

**EVALUACIÓN DE INDUCTORES METÁLICOS Y CO-SUSTRATOS PARA LA  
REMOCION DE NEGRO REACTIVO 5 EMPLEANDO *Pleurotus ostreatus*  
INMOVILIZADO EN FIQUE.**



PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

**NATALY MORENO SANDOVAL**

**XIMENA ALEXANDRA OSPINA VELANDIA**

**TRABAJO DE GRADO**

**Presentado como requisito parcial**

**Para optar el título de**

**Microbiólogo Industrial**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**CARRERA DE MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL**

**Bogotá, D.C.**

**28 Noviembre de 2008**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por Sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no Contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

**EVALUACIÓN DE INDUCTORES METÁLICOS Y CO-SUSTRATOS PARA LA  
REMOCION DE NEGRO REACTIVO 5 EMPLEANDO *Pleurotus ostreatus*  
INMOVILIZADO EN FIQUE.**

**ESTUDIANTES**

**NATALY MORENO SANDOVAL**

**XIMENA ALEXANDRA OSPINA VELANDIA**

**APROBADO**

---

**Aura Marina Pedroza Ph.D.  
Bacterióloga  
Directora**

---

**Ingrid Johanna Puentes  
Microbióloga Industrial  
CoDirectora**

---

**Ivonne Gutiérrez  
Bacterióloga  
Jurado**

---

**Laura Catalina Castillo  
Microbióloga Industrial  
Jurado**

**EVALUACIÓN DE INDUCTORES METÁLICOS Y CO-SUSTRATOS PARA LA  
REMOCION DE NEGRO REACTIVO 5 EMPLEANDO *Pleurotus ostreatus*  
INMOVILIZADO EN FIQUE.**

**ESTUDIANTES**

**NATALY MORENO SANDOVAL**

**XIMENA ALEXANDRA OSPINA VELANDIA**

**APROBADO**

---

**Dra. Ingrid Schuler**  
**Biologa Ph.D**  
**Decana Académica Facultad de ciencias**

---

**Dra. Janeth Arias Palacios Msc.**  
**Bacterióloga**  
**Directora carrera de Microbiología**

## DEDICATORIA

*"Llegar hasta este punto en mi vida fue en un principio gracias a Dios, al apoyo incondicional y a las enseñanzas diarias de mis padres Lilia y Gabriel, quienes con sus esfuerzos y constancia estuvieron siempre allí riendo conmigo y dándome una voz de aliento en aquellos momentos difíciles, a mis hermanos Gabriel y Jessica que son mis cómplices por entenderme en todo momento, a mis dos angelitos de la guarda por nunca desampararme, a Andrés el amor de mi vida por brindarme su amor sincero y llenar mi vida de tantas alegrías. Finalmente a mis amigos, especialmente a Xime por tener su amistad incondicional y patrocinar cuanta idea loca se me ocurría".*

**Nataly**

*"A Dios por permitirme llegar hasta aquí y ser la mujer que soy.  
A mis padres Leonor y Miguel por sus enseñanzas, consejos, esfuerzo y gran compromiso en todo el transcurso de mi carrera  
A mis hermanas Angela y Laura por su apoyo incondicional.  
A Camilo por acompañarme durante todo este proceso y ser mi apoyo, además a mi tía Gilma por sus consejos y apoyo y a mi amiga Nataly por su tolerancia y escucha".*

**Ximena Alexandra**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la vicerrectoría académica por permitir que este trabajo hiciera parte del proyecto de investigación financiado por la oficina de fomento a la investigación identificado con el código 00002730. Titulado “Hongos podredumbre blanca y fotocátalisis nano estructurada con TiO<sub>2</sub> como alternativas para la decoloración del negro reactivo cinco (5)”.

A la Doctora Aura Marina Pedroza por sus enseñanzas y dedicación.

A la Microbióloga Johanna Puentes por su orientación y apoyo.

A Maria Fernanda Rojas por su gran colaboración durante todo este trabajo.

A nuestros compañeros de laboratorio por su apoyo y comprensión.

## TABLA DE CONTENIDOS

		Pág.
	ÍNDICE DE TABLAS	ix
	ÍNDICE DE FIGURAS	x
	Resumen	xii
1.	Introducción	13
2.	Marco teórico y revisión de literatura	15
2.1	Colorantes	15
2.1.2	Clasificación de los colorantes sintéticos	15
2.2	Colorantes tipo Azo	17
2.2.1	Negro Reactivo 5	18
2.2.1.1	Toxicología del Negro Reactivo 5	18
2.3	Efluentes textiles	19
2.4	Legislación ambiental	20
2.5	Tratamiento de Efluentes textiles	21
2.5.1	Tratamiento de colorantes tipo azo	21
2.5.1.1	Tratamiento biológico con Hongos de Podredumbre Blanca (HPB)	22
2.5.1.1.1	Hongos de la podredumbre blanca	22
2.5.1.1.1.1	<i>Pleurotus ostreatus</i>	23
2.5.2	Mecanismos implicados en la degradación de colorantes tipo azo	25
2.5.2.1	Enzimas involucradas en la degradación de azo-colorantes	25
2.5.2.1.1	Lacasas	25
2.5.2.1.2	Manganeso peroxidasas	27
2.5.2.1.3	Lignina peroxidasas	28
2.6	Remoción biológica del negro reactivo 5 con hongos de la podredumbre blanca	30
2.7	Inductores de la actividad enzimática de los hongos de la podredumbre blanca	31
2.7.1	Sulfato de Cobre	31
2.7.2	Sulfato de Manganeso	32
2.8	Efecto de la adición de co- sustratos	33
2.8.1	Almidón	33
2.8.2	Celulosa	35
2.8.3	Quinoa	35
2.9	Inmovilización de hongos de la podredumbre blanca para tratamiento de aguas contaminadas con colorantes	36
2.9.1	Tipos de soportes	37
2.9.1.1	Fique	37
2.9.1.1.2	Caracterización de la planta de fique	37
2.9.1.1.3	Clasificación taxonómica	38
2.9.1.4	Composición del fique	38
3.	Formulación de problema y justificación	40
3.1	Formulación del problema	40
3.2	Justificación	41
4.	Objetivos	43
4.1	Objetivo general	43
4.2	Objetivos específicos	43
5.	Hipótesis	44
6.	Materiales y métodos	45
6.1	Microorganismos	46
6.2	Desarrollo del protocolo de inmovilización	46
6.3	Selección del protocolo de inmovilización	46
6.3.1	Inmovilización utilizando discos de agar con hongo crecido	46
6.3.2	Inmovilización utilizando biomasa pelletizada	46
6.4	Caracterización del colorante azo negro reactivo 5 (NR5)	47
6.4.1.	Curva de calibración	47

	<b>Pág.</b>
<b>6.5</b>	Evaluación de inductores metálicos y su efecto sobre la capacidad de decoloración y actividad enzimática <b>47</b>
<b>6.6</b>	Selección del mejor co sustrato para la actividad enzimática de <i>Pleurotus ostreatus</i> en la decoloración de negro reactivo 5 <b>49</b>
<b>6.7</b>	Curvas de remoción de colorante negro reactivo 5 con las concentraciones de inductores metálicos y co sustratos óptimas. <b>49</b>
<b>6.8</b>	Métodos preparativos <b>50</b>
<b>6.8.1</b>	Determinación de peso húmedo <b>50</b>
<b>6.8.1.1</b>	Biomasa libre <b>50</b>
<b>6.8.1.2</b>	Biomasa inmovilizada <b>50</b>
<b>6.8.1.3</b>	Biomasa resultante de los ensayos realizados <b>50</b>
<b>6.8.2</b>	Determinación de Peso seco <b>51</b>
<b>6.8.2.1</b>	Biomasa libre <b>51</b>
<b>6.8.2.2</b>	Biomasa inmovilizada <b>51</b>
<b>6.8.2.3</b>	Biomasa inmovilizada resultante de cada ensayo <b>51</b>
<b>6.9</b>	Técnicas analíticas empleadas durante el estudio <b>51</b>
<b>6.9.1</b>	Cuantificación de Glucosa <b>52</b>
<b>6.9.2</b>	Cuantificación de la actividad Lacasa <b>52</b>
<b>6.9.3</b>	Cuantificación de la actividad Manganese peroxidasa <b>52</b>
<b>6.9.4</b>	Cuantificación de la actividad Lignina peroxidasa <b>53</b>
<b>6.9.5</b>	Cuantificación de la actividad amilolítica <b>53</b>
<b>6.9.6</b>	Unidades de Color <b>53</b>
<b>6.9.7</b>	Espectro de absorción <b>54</b>
<b>6.9.8</b>	Microscopia electrónica de barrido <b>54</b>
<b>6.9.9</b>	Prueba de viabilidad cualitativa <b>54</b>
<b>6.9.10</b>	Análisis estadístico <b>54</b>
<b>7.</b>	Resultados y discusión <b>55</b>
<b>7.1</b>	Reactivación de las cepas fúngicas <b>55</b>
<b>7.1.2</b>	Selección del protocolo para inmovilización de biomasa fúngica sobre fique <b>57</b>
<b>7.2</b>	Evaluación de inductores metálicos y su efecto sobre la capacidad de decoloración y actividad enzimática <b>59</b>
<b>7.2.1</b>	Diseño factorial 2 <sup>2</sup> <b>59</b>
<b>7.2.2</b>	Actividad enzimática Lacasa <b>62</b>
<b>7.2.3</b>	Respuesta de la actividad MnP <b>64</b>
<b>7.2.4</b>	Respuesta de la LiP <b>67</b>
<b>7.3</b>	Selección de la fuente de carbono como co sustrato para la degradación de NR5 <b>69</b>
<b>7.4</b>	Curva de remoción a nivel de matraz <b>73</b>
<b>7.4.1</b>	Porcentaje de decoloración y concentración de NR5 <b>73</b>
<b>7.4.2</b>	Actividad enzimática ligninolítica tipo Lacasa, MnP y LiP <b>76</b>
<b>7.4.3</b>	Comportamiento del pH, actividad amilolítica y determinación de azúcares reductores totales (ART) <b>79</b>
<b>7.4.4</b>	Análisis del espectro UV- VIS del tratamiento biótico y abiótico <b>83</b>
<b>7.4.5</b>	Microscopia electrónica de barrido (SEM) del tratamiento biótico y abiótico <b>84</b>
<b>8.</b>	Conclusiones <b>87</b>
<b>9.</b>	Recomendaciones <b>88</b>
<b>10.</b>	Referencias bibliográficas <b>89</b>
<b>11.</b>	Anexos <b>103</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1.</b> Clases de colorantes de acuerdo a su aplicación	<b>16</b>
<b>Tabla 2.</b> Características del Negro Reactivo 5	<b>18</b>
<b>Tabla 3.</b> Composición de efluentes textiles	<b>19</b>
<b>Tabla 4.</b> Parámetros vertimientos a un cuerpo de agua	<b>20</b>
<b>Tabla 5.</b> Actividad enzimática de los hongos de podredumbre blanca	<b>29</b>
<b>Tabla 6.</b> Mecanismo enzimático de degradación	<b>35</b>
<b>Tabla 7.</b> Ventajas de las células inmovilizadas	<b>36</b>
<b>Tabla 8.</b> Estructura física de la hoja de fique	<b>38</b>
<b>Tabla 9.</b> Composición química de la hoja de fique	<b>38</b>
<b>Tabla 10.</b> Composición mineralógica del fique	<b>39</b>
<b>Tabla 11.</b> Parámetros y niveles evaluados en el diseño factorial	<b>48</b>
<b>Tabla 12.</b> Concentraciones empleadas de co sustratos	<b>49</b>
<b>Tabla 13.</b> Resultados Matriz factorial $2^2$	<b>67</b>
<b>Tabla 14.</b> Matriz fuentes de Carbono	<b>72</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Estructura química de colorantes tipo azo (A) Naranja ácido 7, (B) Naranja ácido 6, (C) Rojo Congo, (D) Amarillo disperso 3, (E) Amarillo ácido 6 (F) Azul directo 1	17
<b>Figura 2.</b> Estructura del Negro Reactivo 5	18
<b>Figura 3.</b> Cuerpo fructífero de <i>Pleurotus ostreatus</i>	24
<b>Figura 4.</b> Macroscópica <i>Pleurotus ostreatus</i>	24
<b>Figura 5.</b> Microscopía <i>Pleurotus ostreatus</i>	25
<b>Figura 6.</b> Mecanismo de acción de la lacasa	27
<b>Figura 7.</b> Ciclo catalítico de la Manganese peroxidasa	28
<b>Figura 8.</b> Ciclo catalítico de Lignino Peroxidasa	29
<b>Figura 9.</b> Posibles puntos de corte del Negro reactivo 5	30
<b>Figura 10.</b> Molécula de almidón	34
<b>Figura 11.</b> Degradación del almidón	34
<b>Figura 12.</b> Planta Agavaceae	37
<b>Figura 13.</b> Macroscopía. <b>(A)</b> <i>Trametes versicolor</i> , <b>(B)</b> <i>Pleurotus ostreatus</i>	56
<b>Figura 14.</b> Producción de melaninas <b>(A)</b> <i>Trametes versicolor</i> , <b>(B)</b> <i>Pleurotus ostreatus</i>	56
<b>Figura 15.</b> Microscopía: <b>(A)</b> <i>Trametes versicolor</i> , <b>(B)</b> <i>Pleurotus ostreatus</i>	56
<b>Figura 16.</b> Soporte sin colonizar	58
<b>Figura 17.</b> Soporte colonizado por <i>Pleurotus ostreatus</i>	58
<b>Figura 18.</b> Inmovilización con biomasa pelletizada (CCP) <b>(A)</b> Inicial <b>(B)</b> Final	59
<b>Figura 19.</b> Inmovilización con discos (CCD). <b>(A)</b> Inicial <b>(B)</b> Final	59
<b>Figura 20.</b> Respuesta de la decoloración frente a los inductores metálicos	60
<b>Figura 21.</b> Respuesta de la actividad lacasa frente a los inductores metálicos	61
<b>Figura 22.</b> Respuesta de la actividad MnP frente a los inductores metálicos	61
<b>Figura 23.</b> <b>(A)</b> Decoloración de NR5 durante 4 días utilizando combinación de inductores metálicos, <b>(B)</b> Controles	68
<b>Figura 24.</b> <b>(A)</b> Decoloración de NR5 durante 4 días utilizando niveles altos de fuentes de carbono, <b>(B)</b> Decoloración utilizando niveles bajos de fuentes de carbono	70
<b>Figura 25.</b> Comparación entre decoloración biótica y abiótica	73
<b>Figura 26.</b> Remoción presentada por el control abiótico durante 8 días	75
<b>Figura 27.</b> Cinética de remoción del NR5 durante 8 días	76
<b>Figura 28.</b> Microscopía electrónica de barrido de fique inmovilizado con <i>P. ostreatus</i> . <b>(A)</b> Hora 24 de tratamiento, magnificación 1000x <b>(B)</b> Séptimo día de tratamiento, magnificación 1000x	77
<b>Figura 29.</b> Comportamiento de las enzimas ligninolíticas	78
<b>Figura 30.</b> Comportamiento de la actividad amilolítica, pH y Azúcares residuales durante la cinética de remoción	81
<b>Figura 31.</b> Espectro de absorción UV-VIS. <b>(A)</b> Tratamiento biológico <b>(B)</b> Tratamiento	84
<b>Figura 32.</b> Microscopía electrónica de barrido del fique sin colonizar <b>(A)</b> Magnificación de 100x <b>(B)</b> Magnificación de 1000x	85
<b>Figura 33.</b> Microscopía electrónica del bioportador conformado por <i>Pleurotus ostreatus</i> . <b>(A)</b> Hora 18 de tratamiento, magnificación de 1000x <b>(B)</b> Cuarto día de tratamiento, magnificación de 1000x	86

<b>Figura 34.</b>	Siembra en agar nutritivo de dos hilos de fique	<b>104</b>
<b>Figura 35.</b>	Curva calibración del negro reactivo 5	<b>104</b>
<b>Figura 36.</b>	Curva de calibración de DNS utilizada durante la inducción por metales y co sustratos	<b>107</b>
<b>Figura 37.</b>	Curva de calibración de DNS utilizada durante la curva de Remoción	<b>107</b>
<b>Figura 38.</b>	SEM correspondiente a la hora cero de tratamiento (A) Magnitud 100x (B) Magnitud 1000x	<b>110</b>
<b>Figura 39.</b>	SEM correspondiente a la hora seis de tratamiento (A) Magnitud 100x (B) Magnitud 1000x	<b>110</b>
<b>Figura 40.</b>	SEM correspondiente a las 12 horas de tratamiento (A) Magnitud 100x (B) Magnitud 1000x	<b>111</b>
<b>Figura 41.</b>	SEM correspondiente a los 2 días de tratamiento (A) Magnitud 100x (B) Magnitud 1000x	<b>111</b>
<b>Figura 42.</b>	SEM correspondiente a los 8 días de tratamiento (A) Magnitud 100x (B) Magnitud 1000x	<b>112</b>
<b>Figura 43.</b>	Recuperación de <i>Pleurotus ostreatus</i> después del tratamiento para la remoción del NR5	<b>112</b>

## RESUMEN

Se evaluó la inducción de las enzimas ligninolíticas Lignino Peroxidasa (LiP), Lacasa y Manganeso Peroxidasa (MnP) de *Pleurotus ostreatus* inmovilizado en fique por adición de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) y sulfato de manganeso ( $\text{MnSO}_4$ ) y de un co sustrato buscando obtener una mayor remoción del Negro Reactivo 5 a 150 ppm.

En primera instancia, se estandarizó un protocolo de inmovilización en fique utilizando biomasa pelletizada logrando excelente colonización del hongo al cabo de 8 días. Este bioportador se empleo en un factorial  $2^2$  utilizando diferentes concentraciones de inductores metálicos, estableciendo que al adicionar 150  $\mu\text{M/L}$  de  $\text{CuSO}_4$  y 360  $\mu\text{M/L}$  de  $\text{MnSO}_4$  se obtenía una decoloración significativa ( $P < 0.0001$ ) (97%) con respecto a los demás tratamientos, además que la única enzima presentaba correlación positiva ( $P = 0.002$ ) en la decoloración con 23U/L fue Lacasa, mientras que la expresión de MnP y LiP mostro valores bajos de 0.92U/L y 2.8U/L respectivamente, ratificando que LiP no se indujo con la adición de inductores metálicos.

Luego los inductores metálicos escogidos se combinaron con una concentración máxima y mínima (2.0g/L 0.2g/L) de los diferentes co sustratos celulosa, quinua y almidón; este último a razón de 0.2g/L favoreció la decoloración en un 96% luego de 4 días de tratamiento con una actividad lacasa de 15.08 U/L y 15 Unidades amilolíticas; demostrado una interacción entre enzimas ligninolíticas y glicosilhidrolasas en la remoción del color. Posteriormente, se llevo a cabo la curva de remoción en erlenmeyers durante 8 días bajo los parámetros optimizados, en condiciones no estériles y a pH de 6,7; estableciéndose como tiempo de retención en reactor 24 horas con una decoloración de 97%.

Finalmente, se hizo un barrido UV-VIS el cual ratificó la molécula del NR5 fue degradada por acción enzimática, concluyéndose que con los parámetros optimizados se logro la biotransformación del colorante.

## 1.INTRODUCCIÓN

El proceso de elaboración de productos textiles consiste en el desarrollo de varias actividades operacionales secuenciales, en donde cada una utiliza diversas materias primas, como algodón, lana, fibras sintéticas, o mezclas de ellas, además de colorantes y aditivos (Neill *et al.*, 1999).

El volumen de agua empleada en los procesos textiles varía en forma considerable, dependiendo del proceso a realizar y de la maquinaria utilizada por la planta. Por ejemplo, en el teñido con colorantes dispersos, se utilizan entre 100 y 150 litros de agua por kilogramo de producto. En la tinción con colorantes reactivos, las cifras varían entre 125 y 170 litros por kilogramo de producto (Classweb, 2008 <on line>).

En general, las corrientes de agua residual provienen principalmente del desengomado (15 %), descruce y mercerizado (20 %) y del blanqueo, teñido y lavado (65 %). El mayor aporte de la carga orgánica proviene de la etapa del desengomado que aporta alrededor de 50 % del total del la DBO<sub>5</sub> (Neill *et al.*, 1999).

El impacto ambiental de estos efluentes líquidos es muy variado, debido a la diversidad de materias primas, reactivos y de métodos de producción. En los efluentes se pueden encontrar sales, almidón, peróxidos, EDTA, tensoactivos, enzimas, metales y colorantes (Classweb, 2008 <on line>) como el negro reactivo 5 (Tetrasodio – 4 – amino – 5 – hidroxí – 3, 6 (bis (4 - (2 - (Sulfonatooxi ) Etilsulfonil)fenil)Azo)-Naftaleno-2,7-disulfonato) que con frecuencia se encuentra en efluentes textileros. Se caracteriza por ser un di-azo sulfónico que posee dos grupos –N=N– responsables de proporcionar color; siendo esta una molécula compleja de degradar por la presencia de dos nitrógenos unidos a un anillo aromático (Manzano *et al.*, 2004).

Los colorantes tienen gran persistencia en el ambiente, y los métodos de eliminación clásicos no son útiles debido a que oxidaciones o reducciones parciales pueden generar productos secundarios altamente tóxicos. Una gran proporción de los colorantes no son directamente tóxicos para los organismos vivos; sin embargo, la fuerte coloración que imparten a los medios de descarga puede llegar a suprimir los procesos fotosintéticos en los cursos de agua, a largo plazo pueden agotar el oxígeno disuelto en la misma, por lo que su presencia debe ser controlada (Sankar *et al.*, 1999).

Estos problemas han generado gran preocupación pues son muchas las actividades del hombre que producen desecho, que lentamente han ido alterando el equilibrio ecológico y agotando los recursos naturales, la preocupación aumenta al saber que los colorantes

de tipo azo son el grupo más extenso de todos los colorantes orgánicos disponibles en el mercado (Neill *et al.*, 1999).

Actualmente para disminuir ó controlar los efectos adversos sobre el medio ambiente se está haciendo uso de herramientas biotecnológicas entre las cuales se encuentran los hongos Basidiomicetos que ofrecen resultados económicos y muy prometedores al sustituir algunos procesos tradicionales. Estos hongos se caracterizan por poseer un sistema enzimático ligninolítico no específico, compuesto por Manganese Peroxidasa, Lignino Peroxidasa y Lacasa, enzimas capaces de degradar compuestos aromáticos contaminantes con diferentes estructuras, como plaguicidas, hidrocarburos policíclicos aromáticos (PHA), dioxinas, compuestos clorados y colorantes (Manzano *et al.*, 2004).

Las investigaciones en la remoción de colorantes azo se han enfocado no solo en remover el color, sino también en disminuir la toxicidad de los colorantes azo y los productos intermediarios que se producen durante su degradación. (Manzano *et al.*, 2004).

Teniendo en cuenta las anteriores razones en este estudio se evaluó la capacidad de remoción del colorante negro reactivo 5 por parte de *Pleurotus ostreatus* inmovilizado en un soporte no inerte conocido como fique. Se consideró utilizar una técnica de inmovilización debido a que se puede obtener una mayor remoción del colorante porque se presenta un mejor contacto entre el hongo y el agua residual y la recuperación del material vivo es más fácil, asimismo aumenta la estabilidad frente a cambios en temperatura, pH y reactivos. Además utilizar fique como soporte hace que se aumente las condiciones ligninolíticas ayudando a la activación de las enzimas implicadas en la decoloración.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de inductores metálicos y co sustratos sobre la capacidad de remoción del negro reactivo 5 empleando a *Pleurotus ostreatus* inmovilizado en fique.

## 2. MARCO TEORICO

### 2.1. Colorantes

Los colorantes son sustancias orgánicas fluorescentes o de color intenso que imparten color a una sustancia incolora, o bien, a un sustrato por medio de una absorción selectiva de luz (Moeller and Garzón, 2003).

El color depende de los grupos cromóforos, que son la parte visible de la molécula coloreada, responsable de la absorción de luz en un determinado rango de longitud de onda, la afinidad por las fibras es dada por el grupo auxocrómico, conformado por un grupo de átomos ligados al cromóforo que modifica la habilidad de este para absorber la luz (Biology-online, 2008<on line>), y por último la solubilidad en agua o solventes está dada por iones  $-\text{SO}_3-\text{Na}^+$ ;  $-\text{NH}_3^+ \text{Cl}^-$ ;  $-\text{SO}_2-\text{NH}_2^+$ ;  $-\text{O}-\text{Na}^+$  (Classweb, 2008 <on line>).

Los colorantes sintéticos son extensamente usados en industrias textiles, papeleras, farmacéuticas, alimentarias, cosméticas, entre otras. Aproximadamente 10.000 diferentes colorantes y pigmentos son utilizados industrialmente y cerca de 0.7 millones de toneladas son producidas anualmente, de las cuales un 70% corresponde a colorantes de tipo azo (Padmavathy *et al.*, 2003). Estas sustancias son muy persistentes en aguas residuales papeleras, textiles y cosméticas, principalmente porque son muy solubles en agua y por la resistencia a la degradación, la cual está determinada por la complejidad en la estructura del mismo (Quezada *et al.*, 1999; Van der Zee *et al.*, 1999; Bishop, 1996).

Representando esto un problema muy grave de contaminación, ya que aún después de un tratamiento convencional (químico o físico) estos algunas veces no disminuyen y pueden sufrir diferentes reacciones como alteraciones en la estructura química que genera nuevos componentes xenobióticos que pueden ser más o menos tóxicos que el componente principal (Moeller and Garzón, 2003).

#### 2.1.2. Clasificación de los colorantes sintéticos

En el mercado se encuentran aproximadamente 80000 colorantes que difieren en su composición, propiedades químicas y físicas. Su clasificación se basa en la estructura o composición química del colorante, esta clasificación agrupa a los compuestos según la naturaleza del cromóforo de la molécula. Además, existe otra clasificación que toma en cuenta el uso y los materiales a los que están destinados. Este criterio se aplica para lo que se conoce como clasificación tintórea (Christie, 2001).

Según la constitución química del cromóforo, se pueden dividir en tres grandes grupos; Azoicos, Antraquinónicos y derivados del Trifenilmetano, también existen otros de tipo azínico y xanténico, poco importantes en número (Puente *et al.*, 1981).

Los colorantes antraquinónicos son tinturas mordientes, con diferentes compuestos que producen colores diferentes. Los colorantes trifenilmetánicos no son resistentes a la luz ni al lavado, excepto si se aplican sobre fibras acrílicas, son colorantes que tienen como mordiente el ácido tánico (Christie, 2001).

Según su disolución en soluciones acuosas pueden clasificarse en ácidos (aniónicos), básicos (catiónicos) y colorantes dispersos que no son iónicos (Sathiya *et al.*, 2006).

En la Tabla 1 se observan los principales tipos de colorantes según su aplicación y algunas de sus características más importantes.

**Tabla 1.** Clases de colorantes de acuerdo a su aplicación.

CLASE	CARACTERISTICAS	TEJIDOS SOBRE LOS QUE PUEDEN SER APLICADOS
<b>Ácidos</b>	Compuestos solubles en agua. En su mayoría contienen grupos ácido sulfónico (-SO <sub>3</sub> H) o carboxilo (-COOH)	Lana y seda
<b>Básicos</b>	Compuestos solubles en agua que forman especies catiónicas que contienen grupos aminos (-NH <sub>3</sub> )	Acrílicos, nylon y poliéster
<b>Directos</b>	Compuestos solubles en agua. Se aplican en presencia de electrolitos adicionales (cloruro sódico o sulfato sódico). Se une a la tela por interacciones tales como fuerzas de Van Der Waals y puentes de hidrogeno	Algodón y lino
<b>Dispersos</b>	Compuestos no iónicos insolubles en agua. Para teñir se aplican finamente dispersos en agua sobre fibras hidrofóbicas en las que quedan atrapados.	Nylon , poliéster y acrílicos
<b>Reactivos</b>	Reaccionan en presencia de electrolitos, con la fibra firmando enlaces covalentes. Poseen en su estructura grupos derivados de la triclorotriazina	Algodón, nylon y lana
<b>Colorantes de Tina</b>	Compuesto que en su forma oxidada son insolubles en agua y que al ser reducidos dan origen a una especie soluble que es usada para teñir	Algodón, lana
<b>Mordientes</b>	Compuestos que forman complejos con metales. La tela es tratada con una solución básica de metales que se precipitan sobre la tela como un hidróxido metálico	Lana y seda

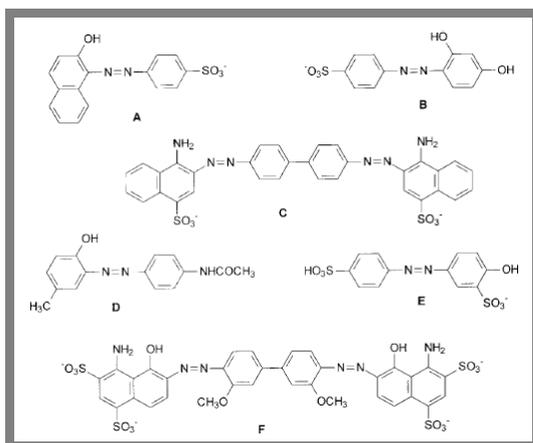
**Fuente.** (Fundación Polar, 2008 <on line>)

## 2.2. Colorantes tipo Azo

Los azocolorantes son los colorantes sintéticos más utilizados en el mercado aproximadamente 50% y se forman a partir de la anilina. La fórmula general de los azos presenta el grupo N=N en medio de los anillos aromáticos Ar- N=N -Ar. El doble enlace es la parte de la molécula del colorante que imparte el color al producto, este grupo funcional se denomina grupo cromóforo y puede estar presente una o varias veces dentro de la estructura molecular del compuesto (Moeller and Garzón, 2003).

Los colorantes de tipo azo son particularmente difíciles de degradar para su tratamiento se han utilizado varias metodologías tales como adsorción, neutralización, coagulación, degradación química, degradación fotocatalítica, ozonación, filtración por membranas e intercambio iónico. A pesar de que estos procesos físicos y químicos producen efluentes de buena calidad, en la mayoría de las ocasiones generan un alto costo mientras que el tratamiento biológico resulta más económico (Zille *et al.*, 2005).

De la gran gama de colorantes azo sintéticos, se distinguen cuatro familias: los mono-azoicos, con un grupo azo; los di-azoicos, con dos grupos azo; los tri-azoicos, con tres grupos azo y los poli-azoicos, con cuatro o más grupos azo (Figura 1). Asimismo, según su estructura molecular y propiedades específicas pueden ser colorantes azo ácidos, básicos, dispersos, directos y reactivos (Christie, 2001). La aplicación de este tipo de colorantes es muy variada y depende del proceso de teñido o estampado, pero en la mayoría de los casos se requiere aplicar calor (Moeller and Garzón, 2003).



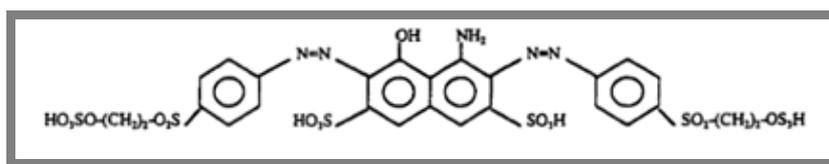
**Figura 1.** Estructura química de colorantes tipo azo (A) Naranja ácido 7, (B) Naranja ácido 6, (C) Rojo Congo, (D) Amarillo disperso 3, (E) Amarillo ácido 6 (F) Azul directo 1

**Fuente.** (Stolz., 2001).

Estos colorantes son deficientes en el contenido de carbono por ello la decoloración solo es posible bajo condiciones de cometabolismo (Quiroz, 2002). Son generalmente persistentes en aerobiosis mientras que en anaerobiosis, este tipo de colorantes sufren una reducción produciendo aminas aromáticas, las cuales son recalcitrantes y requieren condiciones aeróbicas para su degradación y una posible mineralización (Moeller and Garzón, 2003).

### 2.2.1. Negro Reactivo 5

El colorante Negro reactivo 5 (NR5) (Tetrasodio – 4 – amino – 5 – hidroxi – 3, 6 (Bis (4 - (2 - (Sulfonatooxi) Etilsulfonil) Fenil) Azo)-Naftaleno-2,7-disulfonato) es un di-azo sulfónico compuesto por un complejo auxocrómo-cromóforo, constituido por el grupo azo y anillos aromáticos unidos a este, esta interacción es la que determina la cantidad de luz absorbida y la intensidad del color (Figura 2). Por otro lado, el colorante presenta en su estructura un grupo sulfato de sodio (+NaSO<sub>3</sub>), el cual determina la solubilidad del compuesto (Castillo and Ortega, 2007). Los parámetros característicos del colorante se encuentran en la Tabla 2.



**Figura 2.** Estructura del Negro Reactivo 5.

**Fuente.** (Lorenzo *et al.*, 2005).

**Tabla 2.** Características del Negro Reactivo 5.

Nombre Genérico	Reactivo Negro 5
Porcentaje de Pureza	66,00
Apoyo	Vinyl sulfónico
Grupo Cromóforo	Azo
λ max	598nm
Peso Molecular	991.8 g/mol

**Fuente.** (Castillo and Ortega, 2007)

#### 2.2.1.1. Toxicología del Negro Reactivo 5

En estudios realizados se ha demostrado que la Dosis letal 50 (LD50) excede 14.000 mg/Kg de peso del cuerpo, además el colorante es irritante al contacto con la piel pero no con los ojos. Tiene un bajo potencial tóxico en organismos acuáticos (peces LD50 100 – 500 mg/L; bacteria LD50 > 2.000 mg/L), al igual que con el colorante hidrolizado (Peces LC50 > 500 mg/L; *Daphnia magna* LC50 (48h) > 128mg/L) (Hunger and Jung,

1991). La unión azo es la porción más inestable de una molécula del colorante azo y puede romperse fácilmente en organismos mamíferos por actividad enzimática, incluyendo al hombre. La unión azo puede ser reducida y dividida, resultando en la generación de dos partes de la molécula. Después de la división de la unión azo, las aminas aromáticas son absorbidas en el intestino y excretadas en la orina (Brown y DeVito, 1993).

### 2.3. Efluentes textiles

Las aguas residuales que se producen en la industria textil de fibras naturales se caracterizan generalmente por una gran variabilidad de caudal, composición, carga contaminante y color (Tabla 3). Este último fue el primer contaminante en ser reconocido en el agua, afectando el valor estético de ésta, así como también la transparencia, la disolución del oxígeno y otros gases en lagos, ríos y otros cuerpos hídricos. Generalmente es más importante la remoción de color que de sustancias orgánicas incoloras. No obstante, se ha demostrado en recientes estudios que varios colorantes reactivos no son degradados en procesos de tratamiento aeróbico convencional (Banat *et al.*, 1996).

La respuesta de los colorantes frente a los tratamientos de depuración biológicos no es uniforme, son insolubles en agua, sulfurosos, azoicos, etc., se eliminan primero en una etapa de decantación y los más solubles pasan al tratamiento biológico. El problema de su eliminación se acentúa también por su baja fijación en la fibra (del orden del 70%, mientras que las restantes clases de colorantes alcanzan más del 90%). Para la reducción del color después de un tratamiento biológico, se requiere la aplicación posterior de algún tratamiento terciario, que generalmente tiene un costo elevado (Zanon *et al.*, 2005).

**Tabla 3.** Composición de efluentes textiles.

PARÁMETROS	VALOR
pH	11,13
SST, mg/L	240
ST, mg/L	3950
SDT, mg/L	3710
*DQO <sub>s</sub> , mg/L	1267
*DQO <sub>t</sub> , mg/L	1341
DBO <sub>5</sub> , mg/L	450
Sulfatos, mg/L	72,44
Nitrógeno amoniacal mg/L	2,24
Nitrógeno total , mg/L	50,12

Grasas y aceites, mg/L	0,1922
---------------------------	--------

**Fuente.** (Bishop *et al.*, 1996).

\*DQO<sub>s</sub>: DQO de salida.

\*DQO<sub>t</sub>: DQO por tonelada de SST.

#### 2.4. Legislación ambiental

El uso del agua y los residuos líquidos así como las normas para su vertimiento en cuerpos acuáticos y los rangos permitidos de pH, temperatura, material flotante, grasas y aceites, sólidos suspendidos y límites aceptados de metales se encuentran en el decreto 1594 de 1984.

En la Tabla 4 se encuentran los parámetros que debe cumplir todo vertimiento a un cuerpo de agua (con o sin presencia de biota) según lo expuesto en el artículo 72 del presente decreto, excepto las unidades de color (artículo 38) las cuales son un requisito al momento de destinar el agua para el consumo humano y doméstico (fabricación o procesamiento de alimentos en general, preparación de alimentos para consumo inmediato, fabricación de medicamentos, higiene personal, limpieza de elementos, materiales o utensilios).

**Tabla 4.** Parámetros vertimientos a un cuerpo de agua

Referencia	Valor
pH	5-9
Temperatura	<40°C
Ácidos, bases o soluciones que pueden causar explosión	Ausente
Sólidos sedimentables	10ml/L
Sustancias solubles en hexano	100mg/L
Sólidos suspendidos para desecho domésticos e industriales	Remoción >80%
Demanda Bioquímica de Oxígeno	Remoción >80% promedio horario
*Unidades de color	75

**Fuente.** (Decreto 1594, 1984)

\*Criterio de calidad admisible para la destinación del recurso humano y doméstico e indica que para su potabilización se requiere solamente tratamiento convencional.

Otra legislación que se enfoca en la industria textil es la propuesta por la EPA (*U.S. Environmental Protection Agency*) en el acta (*Resource Conservation and Recovery Act*) 24, esta formula los cuidados a nivel ambiental que deben tener las actividades comerciales e industriales, se muestra cual es el ciclo de vida de los residuos, para que el sector industrial conozca cuales son los residuos que está produciendo, en que cantidades los produce mensualmente, y cuál sería la línea adecuada de manejo. De esta manera se garantiza que se cumpla de forma eficaz y clara los requisitos a nivel ambiental que determina el gobierno (EPA, 2007<on line>).

La Unión Europea es bastante rigurosa en la utilización de colorantes azo debido a su efecto cancerígeno en el ser humano; por esto en la directiva 2002/61/EC del Parlamento Europeo del 19 de julio del 2002 se da una lista de 43 aminas y compuestos aromáticos producidos a partir de la degradación de azo colorante, prohibiéndose la comercialización y el uso de dichos colorantes que por su degradación produzcan alguna de estas aminas o compuestos aromático: bifenil-4-ilamina-4-aminobifenil xenilamina, bencidina, 4-cloro-o-toluidina, 2- naftilamina, o-aminoazotolueno, 4-amino 2',3dimetilazobenceno, 4-o-tolilazoo-toluidina, 5-nitro-o-toluidina, 4-cloroanilina, entre otros (Fernández and Henao, 2007).

## **2.5. Tratamiento de Efluentes textiles**

### **2.5.1. Tratamiento de colorantes tipo azo**

Para la remoción de los colorantes en los efluentes de agua se han planteado diversas técnicas las cuales abarcan desde tratamientos fisicoquímicos como son: Filtración con membrana, coagulación, floculación, precipitación, flotación, absorción, intercambio iónico, extracción por par iónico, mineralización ultrasónica, electrólisis, oxidación fotocatalítica y reducción química hasta técnicas biológicas que incluyen la biosorción, biodegradación bacteriana y fúngica en tratamientos aerobios y anaerobios, donde la materia orgánica es degradada a dióxido de carbono, agua o hidrácidos, óxido o sales minerales de otros elementos existentes, que se da por la acción de los microorganismos degradadores de los ecosistemas (Gutiérrez, 2007).

A pesar de que los procesos físicos y químicos producen efluentes de buena calidad, en la mayoría de las ocasiones generan un alto costo mientras que el tratamiento biológico resulta más económico, debido a que se requiere materia prima menos costosa y se trabaja con recursos que en muchos casos resultan ser residuos de otras actividades (Moeller and Garzón, 2003).

### **2.5.1.1. Tratamiento biológico con Hongos de Podredumbre Blanca (HPB)**

Los microorganismos más empleados en la biorremediación de efluentes contaminados son los hongos de la podredumbre blanca inmovilizados en materiales no inertes (*Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor* y *Phanerochaete chrysosporium*) ya que ellos tienen la habilidad para degradar fibra. Según investigaciones dentro de las enzimas caracterizadas de los HPB se encuentran las de tipo oxidasas (lacasas y MnP); estas enzimas han sido utilizadas principalmente en el tratamiento de aguas residuales o productos recalcitrantes. La acción de estos hongos sobre los colorantes se basa en la no especificidad del sistema enzimático para despolimerizar y mineralizar la lignina (Moeller and Garzón, 2003).

Se ha encontrado que *Pleurotus ostreatus* utiliza la enzima Mn-peroxidasa (MnP), y otros hongos utilizan la lacasa y una aril-alcohol oxidasa productora de peróxido de hidrógeno (Guillen *et al*, 1998; Ha *et al*, 2001; Moeller and Garzón, 2003).

#### **2.5.1.1.1 Hongos de la podredumbre blanca (HPB)**

Son un grupo de microorganismos bastante heterogéneo, que tienen en común la capacidad de degradar la lignina y otros componentes de los árboles como la celulosa. Producen enzimas extracelulares que oxidan compuestos fenólicos incluyendo todos aquellos relacionados con lignina. La cantidad relativa de lignina y polisacáridos degradados y utilizados por estos hongos a través de sus enzimas varía al igual que el orden de ataque de ellas.

Normalmente los HPB atacan simultáneamente celulosa y lignina convirtiendo esta última hasta un 70 % en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O (Manzano *et al.*, 2004). Existen evidencias de que la energía requerida para la degradación de lignina es obtenida de fuentes accesibles como polisacáridos y azúcares de bajo peso molecular (Pinzón, 2004).

Dentro del sistema enzimático extracelular se encuentran las lacasas, manganeso peroxidasa, lignina peroxidasa y enzimas productoras de peróxido, metabolitos de bajo peso molecular y sistemas reductores, capaces de degradar compuestos tan complejos como la lignina. En la mayoría de los hongos se ha visto que la ligninólisis se produce durante el metabolismo secundario, es decir durante la limitación de nutrientes, lo que permite que el hongo solo sintetice y secrete agentes ligninolíticos que comiencen a fragmentar el polímero (Sathiya *et al.*, 2006).

Los HPB pueden actuar de manera individual aunque también pueden actuar sinérgicamente con hongos de la pudrición café u otros hongos en la degradación de lignina (Pinzón, 2004).

De todos estos hongos, solo un pequeño porcentaje ha sido estudiado y entre ellos se encuentran: *Bjerkandera adusta*, *Lenzites betulina*, *Coriolus hirsutus*, *Lentinula edodes*, *Merullinus tremellosus*, *Coryolopsis polyzona*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Chrysosporium pridnosum*, *Phlebia radiata*, *Dicromitus sacualens*, *Pleurotus ostreatus*, *Flavolus arcularius*, *Poria subacida*, *Flanonulina velutipes*, *Poliporus abientinus*, *Fomes lignosus*, *Pycnoporus cinnabarinus*, *Ganoderma valesiacum*, *Pycnoporus coccineus*, *Grifola frondosa*, *Stereum hirsutum*, *Himenochaete tabacina*, *Trametes cingulata*, *Hirschioporus abientinus*, *Trametes gibosa*, *Irpex lacteus* y *Trametes versicolor* (Pinzón, 2004).

#### **2.5.1.1.1. *Pleurotus ostreatus***

*Pleurotus ostreatus* es un hongo que pertenece a la clase Basidiomycete, orden Poriales y familia Lentinaceae (Instituto Nacional de Biodiversidad, 2008 <on line>). Su nombre deriva de su forma “de ostra”, llamado también vulgarmente “Pleuroto en forma de concha”, “seta de chopo”, “seta de ostra”, “orellana” o “pleuroto ostreado” (Zanón *et al.*, 2005).

Este microorganismo es un hongo saprófito y algunas veces parásito que crece principalmente sobre sustratos lignocelulósicos vivos o muertos, pobres en nutrientes y con bajos niveles de minerales y vitaminas. Se distribuye principalmente en zonas templadas y se le encuentra creciendo sobre árboles de los géneros *Aesculus*, *Betula*, *Fagus*, *Juglans*, *Populus*, *Salix*, etc. Este hongo fructifica durante el otoño e invierno a temperaturas de 15°C, aunque existen cepas comerciales que son menos afectadas por las temperaturas bajas y altas (Cisterna, 2003). Presenta las siguientes partes cuando fructifica:

- Sombrero: Carnoso, grande 8-15 cm, convexo al principio. Normalmente de color gris azulado a pizarra, virando a pardusco al marchitarse (Figura 3)
- Láminas: Decurrentes blancas o marfil.
- Pie: Normalmente lateral, corto o ausente, aterciopelado y de color blanco.
- Esporas: Cilíndricas (Milla, 2007).



**Figura 3.** Cuerpo fructífero de *Pleurotus ostreatus*  
(Cisterna, 2003).

Es una seta comestible muy apreciada y fácil de cultivar, ya que puede crecer en gran variedad de sustratos tales como: Trigo, arroz, avena, salvado, cebada, rastrojos de maíz, arvejas y tomate. Pulpas de manzana, peras y remolacha. Virutas, aserrines, papeles, cartones y pañales desechables (Cisterna, 2003).

En los últimos años se ha empleado ampliamente en biorremediación debido a que el sistema ligninolítico de este hongo está compuesto por enzimas oxidativas no específicas capaces de metabolizar y mineralizar hidrocarburos policíclicos aromáticos y colorantes artificiales causantes de contaminación ambiental en industrias textiles entre otros. Esta actividad parece estar relacionada a la producción de enzimas como manganeso peroxidasa [EC 1.11.1.7], lignino peroxidasa (E.C. 1.11.1.14) y lacasa [EC 1.10.3.2], que es una polifenol oxidasa capaz de oxidar polifenoles, fenoles sustituidos y diaminas (Gayosso *et al.*, 2004).

Macroscópicamente *Pleurotus ostreatus* presenta crecimiento micelial blanco algodonoso con abundante micelio aéreo y con formación de anillos desde el centro de la caja hacia su periferia (Fernández and Henao, 2007) (Figura 4).



**Figura 4.** Macroscópica *Pleurotus ostreatus*.  
**Fuente.** (Autores, 2008).

Microscópicamente este hongo presenta hifas hialinas septadas delgadas con formación de esporas de pequeño tamaño (Figura 5).



**Figura 5.** Microscopia *Pleurotus ostreatus*.

**Fuente.** (Fernández and Henao, 2007).

## **2.5.2. Mecanismos implicados en la degradación de colorantes tipo azo**

### **2.5.2.1. Enzimas involucradas en la degradación de azo-colorantes**

#### **2.5.2.1.1. Lacasas**

Las lacasas son enzimas que hacen parte del sistema enzimático ligninolítico producido por los hongos de podredumbre blanca. Es una fenol oxidasa con cobre que oxida anillos de lignina en ausencia de LiP. Estas enzimas extracelulares poseen un grupo N-glicosilato que presenta en su estructura dos monosacáridos: Manosa y N-acetilglucosamina; contiene además cadenas glicosídicas unidas a oxígeno y nitrógeno, cuya masa molecular aproximadamente se encuentra entre 60-390 kDa (Call, 1997).

Esta enzima requiere de peróxido de hidrógeno que oxida al ion hierro para aumentar el estado de oxidación en el cual la enzima es capaz de despolimerizar lignina y sus derivados para llevar a cabo su ciclo catalítico (Figura 6); además reduce el oxígeno a agua y simultáneamente realiza la oxidación de un electrón y muchos sustratos aromáticos. Al mismo tiempo cataliza la remoción de un átomo de hidrogeno por un grupo hidroxilo de metoxi sustituyendo orto y para difenoles. La lacasa es también capaz de oxidar otros sustratos como aminas aromáticas, coloca aldehídos y compuestos no fenólicos con radicales libres (Zille *et al.*, 2003).

Estructuralmente en el sitio activo la enzima posee cuatro átomos de cobre (como  $\text{Cu}^{2+}$  en el resto de la enzima) los cuales están distribuidos en tres sitios diferentes de su estructura (McGuirl and Dooley, 1999). El sitio cobre tipo 1 es el responsable del color azul intenso de la enzima con un máximo de absorbancia a 605 nm. El sitio cobre tipo 2 no exhibe señales de absorbancia en el visible, y en el sitio cobre tipo 3, se incorporan dos átomos de cobre en el centro activo, y es el responsable de la pequeña banda que se observa a 330 nm.

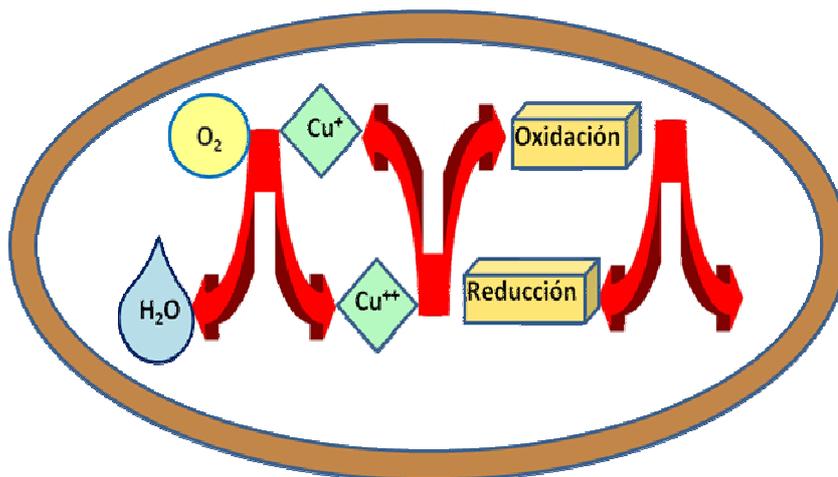
Por lo anteriormente planteado es que la enzima requiere cobre y oxígeno para oxidar fenoles, polifenoles, aminas aromáticas y diferentes sustratos no fenólicos, lo que permite que se lleve a cabo la polimerización, dipolimerización, metilación y/o dimetilación de compuestos fenólicos (Claus, 2003).

Con respecto al pH el óptimo de estas enzimas puede variar de 3 a 7 con un intermedio de 4.5 donde es completamente estable a una temperatura de 37°C por un mínimo de 5 días (Gayosso *et al.*, 2004). Se ha reportado que son enzimas capaces de oxidar principalmente sustancias recalcitrantes, como clorofenoles (Fahr *et al.*, 1999), e hidrocarburos aromáticos policíclicos (Bourbonnais *et al.*, 1996), compuestos organofosforados (Amitai *et al.*, 1998), fenoles, y colorantes aromáticos (Abadulla *et al.*, 2000).

Además, la producción de lacasa puede ser fuertemente inducida por la adición de elementos como cobre, manganeso, magnesio (Palmieri *et al.*, 2000) y mediadores como el ABTS (2,2'-azino-bis[3-etilbenzotiazolina-6-ácidosulfónico]), L-DOPA, siringaldazina, y 2, 6 DMP e intermediarios de la degradación de la lignina entre los que se encuentra el alcohol veratrílico (Gómez *et al.*, 2005), en contraste se inactiva en presencia de zinc, calcio, hierro y tirosina (Zille *et al.*, 2003).

Diferentes estudios llevados a cabo por Nyanhongo *et al.*, 2002 y Guillén *et al.*, 1998 han demostrado que la mayor actividad de lacasas y el nivel máximo de producción no es constante, este oscila entre 5 y 24 días de fermentación. Esto sugiere que existen varios factores que pueden afectar la actividad de las lacasas, como el tipo de cepa, el sustrato y el tiempo de fermentación. La actividad de lacasas en varias especies de *Trametes* se relaciona con las condiciones de cultivo, y se destaca la fuente de carbonos, el pH del caldo de fermentación, la presencia de inductores y de materiales lignocelulósicos, crecimiento de la biomasa fúngica y tiempo de fermentación.

Las lacasas han tomado gran importancia a nivel industrial por tener diversas aplicaciones como delignificación de materiales lignocelulósicos, biorremediación de aguas papeleras y textiles (Mayer and Staples, 2002).



**Figura 6.** Mecanismo de acción de la lacasa

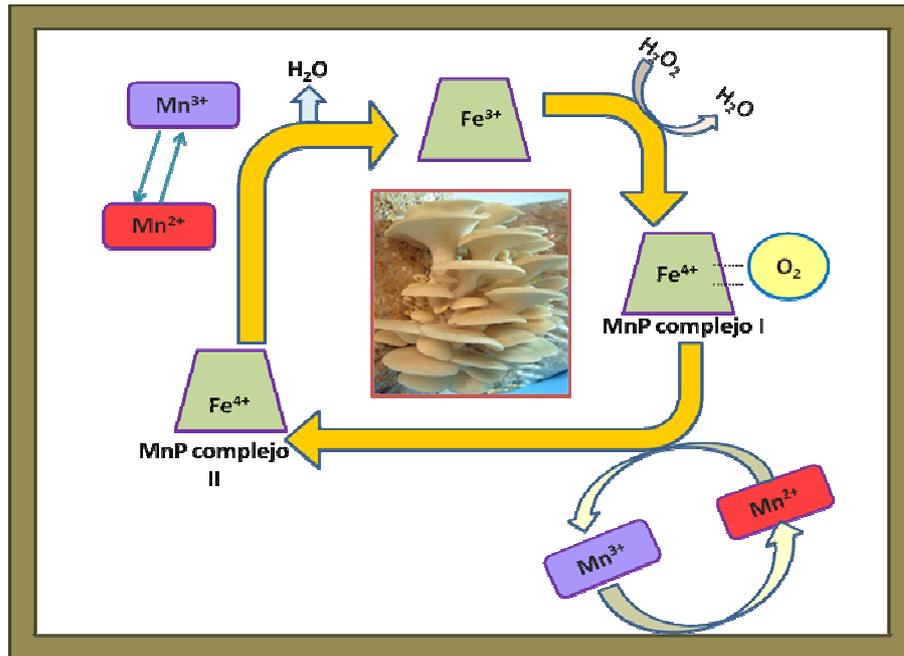
**Fuente.** (Autores, 2008).

#### 2.5.2.1.2. Manganeso peroxidasas

La enzima manganeso peroxidasa MnP es una hemo proteína que cataliza la oxidación de  $Mn^{+2}$  a  $Mn^{+3}$  dependiente de peróxido ( $H_2O_2$ ) (Figura 7), presenta un potencial de oxidación suficiente solamente para absorber electrones de estructuras fenólicas. El  $Mn^{3+}$  es quelado por diferentes ácidos orgánicos como glicolato, y puede oxidar una amplia variedad de compuestos fenólicos. La enzima es oxidada por  $H_2O_2$  para generar un intermediario deficiente de un par de electrones, conocido como componente I. Dicho componente puede ser oxidado 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 (Gayosso *et al.*, 2004).

En altas concentraciones de manganeso se genera una inhibición de la enzima, debido a que se generan grandes cantidades de peróxido de hidrogeno que rompen el ciclo catalítico de la enzima y afecta la cantidad de biomasa fúngica y el crecimiento micelial del hongo (Gómez *et al.*, 2005).

La actividad de la MnP es estimulada por la acción de lignina peroxidasas, presencia de  $CuSO_4$  y por sustratos como el lactato, el cual ayuda a la oxidación de  $Mn^{+2}$  a  $Mn^{+3}$ , igualmente el pH es un factor indispensable debido a que la enzima es inestable a pHs mayores a 7.5, en los cuales la determinación de la actividad es nula (Gómez *et al.*, 2005).



**Figura 7.** Ciclo catalítico de la Manganosa peroxidasa  
**Fuente.** (Autores, 2008).

### 2.5.2.1.3. Lignina peroxidadasas

Fue la primera enzima en descubrirse y se asemeja a otras peroxidadasas en que contiene el grupo hemo férrico y funciona siguiendo la vía catalítica típica en que LiP es oxidada por  $H_2O_2$  generando un intermediario deficiente de electrones, el cual regresa a su estado natural de reposo inicial por medio de oxidaciones posteriores (Gómez *et al.*, 2005).

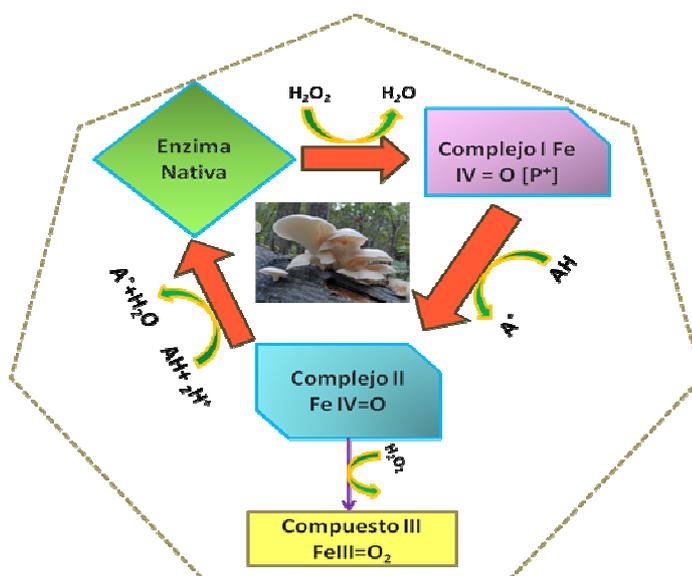
Es una glicoproteína monomérica que contiene 11% de carbohidratos, con pH óptimo entre 2.5 y 3, que cataliza la oxidación de la lignina y de otros compuestos que contengan estructuras homólogas a esta, la lignina peroxidada por síntesis endógena de peróxido oxida compuestos aromáticos no fenólicos y cliva las cadenas laterales de aril propano y enlaces éter, abriendo el anillo aromático e hidroxilándolo (Cullen, 1997).

El ciclo catalítico de la LiP (Figura 8) comienza con la oxidación de la enzima a expensas del peróxido de hidrógeno originando la transformación de su centro activo en un compuesto intermediario (complejo I, o complejo radical +4). Este compuesto actúa como generador catiónico de radicales libres de Fe. Así, en presencia de un compuesto aromático (fenólico o no) donador de electrones, el compuesto I, es reducido a compuesto II (mediante ganancia de un electrón), a la vez que se genera un radical aromático. Tras una segunda reducción del compuesto II con un sustrato aromático se regenera la enzima nativa, cerrándose así el ciclo. No obstante si existe un exceso de

peróxido de hidrógeno en el medio, la LiP puede sufrir una inactivación irreversible, al transformarse su centro activo en el compuesto III (Fernández and Henao, 2007).

En términos generales, las enzimas o complejo ligninolítico pueden ser ordenadas según sus potenciales de oxidación así: LiP > MnP > Lacasas. LiP presenta un potencial de oxidación suficientemente elevado para absorber electrones de estructuras aromáticas no fenólicas, dando origen a radicales catiónicos, los cuales sufren luego varias reacciones no enzimáticas incluyendo el rompimiento de uniones C-C y C-O (Pinzón, 2004).

Todas las anteriores enzimas son expresadas por hongos de la podredumbre blanca como un proceso idiofásico (Tabla 5), el cual está ligado a la limitación de carbono y/o nitrógeno o sulfato en el medio y su síntesis es particularmente activa con altas tensiones de oxígeno (Gómez *et al.*, 2005).



**Figura 8.** Ciclo catalítico de Lignina Peroxidasa

**Fuente.** (Autores, 2008).

**Tabla 5.** Actividad enzimática de los hongos de podredumbre blanca

ENZIMA	CO FACTOR	REACCIONES
<b>Lignina peroxidasa (LiP)</b>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Oxidación de núcleos aromáticos no fenólicos hasta radicales catiónicos
<b>Manganeso peroxidasa (MnP)</b>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Mn <sup>+2</sup>	Oxidación de Mn <sup>+2</sup> a Mn <sup>+3</sup> el cual oxida fenoles a radicales fenóxilos
<b>Lacasas (Lac)</b>	O <sub>2</sub> , Cu <sup>+2</sup>	Reduce Cu <sup>+2</sup> a Cu <sup>+1</sup> , Reduce O <sub>2</sub> a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . Oxidación de fenoles a radicales fenóxilo

<b>Enzimas Productoras de peróxido, Glucosa oxidasa, Metanol oxidasa (intracelular) Glioxal oxidasa, aril alcohol oxidasa (extracelular)</b>	Varios sustratos orgánicos ( metanol, alcohol, glucosa)	Reducción de O <sub>2</sub> a H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
--	---	---

Fuente. (Pinzón, 2004)

## 2.6. Remoción biológica del negro reactivo 5 con hongos de la podredumbre blanca

En el caso del colorante NR5, los puntos de un posible ataque en la estructura son los marcados en la Figura 9. Se sabe que la lignina peroxidasa es capaz de sustraer uno de los electrones de la nube del anillo aromático en las unidades no fenólicas del colorante, generando radicales catiónicos aromáticos, la lacasa y la MnP también tendrían adicionalmente el potencial de oxidar los anillos aromáticos no fenólicos de los compuestos, así mismo la lacasa mediaría la extracción de hidrógenos de los grupos hidroxilo y amino (NH<sub>2</sub>) marcados en la estructura del NR5, desestabilizando la conformación del compuesto. Estas enzimas podrían actuar por separado, o en conjunto para llevar a cabo los procesos oxidativos. A su vez la intervención directa o indirecta de otras enzimas como glioxal oxidasas, mediaría la producción de peróxido, vital para el funcionamiento de las peroxidases. Y las tirosinasas que aunque con un poder de oxidación más reducido que las lacasas podrían intervenir en cierto tipo de degradación (Fernández and Henao, 2007).

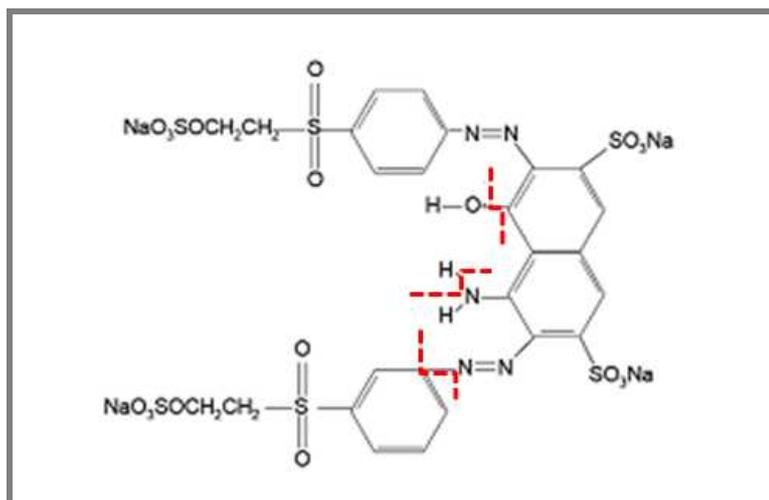


Figura 9. Posibles puntos de corte del Negro reactivo 5

Fuente. (Autores, 2008).

## **2.7. Inductores de la actividad enzimática de los hongos de la podredumbre blanca**

Se ha hecho indispensable el estudio de las necesidades nutricionales de los hongos Basidiomycetes debido a que las enzimas ligninolíticas al ser generadas en un proceso idiofásico son estimuladas por la limitación de nutrientes como carbono, nitrógeno o sulfato (Martínez A *et al.*, 2005), además se ha estudiado la inducción de la actividad enzimática para una mejor degradación y remoción de colorantes y compuestos de estructuras complejas homologas a la lignina (Gayosso *et al* , 2004), dentro de los inductores metálicos que se estudiaron en este proyecto está el sulfato de cobre y el sulfato de manganeso.

### **2.7.1. Sulfato de Cobre**

El cobre es micronutriente esencial de enzimas y proteínas, está envuelto en el transporte de electrones, en la oxidación y reducción y en otras reacciones químicas. El cobre que requieren los microorganismos se adiciona en bajas concentraciones (1-10  $\mu\text{M}$ ), pues es tóxico al alterar el sitio activo de las enzimas y oxidar los componentes de la membrana; por ello este elemento se adiciona en su forma orgánica como sulfato de cobre evitando su toxicidad.

El cobre presentado como  $\text{CuSO}_4$  es un inductor de la actividad enzimática de lacasas ya que en altas concentraciones incrementa la superóxido dismutasa que es la enzima encargada de la producción del peróxido de hidrógeno aumentando la actividad de las enzimas dependientes de peróxido y de esta forma la decoloración (Cervantes and Gutiérrez, 1993). Este compuesto se puede unir a la pared celular específicamente a la quitina y el quitosano y puede actuar como inductor de la enzima lacasa que posee en su núcleo cuatro átomos de cobre que estimulan la oxidación de cada uno de los sustratos y la obtención de dos moléculas de agua. Esta inducción se da por una regulación a nivel transcripcional ya que los niveles de mRNA aumentan en presencia de cobre (Pedroza, 2007).

A nivel de la estructura química de la lacasa el metal está presente en los centros de cobre (T1, T2, T3) los sitios T2 y T3 forman un cluster trinuclear de cobre en el cual el oxígeno es reducido a agua. El centro T1 es el responsable de unión del sustrato fenólico y no fenólico para que se lleve a cabo la sustracción de un electrón y por consiguiente reducción de  $\text{Cu}^{+2}$  a  $\text{Cu}^{+1}$ ; internamente se lleva a cabo la transferencia de electrones del sitio T1 a T2 y T3 donde finalmente los 4 átomos de oxígeno actúan como aceptor final de electrones. (Tinoco *et al.*, 2001).

El efecto negativo del Cu está asociado a la interacción con ácidos nucleicos, alteración de los sitios activos de ciertas enzimas y la oxidación de componentes de membrana (Pedroza, 2007).

### 2.7.2. Sulfato de Manganeso

La acción del  $\text{MnSO}_4$  como inductor de la actividad MnP no es muy clara se reporta que bajo condiciones ligninolíticas la adición de  $\text{MnSO}_4$  en concentraciones de 0.2 mM favorece la expresión de MnP. El manganeso se necesita para que se complete el ciclo catalítico de la enzima ya que el  $\text{Mn}^{2+}$  se oxida a  $\text{Mn}^{3+}$  y el  $\text{Mn}^{3+}$  asociado con ácidos orgánicos (ácido málico y ácido oxálico) actúa como un agente primario en la ligninólisis y puede llevar la oxidación de compuestos aromáticos clorados por oxidación vía dos electrones (Pedroza, 2007).

La transcripción de MnP es codificada por los genes *mnps* en los HPB, en donde la adición de  $\text{Mn}^{2+}$  activa la expresión de los genes y por ende la cuantificación extracelular de la enzima, por lo que se ha propuesto que este ion puede actuar como un metal putativo que enciende elementos de respuesta a la presencia de metales (MRE) los cuales se ubican en la región upstream de los genes *mnps*, Sin embargo, altas concentraciones de  $\text{Mn}^{2+}$  no implica altas expresiones de MnP. Los MRE solo habían sido identificados en plantas y animales como respuesta a la toxicidad ocasionada por altas concentraciones de cadmio, cobre y zinc (Manubens *et al.*, 2007).

Teniendo en cuenta que este metal induce la actividad de MnP, Brown *et al.*, 1991 utilizaron sulfato de manganeso a una concentración de 180  $\mu\text{M}$  esperando que  $\text{Mn}^{2+}$  se oxidara a  $\text{Mn}^{3+}$  de esta forma generando la oxidación de los sustratos orgánicos, el aumento de MnP se dio a los 3 días con una baja concentración de nitrógeno, al incrementar la concentración inicial de sulfato de manganeso no se observó mayor producción enzimática, indicando que la enzima es saturable. La concentración del ion Mn afecta la transcripción de genes de MnP, tal vez a través de una vía que incluye la absorción de Mn y la activación de una o más proteínas intracelulares, además la ausencia de Mn no da lugar a la transcripción del gen, la rapidez de respuesta del Mn sugiere que la enzima puede ser directamente activada por la transcripción de los genes en lugar de influir en el estado metabólico de la célula.

El mecanismo de asimilación de este metal por parte del hongo puede estar asociado a la unión de este a la pared celular especialmente a la quitina y quitosano (Castillo and Ortega, 2007).

## 2.8. Efecto de la adición de co- sustratos

Los microorganismos son incapaces de metabolizar un sustrato como única fuente de carbono y energía, pero pueden transformarlo si se les aporta un sustrato de crecimiento alternativo, al cual se le conoce como co sustrato. A este fenómeno se le llama cometabolismo y se realiza cuando un microorganismo transforma a un compuesto, pero sin que éste sea su fuente principal de carbono y energía.

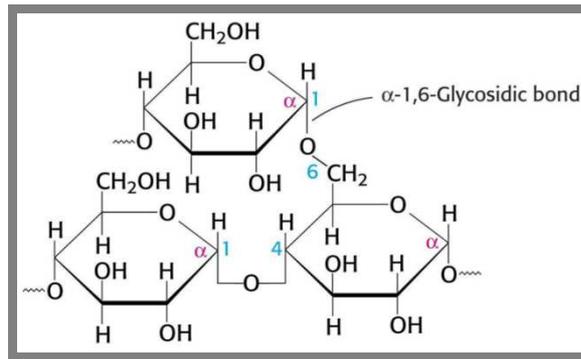
En diferentes trabajos se ha evaluado la capacidad de degradación aeróbica de colorantes azo utilizando HPB y diferentes fuentes de carbono como glucosa, almidón, lactosa y Tween 80 (Padmavathy *et al.*, 2003).

El trabajo realizado por Wang *et al.*, 2002 demuestra que la presencia de una fuente de carbono sencilla como glucosa favorece la decoloración de residuales papeleros en los hongos de podredumbre blanca debido a la inducción que genera frente a enzimas de tipo oxidasas y lacasa. Por otra parte, Yang *et al.*, 2005 emplearon a *Debaryomyces polymorphus*, una levadura, evaluando co sustratos como maltosa, sacarosa y almidón encontrando que el almidón es el único polímero que no pudo ser empleado por este microorganismo, También Hou *et al.*, 2004 estudiaron el comportamiento de co sustratos como glucosa, almidón, celobiosa, celulosa y glicerol en *Pleurotus ostreatus* determinando que la celobiosa es la que genera mayor actividad lacasa (120ULac/L) seguida de la celulosa, glicerol y glucosa mientras que el almidón presentó la menor actividad.

Entre los co sustratos estudiados se encuentran:

### 2.8.1. Almidón

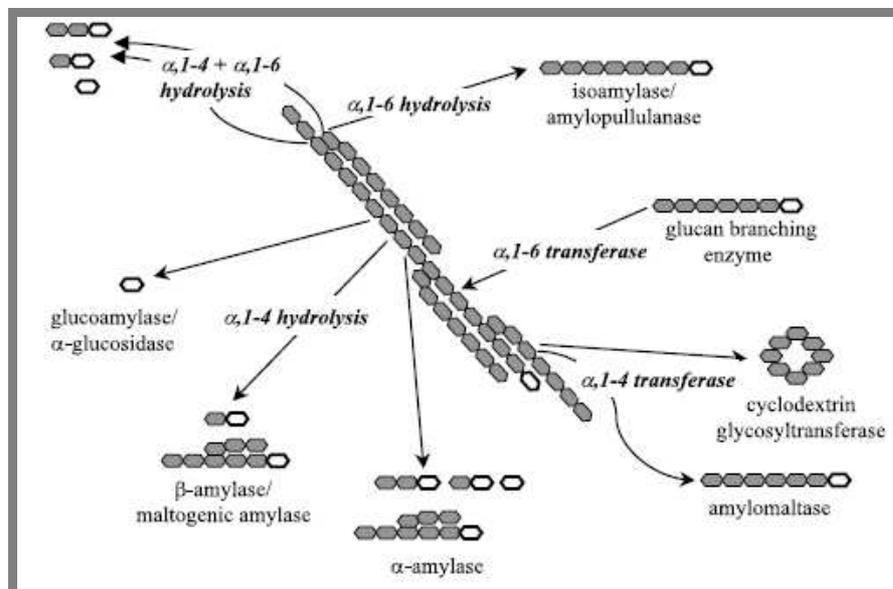
Es un carbohidrato que en las plantas cumple la función de ser una reserva natural. Existen dos formas de este polímero de glucosa y son la amilosa, que es el almidón no ramificados y consiste en una serie de residuos de glucosa unidos por enlace  $\alpha$ -1,4 y la amilopectina, la forma ramificada, la cual está unida por un enlace  $\alpha$ -1,6 (Moreno and Nocove, 2001) (Figura 10).



**Figura 10.** Molécula de almidón

**Fuente.** (Waigh, 1997)

La degradación del almidón se lleva a cabo por medio de cuatro tipos de enzimas, endoamilasas, exo-amilasas, desramificantes y transferasas (Tabla 6). Las endo y exo-amilasas tienen la capacidad de hidrolizar enlaces glicosídicos  $\alpha$ 1-4 en la parte interna y externa de las cadenas de amilosa y amilopectina; las enzimas desramificantes hidrolizan los enlaces glicosídicos  $\alpha$ 1-6 y las transferasas hidrolizan enlaces glicosídicos  $\alpha$ 1-4 (Van der Maarel *et al*, 2002) (Figura 11).



**Figura 11.** Degradación del almidón

**Fuente.** (Van der Maarel *et al*, 2002)

### 2.8.2. Celulosa

Estructuralmente es un carbohidrato compuesto de unidades de glucosa unidas en una larga cadena lineal por enlaces  $\beta$ -1,4 de la molécula de azúcar (Tabla 6). Una característica importante de la celulosa es su estructura cristalina, sin embargo, las fibras individuales no son totalmente cristalinas, produciéndose así estructuras amorfas donde las fibras tienen torceduras y espacios entre sus microfibrillas lo cual permite la formación de microporos y capilares lo que facilita el ingreso de moléculas como enzimas Celulolíticas (Moreno and Nocove, 2001).

### 2.8.3. Quinua

Es un grano rico en proteínas, está constituida por aminoácidos como: leucina, isoleucina, metionina, fenilamina, treonina, triptofano y valina lo que dificulta su degradación (Tabla 6). La concentración de lisina en la proteína de la quinua es casi el doble en relación a otros cereales y gramíneas. Además posee vitaminas como complejo B, vitamina C, E, tiamina, rivotflavina, minerales tales como fósforo, potasio, magnesio y calcio entre otros (Moreno and Nocove, 2001).

**Tabla 6.** Mecanismo enzimático de degradación

Polímero	Enzima	Modo de acción
<b>Almidón y Quinua</b>	1,4 $\alpha$ -D glucan glucanohidrolasa	Hidroliza enlaces glucosídicos al azar al interior de la molécula.
	1,4 $\alpha$ -D glucan maltohidrolasa	Hidroliza enlace $\alpha$ 1,4 cada dos unidades de glucosa.
	1,4 $\alpha$ -D glucan glucohidrolasa	Hidroliza enlace $\alpha$ 1,4 en el extremo de la molécula.
	Pululano 6 glucanohidrolasa	Hidroliza el enlace $\alpha$ 1,6 en la amilopectina.
<b>Celulosa</b>	$\beta$ -1,4 glucanasa ( $\beta$ -1,4 glucano glucanohidrolasa)	Hidroliza aleatoriamente los enlaces $\beta$ -1,4 glucosídicos intermoleculares. Cliva los extremos no reductores de la molécula de celulosa
	Exo $\beta$ -1,4 celobiohidrolasa	Completa el proceso convirtiendo los fragmentos de celobiosa a glucosa o removiendo glucosa desde los extremos no reductores de pequeños celoligosacáridos.
	$\beta$ -1,4 glucosidasa o celobiasa	

**Fuente.** (Autores, 2008).

## 2.9. Inmovilización de hongos de la podredumbre blanca para tratamiento de aguas contaminadas con colorantes

Constituye una alternativa común la utilización de microorganismos soportados en sólidos para llevar a cabo la eliminación de componentes indeseables del agua, aprovechando la actividad metabólica de los mismos sobre esos componentes trayendo consigo muchas ventajas (Tabla 7). La aplicación tradicional consiste en la eliminación de materia orgánica biodegradable, tanto soluble como coloidal, así como la eliminación de compuestos que contienen elementos nutrientes (N y P). Es uno de los tratamientos más habituales, no solo en el caso de aguas residuales urbanas, sino también industriales, entre las que están papelera, textilera y curtiembres entre otras, encontrando buenos resultados en cuanto a la remoción de color, fenoles y compuestos clorinados y adquiriendo como ventaja de su utilización la fácil separación del bioportador en el agua tratada (Herrera and Rosas, 2003).

En la mayor parte de los casos, la materia orgánica constituye la fuente de energía y de carbono que necesitan los microorganismos para su crecimiento. Además, también es necesaria la presencia de nutrientes, que contengan los elementos esenciales para el crecimiento, especialmente los compuestos que contengan N y P (Herrera and Rosas, 2003).

En el caso de microorganismos filamentosos, la inmovilización se puede dar de dos maneras, primero por la producción de polisacáridos que actúan como sustancias adherentes que ayudan a la unión celular con el soporte (Fernández and Henao, 2007). La segunda es la adsorción a soportes con porosidad alta, lo cual permite que los filamentos penetren y colonicen el soporte quedándose allí retenidos. Esta unión puede llevarse a cabo por medio de interacciones de tipo físico, hidrofóbicas, Van der Waals, puentes de hidrógeno, intercambio de ligando, intercambio de iones y quimioadsorción. Este método implica la existencia de una interacción física con frecuencia reversible (Herrera and Rosas, 2003).

**Tabla 7.** Ventajas de las células inmovilizadas

Ventajas
<ul style="list-style-type: none"><li>• Mayor actividad metabólica por parte de las células inmovilizadas.</li><li>• Fácil recuperación de las células con la mezcla de reacción.</li><li>• Mayor superficie de contacto.</li><li>• Se puede trabajar con mayor cantidad de biomasa en un reactor.</li><li>• Disponibilidad homogénea de nutrientes y oxígeno para las células.</li><li>• Mayor persistencia dentro del sistema.</li><li>• Mayor resistencia a la toxicidad y cambios ambientales.</li></ul>

**Fuente.** (Herrera and Rosas, 2003).

### 2.9.1. Tipos de soportes

Los materiales utilizados para inmovilizar células pueden ser de dos tipos: Inorgánicos y orgánicos; dentro de los primeros se destacan la celulosa, estropajo, viruta, salvado de trigo, cascarilla de cebada, fique, y dentro de los inorgánicos la porcelana porosa, fibra de vidrio poroso, espuma poliuretano, alginato, nylon y soportes de sílica (Fernández and Henao, 2007).

Adicionalmente se deben tener en cuenta criterios importantes para la elección del soporte de inmovilización, como la disponibilidad, el bajo costo, y la alta eficiencia de retención de biomasa (Castillo and Ortega, 2007).

#### 2.9.1.1. Fique

La cabuya (Figura 12) es la fibra natural colombiana por excelencia, proveniente de las hojas del fique, tiene su origen en la América Tropical, en la región Andina de Colombia y Venezuela. En Colombia, se cultiva el fique y extrae la cabuya desde tiempos inmemoriales, para la fabricación de hamacas, redes, cuerdas, alpargatas, jíqueras, costales y enjalmas (Ministerio Ambiente, 2006).



**Figura 12.** Planta Agavaceae

**Fuente.** (Kulak, 2008<on line>)

#### 2.9.1.2. Caracterización de la planta de fique

El Fique (*Furcraea spp.*), es una planta grande, de tallo erguido, su altura varía entre 2 y 7 m, esta densamente poblada de hojas de color verde, en forma radial, largas (1 a 3 m), angostas (10 y 20 cm), carnosas, puntiagudas, acanaladas, y dentado espinosas, en algunas variedades, presentando líneas o estrías tenues de unos 3 mm de largo. Su flor es de color blanco verdoso, llamada magüey o escapo, sólo florece una vez en su ciclo de vida y luego le sobreviene la muerte. Las semillas germinan en la misma planta y sus propágulos (bulbillos) caen ya formados al suelo por lo que se considera al fique una planta vivípara (Ministerio Ambiente, 2006).

### 2.9.1.3. Clasificación taxonómica

**Reino:** Vegetal

**Phylum:** Spermatophyta

**Clase:** Angiospermae

**Subclase:** Monocotyledonea

**Orden:** Liliiflorae

**Familia:** Agavaceae

**Género:** Furcraea

**Nombre Común:** Fique, cabuya, penca, fique perulero, maguey, cabui, cabuya blanca, chuchao, cocuiza. (Ministerio Ambiente, 2006).

### 2.9.1.4. Composición del fique

Sus constituyentes físicos, químicos y mineralógicos (Tabla 8 a 10) se conocen en forma cuantitativa, siendo agua, celulosa, materia orgánica y minerales, con los siguientes valores porcentuales:

- 85% humedad.
- 6% celulosa (D-glucosa).
- 8% parte orgánica y amorfa (Con sacarosa, proteínas, nitrógeno, fósforo, calcio, potasio, saponinas y sapogeninas).
- 1% Minerales (Ministerio Ambiente, 2006).

**Tabla 8.** Estructura física de la hoja de fique

<b>Componente</b>	<b>Porcentaje en la hoja</b>	<b>Porcentaje útil</b>	<b>Usos</b>
Fibra	5	4	En la industria textil, empaques.
Jugo	70	40	Extracción de esteroides
Estopa	8	3	Pulpa de papel
Bagazo	17	10	Material de construcción, abonos

**Fuente.** (Arroyave and Velásquez, 2001).

**Tabla 9.** Composición química de la hoja de fique

Fibra		Jugo	Bagazo	
Cenizas	0,70%	Clorofila	Cenizas	0,122
Celulosa	73,80%	Carotenoides	E.E.	0,0364
Resinas, ceras y grasas	1,90%	Saponinas Azúcares	Proteínas Elementos Nitrogenados	9,84% 71,29%
Lignina	11,30%	Resinas	Calcio	0,2165
Pentosanos	10,50%	Flavonoides Ácidos orgánicos	Fósforo Magnesio	0,09% 0,2%
TOTAL	98,20%	Alquitranes Agua Lignina Calcio Lipoides Fósforo	Fósforo Sodio Cobre Hierro Manganeso Zinc	1,81% 0,04% 14ppm 647ppm 33ppm 17ppm

Fuente. (Arroyave and Velásquez, 2001).

**Tabla 10.** Composición mineralógica del fique

Elementos	Cenizas (%)	Hoja	Fibra
Nitrógeno	6,84	1,32%	0,22%
Fósforo	0,58	0,49%	0,04%
Potasio	0,61	7,56%	0,26%
Calcio	1,51	3,58%	0,96%
Magnesio	0,11	0,72%	0,1%
Sodio	0,42	0,4%	0,55%
Hierro	0,98	52,20 ppm	31,6 ppm
Cobre	0,03	8,10 ppm	1,4 ppm
Manganeso	0,06	45,60 ppm	9,4 ppm
Zinc	0,06	35 ppm	16,9 ppm
Boro	Trazas	14,5 ppm	1,8 ppm
Cobalto	Trazas	Trazas	Trazas
Cloro	0,16	Trazas	Trazas

Fuente. (Ministerio Ambiente, 2006).

### 3. PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

#### 3.1 FORMULACION DEL PROBLEMA

En la industria textilera se producen gran cantidad de contaminantes los cuales generan un problema medio ambiental a corto y largo plazo; en este proyecto nos centraremos en el desarrollo de una alternativa viable que sea capaz de mitigar la contaminación causada por la presencia de colorantes azoicos, específicamente Negro Reactivo 5 en los cuerpos de aguas textiles.

Diferentes autores reportan que estos compuestos son difíciles de degradar debido a sus complejas estructuras compuestas de anillos aromáticos y enlaces de difícil ruptura; una ventaja que presentan los Hongos de Podredumbre Blanca es que cuentan con un sistema enzimático potencial inespecífico que puede actuar en presencia de colorantes reactivos generando una remoción rápida y económica.

El problema que se planteó en este proyecto fue buscar por medio de un diseño factorial  $2^2$  la combinación ideal de inductores metálicos ( $\text{CuSO}_4$  y  $\text{MnSO}_4$ ), además por medio de una comparación de medias entre tratamientos seleccionar entre almidón, quinua, celulosa y glucosa, el mejor co sustrato para promover la producción enzimática y finalmente lograr optimizar la actividad enzimática del hongo *Pleurotus ostreatus* inmovilizado en fique con una mejor degradación del colorante y por ende una mayor decoloración.

### 3.2. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años se ha incrementado la preocupación por la preservación del medio ambiente, ya que las actividades desarrolladas por el hombre con el fin de satisfacer las necesidades de una sociedad consumista, generan productos de desecho que lo modifican de manera importante. Tal es el caso de Colombia en donde la contaminación ambiental ha tomado matices significativos y niveles preocupantes, en respuesta a esto se han generado diferentes alternativas encaminadas a disminuir el problema de la contaminación del agua, aire, suelo, etc, originado por fuentes fijas, una de las industrias que genera gran cantidad de contaminantes es la textil, ubicándose en el sexto lugar de importancia a nivel mundial en cuanto a descarga de aguas residuales con contaminantes tales como, colorantes, detergentes, solventes, fibras (Fritjers *et al.*, 2006).

Los efluentes producidos por estas industrias durante la fabricación de telas, se han caracterizado por poseer altos niveles de DQO<sub>5</sub>, sólidos suspendidos, presencia de metales pesados y color. La mayoría de los colorantes sintéticos utilizados son azocolorantes y antroquinonas, muchos de estos son tóxicos o incluso cancerígenos con el transcurso de los años.

Por esto se han buscado diferentes tratamientos que reduzcan los efectos adversos que causa la contaminación entre ellos están los sistemas convencionales para el tratamiento de efluentes textiles (filtración por membrana, adsorción, neutralización, coagulación, degradación química, degradación fotocatalítica, ozonación) que son bastante eficientes en la remoción de DQO<sub>5</sub> y DBO<sub>5</sub>, sin embargo la decoloración no es muy buena y los costos de estos tratamientos son bastante altos, es así como en este proyecto se trabajara con procesos biotecnológicos obteniendo producción más limpia y eficiente que disminuya la contaminación con el objetivo de bajar costos y obtener una gestión sostenible mediante el empleo de *Pleurotus ostreatus*, un hongo de la podredumbre blanca que posee una maquinaria enzimática inespecífica que degrada compuestos estructuralmente parecidos a la lignina. Este microorganismo es una buena solución porque no generan intermediarios tóxicos en la decoloración de efluentes con presencia de colorantes tipo azo en un proceso aerobio como los que generan las bacterias en proceso anaerobio, además disminuye el color presente en el agua y posiblemente conllevando a reducir la toxicidad que el colorante genera en la salud humana y animal.

Este proyecto también gana importancia al trabajar con un soporte que no se ha empleado hasta ahora en la remoción de negro reactivo 5, el fique, una planta que se cultiva en gran parte de Latinoamérica entre los que se encuentra Colombia las ventajas de emplear este soporte es su fácil disponibilidad económica y la presencia de

hemicelulosa, celulosa y lignina degradables por *Pleurotus ostreatus* al ser un soporte no inerte. Además la utilización de este microorganismo inmovilizado le da otra ventaja al tener mayor superficie de contacto con el residuo a tratar realizando el proceso con mayor cantidad de células por ende aumentando la actividad metabólica y la decoloración.

Para finalizar lo que se buscó con este proyecto fue disminuir el problema que se genera en la industria textil al arrojar los residuos generados sin tratamiento a los efluentes creando efectos adversos en la biodiversidad acuática y en los seres humanos. Además beneficiar a los empresarios e nivel jurídico y económico al cumplir con la legislación y bajar los costos del tratamiento.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de inductores metálicos y co sustratos sobre la capacidad de remoción del negro reactivo 5 empleando a *Pleurotus ostreatus* inmovilizado en fique.

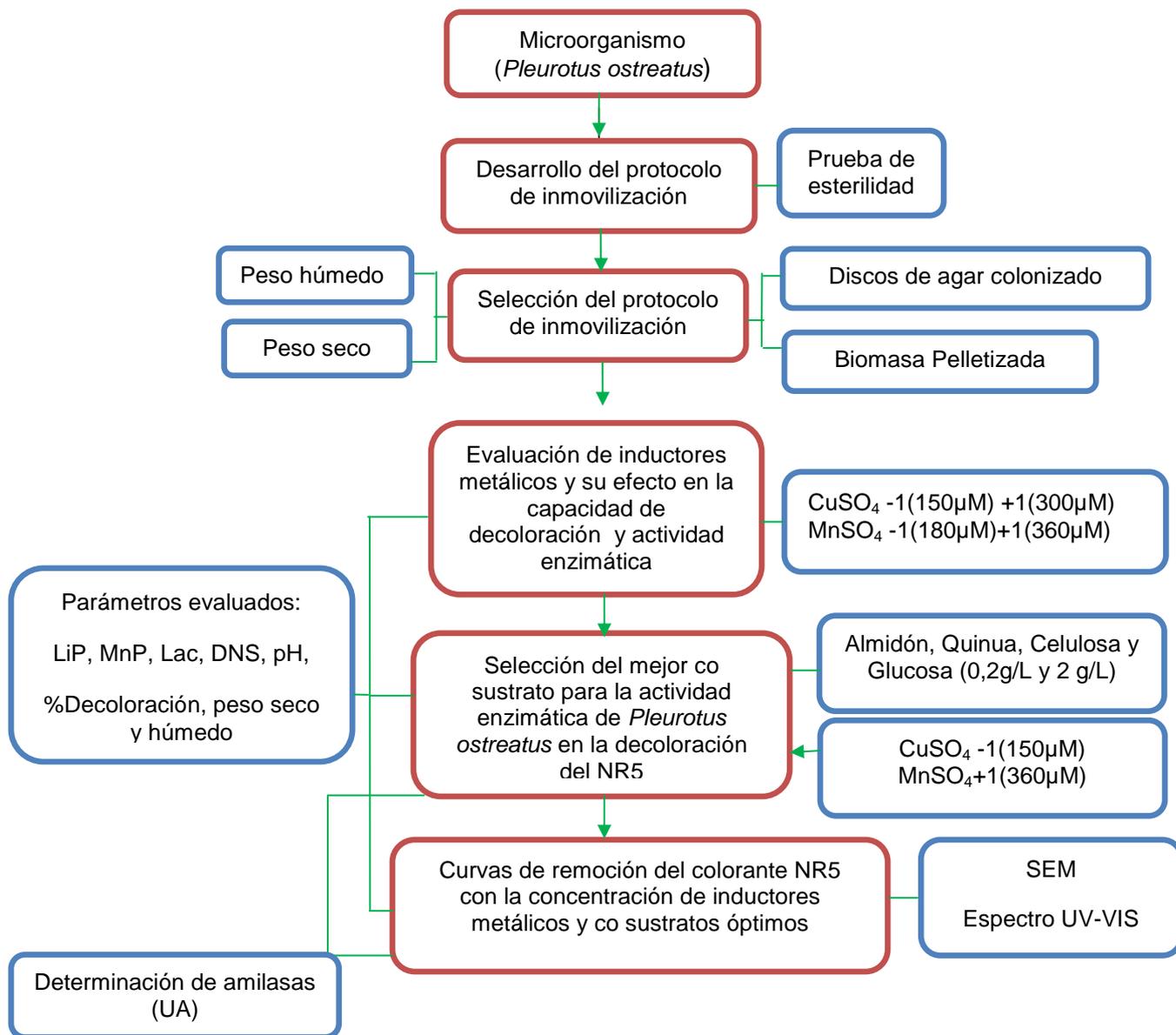
### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desarrollar un bioportador no inerte con elevada capacidad adsortiva y área superficial para la remoción del NR5.
- Valorar el efecto de inductores metálicos a base de cobre y manganeso sobre la capacidad de decoloración del NR5 y su correlación con la actividad enzimática de *P. ostreatus* inmovilizado.
- Evaluar diferentes fuentes de carbono como co sustratos para la remoción de negro reactivo 5 y actividad enzimática del tipo glicosilhidrolasas.
- Realizar curvas de remoción a escala de erlenmeyer bajo las condiciones de inducción y co sustrato previamente seleccionadas.

## 5. HIPOTESIS

*Pleurotus ostreatus* inmovilizado sobre fique removerá el colorante NR5 en respuesta a la inducción enzimática con metales y adición de co sustratos de fácil asimilación.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS



## **6.1 Microorganismos**

Para este estudio, se utilizó la cepa *Pleurotus ostreatus* proveniente del cepario del Laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Pontificia Universidad Javeriana (Bogotá, Colombia). Esta cepa fue reactivada en agar extracto de salvado (**Anexo 1**) a 30° C durante 8 días y conservada a 4° C en tubos eppendorf con 1 mL de agar salvado de trigo estéril inoculando un disco de agar colonizado del hongo, según la técnica descrita por Pedroza *et al.*, 2003.

## **6.2 Desarrollo del protocolo de inmovilización**

Como soporte no inerte se utilizó fibra de fique tejida sin aditivos ni tinturas. Las dimensiones con las que se trabajó fueron hilos de 5 cm de largo con un diámetro promedio de 0,5 cm. La esterilización previa del soporte se realizó por medio de calor seco durante 3 horas a 212° C en bolsas de papel aluminio y kraft con aproximadamente 40 hilos.

Para comprobar la esterilidad del soporte se tomaron hilos de fique al azar de cada bolsa y se sembraron en caldo nutritivo por 24 horas a 37° C. Además se colocaron otros hilos en agar nutritivo por 24 h a 37° C (**Anexo 2**). Finalizado este tiempo se leyó la prueba como ausencia o presencia de flora acompañante (Autores, 2008).

## **6.3 Selección del protocolo de inmovilización**

Se implementaron dos protocolos de inmovilización uno basado en la utilización de pellets obtenidos de la propagación en líquido (CCP) y otra utilizando discos de agar con hongo crecido (CCD). Los parámetros que definieron el mejor protocolo fueron la cantidad de biomasa inmovilizada y el tiempo de obtención.

### **6.3.1 Inmovilización utilizando discos de agar con hongo crecido**

A partir de las cajas cultivadas y con cepa reactivada de *Pleurotus ostreatus* se tomaron 15 discos de agar colonizado que fueron colocados sobre cada uno de los 15 hilos de fique de 5 cm estéril (previamente pesados). Luego se incubaron a 30°C durante 8 días realizando observaciones diarias hasta obtener una colonización completa del soporte (Autores, 2008).

### **6.3.2 Inmovilización utilizando biomasa pelletizada**

Se realizó la propagación en líquido empleando erlenmeyers de 100 mL con una relación 1/2 de caldo salvado de trigo (**Anexo 1**) y 10 discos de agar crecido del hongo. Luego se llevaron a incubar a 30° C durante 8 días a 150 rpm (Pedroza *et al.*, 2003).

Se realizaron determinaciones de pureza por medio de la coloración de Gram y azul de Lactofenol.

La biomasa húmeda obtenida en la propagación en líquido se filtró y pesó (20g/50mL de extracto), luego se inoculó en cajas de Petri con agar salvado que contenían 15 hilos de fique estériles de 5cm. Con un rastrillo se homogenizó la biomasa sobre el soporte y estas cajas de Petri se llevaron a incubación durante 8 días a 30° C (Autores, 2008).

#### **6.4 Caracterización del colorante azo negro reactivo 5 (NR5)**

##### **6.4.1 Curva de calibración**

Se elaboró una curva de calibración tomando como rangos de concentración valores entre 0.5 ppm y 20 ppm. Las diferentes diluciones se leyeron en espectrofotómetro a una longitud de onda de 600nm. El procedimiento se desarrolló por triplicado y los datos obtenidos se linealizaron para obtener la ecuación de la línea recta, la cual se utilizó para determinar la concentración del colorante durante los diferentes ensayos que se llevaron a cabo. El blanco utilizado fue agua destilada (Fernández and Henao, 2007) **(Anexo 3)**.

#### **6.5 Evaluación de inductores metálicos y su efecto sobre la capacidad de decoloración y actividad enzimática**

Se realizó por medio de un diseño factorial  $2^2$  valorando dos factores  $X_1$  Sulfato de cobre y  $X_2$  Sulfato de manganeso, cada uno de ellos tuvo dos niveles codificados como (+1) de 300  $\mu\text{M/L}$  (-1) de 150  $\mu\text{M/L}$  para el sulfato de cobre y (+1) de 360  $\mu\text{M/L}$  (-1) de 180  $\mu\text{M/L}$  para el sulfato de manganeso. El diseño factorial generó una matriz equivalente a cuatro experimentos. La prueba se realizó por triplicado y los controles por duplicado.

Para cada tratamiento se utilizaron erlenmeyers de 100 mL con 50 mL de medio Radha **(Anexo 4)**, suplementado con el colorante negro reactivo 5 a 150 ppm **(Anexo 5)**, la cantidad correspondiente de los inductores metálicos **(Anexo 6)** ajustada a cada una de las concentraciones indicadas en la Tabla 11 y 3 hilos de fique inmovilizado con *Pleurotus ostreatus*, los cuales correspondían a una biomasa húmeda de 4.8g en total; es decir 1,6g/hilo de fique aproximadamente. Se incubaron a 30° C a 150rpm durante 4 días.

**Tabla 11.**Parámetros y niveles evaluados en el diseño factorial

TRATAMIENTO	FACTOR X <sub>1</sub>	FACTOR X <sub>2</sub>
	SULFATO DE COBRE	SULFATO DE MANGANESO
1	-1 (150 µM/L)	-1 (180µM/L)
2	+1 (300 µM/L)	-1 (180 µM/L)
3	-1 (150 µM/L)	+1 (360 µM/L)
4	+1 (300 µM/L)	+1 (360 µM/L)
<b>Control Absoluto</b>	Medio Radha suplementado con NR5 150ppm	
<b>Control de Adsorción</b>	Medio Radha suplementado con NR5 150ppm y tres hilos de fique sin colonizar	
<b>Control Positivo</b>	Medio Radha suplementado con NR5 150 ppm sin adición de metales y 3 hilos colonizados con <i>P. ostreatus</i> .	
<b>Control Negativo</b>	Medio Radha suplementado con NR5 150ppm sin adición de metales ni glucosa y 3 hilos colonizados con <i>P. ostreatus</i> .	

Las variables de respuesta dependientes de este montaje fueron el porcentaje de decoloración, la concentración en ppm de negro reactivo 5 y la cuantificación de enzimas LiP, MnP y Lacasa; además se hallaron las variables de respuesta complementaria entre las que estuvieron la determinación de azúcares reductores (DNS), peso seco y pH realizándose al inicio y al final del diseño factorial.

El análisis de datos se realizó usando los programas SAS 9.0 y Desing Expert 6.0 y los resultados fueron tratados con un modelo empírico el cual relacionó las respuestas cuantificadas con los factores evaluados y sus respectivos niveles. Para un diseño de dos factores el modelo de primer orden fue:

$$y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 \quad (1)$$

Donde  $y$ , corresponde a la variable dependiente;  $b_0$  es el intercepto,  $b_1$ ,  $b_2$ , son los coeficientes lineales y  $X_1$   $X_2$  son los factores ó variables independientes (Mongomery, 2000).

## **6.6 Selección del mejor co sustrato para la actividad enzimática de *Pleurotus ostreatus* en la decoloración de negro reactivo 5**

Se usaron tres co sustratos almidón, quinua y celulosa, como control se empleó glucosa.

La prueba se realizó por triplicado. Para cada ensayo se emplearon erlenmeyers de 100 mL con 50 mL de caldo Radha suplementado con Negro Reactivo 5 a 150 ppm, una combinación de inductores correspondiente a 150µm/L de CuSO<sub>4</sub> y 360 µm/L de MnSO<sub>4</sub> (-1,+1), las diferentes concentraciones de co sustratos de la Tabla 12 y tres hilos de fique colonizado con *Pleurotus ostreatus*, los cuales representaban 4.8g de biomasa húmeda. Los ensayos se incubaron 30° C por 4 días a 150 rpm.

**Tabla 12.** Concentraciones empleadas de co sustratos.

<b>Co sustrato</b>	<b>Concentraciones estudiadas</b>
Almidón	Concentración máx. 2g/L Concentración Min. 0.2g/L
Quinua	
Celulosa	
Glucosa (Control)	

Las variables de respuesta dependientes de este estudio fueron el porcentaje de decoloración, la actividad enzimática de LiP, MnP y lacasa, la concentración de negro reactivo 5 (ppm) y la cuantificación de celulasas y amilasas. El análisis de los resultados se realizó por medio de una comparación de medias y correlación de variables empleando el programa SAS 9.0 para Windows.

## **6.7 Curvas de remoción de colorante negro reactivo 5 con las concentraciones de inductores metálicos y co sustratos óptimas.**

Las curvas de remoción se llevaron a cabo en erlenmeyers de 100 mL con relación ½ que contenían 3 hilos inmovilizados correspondientes a 4.8.g (peso húmedo) de *Pleurotus ostreatus*. Estas estaban constituidas por medio Radha con colorante NR5 a 150 ppm y las condiciones seleccionada en las dos primeras etapas de este estudio.

La cinética se evaluó por un período de ocho días a 30°C y 150 rpm, realizando muestreos en los tiempos: 0h, 6h, 12h, 18h, 24h y después cada 24h, determinando para cada tiempo los parámetros mencionados en el numeral 6.9. Los montajes se realizaron por triplicado para *Pleurotus ostreatus*. Al finalizar las curvas de remoción se realizó el análisis estadístico de los datos por medio de una comparación de medias entre

tratamientos, comparación de medias entre tiempos y análisis de correlación entre variables con el Programa SAS versión 9.0.

## **6.8 Métodos preparativos**

Se realizaron determinaciones de peso seco y húmedo de la propagación en líquido, de la inmovilización utilizando biomasa pelletizada y de la biomasa resultante después de cada uno de los ensayos realizados (inductores metálicos, fuente de carbono y curvas de remoción).

### **6.8.1 Determinación de peso húmedo**

#### **6.8.1.1 Biomasa libre**

La biomasa pelletizada que se produjo en 50 mL de caldo salvado con 10 discos de *P. ostreatus* luego de 8 días de incubación se filtró, esta biomasa retenida en el papel fue pesada y expresada como biomasa húmeda teniendo en cuenta la ecuación (2) y (3).

$$W_{\text{húmeda}} = W_{\text{papel con Bx}} - W_{\text{papel filtro}} \quad (2)$$

$$W_{\text{húmeda}} = \frac{\text{gramos Bx húmeda}}{50 \text{ mL de extracto}} \quad (3)$$

#### **6.8.1.2 Biomasa inmovilizada**

Se pesaron los hilos de fique sin colonizar y sin un previo tratamiento en horno de 80°C, a continuación se realizó el procedimiento de inmovilización utilizando biomasa pelletizada y nuevamente se pesaron los hilos de fique pero esta vez inmovilizados (sin un previo tratamiento de secado), para aplicar la ecuación (4) y (5).

$$W_{\text{húmeda}} = W_{\text{Bx Inmovilizada Inicial}} - W_{\text{hilos de fique}} \quad (4)$$

$$W_{\text{húmeda}} = \frac{\text{gramos Bx húmeda Inmovilizada}}{\text{hilo de fique}} \quad (5)$$

#### **6.8.1.3 Biomasa resultante de los ensayos realizados**

Se pesaron los tres hilos correspondientes a cada uno de los ensayos y/o tratamiento y se realizó una diferencia entre la biomasa húmeda obtenida después de realizar el ensayo y la biomasa inmovilizada para cada uno de ellos, para aplicar la siguiente ecuación (6) y (5).

$$W_{\text{húmeda Final}} = W_{\text{Bx Inmovilizada Final}} - W_{\text{Bx Inmovilizada Inicial}} \quad (6)$$

## **6.8.2 Determinación de Peso seco**

### **6.8.2.1 Biomasa libre**

Se determinará el peso del contenido micelial de *Pleurotus ostreatus* retenido por el papel filtro anteriormente pesado. Este papel más la biomasa se llevó a un horno de 80°C hasta llegar a peso constante (Guillén *et al.*, 1998). Una vez se consiguió peso constante se empleó la ecuación (7) y (8).

$$W_{\text{Seco}} = W_{\text{papel con Bx seco}} - W_{\text{papel filtro seco}} \quad (7)$$

$$W_{\text{Seco}} = \frac{\text{gramos de Bx}}{30 \text{ ml de extracto}} \quad (8)$$

### **6.8.2.2 Biomasa inmovilizada**

Se tomaron 45 hilos sin colonizar, se marcaron para identificarlos perfectamente y se llevaron a un horno a 80°C hasta peso constante, luego se pusieron 15 hilos en cada una de las cajas de Petri y se realizó la inmovilización como se planteó en el numeral 6.3.2. Después se tomaron los 45 hilos inmovilizados con *P. ostreatus* se pesaron y sometieron a un proceso de secado a 80°C hasta obtener peso constante para cada uno de los hilos, se sacó un promedio de ellos y finalmente se aplicó la ecuación (9) y (10).

$$W_{\text{Seco}} = W_{\text{seco Bx inmovilizada Inicial}} - W_{\text{seco } \bar{X} \text{ hilos de fique}} \quad (9)$$

$$W_{\text{Seco}} = \frac{\text{gramos Bx inmovilizada seca}}{\text{hilo de fique}} \quad (10)$$

### **6.8.2.3 Biomasa inmovilizada resultante de cada ensayo**

Se tomaron cada uno de los hilos correspondientes al ensayo respectivo se pesaron y luego fueron llevados a un horno a 80°C hasta obtener un peso constante para cada uno. Posteriormente se aplicó la siguiente ecuación (11) y (10).

$$W_{\text{Seco Final}} = W_{\text{humedo Bx inmovilizada Final}} - W_{\text{seco Bx Inicial}} \quad (11)$$

Con el objetivo de garantizar que la biomasa usada en cada uno de los tratamientos del diseño experimental fuera igual se realizó una estandarización de la misma, mediante la relación del peso húmedo con el peso seco.

## **6.9 Técnicas analíticas empleadas durante el estudio**

Se tomó extracto filtrado, se llevó a tubos falcón de 15 mL y se realizó una centrifugación a 6000 rpm por 20 minutos con el fin de eliminar todos los sedimentos que pudieran generar interferencia al momento de cuantificar los siguientes parámetros:

### 6.9.1 Cuantificación de Glucosa

Se tomo 0.25 mL de sobrenadante y se mezcló con 0.25 mL de ácido 3,5 Dinitrosalicílico (DNS), a continuación los tubos con la anterior mezcla se sometieron a ebullición por cinco minutos, luego la reacción se freno colocándolos en hielo durante 5 minutos, por último se adicióno 2,5 mL de agua destilada. Se leyó absorbancia de las muestras a 540 nm empleando el espectro Genesys teniendo como blanco agua destilada. Este procedimiento se realizo por triplicado. El consumo de glucosa se determino por medio de la técnica de oxidoreducción del ácido 3,5 Dinitrosalicílico (Miller, 1959). Para la curva de calibración se utilizo una solución de glucosa alimentaria en concentraciones ascendentes de 0.5 – 2 g L<sup>-1</sup> (**Anexo 7**).

### 6.9.2 Cuantificación de la actividad Lacasa

La enzima lacasa se determinó por la oxidación del ABTS (2,2'-azino-bis[3-etilbenziazolina-6-ácido sulfónico]), utilizando un volumen de reacción de 1 mL, se tomó 800 µL del extracto enzimático en tubos de ensayo y se adicióno a cada tubo 100 µL de (ABTS) 0.5 mM y 100 µL de buffer acetato de sodio 100 mM pH 4.5 (Gómez *et al.*, 2005). Se utilizo como blanco 900 µL de la muestra a analizar y 100 µL de buffer acetato de sodio (Gayosso *et al.*, 2004). Finalmente, se leyó la absorción a 436 nm con un tiempo de reacción de 3 minutos ( $\epsilon_{436} 29,300 \text{ l mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Una unidad de lacasa se definió como una micromol de ABTS oxidado por minuto (12) (Tinoco *et al.*, 2001) (**Anexo 8**).

$$ULac/L = \frac{\text{Absorbancia}}{29300 \cdot 0.3 \cdot \text{tiempo rx}} * 1000000 * \frac{1}{\mu L} \quad (12)$$

### 6.9.3 Cuantificación de la actividad Manganeso peroxidasa

La enzima MnP se determinó por el método de la oxidación de rojo de fenol con un volumen de reacción de 1 mL. Adicionando 700 µL de muestra, 50 µL de rojo de fenol 0.1%, 50 µL de lactato de sodio 25 mM, 50 µL MnSO<sub>4</sub> 100 µM, 50 µL de albúmina de huevo 0.1%, 50 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 µM y 50 µL de Succinato de sodio 20mM pH 4.5 ( $\epsilon_{610} 4,460 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) (Gómez *et al.*, 2005). Luego las muestras se llevaron a incubación durante 10 minutos a 25°C pasado el tiempo se agrego 40 µL de hidróxido de sodio 2N (**Anexo 8**).

Por último, las muestras fueron leídas en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 610nm, utilizando como blanco todos los anteriores reactivos excepto el peróxido de hidrogeno que se remplazó por 50 µL de muestra. Una unidad de MnP se definió como una µmol de rojo de fenol oxidado por minuto (13) (Michel *et al.*, 1991)

$$UMmP/L = \frac{\text{Absorbancia}}{4460 * 0,7 * 10} * 1000000 * \frac{1}{fd} \quad (13)$$

#### 6.9.4 Cuantificación de la actividad Lignina peroxidasa

La presencia de la enzima lignina peroxidasa se determino por la oxidación del alcohol veratrílico a veratrilaldehído, agregando 40 µL de alcohol veratrílico 10mM, 200 µL de buffer tartrato de sodio 0.25M con pH de 3.5, 50 µL de peróxido de hidrógeno 0,4 mM y 710 µL de muestra. Para que se evidenciara la reacción los reactivos químicos se colocaron en el siguiente orden: Buffer, alcohol, muestra y finalmente el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> antes de iniciar lectura (Fernández and Henao, 2007).

El blanco contenía 200 µL buffer, 760 µL de muestra y 40 µL de alcohol veratrílico (**Anexo 8**). La reacción se leyó en espectrofotómetro de luz ultravioleta después de un minuto de reacción (Genesys 10/UV) a una longitud de onda de 310nm. Los cálculos se realizaron empleando un coeficiente de correlación de  $\epsilon_{310}$  165 L. mmol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>. Una unidad de LiP se definió como una mmol de alcohol veratrílico oxidado por minuto (14) (Kirk and Farrel, 1997).

$$ULiP/L = \frac{\text{Absorbancia}}{1 * 165 * 0,75} * 1000 * \frac{1}{fd} \quad (14)$$

#### 6.9.5 Cuantificación de la actividad amilolítica

Se tomó 1 mL de almidón al 1% preparado en buffer fosfato (Anexo 9) y se mezcló con 1 mL de la muestra de la hora 0, 6, 12, 18 y luego cada 24 horas hasta el octavo día de la curva de remoción. Esta mezcla se llevó a incubar a 30°C durante 1h, al transcurso de este tiempo se paró la reacción con hielo por 10 minutos y luego se realizo la determinación de azúcares reductores por medio de la técnica de DNS (Pedroza *et al.*, 2007). Una unidad amilolítica se definió como la enzima capaz de oxidar un µmol de glucosa por min por litro.

#### 6.9.6 Unidades de Color

Las unidades de color se midieron en un espectrofotómetro marca Genesys a una longitud de onda de 600nm empleando como blanco agua destilada. La densidad óptica se transformo a unidades de color a través de la ecuación (15).

$$UC = \frac{500 * A2}{A1} \quad (15)$$

Donde A1 es la absorbancia de 500 UC estandarizada con una solución de platino-cobalto (Absorbancia longitud de onda seleccionada por el espectro de absorción= 0.132) A2 es la absorbancia del medio (Fernández and Henao, 2007).

Para transformar la decoloración en porcentaje se aplicó la fórmula (16).

$$\% \text{ Decoloración} = \frac{(UC \text{ inicial} - UC \text{ final})}{UC \text{ inicial}} * 100 \quad (16)$$

#### **6.9.7 Espectro de absorción**

Este parámetro se evaluó durante toda la curva de remoción (6h, 12h, 18, 24h y cada 24h hasta el octavo día), las muestras fueron diluidas 1/20 y luego se tomó 1 mL de cada una y se depositó en una celda de cuarzo realizando con el espectrofotómetro un barrido de exploración que evaluó un rango longitud de onda de 250nm a 750nm, teniéndose de esta forma valores para el espectro visible (400 – 800nm) y UV (200 a 400nm) (Fleming and Williams, 1968; Fernández and Henao, 2007).

#### **6.9.8 Microscopía electrónica de barrido**

Se tomó un hilo sin colonizar, un hilo correspondiente al tratamiento abiótico y uno hilo para 0h, 6h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h, 168h y 192h de la curva de remoción colonizado con *P. ostreatus*, cada una de las muestras se llevó al horno a una temperatura de 80°C hasta que se tuvo un peso constante, luego se cortó a 1cm\*1cm y se realizó la metalización en condiciones de prevacío (<10<sup>-1</sup> torr) con argón como gas de ataque (plasma) sobre una placa (ánodo) de oro-paladio (8:2), la película se depositó sobre las muestras (cátodo) a corriente de descarga de +/- 50mA y el espesor típico es de +/- 200 nm. Posteriormente se tomaron las imágenes a una magnitud de 100x y 1000x (**Anexo 10**).

#### **6.9.9 Prueba de viabilidad cualitativa**

Este parámetro se evaluó solo durante la curva de remoción del NR5 tomando un hilo de fique con biomasa inmovilizada correspondiente a cada tiempo de muestreo que fue sembrado en agar salvado de trigo e incubado por 8 días a 30°C. Esto con el fin de determinar la viabilidad de la biomasa después de ser sometida al tratamiento (**Anexo 11**).

#### **6.9.10 Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos se evaluaron por medio de un análisis de varianza (ANOVA), en el software estadístico Design Expert 9.0 con un nivel de confianza del 95%. Las superficies de respuesta fueron realizadas en el Software Statistic (Martínez *et al.*, 2005) (**Anexo 12**).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSION

### 7.1 Reactivación de las cepas fúngicas

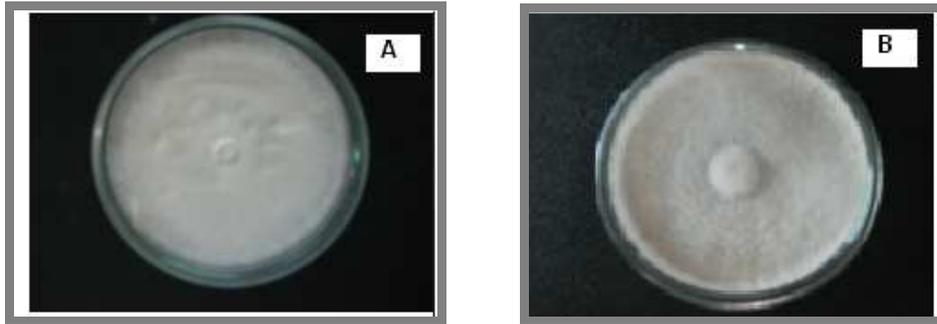
Al realizar la reactivación de las cepas se observó que los dos hongos crecieron de manera diferente, *Trametes versicolor* (Cepa control del estudio) formo micelio aéreo vegetativo reducido de color blanco a los 5 días (Figura 13A) y *Pleurotus ostreatus* después de 4 días presentó abundante micelio aéreo algodonoso de color blanco, formación de anillos geocéntricos y esporulación (Figura 13B).

Las morfologías coinciden con lo reportado por Pedroza, 2007 y Fernández and Henao, 2007, quienes trabajaron con *Pleurotus ostreatus* para el tratamiento de aguas residuales papeleras y degradación de Negro reactivo 5 respectivamente.

En cuanto a la microscopia *T. versicolor* (Figura 15A) y *P. ostreatus* (Figura 15B) presentaron hifas hialinas delgadas septadas, encontrándose producción de esporas redondas de tamaño pequeño solo en *P. ostreatus*.

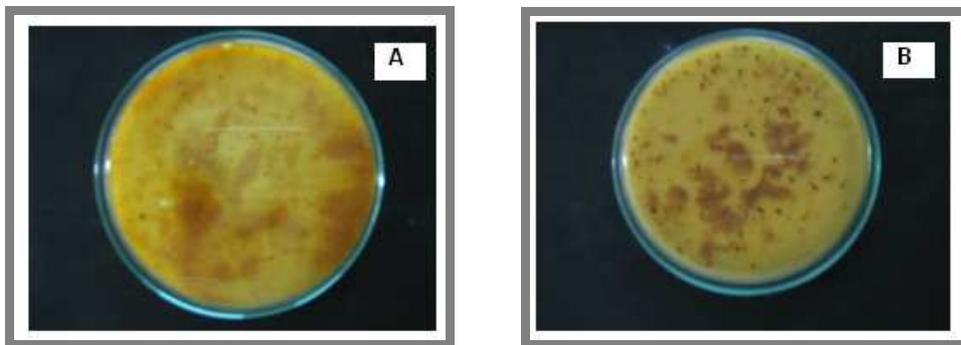
Al observar el lado opuesto de la caja de Petri de *T. versicolor* se encontró una coloración crema (Figura 14A), debida a la producción de pigmentos como L-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), catecol, glutaminil-3,4-dihidroxibenceno y 1,8-dihidroxinaftaleno (Caesar *et al.*, 1995). Estos pigmentos pueden estar asociados con la síntesis de melanina, la cual está directamente relacionada con la producción de enzimas ligninolíticas MnP y lacasa; teniéndose expresión de estas enzimas porque el medio extracto salvado de trigo ofrece a los hongos micro y macro nutrientes como: Tiamina, riboflavina, niacina, potasio, calcio, magnesio, sodio, fósforo, azufre y sales (Ha *et al.*, 2001), ideales para estimular metabolismo primario y secundario y del mismo modo la expresión de MnP y lacasa durante estos dos metabolismos (Guillén *et al.*, 1998; Ramírez *et al.*, 2003). Estableciéndose que este medio es el indicado si lo que se busca es la expresión de enzimas ligninolíticas por parte de hongos de la podredumbre blanca (HPB).

Adicionalmente la producción de melanina ha sido relacionada como un mecanismo de sobrevivencia usado para disminuir la toxicidad causada por la presencia de algunos metales, produciéndose de esta forma un cambio fisiológico en el micelio ya que entre mayor sea la producción de pigmentos este tiende a envejecer (Guillén and Machuca, 2008).



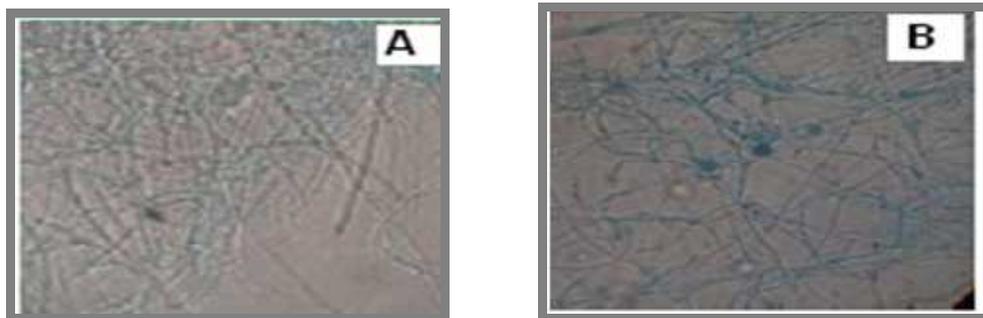
**Figura 13.** Macroscopía. **(A)** *Trametes versicolor*, **(B)** *Pleurotus ostreatus*, cultivo de 8 días, agar extracto de salvado de trigo, temperatura 30°C.

**Fuente.** (Autores, 2008)



**Figura 14.** En ves cajas de Petri. **(A)** *Trametes versicolor*, **(B)** *Pleurotus ostreatus*, cultivo de 8 días, agar extracto de salvado de trigo, temperatura 30°C.

**Fuente.** (Autores, 2008)



**Figura 15.** Microscopia. **(A)** *Trametes versicolor*, **(B)** *Pleurotus ostreatus*.

**Fuente.** (Fernández and Henao, 2007)

### 7.1.2 Selección del protocolo para inmovilización de biomasa fúngica sobre fique

Teniendo en cuenta que emplear biomasa inmovilizada para tratamientos de remoción de color presenta ventajas frente a la utilización de biomasa libre como: Reducción de costos debido a que se permite el uso en continuo del bioportador o reutilización de este en reactores discontinuos, disminución de etapas de purificación del producto, aumento en la producción (en este caso enzimas ligninolíticas), mayor superficie de contacto, conjuntamente que *P. ostreatus* responde de manera positiva al proceso de inmovilización utilizando soportes orgánicos, se decidió buscar para este estudio un soporte que fuese económico, fácil de manejar y sobre todo que simulara el hábitat natural del hongo con el objetivo de tener una mejor secreción de enzimas. Es por esto que se empleo fique (material abundante en Colombia), encontrándose que para este soporte aun no hay evidencia bibliográfica, lo que llevó a estandarizar un nuevo protocolo y a obtener resultados que servirán como base para futuros proyectos que involucren esta fibra como soporte a utilizar (Figura 16).

De acuerdo con lo planteado anteriormente, se encontró una muy buena respuesta del hongo en el protocolo CCP (Colonización con Pelletizado) debido a que con este sistema se logró una colonización uniforme de todos los hilos al cabo de 8 días a una temperatura constante de 30°C (Figura 17), de modo que, la biomasa pelletizada se comporto como una subunidad propagativa independiente, teniendo cada hilo varias microesferas sobre la superficie (Figura 18A), lográndose de este modo tener mayor cantidad de biomasa con elevada humedad (Figura 18B), siendo esto importante ya que para un crecimiento óptimo un hongo necesita entre 70 y 95 % de humedad (Suki and Croan, 2002).

Teniendo en cuenta que por hilo con biomasa inmovilizada se tenía un peso promedio de 1,6g (biomasa húmeda) de los cuales 0,2g correspondían al soporte sin biomasa, al finalizar los ensayos el peso húmedo de la biomasa aumentaba 5 veces (8g de biomasa húmeda/3 hilos) debido a la retención de agua del bioportador.

De igual manera, Castillo and Ortega (2007), inmovilizaron *T. versicolor* utilizando como soporte inorgánico estropajo reportando un valor aproximado de 7g/cubo expresado como biomasa húmeda debido a la diferencias estructurales de los soportes siendo el estropajo menos compacto que los hilos de fique.

Retomando lo anterior, con el protocolo CCD (colonización con discos) la colonización fue lenta, irregular y escasa (Figura 19A), teniéndose aproximadamente 0.5 g de biomasa húmeda/hilo, sabiendo que un hilo con biomasa pesa 0.2 g lo que ocasionaba

que la mayoría de los hilos de fique quedarán parcialmente colonizados o sin biomasa (Figura 19B), posiblemente porque la humedad era mucho menor a la encontrada en el protocolo CSP, viéndose influida la capacidad de crecimiento y adhesión del hongo al soporte (Suki and Croan, 2002).

Finalmente, se determinó que el fique favorece el crecimiento del hongo debido a que está compuesto de 85% humedad, 11.30% lignina, 8% de una mezcla entre sacarosa, proteínas, nitrógeno, fósforo, calcio y potasio, 6% celulosa y 1% de minerales (Ministerio Ambiente, 2006) por lo tanto, *P. ostreatus* pudo haber utilizado parcialmente los componentes del soporte durante el tratamiento de remoción de NR5.



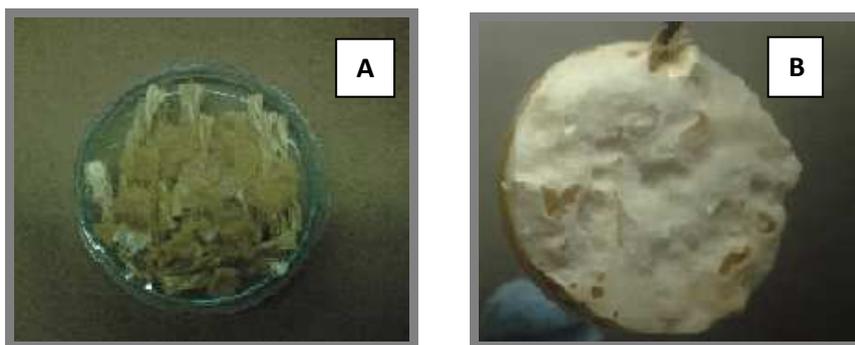
**Figura 16.** Soporte sin colonizar.

**Fuente.** (Autores, 2008)



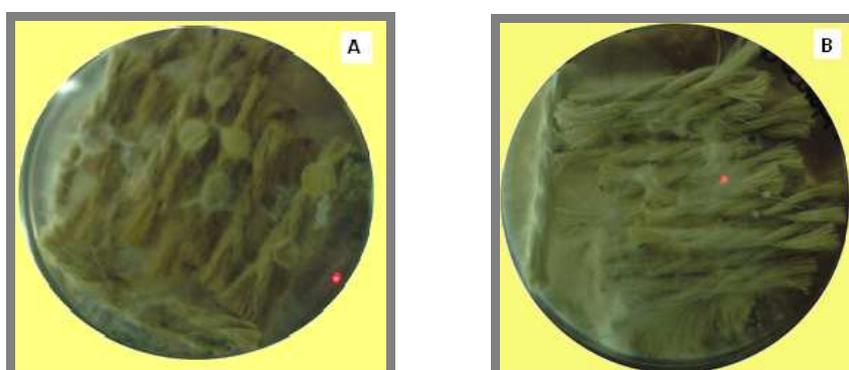
**Figura 17.** Soporte colonizado por *Pleurotus ostreatus*, cultivo de 8 días, agar extracto de salvado de trigo, temperatura 30°C.

**Fuente.** (Autores, 2008)



**Figura 18.** Inmovilización con biomasa pelletizada (CCP). **(A)** Inicial **(B)** Final, temperatura 30°C.

**Fuente.** (Autores, 2008)



**Figura 19.** Inmovilización con discos (CCD). **(A)** Inicial **(B)** Final, temperatura 30°C.

**Fuente.** (Autores, 2008)

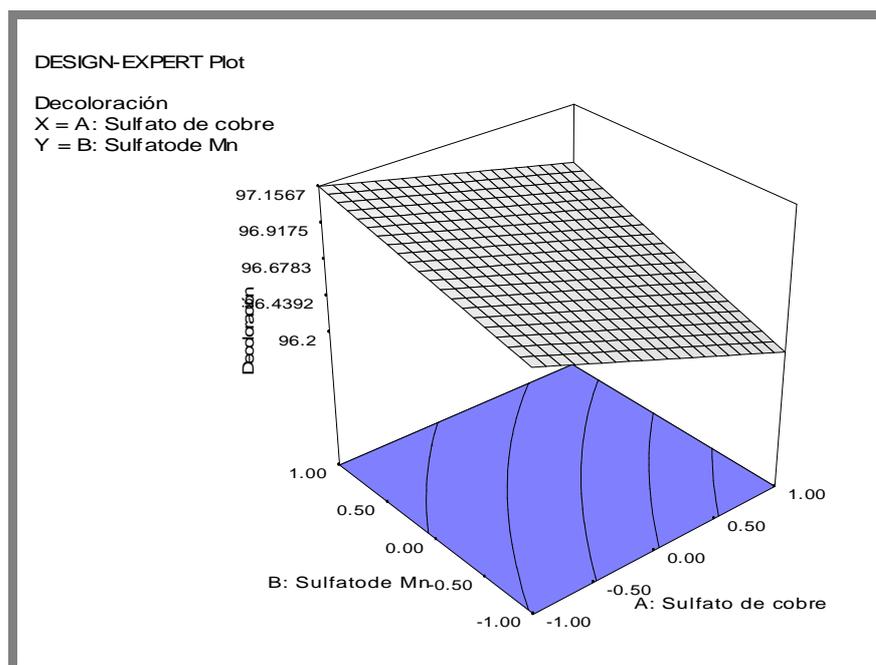
## 7.2 Evaluación de inductores metálicos y su efecto sobre la capacidad de decoloración y actividad enzimática

### 7.2.1 Diseño factorial 2<sup>2</sup>

De acuerdo con los resultados de la prueba ANOVA para la decoloración se observó que ninguno de los factores ni la interacción entre ellos tuvo un efecto significativo sobre la decoloración ( $p > 0.0001$ ), alcanzándose un porcentaje promedio de 95% de decoloración para todos los tratamientos (T1, T2, T3 y T4). Sin embargo, al realizar la comparación de medias entre tratamientos se determinó que al adicionar sulfato de cobre y sulfato de manganeso a razón de 150 y 360  $\mu\text{M/L}$  (T3) se obtuvo una decoloración significativamente mayor con respecto a los demás tratamientos ( $p < 0.0001$ ) (97%) (Figura 20), este valor se correlacionó positivamente ( $p = 0.002$ ) con la actividad de la enzima lacasa, ya que para este mismo tratamiento fue de 23 U/L (Figura 21). Con respecto a la actividad MnP la mayor respuesta se presentó en T2 (300  $\mu\text{M/L}$   $\text{CuSO}_4$  y 180  $\mu\text{M/L}$   $\text{MnSO}_4$ ) con un valor de 2.14 U/L (Figura 22), posiblemente esta enzima se

correlaciona en menor proporción con la decoloración ya que para esta combinación de inductores fue del 96% (**Anexo 12**). Tal vez, esta actuó en grupos diferentes al cromóforo como en los compuestos fenólicos y no fenólicos homólogos a la lignina resultantes de la degradación del colorante. Según Schlosser and Hofer, 1999 la enzima lacasa y MnP cooperan en la decoloración ya que la fenol oxidasa (lacasa) puede producir indirectamente  $H_2O_2$  por oxidación del  $Mn^{2+}$ .

Finalmente, con la actividad LiP los valores obtenidos en todos los tratamiento fueron muy similares y oscilaron entre 2.7-2.8 U/L, esta tendencia era esperada ya que se considera que los metales valorados no tienen un efecto inductor sobre esta ligninasa. Al analizar las gráficas de este diseño experimental se puede ver que a pesar de que no se presentó interacción entre factores la mayor elevación en la superficie de respuesta se da para los niveles bajos de  $Cu^+$  y altos de  $Mn^+$  (Figura 20) demostrando nuevamente que efectivamente se presentó una inducción de las dos enzimas por la presencia de los dos metales ya que al comparar con el control la decoloración no superó el 94% y las actividades fueron de 18 U/L para lacasa y ausencia ó no detección de MnP y LiP.



**Figura 20.** Respuesta de la decoloración frente a los inductores metálicos

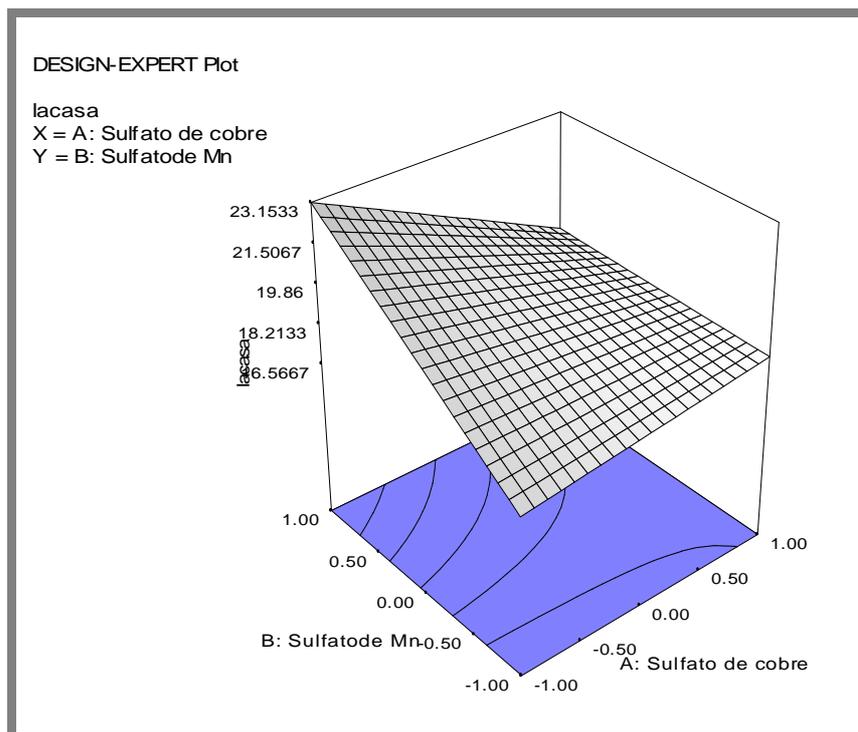


Figura 21. Respuesta de la actividad lacasa frente a los inductores metálicos

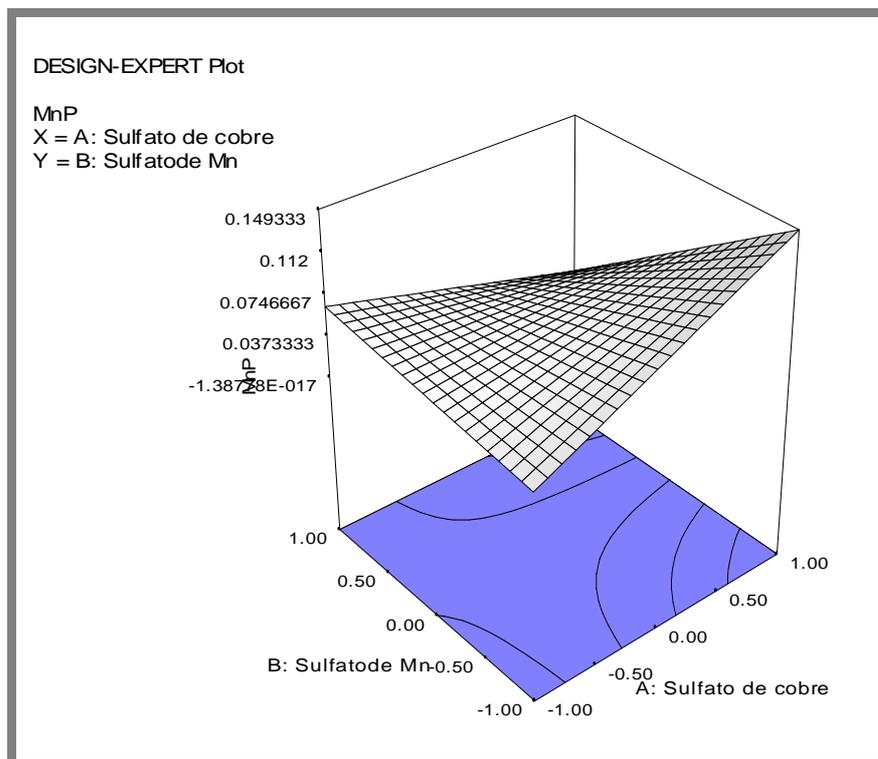


Figura 22. Respuesta de la actividad MnP frente a los inductores metálicos

### 7.2.2 Actividad enzimática Lacasa

Se ha descrito que los niveles de expresión de diferentes genes de lacasa dependen típicamente de las condiciones del cultivo (Mansur *et al.*, 1998), por ejemplo el cobre ha sido reportado como un fuerte inductor de la actividad en diferentes hongos de la podredumbre blanca como: *Phanerochaete chrysosporium* (Dittmer *et al.*, 1997), *Trametes pubescens* (Galhaup and Haltrich, 2001) y *P. ostreatus* (Baldrian and Gabriel, 2006).

También, Nyanhongo *et al.*, 2002 asocian la formación de pigmentos como la melanina con la presencia de metales como cobre y manganeso, encontrándose que esta aumenta en forma proporcional con la enzima lacasa principalmente; lo anterior se ratificó en este estudio al realizar el cultivo de *P. ostreatus* (Figura 14B). Encontrándose que al suplementar el medio Radha más colorante (150 ppm) con 150  $\mu\text{M/L}$   $\text{CuSO}_4$  y 360  $\mu\text{M/L}$   $\text{MnSO}_4$  se alcanzó la mejor actividad enzimática lográndose cuantificar 23U/L (Tabla 13), igualmente la mayor remoción de color con un 97% después de 4 días de tratamiento biológico. Lo que determina que la lacasa reacciona con el NR5 gracias a una interacción electrostática entre las fracciones aniónicas del colorante (grupos sulfónicos) y los aminoácidos cargados de la enzima (Dias *et al.*, 2004).

En presencia de cobre los niveles de transcripción de la enzima se aumentaron debido a que el centro activo de la enzima se compone de 4 átomos de  $\text{Cu}^{2+}$  lo que conlleva a que se ejerza un mecanismo de inducción a nivel transcripcional, al aumentarse la cantidad de mRNA transcrito,;Además a su vez según Collins and Dobson, 1997 a que se exprese el gen de metalotioneína responsable de ligar el cobre en forma de  $\text{Cu}^{2+}$  para luego ser utilizados por la enzima y a que se secreten iones calcio responsables de la estabilización de la lacasa resultante (Rincón, 2006; Taylor *et al.*, 2005). La inducción encontrada es argumentada por lo expuesto por Palmieri *et al.*, 2000 quienes encontraron que el cobre fue el inductor más eficiente de la actividad lacasa en *P. ostreatus* y la expresión de las isoenzimas fue regulada a nivel de transcripción genética.

El cobre es un micro elemento esencial para al menos algunos organismos, estas necesidades se pueden suplir con bajas concentraciones alrededor de 1-10 $\mu\text{M/L}$ , sin embargo se reporta que altas concentraciones de cobre son extremadamente tóxica para las células microbianas, siendo esta una posible razón de que a una concentración mayor de 150  $\mu\text{M/L}$  de  $\text{CuSO}_4$  hubiera hecho descender la expresión enzimática, debido a una posible interacción negativa entre el ion cobre y los ácidos nucleicos, a una alteración el sitio activo de la enzima y la oxidación de compuestos de membrana (Brown *et al.*, 1991; Swamy and Ramsay, 1999; Galhaup and Haltich 2001; Lorenzo *et al.*, 2005).

Lo anterior mostró que la cepa utilizada no presentó tolerancia a altas concentraciones de  $\text{Cu}^{2+}$  lo que podría indicar que *P. ostreatus* no produce agentes quelantes extracelulares o intracelulares, tales como ácido orgánicos y sideróforos, u otros mecanismos de defensa como formación de pigmentos, adsorción al micelio o gradientes de pH (Guillén and Machuca, 2008) que controlen la acción del cobre (evento postraducciona), haciendo que este metal sea transportado y esté disponible de acuerdo a sus necesidades. Según lo reportado por Minussi *et al.*, 2007 algunos hongos de podredumbre blanca como *T. versicolor* y *P. chrysosporium* degradan NR5 sin presencia alguna de sideróforos; sin embargo en el presente ensayo se encontró que si y solo si la concentración de  $\text{Cu}^{2+}$  es acompañada de  $360\mu\text{M}$  de  $\text{MnSO}_4$  se obtiene una expresión enzimática muy cercana a la encontrada en el T3, ello sugiere un efecto positivo del  $\text{MnSO}_4$  frente a la producción de lacasa debido principalmente a que se comporta como un micronutriente del medio lo que induce la biodegradación de la lignina y en segunda instancia a la capacidad de esta enzima para oxidar metales como el  $\text{Mn}^{2+}$  (Claus, 2003; Ramírez *et al.*, 2003). Mientras que para el hongo de podredumbre blanca *Ceriporiopsis subvermispota* se tiene evidencia de que el  $\text{Mn}^{2+}$  estimula el crecimiento del hongo, pero no está ligado a la cantidad de *lcs* mRNA transcrito, siendo este gen el que codifica la enzima lacasa (Manubens *et al.*, 2007).

Estudios previos han demostrado que el  $\text{Fe}^+$  también presenta una regulación a nivel traduccional sobre esta enzima ya que facilita la disponibilidad del mRNA para la síntesis del gen codificador para lacasa (Rincón, 2006), determinando de esta manera que el hierro presente en el medio Radha más colorante en forma de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  a razón de 0,1g, posiblemente contribuyó en la expresión de la enzima. Confirmando que tanto el  $\text{Cu}^{2+}$  como el  $\text{Fe}^+$  están interrelacionados en el metabolismo celular de los hongos y puede que la activación transcripcional por cobre también dependa del Fe a través de mecanismos específicos de la homeóstasis de Cu-Fe (Nakamura and Go, 2005).

Por otro lado, en el estudio realizado por Fernández and Henao, 2007 se utilizó la misma concentración de colorante y el mismo medio de cultivo sin la adición de inductores, pero en este caso *P. ostreatus* produjo solo 8 U/L de lacasa y una decoloración del 90 % al cabo de los mismos 4 días. De manera similar Pedroza 2007, obtuvo una producción de 2U/L aproximadamente en la degradación de licor negro (producto del agua residual de la industria papelera) por parte de *P. ostreatus*, aunque la expresión se aumentó al utilizar el mismo hongo en extracto salvado teniéndose 15U/L en 9 días; sin embargo estos valores no superaron los encontrados en el presente ensayo lo cual demuestra que la inducción con metales es altamente efectiva para el aumento de la expresión enzimática de la enzima lacasa y por ende de la remoción de color.

En el T3 el pH inicial se encontraba en 6.97 el cual descendió hasta 6.14 como resultado de la producción de ácidos debido a la asimilación de glucosa (inicial 2.65 g/L y final 0.15g/L). Demostrándose que esta fuente de carbono fue un sustrato de fácil asimilación que se internalizó por mecanismos de transporte activo para luego ser utilizado por rutas metabólicas como glicolisis y ciclo de Krebs (Ramírez *et al.*, 2003). El descenso de pH no fue tan drástico ya que se cree que los HPB pueden usar los ácidos generados durante el metabolismo como precursores para iniciar otras vías metabólicas, tal es el caso del glioxilato generado durante el ciclo de Krebs el cual se puede utilizar como antecesor del ciclo del glioxilato para conseguir la conversión neta de acetato a succinato y eventualmente la producción de carbohidratos, impidiéndose de forma paralela la acumulación y la disminución marcada en el pH (Guillén and Machuca, 2008).

El pH óptimo reportado para lacasa es cercano o igual a 4.5 (Lankinen, 2004), pero los datos generados en este estudio mostraron una buena expresión a pH de 6.14 (T3) lo que determina que esta enzima puede tener estabilidad en pH cercanos a la neutralidad factor importante ya que el pH real de los efluentes textiles suele encontrarse en 6.3 a 7.2 aproximadamente (Moeller and Garzón, 2003); Mayer and Staples, 2002 describieron en sus apartes que el comportamiento de lacasa es óptimo hasta un pH de 7, de igual manera autores como Gayosso *et al.*, 2004 expusieron que la actividad lacasa es mayor cuando se encuentra en un pH de 6 en comparación a valores de 4. Una posible razón que justifica la estabilidad de la lacasa a pH de 6.14 es la presencia de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) teniéndose evidencia bibliográfica que este ayuda en la estabilización del punto isoeléctrico (pI) de las 4 isoenzimas de la lacasa el cual oscila entre 3,45 y 6,5 en cultivo líquido (Lobo and Peña, 2002) protegiéndola de esta manera de una posible denaturalización. El calcio en este estudio está presente en forma de Cloruro de calcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) en el medio Radha más colorante además, según lo establecido anteriormente la producción de lacasa hace que se secrete iones calcio que pueden estabilizar la enzima (Collins and Dobson, 1997) y de forma directa o indirecta protegerla de la denaturalización.

### **7.2.3 Respuesta de la actividad MnP**

La actividad de esta enzima se fundamenta en la oxidación del  $\text{Mn}^{2+}$  a  $\text{Mn}^{3+}$  usando  $\text{H}_2\text{O}_2$  como sustrato, el  $\text{Mn}^{3+}$  por su parte está asociado con ácidos orgánicos (ácido málico y ácido oxálico) y actúa como agente primario en la ligninólisis llevando a la oxidación de compuestos aromáticos clorados por oxidación vía dos electrones (Pedroza, 2007; Cullen, 1997). La combinación de  $300\mu\text{M/L}$   $\text{CuSO}_4$  y  $180\mu\text{M/L}$   $\text{MnSO}_4$  en esta investigación indujo la actividad enzimática en T2 obteniéndose  $2.14\text{U/L}$ , a pesar de

mostrar la mayor actividad esta no se relacionó con la remoción de color, ratificándose con los resultados del análisis de comparación de medias entre tratamientos donde se demostró que el T3 (150  $\mu\text{M/L}$   $\text{CuSO}_4$  y 360  $\mu\text{M/L}$   $\text{MnSO}_4$ ) fue el que presentó diferencia significativa con respecto a los demás tratamientos ( $p > 0.0009$ ) obteniéndose 0.92U/L de MnP (Figura 22), lo que demuestra que esta enzima tiene baja participación en la degradación del NR5 contrario a lo que ocurre con la enzima lacasa. Es decir, la MnP pudo haberse expresado debido a que el fique tiene lignina lo que hace que la enzima oxide los fenoles constituyentes de la lignina a radicales fenoxilicos (Cullen, 1997).

Los resultados obtenidos demostraron que esta enzima requiere de la combinación de los dos inductores metálicos para su expresión ratificando que el peróxido y otros metales como el cobre, zinc, plata y cadmio inducen la acumulación de *mnp* mRNA pero no la producción de MnP, ya que para que haya una expresión total de la enzima es necesario que el manganeso esté presente en forma de sales en el medio esto con el fin de disminuir la toxicidad que los iones metálicos pueden presentar frente a los hongos de podredumbre blanca (Li *et al.*, 1995; Manubens *et al.*, 2007). De igual manera, se encontró que concentraciones altas de  $\text{CuSO}_4$  y  $\text{MnSO}_4$  reprimen la actividad de MnP como se observó en el T4, debido tal vez a la generación de grandes cantidades de peróxido de hidrógeno lo que conlleva a que se rompa el ciclo catalítico de la enzima (Gómez *et al.*, 2005) y también a que posiblemente se pudo presentar alteraciones en el grado de ionización de los grupos carboxilo y amino presentes en las cadenas de los aminoácidos lo que afectó la unión del sustrato a la enzima y el ensamblaje preciso entre ambos o cambios en la estructura de la proteína, generándose una desnaturalización de la molécula debido a una interferencia de las interacciones débiles (puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals) que mantienen la estructura tridimensional (Fernández and Henao, 2007).

Por otra parte, el aumento de la enzima en el T2 se pudo deber a los componentes dadores del  $\text{Mn}^{+2}$  ya que la enzima MnP oxidó el  $\text{Mn}^{+2}$  a  $\text{Mn}^{+3}$  obtenido de la concentración de sulfato presente en este tratamiento, además que la concentración de carbono y nitrógeno son determinantes para la expresión y la concentración de sulfatos en el medio debido a que es un factor adicional que puede estar limitado o en exceso (Schlosser *et al.*, 1997).

Así mismo, los resultados mostrados en este trabajo fueron mayores a los de Guillén *et al.*, 1998 quienes usaron *P. ostreatus* con un sustrato cometabolizable como la glucosa (5g/L), pH inicial de 5,5 a 6,5 y una temperatura de incubación de 29°C obteniendo 0.41U/L de Manganese peroxidasa, posiblemente este valor fue superado por el empleo de inductores metálicos y porque el fique es un material compuesto de lignina lo que

conlleva a que la enzima ataque las estructuras fenólicas de la lignina extrayendo un hidrógeno de los radicales fenoxi originándose radicales como vainillina, alcohol vainillínico, ácido protocateico y grupos metoxi (Hofrichter, 2002).

Del mismo modo, Fernández and Henao, 2007 quienes también emplearon *P. ostreatus* reportaron una producción de 0.33U/L degradando NR5 a 150ppm; ratificando así que la adición de inductores aumenta la actividad de la enzima MnP. También, Herrera and Rosas, 2003 encontraron que utilizando *Pleurotus ostreatus* inmovilizado en espuma para la biorremediación de aguas residuales provenientes de una industria papelera exactamente licor negro diluido 1/10 encontraron un mayor expresión al octavo día de fermentación con 0.038 U/L, pero al usar Tween80 como protector enzimático y la adición de 2mM MnSO<sub>4</sub> y 5ppm CuSO<sub>4</sub> como inductores enzimáticos del hongo *Trametes versicolor* para la degradación de efluentes sin esterilizar de la industria papelera obtuvieron valores máximos de 18.172U/L, tal vez debido al uso del protector (Gómez *et al.*, 2005)

Otra de las formas para aumentar la expresión de esta enzima además de la adición de inductores enzimáticos al medio, es el control de la concentración de oxígeno que entra al sistema, el cual se comporta como un factor limitante en el proceso de expresión enzimática al tener un efecto regulador sobre la producción y el descenso de las mismas, ya que al parecer juega un papel importante a nivel de transcripción durante la síntesis de MnP (Ha *et al.*, 2001), por lo que manejando una agitación de 150 rpm durante 4 días en el presente estudio se consigue una buena expresión.

Bajo otro punto de vista, otro factor que regula la expresión enzimática es el pH estando este en un rango de 6 a 7 al pasar los cuatro días de tratamiento, los resultados mostrados en este trabajo fueron superiores a los expuestos por Gill and Arora, 2003 y Heinfling *et al.*, 2002 quienes determinaron que la enzima MnP es inestable a pHs mayores a 7,5 y que por encima de pH 6.6 no se genera actividad de MnP, sin embargo, en este ensayo valores de 6,7 y 6,8 permitieron la actividad de dicha enzima, indicando que a pesar de que en este estudio se obtuvo pHs más altos, la enzima estuvo presente.

También se tiene evidencia bibliográfica de que *P. ostreatus*, presenta actividad MnP a pHs entre 5.0 y 6.5 con un valor máximo de 11.66U/L y a pHs entre 5.5 y 6.0 con 13.64U/L, de manera que con los resultados obtenidos en este ensayo se amplió el rango de actividad así no se superaran los valores, esto es algo lógico ya que los primeros se obtienen después de realizar una fermentación utilizando como medio el caldo extracto de salvado de trigo siendo este de más fácil asimilación en comparación con el Radha más colorante que es un medio algo más complicado de degradar por *P. ostreatus*.

## 7.2.4 Respuesta de la LiP

Según Lankinen, 2004, *Pleurotus ostreatus* no es un hongo productor de LiP, esto es apoyado por Vyas *et al.*, 2007 quienes no detectaron esta enzima utilizando el mismo hongo en una fermentación sólida empleando como sustrato paja, de igual manera ocurrió en el trabajo realizado por Ha *et al.*, 2001 quienes utilizaron extracto de salvado como medio de producción de enzimas ligninolíticas, encontrando que la LiP no se expresó bajo las condiciones de fermentación estandarizadas; sin embargo, los datos generados en el estudio de Fernández and Henao, 2007 mostraron que *P. ostreatus* produjo aproximadamente 0.18 U/L de LiP durante la remoción de color de NR5 a 150ppm, del mismo modo ocurrió en este ensayo donde se tuvo una expresión enzimática constante en todos los tratamientos con un valor aproximadamente de 2.8 U/L (Tabla 13), lo que indicó que el  $MnSO_4$  y el  $CuSO_4$  no producen ninguna inducción por los metales siendo esto factible ya que solo se reporta que presentan inducción sobre lacasa y MnP (Collins and Dobson, 1997; Palmieri, 2003; Gayosso *et al.*, 2004).

Es posible que la expresión se hubiese dado gracias a que LiP rompe enlaces C-C y oxida unidades no fenólicas que pudieron ser producto previo del accionar de la MnP y lacasa (Herrera and Rosas, 2003). Adicionalmente los datos llevan a pensar que esta enzima hubiese podido mostrar una mayor expresión si el medio Radha más colorante presentara un pH óptimo como el sugerido por Lucas *et al.*, 2001 y Wesenberg *et al.*, 2003 oscilando entre 2.5-5.0, lo cual contrasta con este ensayo ya que el pH se mantuvo por encima de 6. Otra posible causa se enfoca en que la actividad de esta enzima es limitada por exceso de peróxido de hidrógeno generado de la acción de la glioxal oxidasa, lo cual puede ser controlado con la adición de alcohol veratrílico o triptófano que cumplen la misma función (Collins and Dobson, 1997).

**Tabla 13.** Resultados Matriz factorial 2<sup>2</sup>

T	Factor X <sub>1</sub> CuSO <sub>4</sub>	Factor X <sub>2</sub> MnSO <sub>4</sub>	% Dec	$\sigma$	U MnP/L	$\Sigma$	U Lac/L	$\Sigma$	U LiP/L	$\Sigma$
1	-1	-1	96,83	0,5	0,53	0,5	16,57	2,1	2,81	0
2	+1	-1	96,2	0,8	2,14	0,4	17,78	3,4	2,8	0
3	-1	+1	97,15	0,3	0,92	0,5	23,15	5	2,72	0,1
4	+1	+1	96,76	0,6	0	0	19,59	2,9	2,79	0,1
*5	---	---	0,87	0,2	0	0	0	0	0	0
*6	---	---	45,53	0,2	0	0	0	0	0	0
*7	---	---	67,35	1,4	7,46	0,4	27,3	1,1	2,87	0

*8	---	---	94,93	0,6	0	0	19,05	1,5	1,44	0
*9	---	---	90,67	1,6	0	0	18,81	0,9	0	0

\*5: Control Absoluto

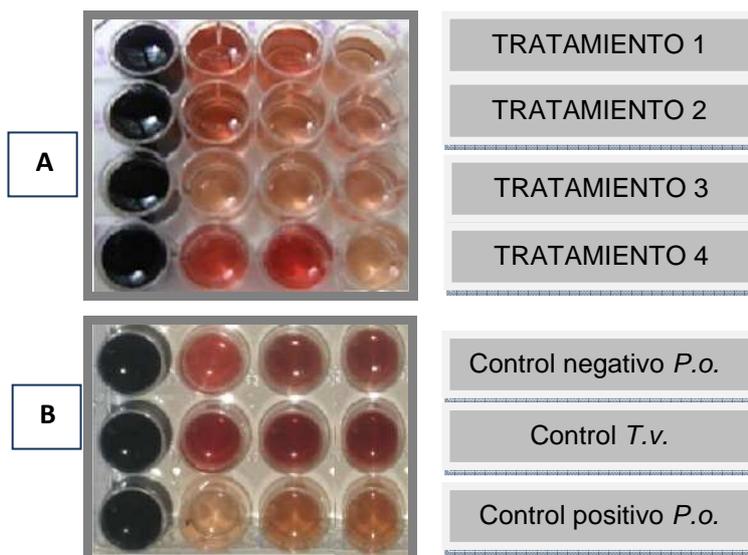
\*6: Control Adsorción

\*7: Control positivo *Trametes versicolor*

\*8: Control positivo *Pleurotus ostreatus*

\*9: Control negativo *Pleurotus ostreatus*

Finalmente, en las siguientes etapas de este estudio no se trabajara con *T. versicolor* ya que esta cepa solo fue empleada como control debido a que Fernández and Henao, 2007 la reportaron como superior en comparación con *P. ostreatus* en cuanto a la decoloración de NR5 a 150 ppm teniéndose un 98.16% y 90.40% respectivamente, sin embargo, al utilizar inductores metálicos en este estudio la remoción de color fue superada por *P. ostreatus* lo que indicó que sería la cepa a evaluar en los siguientes pasos.



**Figura 23. (A)** Decoloración de NR5 durante 4 días utilizando combinación de inductores metálicos, **(B)** Controles, 4 días, 30°C a 150rpm.

**Fuente.** (Autores, 2008)

### 7.3 Selección de la fuente de carbono como co sustrato para la degradación de NR5

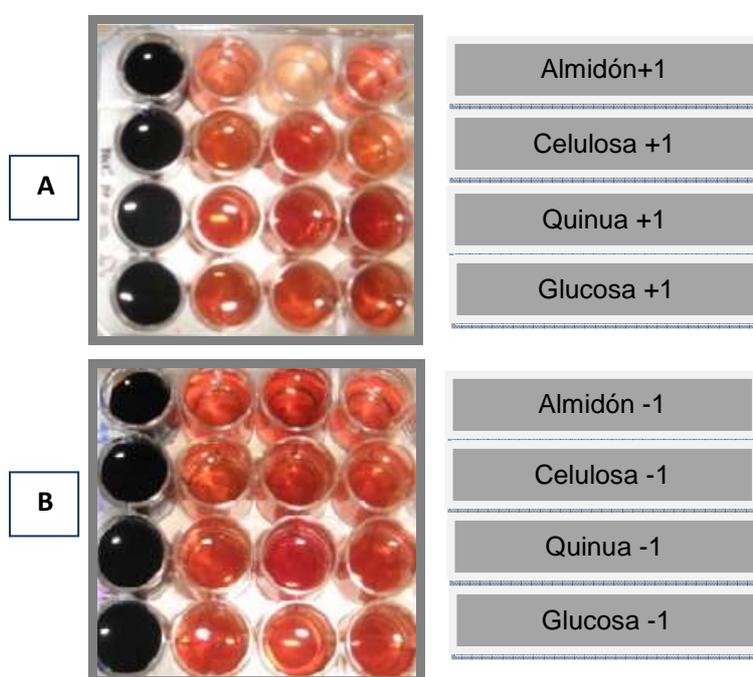
Algunos autores proponen que la degradación de colorantes resulta más eficiente agregando un co sustrato de crecimiento alternativo que ayude al microorganismo a metabolizar y transformar un compuesto de difícil degradación (Quiroz, 2002). Por tal razón se probó la capacidad de remoción de *P. ostreatus* utilizando un co sustrato diferentes a glucosa como: Celulosa, almidón y quinua en presencia de los inductores metálicos (150  $\mu\text{M/L}$   $\text{CuSO}_4$  y 360  $\mu\text{M/L}$   $\text{MnSO}_4$ ) y de forma paralela evaluar la expresión de MnP, LiP y lacasa.

De acuerdo con los resultados obtenidos en la comparación de medias se demostró que *P. ostreatus* presentó la mejor decoloración y producción de enzimas ligninolíticas cuando se utilizó como fuente de carbono almidón en una concentración de 2.0 g/L (T1+1) y 0.2 g/L (T2-1), finalmente se decidió trabajar con 0.2 g/L de almidón ya que no se encontraron diferencias significativas con respecto a la concentración mayor de 2.0 g/L y por el contrario si se utilizaba en mayor cantidad (Tabla 14) (**Anexo 12**). La afinidad de *P. ostreatus* por el almidón se debió a que es más fácil de degradar en comparación con la celulosa que presenta enlaces tipo  $\beta$ -1,4 y la quinua que presenta el mismo tipo de enlace que el almidón ( $\alpha$ -1,4 y  $\alpha$ -1,6) (Moreno and Nocove, 2001) pero está unida a diferentes aminoácidos lo que hace más difícil su degradación.

Es de gran importancia resaltar que no se reportan muchos estudios donde *P. ostreatus* utilice almidón como co sustrato en presencia de inductores metálicos para la degradación de NR5 lo que suma al trabajo gran importancia e innovación.

La asimilación de almidón como fuente de carbono se dio posiblemente porque en las primeras fases de experimentación (Reactivación, propagación e inmovilización) se empleó caldo extracto de salvado el cual contiene almidón residual, hemicelulosa y celulosa, lo que conllevó a que el hongo se adaptara a la presencia de este sustrato y expresara enzimas de tipo glicosilhidrolasas para poder degradar el almidón (Choteborska *et al.*, 2004), consiguiéndose exactamente una actividad amilolítica de 15 U/L; teniendo en cuenta que se definió la unidad como la cantidad de enzima capaz de oxidar una  $\mu\text{mol}$  de glucosa en las condiciones del estudio por minuto por litro. Con la degradación del co sustrato se consiguió que el hongo pudiese mantener su metabolismo y hubiese sido capaz de producir enzimas de tipo ligninolíticas que intervinieron directamente en la decoloración, encontrándose después de 4 días de tratamiento un 96% de remoción del NR5 (Figura 24), siendo esta directamente proporcional con la disminución en la concentración del colorante, pasando de 160 ppm a 6,65 ppm. Lu *et al.*, 2008 utilizaron métodos analíticos como UV-VIS y HPLC y

establecieron los posibles pasos de degradación del colorante azo violeta 5 por *P. ostreatus* siendo este colorante estructuralmente similar al NR5 y dilucidaron que puede ser reducido por la adición de 4 átomos de hidrógeno en el tercer anillo benzoico y luego 2 grupos hidroxilos se combinan y se pierde una mol de agua para formar un éter. En adición, una serie de reacciones químicas se continúan desarrollando y se origina una cetona aldehído. Finalmente, se forman intermediarios como: 2-naftol, 1,2-naftalenodiol, 1,2-naftoquinona, 1-amino-2-naftol, ácido bencenosulfónico y ácido -4-hidroxibencenosulfónico (Lu *et al.*, 2008). Los cuales no absorben en la longitud de onda para el colorante y por el contrario generan un corrimiento hacia el UV que coincide con los intermediarios aromáticos.



**Figura 24. (A)** Decoloración de NR5 durante 4 días utilizando niveles altos de fuentes de carbono, **(B)** Decoloración utilizando niveles bajos de fuentes de carbono, 30°C a 150rpm.

**Fuente.** (Autores, 2008)

La mayoría de estudios sobre remoción de colorantes presentes en efluentes relacionan la decoloración con la producción de enzimas de tipo fenol oxidasa y peroxidasas (Gayosso *et al.*, 2004; Fernández and Henao, 2007; Castillo and Ortega, 2007) los datos de este ensayo mostraron una vez más que la enzima con mayor participación en la decoloración fue lacasa teniéndose 15.08 U/L, debido posiblemente a que no solo es capaz de oxidar fenoles y metoxifenoles sino también hace demetilaciones, es decir ataca los CH<sub>3</sub> del NR5 (Wesenberg *et al.*, 2003). Además, el incremento en la producción

de lacasa se puede deber a que algunos componentes del agua residual como estructuras fenólicas inducen de manera indirecta a la lacasa (Días *et al.*, 2004).

Por otra parte, utilizando 0.2 g/L de almidón se obtuvo una expresión de MnP de 0.23 U/L y LiP 0.08U/L; estas peroxidasas se expresaron tal vez porque con la degradación del almidón se generaron monómeros de glucosa los cuales sirvieron como sustrato de la enzima glucosa oxidasa favoreciéndose así la producción de peróxido de hidrógeno, constituyente indispensable para comenzar los ciclos catalíticos de la MnP y LiP (Hofrichter, 2002; Rincón, 2006). De igual forma posiblemente se generaron compuestos como oxalato, glioxalato y fumarato que actúan como agentes quelantes y estabilizan el  $Mn^{3+}$ , ión que es generado por la MnP y es capaz de oxidar compuestos fenólicos (Manzano *et al.*, 2004). Así mismo, la composición ligninolítica del fique ayudó a que estas peroxidasas pudieran expresarse (Quiroz, 2002).

Un estudio similar fue el realizado por Hou *et al.*, 2004 quienes optimizaron la fuente de carbono para mejorar la producción de lacasa de *P. ostreatus*, encontrando que es capaz de asimilar diferentes polímeros como celulosa, celobiosa, glucosa, glicerol y almidón pero teniéndose una mejor producción de lacasa en presencia de celobiosa después de 14 días de tratamiento (120 U/L) y la más baja expresión de lacasa en presencia de almidón con 30 U/L. Los anteriores resultados se asimilan a lo que se obtuvo en este ensayo ya que el hongo pudo producir lacasa en todas las fuentes de carbono analizadas (Tabla 14), pero la mejor producción fue en presencia de 0.2 g/L de almidón con 15 U/L. Posiblemente se obtuvo el doble de expresión de lacasa utilizando almidón en el estudio de Hou *et al.*, 2004 porque hubo mayor tiempo de tratamiento (15 días), el colorante no era un azoico sino una antraquinona y la relación de almidón era de 10 g/L; esto lleva a pensar que los datos obtenidos en el presente ensayo no fueron para nada despreciables ya que se obtuvieron en un menor tiempo, con un colorante de más difícil degradación por los hongos de podredumbre blanca (Knapp *et al.*, 1995) y utilizando una concentración de almidón mucho más baja (0.2 g/L) lo que le atribuye importancia al experimento.

También, hay evidencia bibliográfica de que utilizando la levadura *Debaryomyces polymorphus* y diferentes co sustratos como maltosa, sacarosa y almidón en una concentración de 5g/L en la degradación de NR5 a 250ppm/L se obtuvo que el microorganismo consumió todas las fuentes a excepción del almidón, lo que muestra que a pesar de estar catalogada dentro del fylum de los hongos no es capaz de expresar enzimas de tipo glicosilhidrolasas que permitan la degradación de este polímero (Yang *et al.*, 2005).

Por otra parte, en cuanto al pH en el tratamiento con baja concentración de almidón se presento un descenso de 6.78 a 6.65 determinándose que a pesar de la disminución el pH de mantuvo en un rango próximo al neutro, tal vez como consecuencia de la producción de metabolitos como las enzimas ligninolíticas y por el ataque de las lacasas a compuestos no fenólicos presentes en la degradación del colorante lo que produce un bajo potencial de ionización (Pérez *et al.*, 2006; Shrivastava *et al.*, 2005). Esta ionización afecta directamente el pH ya que entre menor sea la capacidad ionizante presente en la reacción enzimática el pH tiende a ser neutro (Novotny *et al.*, 2001).

El pH del tratamiento almidón -1 ha sido reportado como óptimo para lacasa pero no para las peroxidases de *P. ostreatus*, ya que la MnP es estable entre un pH de 5 y 6.5 y LiP entre los pH's de 4.5 y 7.0 (Herrera and Rosas, 2003), lo que sugiere tal vez, que la cepa utilizada en este ensayo sea capaz de expresar enzimas estables a pH's diferentes de los reportados como óptimos; sería de gran valor en futuras estudios enfocarse en dicha hipótesis.

Schlosser *et al.*, 1997 realizaron pruebas de estabilidad de la enzima Lacasa a pHs entre 3.5 a 6.0 encontrando, que en el extracto crudo la mejor actividad se presenta a pH 3.5 con valores aproximados de 1.5U/L cuando es cuantificada por medio de la oxidación del ABTS, valor similar obtenido por nosotros (15.08U/L) pero a un pH mayor ampliándose de esta manera el rango de activad.

**Tabla 14.** Matriz fuentes de Carbono

T	Fuente de Carbono	% DEC	$\sigma$	MnP/L	$\sigma$	LiP/L	$\sigma$	LAC/L	$\sigma$	Actividad enzimática U/L*min	$\sigma$
+1	Almidón 2 g/L	96,8	0,2	0,3	0,1	0,0	0,0	11,9	2,5	10,3	0,2
-1	Almidón 0,2 g/L	96,0	0,6	0,2	0,3	0,1	0,1	15,1	3,4	15	0,8
+2	Celulosa 2 g/L	95,0	0,5	0,0	0,0	0,1	0,1	7,5	1,2	17,11	1,7
-2	Celulosa 0,2 g/L	95,5	0,4	0,3	0,4	0,3	0,2	10,1	0,7	14	0,8
+3	Quinoa 2 g/L	94,1	0,2	0,0	0,0	0,1	0,1	14,3	2,6	N.A.	N.A.
-3	Quinoa 0,2 g/L	96,1	0,4	0,1	0,1	0,1	0,1	8,8	6	N.A.	N.A.
+4	Glucosa 2 g/L	94,4	0,3	0,2	0,1	0,3	0,1	6,6	3,4	N.A.	N.A.
-4	Glucosa 0,2 g/L	96,3	0,4	0,0	0,0	0,0	0,2	12,9	5,4	N.A.	N.A.
5	Sin glucosa	94,0	0,0	0,9	0,1	0,0	0,0	12,6	3	N.A.	N.A.

#### 7.4 Curva de remoción a nivel de matraz

Una vez determinada la mejor combinación de inductores metálicos ( $150\mu\text{M/L CuSO}_4$  y  $360\mu\text{M/L MnSO}_4$ ) y fuente de carbono (almidón  $0,2\text{g/L}$ ) que favoreció la decoloración del NR5 se llevo a cabo la curva de remoción con su respectivo control abiótico. Esta curva se realizó para determinar el comportamiento de la actividad enzimática ligniolítica (Lac, MnP y LiP) y glicosilhidrolasas (amilasas) en la decoloración del NR5 a través del tiempo (8 días).

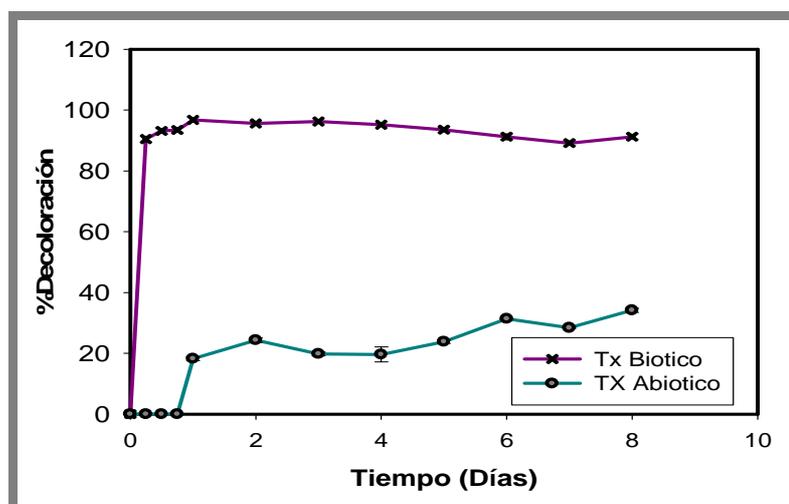
##### 7.4.1 Porcentaje de decoloración y concentración de NR5

El porcentaje de decoloración incremento desde la hora 6 con 90%, hasta la hora 24h con un 97% y este se mantuvo durante los ocho días.

Al analizar la comparación de medias entre tiempos se confirma lo observado en la Figura 25, encontrando que existe una diferencia altamente significativa ( $p < 0.0001$ ) la cual demuestra que la mayor decoloración se obtiene a las 24 horas con 97% disminuyendo la concentración del NR5 de 150ppm a 4.7ppm.

Esto explica lo obtenido en los resultados de la correlación de variables hasta las 24h en donde se determinó una correlación negativa pero altamente significativa ( $p < 0.0001$ ) entre la decoloración y la concentración de colorante indicando con un 99.9% de certeza estadística que estas dos variables se relacionan en las primeras 24h de la cinética, ya que al aumentar el porcentaje de decoloración disminuye la concentración del colorante **(Anexo 13)**.

Estos resultados sugieren emplear como tiempo de retención en reactor 24 horas



**Figura 25.** Comparación entre decoloración biótica y abiótica. 8 días, 150 rpm, 30°C, pH 6,7.

Cabe destacar que los datos obtenidos fueron superiores a los de Fernández and Henao, 2007 quienes emplearon el mismo HPB y colorante teniendo un decoloración de 44.37%, 90% y 95% en concentraciones de 300ppm, 150ppm y 75ppm de NR5 respectivamente, demostrando que los inductores metálicos y del co sustrato (almidón) efectivamente aumentaron la decoloración en un 7% en este ensayo a 150 ppm, en solo 24h comparado con los cuatro días de tratamiento reportado en el estudio de ellos. Sin embargo, la investigación de Fernández and Henao, 2007 fue de gran ayuda al demostrar que el estudio debía limitarse a concentraciones de colorante entre 150 ppm y 75 ppm debido a que altas concentraciones de NR5 ejercían un efecto negativo en *P. ostreatus*.

Del mismo modo, los resultados obtenidos en este ensayo también superaron los logrados por Minussi *et al.*, 2001 quienes emplearon diferentes HPB para la remoción de NR5 sin resultados de decoloración para *Trametes villosa* y *Phanerocheate chrysosporium*, pero si para *Lentinula edodes* y *T. versicolor*, obteniéndose una decoloración de 75% en 22 días y 25% en 16 días respectivamente, a pesar de que no se empleo a *P. ostreatus* se puede realizar la comparación porque estos hongos son de la misma familia y comparten algunas características como la producción de enzimas ligninolíticas, lo que indica que los resultados del presente estudio además de aumentar la remoción de colorante también disminuye el tiempo de retención en el reactor teniendo como ventaja una mayor y más rápida decoloración de este colorante.

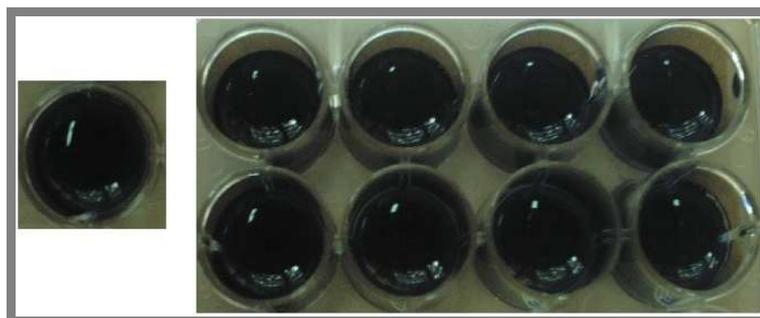
Los resultados logrados utilizando *P. ostreatus* en la remoción de otro colorante Di-azo conocido como Naranja ácido 24 (250 ppm) fueron inferiores a los reportados en este estudio, pues, se obtuvo 76% de decoloración en siete días (Moeller and Garzón, 2003), comparado con un 97% de decoloración a las primeras 24h empleado el mismo hongo y un colorante di azo (NR5).

Del mismo modo, las investigaciones anteriormente reportadas no superaron los obtenido en este trabajo debido a que la adición de los inductores metálicos (sulfato de cobre y de manganeso) y el co sustrato (almidón) como fuente de carbono favorecieron la actividad de lacasas y por tanto incrementaron la decoloración en un menor tiempo.

Otro factor que promovió la remoción de color fue el fique (soporte) por medio de su capacidad absorbiva, ya que el colorante NR5 tiene en su estructura un grupo auxocrómo que le proporciona la afinad a las fibras, siendo en este caso el fique una fibra biodegradable compuesta de celulosa y lignina (Arroyave and Velásquez, 2001), por ello se realizó una comparación de medias entre el tratamiento biótico (T1) y abiótico (T2) (**Anexo 13**) para determinar cuál favoreció en mayor proporción la decoloración y

conocer el comportamiento del bioportador en función del tiempo de proceso estableciendo los tiempos de máxima decoloración durante los ocho días de la curva de remoción, el sistema biótico (*P. ostreatus*) presento diferencia significativa en relación a la decoloración ( $p < 0.0001$ ) con el abiótico (fique), teniendo en cuenta que la mayor decoloración en T2 se obtuvo a los 8 días con un valor de 34% mientras que en el T1 se obtuvo al primer día con un valor de 97% (Figura 25), estos resultados determinaron que a pesar de las características que presento el T2 favoreciendo la biorremediación del NR5 no supero el T1 (Figura 26), debido no solo a la actividad enzimática sino también a la capacidad que tiene la biomasa para absorber el NR5 lo que mejora la decoloración.

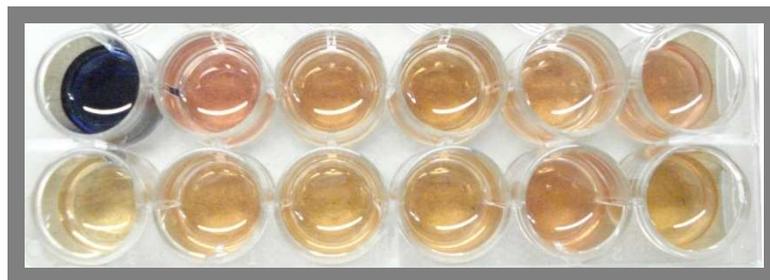
Dicha capacidad de bioadsorción de tipo iónico, físico y químico se explica por la unión del colorante NR5 a ciertos ligandos localizados en la pared del hongo como grupos carboxilo, amino, hidroxilo, fosfato y sulfhidrilo que incrementa conforme la cepa crece a expensas de los nutrientes del medio, además el carácter catiónico del colorante aumenta la bioadsorción cuando se une a la quitina y al quitosano de la pared del hongo (Zhao *et al.*, 2006; Fu and Viraraghavan, 2001).



**Figura 26.** Remoción presentada por el control abiótico durante 8 días, 30°C, 150rpm.

**Fuente.** (Autores, 2008)

La decoloración que se presentó en las curvas de remoción mostró un cambio de color a través del tiempo de azul oscuro a rojo claro y a amarillo (Figura 27), debido a una modificación del complejo auxocrómo cromóforo asociado a un posible ataque enzimático del grupo hidroxilo de la molécula del colorante, este cambio por tanto se atribuye a la degradación del cromóforo, mas no a la mineralización que es una completa descomposición de la molécula generándose  $\text{CO}_2$  y Agua (Lorenzo *et al.*, 2005).



**Figura 27.** Cinética de remoción del NR5 durante 8 días, 150rpm, 30°C.

**Fuente.** (Autores, 2008)

#### **7.4.2 Actividad enzimática ligninolítica tipo Lacasa, MnP y LiP**

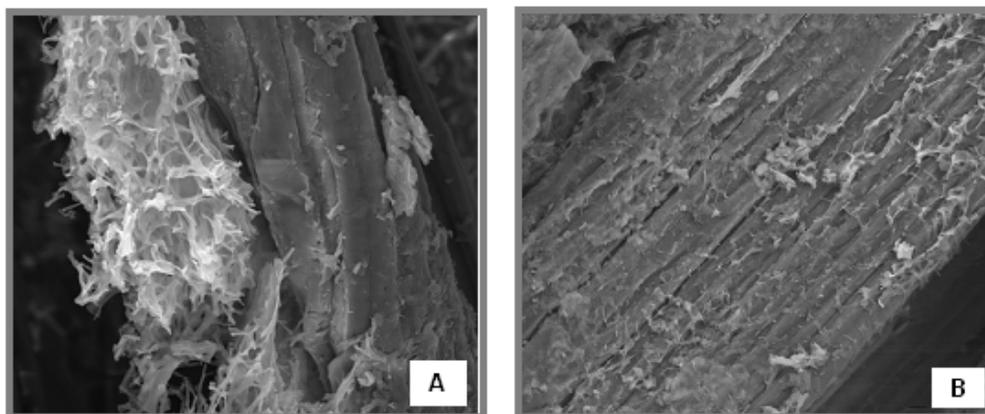
En este estudio se presentaron dos tipos de actividad enzimática ligninolítica (Lacasa, MnP y LiP) y glicosilhidrolasas (amilasa), la enzima ligninolítica que presentó mayor influencia en la decoloración fue la lacasa, según la comparación de medias la actividad de esta enzima es altamente significativa ( $p < 0.0001$ ) entre los tiempos del proceso. Del mismo modo, en el análisis de correlación de variables de las primeras 24h se estableció una correlación significativa entre la decoloración y la actividad de lacasa con un 69% de certeza, lo que reitera que presentó un papel importante sobre la decoloración del NR5.

El comportamiento de esta enzima en la mayoría de su cinética fue constante a excepción del primer día donde se obtuvo el valor más bajo de actividad con 5U Lac/L y la mayor decoloración, atribuyéndose esto al efecto residual de la enzima cuantificada en las primeras horas, desde este momento y hasta el final de la cinética la actividad de la enzima además de influir en la decoloración del NR5 también intervino en la degradación del soporte por lo que se mantiene constante. El fique al estar compuesto de lignina pudo inducir de manera indirecta la producción de enzimas ligninolíticas, las cuales posiblemente intervinieron en la degradación del soporte.

La decoloración con relación a lacasa se pudo dar por la afinidad de la enzima de atacar sustituyentes orto, meta y para de las unidades fenólicas de los compuestos recalcitrantes (Baldrian and Snajdr, 2006). Según Zille *et al.*, 2003 la lacasa reacciona con el NR5 porque se da una interacción electrostática entre las fracciones aniónicas del colorante (grupos sulfónicos) y los aminoácidos cargados de la enzima, la interacción se ve favorecida por la presencia de ciertas sales como cloruro de sodio, sulfato de amonio, etc, las cuales incrementan la fuerza iónica de la solución.

La mayor acción de la lacasa se presentó los días 5 y 7 (Figura 28B) con 30 U/L, esta actividad al igual que la obtenida desde el segundo día puede ser posiblemente atribuida

a que la cantidad de biomasa inmovilizada pudo secretar enzimas ligninolíticas y por ende degradar la lignina presente en el fique, teniéndose que la mayor remoción del colorante se obtuvo a las 24h (Figura 28A) y desde este momento esta variable se mantuvo constante, por lo que se cree que al mismo tiempo que actuaban LiP y MnP rompiendo enlaces C-C y enlaces éter generando vainillina, lacasa demetilada para luego ser oxidada e hidrolizada por LiP y entrar al ciclo de Krebs (Glazer and Nikaido, 1998; Wagner and Wolf, 1998). Otra posible explicación a este comportamiento está relacionada con la respuesta fisiológica por parte del hongo para superar los efectos tóxicos anteriormente nombrados de algunos componentes del medio (Días *et al*, 2004) (2-naftol, 1,2-naftalenediol, 1,2-naftoquina 1-ami-2-naftol, ácido sulfonico-benceno y 4 ácido hidroxibencenosulfónico) al generarse la degradación del colorante (Lu *et al*, 2008).



**Figura 28.** Microscopia electrónica de barrido de fique inmovilizado con *P. ostreatus*.  
(A) Hora 24 de tratamiento, magnificación 1000x (B) Séptimo día de tratamiento, magnificación 1000x.

**Fuente.** (Autores, 2008)

Al comparar los resultados de esta tesis con las investigaciones realizadas por Herrera and Rosas, 2003 y Pedroza, 2007, empleando *P. ostreatus* en medio salvado de trigo se obtuvo 32.7 ULac/L y 44 ULac/L en 8 días respectivamente, lo cual demostró nuevamente que la adición de inductores metálicos en este estudio permitió un resultado similar (32U/L) en el primer día de tratamiento debido que la enzima requiere de estos metales para su accionar (McGuirl and Dooley, 1999) es decir, para oxidar fenoles, polifenoles, aminas aromáticas y diferentes sustratos no fenólicos (Claus, 2003).

Del mismo modo, los estudios realizados por Fernández and Henao, 2007 y Baldrian and Gabriel, 2006 con *P. ostreatus* en un medio con NR5 a 150ppm y 200ppm mostraron 8 ULac/L en 4 días de tratamiento y 1.9 ULac/L en 7 días de tratamiento alcanzando un valor máximo de 38.5 U Lac/L en 17 días respectivamente, ratificando que la adición de

CuSO<sub>4</sub> y MnSO<sub>4</sub> ayudaron a nivel transcripcional a la lacasa (Pedroza, 2007), ya que estos investigadores obtuvieron resultados menores a los de esta tesis a pesar de emplear el mismo HPB y colorante.

Enzimas ligninolíticas como MnP y LiP se midieron sin presentar efecto significativo ( $p=0.6051$  y  $p=0.6330$ ) entre los tiempos del proceso ni correlación con la decoloración en las primeras 24h; la mayor actividad de MnP se manifestó al primer día del tratamiento con 0.45 U/L y la de LiP se presentó el octavo día con 0.99U/L (Figura 29), ambas enzimas mostraron un comportamiento irregular en toda la cinética lo que ratifica que no influyeron en la decoloración del NR5, pero que si actuaron en la degradación de la lignina presente en el soporte por medio del rompimiento de los enlaces C-C y éter y la oxidación de la molécula a ácido acético y ácido succínico (Glazer and Nikaido, 1998; Wagner and Wolf, 1998). Otra posible explicación a la baja actividad enzimática y alta decoloración es la presencia de otros grupos enzimáticos que no fueron medidos en esta investigación como las versátiles peroxidasas (VP) que se consideran un híbrido entre MnP y LiP y pueden oxidar Mn<sup>+2</sup>, compuestos fenólicos y no fenólicos aromáticos incluyendo los colorantes y están presentes en *P.ostreatus* (Wesemberg *et al*, 2003).

Además enzimas como las quinona oxido-reductasas (CBQase), tirosinasas (Swamy and Ramsay, 1999) y aril alcohol oxidasas (AAO) que toman los alcoholes aromáticos, los oxidan a aldehído y producen peróxido que puede oxidar también compuestos orgánicos (Lankinen, 2004).

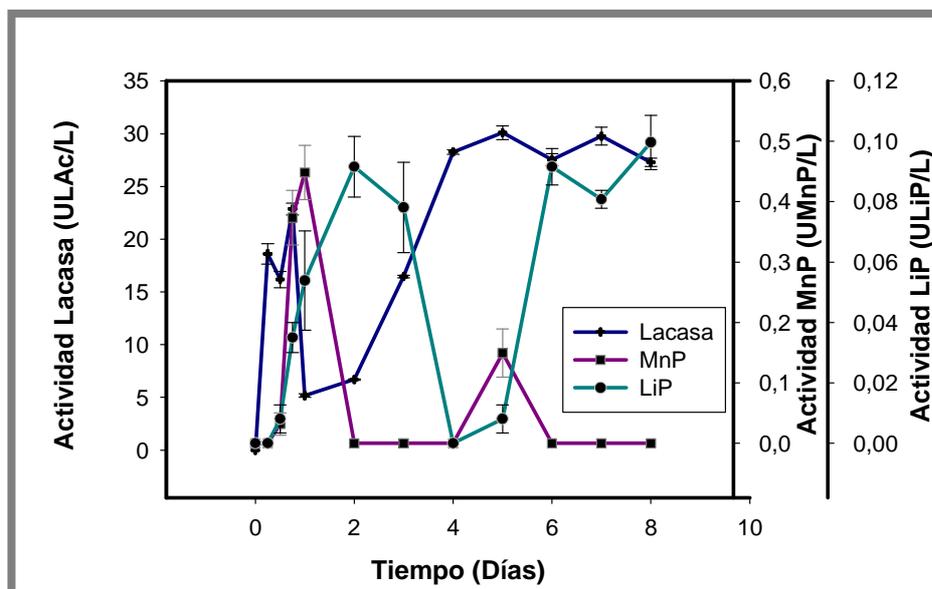


Figura 29. Comportamiento de las enzimas ligninolíticas. 8 días, 150rpm, 30°C, pH 6.7.

Los resultados logrados en la investigación de Guillén *et al.*, 1998 y Baldrian and Snajdr, 2006 con respecto a la actividad de MnP empleando *P.ostreatus* y alcanzando 0.41UMnP/L en cuatro días en un medio sintético con extracto de levadura y glucosa y 0 UMnP/L en 7 días o 1.9U MnP/L en 21 días de tratamiento a 200ppm de NR5 son menores a los de esta investigación ya que se igualo o supero la actividad presentada por estos autores el primer día del tratamiento gracias a la adición de los inductores y el almidón. En cambio, los datos reportados en este proyecto con respecto a la MnP son muy bajos (Figura 29) si se comparan con los obtenidos por Gayosso *et al.*, 2004 quienes alcanzaron a los 30 días 310U/L con *P. ostreatus* empleando un medio con glucosa y extracto de levadura suplementado con 270 µM/L de MnSO<sub>4</sub>. la superioridad de los resultados se pueden deber al tiempo de tratamiento y a la adición de una mayor concentración de MnSO<sub>4</sub>, aunque, en este caso se debe tener en cuenta que una concentración muy alta de este metal puede inhibir la actividad de MnP (Gómez *et al.*, 2005).

De otro lado, el trabajo expuesto por Herrera and Rosas, 2003 usando *P. ostreatus* crecido en medio salvado ratifica lo obtenido en los resultados de este proyecto con respecto a la actividad LiP ya que el comportamiento de esta enzima es inconstante y presenta valores máximos de 0.024 U/L y 0.016 U/L en los días 7 y 8 respectivamente, al igual que en el presente estudio en donde la máxima actividad se obtiene al final del proceso (0.099U/L), teniéndose tal vez un accionar de esta enzima sobre el soporte. Aunque, se debe tener en cuenta que en algunos días de la cinética no se cuantifico la enzima LiP probablemente porque según bibliografía los HPB no expresan esta enzima (Hatakka, 1994; Wesenberg *et al.*, 2003; Baldrian and Snajdr, 2006).

La producción de MnP y LiP estuvo ligada a la acción de enzimas glioxal oxidasa y superoxido dismutasa, responsables de generar el peroxido intracelularmente necesario para el accionar de las peroxidases (Leonowicz *et al.*, 1999; Guillén *et al.*, 1998) y a la adición de inductores metálicos (CuSO<sub>4</sub> y MnSO<sub>4</sub>) en el caso de MnP que posiblemente favorecieron la transcripción de los genes de esta enzima ligninolítica (Wesenberg *et al.*, 2003) como lo expusieron Urzúa *et al.*, 1995 al evaluar diferentes isoenzimas de MnP en el HPB *Ceriporiopsis subvermispota* obteniendo solo la transcripción del gen *Mgmnp* (productor de MnP) cuando MnSO<sub>4</sub> estaba presente.

#### **7.4.3 Comportamiento del pH, actividad Amilolítica y determinación de Azúcares reductores totales (ART)**

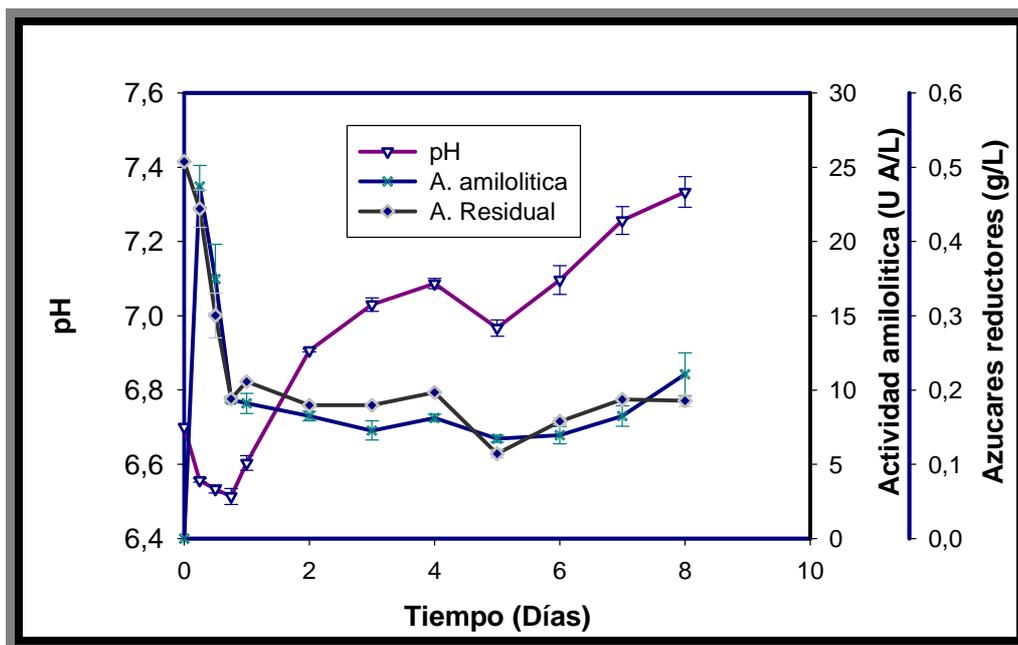
Otro factor que influyó en el comportamiento de la actividad enzimática ligninolítica fue el pH que aumentó constantemente en toda la cinética con valores, de 6.7 al inicio del

proceso y 7.4 al final (Figura 30). En el caso de lacasa en donde se reportan rangos de pH entre 3 a 10 (Gayosso *et al.*, 2004; Ramírez *et al.*, 2003; Herrera and Rosas, 2003) para conservar su actividad se pudo determinar que esta enzima fue estable en toda la cinética y presentó su mayor actividad a un pH neutro posiblemente debido a que su punto isoelectrico esta cercano a la neutralidad a pesar de que en los hongos es usual encontrar un punto isoelectrico bastante acido (pH 3-4) (Hofrichter, 2002).

De otro modo, la mayor actividad de MnP se genero con un pH de 6.6 y de LiP con un pH de 7.4, teniendo en cuenta que MnP es estable en un pH de 2.6 a 4.5 y LiP en un rango de 2 a 5 (Wesenberg *et al.*, 2003) el presente ensayo muestra resultados relevantes ya que se determina que a pH mayores a los que se limita la actividad de MnP y LiP las enzimas pueden producirse. El comportamiento en aumento del pH se puede explicar debido a la producción de metabolitos secundarios muchos de los cuales son derivados del metabolismo del nitrógeno como en este caso con la generación de aminas por procesos de descarboxilación de aminoácidos, los cuales pueden afectar el pH del medio al formarse procesos de alcalinización (Kamitsuji, *et al.*, 2004).

Simultáneamente, la actividad amilolítica expresadas como Unidades Amilolítica (1 $\mu$ M de glucosa liberada/L por minuto) presentó su mayor valor a las 6h con 24 UA/L/min, el comportamiento de esta actividad en el resto de la cinética (18h a 8 días) mostró pocas variaciones (9UA/L/min a 11UA/L/min) (Figura 30). Dicha actividad demostró ser altamente significativa ( $p < 0.0001$ ) con respecto a la decoloración entre los tiempos del proceso y del mismo modo correlación con esta (decoloración) indicando que es necesaria la presencia de una fuente de carbono que ayude al metabolismo del microorganismo y a la producción de MnP (Yang *et al.*, 2005), pues el co sustrato juega dos papeles importantes en la degradación, proporcionando la fuente de carbono anteriormente nombrada y la acción de enzimas peroxidadas con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustrato.

Las unidades amilolíticas se generaron debido a la fuente de carbono empleada y a las condiciones del cultivo, pues según Wu *et al.*, 2007 el almidón es la fuente óptima para la expresión del gen *pcamy1* de la alfa amilasa de *P. chrysosporium* y al emplear otro co sustrato como la glucosa se reprime la actividad de dicho gen (Silva *et al.*, 2006), además el oxígeno es necesario para que se produzca esta enzima (Wu *et al.*, 2007).



**Figura 30.** Comportamiento de la actividad amilolítica, pH y Azúcares residuales durante la cinética de remoción.

Las amilasas pueden romper las cadenas de almidón y se relacionan con los azúcares reductores (Carrillo *et al.*, 2003) siendo estos el producto de la actividad, esta relación directamente proporcional se evidenció al determinar la disminución de los azúcares reductores desde la hora cero hasta los ocho días al igual que la actividad enzimática (Figura 30), ya que al degradarse las cadenas de almidón se generaron monosacáridos, disacáridos (glucosa y maltosa) y fracciones de oligosacáridos que el hongo pudo consumir y las cuales fueron determinadas por medio de la técnica de DNS, el mayor consumo de estos azúcares se da en las primeras 18h vinculándose con el comportamiento de la actividad amilolítica que tiene su mayor producción en las primeras horas del proceso y con el pH que presenta un descenso desde la hora cero hasta las 18 horas posiblemente por la generación de ácidos debido a la asimilación del polisacárido generando unidades de glucosa que produce acetil Co-A precursor del ciclo de Krebs (Wang *et al.*, 2002), además este descenso en el pH favoreció la producción de la enzima amilasa debido a que a las 6 y 12h donde se presenta la mayor actividad amilolítica de toda la cinética (23,7 y 17,47 UA/L/min), las amilasas se encontraban en su pH óptimo de 6.5 en hongos (Yu *et al.*, 1999), otro valor similar de pH se obtuvo en el estudio de las amilasas de *Thermus sp* en *E. coli* recombinante en donde se determinó que esta enzima fue estable en un rango de pH de 6.0 a 7.0 (Lobo and Peña, 2002) a pesar de que estos microorganismos son bacterias se encuentra similitud en el pH en el que actúa la enzima soportando los resultados de esta tesis.

Los resultados de este estudio fueron inferiores en la producción de actividad amilolítica con respecto a los obtenidos por Carrillo *et al.*, 2003 quienes emplearon almidón como co sustrato (almidón 1%) en un medio de caña de azúcar con *Phanerochaete chrysosporium* y alcanzaron en 12 días un pico máximo de 250 UA/L/min ya que a las 6h en el presente estudio esta actividad enzimática presentaba 24 UA/L/min debido a que como fuente de carbono solo tenía el almidón y la celulosa y hemicelulosa presente en el soporte mientras que en el estudio de Carrillo *et al.*, 2003 también había presencia de sacarosa presente en la caña de azúcar más fácil de degradar.

Por lo contrario, la investigación de Mehna *et al.*, 1995 en donde se usó *T. versicolor* con diferentes co sustratos (1%) como sacarosa, glucosa, almidón, etanol y carboximetil celulosa a pesar de determinar que sacarosa fue el mejor co sustrato con un 92% de decoloración del efluente con residuos agroindustriales en 7 días muestra resultados menores a los de esta tesis teniendo en cuenta que con un polímero más sencillo como la sacarosa se obtiene menos decoloración a la de este trabajo (96%) que emplea un co sustrato más complejo (almidón). De igual forma, esta investigación supera los resultados obtenidos con el hongo *Leucoagaricus gongylophorus* que creció en un medio con diferentes fuente de carbono como glucosa, almidón, maltosa y la combinación de almidón y maltosa, maltosa y glucosa y almidón y glucosa al obtenerse que la mejor fuente de carbono fue el almidón con 11.2UA, ya que en nuestra investigación la actividad más alta obtenida fue de 24UA/min/L con el mismo co sustrato; Por último, el estudio realizado por Yang *et al.*, 2008 empleando glucosa a 5 y 10g/L como co sustrato para la decoloración de NR5 (200ppm) por medio de las levaduras *Debaryomyces polymorphus* y *Candida tropicalis* obtuvo resultados de 92.7% de decoloración en 60h con un concentración de 5g/L de glucosa y 100% de decoloración en 24h con 10g/L de glucosa presenta resultados inferiores con respecto a los de este trabajo ya que empleando una concentración mucho menor de un co sustrato más complejo (0.2g/L almidón) se obtienen resultados similares debido a que la producción de amilasas por parte de *P. ostreatus* y enzimas ligninolíticas (MnP, LiP y Lacasa) que soportaron la degradación de un amplio rango de compuestos aromáticos (Carrillo *et al.*, 2003) como el colorante NR5.

Finalmente, al relacionar el comportamiento de enzimas ligninolíticas con las glicosilhidrolasas se determina que en las últimas se genera peróxido necesario para la actividad de enzimas peroxidasa como MnP y LiP pero no Lacasa (Swamy and Ramsay, 1999) además, se reporta que el peróxido, es la molécula que modulaba la expresión de alfa amilasas debido a que en altas concentraciones de peróxido se reprime la actividad de dicha enzima (Wu *et al.*, 2007).

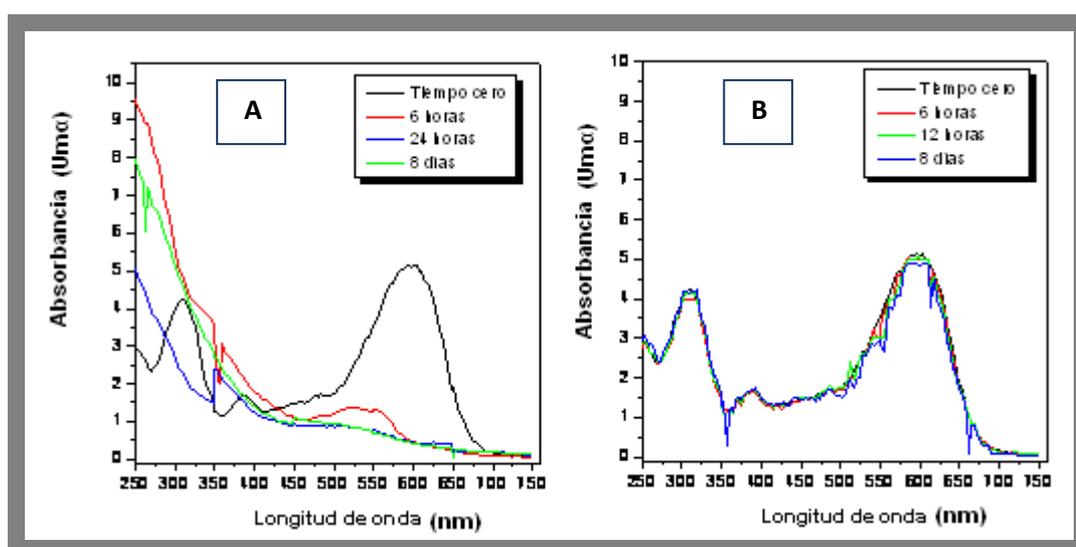
#### 7.4.4 Análisis del espectro UV- VIS del tratamiento biótico y abiótico

El análisis del espectro UV-VIS, pudo mostrar cambios en la estructura del colorante (complejo auxocrómo- cromóforo), demostrando posiblemente la degradación NR5 gracias al accionar de las enzimas ligninolíticas de *P. ostreatus* (Lacasa, MnP y LiP).

El NR5 diluido en agua presento dos picos de absorción tanto al inicio de la curva de remoción biótica (Figura 31A) como en toda la curva de remoción abiótica (Figura 31B) uno en la región visible a 600nm y otro en la región UV a 310nm correspondientes posiblemente a enlaces azo y a presencia de moléculas de aril y naftaleno respectivamente según estudios realizados (Lucas *et al.*, 2006; Sahel *et al.*, 2007). De acuerdo a estos resultados se podría sugerir que *P. ostreatus* fue el responsable de la degradación del colorante ya que en el espectro de absorción del control abiótico no se observo cambio significativo en la molécula en los diferentes tiempos del tratamiento; En contraste, el espectro correspondiente a la degradación biótica (Figura 31A) mostro que desde las 6h de tratamiento se genero un cambio conformacional en la molécula con la aparición de dos picos de absorción a 250nm y 360nm, el primero se mantuvo por toda la cinética mientras que el segundo tuvo un desplazamiento a 350nm en las primeras 24h y a 275nm al finalizar la curva de remoción, indicando posiblemente que el intermediario generado necesito de ocho días para la generación de una nueva molécula. Además, esta última molécula no influyo en el porcentaje de decoloración del NR5, ya que durante la curva de remoción el mayor resultado se obtuvo a las 24h y se mantuvo en los días posteriores.

Además, se ha reportado que la remoción de colorantes de tipo azo por HPB puede generar intermediarios como el ácido benzenosulfónico, ácido 4-hidroxibencenosulfónico, 3-metil-4-hidroxi-bencenosulfónico, 1,2-Naftoquinona-6-ácidosulfónico, ácido-3-metilbencenosulfónico, 3 hidroxí benzoico, 3 hidroxibenzil alcohol, 1-2 naftoquinona, 4-nitroanilina, 4-nitrobenzono, 4-nitrofenol y 4-nitroanisole determinados por espectrofotometría de masas y HPLC (Martins *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2006; Zhao and Hardin, 2007; Lu *et al.*, 2008). Según lo expuesto anteriormente podemos sugerir que las moléculas resultantes de la degradación de NR5 en la mayoría de los casos correspondían a bencenos (255nm), aromáticos (205nm a 260nm), aldehídos aromáticos (270nm a 300nm), cetonas (270nm a 300nm), ácidos benzoicos (271nm a 279nm), benzaldehídos (320nm), naftalenos (275nm a 319nm) con longitudes de onda cercanas a los dos picos obtenidos durante toda la cinética (Simon and Clerc, 1970). Si se quisiera tener una mayor precisión en cuanto al nombre exacto del intermediario es necesario realizar análisis más avanzados y precisos como una espectrofotometría de masas y HPLC.

De igual forma, se puede sugerir que en este trabajo se obtuvo una bio-transformación de la molécula y no una mineralización al degradarse el grupo cromóforo (Swamy and Ramsay, 1999) y que el tratamiento abiótico no tuvo un desplazamiento significativo a nivel de absorbancia del grupo cromóforo auxocromo concluyéndose que la degradación fue realizada por el hongo y no por el soporte lo cual otorga gran importancia a la investigación.



**Figura 31.** Espectro de absorción UV-VIS. **(A)** Tratamiento biológico **(B)** Tratamiento abiótico, a través del tiempo (0h, 6h, 24h y 8días)

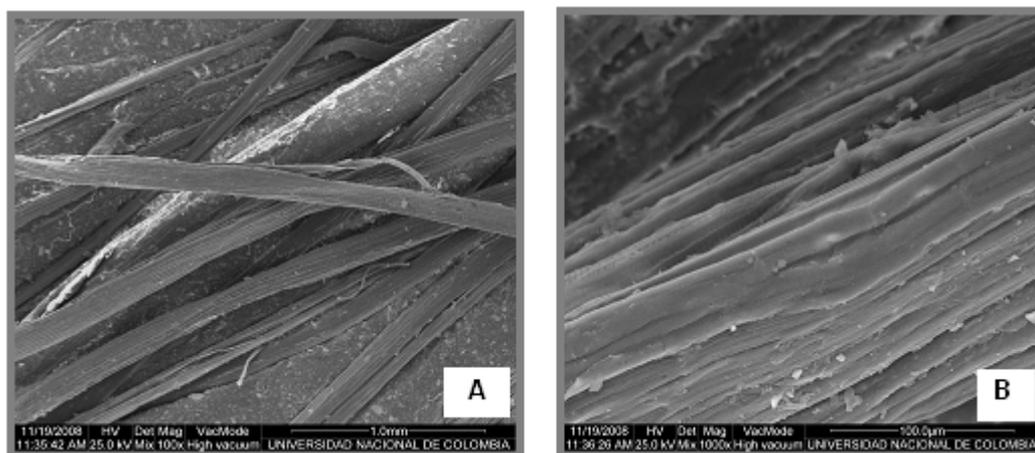
#### 7.4.5 Microscopía electrónica de barrido (SEM) del tratamiento biótico y abiótico.

El soporte utilizado en la inmovilización de *Pleurotus ostreatus* se caracterizó por estar conformado de varios sub-hilos que se entrelazaban originando una estructura más compacta y por ende estable frente a condiciones operacionales como agitación.

De acuerdo a mediciones previas los hilos de fique de 5cm utilizados para la inmovilización presentaban un diámetro de 0,5cm y al realizar SEM cada sub-hilo que lo compone aproximadamente tiene un diámetro de 97,05  $\mu\text{m}$  (Figura 32 A- 32B). El fique por ser una fibra porosa facilitó el ingreso de la biomasa fúngica hacia el interior de cada uno de los hilos, lo que ayudo a que se tuviera abundante crecimiento hifal (Figura 33) y producción de esporas por parte de *P. ostreatus*, estas últimas se comportaron como unidades propagativas de biomasa, destacándose de tal forma el mecanismo de adherencia hongo- soporte.

Como consecuencia de la inmovilización el fique sufrió un proceso erosivo por parte del hongo, teniéndose una disminución en el grosor de los sub-hilos de esta fibra de 50  $\mu\text{m}$ , propiciado posiblemente por la actuación de enzimas ligninolíticas como Lac, MnP y LiP que intervinieron en la degradación de la lignina presente en el fique por medio de la oxidación y rompiendo de enlaces éter de sus componentes (ácido coniferílico, cumarílico y sinapílico) para la generación de un intermediario como la vainillina que es demetilada por medio de lacasas e hidrolizada produciendo compuestos que entran al ciclo de Krebs (ácido succínico), la intervención de estas enzimas también se pudo atribuir al hecho de que la mayor actividad de la enzima lacasa (días 5 y 7) y el accionar de las enzimas MnP y LiP no estuviesen ligadas con la remoción de color. De igual forma, a través de la cinética de remoción se obtuvo un engrosamiento de las hifas, ya que al inicio del proceso estas median 26 $\mu\text{m}$  aproximadamente y al finalizar 270,58 $\mu\text{m}$  aproximadamente calculándose un aumento de 244  $\mu\text{m}$ , ligado al posible uso de la fibra planteado anteriormente (**Anexo 10**).

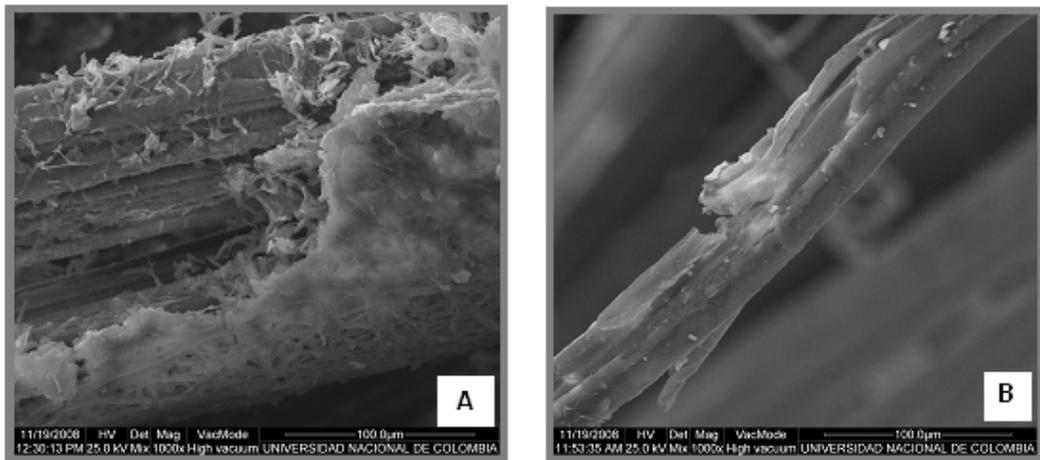
Además, teniendo en cuenta que el fique está compuesto de lignina, celulosa y hemicelulosa y que se empleó almidón a razón de 0,2g/L como co sustrato en la cinética de remoción, se puede inferir que *P. ostreatus* empleó estos componentes como fuente de carbono atacando el soporte lo que conllevó a que se tuviera mayor expresión de enzimas ligninolíticas como se expuso anteriormente.



**Figura 32.** Microscopia electrónica de barrido del fique sin colonizar.

**(A)** Magnificación de 100x **(B)** Magnificación de 1000x.

**Fuente.** (Autores, 2008)



**Figura 33.** Microscopia electrónica del bioportador conformado por *Pleurotus ostreatus*.  
(A) Hora 18 de tratamiento, magnificación de 1000x. (B) Cuarto día de tratamiento, magnificación de 1000x.

**Fuente.** (Autores, 2008)

Finalmente, según los datos obtenidos y los análisis estadísticos se valida de forma parcial la hipótesis planteada para este estudio, ya que los inductores y el co sustrato empleado indujeron solo la actividad Lacasa de *Pleurotus ostreatus* pero esto no impidió que se lograra una excelente remoción del colorante NR5 a 150 ppm.

## 8. CONCLUSIONES

- Se desarrolló un bioportador a base de biomasa viable de *Pleurotus ostreatus* inmovilizado sobre fique con capacidad de remoción del colorante NR5 asociado con mecanismos adsortivos y bioquímicos.
- *Pleurotus ostreatus* inmovilizado en fique incrementó su capacidad de decoloración (97%) asociada con la adición de inductores como sulfato de cobre y el sulfato de manganeso a razón de 180  $\mu\text{M/L}$  y 300  $\mu\text{M/L}$  para lacasa (23 U/L) y 360  $\mu\text{M/L}$  y 150  $\mu\text{M/L}$  de sulfato de cobre y sulfato de manganeso para manganeso peroxidasa (2,13 U/L).
- Se seleccionó almidón a razón de 0.2 g/L como co sustrato alternativo para la remoción de colorante NR5, demostrando que bajo estas condiciones la decoloración máxima fue del 96%, correlacionada con la actividad lacasa (15 u/L) y la producción de amilasas (15 U/ L\* min).
- Se escogió 24h como el tiempo optimo del proceso en las curvas de remoción con 97% de decoloración, 5 U/L de lacasa, 0,45 U/L de MnP y 0,053 U/L LiP, atribuyéndose este cambio a la biotransformación del grupo cromóforo del NR5 observado en el espectro de absorción UV/VIS durante los ocho días de la cinética

## 9. RECOMENDACIONES

- # Evaluar la remoción del color de efluentes textiles utilizando *P. ostreatus* inmovilizado en fique bajo las condiciones evaluadas en este estudio a escala piloto.
- # Cuantificar la presencia de otras enzimas ligninolíticas como: Glioxal oxidasas, tirosinasas, versátil peroxidasas, aril alcohol oxidasas, las cuales pueden intervenir en la degradación del NR5.
- # Determinar el número de ciclos operativos que puede sufrir el bioportador conformado en este estudio.
- # Desarrollar bioensayos con el fin de valorar la toxicidad en organismos vivos de los compuestos generados día a día durante la curva de remoción.

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abadulla, E., Tzanov, T., Costa, S., Robra, K., Cavaco, P. and Gübitz, G. 2000. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsute*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:3357-3362.
- Amitai, G., Adani, R., Sod-Moriah, G., Rabinovitz, I. and Vincze, L. 1998. Oxidative biodegradation of phosphorothiolates by fungal laccase. *FEMS Microbiology Letters*. 438:195-200.
- Arroyave, P. and Velásquez, D. 2001. Ingeniería de Procesos. 3ª Edición. Editorial EAFIT. Bogotá-Medellín. Colombia. 250 p.
- Baldrian, P and Gabriel, J. 2006. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiology Letters*. 206: 69-74.
- Baldrian, P. and Snajdr, J. 2006. Production of ligninolytic enzymes by litter-descomposing fungi and their ability to decolorize synthetic dyes. *Enzyme and Microbial Technology*. 39: 1023-1029.
- Banat, I., Nigam, P., Singh, D. and Marchant, R. 1996. Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. *Bioresource Technology*. 58: 217-225.
- Bishop, P. 1996. The Biodegradation of Textiles Dyes Using Biofilm Treatment Systems. *Biodegradación de Compuestos Orgánicos Industriales*. 1:1-10.
- Bourbonnais, R., Paice, M., Freiermuth, B. 1996. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Applied and Environmental Microbiology*. 63: 4627-32.
- Brown, J., Alic, T., and Gold, M. 1991. Manganese peroxidase gene transcription in *Phanerochaete chrysosporium*: Activation by Manganese. *Journal of Bacteriology*. 173(13): 4101-4106.
- Brown, M. and DeVito, S. 1993. Predicting Azo dye toxicity. *Crit. Rev Environ. Sci. Technol.* **23**: 249-324.
- Call, HP. 1997. History, overview and applications of mediated ligninolytic systems, especially laccasemediator-systems (Lignozym-Process). *Journal of Biotechnology*. 53:163-202.

Castillo, L. and Ortega, K. 2007. Evaluación de tres soportes de inmovilización y dos condiciones nutricionales para *Trametes versicolor* en la remoción del colorante negro reactivo 5 en columna de burbujeo. *Microbiólogo Industrial*. Pontifica Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Depto. Microbiología. Bogotá. 168p.

Carrillo, R., Rodriguez, R., Díaz, D., Torres, V., Manzur, A. and Torres, A. 2003. Starch-based plastic polymer degradation by the White rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* grown on sugarcane bagasse pith: enzyme production. *Bioresource Technology*. 86:1-5.

Caesar, T.C., Fintan, V., Geesey, G. and Henson, J. 1995. Melanin production by a filamentous soil fungus in response to copper and localization of copper sulfite by sulfide- silver staining. *Applied and Environmental Microbiology*. 61: 1968- 1975.

Cervantes, C. and Gutierrez, F. 1993. Copper resistance mechanisms in bacteria and fungi. *Microbiology review*.14: 121-138

Choteborska, P., Palmaro, A., Galbe, M., Melzohc, K. and Rychtera, M. 2004. Processing of wheat bran to sugar solution. *Journal of Food Engineering*. 61: 561-565.

Christie, R. 2001. Colour Chemistry Royal society of chemistry. *United Kingdom*, 46: 118-120.

Cisterna, C. 2003. Cultivo del champiñón ostra en Chile. 1ª Edición. Editorial Mycotec, Ltda. Chile.118p.

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

Collins, P. and Dobson, A. 1997. Regulation of Laccase Gene Transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*. 78: 3444–3450.

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

- Dias, A., Bezerra, R. and Pereira, A. 2004. Activity and elution profile of laccase during biological decolorization and dephenolization of olive mill wastewater. *Bioresource Technology*. 92: 7–13.
- Dittmer, J., Patel, N., Dhawale, S. and Dhawale, S. 1997. Production of multiple laccase isoforms by *Phanerochaete chrysosporium* grown under nutrient sufficiency. *FEMS Microbiology Letters*. 149: 65-70.
- Fahr, K., Wetzstein, H. and Grey, R. 1999. Degradation of 2,4-dichlorophenol and pentachlorophenol by two brown rot fungi. *FEMS Microbiol Letters*. 175:127-32.
- Fernández, J. and Henao, L. 2007. Evaluación de tres hongos basidiomycetos inmovilizados en *Iuffa Cylindrica* y fotocatalisis con  $TiO_2$  Para la remoción del Negro reactivo 5. Microbiólogo industrial. Pontifica Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Depto. Microbiología. Bogotá. 154p.
- Fu, Y. and Viraraghavan, T. 2001. Fungal decolorization a review. *Bioresource Technology*. 79: 251-261.
- Fleming, I. and Williams, D. 1968. Métodos espectroscópicos en química orgánica. Ed. McGraw-Hill. Londres. 223p.
- Fritjers, C., Vos, R., Scheffer, G. and Mulder, R. 2006. Decolorizing and Detoxifying Textile Wastewater, Containing both Soluble and Insoluble Dyes, in a Full Scale Combined Anaerobic/Aerobic System. *Water Research*. 40:1249-1257.
- Galhaup C. and Haltrich, D. 2001. Enhanced formation of laccase activity by the whiterot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper. *Applied and Environmental Microbiology*. 56: 225-232.
- Gayosso, M., Leal, E. and Rodríguez, R. 2004. Evaluación de la actividad enzimática de *Pleurotus ostreatus* en presencia de bifenilos policlorados. *Revista Iberoamericana*. 23:76-81.
- Gill, P.K. and Arora, D.S. 2003. Effect of culture conditions on manganese peroxidase production and activity by some white rot fungi. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 30: 28-33.
- Gómez, C., Martínez, M., Mosquera, D., Pedroza, A., Rodríguez, R. and Rosas, J. 2005. Estudio del efecto de dos inductores y un protector enzimático sobre la

actividad de las enzimas manganeso peroxidasa y lacasa producidas por *Trametes versicolor* y su efecto en la decoloración de efluentes de la industria papelera. *Universitas Scientiarum*. 10: (2) 37-45.

Guillén, Y. and Machuca, A. 2008. The effect of copper on the growth of wood-rotting fungi and a blue-stain fungus. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24:31–37.

Guillén, G., Márquez, F. y Sánchez, J. 1998. Producción de biomasa y enzimas ligninolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido. *Revista Iberoamericana de Micología*. 15: 302-306.

Gutiérrez, G. 2007. Efecto de las condiciones de cultivo sobre la biodegradación del azocolorante Naranja II en un sistema combinado anóxico/óxico. *Revista Sistemas Ambientales*. 1(2): 40-47.

Glazer, A. and Nikaido, H. 1998. Microbial Biotechnology and Fundamentals. *Applied microbiology*. 65: 334-347.

Ha, H., Honda, C., Watanabe, Y. and Kuwahara, M. 2001. Production of Manganese Peroxidase by pellet culture of the lignin-degrading basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 55: 704-711.

Hatakka A. 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *Rev FEMS Microbiol*. 94 (13)125–35.

Heinfling, A., Martínez, J., Martínez, T., Bergbauer, M. and Szewzyk, U. 2002. Transformation of Industrial Dyes by Manganese Peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a Manganese-Independent Reaction. *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (8): 2788–2793.

Herrera, A and Rosas, J. 2003. Estudio preliminar de la producción de enzimas ligninolíticas por los hongos *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* y *Pleurotus ostreatus* para el tratamiento de efluentes de la industria papelera. Microbiólogo Industrial. Pontifica Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Depto. Microbiología. Bogotá. 154p.

Hofrichter, M. 2002. Review: lignin conversión by manganese peroxidase ( MnP). *Enzyme and Microbial Technology*. 30: 454-466

Hou, H., Zhou, J., Wang, J., Du, C. and Yan, B. 2004. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorización of antraquinone dye. *Process Biochemistry*. 39:1415- 1419

Hunger, K. and Jung, R. 1991. "On the Toxicology and Ecology of Organic" Colorants. *CHIMIA*. 45: 297-300.

Kamitsuji, H., Honda, Y., Watanabe, T. and Kuwahara, M. 2004. Production and induction of manganese peroxidase isozymes in a white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 65: 287–294.

Kirk, K., and Farrel, R. 1997. Enzymatic combustion: The microbial degradation of lignin. *Ann. Rew.* 41: 465-505.

Knapp, J., Newby, P. and Reece, P. 1995. Decolorization of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. *Enzyme and Microbial technologic*. 17: 664-668.

Lankinen, P. 2004. Ligninolytic enzymes of the basidiomycetous fungi *Agaricus bisporus* and *Phlebia radiata* on lignocellulose-containing media. Academic Dissertation in Microbiology. University of Helsinki. Division of Microbiology. Department of Applied Chemistry and Microbiology. Helsinki. 54p.

Leonowicz, A., Matuszewska, A., Luterek, J., Ziegenhagen, D., Wojtas-Wasilewska, M. and Cho N.-S. 1999. Biodegradation of lignin by white-rot fungi. *Fungal Genet Biol.* 27:175–85.

Li, D., M, Alic., J, Brown. and M, Gold. 1995. Regulation of manganese peroxidase gene transcription by hydrogen peroxide, chemical stress, and molecular oxygen. *Applied and Environmental Microbiology*. 61:341–345.

Lobo, C. and Peña, M. 2002. Expresión trasiente de la enzima alfa amilasa de *Thermus* sp. en *Escherichia coli* recombinante. Microbiólogo Industrial. Pontifica Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Depto. Microbiología. Bogotá. 155p.

Lorenzo, M., Moldesv, D., Couto, S., and Sanromá, Ma. S. 2005. Inhibition of laccase activity from *T. versicolor* by heavy metals and organic compounds. *Chemosphere*. 63: 912-917.

Lu, Y., Phillips, R., Lu, L. and Hardin, R. 2008. Determination of the degradation products of selected sulfonated phenylazonaphthol dyes treated by white rot fungus *Pleurotus ostreatus* by capillary electrophoresis coupled with electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1208: 223–231.

Lucas, M., Amaral, C., Sampaio, A., Peres, J. and Días, A. 2006. Biodegradation of the diazo dye Reactive Black 5 by a wild isolate of *Candida oleophila*. *Enzyme and Microbial Technology*. 39 : 51–55

Lucas, R., Robles, A., Gálvez, A., García, T. and Álvarez, G. 2001. Biodegradación de la celulosa y la Lignina. Universidad de Jaén. *Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico*. 65-97.

Mansur, M., Suárez, T. and González, A. 1998. Differential Gene Expression in the Laccase Gene Family from Basidiomycete I-62 (CECT 20197). *Applied and Environmental Microbiology*. 64 (2) 771–774.

Manubens, A., Canessa, P., Folch, C., Avila, M., Salas, R. and Vicuña, R. 2007. Manganese affects the production of laccase in the basidiomycete *Ceriporiopsis subvermispora*. *FEMS Microbiol Letters*. 275: 139–145.

Manzano, A., León, T., Arguelles, J., Leal, R., China, R., Guerra, G., Casado, G., Sánchez, M. y Gómez, B. 2004. Hongos de la podredumbre blanca con capacidad ligninolítica y acción decolorante sobre el violeta cristal. *Revista Biología*. 18: 26-30.

Martínez, A., Camarero, S., Ibarra, D. and Jesús, M. 2005. Lignina derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant Dyes. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 1775–1784.

Martínez, M., Pedroza, A., Rodríguez, R. and Rosas, J. 2005. Efecto de la glucosa y nitrato de amonio sobre las enzimas ligninolíticas producidas por *Trametes versicolor* inmovilizado en espuma y la decoloración de un efluente papelerero en un biorreactor de lecho fluidizado. *Universitas Scientiarum*. 10(2): 27-36.

Martins, M., Lima, N., Silvestre, A. and Joao, M. 2003. Comparative studies of fungal degradation of single or mixed bioaccessible reactive azo dyes. *Chemosphere*. 52: 967-97.

Mayer, A. and Staples, R. 2002. Laccase: new functions for an old enzyme *Phytochemistry*. 60 (6) 551-565.

Mehna, A., Bajpai, P and Bajpa, P. 1995. Studies on decolorization of effluent from a small pulp mill utilizing agriresidues with *Trametes versicolor*. *Enzyme and Microbial Technology*.17:18-22.

Michel, F., Balachandra, S., Grulke, E. and Adinarayana, C. 1991. Role of manganese peroxidases and lignin peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of kraft bleach plant effluent. *Applied and Environmental Microbiology*. 57: 2368-2375.

Mikiashvili, N; Elisashvili, V; Wasser, S and Nevo, E. 2005. Carbon and nitrogen source influence the ligninolytic enzyme activity of *Trametes versicolor*. *Biotechnology Letters*. 27: 955-956.

Milla, A. 2007. Introducción al cultivo del hongo *Pleurotus ostreatus*. Ed. Publicaciones INEA. Valladolid. España. 120p.

Miller, G. 1959. "Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar *Ann. Chemistry*. 31: 426-428.

Ministerio de Agricultura. Decreto 1594 de 26 del Junio de 1984. República de Colombia.

Ministerio de ambiente, vivienda y desarrollo territorial Ministerio de Agricultura y desarrollo rural Departamento nacional de planeación. 2006. Guía Ambiental Del Subsector Fiquero. 2ª Edición. República de Colombia.

Minussi, C., Moraes, S., Pastore, G. and Durán, N. 2001. Biodecolorization screening of synthetic dyes by four white-rot fungi in a solid medium: possible role of siderophores. *Letters in Applied Microbiology*. 33: 21-25.

Minussi, R., Pastore, N. and Durán, N. 2007. Laccase induction in fungi and laccase/N-OH mediator systems applied in paper mill effluent *Bioresource Technology*. 98: 158-164.

Moeller, G. and Garzón, M. 2003. Desarrollo de tecnologías no convencionales para el tratamiento de efluentes de la fabricación de colorantes del tipo azo. *Anuario Imta*. 23: 123-129.

Mongomery. 2000. Diseño y Análisis de experimentos. 2ª Edición. Editorial Limusa. 218- 276.

Moreno, A. and Nocove, M. 2001. Aislamiento y caracterización de bacterias mesofilas aerobias con actividad amilolítica y proteolítica a partir de residuos de compost elaborado con residuos de café. Microbiólogo industrial. Pontifica Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Depto. Microbiología. Bogotá. 163p.

McGuirl, M. and Dooley, D.M. 1999. Copper-containing oxidases. *Curr Opin Chem Biol*. 3:138-44.

Nakamura, K. and Go, N. 2005. Function and molecular evolution of multicopper blue proteins. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci*. 23: 312-319.

Nyanhongo, G., Gomes J., Gübitz G., Zvauya R., Read J. and Steiner, W. 2002. Decolorization of textile dyes by Laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Water Research*. 36: 1449-1456.

Neill, F., Hawkes, D., Hawkes, N. and Lourenço, M. 1999. *J. Chem. Technol. Biotechnol*. 74: 1009 -1012.

Novotny, C., Rawal, B., Bhatt, M., Patel, M., Sasek, V. and Molitoris, H. 2001. Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes. *Journal of Biotechnology*. 89: 113–122.

Padmavathy, S., Sandhya, S. and Swaminathan, K. 2003. Aerobic Decolorization of Reactive Azo Dyes in Presence of Various Cosubstrates. *Chem. Biochem. En*. 17 (2) 147–151.

Palmieri, G., Giardina, P., Bianco, C., Fontanella, B. and Sannia, G. 2000. Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*. *Appl. Environ. Microbiol*. 66: 920-924.

Palmieri, G., Cennamo, G., Faraco, V., Amoresano, A., Sannia, G. and Giardina, P. 2003. Atypical laccase isoenzymes from copper supplemented *Pleurotus ostreatus* cultures. *Enzyme Microbial Technology*. 33:220-230.

Pedroza, A. 2007. Tratamiento de aguas residuales de la industria papelera mediante un sistema secuencial: hongos ligninolíticos y un proceso fotocatalítico nanoestructurado de  $TiO_2/Ru_xSe_y$ . Doctora en Ciencias. Centro de Investigaciones y Estudios Avanzado del Instituto Politécnico Nacional unidad Zacatenco. Depto Biotecnología y Bioingeniería. Departamento de biotecnología y Bioingeniería. México D.F. 219 p.

Pedroza, A.M., Matiz, A. and Quevedo, B. 2003. Manual de laboratorio de Introducción a la Biotecnología. Editorial CEJA. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. 50-55 p.

Pérez, S., Savón, R. and Díaz, M. 2006. Selección de cepas de *Pleurotus ostreatus* para la decoloración de efluentes industriales. *Revista Mexicana de Micología*. 23: 9-15.

Pinzón, C. 2004. Implementación de un biorreactor de lecho fijo operado con pulsaciones de aire y oxígeno empleando *Pleurotus ostreatus* inmovilizado en espuma de poliuretano para reducir el color de efluentes provenientes de la industria papelera. Tesis de maestría de microbiología industrial. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Depto. Microbiología. Bogotá. 211p.

Puente, P., Cegarra, J. and Valdeperas, J. 1981. Fundamentos científicos y aplicados de la tintura de materiales textiles. *Cátedra de tintorería y estampación* de ETSIT. Universidad Politécnica de Barcelona. España. 200p.

Quezada, M., Linares, I. and Buitrón, G. 1999. Use of Sequencing Batch Biofilter for Degradation of Azo Dyes (Acids and Basics). *International Specialised IAWQ*. 15: 320-327.

Quiroz, M. 2002. Estudio comparativo entre la decoloración fotocatalítica y la microbiológica realizada por el hongo ligninolítico *Phanerochaete chrysosporium*, de colorantes industriales tipo azo. *Revista Iberoamericana*. 43:214-218.

Ramírez, E., Vargas, C., Ariza, J. and Martínez, C. 2003. Caracterización de la lacasa obtenida por dos métodos de producción con *Pleurotus ostreatus*. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 5 (2) 64 – 72.

Rincón, F. 2006. Análisis molecular de la lacasa de *Phanerochaete flavido-alba*: Caracterización del gen y regulación por fenoles y metales. Doctor en Ciencias. Universidad de Granada. Facultad de Farmacia. Departamento de Microbiología. Granada. España. 164p.

Sahel, K., Perol, N., Chermette, H., Bordes, C., Derriche, Z. and Guillar, C. 2007. Photocatalytic decolorization of Remazol Black 5 (RB5) and Procion Red MX-5B— Isotherm of adsorption, kinetic of decolorization and mineralization. *Applied Catalysis B: Environmental*. 77: 100-109.

Sankar, E., Terre, I. and Blendill, F. 1999. Problems of dyes. *International Journal of Canadá*. 9: (3) 43-55.

Sathiya, P., Periyar, L., Sasikalaveni, A. and Murugesan, K. 2006. Decolorization of textile dyes and their effluents using white rot fungi. *Rev. Iberomaericana*. 19: 65-73.

Sathiya, P., Decaraman, M., Periyar, S., Murugesan, K. and Kalaichelvan, P. 2007. Biosorption of textile dyes and effluents by *Pleurotus florida* and *Trametes hirsuta* with evaluation of their laccase activity. *Liranian journal of biotechnology*. 5: (2) 114-118.

Schlosser, D. and Hofer, C. 1999. Novel enzymatic oxidation of Mn<sup>2+</sup> to Mn<sup>3+</sup> catalyzed by a fungal laccase. *FEBS Letters*. 451(2) 186 - 190.

Schlosser, D., Grey, R. and Fritsche, W. 1997. Patterns of ligninolytic enzymes in *Trametes versicolor*. Distribution of extra- and intracellular enzymes activities during cultivation on glucose, wheat straw and beech wood. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 47:412-418.

Silva, A., Bacci, M., Pagnoccaa,F., Bueno, C. and Heblinga, M. 2006. Starch metabolism in *Leucoagaricus gongylophorus*, the symbiotic fungus of leaf-cutting ants. *Microbiological Research*. 161: 299-303.

Simon, W. and Clerc, T. 1970. Elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos. Ed Alhambra. España. 95p.

Shrivastava, R., Christian, V., Shukla, D., Modi, H. A., and Vyas, B. R. 2005. Degradation of xenobiotic compounds by lignin-degrading white-rot fungi: enzymology and mechanisms involved. *Indian J. Exp. Biol.* 43:301-312.

Stolz, A. 2001. Basic and applied aspects in the microbial degradation of azo dyes. *Appl Microbiol Biotechnol.* 56:69–80.

Suki, C. and Croan, U.S. 2002. Utilization of treated conifer wood chips by *Pleurotus p. karst.* species for cultivating mushrooms. *Biotechnology Letters.* 35: 1223–1230.

Swamy, J. and Ramsay, J. 1999. The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. *Enzyme and Microbial Technology.* 24:130-137.

Taylor, A., Stoj, C., Ziegler, L., Kosman, D. and Hart, P. 2005. The copper-iron connection in biology: Structure of the metallo-oxidase. *P.N.A.S.* 102 (43): 15459-15464.

Tinoco, R., Pickard, M. and Vazquez, R. 2001. Kinetic differences of purified laccases from six *Pleurotus ostreatus* strains. *Letters in Applied Microbiology.* 32:331-335.

Urzúa, U., Larrondo, F., Lobos, S., Larrain, J. and Vicuña, R. 1995. Oxidation reactions catalyzed by manganese peroxidase isoenzymes from *Ceriporiopsis subvermispota*. *FEBS Letters.* 371: 132-136.

Van der Maarel, M., Van der Veen, B., Uitdehaag, J., Leemhuis, H. and Dijkhuizen, L. 2002. Properties and applications of starch-converting enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. *Journal of Biotechnology.* 94:137–155.

Van der Zee, F., Field, A. and Lettinga, G. 1999. The Role of Autocatalysis in the Mechanism of Anaerobic Azo Reduction. *Waste Minimisation and End of Pipe Treatment in Chemical and Petrochemical Industries.* 13:100-112.

Vyas, R., Stepler, H. and Housing, D. 2007. Involvement of an Extracellular H.sub.2 O.sub.2 -Dependent Ligninolytic Activity of the White Rot Fungus *Pleurotus ostreatus*

in the Decolorization of Remazol Brilliant Blue R. *Applied and Environmental Microbiology*. 61(1):3919-3927.

Waigh, L. 1997. Analysis of the native structure of starch granules with X-ray microfocus diffraction. *Macromolecules*. 30: 3813-3820

Wang, Y., Vazquez, R. and Pickard, M. 2002. Effect of growth conditions on the production of manganese peroxidase by three strain of *Bjerkandera adusta*. *Can. J. Microbiol.* 47: 277-282.

Wagner, G. and Wolf, D. 1998. Carbon transformations and soil organic matter formation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 76: 122-129.

Wesenberg, D., Kyriakides, I. and Agathos, S. 2003. White –rot Fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluent. *Biotechnology Advances*. 22: 161-187.

Wu, B., Hu, G., Feng, H., Wu, J. and Zhang, Z. 2007. Cloning and Expression of an  $\alpha$ -Amylase Gene from *Phanerochaete chrysosporium*. *Current Microbiology*. 55: 105–113.

Yang, Q., Tao, L., Yang, M. and Zhang, H. 2008. Effects of glucose on the decolorization of Reactive Black 5 by yeast isolates. *Journal of Environmental Sciences*. 20:105-108.

Yang, Q., Yediler, A., Yang, M. and Kettrup, A. 2005. Decoloration of an azo dye, Reactive Black 5 and MnP production by Yeast isolate: *Debaryomyces polymorphus*. *Biochemical Engineering Journal*. 24: 249-253.

Yu, S., Bojsen, K., Svensson, B. and Marcussen, J.1999. K-1,4-Glucan lyases producing 1,5-anhydro-D-fructose from starch and glycogen have sequence similarity to K-glucosidases. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1433:1-15.

Zanon, J., Armengol, J. and Vilaseca, C. 2005. Estudio del síndrome de decaimiento en el cultivo de *Pleurotus ostreatus*. *Bol. San. Veg. Plagas*. 31: 431-441.

Zille, A., Tzanov, T., Gubitz, G. and Cavaco, A. 2003. Immobilized laccase for decolourization of Reactive Black 5 dyeing effluent. *Biotechnology Letters*. 25: 1473–1477.

Zhao, X. and Hardin, I. 2007. HPCL and spectrophotometric analysis of biodegradation of azo dyes by *Pleurotus ostreatus*. *Dyes and pigments*. 73:322-325.

Zhao, X., Lu, Y., Phillips, D., Hwang, H. and Hardin, I. 2006. Study of biodegradation products from azo dyes in fungal degradation by capillary electrophoresis/electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography*. 1159:217-224.

## RECURSOS ELECTRONICOS

Biology - online. <<http://www.biology-online.org/dictionary/Dye>. Consulta 12 de Febrero de 2008>.

Classweb.<[http://www.classweb.hs.iastate.edu/Fall2006/TC/TC404\\_504/notes/Coloration PrecisionDyeNotes.pdf](http://www.classweb.hs.iastate.edu/Fall2006/TC/TC404_504/notes/Coloration%20PrecisionDyeNotes.pdf). Consulta 23 de Marzo de 2008>.

EPA. <<http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/id/infocus/k02028.pdf>. Consulta 17 de Febrero de 2007>.

Fundación Polar.<<http://www.fpolar.org.ve/quimica/fasciculo27.pdf>. Consulta 16 de Marzo de 2008>.

Instituto Nacional de Biodiversidad. <<http://www.Institucionalbiodiversidad/modules/mimodulo/fuentes/tramites.pdf>. Consulta 6 de Marzo de 2008>.

Kulak.<[http://www.ewakulak.com/colombia/asi\\_es\\_colombia/la\\_magia\\_delfique.html](http://www.ewakulak.com/colombia/asi_es_colombia/la_magia_delfique.html). Consulta: 3 de Marzo de 2008>.

## 11. ANEXOS

### ANEXO 1. COMPOSICION Y PREPARACIÓN DEL MEDIO SALVADO DE TRIGO

#### 11.1 Composición

Glucosa (alimentaria)	10 g/ L
Peptona	5 g/L
Extracto de levadura	2 g/L1
Fosfato de potasio monobásico, cristal (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.1 g/L
Sulfato de Magnesio Heptahidratado (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0.05 g/ L
Sulfato de Manganeso (II) Monohidratado(MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O)	0.076 g/ L
Agar – Agar	18 g/ L
Extracto de salvado líquido	1 L

#### 11.1.2. Preparación del medio extracto de salvado

Para preparar 1000 mL de medio extracto de salvado, se introducen en un recipiente 350 g de salvado de trigo y 2000 mL de agua destilada, dejando en remojo durante 1 hora y posteriormente colando y exprimiendo se obtiene el extracto líquido. En 1000 mL de esta solución se adicionan 10 g de glucosa, 5 g de peptona, 2 g de extracto de levadura, 0.1 g de fosfato de potasio monobásico, 0.05 g de sulfato de magnesio y 0.076 g de sulfato de manganeso, ajustando pH a 6.5. La solución anterior es llevada a esterilización en autoclave a 123.2°C, 15 lb de presión durante 15 minutos

### ANEXO 2. COMPOSICION DEL AGAR NUTRITIVO

#### 11.2. Composición

Peptona de carne	5g/L
Extracto de carne	3g/L
Agar- Agar	12g/L
pH	7± 0.2

Se suspendieron 20g de agar nutritivo/L en agua destilada o 8 g de caldo nutritivo/L y se llevaron a autoclavar a 15min, 121°C

### 11.2.1. Prueba de esterilidad del soporte utilizado (Fique)



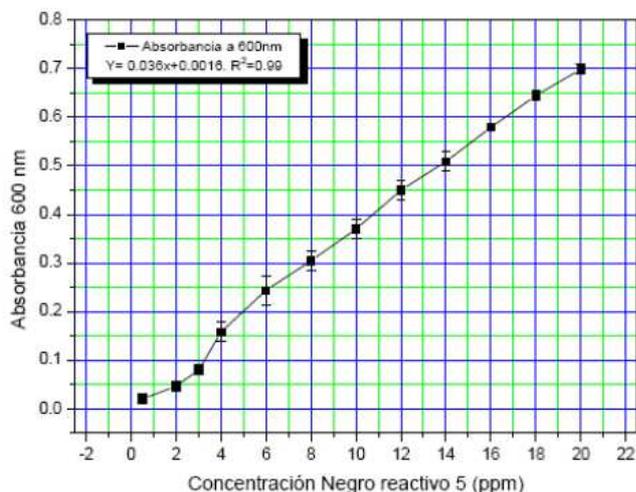
**Figura 34.** Siembra en agar nutritivo de dos hilos de fique, por 24 h a 37° C

**Fuente.** (Autores, 2008)

## ANEXO 3

### 11.3. CURVA CALIBRACIÓN NEGRO REACTIVO 5

Se realizó la curva de calibración, en donde se tomó como concentración máxima 20 ppm, y a partir de ésta se realizó una disminución progresiva de la concentración del colorante (18, 16, 14, 12, 10, 8, 6, 4, 2, 1, 0.5 ppm), obteniendo un total de 12 puntos con los cuales se construyó la curva y se calculó la ecuación de la línea recta arrojando un  $r^2$  de 0.987.



**Figura 35.** Curva calibración del negro reactivo 5

## ANEXO 4

### 11.4. COMPOSICION DEL MEDIO RADHA

Glucosa	2g/L
Fosfato de potasio monobásico $\text{KH}_2\text{PO}_4$	2g/L
Cloruro de amonio $\text{NH}_4\text{CL}$	0,050 g/L
Sulfato de magnesio heptahidratado $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5g/L
Cloruro de calcio dihidratado $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1g/L
Tiamina	100 $\mu\text{g}$
pH final 4.5	

#### Soluciones traza para 10 mL:

Sulfato de manganeso $\text{MnSO}_4$	0,5g/L
Sulfato de hierro heptahidratado $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1g/L
Sulfato de Zinc heptahidratado $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1g/L

## ANEXO 5

### 11.5. MEDIO RADHA SUPLEMENTADO CON NEGRO REACTIVO 5 (150 ppm)

Glucosa	2g/L
Fosfato de potasio monobásico $\text{KH}_2\text{PO}_4$	2g/L
Cloruro de amonio $\text{NH}_4\text{CL}$	0,050 g/L
Sulfato de magnesio heptahidratado $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5g/L
Cloruro de calcio dihidratado $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1g/L
Tiamina	100 $\mu\text{g}$
pH final 4.5	

#### Soluciones traza para 10 mL:

Sulfato de manganeso $\text{MnSO}_4$	0,5g/L
Sulfato de hierro heptahidratado $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1g/L
Sulfato de Zinc heptahidratado $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1g/L

El solvente para disolver los componentes del medio Radha es el negro reactivo 5 a 150 ppm preparado en agua. Este medio se esteriliza a 123.2°C por 15min a 15lb de presión.

## ANEXO 6

### 11.6. CÁLCULOS PARA LA PREPARACIÓN DE LOS INDUCTORES METÁLICOS CuSO<sub>4</sub> Y MnSO<sub>4</sub>

#### 11.6.1. Cálculos para 150µM y 300 µM de CuSO<sub>4</sub>

$$150\mu\text{M de CuSO}_4 \times \frac{1\text{mol}}{10^6\mu\text{mol}} = 1.5 \times 10^{-4} \text{ mol de CuSO}_4$$
$$M = \frac{\text{mol}}{\text{L}} = \frac{1.5 \times 10^{-4} \text{ mol CuSO}_4}{\text{L}} \times \frac{150.08 \text{ g CuSO}_4}{1 \text{ mol CuSO}_4} = 0.0225 \text{ g CuSO}_4/\text{L}$$

$$300\mu\text{M de CuSO}_4 \times \frac{1\text{mol}}{10^6\mu\text{mol}} = 3 \times 10^{-4} \text{ mol de CuSO}_4$$
$$M = \frac{\text{mol}}{\text{L}} = \frac{3 \times 10^{-4} \text{ mol CuSO}_4}{\text{L}} \times \frac{150.08 \text{ g CuSO}_4}{1 \text{ mol CuSO}_4} = 0.04518 \text{ g CuSO}_4/\text{L}$$

#### 11.6.2. Cálculos para 180µM y 360 µM de MnSO<sub>4</sub>

$$360\mu\text{M de MnSO}_4 \times \frac{1\text{mol}}{10^6\mu\text{mol}} = 3.6 \times 10^{-4} \text{ mol de MnSO}_4$$
$$M = \frac{\text{mol}}{\text{L}} = \frac{3.6 \times 10^{-4} \text{ mol MnSO}_4}{\text{L}} \times \frac{150.96 \text{ g MnSO}_4}{1 \text{ mol MnSO}_4} \times \frac{168.02 \text{ g MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}}{150.96 \text{ g MnSO}_4} = 0.0608 \text{ g MnSO}_4/\text{L}$$

$$180\mu\text{M de MnSO}_4 \times \frac{1\text{mol}}{10^6\mu\text{mol}} = 1.8 \times 10^{-4} \text{ mol de MnSO}_4$$
$$M = \frac{\text{mol}}{\text{L}} = \frac{1.8 \times 10^{-4} \text{ mol MnSO}_4}{\text{L}} \times \frac{150.96 \text{ g MnSO}_4}{1 \text{ mol MnSO}_4} \times \frac{168.02 \text{ g MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}}{150.96 \text{ g MnSO}_4} = 0.0302 \text{ g MnSO}_4/\text{L}$$

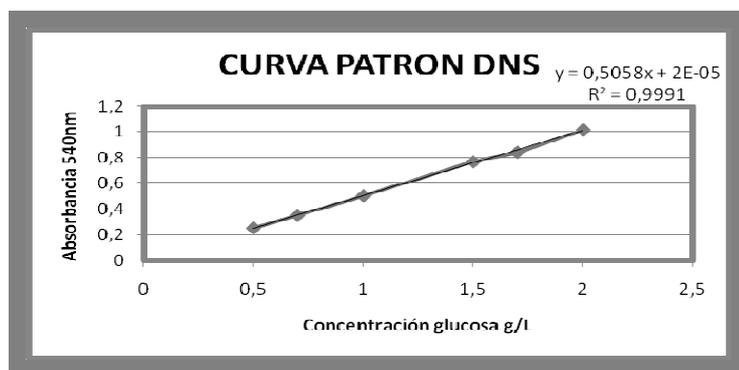
\*El valor se calculara según la cantidad de medio Radha más colorante NR5 a 150 ppm que se desee preparar, la cantidad de inductores se debe añadir a la anterior mezcla.

## ANEXO 7

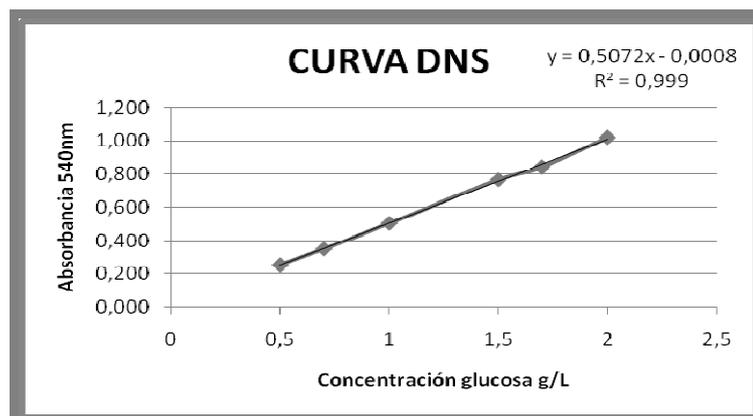
### 11.7. PREPARACIÓN DE LA CURVA PATRON DE DNS

La curva patrón para el análisis de azúcares reductores mediante la Técnica de DNS, se realiza tomando un volumen de 0.25 mL de diferentes concentraciones de glucosa

previamente preparadas, correspondientes a 0.5 g L-1, 0.7 g L-1, 1 g L-1, 1.5 g L-1, 1.7 g L-1, 2 g L-1 y mezclándolas con 0.25 mL de DNS. Luego, se llevan a ebullición por un 5 min, tiempo después se frena la reacción con hielo. Por último, se completa el volumen de las muestras con 2.5 mL, llegando a un volumen final de 3 mL. El blanco que se utiliza es 0.25 mL de muestra y 2.75 mL para completar el volumen de 3 mL.



**Figura 36.** Curva de calibración de DNS utilizada durante la inducción por metales y co sustratos



**Figura 37.** Curva de calibración de DNS utilizada durante la curva de remoción.

## ANEXO 8

### 11.8. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS PARA CUANTIFICACIÓN ENZIMÁTICA

#### 11.8.1. Preparación reactivos para cuantificación de Lacasa

**Acetato de sodio anhidro:** Pese 13.54 g de acetato de sodio anhidro disuelta en 100 mL de agua destilada. Envase en frasco transparente de vidrio y almacena a 4° C. Tiene vida larga.

**Ácido acético glacial:** Mide 7.7 mL de ácido y disuelva en 100 de agua destilada. Envase en frasco transparente y guarde refrigerado, su vida útil es larga.

**ABTS:** Pese 274.35 mg para 100 mL de agua destilada. Envase en frasco ámbar ó vidrio. Almacene a 4° C. EL color inicial es verde, la exposición a la luz genera oxidación, determinando un incremento en la intensidad del verde, pero esto no afecta la determinación, no se debe esterilizar.

#### **Preparación del buffer para actividad lacasa.**

Tome 24.5 mL de acetato de sodio y mezcla con 25.5 mL de ácido acético glacial complete hasta 100 mL, ajuste pH a 4.5 con. Almacenar a 4° C en frasco ámbar, tiene vida útil larga.

Una unidad de Lacasa se define como la cantidad de enzima capaz de oxidar  $\mu\text{mol}$  de ABTS por minuto por litro bajo las condiciones estándar de la prueba.

$$U\text{ Lac/L} = \frac{\text{Absorbancia}}{29300 * 0,8 * \text{tiempo rx}} * 1000000 * \frac{1}{fd}$$

#### **11.8.2. Preparación reactivos para cuantificación de LiP**

**Buffer de tartratos:** pH=3.5

- **Ácido tartárico.** Pesar 9,37 g de Ácido tartárico y disolver en 250 mL de agua destilada.
- **Tartrato de sodio.** Pesar 11.160g de tartrato de sodio y disolver en 250 mL de agua destilada.

Mezclar ambos reactivo para obtener 500 mL el Buffer de tartrato.

**Alcohol Veratrílico** 10Mm Colocar 30.28 $\mu\text{L}$  de Alcohol veratrílico en 20 mL de agua desionizada

**Peróxido de Hidrógeno** 4mM colocar 3.46 $\mu\text{L}$  de Peróxido de Hidrógeno en 100 mL de agua destilada.

Una unidad de MnP se define como la cantidad de enzima capaz de oxidar 1mM de alcohol veratrílico por minuto bajo las condiciones de la prueba

$$U\text{ LiP/L} = \frac{\text{Absorbancia}}{1 * 165 * 0,75} * 1000 * \frac{1}{fd}$$

### 11.8.3. Preparación reactivos para la cuantificación de MnP

**Rojo de fenol:** Peso 0.01 g de rojo de fenol y disuelva en 100 mL de agua destilada. Se debe medir el pH del agua a 7.0 antes de agregar el colorante, si se necesita subir el pH a 7.0 con NaOH 2N. Se coloca en agitación a temperatura ambiente. El color debe ser rojo se almacena a 4 °C en frasco ámbar. Su vida útil es corta. Si hay cambios en color de rojo a amarillo se debe preparar de nuevo, utilizar agua destilada comercial para prepararlo. Si hay precipitación también se debe descartar.

**Lactato de sodio:** Medir 0,625 mL de lactato de sodio y disolver en 100 mL de agua destilada comercial. Almacenar en frasco ámbar a 4 °C. No se ajusta pH, tiene alto riesgo de contaminación.

**Sulfato de Manganeso:** Pesar 7.5 mg y disolver en 500 mL de agua destilada comercial. Almacenar en frasco ámbar a 4° C. No se ajusta pH, tiene alto riesgo de contaminación.

**Albúmina de huevo:** Pese 125 mg g y disuelva en 125 mL de agua destilada comercial. Almacenar en frasco ámbar a 4° C. No se ajusta pH, tiene alto riesgo de contaminación.

**Ácido succínico:** Pese 1.175 g y disuelva en 1 litro de agua destilada comercial. Almacenar en frasco ámbar a 4° C. El pH se ajusta a 4.5 con NaOH 2N, tiene alto riesgo de contaminación.

**NaOH 2N:** Pese 8 g de NaOH y disuelva en 100 mL de agua. Almacenar en frasco ambar a 4° C. No se ajusta pH, tiene alto riesgo de contaminación.

Una unidad de MnP se define como la cantidad de enzima capaz de oxidar 1µmol mol de rojo de fenol por minuto bajo las condiciones de la prueba

$$UMnP/L = \frac{Absorbancia}{4460 \times 0,7 \times 10} \times 1000000 \times \frac{1}{fd}$$

## ANEXO 9

### 11.9. PREPARACIÓN BUFFER FOSFATO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD AMILOLÍTICA

Para preparar 100 mL se debe pesar:

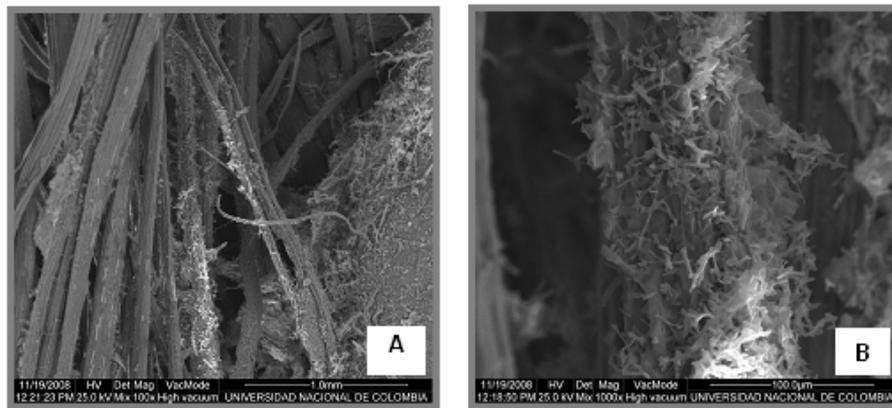
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : **35,61g/L**

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ : **31.21 g/L**

Luego se mezcla 30.5 mL de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  con 19.5 mL de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y se afora con agua hasta 100 mL.

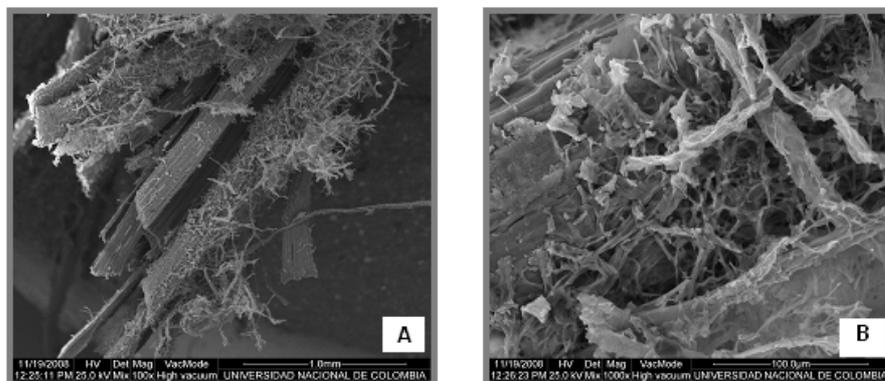
## ANEXO 10

### 11.10. IMÁGENES DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM).



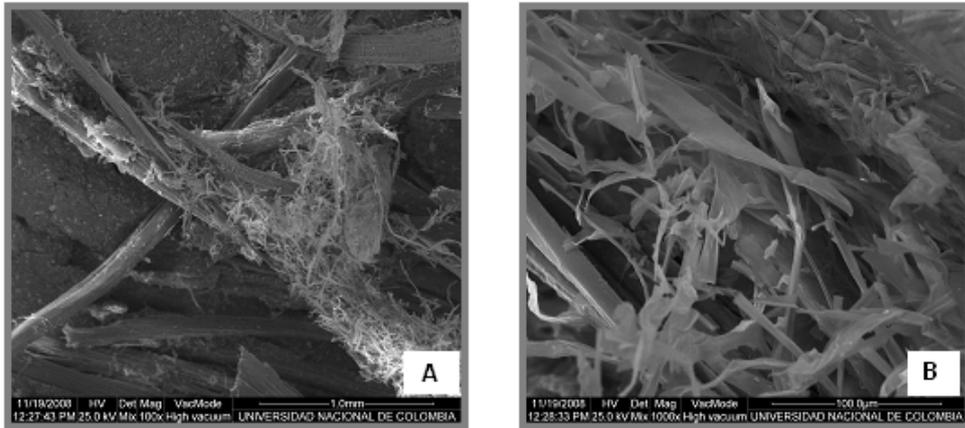
**Figura 38.** SEM correspondiente a la hora cero de tratamiento  
(A) Magnitud 100x (B) Magnitud 1000x.

**Fuente.** (Autores, 2008)



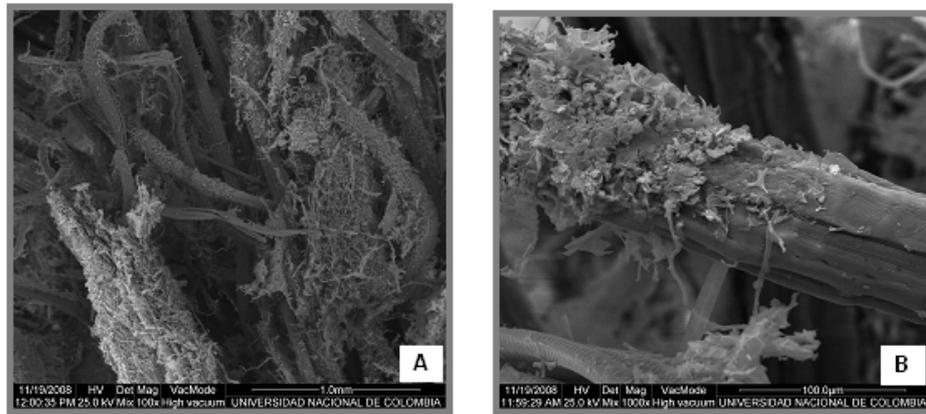
**Figura 39.** SEM correspondiente a la hora seis de tratamiento  
(A) Magnitud 100x (B) Magnitud 1000x.

**Fuente.** (Autores, 2008)



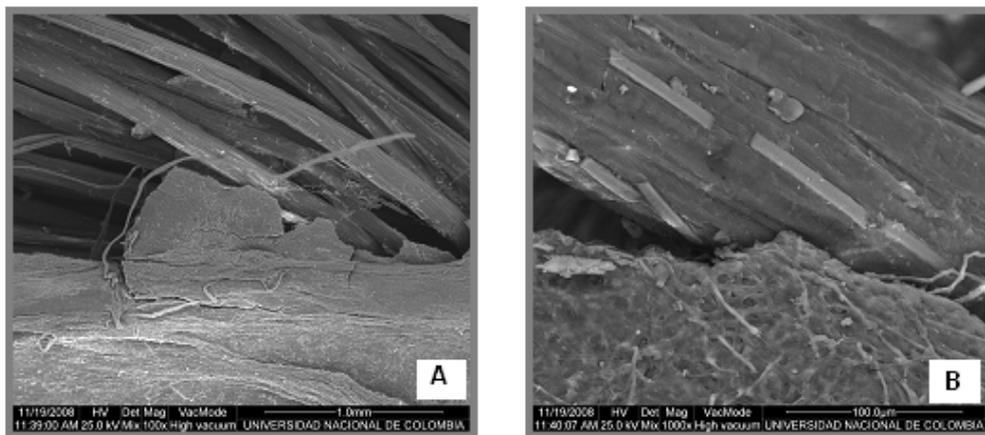
**Figura 40.** SEM correspondiente a las 12 horas de tratamiento  
**(A)** Magnitud 100x **(B)** Magnitud 1000x.

**Fuente.** (Autores, 2008)



**Figura 41.** SEM correspondiente a los 2 días de tratamiento  
**(A)** Magnitud 100x **(B)** Magnitud 1000x.

**Fuente.** (Autores, 2008)



**Figura 42.** SEM correspondiente a los 8 días de tratamiento  
**(A)** Magnitud 100x **(B)** Magnitud 1000x.

**Fuente.** (Autores, 2008)

**ANEXO 11**

**11.11. PRUEBA CUALITATIVA DE CRECIMIENTO DESPUES DE EMPLEAR EL BIOPORTADOR EN LOS DIFERENTES ENSAYOS**



**Figura 43.** Recuperación de *Pleurotus ostreatus* después del tratamiento para la remoción del NR5. Temperatura 30°C.

**Fuente.** (Autores, 2008).

**ANEXO 12**

**11.12. ANÁLISIS ANOVA PARA EL FACTORIAL 2<sup>2</sup> (INDUCCION ENZIMÁTICA POR METALES)**

**Response: Decoloración**

ANOVA	for	Selected	Factorial	Model
Analysis	of	table	sum	of
	variance	[Partial	not	squares]
Source	Sum of	Mean	F	Prob > F
	Squares	Square	Value	
Model	1.42	0.47	1.38	0.3168
A	0.80	0.80	2.32	0.1661
B	0.59	0.59	1.71	0.2276
AB	0.040	0.040	0.12	0.7425
Pure Error	2.74	0.34		
Cor Total	4.16			
		DF		
		3		
		1		
		1		
		1		
		8		
		11		

**Response: lacasa**

**ANOVA for Selected Factorial Model**

**Analysis of variance table [Partial sum of squares] not significant**

Source	Sum of	Mean	F	Prob > F
	Squares	Square	Value	
		DF		
Model	76.42	25.47	2.45	0.1387
		3		

A	11.21	1	11.21	1.08	0.3298
B	35.50	1	35.50	3.41	0.1021
AB	29.70	1	29.70	2.85	0.1298
Pure Error	83.33	8	10.42		
Cor Total	159.75	11			

**Response: MnP**

ANOVA	for	Selected	Factorial	Model	
Analysis of variance	table	[Partial sum of squares]	of squares]	significant	
Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	0.036	3	0.012	16.37	0.0009
B	0.011	1	0.011	15.10	0.0046
AB	0.023	1	0.023	31.67	0.0005
Pure Error	5.913E-003	8	7.392E-004		
Cor Total	0.042	11			

**Response: LiP**

ANOVA	for	Selected	Factorial	Model	
Analysis of variance	table	[Partial sum of squares]	of squares]	not significant	
Source	Sum of Squares	DF	Mean Square	F Value	Prob > F
Model	0.016	3	5.344E-003	1.50	0.2873
A2.700E	003	1	2.700E-003	0.76	0.4096
B8.533E	-003	1	8.533E-003	2.39	0.1605
AB4.800E	-003	1	4.800E-003	1.35	0.2795
Pure Error	0.029	8	3.567E-003		

**ANEXO 11.12.1. COMPARACION DE MEDIAS ENTRE TRATAMIENTOS Y EL CONTROL (Inducción por metales).**

SAS. 60

The SAS System 12:09 Saturday, May 29, 2008 1

Obs	TRA	REP	DEC	MNP	LAC	LIP
1	1	1	96.85	0.00	18.42	2.79983
2	1	2	97.32	0.90	17.14	2.79983
3	1	3	96.32	0.70	14.14	2.83397
4	2	1	95.76	1.95	19.06	2.80837
5	2	2	95.65	2.63	13.87	2.82544
6	2	3	97.19	1.83	20.41	2.78276
7	3	1	97.45	0.61	28.04	2.76569
8	3	2	96.95	1.44	23.32	2.77422
9	3	3	97.07	0.70	18.10	2.62911
10	4	1	97.06	0.00	22.89	2.85958
11	4	2	97.11	0.00	18.34	2.70593
12	4	3	96.11	0.00	17.56	2.79983
13	5	1	95.36	0.00	17.98	1.44259
14	5	2	94.90	0.00	19.05	1.44000
15	5	3	94.54	0.00	20.12	1.44259

**t Tests (LSD) for DEC**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	10
Error Mean Square	0.308593
Critical Value of t	2.22814
Least Significant Difference	1.0106

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	TRA
A	97.1567	3	3
A			
A	96.8300	3	1
A			
A	96.7600	3	4
A			
A	96.2000	3	2
B	94.9333	3	5

**t Tests (LSD) for MNP**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	10
Error Mean Square	0.12338
Critical Value of t	2.22814
Least Significant Difference	0.639

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	TRA
A	2.1367	3	2
B	0.9167	3	3
B			
C B	0.5333	3	1
C			
C	0.0000	3	4
C			
C	0.0000	3	5

**t Tests (LSD) for LAC**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	10
Error Mean Square	10.18022
Critical Value of t	2.22814
Least Significant Difference	5.8046

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	TRA
A	23.153	3	3
A			
B A	19.597	3	4
B A			
B A	19.050	3	5
B A			
B A	17.780	3	2
B			
B	16.567		

**t Tests (LSD) for LIP**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	10

Error Mean Square                    0.002696  
 Critical Value of t                    2.22814  
 Least Significant Difference        0.0945

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	TRA
A	2.81121	3	1
A			
A	2.80552	3	2
A			
A	2.78845	3	4
A			
A	2.72300	3	3
B	1.44173	3	5

## ANEXO 12

### 11.12.2. COMPARACION MEDIAS CO-SUSTRATO

Obs	TRA	REP	ART	DEC	PPM	MNP	LIP	LAC
1	1	1	0.120	96.595	5.250	0.096	0.000	13.993
2	1	2	0.160	96.930	4.639	0.000	0.024	9.044
3	1	3	0.140	96.774	4.861	0.000	0.008	12.742
4	2	1	0.210	95.480	7.140	0.160	0.180	18.260
5	2	2	0.250	95.380	7.390	0.540	0.040	15.590
6	2	3	0.090	96.510	5.440	0.000	0.030	11.380
7	3	1	0.180	94.970	8.080	0.000	0.020	6.540
8	3	2	0.170	95.480	7.140	0.000	0.270	7.050
9	3	3	0.170	94.410	8.810	0.000	0.110	8.870
10	4	1	0.150	95.830	6.530	0.740	0.490	10.130
11	4	2	0.160	95.080	7.670	0.000	0.300	9.330
12	4	3	0.150	95.640	6.690	0.000	0.000	10.690
13	5	1	0.100	93.940	9.080	0.000	0.100	11.950
14	5	2	0.150	94.340	8.330	0.000	0.050	13.770
15	5	3	1.120	94.150	8.690	0.000	0.000	17.060
16	6	1	0.100	96.520	5.360	0.190	0.010	1.880
17	6	2	0.140	96.090	6.140	0.000	0.000	11.890
18	6	3	0.140	95.710	6.720	0.000	0.130	12.630
19	7	1	0.120	94.068	9.278	0.865	0.154	2.688
20	7	2	0.070	94.655	8.167	4.260	0.251	8.191
21	7	3	0.110	94.485	8.472	0.000	0.113	9.044
22	8	1	0.020	96.670	5.080	0.000	0.440	10.580

23	8	2	0.170	95.790	6.500	0.000	0.110	19.000
24	8	3	0.110	96.310	5.750	0.000	0.320	9.000
25	9	1	0.131	93.938	9.389	0.769	0.048	11.519
26	9	2	0.146	93.945	9.278	0.993	0.000	15.956
27	9	3	0.140	93.925	9.444	0.801	0.057	10.324

**t Tests (LSD) for ART**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	18
Error Mean Square	0.038336
Critical Value of t	2.10092
Least Significant Difference	0.3359

Means with the same letter are not significantly different.

t	Grouping	Mean	N	TRA
	A	0.4567	3	5
	A			
B	A	0.1833	3	2
B	A			
B	A	0.1733	3	3
B	A			
B	A	0.1533	3	4
B	A			
B	A	0.1400	3	1
B	A			
B	A	0.1390	3	9
B	A			
B	A	0.1267	3	6
B				
B		0.1000	3	8
B				
B		0.1000	3	7

**t Tests (LSD) for DEC**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	18
Error Mean Square	0.149911
Critical Value of t	2.10092
Least Significant Difference	0.6642

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	TRA
A	96.7663	3	1
A			
B A	96.2567	3	8
B A			
B A C	96.1067	3	6
B C			
B C	95.7900	3	2
C			
D C	95.5167	3	4
D			
E D	94.9533	3	3
E			
E F	94.4027	3	7
F			
F	94.1433	3	5
F			
F	93.9360	3	9

**t Tests (LSD) for PPM**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	18
Error Mean Square	0.416782
Critical Value of t	2.10092
Least Significant Difference	1.1074

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	TRA
A	9.3703	3	9
A			
B A	8.7000	3	5
B A			
B A	8.6390	3	7
B			
B C	8.0100	3	3
C			
D C	6.9633	3	4
D			
D E	6.6567	3	2
D E			
D E	6.0733	3	6
E			

F	E	5.7767	3	8
F				
F		4.9167	3	1

**t Tests (LSD) for MNP**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	18
Error Mean Square	0.595506
Critical Value of t	2.10092
Least Significant Difference	1.3238

Means with the same letter are not significantly different.

t	Grouping	Mean	N	TRA
	A	1.7083	3	7
	A			
B	A	0.8543	3	9
	B			
	B	0.2467	3	4
	B			
	B	0.2333	3	2
	B			
	B	0.0633	3	6
	B			
	B	0.0320	3	1
	B			
	B	0.0000	3	3
	B			
	B	0.0000	3	8
	B			
	B	0.0000	3	5

**t Tests (LSD) for LIP**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	18
Error Mean Square	0.013983
Critical Value of t	2.10092
Least Significant Difference	0.2028

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	TRA
A	0.29000	3	8
A			
B A	0.26333	3	4
B A			
B A C	0.17267	3	7
B A C			
B A C	0.13333	3	3
B C			
B C	0.08333	3	2
C			
C	0.05000	3	5
C			
C	0.04667	3	6
C			
C	0.03500	3	9
C			
C	0.01067	3	1

**t Tests (LSD) for LAC**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	18
Error Mean Square	12.55408
Critical Value of t	2.10092
Least Significant Difference	6.0779

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	TRA
A	15.077	3	2
A			
B A	14.260	3	5
B A			
B A C	12.860	3	8
B A C			
B D A C	12.600	3	9
B D A C			
B D A C	11.926	3	1
B D A C			
B D A C	10.050	3	4
B D C			
B D C	8.800	3	6
D C			

D	C	7.487	3	3
D				
D		6.641	3	7

### 11.12.2.1. COMPARACION DE MEDIAS PARA T1, T2,T,7 Y T8

T1 : ALMIDÓN +1, T2 : ALMIDÓN-1, T3 :GLUCOSA +1 (7), T4 : GLUCOSA-1 (8)

Obs	TRA	REP	ART	DEC	PPM	MNP	LIP	LAC
1	1	1	0.12	96.595	5.250	0.096	0.000	13.993
2	1	2	0.16	96.930	4.639	0.000	0.024	9.044
3	1	3	0.14	96.774	4.861	0.000	0.008	12.742
4	2	1	0.21	95.480	7.140	0.160	0.180	18.260
5	2	2	0.25	95.380	7.390	0.540	0.040	15.590
6	2	3	0.09	96.510	5.440	0.000	0.030	11.380
7	3	1	0.12	94.068	9.278	0.865	0.154	2.688
8	3	2	0.07	94.655	8.167	4.260	0.251	8.191
9	3	3	0.11	94.485	8.472	0.000	0.113	9.044
10	4	1	0.02	96.670	5.080	0.000	0.440	10.580
11	4	2	0.17	95.790	6.500	0.000	0.110	19.000
12	4	3	0.11	96.310	5.750	0.000	0.320	9.000

#### t Tests (LSD) for ART

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	8
Error Mean Square	0.003433
Critical Value of t	2.30600
Least Significant Difference	0.1103

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	TRA
A	0.18333	3	2
A			
A	0.14000	3	1
A			
A	0.10000	3	3
A			
A	0.10000	3	4

#### t Tests (LSD) for DEC

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	8
Error Mean Square	0.17659
Critical Value of t	2.30600
Least Significant Difference	0.7912

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	TRA
A	96.7663	3	1
A			
B A	96.2567	3	4
B			
B	95.7900	3	2
C	94.4027	3	3

**t Tests (LSD) for PPM**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	8
Error Mean Square	0.513904
Critical Value of t	2.30600
Least Significant Difference	1.3498

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	TRA
A	8.6390	3	3
B	6.6567	3	2
B			
C B	5.7767	3	4
C			
C	4.9167	3	1

**t Tests (LSD) for MNP rate.**

Alpha	0.05
-------	------

Error Degrees of Freedom	8
Error Mean Square	1.287578
Critical Value of t	2.30600
Least Significant Difference	2.1365

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	TRA
A	1.7083	3	3
A			
A	0.2333	3	2
A			
A	0.0320	3	1
A			
A	0.0000	3	4

**t Tests (LSD) for LIP**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	8
Error Mean Square	0.010026
Critical Value of t	2.30600
Least Significant Difference	0.1885

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	TRA
A	0.29000	3	4
A			
B A	0.17267	3	3
B			
B	0.08333	3	2
B			
B	0.01067	3	1

**t Tests (LSD) for LAC**

Alpha	0.05
-------	------

Error Degrees of Freedom	8
Error Mean Square	14.86343
Critical Value of t	2.30600
Least Significant Difference	7.259

Means with the same letter are not significantly different.

t	Grouping	Mean	N	TRA
	A	15.077	3	2
	A			
B	A	12.860	3	4
B	A			
B	A	11.926	3	1
B				
B		6.641	3	3

#### 11.12.2.1.2. COMPARACION DE MEDIAS ENTRE EL T1 (Almidón 2g/L) y T2 (Almidón 0.2g/L)

Obs	TRA	REP	ART	DEC	PPM	MNP	LIP	LAC
1	1	1	0.12	96.595	5.250	0.096	0.000	13.993
2	1	2	0.16	96.930	4.639	0.000	0.024	9.044
3	1	3	0.14	96.774	4.861	0.000	0.008	12.742
4	2	1	0.21	95.480	7.140	0.160	0.180	18.260
5	2	2	0.25	95.380	7.390	0.540	0.040	15.590
6	2	3	0.09	96.510	5.440	0.000	0.030	11.380

#### t Tests (LSD) for ART

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	4
Error Mean Square	0.003667
Critical Value of t	2.77645
Least Significant Difference	0.1373

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	TRA
A	0.18333	3	2
A			
A	0.14000	3	1

**t Tests (LSD) for DEC**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	4
Error Mean Square	0.2097
Critical Value of t	2.77645
Least Significant Difference	1.0381

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	TRA
A	96.7663	3	1
A			
A	95.7900	3	2

**t Tests (LSD) for PPM**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	4
Error Mean Square	0.610744
Critical Value of t	2.77645
Least Significant Difference	1.7716

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	TRA
A	6.6567	3	2
A			
A	4.9167	3	1

**t Tests (LSD) for MNP**

Alpha 0.05  
Error Degrees of Freedom 4  
Error Mean Square 0.040003  
Critical Value of t 2.77645  
Least Significant Difference 0.4534

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	TRA
A	0.2333	3	2
A			
A	0.0320	3	1

**t Tests (LSD) for LIP**

Alpha 0.05  
Error Degrees of Freedom 4  
Error Mean Square 0.003591  
Critical Value of t 2.77645  
Least Significant Difference 0.1359

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	TRA
A	0.08333	3	2
A			
A	0.01067	3	1

**t Tests (LSD) for LAC**

Alpha 0.05  
Error Degrees of Freedom 4  
Error Mean Square 9.326684  
Critical Value of t 2.77645  
Least Significant Difference 6.9232

Means with the same letter are not significantly different.

t	Grouping	Mean	N	TRA
	A	15.077	3	2
	A			
	A	11.926	3	1

## ANEXO 13

### 11.13 RESULTADOS ANALISIS ESTADISTICO PARA CURVAS DE REMOCIÓN A ESCALA DE MATRAZ

#### 11.13.1. COMPARACIÓN DE MEDIAS PARA EL TRATAMIENTO BIOLÓGICO TOMANDO TODOS LOS TIEMPOS DE LA CURVA.

Obs	TIM	REP	DEC	LAC	MNP	LIP	UAM
1	0.00	1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2	0.00	2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3	0.00	3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
4	0.25	1	91.726	15.273	0.000	0.000	19.248
5	0.25	2	90.176	19.881	0.000	0.000	24.199
6	0.25	3	89.589	20.648	0.000	0.000	27.682
7	0.50	1	92.527	16.980	0.000	0.024	18.331
8	0.50	2	93.768	13.567	0.000	0.000	10.081
9	0.50	3	93.202	18.003	0.096	0.000	24.015
10	0.75	1	92.865	22.696	1.121	0.081	9.347
11	0.75	2	93.415	21.297	0.000	0.024	9.897
12	0.75	3	94.075	24.600	0.000	0.000	8.797
13	1.00	1	96.975	4.608	0.000	0.000	9.897
14	1.00	2	96.796	5.333	1.345	0.097	10.631
15	1.00	3	96.558	5.589	0.000	0.065	6.780
16	2.00	1	94.786	6.579	0.000	0.089	8.614
17	2.00	2	95.775	6.593	0.000	0.186	7.147
18	2.00	3	96.182	6.911	0.000	0.000	8.981
19	3.00	1	96.157	16.098	0.000	0.210	9.347
20	3.00	2	96.250	16.439	0.000	0.016	6.964
21	3.00	3	96.284	16.860	0.000	0.008	5.497
22	4.00	1	94.964	27.645	0.000	0.000	7.697

23	4.00	2	95.176	28.925	0.000	0.000	8.981
24	4.00	3	95.462	28.242	0.000	0.000	7.697
25	5.00	1	93.292	28.370	0.448	0.000	6.414
26	5.00	2	93.556	32.153	0.000	0.024	6.230
27	5.00	3	93.836	29.764	0.000	0.000	7.514
28	6.00	1	92.064	26.081	0.000	0.089	5.864
29	6.00	2	91.761	27.026	0.000	0.000	6.047
30	6.00	3	89.932	29.465	0.000	0.186	8.981
31	7.00	1	88.861	28.157	0.000	0.234	8.614
32	7.00	2	89.067	28.441	0.000	0.008	6.047
33	7.00	3	89.555	32.708	0.000	0.000	10.081
34	8.00	1	91.726	26.024	0.000	0.000	6.230
35	8.00	2	90.458	28.299	0.000	0.024	14.664
36	8.00	3	91.558	27.588	0.000	0.275	12.281

#### t Tests (LSD) for DEC

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	24
Error Mean Square	0.383649
Critical Value of t	2.06390
Least Significant Difference	1.0438

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	TIM
A	96.7763	3	1
A			
B	96.2303	3	3
B			
B	95.5810	3	2
B			
B	95.2007	3	4
C	93.5613	3	5
C			
C	93.4517	3	0.75
C			
C	93.1657	3	0.5
D	91.2523	3	6
D			
D	91.2473	3	8
D			

D	90.4970	3	0.25
E	89.1610	3	7
F	0.0000	3	0

### 11.13.2. COMPARACION DE MEDIAS TRATAMIENTO BIOLÓGICO (T1) Y ABIÓTICO (T2)

Obs	TRA	TIM	REP	DEC	LAC	MNP	LIP	UAM
1	1	0.00	1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2	1	0.00	2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3	1	0.00	3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
4	1	0.25	1	91.726	15.273	0.000	0.000	19.248
5	1	0.25	2	90.176	19.881	0.000	0.000	24.199
6	1	0.25	3	89.589	20.648	0.000	0.000	27.682
7	1	0.50	1	92.527	16.980	0.000	0.024	18.331
8	1	0.50	2	93.768	13.567	0.000	0.000	10.081
9	1	0.50	3	93.202	18.003	0.096	0.000	24.015
10	1	0.75	1	92.865	22.696	1.121	0.081	9.347
11	1	0.75	2	93.415	21.297	0.000	0.024	9.897
12	1	0.75	3	94.075	24.600	0.000	0.000	8.797
13	1	1.00	1	96.975	4.608	0.000	0.000	9.897
14	1	1.00	2	96.796	5.333	1.345	0.097	10.631
15	1	1.00	3	96.558	5.589	0.000	0.065	6.780
16	1	2.00	1	94.786	6.579	0.000	0.089	8.614
17	1	2.00	2	95.775	6.593	0.000	0.186	7.147
18	1	2.00	3	96.182	6.911	0.000	0.000	8.981
19	1	3.00	1	96.157	16.098	0.000	0.210	9.347
20	1	3.00	2	96.250	16.439	0.000	0.016	6.964
21	1	3.00	3	96.284	16.860	0.000	0.008	5.497
22	1	4.00	1	94.964	27.645	0.000	0.000	7.697
23	1	4.00	2	95.176	28.925	0.000	0.000	8.981
24	1	4.00	3	95.462	28.242	0.000	0.000	7.697
25	1	5.00	1	93.292	28.370	0.448	0.000	6.414
26	1	5.00	2	93.556	32.153	0.000	0.024	6.230
27	1	5.00	3	93.836	29.764	0.000	0.000	7.514
28	1	6.00	1	92.064	26.081	0.000	0.089	5.864
29	1	6.00	2	91.761	27.026	0.000	0.000	6.047
30	1	6.00	3	89.932	29.465	0.000	0.186	8.981
31	1	7.00	1	88.861	28.157	0.000	0.234	8.614
32	1	7.00	2	89.067	28.441	0.000	0.008	6.047
33	1	7.00	3	89.555	32.708	0.000	0.000	10.081
34	1	8.00	1	91.726	26.024	0.000	0.000	6.230

35	1	8.00	2	90.458	28.299	0.000	0.024	14.664
36	1	8.00	3	91.558	27.588	0.000	0.275	12.281
37	2	0.00	1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
38	2	0.00	2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
39	2	0.00	3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
40	2	0.25	1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
41	2	0.25	2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
42	2	0.25	3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
43	2	0.50	1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
44	2	0.50	2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
45	2	0.50	3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
46	2	0.75	1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
47	2	0.75	2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
48	2	0.75	3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
49	2	1.00	1	17.606	0.000	0.000	0.000	0.000
50	2	1	2	18.815	0	0	0	0
51	2	2	1	23.592	0	0	0	0
52	2	2	2	25.087	0	0	0	0
53	2	3	1	20.423	0	0	0	0
54	2	3	2	19.164	0	0	0	0
55	2	4	1	22.183	0	0	0	0
56	2	4	2	17.073	0	0	0	0
57	2	5	1	23.239	0	0	0	0
58	2	5	2	24.390	0	0	0	0
59	2	6	1	31.338	0	0	0	0
60	2	6	2	31.359	0	0	0	0
61	2	7	1	28.169	0	0	0	0
62	2	7	2	28.571	0	0	0	0
63	2	8	1	33.451	0	0	0	0
64	2	8	2	34.843	0	0	0	0

**t Tests (LSD) for DEC**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	62
Error Mean Square	466.0496
Critical Value of t	1.99897
Least Significant Difference	10.874
Harmonic Mean of Cell Sizes	31.5

NOTE: Cell sizes are not equal.

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	TRA
------------	------	---	-----

A	85.510	36	1
---	--------	----	---

B	14.261	28	2
---	--------	----	---

**t Tests (LSD) for LAC**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	62
Error Mean Square	59.07391
Critical Value of t	1.99897
Least Significant Difference	3.8714
Harmonic Mean of Cell Sizes	31.5

NOTE: Cell sizes are not equal.

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	TRA
------------	------	---	-----

A	19.079	36	1
---	--------	----	---

B	0.000	28	2
---	-------	----	---

**t Tests (LSD) for MNP**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	62
Error Mean Square	0.048773
Critical Value of t	1.99897
Least Significant Difference	0.1112
Harmonic Mean of Cell Sizes	31.5

NOTE: Cell sizes are not equal.

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	TRA
------------	------	---	-----

A	0.08361	36	1
---	---------	----	---

A			
---	--	--	--

A	0.00000	28	2
---	---------	----	---

**t Tests (LSD) for LIP**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	62
Error Mean Square	0.00335
Critical Value of t	1.99897
Least Significant Difference	0.0292
Harmonic Mean of Cell Sizes	31.5

NOTE: Cell sizes are not equal.

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	TRA
A	0.04556	36	1
B	0.00000	28	2

**t Tests (LSD) for UAM**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	62
Error Mean Square	21.82596
Critical Value of t	1.99897
Least Significant Difference	2.3532
Harmonic Mean of Cell Sizes	31.5

NOTE: Cell sizes are not equal.

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	TRA
A	9.689	36	1
B	0.000	28	2

**t Tests (LSD) for LAC**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	24
Error Mean Square	2.667502
Critical Value of t	2.06390
Least Significant Difference	2.7523

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	TIM
A	30.096	3	5
A			
B A	29.769	3	7
B A			
B A	28.271	3	4
B A			
B A	27.524	3	6
B			
B	27.304	3	8
C	22.864	3	0.75
D	18.601	3	0.25
D			
D	16.466	3	3
D			
D	16.183	3	0.5
E	6.694	3	2
E			
E	5.177	3	1
F	0.000	3	0

**t Tests (LSD) for MNP**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	24
Error Mean Square	0.090989
Critical Value of t	2.06390
Least Significant Difference	0.5083

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	TIM
A	0.4483	3	1
A			
A	0.3737	3	0.75
A			
A	0.1493	3	5
A			
A	0.0320	3	0.5
A			
A	0.0000	3	0.25
A			
A	0.0000	3	2
A			
A	0.0000	3	3
A			
A	0.0000	3	4
A			
A	0.0000	3	0
A			
A	0.0000	3	6
A			
A	0.0000	3	7
A			
A	0.0000	3	8

**t Tests (LSD) for LIP**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	24
Error Mean Square	0.006317
Critical Value of t	2.06390
Least Significant Difference	0.1339

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	TIM
A	0.09967	3	8

A			
A	0.09167	3	6
A			
A	0.09167	3	2
A			
A	0.08067	3	7
A			
A	0.07800	3	3
A			
A	0.05400	3	1
A			
A	0.03500	3	0.75
A			
A	0.00800	3	5
A			
A	0.00800	3	0.5
A			
A	0.00000	3	0.25
A			
A	0.00000	3	0
A			
A	0.00000	3	4

**t Tests (LSD) for UAM**

Alpha	0.05
Error Degrees of Freedom	24
Error Mean Square	8.617969
Critical Value of t	2.06390
Least Significant Difference	4.947

Means with the same letter are not significantly different.

t Grouping	Mean	N	TIM
A	23.710	3	0.25
B	17.476	3	0.5
C	11.058	3	8
C			
C	9.347	3	0.75

C			
C	9.103	3	1
C			
C	8.247	3	7
C			
C	8.247	3	2
C			
C	8.125	3	4
C			
C	7.269	3	3
C			
C	6.964	3	6
C			
C	6.719	3	5
D	0.000	3	0

### 11.13.2.1. CORRELACIÓN DE VARIABLES HASTA LAS 24 HORAS.

#### The CORR Procedure

6 With Variables: DEC PPM LAC MNP LIP UAM  
 6 Variables: DEC PPM LAC MNP LIP UAM

#### Simple Statistics

Variable	N	Mean	Std Dev	Sum	Minimum	Maximum
DEC	13	71.40908	40.74928	928.31800	0	96.97500
PPM	13	42.97638	60.98973	558.69300	4.27800	153.33300
LAC	13	13.65792	9.22591	177.55300	0	24.60000
MNP	13	0.09362	0.30983	1.21700	0	1.12100
LIP	13	0.00992	0.02315	0.12900	0	0.08100
UAM	13	12.42262	9.53598	161.49400	0	27.68200

Pearson Correlation Coefficients, N = 13  
 Prob > |r| under H0: Rho=0

	DEC	PPM	LAC	MNP	LIP	UAM
DEC	1.00000	-0.99977 <.0001	0.82991 0.0004	0.17256 0.5729	0.24492 0.4200	0.71951 0.0056
PPM	-0.99977 <.0001	1.00000	-0.82833 0.0005	-0.17331 0.5712	-0.24607 0.4177	-0.71713 0.0058
LAC	0.82991 0.0004	-0.82833 0.0005	1.00000	0.30753 0.3067	0.38823 0.1899	0.66899 0.0124
MNP	0.17256 0.5729	-0.17331 0.5712	0.30753 0.3067	1.00000	0.91452 <.0001	-0.06586 0.8307
LIP	0.24492 0.4200	-0.24607 0.4177	0.38823 0.1899	0.91452 <.0001	1.00000	-0.06339 0.8370
UAM	0.71951 0.0056	-0.71713 0.0058	0.66899 0.0124	-0.06586 0.8307	-0.06339 0.8370	1.00000