *O. latemarginatus* alcanzó el MCR en presencia de todos los colorantes destacándose en presencia del colorante R DNX, AZ RMZ Y NEGRO RDT, en los cuales se desarrolló un micelio algodonoso y aéreo que degradaron de mejor manera los colorantes industriales. (Fig. 23, 24, 25 b y c).

Tabla 11. Velocidad de crecimiento de cepa *Oxiporus latemarginatus* en MSAFC y colorante.

DIAS	1	2	3	4	5	6	7	8
N DNX	0.71	1.6	2.99	3.16	3.76	4.04	4.04	4.04
R DNX	0.71	1.96	3.18	3.41	3.99	4.09	4.09	4.09
A DNX	0.76	1.61	2.93	3.25	3.88	3.88	3.88	MCR
R RMZ	0.64	1.66	2.85	3.3	3.94	3.94	3.94	MCR
A RMZ	0.65	1.8	2.81	3.69	3.69	3.69	MCR	MCR
AZ RMZ	0.69	1.78	2.87	3.53	4.1	4.1	4.1	MCR
ÍNDIGO	0.47	1.14	1.83	2.34	3.6	3.6	3.6	MCR
N RDT	0.67	1.68	2.96	3.91	3.91	3.91	MCR	MCR

Los colorantes fueron añadidos a una concentración de 500 ppm antes de esterilizar el medio sólido. (MCR) máximo crecimiento radial, unidades (cm).

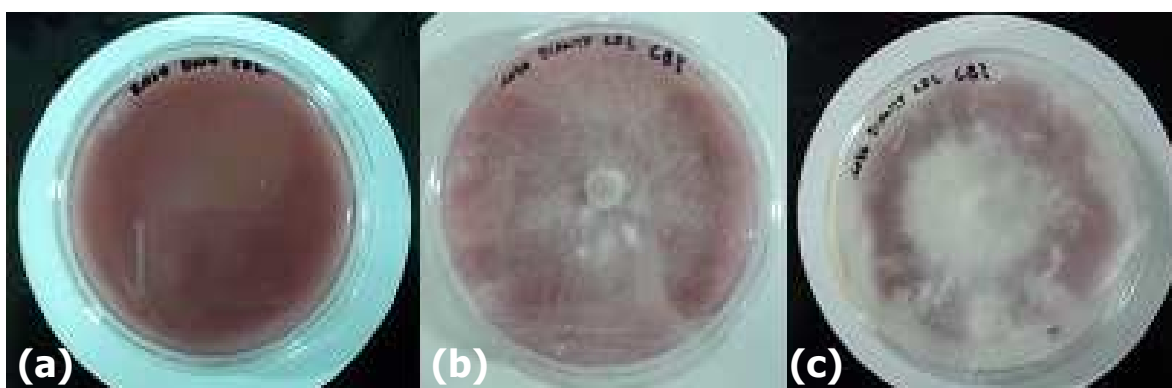


Fig. 23. Decoloración de colorante R DNX en MSAFC. (a) control R DNX, (b y c) crecimiento de *O. latemarginatus* y biodegradación de colorante rojo dianix después de 8 días.

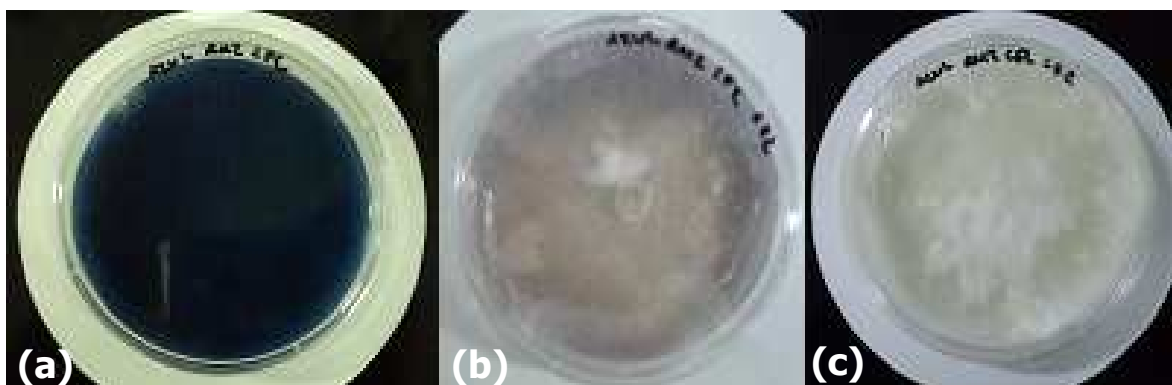


Fig. 24. Decoloración de colorante AZ RMZ en MSAFC. (a) control azul remazol, (b y c) crecimiento de *O. latemarginatus* y biodegradación de colorante azul remazol después de 8 días.

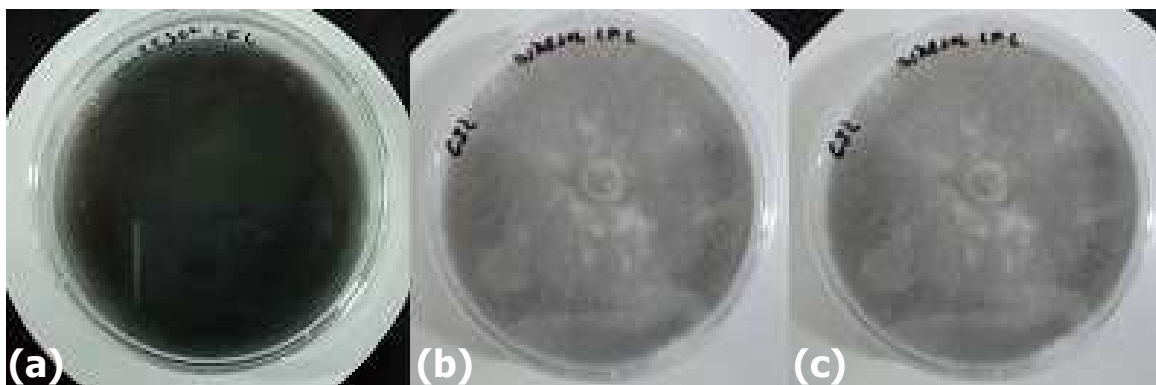


Fig. 25. Decoloración de colorante NEGRO RDT en MSAFC. (a) control NEGRO RDT, (b y c) crecimiento de *O. latemarginatus* y proceso de degradación de colorante NEGRO RDT después de 10 días.

Para la cepa *Rhizomucor variabilis* se registró también la velocidad de crecimiento en MSAFC, en la tabla 12 se muestran los valores alcanzados con los ocho distintos colorantes industriales. *R. variabilis* demostró que en el MSAFC es capaz de degradar medianamente el colorante R DNX y NEGRO RDT. (Fig. 26 y 27 b y c).

Tabla 12. Velocidad de crecimiento de cepa *Rhizomucor variabilis* en MSAFC y colorante.

DIAS.	1	2	3	4	5	6	7	8
N DNX	0.44	2.27	2.54	3.56	3.92	3.92	3.92	MCR
R DNX	1.27	2.27	2.54	3.26	3.80	3.80	3.80	MCR
A DNX	0.97	2.43	2.88	3.24	4.06	4.06	4.06	MCR
R RMZ	1.18	2.14	2.49	3.18	3.61	3.61	3.61	MCR
A RMZ	1.15	2.11	2.51	3.58	3.96	4.24	4.24	4.24
AZ RMZ	1.05	2.21	2.94	3.51	3.97	3.97	3.97	MCR
ÍNDIGO	1.11	2.20	2.41	3.19	3.52	4.02	4.02	4.02
N RDT	1.13	1.88	2.45	2.89	3.40	3.73	3.73	3.73

Los colorantes fueron añadidos a una concentración de 500 ppm antes de esterilizar el medio sólido. (MCR) máximo crecimiento radial, unidades (cm).

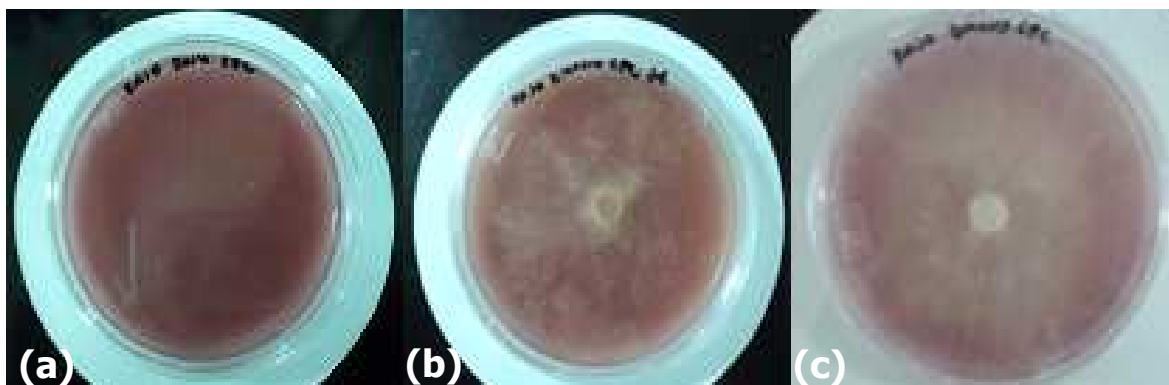


Fig. 26. Decoloración de colorante R DNX en MSAFC. (a) control R DNX, (b y c) crecimiento de *R. variabilis* y proceso de biodegradación de colorante R DNX después de 8 días.

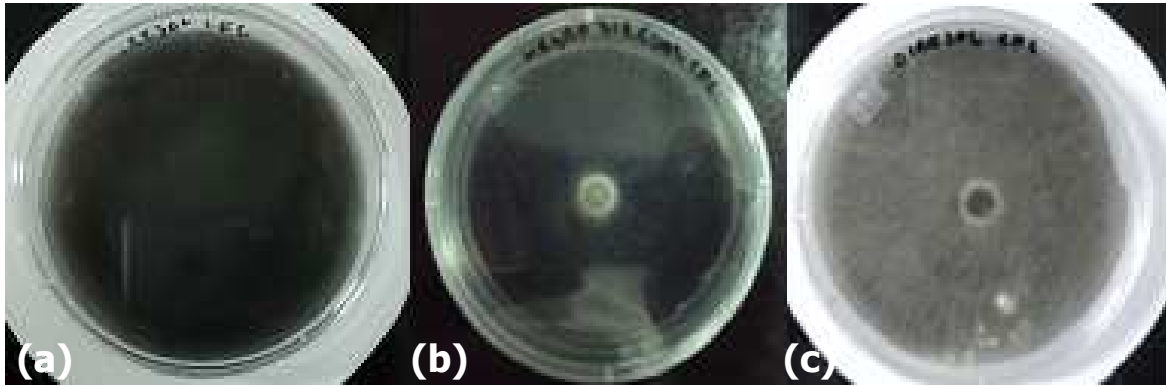


Fig. 27. Decoloración de colorante NEGRO RDT en MSAFC. (a) control NEGRO RDT, (b y c) crecimiento de *R. variabilis* y proceso de degradación de colorante NEGRO RDT después de 8 días.

La cepa *Regularior sp.* obtuvo mayores valores de crecimiento en el MSAFC, en la tabla 13 se muestra la velocidad de crecimiento en presencia de los ocho distintos colorantes industriales. Además de los valores alcanzados que fueron mayores a los del ensayo con MSLFC, la cepa *Regularior sp.* demostró ser capaz de degradar en cierta medida los colorantes AZ RMZ y NEGRO RDT, ya que como se observa en la Fig. 28 y 29 b y c, la tonalidad de estos se ve disminuida durante el ensayo adicionado en fuentes de carbono.

Tabla 13. Velocidad de crecimiento de cepa *Regularior sp.* en MSAFC y colorante.

DIAS.	1	2	3	4	5	6	7	8
N DNX	1.29	1.95	2.49	2.81	3.42	3.83	4.03	4.03
R DNX	1.62	2.56	2.85	3.20	3.81	4.04	4.04	MCR
A DNX	1.44	2.69	3.28	3.33	3.90	3.90	MCR	MCR
R RMZ	1.13	2.41	2.83	3.41	3.83	4.01	4.01	MCR
A RMZ	1.18	2.33	3.23	3.77	3.88	3.88	MCR	MCR
AZ RMZ	1.37	2.29	3.15	3.43	3.91	3.91	MCR	MCR
ÍNDIGO	1.30	2.44	2.78	3.30	3.61	4.05	4.05	MCR
N RDT	1.24	1.85	2.00	2.45	3.01	3.01	MCR	MCR

Los colorantes fueron añadidos a una concentración de 500 ppm antes de esterilizar el medio sólido. (MCR) máximo crecimiento radial, unidades en (cm).

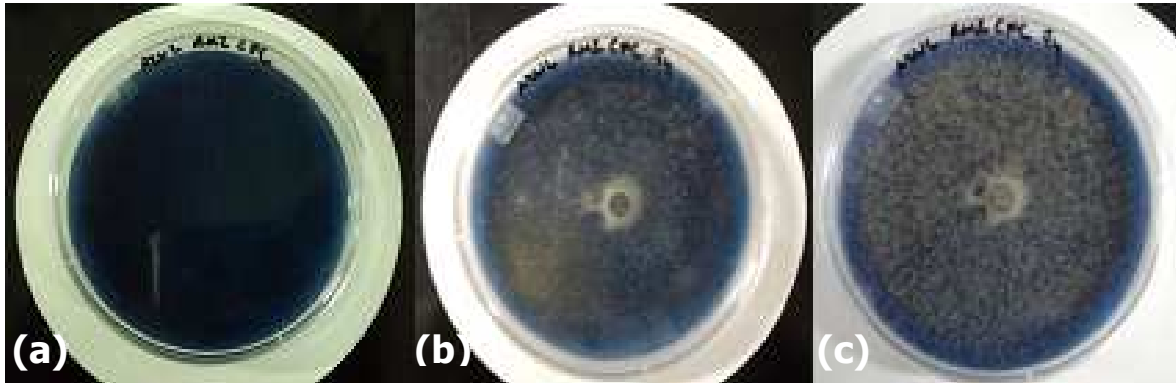


Fig. 28. Ensayo de degradación de colorante AZ RMZ en MSAFC (a) control AZ RMZ, (b y c) crecimiento de *Regualrior sp.* y biodegradación de colorante AZ RMZ después de 8 días.

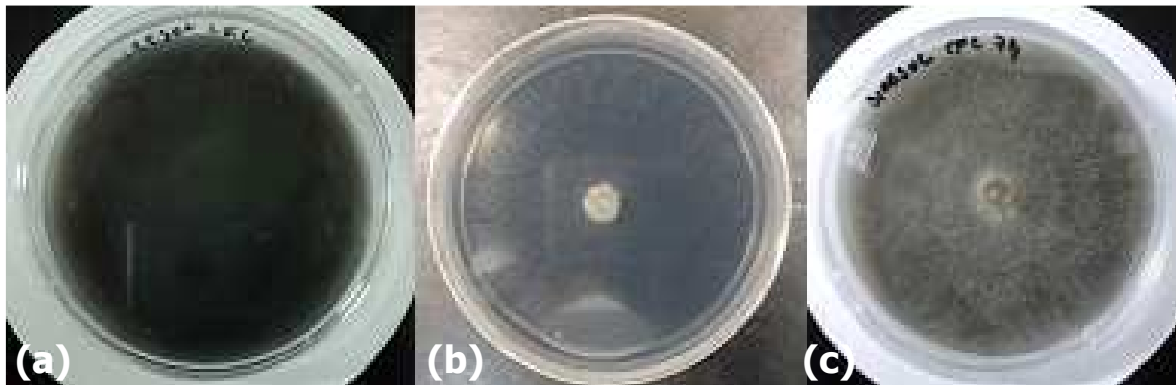


Fig. 29. Decoloración de colorante NEGRO RDT en MSAFC (a) control NEGRO RDT, (b y c) crecimiento de *Regualrior sp.* y proceso de degradación de colorante NEGRO RDT después de 8 días.

9.3 DEGRADACIÓN DE COLORANTE EN MEDIO LÍQUIDO LIMITADO DE FUENTE DE CARBONO.

Los ensayos en (MLLFC) se llevaron a cabo para conocer los posibles procesos de degradación enzimática y registrar el perfil de crecimiento de las cepas *Pleurotus ostreatus* y *Oxiporus latemarginatus* ambas pertenecientes a la clase basidiomicetes; siendo estas cepas las que demostraron ser más capaces para la degradación de los colorantes industriales en los ensayos con medio sólido. En este ensayo se escogieron 3 tipos diferentes de colorantes sintéticos: rojo dianix (R DNX), azul remazol (AZ RMZ) e índigo clarient 94 (ÍNDIGO) cada uno representando una clase diferente de colorante.

Pleurotus ostreatus demostró ser capaz de crecer en presencia de los tres colorantes sintéticos, este se inoculó en el (MLLFC) en forma de pellets cilíndricos usando un horador, bajo condiciones de esterilidad; se encontró que la degradación más significativa fue en el ensayo con colorante ÍNDIGO, el cual según los datos de absorbancia alcanzó una concentración final del 0% a las 160 h. de iniciado el ensayo, para los dos colorantes restantes alrededor de las 552 h. de la fermentación se alcanzaron las menores concentraciones de los colorantes, en presencia de AZ RMZ este organismo alcanzó como lectura final una absorbancia de 16.6%; El colorante R DNX fue el de más bajo porcentaje con una concentración final de 26.3% (Fig. 30). Durante este ensayo se observó una buena capacidad de la cepa *P. ostreatus* para degradar los colorantes sintéticos esta logró de manera satisfactoria disminuir del medio inicial los colorantes sintéticos, de izquierda a derecha se observa en la Fig. 31 la remoción de los colorantes sintéticos R DNX, AZ RMZ e ÍNDIGO, comparados con el ensayo control, el cual consiste el (MLLFC) y el colorante. Se observan en estos ensayos los tres pellets que sobre ellos se ha desarrollado de manera uniforme un micelio esférico que aparentemente absorbió parte de los colorantes que se encontraban disueltos en el medio; De manera particular en el ensayo con colorante AZ RMZ a lo largo de la fermentación este viró a una tonalidad rojiza (Fig. 31 - b), debido probablemente al desdoblamiento de los anillos aromáticos propios de la estructura química del colorante, modificándose así la tonalidad y posiblemente la toxicidad de este. (Cavaco y Gubitz. 2000). Bajo este mismo proceso el colorante ÍNDIGO muestra además de micelios coloreados, agregados del colorante debido quizá a la agitación orbital o a que este es insoluble en agua (Fig. 31 - c).

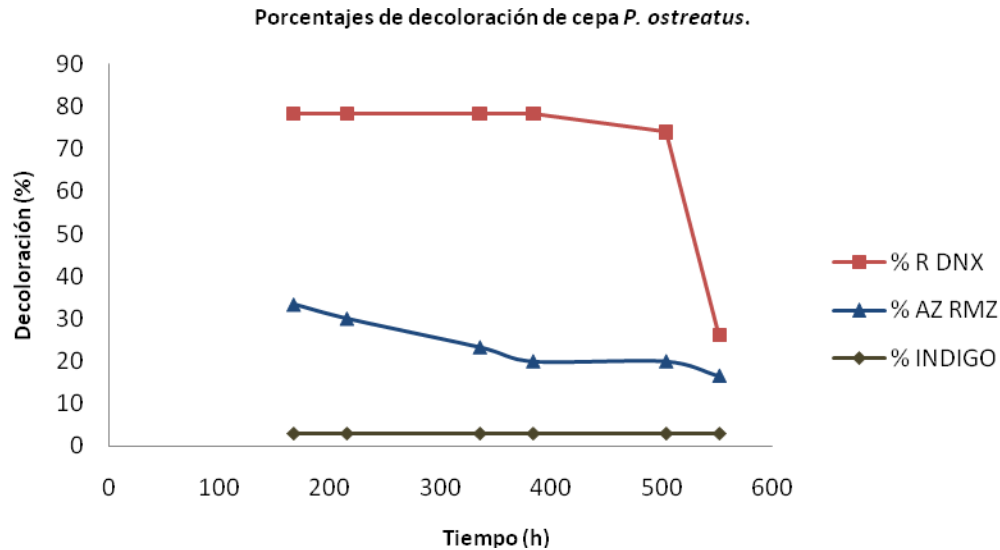


Fig. 30. Porcentaje de decoloración de colorantes industriales obtenidos en el ensayo de fermentación de la cepa *P. ostreatus* donde se observa que alrededor de las 550 h. el colorante R DNX alcanza un 26.3% de concentración final y de un 16.6% para AZ RMZ, en el caso del colorante ÍNDIGO se observa que se alcanzado una concentración del colorante casi de 0%. Los matracos se incubaron en agitación orbital a 27°C.

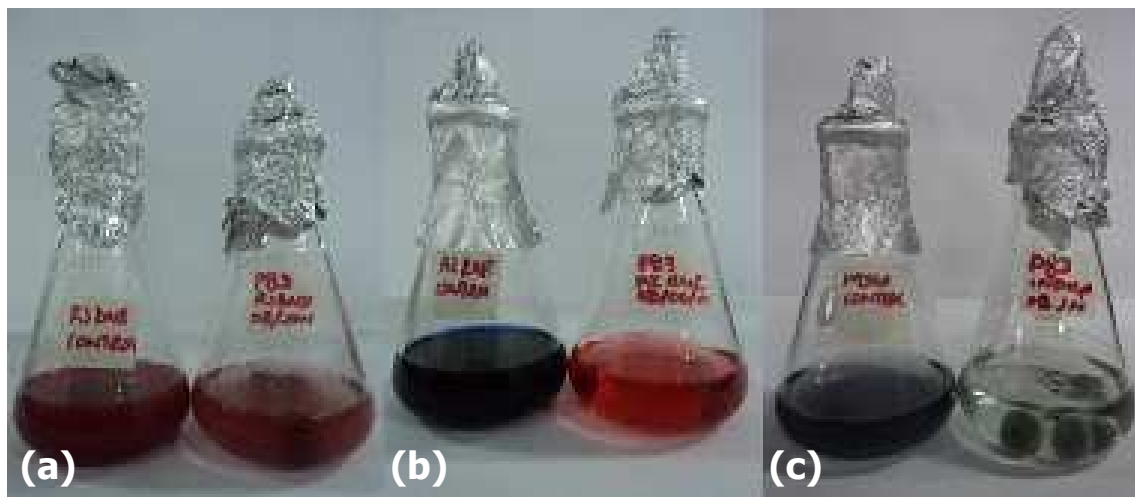


Fig. 31. Fermentación en (MLLFC) con *Pleurotus ostreatus*, de izquierda a derecha: colorante R DNX, AZ RMZ e ÍNDIGO todos en contraste con ensayo control del colorante sin inocular (izquierda) y ensayo (derecha), se aprecia en los ensayos la formación de tres “pellets” esféricos “coloreados” debido a los procesos de biosorción del organismo, esto alrededor de las 550 h. del experimento.

La cepa *Oxiporus latemarginatus* mostró también tener buena capacidad para degradar los colorantes sintéticos en la fermentación con (MLLFC), siendo el de mejores resultados el colorante ÍNDIGO con un porcentaje de concentración final de 2.85 % a las 550 h. de iniciado el ensayo, seguido del colorante AZ RMZ con un 20% de concentración final, y para el colorante R DNX se alcanzó una concentración final del 23.91 % (Fig. 32). En este ensayo el colorante R DNX aunque fue el que en proporción tuvo una menor degradación se observa que el medio líquido aparentemente se ha aclarado de manera más eficiente, este colorante al igual que el colorante ÍNDIGO formó agregados que bien pudieran estar siendo degradados por la enzimas extracelulares de este organismo (Fig. 33 a y c). El colorante AZ RMZ también sufrió un cambio en su tonalidad virando a un color rojizo debido probablemente a la modificación de los anillos aromáticos durante la digestión oxidativa (Fig. 33 - a); de manera similar los pellets con micelio de este organismo se encuentran “coloreados” por el colorante sintético de su medio, sugiriendo nuevamente que los procesos de biosorción juegan un papel importante, en la degradación fúngica. En este ensayo se puede corroborar un poco la premisa de que la cepa *O. latemarginatus*, la cual fue aislada de un efluente contaminado con colorantes entre otros más compuestos xenobióticos, pudiera ser más adecuada para procesos biotecnológicos posteriores (Fig. 33).

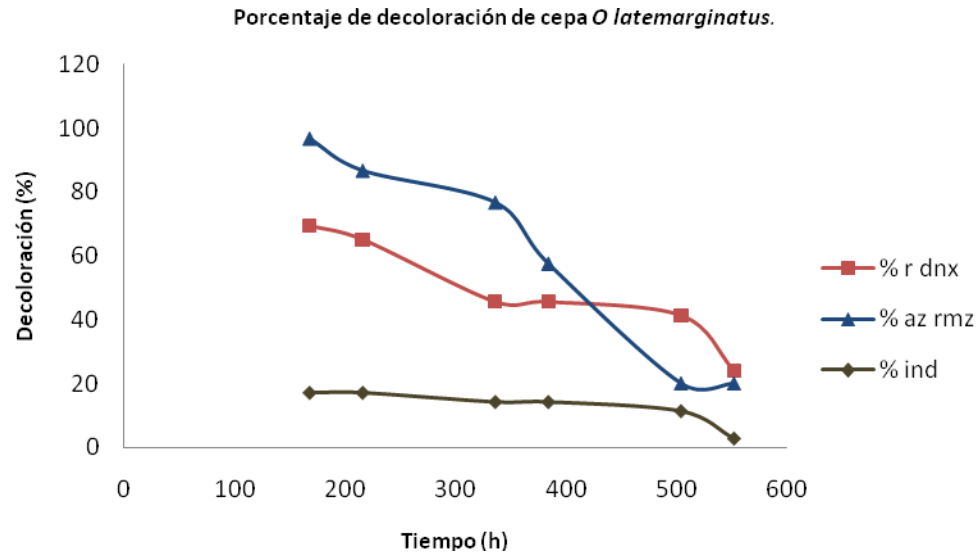


Fig. 32. Porcentajes de decoloración obtenidos en el ensayo de fermentación para la cepa *O. Latemarginatus*, donde se observa que alrededor de las 550 h. el colorante R DNX alcanza un 23.91 % de decoloración final y de un 20% para AZ RMZ, en el caso del colorante ÍNDIGO se observa que se ha alcanzado una concentración del colorante casi de 2.8 %. Los matracos se incubaron en agitación orbital a 27°C.

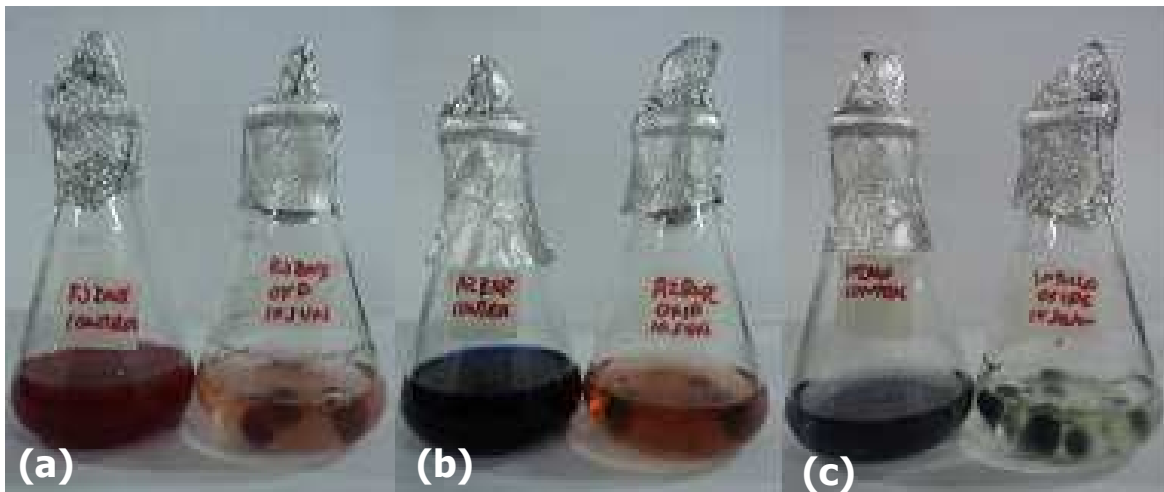


Fig. 33. Ensayo de fermentación en (MLLFC) para la cepa *Oxiporus latemarginatus* de izquierda a derecha: colorante R DNX, AZ RMZ e ÍNDIGO todos en contraste con ensayo control del colorante sin inocular (izquierda) y ensayo (derecha), se aprecia en los ensayos la formación de tres “pellets” esféricos que muestran la aparente biosorción de los colorantes sintéticos alrededor de las 550 h. del experimento.

9.4 ENSAYO DE MICROSCOPIA COMPROBATORIO DE LA BIOSORCIÓN DE COLORANTES INDUSTRIALES.

De los ensayos de fermentación para *Pleurotus ostreatus* y *Oxiporus latemarginatus* se tomaron muestras de micelio para verificar por medio de microscopia la evidencia de los colorantes R DNX, AZ RMZ e ÍNDIGO, demostrando así posibles procesos de biosorción.

De la cepa *O. latemarginatus* se obtuvo evidencia clara de los colorantes AZ RMZ (Fig. 34) y R DNX (Fig. 35), mientras que para el colorante ÍNDIGO no fue posible encontrar partículas u otra evidencia de dicho colorante en el interior del micelio, sugiriéndose así otro mecanismo de biodegradación.

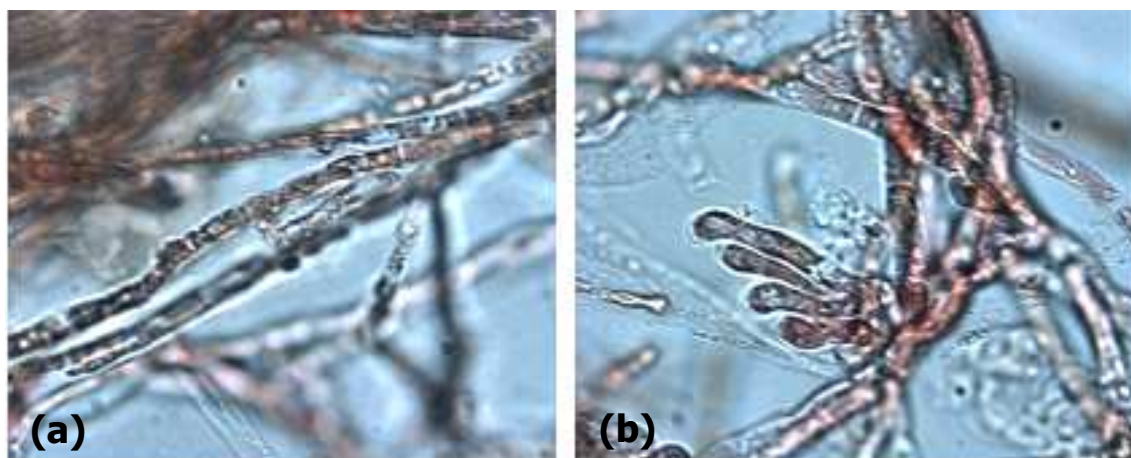


Fig. 34. Evidencia de la presencia del colorante AZ RMZ encontrado en el interior del micelio de *O. latemarginatus*, el colorante se observa en tonalidades rojizas debido a la probable modificación del anillo aromático del colorante; microscopia (100x).

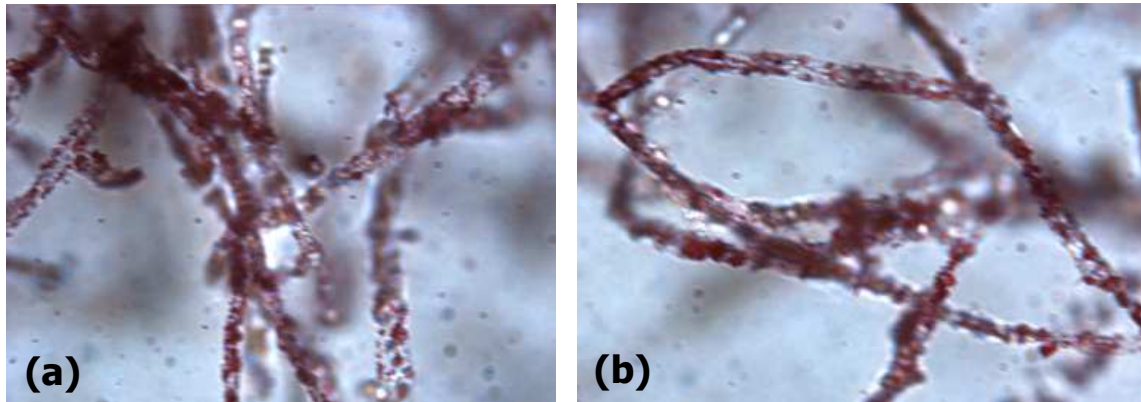


Fig. 35. Evidencia de la presencia del colorante R DNX encontrado en el interior del micelio de *O. latemarginatus*, se observan agregados del colorante fuera y dentro del micelio (microscopía 100x).

Referente a la cepa *P. ostreatus* se corroboró también un posible proceso de biosorción, ya que de manera concluyente se encontró evidencia de los colorantes AZ RMZ (Fig. 36) y R DNX (Fig. 37) dentro del micelio de esta cepa. De manera similar a la cepa *O. latemarginatus* no se encontró evidencia clara del colorante ÍNDIGO en el interior del micelio de *P. ostreatus*; probablemente a que estas dos cepas llevan a cabo procesos similares para la degradación del colorante ÍNDIGO como la digestión enzimática extracelular.

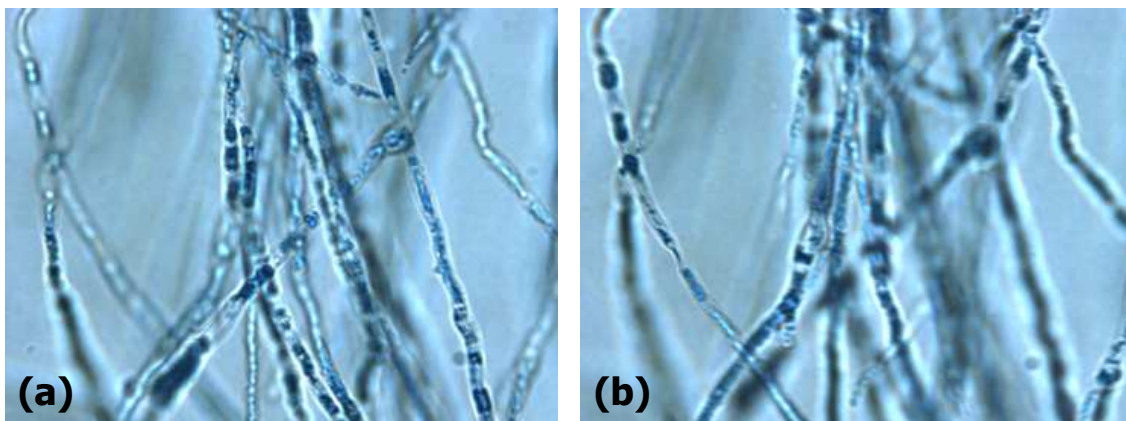


Fig. 36. Evidencia de la presencia del colorante AZ RMZ encontrado en el interior del micelio de *P. ostreatus*, se observa el aparente transporte de las partículas del colorante por el micelio; microscopía (100x).

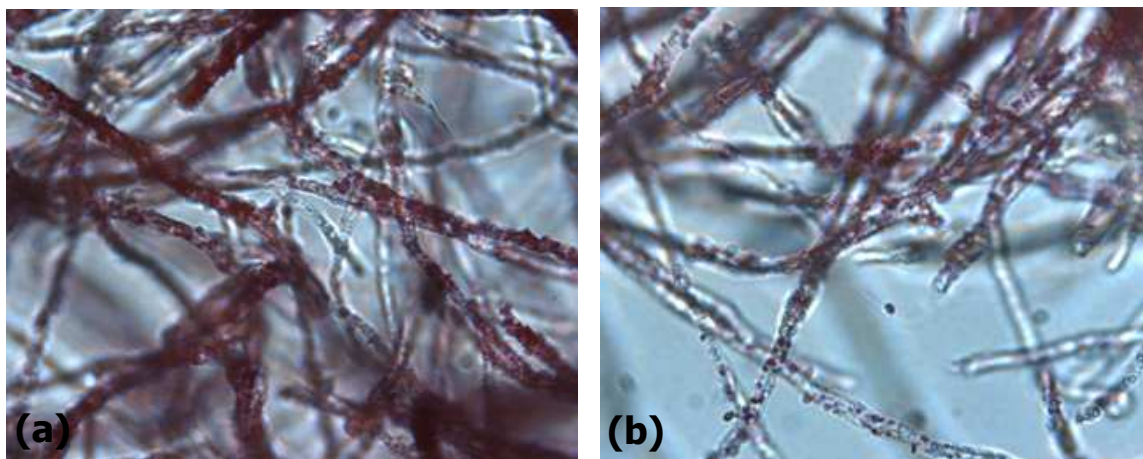


Fig. 37. Evidencia de la presencia del colorante R DNX encontrado en el interior del micelio de *P. ostreatus*, se observan agregados dentro y fuera del micelio (microscopía 100x).

9.5 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE *P. OSTREATUS* Y *O. LATEMARGINATUS* DURANTE FERMENTACIÓN LÍQUIDA EN AUSENCIA Y PRESENCIA DE COLORANTES INDUSTRIALES.

Para la obtención del peso seco generado como biomasa (X), durante la fermentación en el (MLLFC), y los colorantes industriales, se muestrearon 6 puntos con intervalos de 48 y 120 h de la fermentación, con ayuda de una bomba de vacío se filtró el medio líquido o extracto enzimático (EE) a través de un vaso de vidrio con un disco de papel filtro Watman No. 4 mantenido en peso seco constante. Las muestras finalmente fueron desecadas en una estufa a 40°C durante 24 h. En el ensayo con *P. ostreatus* este alcanzó su máxima biomasa generada en presencia del colorante ÍNDIGO con una X_{max} de 0.89 g/L a las 552 h. aproximadamente de iniciar el ensayo y una μ de 0.011 h⁻¹; En presencia del colorante AZ RMZ *P. ostreatus* generó una X_{max} mínima de 0.3 g/L. a las 384 h. del experimento y una μ de 0.01 h⁻¹; En el caso del colorante R DNX este organismo alcanzó una X_{max} de 0.71 g/L y una μ de 0.012 h⁻¹, aunque no se hayan alcanzado niveles de biomasa mayores, ninguno de los colorantes influenció de manera negativa el desarrollo del organismo (Fig. 38). A manera de control se elaboró también una fermentación paralela con las mismas cepas evaluadas, pero sin adicionar el colorante industrial; en este experimento se evaluó la biomasa

generada en (MLLFC) sin colorante. Tellez 2008 expone que los organismos fúngicos pueden tener un crecimiento “atípico” debido a los muchos requerimientos, que parecieran necesitar para su desarrollo, en el ensayo control *P. ostreatus*, alcanzó un valor máximo de X_{max} 2 g/L a las 550 h. del ensayo (Fig. 37). Siendo este el valor más alto obtenido, comparado con la biomasa máxima generada en presencia del colorante ÍNDIGO de aproximadamente 0.89 g/L, la diferencia de este desarrollo de biomasa bien puede obedecer al estrés que representa el colorante en (MLLFC) (Fig. 37).

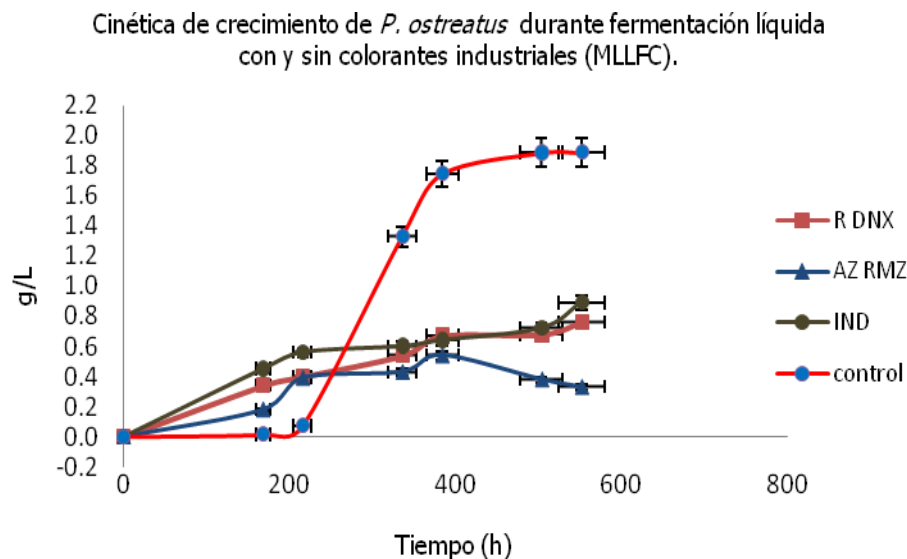


Fig. 38. Biomasa generada por *P. ostreatus* durante fermentación en (MLLFC) y colorantes industriales rojo dianix (R DNX), azul remazol (AZ RMZ) e índigo (ÍNDIGO), las barras muestran el error estandar con un valor del 5%.

De la cepa *Oxiporus latemarginatus* se obtuvieron los siguientes datos de biomasa generada en presencia de los distintos colorantes industriales durante la fermentación en (MLLFC). En este ensayo la biomasa máxima generada en peso seco fue de X_{max} 0.84 g/L en presencia del colorante R DNX con una μ de 0.011 h^{-1} ; seguido del colorante AZ RMZ con una biomasa máxima de X_{max} 0.63 g/L y una μ de 0.005 h^{-1} ambos a las 456 h. de iniciado el experimento, por último en el

colorante ÍNDIGO la cepa alcanzó una biomasa final X_{\max} 0.57 g/L y una μ de 0.011. (Fig. 39). *O. latemarginatus* en el ensayo control alcanzó a generar solo 0.35 g/L X_{\max} de biomasa a las 456 h. de fermentación (Fig. 39). La baja producción de biomasa, incluso menor a lo alcanzado en presencia de los colorantes ÍNDIGO, esto sugiere que *O. latemarginatus*, utilizó los colorantes como fuente de carbono, y energía, además de no mostrar ninguna supresión de su desarrollo en presencia de los colorantes sintéticos bien pudiera estar transformándolos en biomasa.

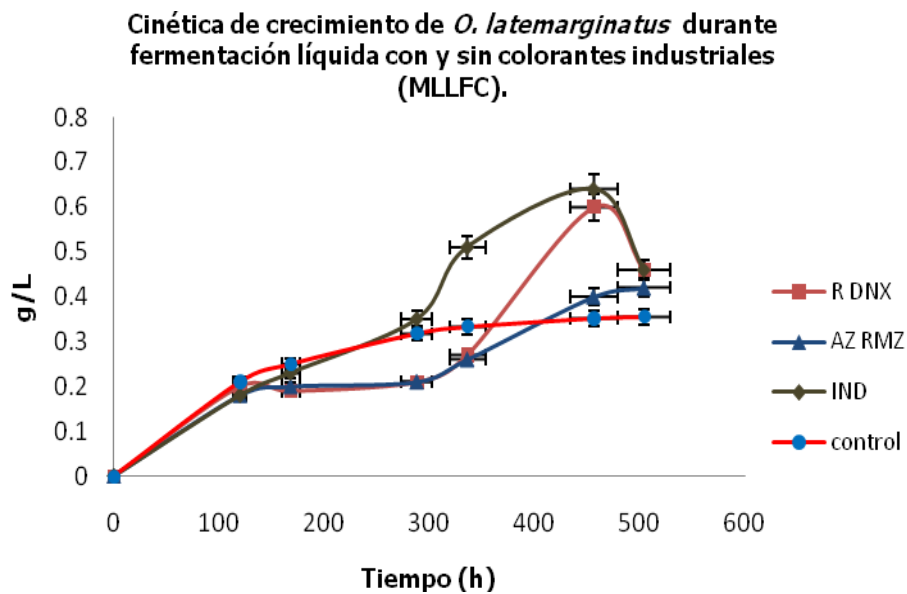


Fig. 39. Biomasa generada por *O. latemarginatus* durante fermentación en (MLLFC) y colorantes industriales: R DNX, AZ RMZ, e ÍNDIGO, las barras muestran el error estandar con un valor del 5%.

9.6 ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS EN FERMENTACIÓN LÍQUIDA EN PRESENCIA DE COLORANTES INDUSTRIALES.

Las actividades enzimáticas (E) fueron evaluadas a partir de los sobrenadantes congelados obtenidos mediante la filtración del extracto enzimático (EE), contra un suero control (MLLFC) el cual contenía solo el medio líquido, sin hongo ni colorante, los valores negativos se traducen en una nula actividad de la enzima muestreada esto para confirmar la presencia de enzimas extracelulares que pudieran estar involucradas en la degradación de los colorantes.

Para la enzima lacasa se encontraron los siguientes resultados generados por la cepas *Pleurotus ostreatus* y *Oxiporus latemarginatus* en presencia de los 3 distintos colorantes.

En el caso de *P. ostreatus* el mayor volumen encontrado producido fue de la enzima lacasa, en presencia del colorante AZ RMZ con 1700 U/L a las 200 h. de iniciado el experimento, (Fig. 40) donde al parecer el colorante ya había sido degradado en casi un 30% (Fig. 30), para el colorante R DNX, también en el monitoreo de la enzima lacasa, es en la que se encuentra el mayor volumen con 1400 U/L. A las 600 h. de haber iniciado la fermentación, (Fig. 41) coincidiendo donde este colorante alcanza un 30% de decoloración final dentro del medio (Fig. 30). La cepa *O. latemarginatus* fue capaz de producir todas la enzimas a excepción de la enzima lacasa en presencia del colorante ÍNDIGO (Fig. 42) y casi nula en presencia del colorante AZ RMZ esperándose que los procesos de degradación se llevasen mediante otra enzima extracelular como la Manganese peroxidasa, también registrada en este ensayo.

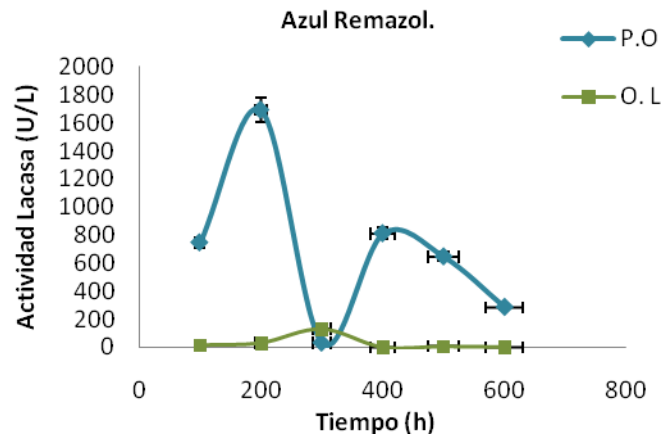


Fig. 40. Actividad enzimática de lacasa (U/L), generada por *P. ostreatus* y *O. latemarginatus* en presencia de el colorante azul remazol las barras muestran el error estándar con un valor del 5%.

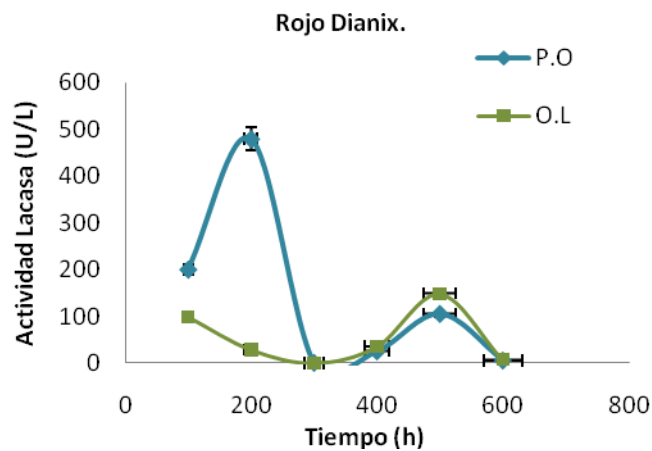


Fig. 41. Actividad enzimática de lacasa (U/L), generada por *P. ostreatus* y *O. latemarginatus* en presencia de el colorante R DNX las barras muestran el error estándar con un valor del 5%.

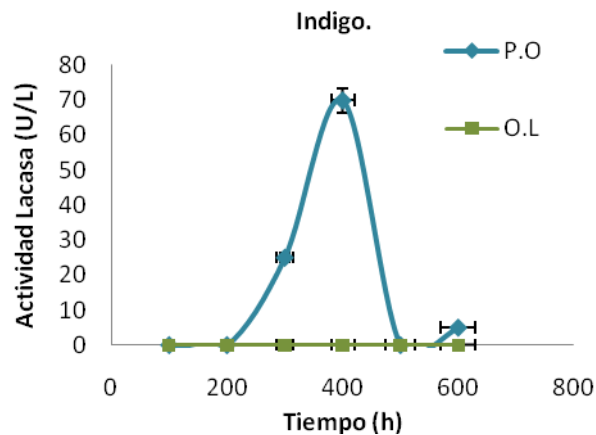


Fig. 42. Actividad enzimática de lacasa (U/L), generada por *P. ostreatus* y *O. latemarginatus* en presencia de el colorante ÍNDIGO las barras muestran el error estándar con un valor del 5%.

Para la enzima Manganese Peroxidasa se encontraron los siguientes resultados generados por la cepas *Pleurotus ostreatus* y *Oxiporus latemarginatus* en presencia de los 3 distintos colorantes.

En presencia de el colorante AZ RMZ, *O. latemarginatus* registró su valor máximo generado de enzima (MnP) con 2800 U/L a las 100 h. de la fermentación, prosiguiendo a una aparente disminución de la producción de esta enzima (Fig. 43).

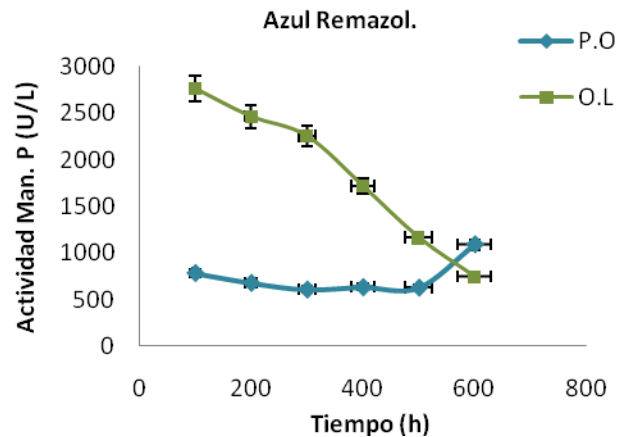


Fig. 43. Actividad enzimática de Manganeso peroxidasa (U/L), generada por *P. ostreatus* y *O. latemarginatus* en presencia de el colorante AZ RMZ las barras muestran el error estándar con un valor del 5%.

La cepa *O. latemarginatus* se destacó en la degradación del colorante R DNX con un 23.91% de decoloración final en el cual se reportó uno de los valores más altos con 2700 U/L. a las 100 h. de fermentación (Fig. 44).

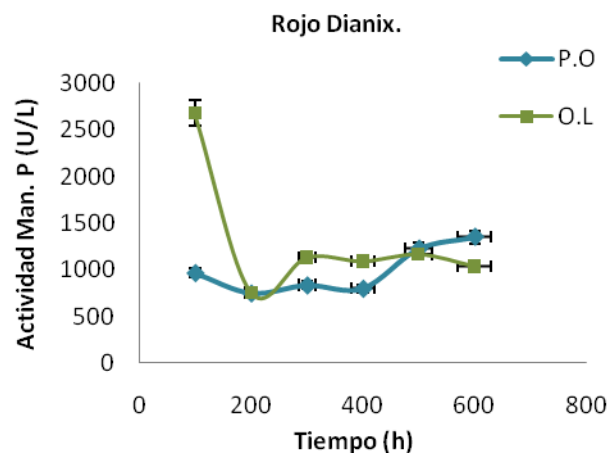


Fig. 44. Actividad enzimática de Manganeso peroxidasa (U/L), generada por *P. ostreatus* y *O. latemarginatus* en presencia de el colorante R DNX las barras muestran el error estandar con un valor del 5%.

En presencia de el colorante ÍNDIGO la cepa *P. ostreatus* denotó uno de los valores más altos para la enzima, (MnP), con 1000 U/L a las 600 h. de fermentación (Fig. 45).

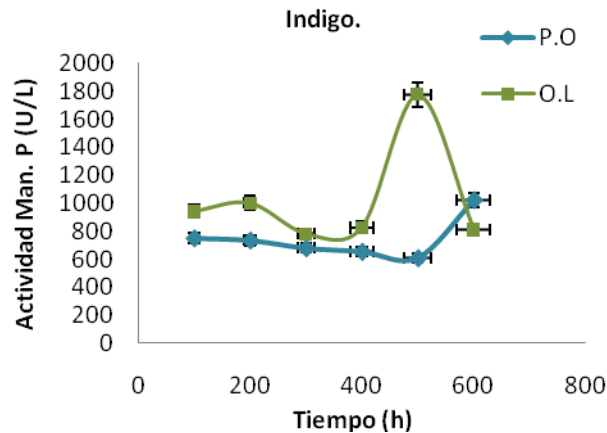


Fig. 45. Actividad enzimática de Manganeso peroxidasa (U/L), generada por *P. ostreatus* y *O. latemarginatus* en presencia de el colorante ÍNDIGO las barras muestran el error estándar con un valor del 5%.

Para la enzima Alcohol Veratril Oxidasa se encontraron los siguientes resultados generados por la cepas *Pleurotus ostreatus* y *Oxiporus latemarginatus* en presencia de los 3 distintos colorantes.

Para el colorante AZ RMZ, los registros más altos de (AVO), fueron encontrados en el monitoreo de *O. latemarginatus* con 2000 U/L; en presencia de el colorante AZ RMZ, *P. ostreatus* registró en presencia de este mismo colorante su mayor volumen de enzima con 1500 U/L (Fig. 46).

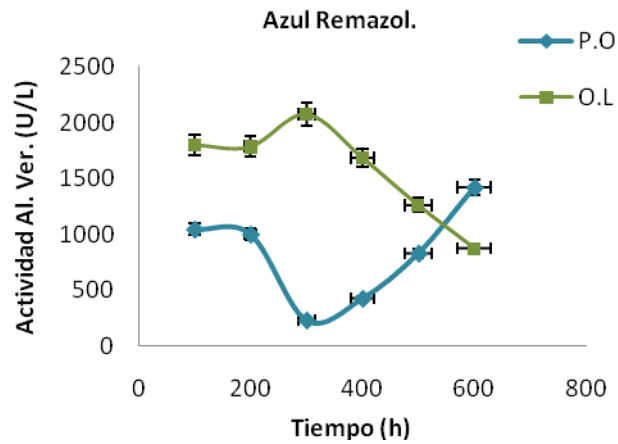


Fig. 46. Actividad enzimática de Alcohol Veratril Oxidasa (U/L), generada por *P. ostreatus* y *O. latemarginatus* en presencia de el colorante AZ RMZ las barras muestran el error estándar con un valor del 5%.

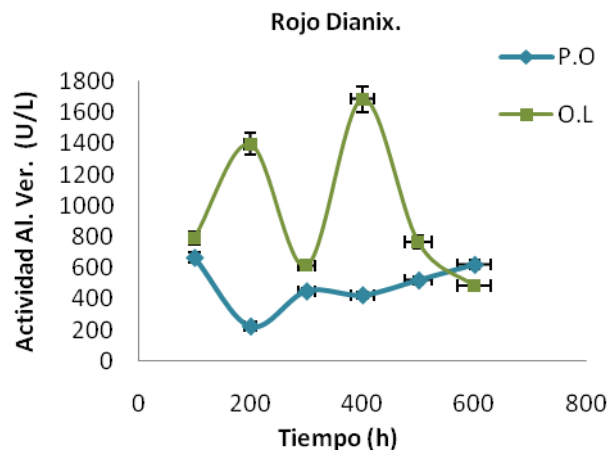


Fig. 47. Actividad enzimática de Alcohol Veratril Oxidasa (U/L), generada por *P. ostreatus* y *O. latemarginatus* en presencia de el colorante R DNX; las barras muestran el error estándar con un valor del 5%.

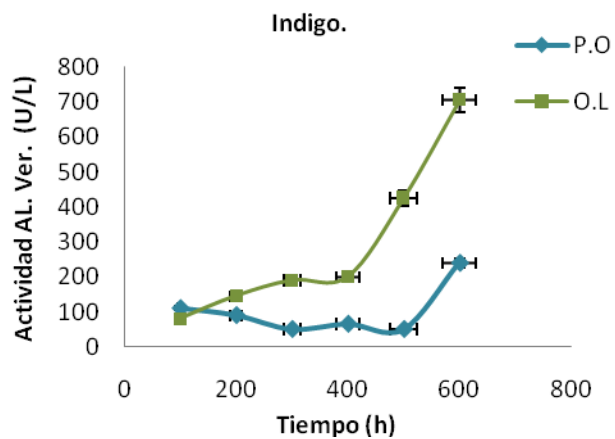


Fig. 48. Actividad enzimática de Alcohol Veratril Oxidasa (U/L), generada por *P. ostreatus* y *O. latemarginatus* en presencia de el colorante ÍNDIGO; las barras muestran el error estándar con un valor del 5%.

10. DISCUSIÓN

El estudio de la habilidad de los hongos de pudrición seleccionados para degradar los diferentes colorantes sintéticos en el medio sólido adicionado con fuente de carbono y limitado en fuente de carbono reveló una elevada capacidad biodegradativa de algunos de los colorantes empleados; sin embargo de las cepas seleccionadas los pertenecientes a la clase zigomicetes, bien pudieron haber sido reprimidos en su crecimiento, tal es el caso en específico de la cepa *Rhizomucor variabilis* inhibido por el colorante AZ RMZ y la cepa *Regularior sp.* en presencia de el colorante ÍNDIGO y NEGRO RDT, en contraste en este mismo ensayo el hongo de pudrición blanca *Pleurotus ostreatus* en el (MSLFC), fue capaz de degradar de manera (total +++) los colorantes AZ RMZ y NEGRO RDT, esto pudo haber sido resultado de los procesos de co-metabolización propios de la degradación extracelular fúngica, ya que en presencia de otras fuentes de carbono y de soporte para el crecimiento como almidón, sulfatos, cloruros, y ácidos como el fosfórico, se observa y corrobora una mayor cantidad de colorantes degradados en el (MSAFC) como se muestra en la tabla 9; donde incluso los organismos pertenecientes a la clase zigomicetes alcanzaron a decolorar el medio sólido (Assadi y Jahangiri). Esta evaluación fue determinada por el crecimiento miceliar acompañado algunas veces por halos de decoloración observados en algunos experimentos, el micelio alcanzó un máximo crecimiento radial (MCR), que no siempre fue acompañado por la decoloración del medio con colorante; aunque algunos autores como Ivana *et al.*, (2005) demuestran una correlación positiva entre la velocidad de crecimiento y la habilidad de decoloración de los halos formados por la degradación, no siempre en nuestro experimento se observó así, ya que aunque el hongo se halla desarrollado de manera extensa la decoloración no fue consistente; Ivana *et al.* (2005), comentan que cuando la zona de decoloración excede el diámetro del crecimiento miceliar, indica que las enzimas lignolíticas, u otros metabolitos son tan altos que van más allá de lo alcanzado por el micelio dentro de la placa de agar. Así también como ya se ha reconocido aunque los colorantes tuvieran el mismo tipo de enlace aromático por ejemplo los que pertenecen al grupo “remazol” esto no significó que fuera capaz de degradar

los demás “tonos” de este mismo tipo colorante, esto probablemente a los muchos de los enlaces aromáticos, las distintas posiciones de unión y el número de grupos funcionales en las regiones aromáticas de los colorantes de tipo azo, dianix, índigo, diresol y remazol usados en este ensayo.

Para verificar otros procesos biodegradativos las cepas de basidiomicetes fueron evaluadas también en un medio líquido limitado en fuente de carbono y adicionado con colorante, ya que estas mismas cepas fueron las que obtuvieron mejores porcentajes de concentración en el medio sólido; todos los ensayos de decoloración tanto para *Pleurotus ostreatus* y *Oxiporus latemarginatus* alcanzaron su mejor rendimiento a las 550 h (metabolismo secundario) de iniciada la fermentación; estos porcentajes fueron medidos en intervalos de 48 y 120 h. la biomasa máxima (X_{max}) generada y medida en peso seco, no fue siempre encontrada al final del experimento cuando la cepa ha consumido todas los elementos nutritivos disponibles dentro del medio, esto puede deberse ya que como comenta Robinson *et al.* (2001) y Téllez (2008); los organismos fúngicos pueden presentar un crecimiento “atípico” debido al estrés generado por las condiciones propias del medio, así también en nuestro ensayo a diferencia de Pereira y Regina (2005), la cepa *Pleurotus ostreatus*, no alcanza valores mayores de biomasa de los que ellos reportan, pudiendo obedecer esto al medio de cultivo que contenía mínimas fuentes de carbono, esto corroborado por el ensayo control en el cual nuestro organismo libre del estrés que representa el colorante alcanzó 2 g/L X_{max} a las 550 h. del ensayo (Fig. 38). En cambio la cepa *Oxiporus latemarginatus* la cual en el ensayo control alcanzó a generar solo 0.3 g/L de X_{max} , siendo este valor incluso menor que en la fermentaciones adicionadas con colorante industrial pudiendo inferir que el colorante en específico para esta cepa es usado como fuente de carbono o de nutrición ya que en presencia de estos aumenta su biomasa casi al doble como fue en el caso del colorante ÍNDIGO a las 456 h. de fermentación (Fig. 39).

En función de establecer el proceso por el cual nuestros organismos degradan los colorantes industriales se monitoreo bajo los mismos parámetros de tiempo las

posibles actividades enzimáticas extracelulares, de 3 enzimas fúngicas, (LiP) (E.C.1.11.12.14); (MnP) (E.C.1.11.1.13) y Lacasa (E.C.1.10.3.2), todas pertenecientes al grupo de las oxidasas, estas asociadas a la digestión de lignina y otros elementos recalcitrantes, en el caso de *Pleurotus ostreatus* se reportó la habilidad de producir las tres enzimas oxidativas siendo la mayor actividad encontrada para la enzima lacasa, en presencia del colorante AZ RMZ con 1700 U/L a las 200 h. (Fig. 40), de iniciado el experimento donde al parecer el colorante ya había sido degradado en casi un 35% (Fig. 30). Para el colorante R DNX alrededor de la 500 h. se observó una disminución de la concentración del dicho colorante (Fig. 30), revisando las actividades enzimáticas alrededor de estos mismos tiempos encontramos que la enzima (MnP) muestra su mayor actividad con 1100 U/L. y la enzima (AVO) la cual aparece con 1700 U/L a las 400 h evidenciando así una probable participación de ambas enzimas en la degradación de este colorante (Fig. 44), por ultimo para el colorante índigo los valores más altos fueron encontrados para la enzima (MnP), con 1000 U/L que como menciona a las 600 h. de fermentación (Fig. 45). Podemos así diferenciar o proponer que los mecanismos de biodegradación de *Pleurotus ostreatus* pudieran bien comenzar con la producción de Lacasa, y para el colorante Azul remazol esto puede ser un proceso cometabólico (Kirk y Farrel 1987), ya que las otras dos enzimas (AVO) y (MnP) parecen ser secretadas de manera secundaria y probablemente concluyente para los procesos de degradación como en el ensayo con el colorante AZ RMZ que a las 600 h. produce 1500 U/L. de (MnP) (Fig. 46). La cepa *Oxiporus latemarginatus* fue capaz de producir todas la enzimas a excepción de la enzima Lacasa en presencia del colorante ÍNDIGO (Fig. 42), aunque al parecer para su digestión se sirvió de la producción de (MnP) a las 550 h. del ensayo con 1800 U/L. Así también para esta enzima (MnP) se encontró el valor máximo de producción con 2800 U/L. a las 100 h. de fermentación (Fig. 43), en presencia de el colorante AZ RMZ, *Oxiporus latemarginatus* se destacó en la degradación del colorante R DNX con un 23.91% de concentración final (Fig. 32); siendo este mismo ensayo con el colorante R DNX donde se reportó la actividad más alta para la enzima MnP con 2700 U/L. a las 100 h. de fermentación (Fig. 44), estos valores

demuestran que los organismos fúngicos se sirven de distintas enzimas extracelulares inespecíficas que en conjunto pudieran ser las responsables de la catálisis de los colorantes aunque las evidencias atípicas e incluso secreciones posteriores de una nueva enzima como (AVO), puede ser evidencia de como comenta Sumanthi y Manju (2000), que otros procesos cometabólicos bien pueden estar implicados, en la digestión de colorantes industriales y xenobioticos como los citocromos reductores P450, y procesos de biosorción en el micelio.

11. CONCLUSIONES.

De la evaluación de las cepas fúngicas es probable que los organismos pertenecientes a la clase Basidiomicetes tengan mayor afinidad por degradar colorantes industriales que los pertenecientes a la clase Zigomicetes, ya que aunque estos últimos alcanzaron un máximo crecimiento radial (MCR), no siempre fue acompañado con la degradación del colorante.

No solo la oxidación enzimática es la responsable de degradar colorantes industriales, bien los procesos de biosorción y acumulación micelial ocupan un papel relevante en la degradación

La cepa *Oxiporus latemarginatus* es un buen modelo de biodegradación ya que al ser una cepa aislada de un efluente contaminado con este mismo tipo de contaminante recalcitrante alcanza mayores porcentajes de decoloración y biomasa en presencia de colorante.

12. BIBLIOGRAFIA.

Aber J.D; Melillo, J.M.; Mc claugherly, C.A. (1990). Predicting long-term patterns of mass loss, nitrogen dynamics and soil organic matter formation from initial fine litter chemistry in temperate forest ecosystems. *Canadian Journal of Botany* 68: 2201-2208.

Arjmand M, Sandermann H (1985). Mineralization of chloraniline/ lignin conjugates and of free chloranilines by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *J Agric Food Chem* 33:1055–1060

Artexaga E; Tzanov T; Costa S; Robra K. H; Cavaco-Paulo A. and Gübitz G.M. (2000) Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsuta*, *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3357-3362.

Assadi M.M; Jahangiri M. R. (2001). Textil waste water By *Aspergillus niger*, *desalination*, 141-1-6.

Banat I. M; Nigam P; Singh D; Marchant R. (1996). Microbial decolourisation of textile-dye-containing effluents: a review. *Bioresource Technology.* 58: 217-227.

Barr, D.P., Aust, S.D., 1997. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 28 (2), 78–87.

Boerjan W., Ralph J; Baucher M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 54: 519-546.

Bohmer S., Messner K., Srebotnik E. (1998). Oxidation of phenantrene by fungal laccase in the Presence of 1-hydroxyl benzotriazo lean dunsaturat ed lipids. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 244: p. 233–238.

Bochert M., Libra J. A.4. (2001). Decolorization of reactive dyes by the white rot fungus *Trametes versicolor* in sequencing batch reactors. *Biotechnology Bioeng.* 75:p. 313–321.

Bourbonnais R; Paice M. G. (1990). Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Lett* 267:99–102.

Bruswell J. A. (1991). Fungal degradation of lignin. In D. K. Arora, B. Rai, K. G. Mukerji, and G. R. Knudsen (eds.): Handbook of applied Mycology. Vol. 1, pp. 425-480. Marcel Dekker, New York.

Bumpus J. A. Tien M, Wright D, Aust SD (1985). Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. Science 228:1434–1435.

Cardona M; Juliana Osorio, Juan Quintero(2009).Degradation of industrial dyes with white rot Fungi, rupo de Bioprocesos. Departamento de Ingeniería Química. Universidad de Antioquia Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia N.º 48. pp. 27-37.

Cavaco A; M Gubitz. (2000).Textile processing with enzymes. The textile institute Abington hall, Abington Cambridge CB&AH, England. pp 212-219.

Christie R; (2001). Colour chemistry, Editorial Royal Society of Chemistry, First Edition, United Kingdom. 70-127.

Claus H. 2003. Laccases and their occurrence in prokaryotes. Archives Microbiology 179: 145-150.

Collins P. J, and Dobson A. D. W. (1997). Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. Appl. Environ. Microbiol. 63, 3444-3450.

Cordi L; Assalin M. R, Ponezi A. N, Durán N. (2012). Identification of Microbiota for Activated Sludge Acclimated By Paper Mill Effluent Kraft E1 Bioremediation. J. Bioremed. Biodeg. 3:169. doi:10.4172/2155-6199.1000169

Crawford R. L. (1981). Lignin biodegradation and transformation. Wiley Interscience, New York.

Crites R., Tchobanoglous G.(2000). Sistema de manejo de aguas residuales para núcleos pequeños y descentralizados tomo 1 Mac Graw Hill Iberoamericana S.A, pp. 130-133.

Cullen D; Kersten P. J. (2004). Enzymology and molecular biology of lignin degradation. En: Mycota.III: Biochemistry and Molecular Biology. Anonymous pp. 249-273.

Curtis Helena; Shneck A. (2006). La diversidad de la vida. Capitulo 29. Características de los hongos y su clasificación. <http://www.cobach-elr.com/academias/quimicas/biologia>.

Davila G y Vázquez R. (2006). Enzimas lignolíticas fúngicas para fines ambientales. Mensaje Bioquímico, 30:29-55.

Deverall B. J. (1965). Temperature. In G. C. Ainsworth and A. S. Sussman (eds.): The Fungi. Vol. 1, pp. 543-550: Academic Press, New York.

Díaz-Godínez G, Soriano-Santos J, Augur C, Viniegra-González G. (2001). Exopectinases produced by *Aspergillus niger* in solid state and submerged fermentation: a comparative study. Journal Industrial Microbiology Biotechnology 26: 271-275.

Durieu y Mont. *Oxyporus latemarginatus* (Durieu & Mont.) Donk, Persoonia 4: 342 (1996) Asturnatura.com

Edens W, Goins T, Dooley D y Henson J. 1999. Purification and characterization of secreted laccase of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. Applied and Environmental Microbiology 65: 3071-3074.

Eggen T; (2000). Bioremediation of recalcitrant aromatic organic pollutants with white rot fungi. Doctor Scientiarum Theses. Jordforsk, Norway. Agricultural University of Norway.

Eriksson K. E. L. Blanchette R. A; Ander P. (1990). Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components. Springer-Verlag Berlin. 407 pp.

Evans C.S., Dutton M.V., Guillén F; Veness R.G. (1994). Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation. FEMS Microbiol. Rev. 13: 235-240.

Feijoo G; Lema J M. (1999). Tratamiento de efluentes de industrias de la madera con compuestos tóxicos y recalcitrantes mediante hongos lignolíticos. Revista AFINIDAD LIV: 171- 180.

Fengel D; Wegener G. (1984). Wood: Chemistry, ultra structure, reactions. De Gruyter, Berlin.

Fernando T., Bumpus J.A., Aust S.D. (1990). Biodegradation of TNT (2,4,6-Trinitrotoluene) by

Phanerochaete chrysosporium. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1666-1671.

Ferrer J; Seco A. (2008). Tratamientos biológicos de aguas residuales, Universidad Politécnica de Valencia, Alfa Omega S.A, pp. 154-160.

Ferreira P., Guillén F., Ruiz-Dueñas F.J., García de Lacoba M., Martínez M.J., van Berkel, W.J.H; Martínez A.T. (2002) Structure-function studies on fungal aryl-alcohol oxidase. In: Flavins and flavoproteins. (Eds.: Ghapman,S.K., Perham,R.N. y Scrutton,N.S.), Rudolf Weber, Berlin, pp. 155-160

Field, J. A., E. de Jong,, G. Feijoo, and J. A. M. de Bont. (1992). Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by New Isolates of White Rot Fungi. Appl. Environ. Microbiol. 58, 2219-2226.

Fog K; (1988).The effect of added nitrogen on the of decomposition of organic matter. Biological Reviews 63: 433-462.

Forgacs E; Cserháti T; Oros G. (2004). Removal of synthetic dyes from waste waters: a review. Environmental International. 30: 953-971.

Fritsche W., Hofrichter M. (1999). Aerobic degradation by microorganisms. En: Advances in Biochemical engineering biotechnology. T. Scheper (Ed.) Springer-Verlag, Vol. 63. Biotransformations.

Galhaup C; Haltrich D. (2001). Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. Appl. Microbiol. Biotechnol.56: p.225-232.

Gahr F; Hermanutz F; Opperman W. (1994). Ozonation - an important technique to comply with new German law for textile wastewater treatment. Water Science and Technology. 30: 255-263.

Gianfreda L; Xu Bollag J-M, (1999). Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. Biorremediat J:3:1-25.

Gilbertson R. L; L. Ryvarden. (1987). North American polypores, vol. 2. *Megasporoporia- Wrightoporia*. Fungiflora, Oslo. p. 434-885.

Goodell, B., Nicholas, D.D. y Schultz, T.P. (2006). Wood deterioration and preservation. Advances in our changing world. ACS, Washington.

Gorontzy T, Drzyga O, Kahl MW, Bruns-Nagel D, Breitung J, von Loew E, Blotvogel KH (1994). Microbial degradation of explosives and related compounds. *Crit Rev Microbiol* 20:265–284

Griffin D. H. (1994) *Fungal Physiology* 2nd ed. Wiley Science Paperback Series. College of Environmental Science and Forestry State University of New York, Syracuse.

Guaratini C. C. I; Zanoni M. V. B. (2000). Textile dyes. *Química Nova* 23(1): 71-78.

Guinberteau J; (1990). Definition and taxonomical place of the genus *Pleurotus* in the mushrooms classification. *Bulletin de la Federation Nationale des Syndicats Agricoles de Cultivateurs de Champignons* (Francia) 48: 261-264.

Guzmán G; G Mata, D Salmones. C Soto-Velazco y L. Guzmán. Davalos. (1993). El cultivo de los hongos comestibles. Con especial atención a especies tropicales y subtropicales en esquilmos y residuos agro-industriales. Instituto Politécnico Nacional. México.

Guillén F., Gómez-Toribio V., Martínez M.J. y Martínez A.T. (2000). Production of hydroxyl radical by the synergistic action of fungal laccase and aryl alcohol oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 383: 142-147.

H. Chun y Yizhong. (1999). Decolorization and biodegradability of photocatalytic treated azo dyes and wool textile wastewater 39, 2107.

Hammel K.E., Gai W.Z., Green B., Moen M.A. (1992). Oxidative degradation of phenanthrene by the ligninolytic fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1832-1838.

Have R., Teunissen P. J. M. (2001). Oxidative mechanisms involved in lignin degradation by white rot fungi. *Chem. Rev.* 101:3397-3413.

Higson F. K; (1991) Degradation of xenobiotics by white rot fungi. En: Ware GW (Ed.) *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. New York, Springer Verlag, 122-125.

Higuchi T. (1997). *Biochemistry and molecular biology of wood*. Springer Verlag, London.

Ivana E; Ladislav H, Frantiesk N. (2005). Synthetic dye decolorization capacity of White rot fungus *Dichotomus squalens*. Institute of microbiology AS CR Videnka 1083. 2153-2159.

Janshekar H. y Fiechter A. (1998). Cultivation of *Phanerochaete chrysosporium* and submerged stirred tank reactors. *Journal of Biotechnology* 8: 91-102.

J. S Knappy; P. S. Newby. (1998). The decolourisation of a chemical industry effluent by white rot fungi, Department of Microbiology, University of Leeds, Leeds, LS2 9JT, U.K.

Käärik A. (1965). The identification of the mycelia of wood-decay fungi by their oxidation reactions with phenolic compounds. *Stud. For. Suec.* 31: 3-81.

Keyser P; Kirk, T.K.; Zeikus, J.G. (1978). Lignolytic enzyme of *Phanaerochaete chrysosporium* synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation. *Journal of Bacteriology* 135: 780-797.

Kirby N; McMullan G; Marchant R. (1995). Decolourisation of an artificial textile effluent by *Phanerochaete chrysosporium*. *BiotechnolLett* 17:761–764.

Kirk T. K; Chang, H. M. (1975). Decomposition of lignin by white-rot fungi. II. Characterization of heavily degraded lignins from decayed spruce. *Holzforschung* 29:56-64.

Kirk T. K; Cullen, D. (1998) Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi. In: Environmentally friendly technologies for the pulp and paper industry. (Eds.: Young, R.A. y Akhtar, M.), TAPPI Press, Atlanta, pp. 273-308.

Kirk T.K; Farrel R. L. (1987). Enzymatic combustion: the microbial degradation of lignin. *Ann. Rev. Microbiol*, 41: 465-505.

Kullman SW; Matsumura F. (1996). Metabolic pathways utilized by *Phanerochaete chrysosporium* for degradation of cyclodiene pesticide Endosulfan. *Appl Environ Microbiol* 62:593–600

Kumar M. N. V. R.; Sridhari T. R; Bhavani K. D; Dutta P. K. (1998). Trends in color removal from textile mill effluents. *Colorage*. 40: 25-34.

Kunz A; Peralta-Zamora P; Gomes de Morales, S; Durán N. (2002). New tendencies on textile effluent treatment. *Química Nova*. 25(1): 78-82.

Kuo, M. (2005, February). *Pleurotus ostreatus*: The oyster mushroom. Retrieved from the *MushroomExpert.Com* Website: http://www.mushroomexpert.com/pleurotus_ostreatus.html

Kuwahara M; Tatsuro S; Yositoshi N; Fumihisa K; Takashi W. (2004). Effects of fungal pretreatment and steam explosion pretreatment on enzymatic saccharification of plant biomass. DOI 10, 1002/bit. 719-724;20.

Lee B, Pometto AL, Demici A, Hinz PN (1998) Media evaluation for the production of microbial enzymes. J. Agric. Food Chem. 46: 4775-4778.

Leonowicz A., Cho N.S., Luterek J., Wilkolazka A., Wojtaz 24. Wasilewka M., Matuszewska A., Hofrichter M., Wesbergg., Rogalski J. (2001). Fungal laccase: properties and activity on lignin. J. Basic. Microbiol. 41: p. 185–227.

Lewandowski G. A; Armenante PM, Pak D (1990). Reactor design for hazardous waste treatment using a white rot fungus. Water Res 24:75–82.

Londoño E; Yepes M. C. y Castro, Rommel H. (2001). “Decoloración de Aguas de Teñido Textil por Métodos Físico-químicos y Biológicos. Proyecto de Grado para optar al título de Ingeniero Químico” Medellín Universidad Nacional de Colombia.

López M; Méndez T; Hernandez – Hernandez; y Castañón. (2004). Olivares micología medica. Ed. Trillas, pp 68-70.

Lund M., Ragauskas A. J. (2001). Enzymatic modification of kraft lignin through oxidative coupling with water-soluble phenols. Appl. Microbiol. Biotechnol. 55: p. 699–703.

Malherbe, S. & T. Cloete. 2002. Lignocellulose biodegradation: fundamentals and applications. Rev. Environ. Sci. Biotechnol. 1:105–114.

Mancilla D. H; Lizama C, Guattarra A, Rodriguez J. (2012). Tratamiento de residuos líquidos de la industria de celulosa y textil. ciencia y tecnología para el desarrollo. la industria de celulosa y textil. Ciencia y tecnología para todos. www.Cnea.Gov.Ar/Xxi/Ambiental/Cyted/20cap13.pdf.

Martínez A.T., Speranza M., Ruiz-Dueñas F.J., Ferreira P., Camarero S., Guillén F., Martínez M. J., Gutiérrez A., del Río J.C. (2005). Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungi attack of lignin. Int. Microbiology 8, 195-204.

Marzullo L., Cannio R., Giardina P., Santini M. T. y Sannia G. (1995). Veratryl alcohol oxidase from *Pleurotus ostreatus* participates in lignin biodegradation and prevents polymerization of laccase-oxidized substrates. *J. Biol. Chem.* 270: 3823-3827.

Mayer A. M., Staples R.C. (2002). Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry* 60: p. 551–65.

Mc Clagherty C.A.; Pastor J; Aber J.D; Melillo, J.M. (1985). Forest litter decomposition in relation to soil nitrogen dynamics and litter quality. *Ecology* 66 (1): 266-275.

Mc Mullan G; Meehan C; Conneely A; Kirby N; Robinson T; Nigam P; Banat I. (2001). Microbial decolourisation and degradation of textile dyes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 56:81–87.

Meyer U. (1981). Biodegradation of synthetic organic col-orants. In *Microbial Degradation of Xenobiotic and Recalcitrant Compounds*, FEMS Symposium 12, ed. T. Leisinger, A. M. Cook, R. Hutter & J. Nuesch. Academic Press, London, pp. 371-385.

M. Téllez-Téllez; F. J. Fernández; A. M. Montiel-González; C. Sánchez; G. Díaz-Godínez Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation. *Biotechnologically relevant enzymes and proteins. Appl Microbiol Biotechnol* (2008) 81:675–679 DOI 10.1007/s00253-008-1628-6.

Moeller G. E; Garzon M. A; (2003). Desarrollo De Tecnologías no Convencionales Para El Tratamiento de Efluentes de la Fabricación de Colorantes del Tipo Azo Anuario Imta.

Molina S. (2006); Utilización del sistema enzima- mediador para la eliminación de los compuestos extraíbles y la lignina en la industria de pasta y papel; Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla (IRNAS-CSIC). Pag 7.

Moreira M.T, Feijoo G, Sierra-Alvarez R y Field J.A. 1999. Revaluation of the manganese requirement for the biobleaching of kraft pulp by white rot fungi. *Bioresource Technology* 70: 255-260.

Morgan P; Lewis S.T; Watkinson R. J. (1991). Comparison of abilities of white-rot fungi to mineralize selected xenobiotics compounds. *Appl Microbiol Biotechnol* 34:693–696.

Nebel B. J; Wright, R. T. (1999). Ciencias Ambientales: Ecología y Desarrollo Sostenible.

6th ed. México: Pearson-Prentice Hall. 698 pp.

N. Duran, The impact of biotechnology in the pulp and paper industry: state of art in: M. T. Martins et al. (1997). (Eds.), Progresse in Microbial Ecology, Soc. Brazil. Microbiol./ ICOME Publ SP, Brazil, p. 543

Nsereko VL, Morgavi DP, RodeLM, Beauchemin KA, McAllisterTA (2000). Effects of fungal preparation on hydrolysis sand subsequent degradation of alfalfa hay fiber by mixed rumen microorganism invitro. Anim. Feed Sci.Technol. 88: 153-170.

Ochoa G. J. R. (1995). Técnicas electroquímicas para el tratamiento de efluentes industriales, Ingeniería Química. 4:125-131.

O' Neil C; Freda R. H; Dennis L. H; Niddia D. L; Helena M. P; Wouter D; (1999). Colour textile effluents-sources, measurements, discharge contents an simulation: a review. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 74 (11), 1009e.

Pagga U; Brown DH (1986). The degradation of dyestuffs, part II. Behavior of the dyestuffs in aerobic biodegradation test. Chemosphere 15:479-491.

Park YS; Kang SW, Lee JS, Hongsi, Kim SW (2002) Xilanaseproduction in solid state fermentationby *Aspergillus niger*mutant using statistical experimental designs. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58: 762-766.

Pereira E; Regina L. (2001). Decolorizatiion of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus ostreatus*. Enzyme and Microbial Technology. 29: 473-477.

Pérez J., Muñoz-Dorado J., de la Rubia R.T., Martínez J. (2002) Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. Int. Microbiol 5, 53-63.

Pierce J; (1994). Colour in textile effluents – the origins of the problem. J. Soc. Dyers Colourists 110:131-134.

Reddy C A; Fommey L. (1978). Lignin chemistry and structure: a brief review. Dev. Ind. Microbiol. 19: 51-61.

Reife A; Freeman H. S. (1996). Environmental chemistry of dyes and pigments. New York, John Wiley & Sons, Inc.

Robinson T; Mc Mullan G; Marchant R; Nigam P. (2001). Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresource Technology*. 77:247-255.

Robbinson W. J; y Hervey, A. (1960). Light and the development of *Poria ambigua*. *Mycologia* 52:231-247.

Rodríguez E., Pickard M.A., Vazquez Duhalrt. (1998). Industrial dye decolorization by laccase from ligninolytic fungi. *Curr. Microbiol.* 38: p. 27–32.

Rodríguez S; Toca-Herrera J. L. (2006). Lacasses in the textile industry. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. 1(4): 117-122.

Ruckenstein E y Wang X-B. (1994). Production of lignin peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on porous poly. (styrene-divinylbenzene)carrier and its application to the degrading of 2-chlorophenol. *Biotechnol Bioeng* 44:79–86.

Ruiz J. E; (2010). “Construcción y Monitoreo de Variables de un Prototipo para el Tratamiento Biológico de un Efluente con Colorante Naranja II, Mediante el Hongo *Trametes versicolor*”, extraído de <http://www.cenidet.edu.mx/subaca/web-mktr/submenus/investigación/tesis>.

Russ R; Rau R; Stolz A. (2000). The function of cytoplasmic flavin reductases in the reduction of azo dyes by bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*. 66:1429-1434.

Schwarze F, Engels J y Mattheck C. 2000. Fundamental aspects. In *Fungal strategies of wood decay in trees*. Springer. 5-31.

Shah V., Nerud F. (2002). Lignin degrading system of white–rot fungi and its exploitation for dye decolorization. *Can. J. Microbiol.* 48: p. 857–870.

Shimada M., Higuchi T. (1983). Recent advances in lignin biodegradation research. En: *Recent advances in lignin biodegradation research*. T. Higuchi, H. M. Chang y T. K. Kirk (Eds.), Uni Publishers. Tokio, pp 195-208.

Stevenson, I. 1965. Biochemistry of soil. En: Chemistry of the soil. Bear, F. E. (Ed.). Reinhold Publishing Corporation. New York. Pp.; 242–291.

Slokar M; Le Marechal, A. M. (1997). Methods of decoloration of textile wastewaters, Dyes Pigments. 37:335-356.

Stryer L; Berg M; Tymoczko J. (2003). Bioquímica Quinta Edición, EDITORIAL REVERTE, S.A. pp. 189-193.

Spiker J. K; Crawford DL, Crawford R. L. (1992). Influence of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) concentration on the degradation of TNT in explosive contaminated soil by white rot fungus. Appl Environ Microbiol 58:3199–3202.

Sumanthi S; Manju B. S. (2000). Uptake of reactive textile dyes by *Aspergillus foetidus* Enzyme Microbiol Technol.; 27, 347-355.

Takada S; Nakamura M, Matsueda T, Kondo R, Sakai K (1996). Degradation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans by the white rot fungus *Phanerochaete sordid* YK-624. Appl Environ Microbiol 62:4323–4328.

Thorn G. R., Reddy, C. A., D. Harris, and Paul E. A. (1996). Isolation of Saprophytic Basidiomycetes from Soil. Appl. Environ. Microbiol. 62, 4288-4292.

Thurston, C. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140:19–26.

Tien M., Kirk, T. K. (1984). Lignin degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:2280-2284.

Tlecuitl-Beristain S, Sánchez C, Loera O, Robson GD y Díaz-Godínez G. (2008). Laccases of *Pleurotus ostreatus* observed at different phases of its growth in submerged fermentation: production of a novel laccase isoform. Mycological Research 112:1080-1084.

Trutman E; Edward Arnold. Gran Bretaña, (1990). Dyeing and chemical technology of textiles fibers, Griffin London. 323-338.

Verma I; (1976). Toxicity of distillery waste to *Puntius sophore* (Ham) and *Mystivittatus* (Bloch) (Piscu Cyprinidial Bagridal). Part 3 Bioassay studies and TLm determination. *Acta Hydrochimica et hydrobiologica* 4:547-550.

Wesenberg D., Kryahides I., Agathos N.S.(2003). White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnol. Adv.* 22: p. 161.

Yadav J. S; Quensen JF, Tiedje JM, Reddy CA (1995). Degradation of polychlorinated biphenyl mixtures (Aroclors 1242, 1254, and 1260) by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* as evidenced by congener-specific analysis. *Appl Environ Microbiol* 61:2560–2565

Young L., Yu J., (1997). Ligninase-catalysed decolorization of synthetic dyes. *Water Res.* 31 (5), 1187–1193.

Zabel R. A; Morrel J. J. (1992). *Wood Microbiology*. Academic Press, San Diego. 476 pp.

Zollinger H; (1991). *Color chemistry – syntheses properties and applications of organic dyes and pigments*. VCH Publications, New York. N. Y.

Apendice A1 Medios.

MSLFC. Medio solido limitado en fuente de carbono. Por L.

Colorante industrial. 150 mg (500 ppm).
20 g de agar.

MSAFC. Medio solido adicionado en fuente de carbono. Por L.

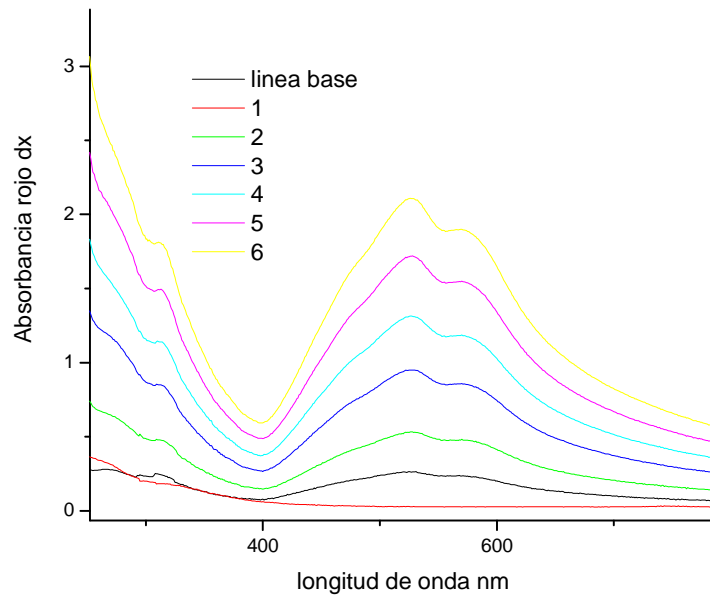
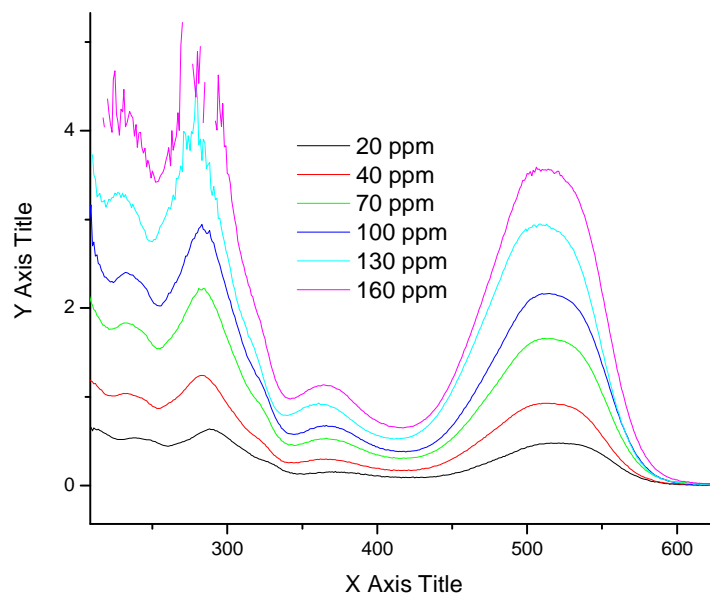
20 g de agar.
3.5 g de extracto de malta.
10 g de almidón.
150 mg de colorante

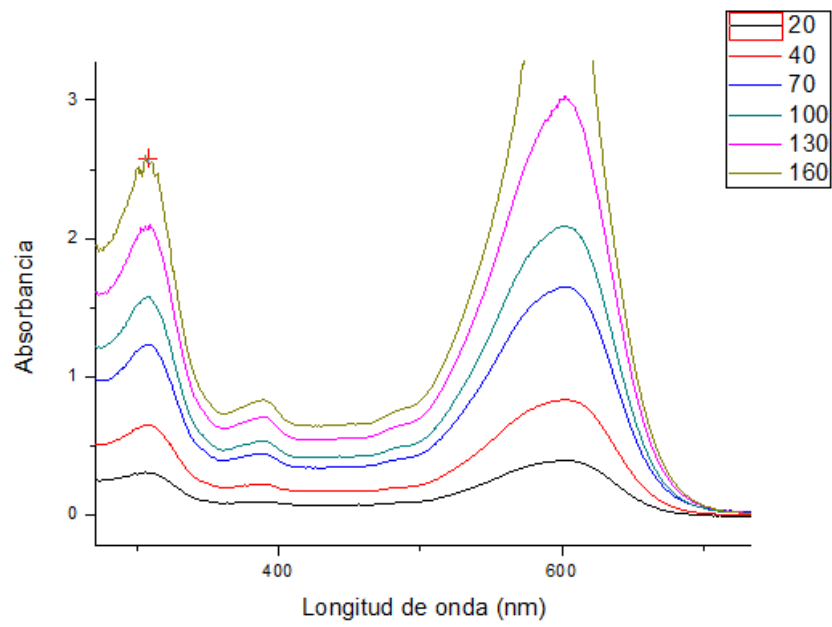
MLLFC. Medio líquido limitado en fuente de carbono. Por L.

d- glucosa. 3 g.
tartrato di amonio. 0.66 g.
MgSO₄. 7H₂O, 0.15g.
CaCl₂. 2H₂O, 30mg.
FeSO₄.7H₂O, 5.55mg.
H₃PO₄ (2N), 3.27ml.
150 mg/L de colorante.

Apendice A2 Perfil de colorantes en espectrofotometro uv (evolución 600).

MICRO L		
1	20 PPM	26.6
2	40 PPM	53.3
3	70 PPM	93.3
4	100 PPM	133.3
5	130 PPM	173.3
6	160 PPM	213.3

ROJO DIANIX:**INDIGO:**

AZUL REMAZOL.

Apendice A1 Medios.

MSLFC. Medio solido limitado en fuente de carbono. Por L.

Colorante industrial. 150 mg (500 ppm).

20 g de agar.

MSAFC. Medio solido adicionado en fuente de carbono. Por L.

20 g de agar.

3.5 g de extracto de malta.

10 g de almidón.

150 mg de colorante

MLLFC. Medio líquido limitado en fuente de carbono. Por L.

d- glucosa. 3 g.

tartrato di amonio. 0.66 g.

MgSO₄. 7H₂O, 0.15g.

CaCl₂. 2H₂O, 30mg.

FeSO₄.7H₂O, 5.55mg.

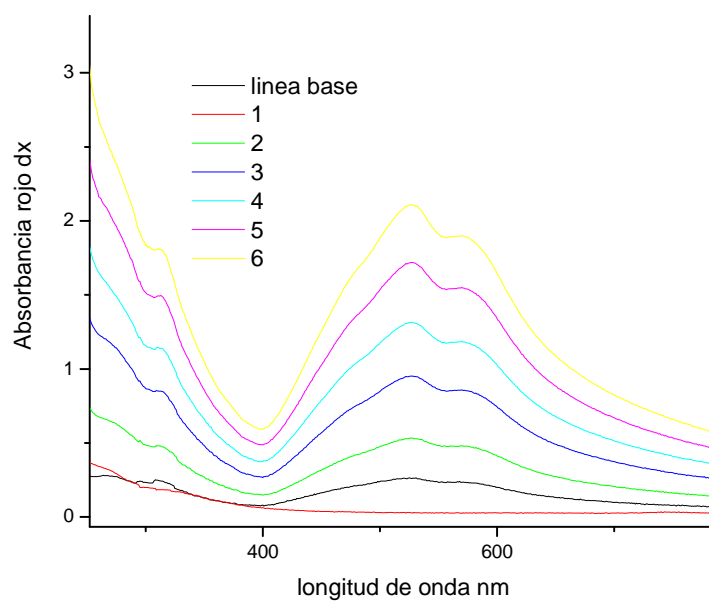
H₃PO₄ (2N), 3.27ml.

150 mg/L de colorante.

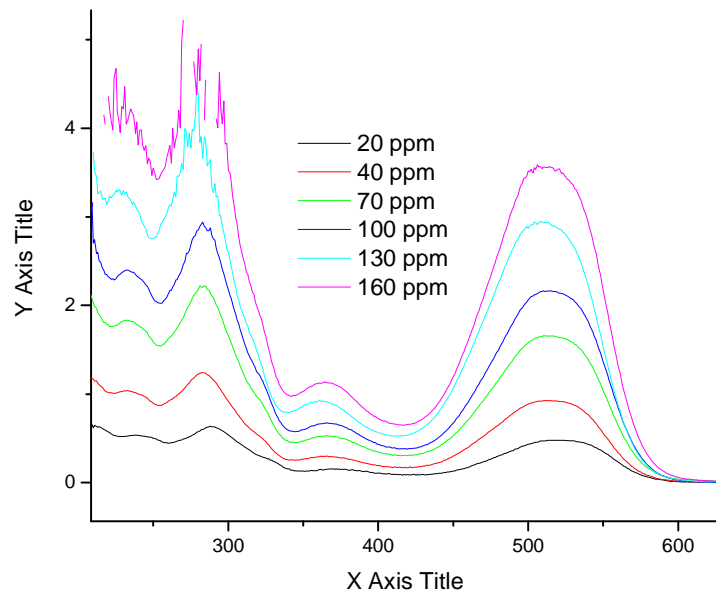
Apendice A2 Perfil de colorantes en espectrofotometro uv (evolución 600).

		MICRO L
1	20 PPM	26.6
2	40 PPM	53.3
3	70 PPM	93.3
4	100 PPM	133.3
5	130 PPM	173.3
6	160 PPM	213.3

ROJO DIANIX:



INDIGO:



AZUL REMAZOL.

