

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE MÉRIDA

TESIS

**“REMOCIÓN DE TINTES INDUSTRIALES POR TRATAMIENTOS
NATURALES RENOVABLES.”**

PARA OPTAR AL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

IBQ. INGRID ARACELY ALVAREZ BRICEÑO

ASESOR:

DR. SARA SOLÍS PEREIRA

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO.

26 DE OCTUBRE DE 2016

SEP

SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
Instituto Tecnológico de Mérida

DEPENDENCIA: DIV. DE EST. DE POSG. E INV.
No. DE OFICIO: X-548/2016

ASUNTO: AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

MÉRIDA, YUCATÁN A 18 DE OCTUBRE DE 2016

C. INGRID ARACELY ALVAREZ BRICEÑO
PASANTE DE MAESTRIA EN CIENCIAS DE LOS
ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

De acuerdo al fallo emitido por su asesora la **Dra. Sara Elena Solís Pereira** y la comisión revisora integrada por el Dr. Jorge Abraham Tamayo Cortez, el Dr. Gabriel Lizama Uc, y el Dr. Luis Fernando Cuevas Glory, considerando que cubre los requisitos establecidos en el Reglamento de Titulación de los Institutos Tecnológicos le autorizamos la impresión de su trabajo profesional con la TESIS:

"REMOCIÓN DE TINTES INDUSTRIALES POR TRATAMIENTOS NATURALES RENOVABLES"

ATENTAMENTE
IN HOC SIGNO VINCES

M.C. MIRIAM H. SÁNCHEZ MONROY
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS
DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

C.p. Archivo
MHSM/fja



S. E. P.
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE MÉRIDA
DIVISION DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACION



* SEP Instituto Tecnológico de Mérida, Km.5 Carretera Mérida-Progreso A.P 911
C.P 97118 Mérida Yucatán, México, Tels. 964-50-00, Ext. 10001, 10401
10601, 10201 e-mail:itm@itmerida.mx <http://www.itmerida.mx>



DEDICATORIA

A Dios por estar conmigo en todo momento, haberme dado salud para lograr mis objetivos y permitirme concluir esta etapa de mi vida.

A mi esposo Jardiel y mis hijas Karime y Jaridel por su paciencia, su comprensión y por su amor, los amo gracias por ser parte de mi vida.

A mis padres Wilbert y Soledad por apoyarme, por sus consejos y su amor incondicional.

A mis lindas hermanas Elmy, Claudia, Marisol y Jennifer por su cariño, su comprensión y por el apoyarme siempre en el cuidado de mis niñas.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora la Dra. Sara Solís por su apoyo, paciencia, consejos, comprensión en todo momento y por compartir conmigo sus conocimientos a lo largo de este proyecto.

A mis revisores de tesis el Dr Gabriel Lizama Uc y el Dr. Luis Cuevas Glory, por sus consejos y su excelente disposición para la revisión de la tesis.

Al Dr. Jorge Tamayo por sus enseñanzas, consejos y su amistad.

A la Dr. Wendy Ancona por brindarme su amistad, sus consejos dentro y fuera del laboratorio y su apoyo en todo momento.

A la Dra. Odri Sosa Moguel, por las facilidades otorgadas para el uso de los equipos en las pruebas de citotoxicidad, por su tiempo y la ayuda brindada.

A mis compañeros de la Maestría Paola, Ocandy, Lucibel, Adriana, Abraham, Karla y Tefy que me apoyaron y ayudaron gracias por su amistad.

A mis compañeros de laboratorio por su amistad, confianza, sus ánimos y algunas veces su tiempo.

Al Instituto Tecnológico de Mérida por las instalaciones brindadas para la realización de este proyecto.

Al CONACYT por la beca otorgada durante la maestría.

RESUMEN

Los hongos de la podredumbre blanca han demostrado ser capaces de remover tintes recalcitrantes y tóxicos a través del proceso de adsorción y/o la biodegradación enzimática. El desarrollo de procesos industriales requiere la utilización de organismos eficientes y el establecimiento de condiciones que permitan una elevada remoción del tinte en tiempos cortos a fin de reducir los costos del proceso. En este trabajo se establecieron las condiciones para la decoloración del índigo usando biomasa muerta y viva de *Trametes hirsuta* Bm2. Se evaluaron algunos parámetros como el pH, la temperatura, la concentración del inóculo y el tamaño de la esfera (pellets). Las mejores condiciones con micelio muerto fueron: pH3, 30°C, 1 g de inóculo y pellets de 48 horas de cultivo. De esta manera se logró remover 78% de tinte en 1.5 horas. Durante el cultivo de las esferas del hongo vivo se estableció que las mejores condiciones fueron pH6, 30°C, 0.5g de inóculo y pellets de 48 horas de cultivo. También se evaluó la capacidad del micelio vivo para ser reutilizado. Se determinó que los pellets pueden ser usados durante cuatro ciclos de (12 horas) con una eficiencia de remoción del tinte de hasta 74%. Bajo estas condiciones también se detectó la actividad de lacasas cuyos niveles de actividad se incrementaron 8 veces con los ciclos del reuso. Finalmente se realizaron pruebas de citotoxicidad antes y después del tratamiento fúngico empleando células de riñón MCDK. El tinte a concentración 100 mg/L sólo inhibió el crecimiento del 15% de las células y el extracto proveniente del tratamiento con micelio muerto no inhibió el crecimiento. Sin embargo, los extractos obtenidos después del tratamiento con micelio vivo aumentaron el índice de toxicidad hasta 90%, lo que representa un nivel de toxicidad aguda. El incremento en la toxicidad podría ser ocasionada por la acumulación de intermediarios tóxicos durante la biotransformación del tinte. Por lo anterior, en el sistema vivo será necesario evaluar procesos mixtos o el uso de mezclas de mediadores redox que permitan la degradación más eficiente del tinte sin la acumulación de compuestos tóxicos. De esta manera se podría garantizar no sólo la remoción de color sino el desarrollo de un producto inocuo.

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 ANTECEDENTES | 3 |
| 1.1.1 Efluentes textiles..... | 3 |
| 1.1.2 Tintes..... | 4 |
| 1.1.3 Tratamientos para la remoción de tintes..... | 8 |
| 1.1.4 Adsorción | 10 |
| 1.1.5 Hongos de la podredumbre blanca..... | 13 |
| 1.1.6 Micelio vivo | 17 |
| 1.1.7 Micelio muerto..... | 19 |
| 1.1.8 Ensayos de Toxicidad..... | 20 |
| 1.1.9 <i>Trametes hirsuta</i> Bm2..... | 22 |
| 1.2 JUSTIFICACIÓN | 23 |
| 1.3 OBJETIVOS | 24 |
| 1.3.1 Objetivo general | 24 |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS | 25 |
| 2.1 Microorganismo | 25 |
| 2.2 Inóculo..... | 25 |
| 2.3 Obtención de biomasa microbiana viva y muerta (pellets)..... | 25 |
| 2.4 Establecimiento de las condiciones para decoloración del tinte con micelio fúngico muerto y vivo. | 26 |
| 2.4.1 Efecto del pH..... | 26 |
| 2.4.2 Efecto de la temperatura | 26 |
| 2.4.3 Efecto de la concentración del inóculo..... | 27 |
| 2.4.4 Cuantificación de biomasa | 27 |
| 2.4.5 Actividad de la enzima lacasa | 27 |
| 2.4.6 Efecto de la concentración de tinte..... | 27 |
| 2.4.7 Decoloración del tinte | 28 |
| 2.4.8 Reutilización de micelio vivo..... | 28 |
| 2.4.9 Línea celular | 28 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.4.10 | Ensayo de citotoxicidad..... | 29 |
| 2.4.11 | Ensayo MTT | 29 |
| 2.4.12 | Análisis estadístico de los resultados..... | 30 |
| 3. | RESULTADOS Y DISCUSIONES | 31 |
| 3.1 | Obtención de la biomasa..... | 31 |
| 3.2 | Determinación de las condiciones de decoloración con micelio muerto. | 32 |
| 3.2.1 | Efecto del pH..... | 32 |
| 3.2.2 | Efecto de la temperatura | 34 |
| 3.2.3 | Efecto de la concentración de Inóculo..... | 35 |
| 3.2.4 | Efecto de la concentración de tinte | 36 |
| 3.3 | Determinación de las condiciones de decoloración con micelio vivo..... | 39 |
| 3.3.1 | Efecto del pH..... | 39 |
| 3.3.2 | Efecto de temperatura..... | 42 |
| 3.3.3 | Efecto de la concentración de inóculo | 44 |
| 3.4 | Reuso de los pellets..... | 48 |
| 3.5 | Comparación de la decoloración con micelio vivo y muerto..... | 49 |
| 3.6 | Pruebas de Citotoxicidad | 50 |
| 4. | CONCLUSIONES..... | 55 |
| 5. | RECOMENDACIONES..... | 56 |
| 6. | REFERENCIAS | 57 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Características de un efluente textil..... | 3 |
| Tabla 2. Clasificación de los tintes de acuerdo a su estructura química. | 6 |
| Tabla 3. Ventajas y desventajas del micelio vivo y muerto en la decoloración. | 17 |
| Tabla 4. Efecto del pH en la decoloración del índigo carmín 0.01% por <i>T. hirsuta</i> . .. | 34 |
| Tabla 5. Efecto del pH en la actividad lacasa y biomasa de <i>T. hirsuta</i> | 41 |
| Tabla 6. Efecto de la temperatura en la actividad lacasa y biomasa de <i>T. hirsuta</i> , ... | 43 |
| Tabla 7. Efecto de concentración de inóculo en la lacasa y biomasa de <i>T. hirsuta</i> ... | 45 |
| Tabla 8. Tabla comparativa del tratamiento del tinte con micelio muerto y vivo..... | 50 |
| Tabla 9. Decoloración y citotoxicidad antes y después de los | 52 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Tintes textiles y clases de cromóforos (color rojo): (a) antraquinona (b) azo (c) triarilmetano (d) nitro y (e) índigo (Modificado de Días y col, 2007) | 5 |
| Figura 2. Molécula de índigo carmín (Quintero y Cardona, 2009)..... | 7 |
| Figura 3. Estructura de la pared células de los hongos..... | 14 |
| Figura 4. Estructura de la quitina..... | 15 |
| Figura 5. Mecanismo de acción de las lacasas..... | 18 |
| Figura 6. Pellets del cultivo de <i>T. hirsuta</i> BM2 en medio YMPG..... | 31 |
| Figura 7. Diámetro de pellets (mm) de <i>T. hirsuta</i> BM2 producidos en YMPG..... | 32 |
| Figura 8. Efecto de la temperatura en la decoloración del índigo carmín 0.01% por <i>T. hirsuta</i> en buffer de citrato-fosfato 60 mM, pH 3, 150rpm y 3 h..... | 35 |
| Figura 9. Efecto de la concentración de inóculo en la decoloración del índigo carmín 0.01% por <i>T. hirsuta</i> en buffer de citrato-fosfato 60 mM, pH 3, 35 °C, 150 rpm y 3 horas de tratamiento..... | 36 |
| Figura 10. Cinética de decoloración del índigo carmín por <i>T. hirsuta</i> en buffer de citrato-fosfato pH 3, 30 °C, 1g inóculo, 150 rpm..... | 37 |
| Figura 11. Pellets de <i>T. hirsuta</i> antes (A) y después (B) de 1.5 horas de tratamiento con micelio muerto a pH3, 30°C y 150 rpm..... | 38 |
| Figura 12. Efecto del pH en la decoloración del índigo carmín 0.01% por <i>T. hirsuta</i> a temperatura ambiente, 150 rpm y 10 h de incubación..... | 40 |
| Figura 13. Efecto de la temperatura en la decoloración del índigo carmín 0.01% por <i>T. hirsuta</i> a pH 3, 150 rpm y 10 h de tratamiento..... | 43 |
| Figura 14. Efecto de la concentración de inóculo en la decoloración del índigo carmín 0.01% por <i>T. hirsuta</i> a pH 3, 30 °C, 150 rpm y 10 h de incubación..... | 44 |
| Figura 15. Cinética de decoloración del índigo carmín por <i>T. hirsuta</i> en buffer de fosfatos pH 3, 30 °C, 0.5 g inóculo, 150 rpm; control sin inóculo (figura a) y micelio (figura b)..... | 46 |
| Figura 16. Pellets de <i>T. hirsuta</i> antes (A) y (B) después del tratamiento con micelio vivo a pH6, 30°C, 150 rpm y 10 horas de tratamiento..... | 47 |

| | |
|--|----|
| Figura 17. Ciclos de reuso en la decoloración del índigo carmín por <i>T. hirsuta</i> Bm2 a pH 6 y 30°C | 48 |
| Figura 18. Citotoxicidad antes y después del tratamiento del tinte índigo carmín con micelio vivo y muerto de <i>T. hirsuta</i> Bm2..... | 51 |

1. INTRODUCCIÓN

Los efluentes textiles contienen diversos tintes que se descargan en grandes cantidades en el mar, ríos y lagos. Estos efluentes representan un riesgo ambiental ya que los tintes que contienen resultan ser tóxicos, mutagénicos y cancerígenos (Weisburger, 2002). Además, reducen la penetración de luz solar en los cuerpos naturales de agua, lo que conduce a una disminución tanto de la actividad fotosintética como de la concentración de oxígeno disuelto.

El tratamiento de efluentes resulta difícil debido al origen sintético y las complejas estructuras moleculares aromáticas de los colorantes, que son químicamente estables y por lo tanto no son biodegradables fácilmente.

En la actualidad existen diferentes métodos físico-químicos como la adsorción, precipitación química, floculación y la fotólisis que han sido empleados para la eliminación de los colorantes en residuos textiles, aunque la naturaleza poco amigable de estos procesos con el medio ambiente representa una limitante para su uso (Sandoval, 2006). La adsorción, es el método más empleado, debido a su efectividad en la remoción de tintes aunado a su facilidad de operación. El carbón activado es el adsorbente más estudiado, sin embargo, su utilización se ve limitada debido al elevado costo de manufactura y su difícil regeneración.

Por lo tanto, se requiere desarrollar procesos alternativos inocuos que a su vez sean más redituables para el tratamiento efectivo de los efluentes.

Una alternativa es el uso de la biomasa de hongos debido a que el micelio fúngico es una fuente de quitina. En este sentido la quitina es el componente principal de la pared celular de hongos conformado de unidades de N-acetilglucosamina con enlaces β -1,4, que se caracteriza por poseer grandes propiedades adsorbentes para remover metales, tintes y otros contaminantes peligrosos (Khedry col, 2013).

Además los hongos ligninolíticos como los de la podredumbre blanca han demostrado una gran capacidad para remover tintes mediante un complejo enzimático donde la enzima lacasa ha mostrado un papel importante (Quintero, 2009).

Actualmente se necesita el desarrollo de tecnologías eficientes para reducir y eliminar el impacto de estos contaminantes en el medio ambiente. Por lo tanto el presente estudio se evaluó el potencial del micelio vivo y muerto sobre la decoloración de un tinte textil.

1.1 ANTECEDENTES

1.1.1 Efluentes textiles

La industria textil consume grandes cantidades de agua que se devuelven al medio ambiente como aguas residuales teñidas (Andleeb y col, 2010).

Los efluentes derivados de la industria textil varían en función de la tela, tipos y mezclas de tintes; estos efluentes contienen altas concentraciones de sólidos disueltos, además de sodio, cloro, sulfatos, fenoles y tintes (Tabla1) (Al-Kdasi y col, 2004; Savin y Butnaru 2008).).

Tabla 1. Características de un efluente textil

| Parámetros | Valores |
|--------------------------------------|---------------|
| pH | 7.0 - 9.0 |
| Demanda Bioquímica de Oxígeno (mg/L) | 80 - 6,000 |
| Demanda Química de Oxígeno (mg/L) | 150 – 12,000 |
| Sólidos Totales Suspendidos (mg/L) | 15 – 8,000 |
| Sólidos Totales Disueltos (mg/L) | 2,900 – 3,100 |
| Nitrogeno Total Kjeldahl (mg/L) | 70 -80 |
| Cloruros (mg/L) | 1000 – 1600 |
| Color (Pt-Co) | 50-2500 |

Tomado de Al-Kdasi y col, 2004

Durante los procesos comúnmente se usan mezclas de tintes que difieren en sus características químicas y suelen ser recalcitrantes y cancerígenos (Selvam, 2012; Kim, 2004).

La presencia de los tintes o sus productos de degradación en el agua, incluso en concentraciones muy bajas pueden causar trastornos en la salud humana, tales como náuseas, hemorragias, ulceraciones de la piel y membranas mucosas; también pueden causar graves daños al riñón, sistema reproductivo, cerebro, hígado y sistema nervioso central (Prigione y col, 2008). Cuando los efluentes se vierten a los mantos acuíferos, los tintes reducen la penetración de luz solar en los cuerpos naturales de agua, lo que conduce a la disminución de la actividad fotosintética y la concentración de oxígeno disuelto.

Además de la industria textil, otras industrias como la del cuero, plástico, y papel descargan aguas coloreadas donde los tintes cambian químicamente, de manera que consumen el oxígeno disuelto y pueden causar efectos cancerígenos y genotóxicos (Imran y col. 2015). Las aguas residuales son difíciles de tratar debido a que los tintes contienen estructuras moleculares complejas que los hacen estables en el ambiente y difíciles de degradar (Kim, 2004).

1.1.2 Tintes

El color es el primer contaminante que se evidencia en aguas residuales. Este efecto se produce debido a los colorantes, sustancias capaces de conferir color a otras sustancias. Entre los colorantes podemos encontrar tanto a tintes como a pigmentos. Ambos se diferencian por sus características de solubilidad. Los tintes son compuestos solubles, que se aplican principalmente a fibras textiles en disolución acuosa, mientras que; los pigmentos son compuestos insolubles, que se adicionan a productos tales como pinturas, tintas de imprenta o plásticos (Christie, 2003).

Existen más de 100,000 tintes comerciales con una producción anual de 7×10^5 toneladas/año. La industria textil consume más de 10,000 toneladas/año de tintes y

aproximadamente 100 toneladas / año se descargan en las corrientes de agua (Yagub y col, 2014). Entre el 10% y el 15% de los tintes usados en el proceso textil no se enlaza a las fibras y se libera al medio ambiente en los procesos de teñido (Campos y col, 2001, Moussavi y Mahmoudi, 2009). Los tintes son moléculas orgánicas complejas compuestas por dos grupos funcionales, el cromóforo, que es un grupo insaturado responsable de dar color al compuesto; el auxocromo que le da intensificación del color y / o mejora la afinidad del tinte por el sustrato (Figura 1) (Moussavi y Mahmoudi, 2009).

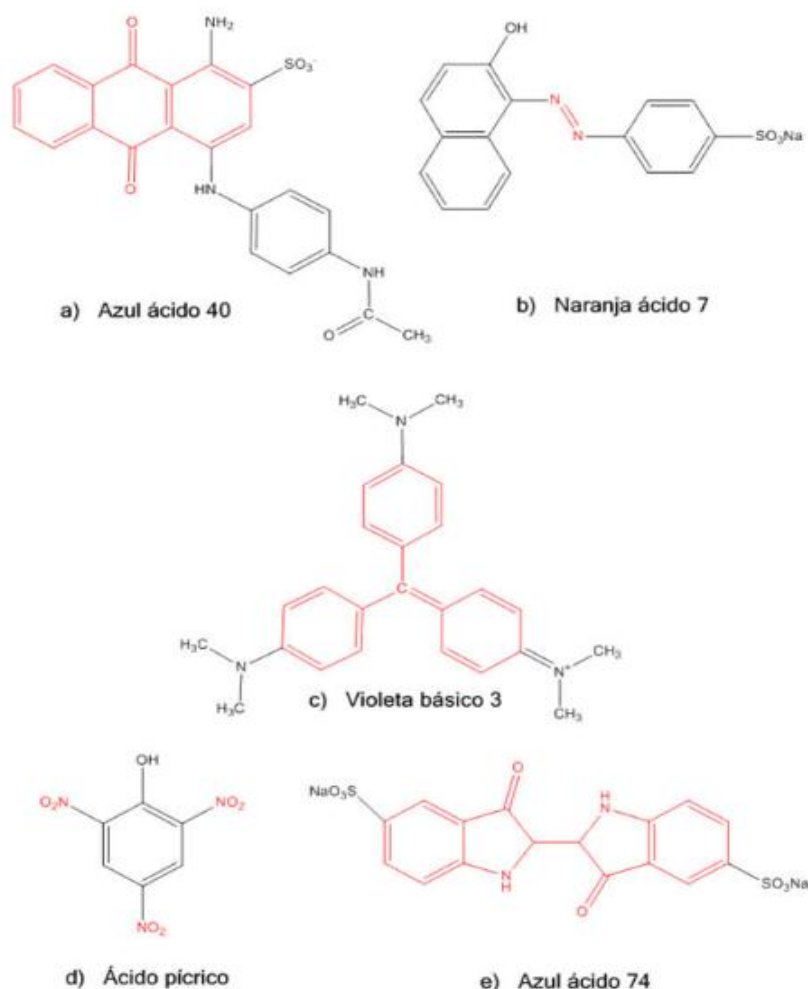
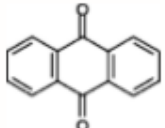
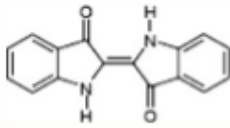

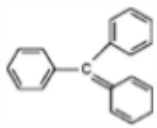


Figura 1. Tintes textiles y clases de cromóforos (color rojo): (a) antraquinona (b) azo (c) triarilmetano (d) nitro y (e) índigo (Modificado de Días y col, 2007)

Existen diferentes formas para clasificar a los tintes; éstas pueden ser de acuerdo al color, a su estructura química (Tabla 2), a su aplicación a la fibra (ácidos, básicos, directos, dispersos, reactivos sulfuros o de tina) y de acuerdo a su carga puede ser catiónicos (tintes básicos), aniónicos (tintes directos, ácidos y reactivos) y no iónicos (tintes dispersos) (Yagub y col, 2014).

Tabla 2. Clasificación de los tintes de acuerdo a su estructura química.

| Tinte | Cromóforo |
|---------------|--|
| Azo | —N=N— |
| Antraquinona |  |
| Indigoide |  |
| Nitroso | —N=O |
| Nitro |  |
| Triarilmetano |  |

Fuente: Yagub y col, 2014

Los tintes empleados con mayor frecuencia a escala industrial son: los azo, antraquinonas, indigoides, trifenilmetilos y ftalocianinas (Forgacs y col, 2004).

El índigo carmín (2,2'-bis-índigo) también llamado tinte de tina es uno de los tintes más antiguos e importantes que usan en estos procesos. Este tinte representa un 7% del mercado mundial en donde se usan anualmente cerca de las 120,000 toneladas (Quintero y Cardona, 2010).

Es un polvo cristalino azul oscuro con fórmula química $C_{16}H_8O_8N_2S_2Na_2$ (Figura 2) es insoluble en agua, alcohol o éter debido a las fuerzas intermoleculares fuertes ocasionadas por los puentes de hidrógeno, soluble en cloroformo, nitrobenzeno o ácido sulfúrico concentrado. En estado sólido forma un polímero en el cual cada molécula de índigo se une a cuatro moléculas a su alrededor (Zollinger, 2003). Está formado por el grupo H-cromóforo que consiste de un simple enlace doble entre carbonos sustituidos por dos donadores NH y dos aceptores CO.

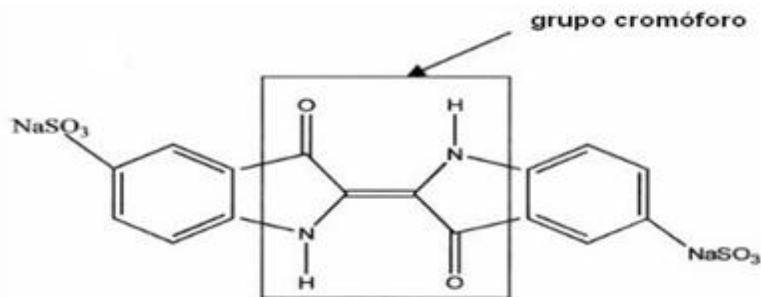


Figura 2. Molécula de índigo carmín (Quintero y Cardona, 2009)

El índigo carmín ha sido utilizado como agente de teñido durante muchas décadas, su principal aplicación industrial es el teñido de mezclilla (Li y col, 2015). Es un compuesto mutagénico, cancerígeno, de alta toxicidad que puede producir irritación en los ojos y piel del ser humano, hipertensión severa, efectos cardiovasculares y respiratorios; además el consumo del tinte en madres embarazadas puede causar en

los fetos daños en su naturaleza reproductiva, en su desarrollo mental o intoxicaciones (Quintero y Cardona, 2010).

1.1.3 Tratamientos para la remoción de tintes

Se han empleado diferentes procesos para el tratamiento de efluentes textiles, sin embargo, representan altos costos de tratamiento, los contaminantes químicos no son destruidos sino simplemente removidos de los efluentes y relocalizados en otro sitio donde el problema persiste.

En procesos donde se utiliza el cloro para la decoloración, se pueden producir compuestos organoclorados que son altamente tóxicos y recalcitrantes, en ciertos tratamientos químicos se produce ruptura del anillo aromático del colorante generando sustancias aún más tóxicas. En atención al deterioro ambiental, actualmente existe un gran interés en el tratamiento de efluentes textiles industriales. El tratamiento de efluentes textiles por métodos convencionales es difícil debido a la estructura aromática compleja de los tintes de origen sintético los que se hace difíciles de degradar (Cortazar y col, 2012).

Los tratamientos físicos requieren mucha energía y pueden causar la formación de subproductos peligrosos (Saraswathi y Balakumar, 2009). Algunos procesos incluyen la filtración de membrana (nanofiltración, ósmosis inversa, electrodiálisis inversa) y técnicas de adsorción.

Los métodos químicos son eficaces, sin embargo requieren altas concentraciones de productos químicos; estos procesos incluyen la coagulación o floculación combinada con flotación y filtración, precipitación-floculación con Fe (II) / Ca (OH)_2 , electroflotación, métodos de oxidación convencionales de agentes oxidantes (ozono), irradiación o procesos electroquímicos. Mediante estas técnicas se logra eliminar el color, sin embargo, son caros, se acumulan grandes cantidades de lodo concentrado que representan un problema para su eliminación y requiere el uso excesivo de químicos contaminantes (Selvam, 2012).

Por otro lado, los tratamientos biológicos con comunidades de organismos son una alternativa más económica en comparación con los tratamientos físicos y químicos. Los métodos de biodegradación se aplican comúnmente para el tratamiento de efluentes industriales, debido a que muchos microorganismos, como bacterias, levaduras, algas y hongos son capaces de acumular y degradar diferentes contaminantes (McMullan y col, 2001). Sin embargo se requiere de grandes superficies, poca flexibilidad en el diseño además de que algunos productos químicos son tóxicos, lo que limita la eficiencia del proceso (Bhattacharyya y Sarma, 2003). Es por esto que los tratamientos biológicos aún no son del todo satisfactorios en los procesos de biodegradación (Robinson y col, 2001). Además, aunque muchas moléculas orgánicas se degradan, muchas otras son recalcitrantes debido a su estructura química compleja y origen orgánico sintético (Ravi y col, 1998). En particular, debido a su naturaleza de xenobióticos, los colorantes azoicos no son totalmente degradados.

Aunque las bacterias anaeróbicas podrían utilizarse en la decoloración de tintes, las desventajas de este método incluyen la producción de aminas aromática que suelen ser tóxicas y cancerígenas, además que las bacterias aeróbicas por lo general tienden a ser específicas hacia un tinte particular (Selvam, 2012).

La decoloración y la degradación microbiana se han usado como una alternativa ambiental a los procesos de descomposición química. Los procesos biológicos tienen el potencial de convertir o degradar el contaminante en agua, dióxido de carbono y diversas sales de naturaleza inorgánica.

De acuerdo a la literatura, la adsorción en fase líquida es un método eficiente para la eliminación de contaminantes de aguas residuales ya que el diseño adecuado del proceso de adsorción producirá un efluente tratado de alta calidad. Este proceso ofrece una alternativa atractiva para el tratamiento de aguas contaminadas, especialmente si el adsorbente es barato y no requiere una etapa de pre-tratamiento adicional antes de su aplicación.

En los últimos años se ha propuesto el uso de la biomasa microbiana, en especial la biomasa fúngica como potencial adsorbente para la eliminación de los tintes de las aguas residuales industriales (Fu y Viraraghavan, 2002; Tatarko y Bumpus, 1998;). Los microorganismos más eficientes en la descomposición de tintes sintéticos son los hongos basidiomicetos o sus enzimas que degradan la lignina. Por lo tanto, es necesario explorar el uso de esta biomasa de bajo costo, renovable y disponible localmente para la remoción de los colorantes.

1.1.4 Adsorción

La adsorción es un proceso de separación de equilibrio bien conocido y un método eficaz para aplicaciones de descontaminación de agua (Dabrowski, 2001). Se ha encontrado que es superior a otras técnicas para la reutilización del agua en términos de costo inicial, flexibilidad, simplicidad del diseño, facilidad de uso y la falta de sensibilidad a los contaminantes tóxicos. La adsorción no da lugar a la formación de sustancias nocivas; se lleva a cabo por separación de una sustancia de una fase y se produce por acumulación o concentración en la superficie de otra sustancia. La fase de adsorción es el adsorbente y el material concentrado o adsorbido en la superficie es el adsorbato.

El proceso de adsorción puede ser químico o físico: la adsorción química se produce cuando los enlaces presentes entre el adsorbato y el adsorbente son fuertes debido a un intercambio de electrones donde se forman enlaces iónicos y covalentes; por otro lado la adsorción física se produce cuando existen enlaces débiles entre partículas del adsorbato y el adsorbente, como son los enlaces de Van der Waals, puentes de hidrógeno y dipolo-dipolo, en este tipo de adsorción la mayoría de los casos es reversible.

La adsorción genera efluentes de alta calidad, aunque presentan una serie de desventajas que los hace ineficaces para el tratamiento de efluentes coloreados. El

carbón activado es el adsorbente más estudiado por su alta capacidad de adsorción aunque su aplicación es limitada por su alto costo y difícil regeneración.

En estudios para la decoloración de tintes por adsorción, se utilizan como adsorbentes la quitina, quitosano y lignocelulosa. La adsorción depende de varios factores como por ejemplo; las condiciones de cultivo usados para la preparación de la biomasa, la estructura y composición de las paredes celulares de hongos. Se sabe que el pH, temperatura, la concentración iónica de los medios de cultivo y el tamaño de partícula afectan la eficiencia de decoloración por hongos, ya que éstos son factores importantes en estudios de adsorción (Seyis y col, 2008).

El pH de la solución del tinte juega un papel importante en la adsorción; influye en la carga de la superficie del adsorbente, el grado de ionización del material presente en la solución, la disociación de los grupos funcionales en los sitios activos del adsorbente y la química de la solución del tinte (Kyzas y col, 2013).

La capacidad de adsorción de colorantes por quitina es dependiente de pH. El biopolímero tiene grupos funcionales OH, NHCOCH_3 y NH_2 . Los grupos hidroxilo del polímero son fuertemente hidratados y son prácticamente incapaces de formar enlaces de hidrógeno con colorantes. Sin embargo, otros grupos como los amino pueden adsorber tintes por la formación de un enlace de hidrógeno, interacciones de van der Waals y también por intercambio iónico; dependiendo del pH en el agua. Los polímeros que contienen los grupos amino son neutrales ($-\text{NH}_2$) o catiónicos (NH_3^+). A pHs ácidos estos grupos químicos se protonan y se adsorben iones aniónicos para mantener la neutralidad, este proceso ocurre a través de un intercambio iónico favoreciendo la remoción del tinte lo que permite la decoloración. Por otro lado, a pH alcalino los grupos aminos se desprotonan y los tintes aniónicos ya no pueden adsorberse (Razak y col, 2015; Longhinotti y col, 1998)

Longhinotti y col, (1998) reportaron una tendencia hacia una mayor adsorción de colorantes aniónicos (en el rango de pH de 3-4). A un pH por debajo de 2, los aniones en la solución compiten con el colorante aniónico, disminuyendo de ese

modo la adsorción. Esto también se observó a pH alcalino ya que se desprotonan los grupos amino del polímero.

La adsorción depende de la relación entre la concentración inicial del tinte y los sitios disponibles en la superficie del adsorbente; en general el porcentaje de eliminación del tinte disminuye con un aumento en la concentración inicial del tinte; que puede ser debido a la saturación de los sitios de adsorción en la superficie del adsorbente (Yagub y col, 2014). De igual manera, un aumento en la concentración inicial del tinte provoca un aumento en la capacidad del adsorbente, lo cual puede ser debido a la elevada fuerza de conducción para la transferencia de masa.

El efecto de la temperatura es otro parámetro significativo, porque modifica la capacidad de adsorción del adsorbente. Si la adsorción aumenta al aumentar la temperatura es un proceso endotérmico, pero si la adsorción disminuye con el aumento de la temperatura es un proceso exotérmico

La adsorción de contaminantes se incrementa con el aumento de la temperatura, debido a que aumenta la solubilidad del tinte y existe una mayor difusión de las moléculas del adsorbente y el adsorbato; sin embargo las temperaturas altas también influyen ocasionando la desorción del adsorbato. El incremento en la adsorción se puede atribuir a que al aumentar la temperatura, se generan más sitios activos sobre el adsorbente debido a la protonación o desprotonación de sus grupos funcionales (Kyzas y col, 2013). Los efectos de la temperatura sobre la capacidad de adsorción varían entre los diferentes adsorbentes

También se ha reportado que la adsorción es dependiente del tamaño de partícula, debido a que las partículas pequeñas aumentan la capacidad de adsorción ya que proporcionan una mayor superficie de contacto y una mejor difusión del adsorbato y el adsorbente (Razak y col, 2015). Las técnicas de adsorción para tratamiento de aguas residuales se han vuelto más populares en los últimos años debido a su eficacia en la eliminación de contaminantes, que son tratados con dificultad en los métodos biológicos.

1.1.5 Hongos de la podredumbre blanca

Los hongos de la podredumbre blanca han demostrado ser potencialmente útiles en biorremediación, debido a su crecimiento filamentoso permiten una colonización y una exploración más eficiente en los suelos contaminados, son capaces de mineralizar la lignina y simultáneamente degradar los compuestos de la madera a CO₂ y H₂O (Arana y col, 2002). Además, estos hongos poseen un importante grupo de enzimas con capacidad para oxidar diversos sustratos entre ellos una amplia variedad de contaminantes ambientales (Pointing, 2001) y varios tipos de colorantes sintéticos como azo, poliméricos, y colorantes heterocíclicos (Couto y col, 2002).

Los hongos de la podredumbre blanca en cultivos sumergidos tienden a agregarse y crecen en forma de esferas compactas de micelio conocidas como pellets; estos están formados por una capa exterior de hifas creciente y una masa interna de micelio no crecido (Pirt, 1966; Papagianni, 2004)

La pared celular de los hongos es una estructura que protege a la célula de los cambios adversos, incluyendo la presión osmótica; permite a la célula fúngica interactuar con su entorno ya que algunas proteínas son adhesivas y receptoras.

El micelio fúngico en su pared celular contiene exopolímeros como el glucano y quitina que son muy hidrofílicos y tienen la capacidad de formar geles (Figura 3) (Smith y col, 2002). Los grupos reactivos de la superficie actúan como intercambiadores iónicos (Gadd, 2009) y las proteínas se asocian a polisacáridos formando las glicoproteínas.

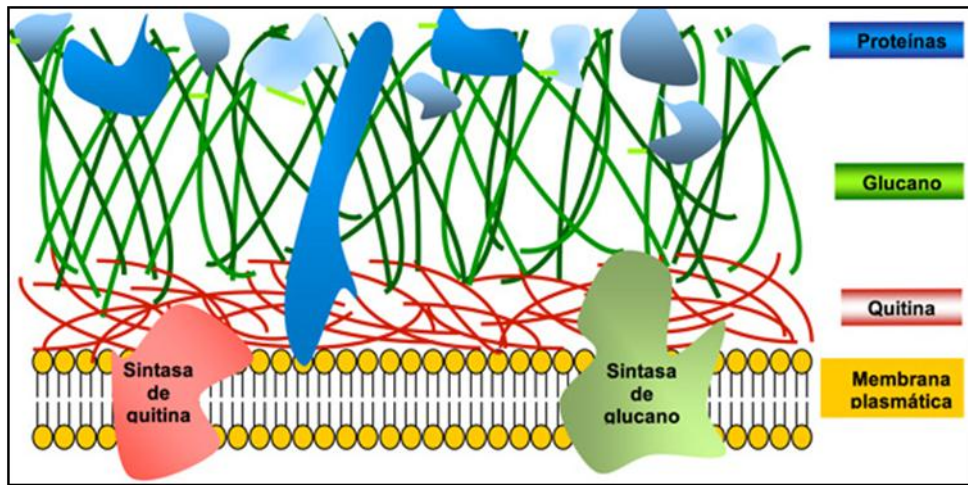


Figura 3. Estructura de la pared células de los hongos

Las proteínas representan del 20 al 30% de peso seco de la pared de los hongos filamentosos. Estas moléculas tienen varias funciones, participan en los procesos de adhesión, mantenimiento de la forma celular, protegen a la célula de sustancias extrañas, participan en la absorción de las moléculas, transmiten señales al citoplasma, sintetizan y remodelan los componentes de la pared celular.

Por otro lado el glucano es el polisacárido estructural más importante de la pared celular, representa el 50-60% del peso seco. Está compuesto de unidades de glucosa con uniones β -1,3. El β -1,3-D-glucano es el componente al cual se unen otros componentes por medio de enlaces covalentes. El β -1,3-D-glucano se sintetiza por las enzimas glucano sintetasas. Estas enzimas catalizan la formación de cadenas lineales de glucano compuestas por aproximadamente 1500 residuos de glucosa unidos por enlaces β -1,3. En estas cadenas, cada 40-50 residuos de glucosa se unen nuevas unidades de glucosa por enlaces β -1,3 para dar lugar a una estructura ramificada. Estas ramificaciones pueden unirse a otros glucanos, a la quitina o a las manoproteínas, proporcionando a la pared una gran resistencia mecánica esencial para mantener la integridad celular.

La quitina representa el 1-2% de peso seco de la pared celular de las levaduras mientras que en los hongos filamentosos puede llegar al 10-20%. Este biopolímero es un polisacárido blanco, duro, inelástico, compuesto de unidades de N-acetilglucosamina (N-acetil-D-glucos-2-amina) unidas entre sí mediante enlaces β -1,4, como las unidades de glucosa que componen la celulosa, pero tiene grupos acetamida (-NHCOCH₃) en lugar de los grupos hidroxilo (Figura 4). La presencia de estos grupos es muy importante ya que proporciona funciones distintivas de adsorción, es capaz de atrapar iones de metales pesados, proteínas y colorantes; debido a que su estructura molecular le permite la formación de fibras y películas biodegradables.

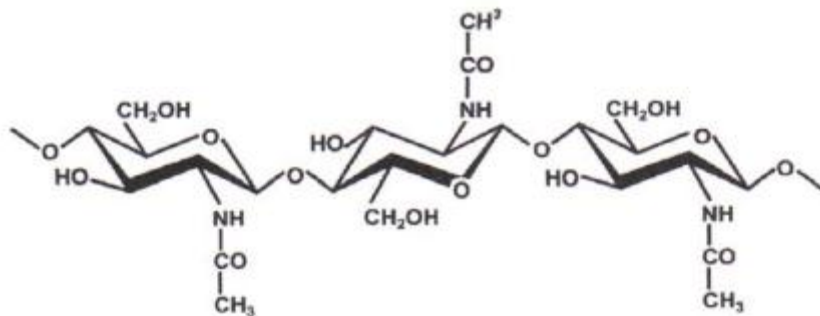


Figura 4. Estructura de la quitina

En la naturaleza se han detectado tres estructuras alotrópicas denominadas α , β y γ y la diferencia entre ellas es la disposición de sus cadenas (Ramírez y col, 2006). La configuración α posee microfibrillas antiparalelas de quitina unidas entre sí mediante puentes de hidrógeno intramoleculares; es la forma más abundante en la naturaleza y se encuentra en el caparazón de crustáceos como los camarones y los cangrejos. La β -quitina está integrada por cadenas paralelas de quitina unidas entre sí mediante puentes de hidrógeno débiles que la hacen más inestable y se encuentran en los calamares. Por último la γ presenta dos cadenas paralelas en el mismo sentido y la siguiente en el sentido opuesto, ha sido la menos estudiada y se puede decir que es una mezcla de la α y β - quitina. (Ramírez y col, 2006; Zhang y col, 2000).

Este polímero se encuentra en el exoesqueleto de los crustáceos, las cutículas de los insectos, y la pared celular de los hongos, es el aminopolisacárido más abundante en la naturaleza (Rinaudo, 2006). Se sintetiza a partir de N-acetilglucosamina por las quitina sintetasas, que depositan los polímeros de quitina en el espacio extracelular próximo a la membrana citoplásmica (Kumar, 2000).

El principal derivado de la quitina es el quitosano formado por residuos de N-glucosamina unidos por enlaces β -(1,4) y se obtiene de la N-desacetilación de la quitina, tras la eliminación de los grupos acetilo (Lárez, 2006).

La presencia de quitina en la pared fúngica permite la adsorción de compuestos tóxicos de alto impacto ambiental, así como colorantes o metales pesados, lo que hace de los hongos de la podredumbre blanca una alternativa biotecnológica muy eficaz en la remoción de contaminantes.

El micelio fúngico ha demostrado tener una alta capacidad de adsorción en el tratamiento de efluentes textiles (Seyis y col, 2008; Slockar y col, 1998). *Pencillium oxalicum* removió el 91% del azul reactivo 19 en 80min (Zhang y col, 2003), así mismo *Trametes versicolor* logró remover 63% de 800mg/L de azul directo 1 en 6 horas (Bayramoglu y Arica, 2009).

La decoloración de efluentes textiles con hongos se puede llevar a cabo a través de dos sistemas de acuerdo a su estado de vida; micelio vivo que adsorbe y biodegrada tintes y micelio muerto que únicamente adsorbe tintes (Knapp y col, 1995). Ambos sistemas presentan ventajas y desventajas que se muestran en la Tabla 2. La eficiencia en estos procesos depende del hongo utilizado y el establecimiento de las mejores condiciones de decoloración.

Tabla 3. Ventajas y desventajas del micelio vivo y muerto en la decoloración.

| | Micelio muerto | Micelio vivo |
|--------------------|--|--|
| Ventajas | No requiere nutrientes | Se pueden mejorar condiciones de cultivo |
| | Los grupos químicos quedan más expuestos por la esterilización | Producción de enzimas |
| | Es inocuo | Mineralización de tintes |
| | Resistente a iones y fenoles de efluentes | Uso en cultivos continuos |
| | | |
| Desventajas | Los tintes se almacenan | Requiere nutrientes |
| | Desorción | Enzimas sensibles a iones |
| | No se reutilizan | Puede contaminarse cultivo |

Fuentes: Maurya y col, 2006; Kalaiarasi y col, 2012

1.1.6 Micelio vivo

La decoloración con micelio vivo se lleva a cabo a través de dos procesos, adsorción y degradación enzimática. Un gran número de hongos de la podredumbre blanca han demostrado ser capaces de degradar la lignina ya que contienen un sistema multienzimático formado por lacasas, lignina peroxidasas (LiP), y manganeso peroxidasa (MnP). La lacasa ha demostrado tener un papel predominante en estos procesos (Nyanhongo y col, 2002).

La enzima lacasa (bencenediol oxígeno oxidoreductasa (E.C.1.10.3.2) contiene varios átomos de cobre por lo que se le llama enzima multicobre y cataliza la

oxidación de compuestos fenólicos, no fenólicos, anilinas y algunos compuestos inorgánicos (Nyanhongo y col, 2002) mediante la transferencia de un electrón, lo que produce un radical libre, que espontáneamente reacciona consigo mismo o con otros compuestos reduciéndose y recuperando así el electrón perdido para alcanzar su estabilidad (figura 5) (Arana y col, 2002).

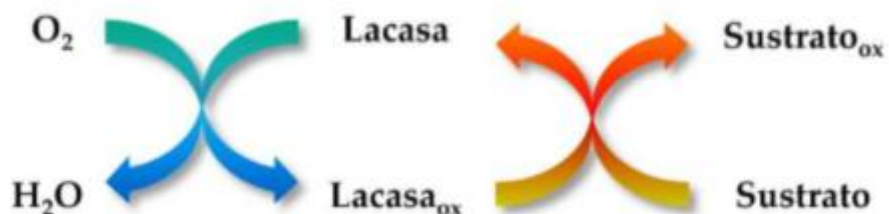


Figura 5. Mecanismo de acción de las lacasas.

Estas lacasas son secretadas como parte del metabolismo secundario de muchos hongos (Shi y col, 2012).

En los últimos años un gran número de estudios han demostrado que los hongos de podredumbre blanca, como *Phanerochaete chrysosporium*, *Bjerkandera adusta*, *Trametes versicolor*, o *Phlebia radiata* entre otros, son capaces de degradar diversos tintes (Kaushik y Malik 2009). Mediante estos tratamientos se ha logrado la decoloración de tintes azo, antraquinónicos, heterocíclicos, trifenilmetano y poliméricos, así como la mineralización parcial por parte de los sistemas enzimáticos de estos hongos. (Ferreira y col, 2000; Swamy y col, 1999).

Los hongos de la podredumbre blanca se han usado para la decoloración de efluentes provenientes de industrias, algunos ejemplos incluyen a *Corioloopsis gallica* y *Trametes sp.* I-62 que fueron capaces de decolorar y disminuir la DQO (Demanda Química de Oxígeno) de efluentes provenientes de la industria cervecera y de destilerías respectivamente (Yagüe y col, 2000; González y col, 2000). Anjaneya y col, (2009) alcanzaron remover el Azul Remazol, Brillante R (RBBR) 93%, azul de

bromofenol 100%, Cu-ftalocianina 98%, Rojo de metilo 56%, rojo Congo 58% durante el cultivo del hongo *Irpex lacteus* en medio líquido. Tian y col, (2013) removieron el 92% del índigo carmín con *Ganoderma weberianum* en 1 hora. En otro estudio Balam y Monteiro (2001) reportaron la remoción del 94 -100% de Índigo carmín con *P. gilvus*, *P. chrysosporium*, *P. sanguineus*, *P. sanjor-caju* respectivamente en un periodo de 4 días. En estos estudios las lacasas demostraron estar involucradas en la decoloración ya que el micelio no presentó color.

Mediante análisis por espectroscopía FT-IR, HPLC y resonancia magnética nuclear (NMR C¹³) se han logrado identificar los productos de la transformación del índigo carmín (IC) durante el tratamiento enzimático y microbiano. El principal metabolito formado durante la oxidación del IC por lacasas fúngicas es la isatina (ácido isatin sulfónico) compuesto que se genera a partir de la ruptura del enlace C=C y la formación de un enlace C=O (Flox y col.2006; Ramya y col, 2008; Zaied y col, 2011; Ben Younes y Sayadi, 2013); posteriormente por descarboxilación puede generarse el ácido antranílico, como producto estable final (Campos y col, 2001). También se ha reportado en un estudio con lacasas bacterianas purificadas, que el IC se transforma en ácido antranílico vía isatina (Singh y col, 2007). Asimismo, se reportó que el grupo sulfónico enlazado al anillo aromático es causante de la recalcitrancia del ácido antranílico debido a su estabilidad química (Caraplash y Sharma, 1992). Durante la degradación del IC por biomasa liofilizada de *Trametes versicolor* se detectó la formación del ácido isatin sulfónico sin la formación de ácido antranílico. Esta acción fue atribuida a la lacasa intracelular del hongo que se mantuvo activa aún después de la deshidratación del hongo. Estos estudios han corroborado que el índigo carmín es un sustrato de la enzima lacasa.

1.1.7 Micelio muerto

La adsorción usando micelio fúngico muerto es independiente del metabolismo, se lleva a cabo por medio de los grupos funcionales presentes en la pared celular como son: amino, carboxilo, tiol y fosfatos, responsables de la adhesión del colorante.

Varios autores han reportado que ciertas modificaciones a nivel de pared fúngica aumentan la capacidad de adsorción de los hongos (Prachi y Anushree, 2008).

Zhang y col, (2003) usaron pellets *Penicillium oxalicum* que lograron remover el 60% de azul reactivo 19 en 10 min y 91 % en 80 min. Ambrósio y col, (2012) encontraron que el micelio inactivo de *Cunninghamella elegans* en 120 h adsorbió el 70% naranja reactivo II, 85% negro reactivo, 93% reactivo de color rojo y 88% presentes en un efluente sintético (mezcla de tintes). Asma y col, (2006) determinaron el potencial de *Phanerochaete chrysosporium* y *Funalia trogii* para decolorar el azul de astrazone y evaluaron el efecto de diferentes parámetros como el pH, temperatura, agitación y concentración de tinte en la decoloración; ellos reportaron que *P. chrysosporium* fue más efectiva que *F. trogii* logrando remover el 85% del azul de 50mg/ L de astrazone en 60 minutos, a pH 8,9 y 10 con 1g/50ml de biomasa y 150 rpm. Mientras tanto Razak y col (2006) lograron remover el 90% de azul remazol 19 y 95% de rosa bengal en 20 min con micelio muerto de *Aspergillus niger* a pHs ácidos, 50°C, 15 rpm; demostrando que el pH, la temperatura, la concentración de adsorbente y el tamaño del pellet son parámetros pueden afectar la decoloración.

1.1.8 Ensayos de Toxicidad

Ha sido ampliamente evidenciado que los tintes que se descargan en los efluentes son tóxicos, carcinogénicos y mutagénicos. Entre los daños que ocasionan incluyen daños genéticos que pueden conducir a diversos problemas de salud e incluso afectar futuras generaciones (Igbal y col, 2014). Por lo tanto es importante realizar ensayos de toxicidad de los tintes y de los metabolitos formados después de los tratamientos.

La toxicidad aguda de tintes especialmente azo y amino sustituidos ha sido ampliamente demostrada en plantas, bacterias y líneas celulares (Rajaguru y col, 1999). Para medir la fitotoxicidad de los tintes se han utilizado ensayos con semillas de lechuga, melón y rábano, ya que los tintes pueden reducir la germinación de

semillas y el crecimiento radicular de las plantas (Rehman y col, 2008). Las pruebas de genotoxicidad que muestran el efecto mutagénico de tintes, ha sido evaluada usando bacterias como *Vibrio fisheri*, *Salmonella thyphimurium* (Bae y col, 2005; Chhabra y col, 2008, Chhaya y col, 2007). A través de análisis epidemiológicos se ha demostrado que algunos tintes están asociados al desarrollo de cáncer de hígado (Gago-Domínguez y col, 2002) y que la toxicidad puede ser ocasionada por los derivados que se generan durante la transformación de tintes (Soares-Graca y col, 2002).

La ingestión de agua o alimentos contaminados con tintes puede permitir el contacto directo con células de mamíferos por lo que se han desarrollado ensayos de citotoxicidad usando líneas celulares como las epiteliales de intestino (Caco-2), de hígado y de riñón. En estos sistemas los tintes pueden ser absorbidos y transformados ocasionando daños a la célula. El efecto tóxico se mide determinando la EC₅₀ (concentración necesaria para reducir 50% de la viabilidad celular). Mathur y col, 2003 reportaron el efecto tóxico de efluentes textiles en células de hígado y testículos de ratas albinas, encontrando cambios en el contenido total de lípidos y colesterol; lo que revela una disminución en la función testicular. Así mismo, se encontró la disminución de las proteínas en el hígado como resultado de la acción necrótica del efluente con colorante. Recientemente, Bilal y Asgher, 2015, reportaron la disminución significativa en la citotoxicidad (glóbulos rojos) ocasionada por tintes reactivos sandal cuando fueron tratados con manganeso peroxidasa de *Ganoderma lucidum*. Ramsay y col, 2002 determinaron la EC₅₀, después del tratamiento de tintes con *Trametes versicolor* donde encontraron que también los productos de la degradación del tinte pueden ser tóxicos, lo que resalta la necesidad de evaluar la toxicidad antes y después del tratamiento. En otro estudio se encontró que los tintes azul ácido 62 y azul ácido 628 fueron completamente decolorados por seis hongos de la podredumbre blanca, sin embargo encontraron diferencias en la reducción de la toxicidad medida con ensayos VITOTOXTM y células Caco-2 que varió entre 44% a 99% dependiendo de la cepa (Vanhulle, 2006).

De esta manera las pruebas de toxicidad pueden verificar la eficiencia de enzimas o microorganismos no sólo para remover el color sino también para disminuir la toxicidad. La pérdida de toxicidad junto con la pérdida de color permitirán que el efluente pueda ser descargado al ambiente de manera segura (Gavril y Hodson, 2007; Ulson de Souza y col, 2007).

1.1.9 *Trametes hirsuta* Bm2

El hongo *T hirsuta* Bm2 se aisló de desechos de madera en el estado de Yucatán (Medina, 2000). En estudios previos con este hongo se evaluó la producción de lacasas en medios definidos y sustratos lignocelulósicos (Ireta, 2010). También se reportó que el cobre y el hierro estimulan la producción de estas enzimas en cultivos (Burgos, 2010) demostrándose que son las responsables de la decoloración de tintes y efluentes (Zapata, 2010). Por otro lado se logró mejorar el porcentaje de decoloración hasta un 95% con la adición de mediadores naturales como el ácido vanílico, (Acosta, 2011). Así mismo se logró la remoción completa del color de un efluente en 48 h de cultivo con la inmovilización del hongo en poliuretano (PUFI) (Castellanos, 2013).

1.2 JUSTIFICACIÓN

La generación de grandes volúmenes de efluentes apremia el desarrollo de tecnologías eficientes para reducir y eliminar el impacto de tintes tóxicos en el medio ambiente. La biomasa de hongos contiene quitina que es un polímero natural e inocuo con gran capacidad de adsorción; además posee lacasas que tienen la capacidad de degradar compuestos fenólicos, no fenólicos, anilinas y algunos compuestos como los tintes. Estas fuentes representan una alternativa amigable con el medio ambiente para el desarrollo de procesos para la remoción de tintes. En este estudio se evaluó el potencial del micelio vivo y muerto en la decoloración de un tinte.

HIPOTESIS

El micelio fúngico de *T. hirsuta* tiene la capacidad de remover el color del tinte índigo carmín.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo general

Desarrollar un tratamiento para remover el Índigo carmín usando micelio fúngico de *T. hirsuta* Bm2.

1.3.2 Objetivos específicos

- Obtener pellets de diferentes edades de cultivo para usarlos como adsorbentes en la remoción de tintes.
- Establecer las condiciones de decoloración usando micelio muerto.
- Establecer las condiciones de decoloración usando micelio vivo.
- Cuantificar la cantidad de biomasa y la actividad lacasa.
- Establecer los ciclos de reuso del micelio vivo en la decoloración de un tinte.
- Comparar la eficiencia de la remoción del tinte en los diferentes procesos evaluados.
- Determinar la toxicidad del tinte antes y después del tratamiento microbiano usando línea celulares de riñón

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Microorganismo

Se usó *Trametes hirsuta* Bm-2 una cepa aislada en Laboratorio de Fisiología y Bioquímica Microbiana del Instituto Tecnológico de Mérida (Tapia-Tussell, 2011). La cepa se inoculó en medio de cultivo al 2 % (p/v) de extracto de malta (EM) y 2 % de agar bacteriológico. El medio se esterilizó durante 15 minutos a 121 °C y 15 psi. La inoculación se llevó a cabo adicionando al medio una superficie de 1 cm² de micelio y se incubó a 35 °C por 4 días y se almacenó a 4 °C.

2.2 Inóculo

Para la producción del inóculo se usó medio YMPG que contenía: glucosa 10 g, extracto de malta 10 g, peptona 2 g, extracto de levadura 2 g, KH₂PO₄ 2 g, MgSO₄·7H₂O 1 g, Tiamina 1 mg. Se ajustó el pH a 4.5 con una solución concentrada de HCl. Se transfirieron 50 mL del medio en matraces de 250 mL, se esterilizaron a 121°C por 15 minutos en autoclave. En cada matraz se depositaron dos porciones de 1 cm² del micelio propagado en el medio sólido y se incubó durante 4 días a 35°C y 150 rpm. El micelio se homogenizó durante 2 minutos con un homogenizador ultraturrax y posteriormente se empleó como inóculo.

2.3 Obtención de biomasa microbiana viva y muerta (pellets).

Se adicionó 1 mL del medio homogenizado a matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 ml del medio líquido YMPG. Los matraces se incubaron a 35 °C y 150 rpm. Se obtuvieron los pellets en diferentes tiempos 48, 72 y 96 h, seguidamente se midió el tamaño promedio de 100 pellets. Para obtener la biomasa muerta los pellets se esterilizaron 15 min a 121 °C y 15 psi. Se usaron los pellets vivos y muertos para evaluar la decoloración del tinte.

2.4 Establecimiento de las condiciones para decoloración del tinte con micelio fúngico muerto y vivo.

La decoloración del tinte con micelio muerto se realizó en matraces Erlenmeyer de 125 mL que contenían buffer 60 mM. La decoloración con micelio vivo se llevó a cabo en 2 medios el primero fue medio YMPG (inciso 2.2) en buffer 60 mM y el segundo medio YMPG (inciso 2.2) en buffer 60mM suplementado con 2% de salvado de trigo. En todos los casos la solución de índigo carmín (0.01%) se agregó en la concentración y condiciones señaladas en cada experimento. El control se realizó con el tinte y la solución del medio correspondiente sin la adición del inóculo, se midió la absorbancia a 600 nm.

Adicionalmente en las muestras de micelio vivo se cuantificó la biomasa por peso seco y en los extractos la actividad lacasa.

2.4.1 Efecto del pH

Los pellets de diferentes edades se transfirieron a matraces de 125 mL con 50 mL de buffer citratos-fosfatos pH 3, buffer acetatos pH 4 y 5, buffer fosfatos pH 6 y 7 (60 mM) y 0.01 % de índigo carmín. Los matraces se incubaron a temperatura ambiente con agitación de 150 rpm. Se tomaron muestras cada tres horas durante 24 h en las que se midió la absorbancia.

2.4.2 Efecto de la temperatura

Los pellets obtenidos de diferentes edades (0.5 g) se transfirieron a matraces de 125 mL con el buffer de citrato-fosfato 60 mM, pH 3 para el micelio muerto y buffer de fosfato 60 mM, pH 6 para el vivo; posteriormente se incubaron a diferentes temperaturas entre 30, 35, 40, 45 y 50°C a 150 rpm. Se tomaron las muestras cada 3 h durante 24 h y se midió la absorbancia.

2.4.3 Efecto de la concentración del inóculo

Se transfirieron pellets (0.25, 0.5, 0.75, 1 y 1.25 g) de diferentes edades a matraces de 125 mL con buffer de citrato-fosfato pH 3 (micelio vivo) y buffer de fosfatos pH 6 (micelio muerto); se incubaron a 30 °C y 150rpm. Se tomaron muestras cada 3 h durante 24 h y se midió la absorbancia.

2.4.4 Cuantificación de biomasa

Las muestras de 24 h de incubación se filtraron en papel filtro Whatman No 1 y se secaron durante 24 h a 60°C. La biomasa se determinó por la diferencia de peso entre el papel filtro y el papel filtro con biomasa.

2.4.5 Actividad de la enzima lacasa

Las muestras obtenidas durante el cultivo se centrifugaron a 3,000 rpm por 30 min. En los sobrenadantes o extractos libres de células se determinó la actividad lacasa por espectrofotometría midiendo la oxidación del ABTS (2,2'-azino-bis [ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico]) (Coll y col, 1993). El sistema de reacción de 1 mL contenía: 100 µL de amortiguador de acetatos 1 M pH 4.5, 770 µL de agua destilada y 30 µL de extracto enzimático. Los tubos se preincubaron durante 5 minutos a 45°C. Después se adicionaron 100 µL de la solución ABTS 5 mM y se incubaron 20 minutos más. Posteriormente se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 420nm. El coeficiente de extinción molar del ABTS es de 36,000 M⁻¹ cm⁻¹ (Coll y col, 1993). El blanco se preparó sustituyendo la enzima por 30 µL de agua destilada. Una unidad de actividad de lacasa se definió como la cantidad de la enzima que oxida 1 µmol de ABTS mL⁻¹min⁻¹, bajo las condiciones de ensayo.

2.4.6 Efecto de la concentración de tinte.

Se evaluó el efecto de la concentración de tinte (50, 100 y 150 mg/L) en matraces de 125 mL. Se transfirieron 1 g de pellets a matraces con buffer de citrato-fosfato pH 3

(micelio muerto) y 0.5 g de pellets a matraces con buffer de fosfatos pH 6 (micelio vivo); se incubaron a 30 °C y 150 rpm. Se tomaron muestras cada 3 h durante 24 h y se midió la absorbancia.

2.4.7 Decoloración del tinte

La decoloración se midió por la pérdida de absorbancia a 600 nm. El % de decoloración se determinó utilizando la siguiente fórmula. Es importante mencionar que a las muestras se les resta la decoloración del control para obtener una decoloración real.

$$\% \text{ Decoloración} = \frac{\text{Absorbancia inicial} - \text{Absorbancia final}}{\text{Absorbancia inicial}} \times 100$$

2.4.8 Reutilización de micelio vivo.

Para determinar los ciclos de reutilización de los pellets (micelio vivo) se adicionaron 0.5 g de pellets a matraces con medio YMPG en buffer de fosfatos pH 6 y otros con medio YMPG suplementado con 2% de salvado de trigo, 100 mg/mL de tinte y se incubaron a 30 °C y 150 rpm. Después de 12 h de cultivo las esferas se recuperaron en un colador y se transfirieron a un medio fresco en condiciones estériles. Al término de cada cultivo se determinó la decoloración y la actividad de lacasa.

2.4.9 Línea celular

Se empleó la línea celular de epitelio de riñón canino (MDCK), las células fueron cultivadas en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEN) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% ampicilina estreptomycin (10000 U de penicilina y 10000 µg de estreptomycin) y 1% de glutamina en cajas de cultivo estériles, de 75 cm² y se incubaron a 37°C y 5% CO₂. Para el mantenimiento de los cultivos se cambió a medio fresco cada dos días, lavando las células dos veces con 1ml de solución salina con bufer de fosfatos (PBS) y pH7.

Los cultivos con 90% de confluencia se lavaron dos veces con PBS y dos veces con solución de tripsina al 0.025% y se incubaron durante 4 min a 37°C y 5% CO₂, obteniendo una suspensión celular que se contó en cámara de Neubauer mediante el método su exclusión con azul de tripano.

2.4.10 Ensayo de citotoxicidad

Las células se inocularon a una densidad aproximadamente de 10,000 células/pozo en microplacas de 96 pozos en un volumen de 100µL de DMEN suplementado con SFB, se incubaron 24 horas a 37°C y 5% CO₂ para permitir la adhesión celular a la superficie del pozo. Posteriormente se inoculó por triplicado diferentes concentraciones de tinte (25, 50, 75, 100, 125 y 150 mg/L), así como las muestras antes y después del tratamiento con micelio vivo y muerto. Todas las muestras se incubaron durante 72 horas a 37°C y 5% CO₂

2.4.11 Ensayo MTT

Para cuantificar el efecto citotóxico se aplicó el método MTT (Metil tiazol tetrazolio). Después del tiempo de tratamiento se eliminó el medio de cultivo y las microplacas de cultivo se lavaron con PBS, para evitar la interferencia de las proteínas provenientes del SFB en la dilución final del formazán. Posteriormente se añadió 100µL de MTT en una concentración de 0.25mg/mL en medio sin suplementar y las placas se incubaron durante 4 horas en condiciones estándar. Después se desechó cuidadosamente el sobrenadante y se adicionó 100µL de DMSO (dimetilsulfóxido) para disolver el formazán producto del metabolismo de MTT. Las placas de cultivo se leyeron a 550nm y el porcentaje de inhibición se determinó comparando la viabilidad celular en ausencia y presencia de las muestras tratadas de acuerdo a la fórmula:

$$\% \text{ Desintoxicación} = \frac{\% \text{ inhibición inicial} - \% \text{ inhibición final}}{\% \text{ inhibición inicial}}$$

2.4.12 Análisis estadístico de los resultados

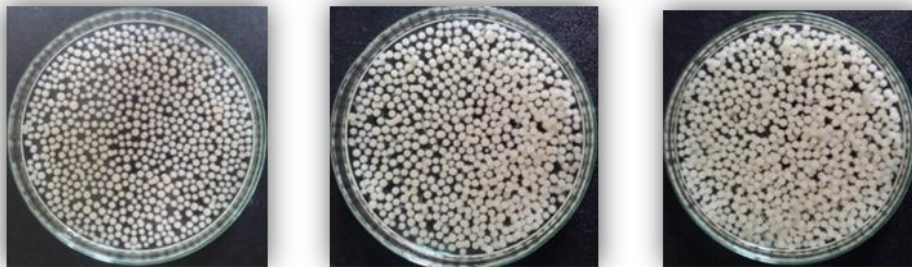
Se realizó un análisis de varianza ANOVA con un 95 % de confianza. La significancia estadística se determinó con la prueba de Tukey's con un nivel $p \leq 0.05$, con la ayuda del programa estadístico SPSS (Statistics Product for Service Solutions).

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1 Obtención de la biomasa.

Durante el crecimiento de hongos en cultivo sumergido, el micelio se desarrolló en forma de pellets cuyo tamaño se varió en función del tiempo de cultivo. En este estudio se obtuvieron aproximadamente 500 pellets por cada 50 mL de medio de cultivo, de donde se tomaron aleatoriamente 100 pellets para medir su diámetro a las 48, 72 y 96 horas. Estos se denominaron M1, M2, y M3 respectivamente para su posterior identificación.

En el análisis, se observó que durante el cultivo se incrementó el tamaño de los pellets en función del tiempo en un rango de 2 a 4 mm a las 48, 72 y 96 horas respectivamente como se muestra en la figura 6 y 7. Este hecho fue atribuido a que las condiciones a lo largo del cultivo favorecieron el crecimiento del hongo.



M1

M2

M3

Figura 6. Pellets del cultivo de *T. hirsuta* BM2 en medio YMPG.
M1 (micelio de 48h), M2 (micelio de 72h) y M3 (micelio de 96h).

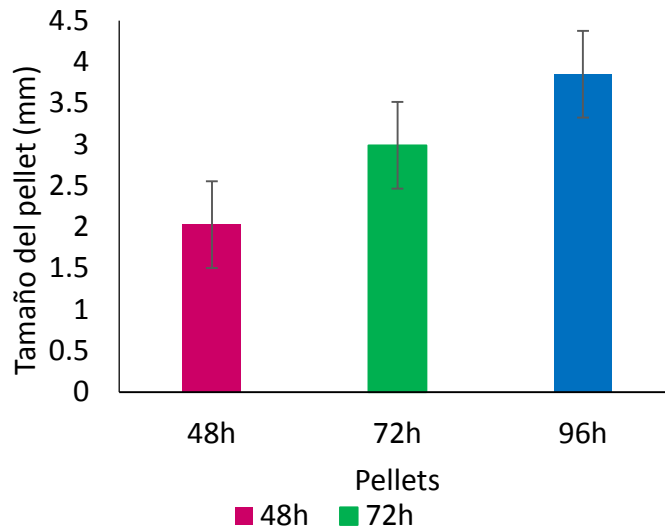


Figura 7. Diámetro de pellets (mm) de *T. hirsuta* BM2 producidos en YMPG.

3.2 Determinación de las condiciones de decoloración con micelio muerto.

El uso de la biomasa microbiana en especial la biomasa fúngica como potencial absorbente para la eliminación de tintes de aguas residuales industriales ha sido propuesta como una alternativa prometedora. Se ha reportado que la capacidad de adsorción es dependiente de varios factores como: tipo de biomasa, pH, temperatura concentración de tinte y concentración de adsorbente (Maurya y col, 2006), por lo que en este estudio se realizó una cinética de decoloración a diferentes valores de pH, temperaturas concentración de micelio y tiempo para determinar la mayor eficiencia en la decoloración.

3.2.1 Efecto del pH

El pH de la solución del tinte juega un papel importante en todo el proceso de decoloración y en particular sobre la capacidad de adsorción. Este parámetro influye en la carga de la superficie del adsorbente, el grado de ionización del material presente en la solución, la disociación de grupos funcionales en los sitios activos del

adsorbente y la química de la solución de colorante. Se evaluó el efecto del pH en un rango de 3 a 7 en la remoción del índigo carmín con biomasa muerta a temperatura ambiente y una concentración inicial de tinte de 100 mg/L.

En la tabla 4 se muestra los resultados donde se observa que al incrementar el pH (3-7) disminuye la eficiencia de la decoloración. A pH 3 se detectó la máxima decoloración que fue de 60,52 y 36% en M1, M2 y M3 respectivamente a las 24 horas de tratamiento. Este comportamiento puede ser atribuido a la concentración de iones de hidrógeno presentes en el medio y las interacciones electrostáticas ya que a pH ácidos los grupos químicos presentes en la pared celular del hongo se protonan adquiriendo una carga positiva y para mantener su neutralidad contra iones negativos se adsorben; por otro lado al aumentar el pH del medio estos grupos químicos se desprotonan y la adsorción disminuye (Garg y col, 2004; Yesilada y col, 2003)

Estos resultados coinciden con los reportados por Razak y col, (2015) quienes lograron remover del 90-95% de Rosa de Bengal y Azul de Remazol 19 respectivamente a pHs bajos (2-4) con micelio muerto de *A. niger*, mientras que Kahraman y col, (2012) reportan la remoción del 90% de 50mg/L del tinte índigo carmín a pH 2 en un período de tiempo corto (60min). Similarmente Wang y col, (2008) reportaron que el pH óptimo en la adsorción de un tinte azo con *A. fumigatus* fue de 2. En la Tabla 4 también se observan diferentes niveles de decoloración en función de la edad del micelio. M1 alcanzó el mayor porcentaje de decoloración (60%), seguido de M2 (52%) y M3 (36%).

Tabla 4. Efecto del pH en la decoloración del índigo carmín 0.01% por *T. hirsuta*.

| pH | Decoloración (%) | | |
|----|------------------|-------------------|------------------|
| | M1 | M2 | M3 |
| 3 | 60 ^a | 52 ^a | 36 ^a |
| 4 | 23 ^b | 14 ^b | 18 ^b |
| 5 | 11 ^c | 11 ^{bc} | 5 ^{bc} |
| 6 | 0.7 ^d | 0.5 ^{cd} | 0.9 ^c |
| 7 | 0.6 ^d | 0 ^d | 0.5 ^c |

Índigo carmín 0.01% Temperatura ambiente, 150 rpm y 24 h. Las medias con letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

3.2.2 Efecto de la temperatura

La temperatura es otro factor importante en el proceso de decoloración, se sabe que la temperatura aumenta la energía cinética de las moléculas favoreciendo la difusión e interacción del adsorbato (tinte) y el adsorbente (micelio), sin embargo a temperaturas altas se produce la desorción del tinte (Kyzas y col, 2013). Por lo tanto se evaluó el efecto de la temperatura en la decoloración de índigo carmín en un rango de 30 a 50 °C a pH3

En la figura 8, se presentan los resultados de la evaluación de este parámetro, donde se puede observar que la máxima remoción del color se detectó de 30 a 40 °C, después de 3 horas de tratamiento, y aunque los tres micelios presentan el mismo comportamiento durante el experimento, el micelio M1 alcanzó el mayor porcentaje de remoción (75 y 76%), seguido de M2 (64%) y M3 (51%). A partir de 45°C se observa una disminución en la decoloración, que podría ser atribuido al efecto de la desorción, ya que al aumentar la temperatura las fuerzas electrostáticas se rompen liberando el tinte. Datos similares fueron reportados por Kalaiarasi y col, (2012)

donde removieron el 90% del color en un efluente textil a 30 °C con *Aspergillus fumigatus*, además mencionan que con el incremento de la temperatura, la eficiencia de decoloración disminuye.

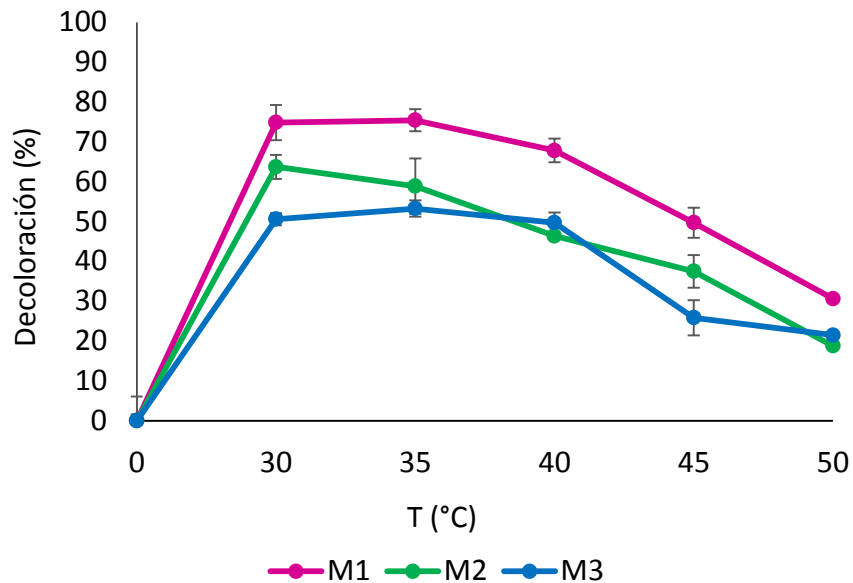


Figura 8. Efecto de la temperatura en la decoloración del índigo carmín 0.01% por *T. hirsuta* en buffer de citrato-fosfato 60 mM, pH 3, 150rpm y 3 h.

3.2.3 Efecto de la concentración de Inóculo

Para estudiar el efecto de la concentración de inóculo se usaron concentraciones de 0.25 a 1.25 g con micelio de diferentes edades M1, M2 y M3. Se usaron los valores de pH y temperatura seleccionados anteriormente (pH 3 y 30 °C). El tiempo de tratamiento fue de 3 horas donde se observó que el porcentaje de decoloración se incrementó de acuerdo al tamaño de inóculo. El mayor porcentaje de remoción de color (82%) se obtuvo con un gramo del micelio más joven (M1), que se mantuvo al aumentar la concentración a 1.25g (Figura 9). Este incremento fue atribuido al aumento en la superficie adsorbente y la disponibilidad de más sitios de adsorción (Razak y col, 2015). Asma y col. (2006), también encontraron que el incremento en la

concentración del inóculo favorece la adsorción en la decoloración del Azul astrazone con *P chysosporium* donde logran remover el 80% del tinte en 60 min. Del mismo modo Verma y Banik, en 2005 evaluaron el efecto de la concentración del inóculo de *Phanerochaete chrysosporium* en un rango de 0.05 a 1 mg/100mL para decolorar el tinte verde malaquita logrando una decoloración de 78.2% con 0.2 mg/mL de biomasa viable y no viable.

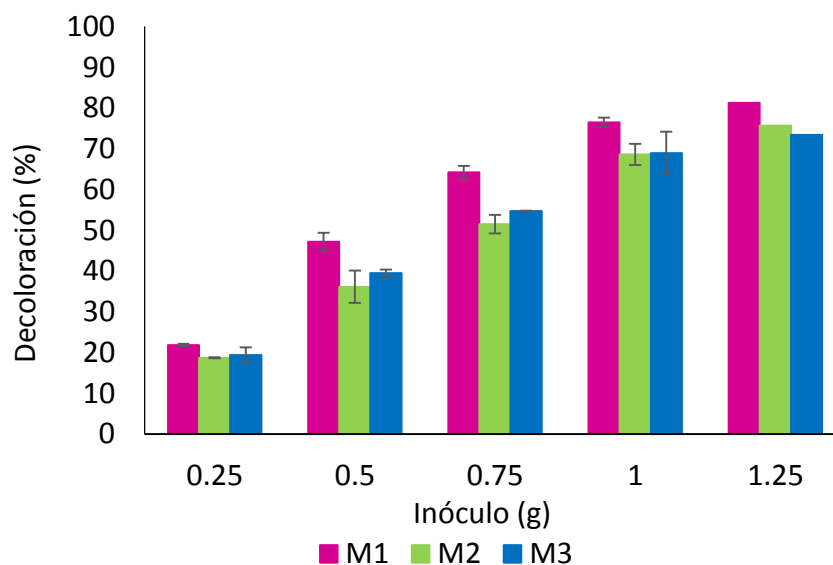


Figura 9. Efecto de la concentración de inóculo en la decoloración del índigo carmín 0.01% por *T. hirsuta* en buffer de citrato-fosfato 60 mM, pH 3, 35 °C, 150 rpm y 3 horas de tratamiento.

3.2.4 Efecto de la concentración de tinte

Se realizó una cinética donde se evaluó el efecto de la concentración de tinte de 50 a 150 mg/L a pH 3, 30 °C, 1 g de inóculo y 150 rpm. Los resultados muestran que la remoción del tinte con biomasa muerta es dependiente de la concentración inicial de mismo (Figura 10). La mayor eficiencia en la remoción de color ocurrió a 50 y 100 mg/L de índigo carmín (74 y 68%) a las 1.5 horas de tratamiento y al aumentar la concentración del tinte disminuye la eficiencia del proceso.

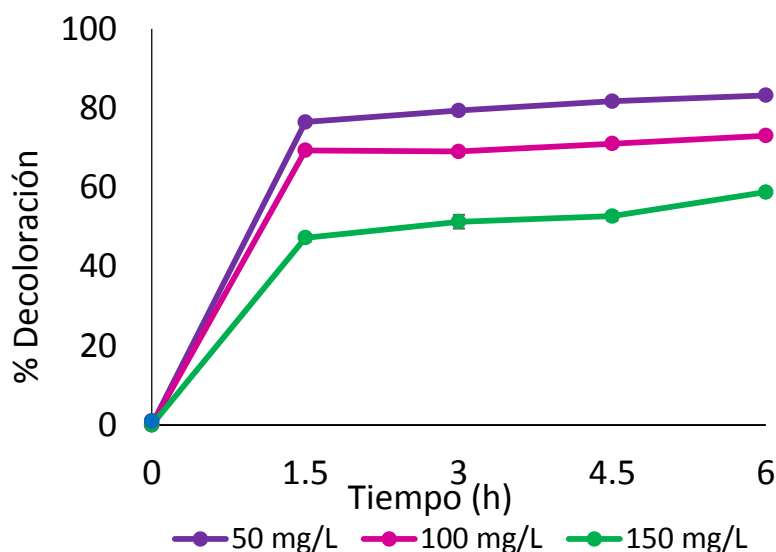


Figura 10. Cinética de decoloración del índigo carmín por *T. hirsuta* en buffer de citrato-fosfato pH 3, 30 °C, 1g inóculo, 150 rpm

Estos resultados podrían ser relacionados con la saturación de los grupos químicos presentes en pared celular del hongo a una concentración de 150 mg/L. Cabe mencionar que el control no presentó decoloración lo que permite confirmar que la decoloración no fue afectada por ninguna variable externa a las ya controladas en el periodo donde se observaron los cambios en la remoción del color. Un comportamiento similar fue observado por Kahraman y col (2012)) en la decoloración del índigo carmín con *P. ostreatus* reportando una reducción en la decoloración de 93 - 64% cuando incrementaron la concentración del tinte de 50-500mg/L. Además ellos mencionan que la concentración de tinte presente en aguas textiles es menor a 500mg/L (aproximadamente 10-50 mg/L). Por otro lado Binupriya y col (2007) reportan un decremento el porcentaje de adsorción cuando se incrementa la concentración de tinte.

Como se mostró en los experimentos con diferentes edades de micelio, el más joven (M1) alcanzó el porcentaje más alto de decoloración. Lo anterior puede ser debido a que los pellets, son más pequeños y hay mayor cantidad de éstos por gramo de

inóculo. Este hecho ha sido estudiado por Weber, (1972) quien reportó que el incremento en la superficie de contacto favorece la adsorción del tinte. Asimismo, durante el crecimiento del hongo podrían ocurrir modificaciones en la pared celular en relación a la estructura y concentración de la quitina que es el principal adsorbente. Los grupos acetamida proporcionan funciones distintivas de adsorción y de acuerdo a su concentración en el polímero quitina podrían favorecer la capacidad de atrapar iones de metales pesados, proteínas y colorantes. Por otra parte, la quitina posee microfibrillas antiparalelas unidas entre sí por puentes intermoleculares cuya compactación podría aumentar con la edad del micelio. Aunque no se han encontrado reportes al respecto, es posible que la estructura de la quitina en el micelio joven sea menos compacta dejando más disponibles los grupos químicos que favorecen la adsorción del tinte. Las figura 11a y 11b muestran los pellets antes y después del tratamiento donde se observa claramente la coloración azul de los pellets después del tratamiento.

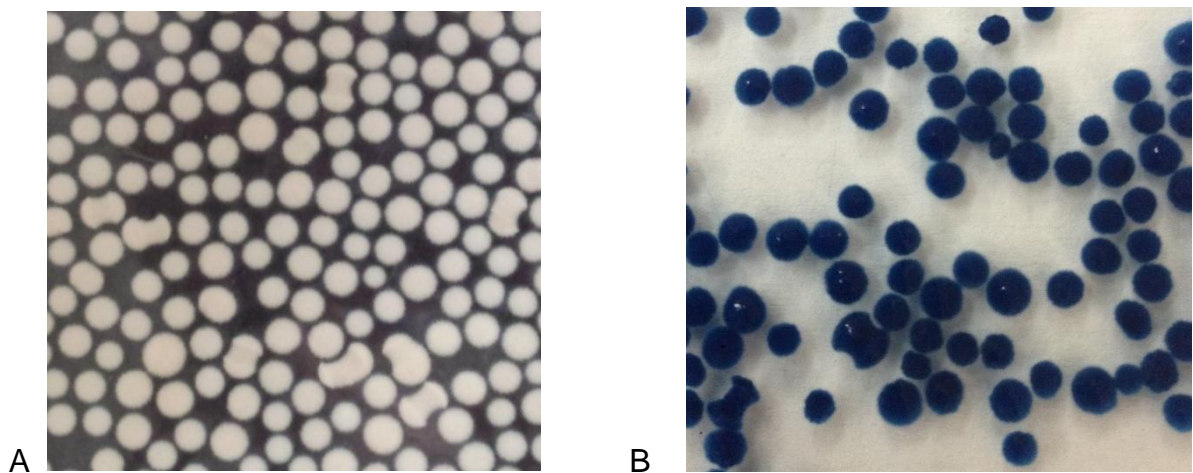


Figura 11. Pellets de *T. hirsuta* antes (A) y después (B) de 1.5 horas de tratamiento con micelio muerto a pH3, 30°C y 150 rpm

3.3 Determinación de las condiciones de decoloración con micelio vivo.

En los últimos años se ha centrado más la atención en el desarrollo de nuevas tecnologías de tratamiento que nos ayuden a completar la degradación del tinte. Los hongos de la podredumbre blanca han sido muy estudiados en la decoloración de tintes y si bien el mecanismo primario es la adsorción del tinte también producen enzimas lacasas que son capaces de degradarlos y eliminarlos. En este estudio se realizó una cinética de decoloración para evaluar el pH, temperatura y concentración de tinte; se presenta el tiempo en el que se obtuvo la mayor decoloración.

3.3.1 Efecto del pH

El pH es un factor importante que afecta el crecimiento del hongo, la decoloración, la síntesis y actividad de las lacasas. Los cultivos se realizaron en un rango de pH de 3 a 7 (con el buffer correspondiente) a temperatura ambiente en medio YMPG. En la figura 12 se observa que la mayor decoloración se detectó a pH 6 y 7 siendo esta del 80% y 73% a las 10 horas. Este cambio de coloración fue atribuido a que a estos valores de pH se detectó un mayor crecimiento del hongo (adsorción) y/o la presencia de las enzimas lacasas que produce, mientras que en el control no se observaron cambios significativos de color. A diferencia a pH 3, 4 y 5 el nivel de decoloración fue similar al control, lo que sugiere que la remoción de color fue debida a un efecto por pH.

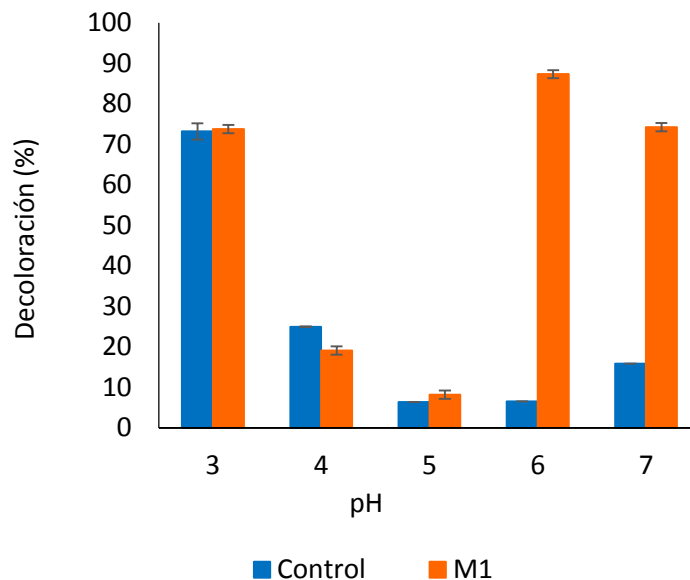


Figura 12. Efecto del pH en la decoloración del índigo carmín 0.01% por *T. hirsuta* a temperatura ambiente, 150 rpm y 10 h de incubación.

La tabla 5 muestra los resultados de la biomasa que fue medida como indicador del crecimiento del hongo y la producción de lacasas a los diferentes pHs. No se detectó correlación entre la actividad lacasa y la biomasa ya que el hongo tuvo un crecimiento similar a pH 3, 6 y 7 pero la actividad de lacasa varió significativamente dependiendo del pH (197, 114 y 57 U/mL respectivamente). Se ha evidenciado que los hongos de la podredumbre blanca son capaces de crecer en un amplio rango de pH, sin embargo este parámetro ha demostrado tener un papel predominante en la inducción de enzimas ligninolíticas que se ha evidenciado incluso a nivel transcripcional (Fernández y col, 2014). El mejor pH para inducir las lacasas puede variar con la cepa y las condiciones de cultivo.

Los resultados de este estudio mostraron que aunque a pH 3 se produjo la mayor actividad de lacasas (197 U/mL), no hubo decoloración ya que los niveles de

decoloración fueron similares al control. Este comportamiento puede ser atribuido al efecto de este pH en la síntesis de isoenzimas lacasas que pueden tener diferencias en sus propiedades, como la afinidad al sustrato, lo que podría indicar que las lacasas producidas no tienen afinidad por el índigo carmín. Cabe recordar que durante el tratamiento con micelio muerto (producido a pH6) se detectó una alta eficiencia en la remoción de tinte a pH3, sin embargo cuando se usó micelio vivo no fue así, probablemente debido a que durante el cultivo a pH3 ocurrieron cambios en la estructura del micelio que modificaron su capacidad de adsorción.

A pH 6 se encontraron 114 U/mL de actividad lacasa con las cuales se obtuvo el 80% de decoloración y a pH 7 se produjeron 57 U/mL y 72% de decoloración. Estos resultados nuevamente muestran la ausencia de correlación entre los niveles de actividad y la eficiencia en la remoción del tinte, por lo que es probable que la decoloración esté relacionada con un efecto combinado con la afinidad de las lacasas producidas a un determinado pH y la afinidad de las lacasas sobre el índigo carmín. En base a los resultados obtenidos se seleccionó el pH de 6 para continuar con los estudios en micelio vivo.

Tabla 5. Efecto del pH en la actividad lacasa y biomasa de *T. hirsuta*

| pH | Biomasa (mg/mL) | Lacasa (U/mL) |
|----|--------------------|------------------|
| 3 | 0.935 ^a | 197 ^a |
| 4 | 0 ^b | 0 ^d |
| 5 | 0 ^b | 0 ^d |
| 6 | 0.910 ^a | 114 ^b |
| 7 | 1.006 ^a | 57 ^c |

Temperatura ambiente, 150 rpm y 10 h de tratamiento. Las medias con letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

3.3.2 Efecto de temperatura.

Posteriormente se evaluó el efecto de la temperatura en un rango de 30-50 °C a pH6. A 30 y 35 °C el micelio vivo produjo la mayor decoloración a las 10 horas (figura 13). Se observó que al incrementar la temperatura hubo decoloración en el control. Como se puede apreciar, la decoloración del tinte en el control aumentó al incrementar la temperatura.

En este experimento, también se evaluó la biomasa y la actividad enzimática, los resultados indican que de 30 - 40 °C se obtuvo la mayor cantidad de biomasa (1.359-0.899 mg/mL) y de actividad lacasa (25 - 23 U/mL). Sin embargo a partir de 45°C se afectó el crecimiento y producción de lacasas hasta desaparecer a 50 °C (Tabla 6). Tian y col, (2013) reportaron que 33 °C fue la mejor temperatura de *Ganoderma weberianum* para remover 92% de índigo carmín usando 20 mg/L.

Este efecto se puede atribuir a que a temperaturas altas se afectan las reacciones enzimáticas, provocando la inactivación de la enzima por el calor o la desnaturalización de la misma. Tal como sugiere Nyanhongo y col, (2002) en la decoloración de ocho tintes con *T. modesta* quien además menciona que los ocho tintes se decoloraron a diferentes temperaturas. Por lo tanto la temperatura que se usó en este trabajo para los siguientes experimentos fue 30 °C.

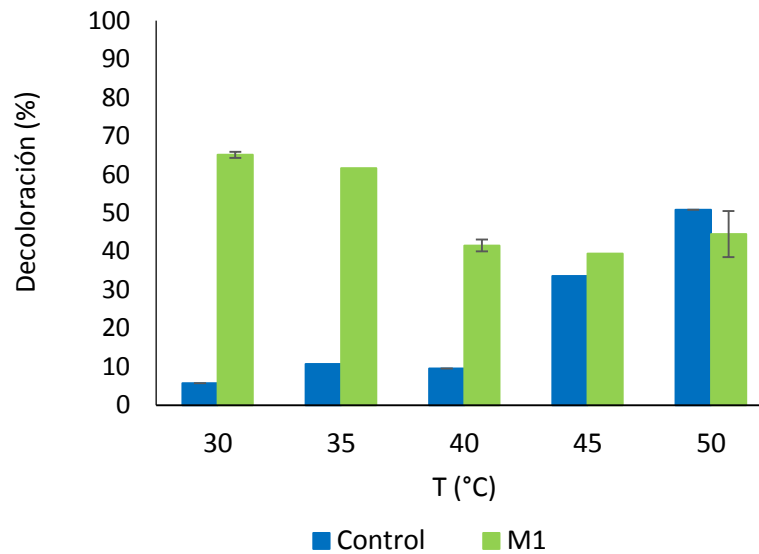


Figura 13. Efecto de la temperatura en la decoloración del índigo carmín 0.01% por *T. hirsuta* a pH 3, 150 rpm y 10 h de tratamiento.

Tabla 6. Efecto de la temperatura en la actividad lacasa y biomasa de *T. hirsuta*,

| T (°C) | Biomasa (mg/mL) | Lacasa (U/mL) |
|--------|---------------------|------------------|
| 30 | 1.359 ^a | 25 ^a |
| 35 | 0.930 ^{ab} | 23 ^a |
| 40 | 0.899 ^{ab} | 17 ^a |
| 45 | 0.587 ^b | 5.2 ^b |
| 50 | 0 ^c | 0 ^b |

pH 3, 150 rpm y 10 h de incubación. Las medias con letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

3.3.3 Efecto de la concentración de inóculo

El tamaño del inóculo es un factor que ha mostrado tener un efecto en los procesos de decoloración de tintes con micelio vivo, de tal manera que se evaluaron concentraciones de inóculo de 0.25, 0.50, 0.75, 1 y 1.25 g a pH 6 y 30 °C. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 14, donde se observa una elevada remoción de tinte (70%) a partir de 0.5 g, después de los cuales no hay un cambio significativo en decoloración con respecto a los demás tamaños de inóculo, por lo que esta concentración, fue seleccionada como la mejor en este proceso.

De igual manera Verma y Banik en 2005 evaluaron el efecto de la concentración de inóculo de *Phanerochaete chrysosporium* en un rango de 0.05 a 1 mg/100ml y lograron decolorar el 78.2% del verde malaquita con 0.2 mg/mL de biomasa viable y no viable.

Por otro lado, Shahvali y col, (2000) han informado que un tamaño de inóculo del 10% es suficiente para la decoloración de las aguas residuales textiles y que por encima de este no existe ningún cambio apreciable en el porcentaje de decoloración.

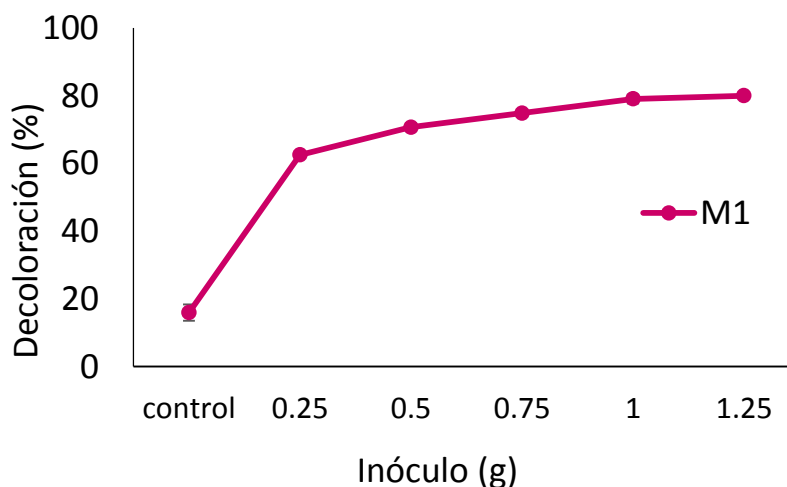


Figura 14. Efecto de la concentración de inóculo en la decoloración del índigo carmín 0.01% por *T. hirsuta* a pH 3, 30 °C, 150 rpm y 10 h de incubación.

También se observó un incremento entre la cantidad de inóculo, la cantidad de biomasa y la actividad de lacasa (Tabla 7).

Tabla 7. Efecto de concentración de inóculo en la lacasa y biomasa de *T. hirsuta*

| Inóculo (g) | Biomasa (mg/mL) | Lacasa (U/mL) |
|-------------|----------------------|------------------|
| 0.25 | 0.7575 ^c | 17 ^d |
| 0.50 | 1.498 ^{bc} | 48 ^{cd} |
| 0.75 | 1.472 ^{bc} | 76 ^{bc} |
| 1.00 | 1.8915 ^{ab} | 117 ^b |
| 1.25 | 2.6365 ^a | 173 ^a |

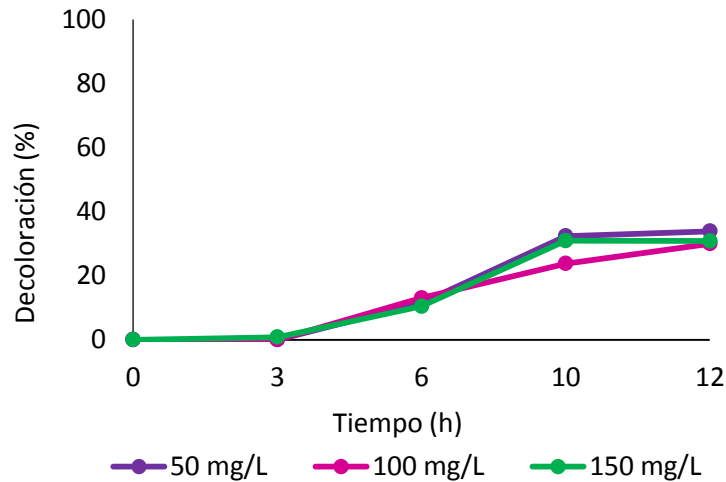
pH 3, 30 °C, 150 rpm y 10 h de tratamiento. Las medias con letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

3.3.4 Efecto de la concentración de tinte con micelio vivo

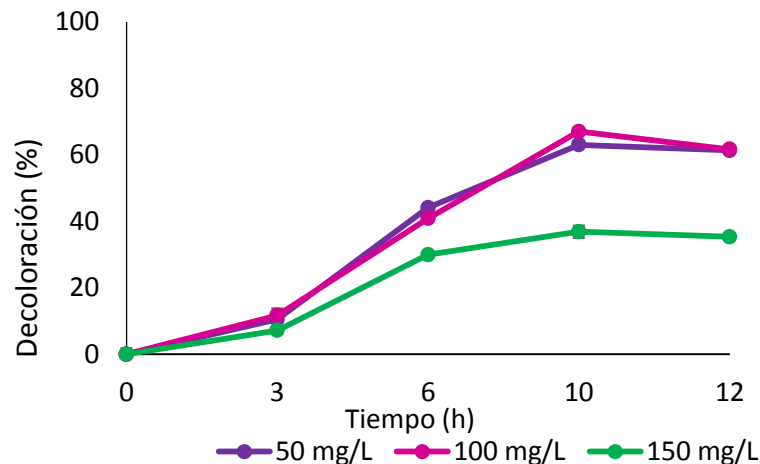
El efecto de la concentración inicial de tinte depende de la relación inmediata entre la concentración del tinte y los sitios disponibles en una superficie adsorbente.

Para evaluar el efecto de la concentración de tinte (entre 50-150 mg/L), se realizó una cinética bajo las siguientes condiciones pH 6, 30 °C, 0.5 g de inóculo y 150 rpm; los resultados demuestran que la mayor eficiencia de decoloración fue con 50 y 100 mg/L (figura 15b). Lo cual indica que un aumento en la concentración inicial de tinte provoca un aumento en la capacidad del adsorbente y esto puede ser debido a la elevada fuerza de conducción en la transferencia de masa a una alta concentración inicial de tinte. Por otro lado cuando si se aumenta la concentración de tinte a 150

mg/L la eficiencia en la decoloración disminuye probablemente por la saturación o inhibición de la lacasa. Datos similares han sido reportados por Binupriya y col 2008; en otro estudio Verma y Banik (2005) encontraron un comportamiento semejante cuando evaluaron el efecto de la concentración de tinte de 100mg/L a 1000mg/L en la decoloración del violeta de cristal y el verde de malaquita.



a)



b)

Figura 15. Cinética de decoloración del índigo carmín por *T. hirsuta* en buffer de fosfatos pH 3, 30 °C, 0.5 g inóculo, 150 rpm; control sin inóculo (figura a) y micelio (figura b).

También se puede observar en la figura 15a la decoloración del control (medio sin inóculo) a partir de las tres horas de tratamiento, esto podría ser atribuido al tiempo y a luz. Por lo tanto la decoloración real (decoloración del micelio- decoloración del control) del índigo carmín en 100 mg/L de tinte es aproximadamente del 53%.

Las figura 16 muestra los pellets al inicio y al final del tratamiento es importante mencionar que el tinte se adsorbe inicialmente al pellet, pero el color desaparece, lo que indica que la decoloración fue ocasionada por las lacasas que produce el hongo. Un comportamiento similar fue reportado por Quintero y col, (2013) en la degradación del Orange II después de días de tratamiento. También Yesilada y col (2010) reportaron un comportamiento similar en la decoloración del diferentes tintes (Negro astrazon, rojo cibacron FN-3R, azul remazol brillante R, rojo de remazol BS, azul turquesa remazol G) donde obtuvieron una decoloración del 87 al 94% con *F. troglia* y *T versicolor*, ellos mencionan que la decoloración puede atribuirse primeramente a la adsorción y luego a la degradación enzimática, debido a que los pellets no se tiñen al final del tratamiento. De igual manera Aretxaga y col, (2001) y Enayatzamir y col (2009) reportaron un comportamiento similar.

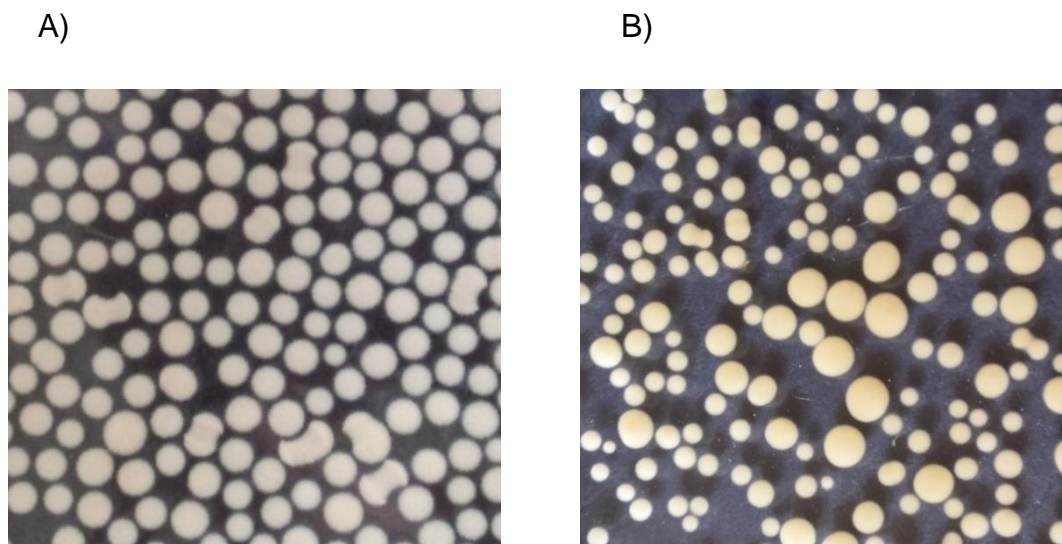


Figura 16. Pellets de *T. hirsuta* antes (A) y (B) después del tratamiento con micelio vivo a pH6, 30°C, 150 rpm y 10 horas de tratamiento.

3.4 Reuso de los pellets

Una de las principales ventajas del micelio vivo es que se puede recuperar y reutilizar por esta razón se llevaron a cabo ciclos de reuso de los pellets cada 12 horas bajo las condiciones encontradas en los experimentos anteriores en medio YMPG y en medio YMPG suplementado con el 2% de salvado de salvador de trigo debido a que se reportado que el salvado de trigo favorece el crecimiento del hongos además que es un inductor de las lacasas.

La figura 17 muestra los ciclos de reuso de los pellets en medio YMPG, se puede observar una decoloración del 58 al 70% respectivamente en los dos primeros ciclos y que al aumentar estos la eficiencia en la decoloración disminuye hasta 30%. Por otro lado tenemos el medio YMPG suplementado con 2% salvado trigo y se puede ver que obtiene una decoloración del 53 al 74% lo cual nos permite usar el micelio vivo hasta 4 ciclos. También se determinó la actividad lacasa en los ciclos de reuso los resultados se presentan en la tabla 7 en donde se observa que la actividad aumenta en función del tiempo y que la mayor actividad se detectó en el tercer ciclo (36h) en el medio YMPG suplementado con salvado de trigo siendo de 1981 U/mL ocho veces mayor que en medio de solo YMPG.

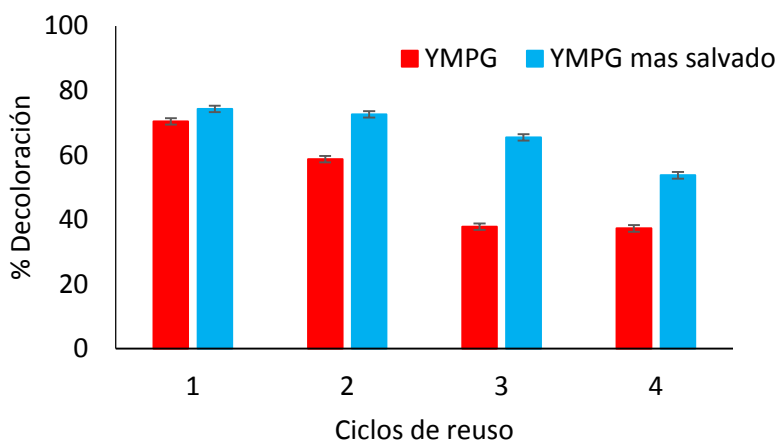


Figura 17. Ciclos de reuso en la decoloración del índigo carmín por *T. hirsuta* Bm2 a pH 6 y 30°C .

Tabla 7. Actividad lacasa en los ciclos de reuso

| Actividad Lacasa (U/mL) | | |
|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| Reuso | YMPG | YMPG + salvado |
| 1 | 66 ^b | 145 ^c |
| 2 | 128 ^b | 900 ^b |
| 3 | 246^a | 1981^a |
| 4 | 205 ^a | 1363 ^b |

pH6, 30°C, 150 rpm, 10 horas de tratamiento. Las medias con letras diferentes en la misma columna son significativamente diferentes ($p \leq 0.05$)

3.5 Comparación de la decoloración con micelio vivo y muerto.

En la tabla 8 se comparan los tratamientos en la decoloración del índigo carmín con micelio vivo y muerto. Se puede observar que ambos tratamientos demostraron ser capaces de eliminar el tinte logrando remover altos porcentajes del índigo carmín. La máxima decoloración con micelio vivo se obtuvo a las 10 horas de tratamiento. En este sistema la cantidad de inóculo fue menor que el muerto, además, se produjeron enzimas lacasas que podrían ser usadas en otros procesos y los pellets fueron reutilizados 4 ciclos. Por otro lado, con el micelio muerto se requirió un tiempo muy corto (1.5 h) para remover eficientemente el tinte (68%). Es importante señalar que aunque el tinte se almacena en los pellets, éstos podrían ser desorbidos para la reutilización el tinte. La selección del tratamiento adecuado a escala industrial depende de la economía, la viabilidad y la inocuidad de las aguas tratadas.

Tabla 8. Tabla comparativa del tratamiento del tinte con micelio muerto y vivo.

| Micelio | pH | T (°C) | Inóculo (g) | Tinte (mg/L) | Decol. (%) | Tiempo (h) | Lacasas (U _{mL} ⁻¹) | Ciclos |
|---------|----|--------|-------------|--------------|------------|------------|--|--------|
| Muerto | 3 | 30-35 | 1 | 100 | 68 | 1.5 | 0 | 1 |
| Vivo | 6 | 30-35 | 0.5 | 100 | 70 | 10 | 48 | 4 |

3.6 Pruebas de Citotoxicidad

Los hongos de la podredumbre blanca son capaces de decolorar tintes a través de las enzimas oxidativas extracelulares que producen. Sin embargo, la decoloración no implica que los metabolitos resultantes de la transformación del tinte sean menos tóxicos que las moléculas iniciales. En este estudio el tinte índigo carmín fue tratado con células vivas y muertas de *Trametes hirsuta* y posteriormente se midió la citotoxicidad de los extractos tratados. Los ensayos de toxicidad se llevaron a cabo con células de riñón, los cuales son un modelo que ha sido validado “*in vitro*” por lo que representa una herramienta para el estudio de toxicidad de contaminantes (Bondy y Armstrong, 1998).

Los resultados de la figura 18 muestran que la toxicidad celular por el índigo carmín fue del 15.6 %, lo cual representa un nivel bajo de toxicidad de acuerdo a la escala reportada por (Coleman y col, 1985; Ramsay y col, 2002). Después del tratamiento del tinte con micelio muerto se logró remover el tinte y la sobrevivencia de las células se recuperó al 100% debido a que el tinte fue eliminado por el proceso de biosorción. Por otro lado el carácter citotóxico fue mucho mayor durante la biotransformación del índigo carmín con el micelio vivo. En todas las muestras obtenidas después del crecimiento del hongo en medio YMPG y con salvado, la toxicidad celular fue de 79 a 90%, lo que implica un nivel de toxicidad aguda.

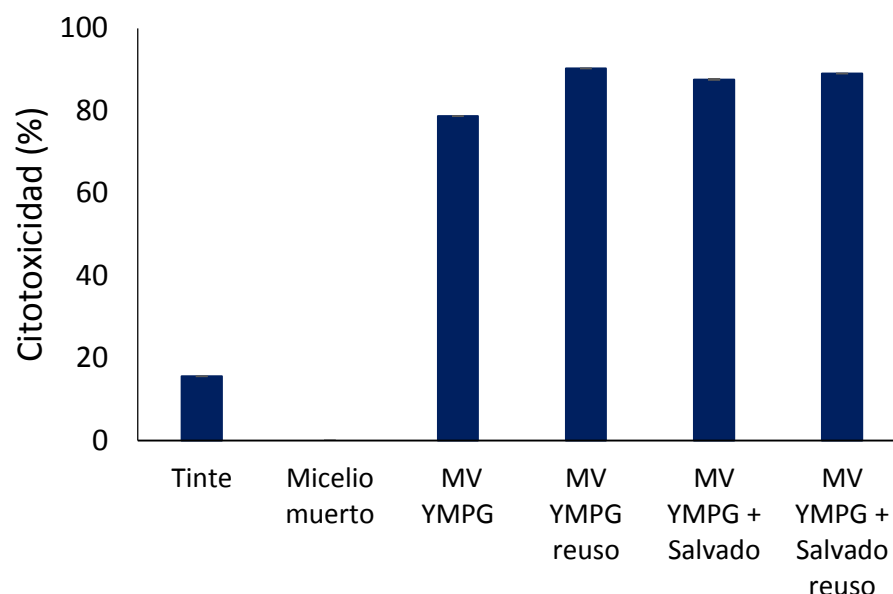








Figura 18. Citotoxicidad antes y después del tratamiento del tinte índigo carmín con micelio vivo y muerto de *T. hirsuta* Bm2.

La tabla 8 muestra una comparación de los porcentajes de remoción del tinte, las lacasas producidas y la actividad citotóxica. El tinte sin tratamiento y tratado con micelio muerto desarrollaron un color púrpura en la reacción, que de acuerdo a su intensidad es indicador de baja o ausencia de toxicidad, mientras que la disminución del color se relaciona con el nivel de toxicidad de la muestra. Los resultados muestran claramente que no hubo una correlación directa entre el nivel de decoloración del índigo carmín y la citotoxicidad detectada. Después del tratamiento con YMPG y YMPG con salvado, la decoloración fue de 70 y 74% y el nivel de citotoxicidad de 78 a 87% respectivamente, mientras que, en los extractos obtenidos durante el reuso, la decoloración fue de 37 y 53% y la toxicidad de 90 y 89% respectivamente. Tampoco hubo correlación entre los niveles de actividad de lacasa, la decoloración y la toxicidad. En el medio YMPG aun cuando la actividad fue baja (66 U/mL), se obtuvieron altos porcentajes de decoloración (70%) y citotóxica

(78%). También se observó que después del reuso la actividad de lacasas aumentó a 205 U/mL, sin embargo la decoloración fue de 37% y la toxicidad 90%. Lo anterior indica que aun cuando las lacasas están involucradas en el proceso de biotransformación, otros factores podrían estar involucrados en el proceso, como la liberación de otros metabolitos producidos por el hongo.

Tabla 9. Decoloración y citotoxicidad antes y después de los tratamientos del índigo carmín.

| Muestra | Decoloración (%) | Act. Lacasa (U/mL) | Citotoxicidad (%) | |
|---------------|------------------|--------------------|-------------------|---|
| Tinte | 0 | 0 | 15.61 |  |
| MM | 68 | 0 | 0 |  |
| MV/YMPG | 70 | 66 | 78.75 |  |
| MV/YMPG reuso | 37 | 205 | 90.31 |  |
| MV/S | 74 | 145 | 87.62 |  |
| MV/S reuso | 53 | 1362 | 89.06 |  |

MM: micelio muerto, MV: micelio vivo, medios YMPG y Salvado (S)

Estos resultados coinciden con los reportados por Ramsay y col, (2002) quienes evidenciaron el incremento en la toxicidad después del tratamiento de los tintes, Amarillo Brillante Cibacron 3B-A y Rojo Congo con *Trametes versicolor*.

La degradación enzimática de los tintes vía lacasas requiere diversos pasos para la biotransformación a moléculas no tóxicas. Se ha mencionado que las lacasas podrían causar separación de los anillos aromáticos del tinte a través de la incorporación de átomos de oxígeno (biohidroxilación) resultando en ácidos carboxílicos. El índigo carmín puede ser transformado en isatina y por descarboxilación puede formar el ácido antranílico que es muy tóxico para la células (Quintero y Cardona, 2010). También Campos y col, (2001), encontraron que la degradación de Indigo es más rápido en presencia de las lacasas de la cepa de *T. hirsuta* de hongos que las lacasas de la cepa bacteriana *Sclerotium rolfsii*, pero los mismos productos de degradación (ácido antranílico e isatina) se crearon después de la biodegradación por ambas lacasas.

La toxicidad de tintes después del tratamiento microbiano ha sido escasamente estudiada y se han realizado empleando modelos bacterianos, algas, organismos marinos, plantas y líneas celulares. El índigo carmín fue eficientemente decolorado y detoxificado por lacasas de *Scytalidium thermophilum*, usando *Escherichia coli* y *Bacillus megaterium* para medir la toxicidad (Younes y Sayadi, 2013). En otros estudios se reportó la decoloración y detoxificación del amarillo de ranomil y rojo A con lacasas de *Cyathus bulleri* usando como modelo de toxicidad a *Bacillus subtilis* (Mishra y Bisaria, 2007). También, la lacasa purificada de *T. hirsuta* fue capaz de decolorar tintes triarilmetano, indigoides, azo y antraquinónicos y reducir la toxicidad que se midió por la velocidad de consumo de O₂ de *Pseudomonas putida* (Abadulla et al, 2010). En otro estudio, la toxicidad del tinte medida con *Daphnia magna* y líneas celulares de cáncer fue eliminada completamente después del tratamiento con *Coriolus versicolor* (Srikanlayanukul y Kitwechkun, 2008).

En un estudio más amplio, Vanhulle y col (2008) llevaron a cabo el tratamiento de 8 tintes con seis hongos y compararon el efecto tóxico usando sistemas bacterianos y líneas celulares Caco-2. La eficiencia en la decoloración varió en función de la cepa y no hubo correlación entre la decoloración y el nivel de toxicidad. Cuando se usó

Pycnopus sanguineus, el tinte indigoide azul ácido mostró ser pobremente detoxificado en el sistema de células Caco-2 mientras que fue eficientemente detoxificado con el sistema de *Salmonella*. A diferencia, el rojo ácido fue detoxificado por células Caco-2 mientras que se observó un incremento en la toxicidad usando el sistema *Vibrio fischeri*. Lo anterior muestra que la evaluación de la toxicidad es complicada, ya que los resultados varían dependiendo de hongo, del tinte y el sistema utilizado (bacterias, o células), es decir, diferentes modelos pueden conducir a diferentes resultados.

4. CONCLUSIONES

Se establecieron las mejores condiciones de decoloración con el micelio muerto 30°C, pH 3, 1 g inóculo, 150 rpm y 100 mg/L de tinte en un tiempo de 1.5 horas y se logró remover el 68% del índigo carmín.

Se establecieron las mejores condiciones de decoloración en el micelio vivo 30°C, pH6, 0.5 g inóculo, 150 rpm y 100 mg/l de tinte en un tiempo de 10 horas y se logró remover el 70% del índigo carmín en 10 horas.

La adición de salvado de trigo permitió la reutilización del sistema vivo durante 4 ciclos. En estas condiciones se incrementó la actividad de las lacasas 8 veces.

El tratamiento con micelio vivo mostró un severo efecto citotóxico en las células de riñón MDCK. Mientras que con el uso de micelio muerto no presentó un efecto citotóxico.

Los resultados obtenidos contribuyen a resaltar la importancia de evaluar el efecto citotóxico después del tratamiento fúngico para establecer la seguridad de la tecnología de tratamiento de tintes o aguas residuales.

El mejor tratamiento fue con micelio muerto ya que se obtiene una decoloración del 68% en un tiempo corto y se reduce la citotoxicidad en las células MDCK.

5. RECOMENDACIONES

Los resultados de este estudio mostraron que en las condiciones empleadas para el tratamiento del índigo carmín con el micelio vivo de *T. hirsuta* Bm-2 se logró remover el tinte pero se generaron compuestos que incrementan la toxicidad medida en células de riñón. Por lo anterior es importante realizar análisis por HPLC acoplado a masas para identificar los compuestos que se acumulan durante la biotransformación.

Una alternativa para mejorar el proceso es el uso de tratamientos mixtos y/o la adición de mediadores redox que aumentan el potencial redox de las lacasas y le permitan ampliar el espectro de sustratos (como los intermediarios) sobre los que puede actuar la lacasa a fin de transformarlos a compuestos no tóxicos.

6. REFERENCIAS

- Acosta Baquedano O. (2011). Decoloración de efluentes de la industria textil mediante el sistema lacasa-mediador redox. Universidad autónoma de Yucatán. Facultad de Ingeniería Química. Tesis de la Maestría en Ambiental.
- Abadulla E., Tzanov T., Costa S., Robra K., Cavaco-Paulo A., Gubitiz G. (2000). Decolorization and detoxification of textile dyes with laccase from *Trametes hirsuta*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 3357-3362.
- Bondy G S, and. Amstrong C L (1998). Cytotoxicity of nephrotoxic fungal toxins to kidney-derived LLC-PK1 and OK cell lines. *Cell Biol Toxicol*. 14: 323-332.
- Al-Kdasi, A., Idris, A., Saed, K., y Guan, C. T. (2004). Treatment of textile wastewater by advanced oxidation processes—a review. *Global nest: the Int. J*, 6(3), 222-230.
- Ambrósio, S. T., Vilar Júnior, J. C., da Silva, C. A. A., Okada, K., Nascimento, A. E., Longo, R. L., y Campos-Takaki, G. M. (2012). A biosorption isotherm model for the removal of reactive azo dyes by inactivated mycelia of *Cunninghamella elegans* UCP542. *Molecules*, 17(1), 452-462.
- Andleeb, S. A. A. D. I. A., Atiq, N. A. M. I., Ali, M. I., Razi-ul-Hussnain, R. A. J. A., Shafique, M., Ahmad, B., y Ahmad, S. (2010). Biological treatment of textile effluent in stirred tank bioreactor. *Int. J. Agric. Biol*, 12(2), 256-260.
- Anjaneya, O., Santoshkumar, M., Anand, S. N., y Karegoudar, T. B. (2009). Biosorption of acid violet dye from aqueous solutions using native biomass of a new isolate of *Penicillium* sp. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 63(6), 782-787
- Arana, A., Téllez, A., González, T., y González, A. (2002). Aspectos generales de la biodegradación de la madera: aplicaciones industriales de las lacasas. *Bio-Tecnología*, 7(3), 40-55.
- Aretxaga, A., Romero, S., Sarrà, M., y Vicent, T. (2001). Adsorption step in the biological degradation of a textile dye. *Biotechnology progress*, 17(4), 664-668.

- Asma, D., Kahraman, S., Cing, S., y Yesilada, O. (2006). Adsorptive removal of textile dyes from aqueous solutions by dead fungal biomass. *Journal of basic microbiology*, 46(1), 3-9.
- Bae S.J., Freeman S.H. y Kim D.S., (2006). Influences of new azo dyes to the aquatic ecosystem. *Fiber Polymer*, 7, 30-35.
- Bayramoğlu, G., Arica, M. Y. (2007). Biosorption of benzidine based textile dyes “Direct Blue 1 and Direct Red 128” using native and heat-treated biomass of *Trametes versicolor*. *Journal of Hazardous Materials*, 143(1), 135-143.
- Bhattacharyya, K. G, y Sarma, A. (2003). Adsorption characteristics of the dye, Brilliant Green, on Neem leaf powder. *Dyes Pigments*, 57(3), 211-222.
- Bilal, M. and Asgher, M. (2015). Sandal reactive dyes decolorization and cytotoxicity reduction using manganese peroxidase immobilized onto polyvinyl alcohol-alginate beads. *Chemical Center Journal*. 9:47-60
- Binupriya, A. R., Sathishkumar, M., Dhamodaran, K., Jayabalan, R., Swaminathan, K., & Yun, S. E. (2007). Liquid-phase separation of reactive dye by wood-rotting fungus: A biotechnological approach. *Biotechnology journal*, 2(8), 1014.
- Burgos J. M. (2010). Regulación de la expresión de lacasas por metales y fenoles simples en *Trametes hirsuta* Bm2. Instituto tecnológico de Mérida. Tesis de maestría.
- Campos, R., Kandelbauer, A., Robra, K. H., Cavaco-Paulo, A., & Gübitz, G. M. (2001). Indigo degradation with purified laccases from *Trametes hirsuta* and *Sclerotium rolfsii*. *Journal of biotechnology*, 89(2), 131-139.
- Cano, M., Solis, M., Diaz, J., Solis, A., Loera, O., & Teutli, M. M. (2013). Biotransformation of indigo carmine to isatin sulfonic acid by lyophilized mycelia from *Trametes versicolor*. *African Journal of Biotechnology*, 10(57), 12224-12231.

- Capalash, N., & Sharma, P. (1992). Biodegradation of textile azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *World journal of microbiology and biotechnology*, 8(3), 309-312.
- Castellanos May, (2013). Obtención de un Sistema de células inmovilizadas para la remoción de color de un efluente textil. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico de Merida.
- Chhabra M., Mishra S. y Sreekrishnan T., (2008). Mediator-assisted decolorization and detoxification of textile dyes/dye mixture by *Cyathusbulleri* laccase. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 151, 587-598
- Chhaya J., Thaker J., Mittal R., Nuzhat S., Mansuri A.P. y Kundu R., (2007). Influence of textile dyeing and printing industry effluent on ATPases in liver, brain, and muscle of mudskipper, *Periophthalmus dipes*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 58, 793-800
- Christie, R. M. (2003): La química del color. Zaragoza (España), Editorial Acribia, S.A.
- Coleman, R. N., & Qureshi, A. A. (1985). Microtox® and *Spirillum volutans* tests for assessing toxicity of environmental samples. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 35(1), 443-451.
- Cortazar M. A., González C. A., Coronel C., Escalante J. A., Castro J., y Villagómez J. R. (2012). Biotecnología aplicada a la degradación de colorantes de la industria textil. *Universidad y ciencia*, 28(2), 187-199.
- Couto, S. R., Gundín, M., Lorenzo, M., y Sanromán, M. Á. (2002). Screening of supports and inducers for laccase production by *Trametes versicolor* in semi-solid-state conditions. *Process Biochemistry*, 38 (2), 249-255.
- Dąbrowski, A. (2001). Adsorption from theory to practice. *Advances in colloid and interface science*, 93 (1), 135-224
- Dias, A.A., Sampaio, A., Bezerra, R.M., (2007). Environmental applications of fungal and plant systems: decolourisation of textile wastewater and related

- dyestuffs. In: Singh, S.N., Tripathi, R.D., Environmental Bioremediation Technologies. Springer Heidelberg, Berlin, 445-463.
- Enayatzamir, K., Alikhani, H. A., & Couto, S. R. (2009). Simultaneous production of laccase and decolouration of the diazo dye Reactive Black 5 in a fixed-bed bioreactor. *Journal of hazardous materials*, 164(1), 296-300.
 - Fernández-Fueyo, E., Castanera, R., Ruiz-Dueñas, F. J., López-Lucendo, M. F., Ramírez, L., Pisabarro, A. G., & Martínez, A. T. (2014). Ligninolytic peroxidase gene expression by *Pleurotus ostreatus*: differential regulation in lignocellulose medium and effect of temperature and pH. *Fungal Genetics and Biology*, 72, 150-161.
 - Ferreira, V. S., Magalhães, D. B., Kling, S. H., Da Silva Jr, J. G., y Bon, E. P. (2000). N-demethylation of Methylene Blue by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. In Twenty-First Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals (pp. 255-265). Humana Press.
 - Forgacs, E., Cserhati, T., & Oros, G. (2004). Removal of synthetic dyes from wastewaters: a review. *Environment international*, 30(7), 953-971.
 - Fu, Y., Viraraghavan, T., (2002). Removal of Congo Red from an aqueous solution by fungus *Aspergillus niger*. *Advan. Environ. Res.* 7, 239–247
 - Gadd, G. M. (2009). "Biosorption: critical review of scientific rationale, environmental importance and significance for pollution treatment." *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 84(1): 13-28.
 - Gago-Dominguez M, Castelao J E, Yuan J M, Ross R K, and Yu M C (2002). Lipid peroxidation: a novel and unifying concept of the etiology of renal cell carcinoma (United states). *Cancer Causes Control* 13: 287-293.
 - Garg, V. K., Kumar, R., y Gupta, R. (2004). Removal of malachite green dye from aqueous solution by adsorption using agro-industry waste: a case study of *Prosopis cineraria*. 62(1), 1-10.
 - Gavril M. y Hodson P., (2007). Chemical evidence for the mechanism of the biodecoloration of Amaranth by *Trametes versicolor*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23,103–124, 2007.

- González, T., Terrón, M. C., Yagüe, S., Zapico, E., Galletti, G. C., y González, A. E. (2000). Pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry monitoring of fungal-biotreated distillery wastewater using *Trametes* sp. I-62 (CECT 20197). *Rapid communications in mass spectrometry*, 14(15), 1417-1424.
- Guaratini, C. C., y Zanoni, M. V. B. (2000). Corantes têxteis. *Química nova*, 23(1), 71-78.
- Imran, M., Crowley, D. E., Khalid, A., Hussain, S., Mumtaz, M. W., y Arshad, M. (2015). Microbial biotechnology for decolorization of textile wastewaters. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 14(1), 73-92.
- Iqbal M, Bhatti IA, Zia-ur-Rehman M, Bhatti HN, Shahid M (2014). Application of bioassays to evaluate the efficiency of advanced oxidation processes for the detoxification of industrial effluents. *Asian J Chem* 26:4291–4296.
- Ireta, E. (2010). Establecimiento de las condiciones de cultivo para a producción de enzimas celulasas, pectinasas y lacasas. Tesis de licenciatura. Instituto Tecnológico de Merida
- Kalaiarasi, K., Lavanya, A., Amsamani, S., y Bagyalakshmi, G. (2012). Decolourization of textile dye effluent by non-viable biomass of *Aspergillus fumigatus*. *Brazilian archives of biology and technology*, 55(3), 471-476.
- Kahraman, S., Kuru, F., Dogan, D., y Yesilada, O. (2012). Removal of indigo carmine from an aqueous solution by fungus *Pleurotus Ostreatus*. *Archives of Environmental Protection*, 38(3), 51-57.
- Kaushik, P., & Malik, A. (2009). Fungal dye decolourization: recent advances and future potential. *Environment International*, 35(1), 127-141.
- Kettle, A. J., Clark, B. M., & Winterbourn, C. C. (2004). Superoxide Converts Indigo Carmine to Isatin Sulfonic Acid Implications for the hypothesis that neutrophils produce ozone. *Journal of Biological Chemistry*, 279(18), 18521-18525.

- Khelifi, E., Ayed, L., Bouallagui, H., Touhami, Y., y Hamdi, M. (2009). Effect of nitrogen and carbon sources on Indigo and Congo red decolourization by *Aspergillus alliaceus* strain 121C. *Journal of hazardous materials*, 163(2), 1056-1062.
- Kim, T. H., Lee, Y., Yang, J., Lee, B., Park, C., y Kim, S. (2004). Decolorization of dye solutions by a membrane bioreactor (MBR) using white-rot fungi. *Desalination*, 168, 287-293.
- Knapp, J. S., Newby, P. S., y Reece, L. P. (1995). Decolorization of dyes by wood-rotting basidiomycete fungi. *Enzyme and Microbial Technology*, 17(7), 664-668.
- Kumar, M. N. R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and functional polymers*, 46(1), 1-27.
- Kyzas, G. Z., Bikiaris, D. N., Kostoglou, M., y Lazaridis, N. K. (2013). Decolorization of Dyeing Wastewater Using Polymeric Absorbents-An Overview. INTECH Open Access Publisher.
- Lárez C. (2006). Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en Química*. 1:15-21.
- Li, H. X., Xu, B., Tang, L., Zhang, J. H., y Mao, Z. G. (2015). Reductive decolorization of indigo carmine dye with *Bacillus* sp. MZS10. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 103, 30-37.
- Longhinotti, E., Pozza, F., Furlan, L., Sanchez, M. D. N. D. M., Klug, M., Laranjeira, M., y Fávere, V. T. (1998). Adsorption of anionic dyes on the biopolymer chitin. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 9(5), 435-440.
- Mathur N., Krishnatrey R., Sharma S. y Sharma K.P., (2003). Toxic effects of textile printing industry effluents on liver and testes of albino rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 71:453–457.
- Maurya, N. S., Mittal, A. K., Cornel, P., y Rother, E. (2006). Biosorption of dyes using dead macro fungi: effect of dye structure, ionic strength and pH. *Bioresource technology*, 97(3), 512-521

- McMullan G, Meehan C, Conneely A, Kirby N, Robinson T, Nigam P, Banat IM, Marchant R, Smyth WF. *Appl Microbiol Biotechnol* 2001;56:81
- Medina, E. (2000). Aislamiento y selección de hongos ligninolíticos termofílicos a partir de desechos de Madera. Tesis de licenciatura Instituto Tecnológico de Mérida.
- Mishra S. and Bisaria V.S. (2007). Decolorization and detoxification of textiles dyes and black liquor by laccase of *Cyathus bulleri*. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 66: 684-688.
- Moussavi, G., y Mahmoudi, M. (2009). Removal of azo and anthraquinone reactive dyes by using MgO nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials*, 168, 806–812
- No, H. K., y Meyers, S. P. (1989). Crawfish chitosan as a coagulant in recovery of organic compounds from seafood processing streams. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37(3), 580-583
- Nyanhongo, G. S, Gomes, J., Gübitz, G. M., Zvauya, R., Read, J., y Steiner, W. (2002). Decolorization of textile dyes by laccases from a newly isolated strain of *Trametes modesta*. *Water Research*, 36(6), 1449-1456.
- Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology advances*, 22(3), 189-259.
- Prachi K, Anushree M. (2008). Fungal dye decoloration: Recent advances and future potencial. *Environment International*. 35, 127-141.
- Pointing, S. (2001). Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57(1-2), 20-33
- Prigione, V., Tigini, V., Pezzella, C., Anastasi, A., Sannia, G., y Varese, G. C. (2008). Decolourisation and detoxification of textile effluents by fungal biosorption. *Water Research*, 42(12), 2911-2920.
- Quintero, L., & Cardona, S. (2010). Technologies for the decolorization of dyes: indigo and indigo carmine. *Dyna*, 77(162), 371-386.

- Quintero, J., Cardona, M., y Osorio, J. (2013). Degradación de colorantes industriales con hongos ligninolíticos. *Revista Facultad de Ingeniería*, (48), 27-37.
- Radhika, R., Jebapriya, G. R., y Gnanadoss, J. J. (2014). Decolourization of synthetic textile dyes using the edible mushroom fungi *Pleurotus*. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 17(2), 248.
- Rajaguru P, Fairbairn L J, Ashby J, Willington M A, Turner S, Woolford L A, Chinnasamy N, and Rafferty J A (1999). Genotoxicity studies on the azo dye Direct Red 2 using the in vivo mouse bone marrow micronucleus test. *Mutation Research/Genetic Toxicol Environ Mutagenesis* 444: 175-180.
- Ramírez-Coutiño, L., del Carmen Marín-Cervantes, M., Huerta, S., Revah, S., y Shirai, K. (2006). Enzymatic hydrolysis of chitin in the production of oligosaccharides using *Lecanicillium fungicola* chitinases. *Process Biochemistry*, 41(5), 1106-1110.
- Ramsay J. y Nguyen T., 2002. Decoloration of textile dyes by *Trametes versicolor* and its effect on dye toxicity. *Biotechnol. Lett.*, **24**, 1757–1761.
- Rinaudo M (2006) Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress Polymer Science*. 31: 603-632.
- Ravi Kumar, M. N. V., Sridhari, TR, Bhavani, KD, y Dutta, PK. (1998). Trends in color removal from textile mill effluents. *Colorage*, 40, 25-34
- Razak MA, Reddy BR, Pallavi H (2015). Influence of different factors on adsorption of textiles dyes by the dead mycelia of *Aspergillus niger* In: *New Horizons in Biotechnology*. (Ed. Viswanath B and Indravathi G) Paramount Publishing House, India, pp. 015 – 022
- Robinson, T, McMullan, G, Marchant, R, y Nigam, P. (2001). Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative. *Bioresour. Technol.*, 77, 247-255.

- Rodriguez, E., Pickard, M. A., y Vazquez-Duhalt, R. (1999). Industrial dye decolorization by laccases from ligninolytic fungi. *Current microbiology*, 38(1), 27-32.
- Sandoval Torres, M. E. (2006). Potencial biotecnológico del hongo BAM II para la producción de lacasas y su uso en la decoloración de efluentes textiles. Mérida, Yucatán; México. Tesis de maestría.
- Saraswathi, K., y Balakumar, S. (2009). Biodecolourization of azo dye (pigmented red 208) using *Bacillus firmus* and *Bacillus laterosporus*. *Journal of Bioscience and Technology*, 1, 1-7.
- Savin, I. I., & Butnaru, R. (2008). Wastewater characteristics in textile finishing mills. *Environmental engineering and management journal*, 7(6), 859-864.
- Selvam, K. y M. S. Priya (2012). "Biological treatment of Azo dyes and textile industry effluent by newly isolated White rot fungi *Schizophyllum commune* and *Lenzites eximia*." *International journal of Environmental sciences* 2(4): 1926-1935.
- Seyis, I., y Subasioglu, T. (2008). Comparison of live and dead biomass of fungi on decolorization of methyl orange. *African Journal of Biotechnology*, 7(12).
- Shahvali, M., Assadi, M. M., y Rostami, K. (2000). Effect of environmental parameters on decolorization of textile wastewater using *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioprocess Engineering*, 23(6), 721-726.
- Si, J., Peng, F., & Cui, B. (2013). Purification, biochemical characterization and dye decolorization capacity of an alkali-resistant and metal-tolerant laccase from *Trametes pubescens*. *Bioresource technology*, 128, 49-57.
- Singh, G., Capalash, N., Goel, R., & Sharma, P. (2007). A pH-stable laccase from alkali-tolerant γ -proteobacterium JB: purification, characterization and indigo carmine degradation. *Enzyme and Microbial Technology*, 41(6), 794-799.

- Slokar, Y. M., y Le Marechal, A. M. (1998). Methods of decoloration of textile wastewaters. *Dyes and pigments*, 37(4), 335-356.
- Smith J. E., Rowan N. J., Sullivan R. (2002). Medicinal mushrooms: a rapidly developing are of biotechnology for cáncer therapy and others bioactivities. *Biotechnol.*97:1377-1381
- Soares Graça M B, Amorim M T P, Oliveira-Campos A M, Hrdina R, and Costa-Ferreira M (2002). Specificity of phenolic diazo dyes in relation to transformation by laccase. *Enzyme Microb Technol* 30: 607-612
- Songulashvili, G., Elisashvili, V., Wasser, S., Nevo, E., y Hadar, Y. (2006). Laccase and manganese peroxidase activities of *Phellinus robustus* and *Ganoderma adspersum* grown on food industry wastes in submerged fermentation. *Biotechnology letters*, 28(18), 1425-1429.
- Srikanlayanukul M. and Kitwechkun W. (2008). Decolorization of Orange II by immobilized thermotolerant white rot fungus *Coriolus versicolor* RC3 in packed-bed reactor. *Biotechnology*. 7: 280-286.
- Swamy, J., y Ramsay, J. A. (1999). The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes. *Enzyme and Microbial Technology*, 24(3), 130-137.
- Tapia T. R., Pérez B., Rojas H., Cortes V., Rivera M., Solís S (2011). New laccase producing fungi isolates with biotechnological potential in dye decolorization. *Afr. J. Biotechnol.* 10:10134-10142
- Tatarko, M., Bumpus, J.A., (1998). Biodegradation of Congo red by *Phanerochaetae chrysosporium*. *Wat. Res.* 32, 1713–1717.
- Tian, C. E., Tian, R., Zhou, Y., Chen, Q., & Cheng, H. (2013). Decolorization of indigo dye and indigo dye-containing textile effluent by *Ganoderma weberianum*. *African Journal of Microbiology Research*, 7(11), 941-947.
- Ulson de Souza S., Forgiarini E. y Ulson de Souza A., 2007. Toxicity of textile dyes and their degradation by the enzyme horseradish peroxidase (HRP). *J. Hazard. Mat.*, 147, 1073–1078.

- Vanhulle S, (2006). White Rot Fungi in Bioremediation of Dyes. Sophie Tesis de doctorado en Ciencias Químicas. Universidad de Louvain, Bélgica.
- Vanhulle, S., Trovaslet, M., Enaud, E., Lucas, M., Sonveaux, M., Decock, C. and Corbisier, A. M. (2008). Cytotoxicity and genotoxicity evolution during decolorization of dyes by White Rot Fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(3), 337-344.
- Verma D. K., Banik R. M. (2005). Decolorization of triphenylmethane dyes using immobilized fungal biomass. School of Biochemical Engineering, Institute of Technology, Banaras Hindu University, Varanasi. - 221005, India
- Wang, B. E., Hu, Y. Y., Xie, L., y Peng, K. (2008). Biosorption behavior of azo dye by inactive CMC immobilized *Aspergillus fumigatus* beads. *Bioresource Technology*, 99(4), 794-800.
- Weisburger, J. H. (2002). Comments on the history and importance of aromatic and heterocyclic amines in public health. *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 506, 9-20.
- Yagub, M. T., Sen, T. K., Afroze, S., & Ang, H. M. (2014). Dye and its removal from aqueous solution by adsorption: a review. *Advances in colloid and interface science*, 209, 172-184.
- Yagüe, S., Terrón, M. C., González, T., Zapico, E., Bocchini, P., Galletti, G. C., y González, A. E. (2000). Biotreatment of tannin-rich beer-factory wastewater with white-rot basidiomycete *Coriolopsis gallica* monitored by pyrolysis/gas chromatography/mass spectrometry. *Rapid Communications in mass spectrometry*, 14(10), 905-910.
- Yesilada, O., Asma, D., y Cing, S. (2003). Decolorization of textile dyes by fungal pellets. *Process Biochemistry*, 38(6), 933-938.
- Yesilada, O., Yildirim, S. C., Birhanli, E., Apohan, E., Asma, D., and Kuru, F. (2010). The evaluation of pre-grown mycelial pellets in decolorization of textile dyes during repeated batch process. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(1), 33-39.

- Younes, S. B., & Sayadi, S. (2013). Detoxification of Indigo carmine using a combined treatment via a novel trimeric thermostable laccase and microbial consortium. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 87, 62-68.
- Zapata Castillo, (2011). Obtención, Purificación y Modificación Química de una Lacasa de *Trametes hirsuta* Bm-2. Tesis de Doctorado en Ciencias de los Alimentos y Biotecnología. Instituto Tecnológico de Mérida
- Zhang Z, Schwartz S, Wagner L and Miller W (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *Journal of Computational Biology*. 7 (1-2): 203-214.
- Zhang, Sj; Yang, M; Yang, Qx; Zhang, Y; Xin, Bp; Pan, F., (2003). Biosorption of reactive dyes by the mycelium pellets of a new isolate of *Penicillium oxalicum*. *Biotechnology letters* 25(17): 1479-1482
- Zollinger, H. (2003). *Color chemistry: syntheses, properties, and applications of organic dyes and pigments*. John Wiley & Sons.