



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

**EVALUACIÓN DEL PORCENTAJE DE REMOCIÓN DE
COLORANTE NEGRO REACTIVO 5, EN AGUAS RESIDUALES
DEL CURTIDO DE PIELS, UTILIZANDO 2 HONGOS
LIGNOLÍTICOS.**

TRABAJO DE TITULACIÓN

TIPO: PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Presentado para optar al grado académico de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL

AUTORA: JOHANNA GABRIELA MEDINA MORENO

TUTORA: DRA. JENNY MARINA MORENO MORA

Riobamba-Ecuador

2018

©2018, Johanna Gabriela Medina Moreno

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

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE CIENCIAS QUÍMICAS

El tribunal de Trabajo de Titulación certifica que: El trabajo de investigación: **EVALUACIÓN DEL PORCENTAJE DE REMOCIÓN DE COLORANTE NEGRO REACTIVO 5, EN AGUAS RESIDUALES DEL CURTIDO DE PIELES, UTILIZANDO 2 HONGOS LIGNOLÍTICOS**, de responsabilidad de la señorita Johanna Gabriela Medina Moreno, minuciosamente revisado por los miembros del Tribunal de Trabajo de Titulación, quedando autorizada su presentación.

FIRMA

FECHA

Dra. Jenny Marina Moreno Mora

DIRECTOR DE TRABAJO

DE TITULACIÓN

Dra. Yolanda Dolores Díaz Heredia

MIEMBRO DEL TRIBUNAL

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo, Johanna Gabriela Medina Moreno soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este Trabajo de Titulación y el patrimonio intelectual del Trabajo de Titulación pertenece a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.

Johanna Gabriela Medina Moreno

DEDICATORIA

A mis padres Pedro y Yolanda por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en mi educación, tanto académica, como de la vida, por su incondicional apoyo mantenido a través del tiempo, a mis hermanas Carolina y Nicole, a mis tíos Nicolás y Rosa, y a todas aquellas personas que me acompañaron en mi vida estudiantil.

Gabriela

AGRADECIMIENTO

A Dios y la Virgen Inmaculada que me han brindado fortaleza para culminar esta etapa estudiantil, a mis padres que me motivaron durante este proceso gracias por su apoyo incondicional y paciencia. A mis amigos, técnicos docentes de Laboratorio, docentes de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo que ayudaron a la realización de esta investigación

Gabriela

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	xiv
SUMMARY	xiv
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	
1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL	4
1.1. Antecedentes de la investigación	4
1.2. Marco conceptual	6
1.2.1. Biorremediación	6
1.3. Hongos de podredumbre blanca	7
1.3.1. <i>Pleurotus ostreatus</i>	7
1.3.1.1. <i>Clasificación taxonómica</i>	8
1.3.2. <i>Aspergillus niger</i>	9
1.3.2.1. <i>Clasificación taxonómica</i>	10
1.4. Colorantes textiles	11
1.4.1. <i>Clasificación de los colorantes</i>	11
1.4.2. <i>Estructura química de un colorante</i>	12
1.4.2.1. <i>Grupo cromóforo</i>	12
1.4.2.2. <i>Grupo auxocromo</i>	13
1.4.3. <i>Colorante negro reactivo 5</i>	13
1.5. Impacto ambiental de los colorantes textiles	14
1.5.1. <i>Mecanismos para la remoción de colorantes</i>	15
1.5.1.1. <i>Tratamientos enzimáticos</i>	15
1.5.1.2. <i>Reactores anaerobios</i>	15
1.5.1.3. <i>Procesos de oxidación avanzada</i>	15
1.5.1.4. <i>Técnicas electroquímicas</i>	15
1.5.2. <i>Mecanismos biológicos para la remoción y degradación de colorantes</i>	16

1.6.	Curtido de pieles	17
1.7.	Aguas residuales en la industria de la curtiembre	18
1.7.1.	Composición general	19

CAPÍTULO II

2.	MARCO METODOLÓGICO EXPERIMENTAL	24
2.1.	Hipótesis y variables	24
2.1.1.	<i>Hipótesis</i>	24
2.1.2.	<i>Variables</i>	24
2.1.2.1.	<i>Variable dependiente</i>	24
2.1.2.2.	<i>Variables independientes</i>	24
2.2.	Tipo y Diseño de Investigación	24
2.3.	Diseño experimental	25
2.4.	Unidad de análisis	25
2.5.	Población de estudio	25
2.6.	Tamaño de la muestra	25
2.7.	Selección de la muestra	25
2.8.	Técnicas de recolección de datos	26
2.8.1.	<i>Localización y descripción del lugar</i>	26
2.8.2.	<i>Muestreo</i>	26
2.8.3.	<i>Caracterización de parámetros físico-químicos y microbiológicos.</i>	27
2.9.	Microorganismo de estudio <i>Pleurotus ostreatus</i>	28
2.9.1.	<i>Desarrollo del protocolo de inmovilización</i>	28
2.9.2.	<i>Selección del método o protocolo de inmovilización para la biomasa fúngica</i>	28
2.9.3.	<i>Inmovilización utilizando discos de agar con hongo crecido en soporte vegetal <i>Luffa cylindrica</i>.</i>	28
2.9.4.	<i>Biomasa del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> utilizando como soporte vegetal <i>Luffa cylindrica</i>.</i>	29
2.9.5.	<i>Masificación de <i>Pleurotus ostreatus</i> utilizando como soporte el trigo</i>	29
2.9.6.	<i>Biomasa del hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> utilizando como soporte el trigo</i>	30

2.10.	Microorganismo de estudio <i>Aspergillus niger</i>	30
2.10.1.	Obtención del <i>Aspergillus niger</i> a partir de varios sustratos	30
2.10.2.	Aislamiento del hongo <i>Aspergillus niger</i>	30
2.10.3.	Purificación del hongo <i>Aspergillus niger</i>	31
2.10.4.	Desarrollo del protocolo de masificación	31
2.10.5.	Selección del método o protocolo de masificación de la biomasa fúngica	31
2.10.6.	Método para cuantificar esporas del hongo <i>Aspergillus niger</i>	31
2.10.6.1.	Preparación de la solución Tween 80 al 0,1%	30
2.10.6.2.	Conteo de las esporas en cámara de Neubauer improved	31
2.10.7.	Identificación y mantenimiento del hongo <i>Aspergillus niger</i>	33
2.10.7.1.	Identificación del hongo <i>Aspergillus niger</i>	33
2.10.7.2.	Mantenimiento del hongo <i>Aspergillus niger</i>	33
2.11.	Inoculación del agua residual	33
2.12.	Caracterización del colorante negro reactivo 5 (CNR5)	34
2.12.1.	Curva de calibración	35
2.13.	Determinación de la concentración mínima inhibidora (CMI)	35
2.14.	Control de crecimiento microbiano	35

CAPÍTULO III

3.	MARCO DE RESULTADOS	37
3.1.	Resultados, análisis y discusión	37
3.1.1.	Caracterización de parámetros físico-químicos y microbiológicos	37
3.1.2.	Identificación macroscópica y microscópica	38
3.1.2.1.	<i>Pleurotus ostreatus</i>	38
3.1.2.2.	<i>Aspergillus niger</i>	40
3.2.	Biomasa de <i>Pleurotus ostreatus</i>	41
3.2.1.	Determinación de peso húmedo	41
3.2.2.	Determinación de peso seco	42
3.3.	Conteo de esporas	44
3.3.1.	Preparación del inóculo de <i>Aspergillus niger</i>	44

3.4.	Preparación del baño de efluente	45
3.5.	Cinéticas de remoción de colorantes textiles por tratamientos biológicos	45
3.6.	Evaluación del porcentaje de decoloración	46
3.6. 1..	<i>Eficiencia del colorante negro reactivo 5</i>	48
3.6.2.	<i>Control crecimiento microbiano</i>	59
	CONCLUSIONES	60
	RECOMENDACIONES	62
	BIBLIOGRAFÍA	
	ANEXOS	

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1: Taxonomía de <i>Pleurotus ostreatus</i>	8
Tabla 2-1: Taxonomía de <i>Aspergillus niger</i>	10
Tabla 3-1: Microorganismos utilizados en el tratamiento de colorantes y su mecanismo de acción para la decoloración.....	17
Tabla 4-1: Características de los efluentes de curtiembre.....	19
Tabla 1-2: Diseño experimental.....	24
Tabla 2-2: Análisis físico químicos y microbiológicos.....	26
Tabla 3-2: Elaboración del Caldo Papa y Dextrosa.....	30
Tabla 1-3: Caracterización físico- química y microbiológica del agua residual dilución 1-100 (v/v).....	36
Tabla 2-3: Características macroscópicas de <i>Pleurotus ostreatus</i>	37
Tabla 3-3: Características microscópicas de <i>Pleurotus ostreatus</i>	38
Tabla 4-3: Características macroscópicas de <i>Aspergillus niger</i>	39
Tabla 5-3: Características microscópicas de <i>Aspergillus niger</i>	39
Tabla 6-3: Resultados de la biomasa inmovilizada utilizando el tratamiento PL.....	42
Tabla 7-3: Resultados conteo de esporas.....	43
Tabla 8-3: Resultados porcentaje de remoción del colorante NR5.....	46
Tabla 9-3: Pruebas t muestras relacionadas.....	48
Tabla 10-3: Estadísticos de muestras relacionadas.....	49
Tabla 11-3: Correlaciones de muestras relacionadas.....	49
Tabla 12-3: Diferencias relacionadas respecto a los días.....	51
Tabla 13-3: Control crecimiento microbiano.....	59

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1: Macroscópica <i>Pleurotus ostreatus</i>	8
Figura 2-1: Microscópica <i>Pleurotus ostreatus</i>	9
Figura 3-1: Macroscópica <i>Aspergillus niger</i>	9
Figura 4-1: Microscópica de <i>Aspergillus niger</i>	10
Figura 5-1: Grupos cromóforos.....	12
Figura 6-1: Grupos auxocromos.....	13
Figura 7-1: Estructura química del colorante negro reactivo 5.....	14
Figura 8-1: Esquema proceso de producción cueros curtidos.....	21
Figura 1-3: Hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> macroscópica.....	46
Figura 2-3: Hongo <i>Pleurotus ostreatus</i> microscópica.....	46
Figura 3-3: Hongo <i>Aspergillus niger</i> macroscópica.....	47
Figura 4-3: Hongo <i>Aspergillus niger</i> microscópica.....	48
Figura 5-3: Masificación de <i>Aspergillus niger</i>	52
Figura 6-3: Inmovilización de <i>Pleurotus ostreatus</i> con <i>Luffa cylindrica</i>	53

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1-3: Espectro de absorción UV/VIS para el colorante NR5.....	34
Gráfico 2-3: Concentración de CNR5 vs Tratamiento <i>Pleurotus ostreatus</i>	50
Gráfico 3-3: Concentración de CNR5 vs Tratamiento <i>Aspergillus niger</i>	51
Gráfico 4-3: Concentración de CNR5 vs Tiempo.....	52
Gráfico 5-3: Porcentaje de decoloración vs Tratamientos aplicados.....	53
Gráfico 6-3: DBO ₅ vs Tratamientos aplicados.....	55
Gráfico 7-3: DQO vs Tratamientos aplicados.....	56
Gráfico 8-3: Oxígeno disuelto vs Tratamientos aplicados.....	57
Gráfico 9-3: Sólidos totales vs Tratamientos aplicados.....	58
Gráfico 10-3: pH vs Tratamientos aplicados.....	59

RESUMEN

Esta investigación evaluó el porcentaje de remoción del colorante negro reactivo 5 de las aguas residuales del Laboratorio de Curtición de Pieles de la ESPOCH utilizando 2 hongos lignolíticos. Tratando la fuerte coloración de los residuos de colorante negro reactivo 5 (CNR5) que imparten a los medios de descarga llegando a suprimir los procesos fotosintéticos en los cursos de agua, empleando los hongos de podredumbre blanca: *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger*, especies que se caracterizan por su capacidad de remover colorantes. Se establecieron dos tratamientos a tres concentraciones diferentes de CNR5 de 100,150,200 ppm: P (*Pleurotus ostreatus* + Agua residual), A (*Aspergillus niger* + Agua residual), y un control con agua residual sin inoculación de esporas, *Pleurotus ostreatus* inmovilizado en *Luffa cylindrica* y *Aspergillus niger* en solución de esporas; se inocularon ajustando una concentración de 3×10^6 esporas/ml, realizándose cada tratamiento por triplicado, con un total de 27 unidades experimentales; el tiempo de experimentación fue de 18 días controlándose la concentración de CNR5 a los 1,9,18 días. Al término de la experimentación se midieron: demanda química de oxígeno (DQO), demanda biológica de oxígeno (DBO₅), sólidos totales (ST), sólidos suspendidos (SS), oxígeno disuelto (OD). Los tratamientos P6 y A1; redujeron el colorante negro reactivo 5 en un 90,93% y 88,45% respectivamente mostrándose que, P6 se tuvo mayor reducción de la concentración de CNR5. Por lo tanto, el uso de estos hongos constituye una alternativa viable para el tratamiento de aguas residuales del curtido de pieles, recomendando emplear otros residuos de plantas que posean cantidades significativas de lignina.

Palabras clave: <BIORREMEDIACIÓN>, <MICROBIOLOGÍA>, <TRATAMIENTO DE AGUAS RESIDUALES>, <COLORANTE NR5>, <CURVA DE CALIBRACIÓN>, <HONGO (*Aspergillus niger*)>, <HONGO (*Pleurotus ostreatus*)>.

ABSTRACT

This investigative work evaluated the percentage of removal of the reactive black dye 5 from the wastewater of the ESPOCH Piece Tanning Laboratory using 2 lignolite fungi.

Treating the strong coloration of the reagent black dye residues 5 (CNR5) that impart the discharge media, eliminating the photosynthetic processes in the water courses, using the white rot fungi: *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger* species, that are characterized by the ability to remove dyes. Two treatments were established at three different concentrations of CNR5 of 100,150,200 ppm: P (*Pleurotus ostreatus* + Waste water), A (*Aspergillus niger* + Waste water), and a control with residual water without inoculation of spores, *Pleurotus ostreatus* immobilized in *Luffa cylindrical* y *Apergillus niger* in solution of spores adjusting a concentration of 3×10^6 spores / ml, each treatment was made three times, total of 27 experimental units; the experimental time was 18 days and the CNR5 concentration was controlled at 1.9.18 days. After the experiment was finished, the following were measured: chemical oxygen demand (COD), biological oxygen demand (BOD), total solids (SS), dissolved oxygen (DO). Treatments P6 and A1 reduced the reactive black dye 5 in 90.93% and 88.45% respectively, showing that P6 had a greater reduction in the CNR5 concentration. Therefore, the use of these fungi is a viable alternative for the treatment of wastewater from leather tanning, I recommend using other plant residues that have significant amounts of lignin.

Keywords: BIOREAMEDIATION, MICROBIOLOGY, WASTEWATER TREATMENT, COLORANT NR5, CALIBRATION CURVE, FUNGUS (*Aspergillus niger*), FUNGUS (*Pleurotus ostreatus*).

INTRODUCCIÓN

Identificación del problema

Uno de los problemas más severos en la industria textil es la presencia de colorantes azoicos, muchos de estos compuestos son cancerígenos y producen un impacto sanitario y ambiental. Durante el proceso de la curtiembre, la etapa de coloración, ocasiona la pérdida de considerables cantidades de colorantes. Los volúmenes liberados dependen del tipo de colorante y del proceso de aplicación, variando desde un 2%, si se trata de un colorante básico, a un 50% cuando se utilizan algunos colorantes reactivos. (CEPIS Publicaciones, 1997)

El color es el principal contaminante en ser reconocido en el agua, concentraciones menores a 1ppm son altamente visibles para algunos colorantes afectando así, la estética de los cuerpos acuáticos. Sus características químicas, los hacen muy resistentes a la luz, temperatura, al ataque microbiano y por consiguiente son compuestos altamente recalcitrantes. Uno de los principales efectos de su liberación al ecosistema acuático, está asociado con la reducción de la concentración del oxígeno disuelto, generando condiciones anóxicas, que pueden afectar organismos a diferentes niveles tróficos. (Fernández, y otros, 2009).

Los procesos de curtido del Laboratorio de Curtición de Pieles de la ESPOCH descargan carga contaminante constituida por restos de carnaza, lana, derrames de cromo, ácido sulfhídrico, cal, sal, entre otros. El consumo de agua de este laboratorio es de 185 litros, utilizados en los procesos de ribera, curtido y acabado. Por lo que se requiere la optimización del recurso hídrico, disminuyendo derrames de cromo y aplicando tecnologías limpias. (Flores, 2015).

Por tal razón es preciso formularse la pregunta central del problema: ¿Qué porcentaje de remoción de colorante negro reactivo 5 permite el tratamiento con hongos lignolíticos *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger* de las aguas residuales del curtido de pieles?

Justificación

En los últimos años se ha incrementado la preocupación por la preservación del ambiente, las actividades desarrolladas por el hombre con el fin de satisfacer las necesidades de una sociedad consumista, generan productos de desecho que lo modifican de manera importante. En la industria de la curtiembre se hacen teñidos y lavados de sus materias primas desechan aguas residuales que contienen restos de colorantes, sustancias orgánicas, altos niveles de DQO, DBO₅, sólidos suspendidos, presencia de metales pesados. La mayoría de los colorantes sintéticos son tóxicos e incluso cancerígenos con el transcurso de los años.

Se han desarrollado diferentes tratamientos que reduzcan los efectos adversos que causa la contaminación, entre ellos están los sistemas convencionales para el tratamiento de efluentes textileros que son bastante eficientes en la remoción de DBO₅ y DQO sin embargo la decoloración no es muy buena y los costos de estos tratamientos son bastante altos, mediante el empleo de hongos de la podredumbre blanca *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger*, éstos microorganismos son usados para el tratamiento de efluentes textileros debido a que producen enzimas inespecíficas asociadas con la degradación de lignina que oxidan los diferentes sustituyentes y los anillos aromáticos de un colorante. (Fernández, y otros, 2009)

Esta investigación evaluará al hongo que presente la mayor capacidad de remoción de colorante negro reactivo 5, como alternativa para el tratamiento de aguas residuales disminuyendo así el problema que se genera en la industria textil al arrojar los residuos generados sin tratamiento a los efluentes creando efectos adversos en la biodiversidad acuática y en los seres humanos. La misma está enfocada de acuerdo a las líneas de investigación Biorremediación aplicada al mejoramiento de aguas y suelos, cumpliendo con el perfil profesional de la carrera de Ingeniería en Biotecnología Ambiental de la ESPOCH.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el porcentaje de remoción del colorante negro reactivo 5 de las aguas residuales del Laboratorio de Curtición de Pieles de la ESPOCH utilizando 2 hongos lignolíticos.

Objetivos específicos

- Caracterizar físico, química y microbiológicamente el agua residual del Laboratorio de Curtición de Pieles de la ESPOCH, proveniente de la etapa de tinturado.
- Determinar la capacidad de degradación de *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger* del colorante negro reactivo 5 en aguas residuales del Laboratorio de Curtición de Pieles de la ESPOCH a escala de laboratorio.
- Establecer las unidades experimentales con el uso del hongo con mayor capacidad de degradación en el agua de curtiembre.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO REFERENCIAL

1.1. Antecedentes de la investigación

Para los investigadores Jorge Fernández, Lina Henao, Aura Pedroza, Balkys Quevedo; la presencia de colorantes azoicos en aguas residuales de la industria textil es un problema ambiental y sanitario, porque numerosos de estos compuestos son cancerígenos. Los tratamientos biológicos son una alternativa para la remoción de ese tipo de colorantes. Donde evaluaron el efecto de tres hongos de podredumbre blanca, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* y *Phanerochaete chrysosporium* sobre la decoloración del colorante negro reactivo 5 (CNR5), ampliamente usado en la industria textil.

Se estudió la inmovilización de estos hongos en dos soportes, espuma de poliuretano y la planta estropajo (*L. cylindrica*), para seleccionar el mejor soporte y el hongo con mayor capacidad para la decoloración. Ambos soportes fueron igualmente efectivos, pero se seleccionó estropajo vegetal (*L. cylindrica*), por ser un producto natural. El hongo que generó los mayores porcentajes de decoloración en 15 días fue *Trametes versicolor*, con 96%, 98% y 98% para agua con concentración de NR5 300 ppm, 150 ppm y 75 ppm, respectivamente.

Los investigadores también mencionan que, utilizar la biomasa viable e inactiva de los hongos lignolíticos que crecen sobre la madera ayuda significativamente a la remoción de colorantes textiles con este grupo de microorganismos se puede llevar a cabo como proceso activo dependiente del metabolismo, también conocidos como bioacumulación y reacciones de óxido–reducción asociadas con enzimas o de forma pasiva independiente del metabolismo por medio de quelación, quimiosorción, complejación y bioadsorción. Es por esto que producir grandes cantidades de biomasa empleando subproductos agroindustriales permite utilizarla como bioadsorbente natural, económico y de fácil obtención. (Gómez-Bertel, y otros, 2008).

Los tratamientos físicos y químicos para remover los colorantes son ineficientes o costosos y la tendencia actual es combinarlos con microorganismos que pueden degradar estas moléculas sintéticas los colorantes que se emplean en la industria textil, se eligen no solo por la variedad de colores que brindan, sino por la estabilidad química, durante el proceso de tintura una parte

de los colorantes es vertida a los efluentes generalmente sin ningún tratamiento previo. (Salcedo, 2009). El impacto negativo de estos colorantes está asociado principalmente a la alteración de los procesos fotosintéticos del fitoplancton, afectando gravemente el equilibrio de los ecosistemas acuíferos en los que son vertidos.

Existen diferentes clases de colorantes sintéticos y vegetales que son empleados en diferentes industrias principalmente la textil. Entre el 2 y 50% de estos colorantes forman parte de las aguas residuales y se consideran como contaminantes persistentes que no pueden removerse con los métodos convencionales empleados en el tratamiento de aguas. Los colorantes están formados por un grupo de átomos responsables del color denominados cromóforos, los más comunes son los azo (-N=N-), carbonilo (C=O), metilo (-CH₃), nitro y grupos quinoides. (Castro, y otros, 2011).

Los colorantes reactivos son sustancias de estructuras no saturadas, orgánicas solubles en agua se preparan comercialmente para tener uno o dos átomos de cloro que reaccionen con la celulosa formando enlaces covalentes con los grupos nucleófilos de la fibra. El colorante negro reactivo 5 se caracteriza por ser un di-azo sulfónico compuesto por un complejo cromóforo-auxocromo, constituido por el grupo azo y anillos aromáticos unidos al colorante, esta interacción es la que determina la cantidad de luz absorbida y la intensidad del color. (Cervantes, y otros, s.f.).

Los hongos verdaderos se agrupan en el Reino Fungi o Eumycota y son organismos eucariotas heterótrofos que presentan su material genético estructurado en cromosomas, digestión extracelular y nutrición saprófita, algunos son unicelulares pero la mayoría son pluricelulares, de aspecto comúnmente filamentoso y con paredes celulares compuestas de quitina y β -glucanos, presentan ribosomas 80S y producen esporas en alguna etapa de su ciclo vital (Salcedo, 2009). Los hongos que crecen sobre la corteza vegetal despolimerizan y mineralizan la lignina, accediendo a los carbohidratos de la celulosa y la hemicelulosa. Esta capacidad se ha aprovechado para desarrollar sistemas biológicos direccionados a tratar contaminantes de alta estabilidad, como los colorantes sintéticos textiles. (Chanagá, y otros, 2012).

1.2. Marco conceptual

1.2.1. Biorremediación

Para (Araujo, y otros, 2016) citados en (Corton, y otros, 2006) la biorremediación puede definirse como la respuesta biológica al abuso ambiental, permite distinguir entre el uso de microorganismos para recuperar áreas contaminadas y para tratamientos de residuos tanto sólidos, líquidos o gases. El objetivo de la biorremediación es erradicar, o reducir la concentración de sustancias latentemente tóxicas, disipadas en suelos y/o cuerpos de agua superficial o subterránea, empleando como parte fundamental del proceso a los microorganismos (Alexander, 1994).

Es un proceso que utiliza las capacidades catalíticas propias de los organismos para degradar transformar y remover contaminantes, presenta un enorme potencial en la mitigación de la contaminación ambiental. La biorremediación se ha centrado en el aprovechamiento de la diversidad genética y variabilidad metabólica que es propia de las bacterias para transformar contaminantes en productos libres de contaminantes o, en su defecto, menos tóxicos, que pueden entonces integrarse en los ciclos biogeoquímicos. No obstante, existen casos aislados de utilización de otros tipos de organismos como, por ejemplo, los hongos y, más recientemente, las plantas (la llamada "fitorremediación" es un campo altamente prometedor). (Alkorta, y otros, 2002).

Esta técnica utiliza el potencial metabólico de los microorganismos para convertir contaminantes orgánicos en compuestos poco o nada contaminantes, la biorremediación puede darse por medio de microorganismos autóctonos del área contaminada o su vez inocular cepas o poblaciones microbianas que posea las rutas degradativas necesarias para metabolizar el contaminante a eliminar; el éxito de estas inoculaciones depende no solamente de factores abióticos como el pH, temperatura, potencial de reducción y la disponibilidad de agua y nutrientes, sino también de factores bióticos tales como la competencia microbiana, amensalismo, parasitismo y depredación que pueden limitar el crecimiento y desarrollo de las poblaciones inoculadas.

1.3. Hongos de podredumbre blanca

El empleo de hongos de pudrición blanca, como alternativa para efectuar la decoloración de efluentes y para la degradación de compuestos xenobióticos y recalcitrantes. Se hace presente en procesos de tratamiento y biorremediación los hongos de pudrición blanca poseen un sistema enzimático extracelular de carácter no específico, (Bermúdez, y otros, 2003) capaz de destruir enlaces diferentes y, por lo tanto, de degradar una gran diversidad de compuestos orgánicos. *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* y *Pleurotus spp.* Son los hongos que se han identificado con mayores condiciones para ser empleados con estos fines. (Barr, y otros, 1994).

Los hongos de pudrición blanca de la madera han mostrado gran potencial para degradar compuestos químicos recalcitrantes generalmente tóxicos como hidrocarburos poli-aromáticos, explosivos, plaguicidas, tintes, entre otros. Esta propiedad se debe principalmente a un complejo de enzimas oxidativas extracelulares que emplean naturalmente para la degradación de la lignina de la madera. (Cardona, y otros, 2009).

El crecimiento filamentoso que admite una colonización y una exploración más eficiente en suelos y aguas contaminadas, Para (Kirk, y otros, 1986) citados por (Agosin, y otros, 1990). El sistema lignolítico de estos microorganismos se desarrolla a partir del momento en que el hongo se encuentra en metabolismo secundario; además estos microorganismos tienen un sustancial conjunto de enzimas con capacidad para oxidar numerosos sustratos entre ellos una extensa diversidad de contaminantes ambientales.

1.3.1. *Pleurotus ostreatus*

Es un hongo perteneciente a la clase Basidiomycete, orden Poriales y familia Lentinaceae, su nombre deriva de su forma “ostra”, llamado también “Pleuroto en forma de concha”, “seta de ostra” o “pleuroto ostreado” (Moreno, y otros, 2008). Este microorganismo es un hongo saprófito y algunas veces parásito que crece principalmente sobre sustratos lignocelulósicos vivos o muertos, pobres en nutrientes y con bajos niveles de minerales y vitaminas. Se distribuye principalmente en zonas templadas se encuentra sobre árboles de los géneros *Aesculus*, *Betula*, *Fagus*, *Juglans*, *Populus*, etc. Este hongo crece a temperaturas de 15°C. (Taniguchi, y otros, 2005).

En los últimos años se ha empleado ampliamente en biorremediación debido al sistema lignolítico de este hongo está compuesto por múltiples enzimas capaces de oxidar, son netamente específicas capaces de metabolizar y mineralizar hidrocarburos policíclicos aromáticos y colorantes artificiales causantes de contaminación ambiental en industrias textiles entre otros. (Moreno, y otros, 2008).

1.3.1.1. Clasificación taxonómica.

Para *Pleurotus ostreatus* la taxonomía es la siguiente:

Tabla 1-1: Taxonomía de *Pleurotus ostreatus*

Taxonomía	
Reino	Fungi
Filo	Basidiomycota
Clase	Agaricomycetes
Orden	Agaricales
Familia	Pleurotaceae
Género	<i>Pleurotus</i>
Especie	<i>P. ostreatus</i>

Fuente. Adaptado de (Kumm, 1871)

Realizado por: Gabriela Medina.2018

Macroscópicamente *Pleurotus ostreatus* presenta crecimiento micelial blanco algodonoso con abundante micelio aéreo y con formación de anillos desde el centro de la caja hacia su periferia (Fernández, y otros, 2009).

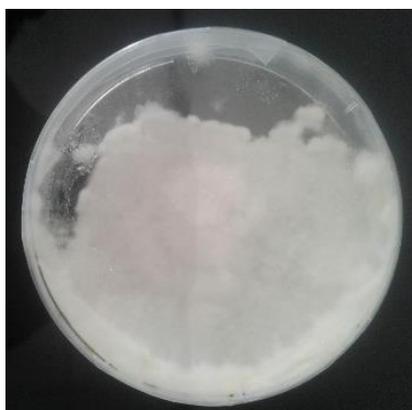


Figura 1-1: Macroscópica *Pleurotus ostreatus*

Fuente: Gabriela Medina. 2018

Microscópicamente este hongo presenta hifas hialinas septadas delgadas con formación de esporas de pequeño tamaño. (Manjón, y otros, 1986).

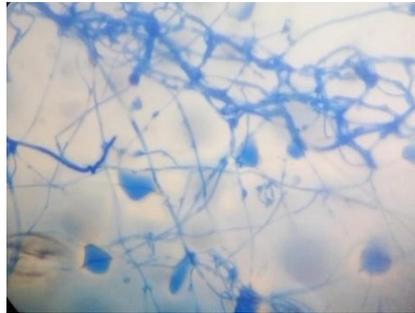


Figura 2-1: Microscópica *Pleurotus ostreatus*
Fuente: Gabriela Medina. 2018

1.3.2. Aspergillus niger

De acuerdo a (Duque, 2008) citados por (Rosas, y otros, 2015), *Aspergillus* es un hongo filamentoso del grupo Deuteromycetes u hongos imperfectos su aspecto microscópico es típico y se caracteriza por unas estructuras esporíferas o reproductoras llamadas cabezas conidiales, estas cabezas están compuestas por una vesícula rodeada por una corona de fiálides en forma de botella, en cuyo extremo se forman cadenas de esporas.

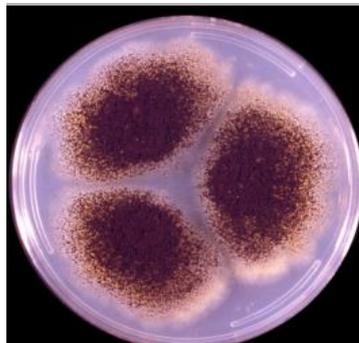


Figura 3-1: Macroscópica *Aspergillus niger*
Fuente. (Ellis, 2017)

Es una colonia con pliegues de micelio lanoso de color blanco amarillento que cambia a negro, el reverso es blanco amarillento, la producción de conidios se observa, por la presencia en la superficie del micelio de puntos negros similares a la pimienta presenta conidióforos largos y lisos y fiálides biseriadas que cubren completamente la vesícula.



Figura 4-1: Microscópica de *Aspergillus niger*
Fuente. (Patiño, s.f)

Este hongo provoca un moho negro en vegetales como: la acelga la lechuga, el tomate, también se encuentran el limón y la naranja es una de las especies más corrientes del género *Aspergillus* cultivada para la producción de: ácido cítrico, ácido glucónico enzimas: glucoamilasa, galactosidasa, etc. *Aspergillus niger* crece rápidamente en una variedad de substratos artificiales produciendo colonias que consisten de un fieltro basal blanco o amarillo cubierto por una capa densa de conidios de color castaño oscuro a negro. Las conidioesporas de esta especie son típicamente 17 de 900 - 1600 μm de longitud, paredes lisas y termina en las vesículas globosas color café pálido de 40 - 60 μm de diámetro.

1.3.2.1. Clasificación taxonómica.

Para *Aspergillus niger* su taxonomía es la siguiente.

Tabla 2-1: Taxonomía de *Aspergillus niger*

Taxonomía	
Subdivisión	Deuteromycotina
Clase	Deuteromycete
Orden	Moniliales
Familia	Moniliacea
Género	<i>Aspergillus</i>
Especie	Niger

Fuente. (Rico, 2017)

Realizado por: Gabriela Medina. 2018

En su libro (García, y otros, 1993), mencionan que; la cantidad de ácido cítrico está en relación inversa con el crecimiento celular, al inicio de la fermentación, sin embargo; se requiere un balance apropiado de nutrientes que permita la propagación adecuada del micelio. Los factores nutricionales más importantes para una producción exitosa son: la concentración, tipo de carbohidratos y el contenido de metales. Los carbohidratos deben ser simples y de fácil transportación a través de la membrana, gracias a la presencia de invertasas extracelulares

asociadas a la membrana como las hidrolasas, estas hidrolasas desdoblan la sacarosa a hexosas y son sumamente activas a las condiciones de fermentación.

1.4. Colorantes textiles

Los colorantes son sustancias que penetran y permanecen coloreando uniformemente una tela, y que pueden usarse para producir un alto grado de coloración cuando se dispersan en otros materiales o se hacen reaccionar con los mismos por medio de un proceso que destruye la estructura cristalina de la sustancia. La característica de las moléculas de un colorante es que, absorben fuertemente una radiación en la región visible del espectro de luz. (García, 2007).

1.4.1. Clasificación de los colorantes

Los colorantes se categorizan de acuerdo al índice de color (Color Index), y a su método de aplicación.

- Colorantes directos
- Colorantes reactivos
- Colorantes sulfurosos
- Colorantes dispersos
- Colorantes básicos o catiónicos
- Colorantes a la tinta
- Colorantes ácidos

Colorantes reactivos: pertenecen a los colorantes nuevos que forman enlaces covalentes con las fibras que poseen los grupos aromáticos oxhidrilo o amino. Este tipo de colorante reactivo contiene moléculas de cloro que reaccionan con los grupos oxhidrilo de la celulosa de los vegetales cuando se aplica un álcali. Establece un enlace de éter entre el colorante y la fibra. Otro tipo de colorante reactivo utiliza grupos vinilo activados, que reaccionan con un oxhidrilo celulósico en presencia de una base. Los colorantes reactivos exhiben firmeza al lavado, puesto que el colorante se adhiere de tal manera que pasa a formar parte de la fibra. Las otras propiedades dependen de la estructura de los grupos colorantes de la molécula y de los métodos usados para enlazarlos a la parte reactiva del colorante. (García, 2007).

1.4.2. Estructura química de un colorante

Los cuerpos son coloreados a través de moléculas activas llamadas cromóforos, cuya característica principal es darle el color, transformando al hidrocarburo incoloro en cromógeno, conocido como generador del color. Pero este cromógeno no es un colorante hasta que se introduce en la molécula de otro grupo de átomos llamado auxóchromos. (PASTIGRIGSBY, y otros, 1992)

1.4.2.1. Grupo cromóforo

Algunos grupos de átomos que presentan uno o más enlaces insaturados y que su presencia es la responsable de generar color al compuesto se los denomina cromóforos. Son todos aquellos compuestos que tienen electrones resonando a determinada frecuencia y por eso absorben luz y al unirse refuerzan la absorción de radiación, proviene del griego:

Cromo = color Foro = llevar

Que significa llevar el color, los cromóforos son grupos que contienen uno o varios dobles enlaces, los grupos más importantes se muestran en la siguiente figura 5-1.

PRINCIPALES GRUPOS CROMOFOROS		
—N=N—	Azo	
>C=S	Tiocarbonilo	
—N=O	Nitro	
—N=O	Nitroso	Paraquinona
—C=C—	Etilénico	
>C=O	Carbinol	
—C=N—	Azometino	
—S=S—	Disulfuro	Ortoquinona

Figura 5-1: Grupos cromóforos
Fuente: (Peñañiel, 2011)

1.4.2.2. Grupo auxocromo

Son los responsables de la fijación al sustrato a teñir, capaces de fijar la molécula del colorante y en algunos casos intensificar la labor de los cromóforos. Se derivan del griego:

Auxo = aumentar Cromos = color

Esto significa aumentar el color, al reaccionar cambian las moléculas, originando propiedades tintóreas, los grupos auxóchromos más importantes son:

GRUPOS AUXOCROMOS	
— OH	Hidróxilo
— NH ₂	Amino
— COOH	Carboxilo
$\begin{array}{l} \text{R} \\ \diagup \\ \text{—N—} \\ \diagdown \\ \text{H} \end{array}$	Amino monosustituido
$\begin{array}{l} \text{R} \\ \diagup \\ \text{—N—} \\ \diagdown \\ \text{R} \end{array}$	Amino disustituido
— CO — r	Ácido (r = radical de ácido graso)
— SO ₃ H	Sulfónico
— SR	Sulfuro

Figura 6-1: Grupos auxocromos
Fuente: (Peñañiel, 2011)

Se denomina así a aquellos grupos de átomos con carga positiva, que tienen la propiedad de intensificar la acción de un grupo cromóforo dentro de la misma molécula de una sustancia.

- El grupo cromóforo otorga color y el auxocromo lo intensifica.
- El grupo auxocromo solo no genera color.

El grupo auxocromo está compuesto por átomos o radicales libres con carga positiva que desplaza los picos de absorción de luz de los grupos insaturados (cromóforos) hacia longitudes de onda larga además de aumentar sus intensidades.

1.4.3. Colorante negro reactivo 5

Son moderadamente reactivos generalmente se aplica utilizando una mezcla de carbonato de sodio y sosa caustica, este colorante muestra excelentes propiedades de fijación bajo condición alcalina adecuada; son considerados de los mejores colorantes el colorante se fija por medio de una reacción química a la fibra mediante enlaces covalentes. Para que se pueda aplicar se

necesita que tanto la fibra como el colorante tenga grupos reactivos para establecer el enlace; no son útiles con fibras sintéticas, ya que estas normalmente no tienen centros reactivos. El (CNR5) es utilizado comúnmente en la industria textil y presenta un nivel de contaminación ambiental alto debido a que más del 15% de su contenido se descarga a las aguas residuales sin previo tratamiento, además de ser altamente tóxico. Cuya fórmula molecular es: $(C_{26}H_{25}N_5O_{19}S_{6.4}Na)$ y de nombre químico (4-amino-5-hidroxi-3,6-bis [[4-[[2-(sulfonatooxi) etil] sulfonil] fenil] azo] naftaleno-2,7-disulfonato de tetrasodio).

La estructura química se describe en la Figura 7-1.

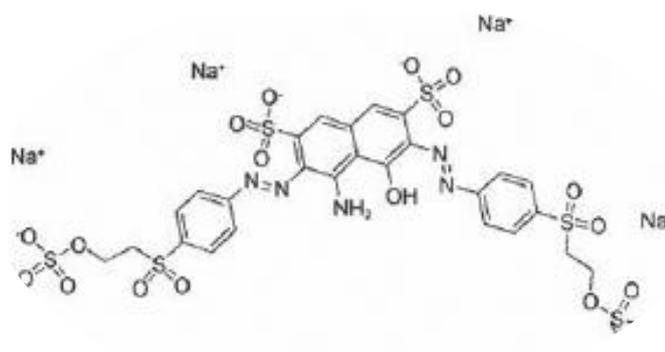


Figura 7-1: Estructura química del colorante negro reactivo 5
Fuente. (Vallejos, 2013)

1.5. Impacto ambiental de los colorantes textiles

La investigación sobre los colorantes textiles preocupa debido a la contaminación que se observa en las aguas residuales, provocando disminución de la transparencia, oxígeno disuelto, dificultando la acción fotosintética de las plantas. Este tipo de contaminación provocada por colorantes muchas de las veces no lo consideran como parte de la problemática de las aguas residuales a pesar de los daños que provoca, está asociado con la presencia de compuestos tóxicos y grupos cromóforos o polímeros de alto peso molecular como la lignina. Durante el tratamiento de un residuo coloreado se debe prestar atención a la reducción o eliminación del color, contribuyendo de esta forma a reducir el impacto sobre los ecosistemas donde son vertidos. (Bermúdez, y otros, 2003).

En el proceso de teñido se generan alrededor de 200 litros de efluentes con colorantes, alrededor del 30% de estos compuestos se pierden debido a las ineficiencias del proceso de teñido y son descargados. El uso de una amplia variedad de colorantes químicos da origen en cortos ciclos de tiempo a, efluentes considerablemente modificados en su composición, que requieren de un tratamiento de agua. (Coronel, y otros, s.f.)

1.5.1. Mecanismos para la remoción de colorantes.

La industria textil mundialmente descarga 280.000 toneladas de colorantes en efluentes textiles, se determinan tratamientos; primarios, secundarios o terciarios para la remoción y eliminación de materia orgánica, color y sólidos no eliminados, para la remoción de colorantes en aguas residuales, debido a su complejidad para ser eliminados se emplean métodos biológicos o fisicoquímicos convencionales, en donde se recurre a la biotecnología mediante tecnologías innovadoras.

1.5.1.1. Tratamientos enzimáticos. - bacterias y hongos son capaces de degradar compuestos recalcitrantes, así como los colorantes reactivos por acción enzimática, empleando la lacasa una enzima proveniente de *Ascomycetes Myceliophthora Thermophila* con la cual se obtiene buenos resultados con la precipitación del colorante mediante los grupos fenólicos del colorante todas las fuentes de nitrógeno suplementarias son inhibitorias para la actividad de lacasa y la decoloración del colorante. Son evidentes la adsorción insignificante del colorante en los micelios fúngicos y la biodegradación catalizada por lacasa es la principal vía de decoloración. (Asgher, y otros, 2008).

1.5.1.2. Reactores anaerobios. – se usa en los colorantes azoicos donde se emplean microorganismos como las bacterias metanogénicas, estas poseen grupos funcionales de aminas aromáticas las cuáles se emplean para los biorreactores combinados (anaerobios-aerobios) para el tratamiento de aguas residuales. (Der Zee, y otros, 2005).

1.5.1.3. Procesos de oxidación avanzada. – utiliza los radicales -OH incluyen también a las reacciones Fenton y fotocátalisis heterogénea, pero su principal desventaja hace referencia a su elevado costo y consumo de energía, por lo que las industrias lo descartan buscando opciones menos costosas y amigables con el ambiente. (Haemmerli, y otros, 1986).

1.5.1.4. Técnicas electroquímicas. – son alternativas limpias operan en condiciones ambientales, la descomposición de los compuestos orgánicos se da por oxidación, entre sus ventajas esta que no requiere de la adición de productos químicos los cuáles no generan residuos. (Crespi, y otros, s.f.).

1.5.2. Mecanismos biológicos para la remoción y degradación de colorantes.

Los microorganismos tienen la capacidad de degradar colorantes dentro de los cuáles se encuentran bacterias como *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas mendocina*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces sp*, *Shewanella decolorationis*, así también los hongos de las especies *Funalia trogii*, *Aspergillus niger*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Trametes versicolor*, entre otros. Para los autores (Cortázar, y otros, 2012), los microorganismos usan mecanismos como la bioabsorción, la biodegradación (aerobia o anaerobia) y métodos enzimáticos. Para la decoloración los reactores pueden contener cultivos mixtos, organismos aislados o enzimas aisladas algunas especies de hongos y bacterias son utilizadas en el tratamiento biológico de colorantes. Estos organismos presentan diferentes mecanismos de acción frente a los colorantes.

Los mecanismos biológicos para el tratamiento de efluentes de la industria textil, se basan en el uso de microorganismos vivos o sus metabolitos producidos por fermentación sólida o líquida de material generalmente, lignocelulósico. Los hongos, son capaces de llevar a cabo reacciones de oxidación de los colorantes; poseen una batería enzimática que tiene la capacidad de romper la lignina del material lignocelulósico, y debido a la estructura de la lignina que es similar a las de muchos colorantes, este fenómeno ha sido explotado para ser usado en el tratamiento de aguas residuales con alta carga de colorantes. (Macías, 2017).

Aspergillus niger es una alternativa prometedora para complementar los mecanismos actuales en procesos de eliminación del colorantes de las aguas residuales, el sistema trabaja a partir de solución acuosa mediante biosorción en hongos muertos, *Aspergillus niger* con pretratamiento de NaHCO_3 es eficaz en la capacidad de biosorción; los estudios se realizan evaluando el pH, cinética e isoterma en lote para evaluar la capacidad de biosorción de la biomasa fúngica en una solución acuosa. (FU, y otros, 2002).

Para (Martinez, y otros, 2015). Los métodos biológicos se consideran como: efectivos, específicos y menos nocivos al ambiente los procesos biológicos son más económicos, bajo diferentes condiciones de concentración de oxígeno como los procesos anaerobios, aerobios y la combinación de estos, pueden degradar ciertos colorantes (procesos biológicos convencionales). Asimismo, recientemente se ha dado importancia a la investigación sobre

cierto tipo de procesos biológicos no- convencionales como son el uso de hongos del tipo de los Basidiomicetos y de las enzimas del tipo de las peroxidases extraídas de ciertos productos naturales. (Mijaylova, y otros, 2013) En la Tabla 3-1 se muestran ejemplos de algunos microorganismos utilizados en el tratamiento biológico de colorantes, así como su mecanismo de acción (Kuhad, y otros, 2004).

Tabla 3-1: Microorganismos utilizados en el tratamiento de colorantes y su mecanismo de acción para la decoloración.

Especie	Mecanismo
<i>Aspergillus niger</i>	Adsorción -biodegradación
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Peroxidasa

Fuente. Adaptado de (Kuhad, y otros, 2004)
Realizado por: Gabriela Medina. 2018

1.6. Curtido de pieles

Es el proceso de convertir la piel putrescible en cuero imputrescible después de ser sacrificados los animales, sus cueros son tratados con sal en el lado de la carne evitando la descomposición y ataques bacterianos para poder conservarlos el mayor tiempo posible y así su posterior uso para la obtención del cuero, las pieles son almacenadas en el saladero hasta procesarlos en las siguientes etapas.

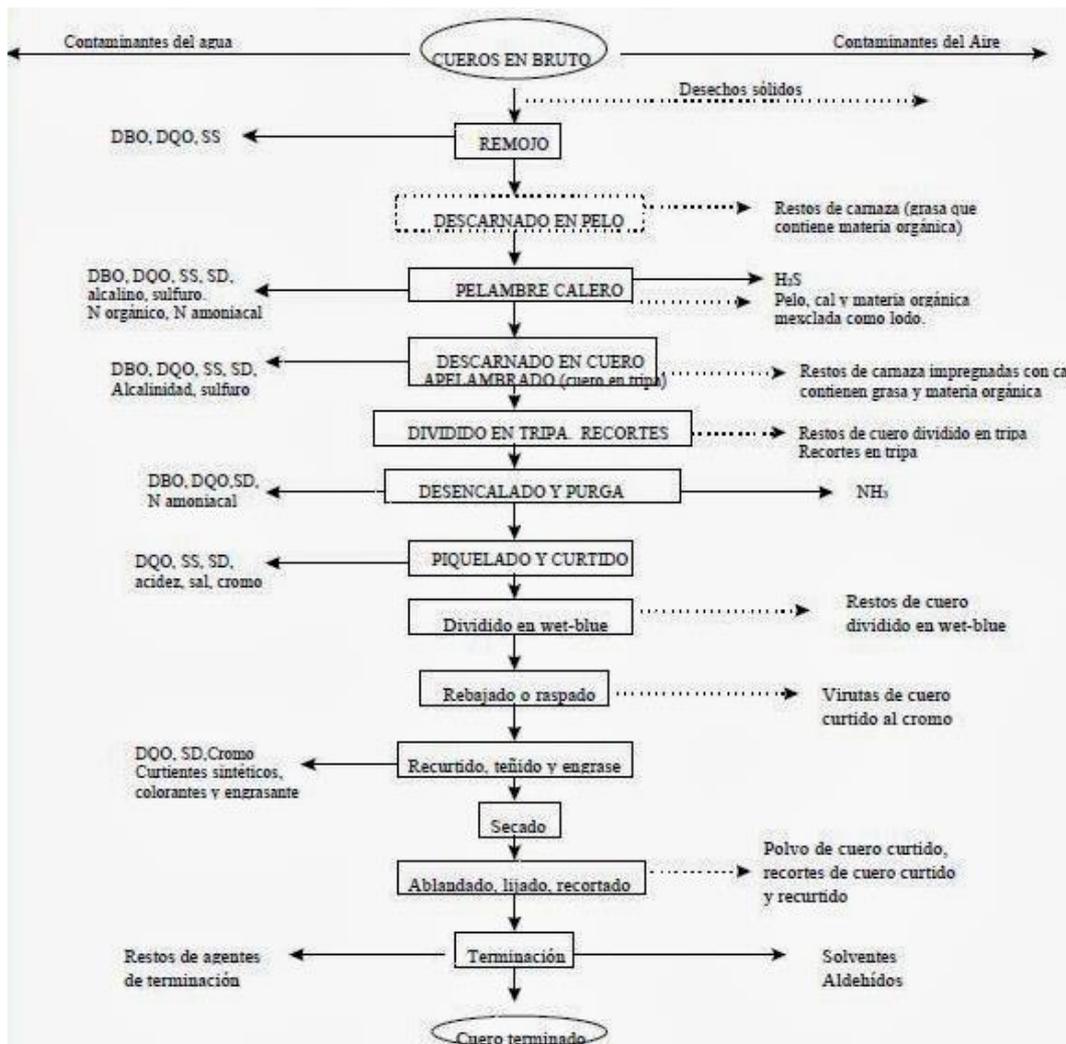


Figura 8-1: Esquema proceso de producción cueros curtidos
Fuente. (Vallejos, 2013)

1.7. Aguas residuales en la industria de la curtiembre

Agua residual se considera a aquella que ha sufrido una alteración en sus características físicas, químicas o biológicas por la introducción de contaminantes como residuos sólidos, biológicos, químicos, municipales, industriales, agrícolas etc., afectando así los ecosistemas acuáticos y su entorno (Novotny, y otros, 2001).

En un informe publicado por Greenpeace basado en un estudio de la UNEP (programa del cuidado del medio ambiente de las Naciones Unidas) habla de las curtiembres como un ejemplo de industrias con alto potencial de impacto ambiental y seguridad laboral. Esto es consecuencia principalmente del uso de compuestos químicos para el curtido, solventes, pigmentos, etc. que suelen ser tóxicos y persistentes, afectando la salud humana y el medio

ambiente; los impactos incluyen efectos no solamente sobre las aguas donde se descargan los efluentes, sino también el suelo, agua subterránea, los sitios de disposición de los lodos de tratamiento y residuos sólidos, la calidad del aire y la salud humana (UNEP, 1991).

Las aguas residuales en la industria de curtiembre, se caracterizan por presentar elevadas concentraciones de contaminación orgánica y tóxica asociada al cromo, cloruros y sulfatos provenientes del proceso, lo que implica una problemática que vincula un ámbito ambiental, higiénico y social. Los procesos de transformación en la industria de curtiembres se desarrollan mediante etapas discontinuas, en grandes tambores rotatorios denominados fulones. En cada una de las etapas se requiere aditivos químicos y elevados volúmenes de agua (30-60 m³/ton piel). Como resultado, además del cuero, se genera una importante carga contaminante. Estos contaminantes consisten en residuos sólidos, líquidos y gaseosos, siendo el de mayor preocupación el líquido, por su elevada carga orgánica y toxica (García, 2016).

1.7.1. Composición general

La composición de las aguas residuales puede variar mucho de una curtiembre a otra debido al proceso que se use Tabla 4.1; sin embargo, se observa elementos comunes como los altos contenidos de materia en suspensión, proteínas, componentes oxidables, productos químicos y sustancias tóxicas además del color oscuro y olor desagradable. Cabe destacar que los procesos de ribera son responsables del 80% de la carga contaminante total expresada en términos de DBO₅ debido esencialmente a la presencia de proteínas y sus productos de degradación, y del 60% de los sólidos suspendidos; la presencia de sulfuro en el pelambre y de cromo en la curtición dan una especial toxicidad a las descargas, por lo que deben ser atendidos con especial cuidado (Esparza, y otros, 2001).

Tabla4-1: Características de los efluentes de curtiembre.

Parámetro	Tipo de curtido	
	Curtido Vegetal (mg/mL)	Curtido al Cromo (mg/mL)
DBO ₅	1000	900
DQO	3000	2500
Sulfuro	160	160
Sulfato	2000	2000
Cloruro	2500	2500
Nitrógeno total	120	120
Aceites y grasas	200	200
Fósforo	1	1
Cromo (Cr ³⁺)	-	70
Sólidos Totales	10000	10000
Sólidos Suspendidos	1500	2500
Ceniza total	6000	6000
Ceniza en solidos suspendidos	500	1000
Sólidos sedimentables (2h)	50	100
pH	9	9

Fuente. Adaptado de (Esparza, y otros, 2001)

Realizado por: Gabriela Medina. 2018

- pH

El valor del pH se puede medir de forma precisa mediante un potenciómetro, también conocido como pH-metro, también empleando indicadores, ácidos o bases débiles que presentan diferente color según el pH. El papel indicador, que se trata de papel impregnado de una mezcla de indicadores cualitativos para la determinación del pH. (González, 2011).

- Temperatura

La temperatura del agua residual suele ser siempre más elevada que la del agua de suministro, hecho principalmente debido a la incorporación del agua caliente procedente de la industria. (CIDTA, s.f.).

- Sólidos totales

Analíticamente, se define el contenido de sólidos totales como la materia que se obtiene como residuo después de someter al agua a un proceso de evaporación a entre 103 y 105°C Para la determinación de sólidos totales se emplea la siguiente fórmula: (Torres, 2012).

$$ST = \frac{(Masa\ del\ plato\ de\ evaporación - residuo.g.masa\ del\ plato\ de\ evaporación) \times 1000g}{Volumen\ de\ la\ muestra}$$

- Sólidos disueltos

Contaminante secundario por la Agencia de Protección Ambiental de los EU (USEPA) y se sugiere un máximo de 500 mg/L en agua potable. Éste estándar secundario se establece porque TDS elevado proporciona al agua una apariencia turbia y disminuye el sabor en ésta. (Bauder, y otros, s.f.).

- Color

Este término se refiere a la edad del agua residual, que puede ser determinada cualitativamente en función de su color y su olor. El agua residual reciente suele tener un color grisáceo. Sin embargo, al aumentar el tiempo de transporte en las redes de alcantarillado y al desarrollarse condiciones más próximas a las anaerobias, el color del agua residual cambia gradualmente de gris a gris oscuro, para finalmente adquirir color negro. (García, 2001).

- Olor

En su forma pura, el agua no produce sensaciones olfativas. El olor en el agua puede utilizarse de manera subjetiva para describir cualitativamente su calidad, estado, procedencia o contenido. Esta propiedad tiene un amplio espectro de posibilidades, para propósitos de calidad de aguas existen ciertos aromas característicos que tipifican algunas fuentes u orígenes, más o menos bien definidos. (GESTA AGUA , s.f.).

- Conductividad

Es la capacidad del agua para conducir la corriente eléctrica, mide la cantidad de iones en solución (fundamentalmente cloruro, nitrato, sulfato, fosfato, sodio, magnesio y calcio, la conductividad será determinada mediante la utilización de un conductímetro electrónico, el que genera una diferencia de voltaje entre dos electrodos sumergidos en agua. La caída en el voltaje debida a la resistencia del agua es utilizada para calcular la conductividad por centímetro. (Goyenola, 2007).

- Turbiedad

La turbiedad, como medida de las propiedades de transmisión de la luz de un agua, es otro parámetro que se emplea para indicar la calidad de las aguas vertidas o de las aguas naturales en relación con la materia coloidal y residual en suspensión. La medición de la turbiedad se lleva a cabo mediante la comparación entre la intensidad de la luz dispersada en la muestra y la intensidad registrada en una suspensión de referencia en las mismas condiciones (CIDTA, s.f.).

- Demanda química de oxígeno

El ensayo de la DQO se emplea para medir el contenido de materia orgánica tanto de las aguas naturales como de las residuales. En el ensayo, se emplea un agente químico fuertemente oxidante en medio ácido para la determinación del equivalente de oxígeno de la materia orgánica que puede oxidarse. (CIDTA, s.f.).

- Demanda bioquímica de oxígeno

El parámetro de contaminación orgánica más ampliamente empleado, aplicable tanto a aguas residuales como aguas superficiales, es la DBO a 5 días (DBO5). (Hach Method 8000). La oxidación bioquímica es un proceso lento, cuya duración es, en teoría, infinita en un periodo de 20 días se completa la oxidación del 95 a 99 por 100 de la materia carbonosa, y en los 5 días que dura el ensayo de la DBO se llega a oxidar entre el 60 y el 70 por 100. Se asume la

temperatura de 200C como un valor medio representativo de temperatura que se da en los cursos de agua que circulan a baja velocidad en climas suaves, y es fácilmente duplicada en una incubadora. (CIDTA, s.f.).

CAPÍTULO II

2. MARCO METODOLÓGICO EXPERIMENTAL

2.1. Hipótesis y variables

2.1.1. *Hipótesis*

Existe diferencia significativa en las concentraciones de colorante negro reactivo 5 por efecto de los tratamientos con *Pleurotus ostreatus* y los tratamientos con *Aspergillus niger*

2.1.2. *Variables*

2.1.2.1. *Variable dependiente*

Concentración de colorante negro reactivo 5

2.1.2.2. *Variables independientes*

Hongos (*Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger*)

2.2. Tipo y Diseño de Investigación

La presente investigación es de tipo experimental-correlacional, donde se analiza el comportamiento de las variables para evaluar el porcentaje de remoción del colorante negro reactivo 5 conociendo así el grado de relación que existe entre los dos hongos lignolíticos.

2.3. Diseño experimental

Tabla 1-2: Diseño experimental

UNIDADES EXPERIMENTALES	HONGOS	TRATAMIENTOS	DOSIS-CONCENTRACIÓN
UE 1	Tratamiento de control	Tc	100 ppm
UE 2	<i>Pleurotus ostreatus</i> (P)	Tp	150 ppm
UE 3	<i>Aspergillus niger</i> (A)	Ta	200ppm

Realizado por: Gabriela Medina. 2018

2.4. Unidad de análisis

La unidad experimental fue de un envase de 1500 ml de agua residual, con un total de 27 unidades experimentales.

2.5. Población de estudio

Agua residual del Laboratorio de Curtición de Pieles de la ESPOCH.

2.6. Tamaño de la muestra

Tres unidades experimentales con tres repeticiones por cada concentración de 100, 150,200 ppm de CNR en 1,5 l cada una, dando un volumen total de 40,5 l de agua residual.

2.7. Selección de la muestra

El agua residual utilizada en la investigación se tomó de acuerdo al proceso de curtido del Laboratorio de Curtición de Pieles de la ESPOCH.

2.8. Técnicas de recolección de datos

2.8.1. Localización del lugar

El Laboratorio de Curtición de Pieles pertenece a la Facultad de Ciencias Pecuarias de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, está ubicado en la Panamericana Sur km 1½. Ocupa un área de 150 m². La planta recibe pieles de ovinos, caprinos, camélidos y bovinos; dependiendo del uso al que vaya a ser destinado el cuero: calzado, vestimenta o talabartería, se empelan alrededor (40-50 kg de piel).

La investigación fue realizada tomando el agua residual generada en la etapa de tinturado, donde se añaden los diversos colorantes tanto químicos como vegetales. El lugar donde se descarga el agua consta de canaletas las mismas que conducen a un reservorio; sin previo tratamiento.

2.8.2. Muestreo

El agua residual fue obtenida del Laboratorio de Curtición de Pieles de la ESPOCH, una vez concluida la etapa de tinturado con colorantes vegetales (mimosa), considerando el proceso productivo de curtido, tomando una muestra compuesta del agua residual generada en la etapa de tinturado, el agua residual recolectando directamente del bombo de tinturado. El muestreo se realizó tres veces en diferentes procesos de curtición de pieles, durante las prácticas de laboratorio de los estudiantes de la Facultad de Ciencias Pecuarias recolectándose alrededor de 50 l.

Se envió el agua residual del proceso de curtido sin tratar para análisis al Laboratorio de Calidad del Agua de la ESPOCH las determinaciones fueron de acuerdo a la norma de Calidad Ambiental y de descarga de efluentes: Recurso Agua (Anexo 1 del libro del TULSMA). Dentro de los parámetros a analizar el pH, temperatura, conductividad, se midieron in situ con un termómetro graduado en grados Celsius, papel universal de pH y conductímetro debidamente calibrado, los resultados obtenidos se observan en el Anexo 1 B.

La temperatura determinada en campo se obtuvo de acuerdo al método APHA 2550 B-1 con un termómetro. El pH se determinó empleando tiras indicadoras. Para el análisis físico químico se

tomó 1 l de agua residual en una botella estéril ámbar, mientras que para el análisis microbiológico se tomó agua residual en un recipiente estéril.

2.8.3. Caracterización de parámetros físico-químicos y microbiológicos.

La caracterización inicial del agua residual de curtiembre se tomó en cuenta de acuerdo a bibliografía los siguientes parámetros:

- pH
- Temperatura
- Sólidos totales
- Sólidos suspendidos
- DBO₅
- DQO
- Conductividad
- Turbiedad
- Color
- Oxígeno disuelto
- Olor
- Heterótrofos totales

Tabla 2-2: Análisis físico-químicos y microbiológicos

PARAMETRO	MÉTODO/PROCEDIMIENTO
pH	STANDARD METHODS 4500-B
Sólidos totales	STANDARD METHODS 2540-D
Sólidos suspendidos	STANDARD METHODS 2540-D
DBO ₅	STANDARD METHODS 5210-B
DQO	STANDARD METHODS 5220-C
Conductividad	STANDARD METHODS 2510-B
Turbiedad	STANDARD METHODS 2130-B
Color	STANDARD METHODS 2120-C
Olor	STANDARD METHODS 2150-B
Oxígeno disuelto	STANDARD METHODS 4500-O G
Heterótrofos totales	STANDARD METHODS 9221-B

Fuente: ESPOCH 2018

Realizado por: Gabriela Medina. 2018

2.9. Microorganismo de estudio *Pleurotus ostreatus*

Para esta investigación se utilizó la cepa *Pleurotus ostreatus* proveniente del Laboratorio de Biotecnología de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (Riobamba, Ecuador). Esta cepa fue reactivada en agar PDA (papa dextrosa agar) (Anexo 1A), a 30° C durante 8 días y posteriormente conservada a 4° C en tubos de ensayo con 1 mL de agar PDA; inoculando un disco de agar colonizado del hongo, según la técnica descrita por (Pedroza, y otros, 2003).

2.9.1. Desarrollo del protocolo de inmovilización

Como soporte no inerte se utilizó estropajo de *Luffa cylindrica* (esponja vegetal) de 0,5 cm³, la esterilización previa del soporte se realizó por medio de calor seco durante 3 horas a 212°C; en bolsas de papel aluminio con 90 cubos. De acuerdo a la técnica descrita por (Rodas, 2015).

2.9.2. Selección del método o protocolo de inmovilización para la biomasa fúngica

Se utilizaron dos cepas de *Pleurotus ostreatus* las cuales fueron reactivados en PDA, de acuerdo a bibliografía y experimentos realizados los parámetros que definieron el mejor protocolo fueron la cantidad de biomasa inmovilizada y el tiempo de retención; se seleccionó el protocolo de inmovilización, colonización en medio sólido (CMS), empleando como soporte de estropajo (*Luffa cylindrica*).

2.9.3. Inmovilización utilizando discos de agar con hongo crecido en soporte vegetal *Luffa cylindrica*.

Se tomó cajas cultivadas y con cepa reactivada de *Pleurotus ostreatus*, 15 discos de agar colonizado que fueron colocados sobre cada uno de los 30 cubos de *Luffa cylindrica* de 0,5 cm² estéril (previamente pesados). Posteriormente se incubaron a 30°C durante 8 días realizando observaciones diarias hasta obtener una colonización completa del soporte. (Anexo A; Fotografía 4^a)

2.9.4. Biomasa del hongo *Pleurotus ostreatus* utilizando como soporte vegetal *Luffa cylindrica*.

Se determinó la biomasa del hongo *Pleurotus ostreatus* por métodos analíticos se analizó el contenido micelial retenido por membranas pre-pesadas GF/C, lavadas 2 veces con agua destilada y secadas en una estufa por peso constante a 105°C, durante 24 horas (Guillen, y otros, 1998).

La cantidad de biomasa aún inmovilizada en el soporte vegetal *Luffa Cylindrica* fue medida por medio de la técnica de peso seco. Para esto se estandarizó el peso inicial de *Luffa Cylindrica* a 0.9 g equivalente al peso obtenido a un cuadrado de 1cm x1cm. Una vez inmovilizadas durante tres días, los cuadrados fueron secados a 60°C hasta tener un peso constante, al igual que los cuadrados sin inmovilizar. Para obtener el peso de la biomasa seca se aplicó la siguiente formula:

$$P_b = P_f - P_i$$

Dónde:

P_b = es el peso en gramos de la biomasa seca.

P_f = es el peso en gramos de la *Luffa Cylindrica* con el microorganismo inmovilizado.

P_i = es el peso en gramos de la *Luffa Cylindrica* seca sin inmovilizar.

2.9.5. Masificación de *Pleurotus ostreatus* utilizando como soporte el trigo

En un recipiente, se colocó 5 kg de semillas de trigo (sustrato) remojándolas por 24 h, se añade el fungicida Benomyl 50PM, que tiene una relación de 200-240 g de fungicida por cada 100 kg de semilla, por lo que se coloca 10g en el trigo remojado. Se disolvió el fungicida, durante 30 min, concluido el tiempo de acción del fungicida, se enjuaga el trigo y se lo seca al ambiente, con humedad de 50%, el sustrato se coloca en recipientes de vidrio, los mismos son llenados hasta un 80 %, de su capacidad. Se selló con papel aluminio y parafilm; se colocó en autoclave para ser esterilizados a una temperatura de 121°C durante 15 min. (Kerem, y otros, 1992).

En la cámara de flujo se inocula el hongo *Pleurotus ostreatus*, los recipientes son sellados nuevamente y depositados en la incubadora a 25°C durante 8 días, hasta que las cepas hayan

poblado completamente el sustrato y tenga una coloración blanquecina y textura algodonosa. (Haro, 2016). Anexo3 A.

2.9.6. Biomasa del hongo *Pleurotus ostreatus* utilizando como soporte el trigo

Para determinar la biomasa del hongo *Pleurotus ostreatus* en estado sólido tomado de la masificación, de cada frasco se tomó 3 g del sustrato colonizado para colocar en un Erlenmeyer de 25 ml con un volumen mínimo de agua destilada (10ml) agitar suavemente por 1 hora, permitiendo el desprendimiento de las biomásas del hongo por su posterior filtración y determinación. Tanto la biomasa obtenida por filtración del cultivo de frascos con trigo (sustrato) fueron secados durante 24 horas en estufa a 110 ° C hasta su peso constante.

2.10. Microorganismo de estudio *Aspergillus niger*

2.10.1. Obtención de *Aspergillus niger* a partir de varios sustratos

Para la obtención del hongo *Aspergillus niger* se sembró en agar PDA (papa dextrosa agar) Y SDA (sabouraud dextrosa agar) muestras de: lodo, suelo agrícola, acelga, tomate, naranja, cebolla, limón realizándose varios ensayos; esta cepa se encontró en el limón. Una vez crecido el hongo se recolectaron las esporas en 1 ml de agua destilada estéril, en un tubo eppendorf, estas esporas fueron cuantificadas a través de la cámara de Neubauer, en la que se cuenta el número de esporas en 5 cuadrantes, dividida esta cantidad para 0.02 mm³ y luego multiplicado por 1000 obteniéndose la cantidad total de esporas en 1 ml; se cuantificaron aproximadamente 3x10⁶ esporas/ml en agar PDA. (Lozano, 2011).

2.10.2. Aislamiento del hongo *Aspergillus niger*

El *Aspergillus niger* puede ser aislado de varios sustratos como: granos de maíz, trigo acelga, tomate, naranja, cebolla, limón, etc. Se aisló el hongo *Aspergillus niger* a partir de especies que lo contiene como parte de su flora normal, así pues, el limón en la variedad “Fino”; estos se caracterizan por ser ovalados, de corteza delgada, y bastante jugo. En donde se evidenció crecimiento del mismo. (Rodas, 2015).

2.10.3. Purificación del hongo *Aspergillus niger*

La purificación del hongo *Aspergillus niger* consistió en eliminar todo microorganismo indeseable que se encontraba en cada caja con el hongo, se utilizó un saca bocados para extraer micelio y sembrar en una caja estéril con medio PDA (papa dextrosa agar). Posteriormente reactivada en agar PDA (Anexo A; Fotografía 2A) a 30° C durante 8 días, para más adelante ser conservada a 4° C en tubos de ensayo con 1 mL de agar PDA.

2.10.4. Desarrollo del protocolo de masificación

Se preparó el caldo de cultivo papa dextrosa, de acuerdo a la siguiente descripción;

Tabla3-2: Elaboración del Caldo Papa y Dextrosa

COMPOSICIÓN		PROCEDIMIENTO
Papas sin pelar	200g	Lavar las papas, cortarlas y hacerlas hervir en 1 L de agua destilada por 20 minutos colar y disolver la dextrosa, esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 min a 15 lb de presión. (Ames, y otros, 2004).
Dextrosa	10g	
Agua destilada	1000ml	

Fuente: (Ames, y otros, 2004)

Realizado por: Gabriela Medina. 2018

2.10.5. Selección del método o protocolo de masificación de la biomasa fúngica

La masificación se llevó a cabo en 9 erlenmeyers de 250ml cada uno con 150 ml de caldo papa dextrosa inoculados 10 discos de agar colonizado de las cajas cultivadas de *Aspergillus niger*. Se colocó en la incubadora durante 5 días, a 30°C, realizando observaciones diarias. (López, y otros, s.f.).

2.10.6. Método para cuantificar esporas del hongo *Aspergillus niger*.

2.10.6.1. Preparación de la solución Tween 80 al 0,1%

Se preparó una solución de Tween 80 al 0,1%, de formulación comercial, se realizó una dilución al 10%; tomando 10 ml de Tween 80 y agregando 90 ml de agua destilada, para la preparación

del Tween al 0,1 %, tomando 1ml de la solución al 10% y adicionando 99 ml de agua destilada. Esta solución se esterilizó en autoclave a 15 lb de presión durante 30 minutos.

2.10.6.2. *Conteo de las esporas en cámara de Neubauer improved*

Se preparó una suspensión de esporas a partir del Erlenmeyer con el hongo *Aspergillus niger* masificado; en un eppendorf con 1ml de la solución de Tween al 0,1% colocando una porción del hongo para que se separen todas las esporas se agitó en un Vortex por espacio de 15 segundos. Se cargó 1 ml a la cámara de Neubauer con una pipeta Pasteur estéril para el conteo del número de esporas, bajo el microscopio de visión plana hasta obtener una concentración de 50 a 100 esporas por cada mililitro. (Anexo A; Fotografía 5 A)

La fórmula para contar en cámara de Neubauer que se utilizó es la siguiente;

Cuadrado 1

$$\text{Área} = 1\text{mm} \times 1\text{mm} = 1\text{mm}^2$$

$$\text{Volumen} = 1\text{mm}^2 \times 0.1\text{mm} = 0.1\text{mm}^3 = 1 \times 10^{-4} \text{ ml}$$

$$\text{Concentración} = \frac{\text{total de células contadas} \times 10.000}{\text{número de cuadrados}}$$

Cuadrado 2

$$\text{Área} = 0.25\text{mm} \times 0.25\text{mm} = 0.0625\text{mm}^2$$

$$\text{Volumen} = 0.0625\text{mm}^2 \times 0.1 \text{ mm} = 625 \times 10^{-3} \text{ mm}^3 = 6.25 \times 10^{-6} \text{ ml}$$

$$\text{Concentración} = \frac{\text{total de células} \times 16.000}{\text{número de cuadrados}}$$

Se sembró 100 µl de la concentración 3×10^6 en una placa con medio PDA, se incubó a 20°C durante una semana, con el fin de que la colonia provenga de una sola conidia. (Ames, y otros, 2004).

2.10.7. Identificación y mantenimiento del hongo *Aspergillus niger*

2.10.7.1. Identificación del hongo *Aspergillus niger*

Para identificar *Aspergillus niger* se tomó como referencia las guías prácticas de identificación de hongos productores de micotoxinas contaminantes en alimentos, en donde se detalla características que tiene el *Aspergillus niger*.

- Colonias: generalmente de rápido crecimiento, blancas, amarillas, marrón a negras o coloreadas de verde consiste principalmente en una felpa densa de conidióforos erectos.
- Conidióforos: estípote no ramificada con un ensanchamiento en el ápice (vesícula)
- Fiálides: formadas a partir de un elemento intercalar que está inserto sobre la vesícula.
- Conidias: se originan desde las fiálides formando cadenas compactas columnares o radiadas; unicelulares, lisas o rugosas, hialinas o pigmentadas.

Además, para la identificación del hongo *Aspergillus niger* se consideró otros aspectos, si las colonias sobre PDA y SDA exceden los 35 mm de diámetro y son de coloración gris a negras que crecen a 25°C se trata de la variedad *niger* generalmente estos hongos son una mezcla de uni y biseriados con cabeza conidial radiada, de coloración negro a marrón (Lozano, 2011). Las colonias en PDA son de 80 mm de diámetro, cubren toda la caja Petri, el micelio es blanco y las cabezas conidiales son negras; al reverso de la caja se diferencia desde un color pálido a amarillo claro.

2.10.7.2. Mantenimiento del hongo *Aspergillus niger*

Se realizó siembra del hongo en agar inclinado se mantuvo en refrigeración en cada una de las cajas Petri, en los dos medios de cultivo que mayor crecimiento obtuvieron (PDA y SDA) luego se realizó una recolección de esporas del hongo con asas y puntas estériles de 1 ml. Las esporas se mantuvieron en congelación en tubos eppendorf de 1 ml, para luego realizar el conteo del número de esporas por cada ml dispuesto en cada tubo, el conteo del número de esporas se lo realizó en la cámara de Neubauer, en donde se obtuvieron desde 2×10^6 esporas/ml hasta 9×10^6 esporas/ml.

2.11. Inoculación del agua residual

La inoculación de los hongos en el agua residual se realizó de la siguiente manera se recolectó 40,5 l de agua de la muestra compuesta se emplearon 27 frascos de vidrio estériles de 1,9 l de capacidad, se colocó 1,5 l en cada frasco. Para *Aspergillus niger* y *Pleurotus ostreatus* la inoculación de esporas en el agua residual se realizó siguiendo un modelo completamente aleatorio.

Se plantearon dos tratamientos con concentraciones de CNR5 de 100,150 y 200 ppm; más un tratamiento control con tres repeticiones cada uno, la inoculación se realizó en el agua residual sin suplemento nutricional de esta manera:

- Tratamiento P (*Pleurotus ostreatus*+ Agua residual): 150 ml de solución de esporas. A tres concentraciones diferentes de (100-150-200) ppm.
- Tratamiento A (*Aspergillus niger*+ Agua residual): 150 ml de solución de esporas. A tres concentraciones diferentes de (100-150-200) ppm.
- Tratamiento C (Control agua residual): Sin solución de esporas. A tres concentraciones diferentes de (100-150-200) ppm.

Una vez inoculadas las unidades experimentales, se colocó un sistema de aireación en cada una de ellas y se selló con parafilm de tal manera que quedara cubierta la boca del frasco excepto la entrada de la manguera de aireación. Se colocaron en cajas elaboradas evitando cambios de temperatura. Las unidades experimentales fueron incubadas a temperatura ambiente y con aireación constante por un periodo de 18 días.

2.12. Caracterización del colorante negro reactivo 5 (CNR5)

Para la caracterización del colorante negro reactivo 5 proveniente de las aguas residuales del curtido de pieles en la etapa de tinturado se tomó una alícuota de 250ml de la muestra compuesta para medición en un instrumento óptico, donde se utilizó un espectrofotómetro UV/VIS el cual identifico dos tipos de espectros para grupos azoicos medidos a 350 nm y fotómetro para medir el color verdadero en 450 nm.

2.12.1. Curva de calibración

La etapa de calibración y la obtención de la concentración de analito en la muestra de CNR5 consta de lo siguiente, se prepararon los patrones del analito que cubran un intervalo adecuado de concentraciones, y se midió la señal analítica proporcionada por los mismos, se trazó un gráfico con las señales frente a la concentración de analito y se calculó la recta que mejor se ajusta a los datos mediante un ajuste de mínimos cuadrados.

De esta forma se obtiene la pendiente y la ordenada que definen la recta; se mide la señal analítica para las muestras desconocidas y se interpola en la recta de calibrado para obtener valores de concentración del analito. Por último, se obtuvo la concentración de analito en la muestra con las diluciones a las que se sometió la muestra. Como se observa en el Grafico 1-3:

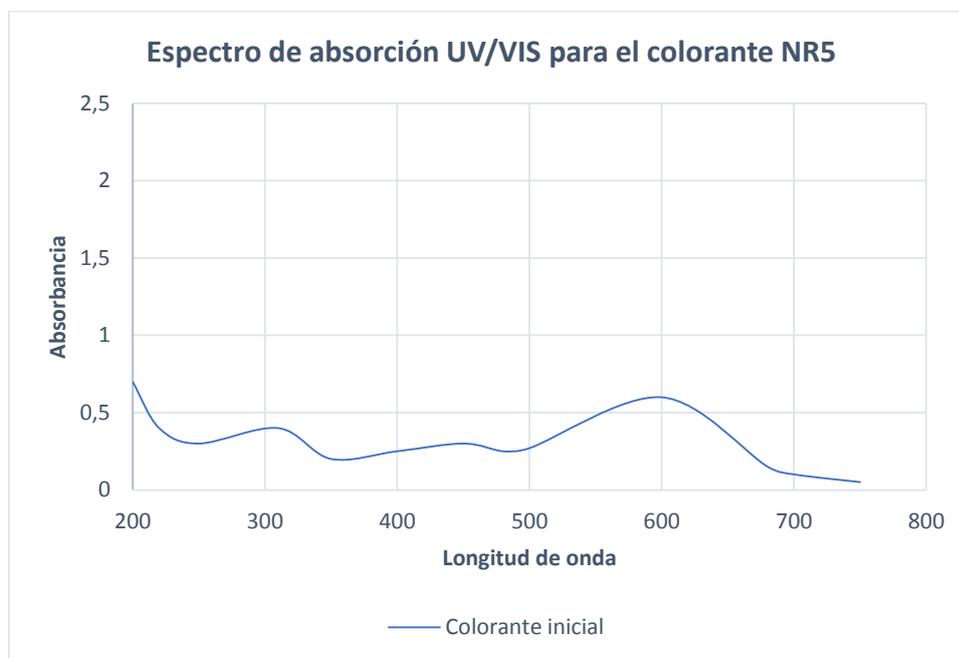


Grafico 1-3: Espectro de absorción UV/VIS para el colorante NR5
Realizado por: Gabriela Medina.2018.

2.13. Determinación de la concentración mínima inhibidora (CMI)

La tolerancia a diferentes concentraciones de colorante negro reactivo 5 se realizó sembrando masivamente 0.1m L de una suspensión de 1×10^6 conidios $m L^{-1}$ en agar PDA (*Pleurotus ostreatus*, *Aspergillus niger*) adicionando concentraciones de 100, 150,200 ppm de colorante negro reactivo 5, como testigo negativo se inocularon 0.1 m L de la suspensión de conidios en agar sin colorante negro reactivo 5, todas las cajas se incubaron a 25°C por ocho días. Se observó

el crecimiento en las placas determinando la concentración mínima inhibitoria (CMI) que se refiere a la última concentración del CNR5 que presenta crecimiento microbiano.

2.14. Control crecimiento microbiano

Los controles de crecimiento de hongos fueron tomados de 1 ml de cada unidad experimental de acuerdo a los respectivos tratamientos P, A, y realizando una siembra de 100 µl de cada muestra sobre agar PDA las cajas fueron incubadas durante 5 días a 25°C.

De acuerdo al número de colonias de hongos en cada tratamiento se evidenció su crecimiento empleando la siguiente denominación:

ALTO (+++) caja cubierta- colonias incontables

MEDIO (++) caja parcialmente cubierta - > 50 colonias

BAJO (+) caja poco cubierta - < 20 colonias

NO VISIBLE (-) caja sin crecimiento- ausencia de colonias visibles

CAPÍTULO III

3. MARCO DE RESULTADOS

3.1. Resultados, análisis y discusión.

3.1.1. Caracterización de parámetros físico-químicos y microbiológicos.

Se muestran los resultados de los análisis correspondientes para 3 muestreos del agua residual de curtiembre en la Tabla 1-3:

Tabla1-3: Caracterización físico-química y microbiológica del agua residual dilución 1-100(v/v).

PARÁMETRO	UNIDAD	MUESTREO 1	MUESTREO 2	MUESTREO 3
pH		3,5	3,1	3,2
Temperatura	°C	24	22	24
Sólidos Totales	mg/l	47600	47800	48800
Sólidos Suspendidos	mg/l	27270	26856	22580
DBO ₅	mg/l	89300	86800	89900
DQO	mg/l	102000	101800	101000
Conductividad	µs/cm	4440	4400	4470
Turbiedad	Utn	154,3	152,4	153,78
Color	Pt Co	7927	8136	8014
Oxígeno disuelto	mg/l	6,92	7,34	7,11
Heterótrofos totales	UFC/100ml	78000	77000	77000

Fuente: ESPOCH, 2018

Realizado por: Gabriela Medina.2018.

Los resultados de los análisis presentados coinciden con las características descritas por (Mijaylova, y otros, 2013) donde presentan altos valores de DBO₅ y DQO; debido a la presencia de materia orgánica. Muestran además altos valores de color por ser una industria dedicada a la fabricación de textiles.

Los valores de pH y temperatura se encuentran dentro del rango establecido para aguas residuales generadas en la industria de curtiembre, resultados que concuerdan con (Villena, 2008). Sin embargo, mencionan límites máximos permisibles de 250, 500, 1600,220,>6 mg/l para DBO₅, DQO, sólidos totales, sólidos suspendidos, oxígeno disuelto; 20 Pt Co para color. Los resultados obtenidos exceden las condiciones descritas por los autores, debido a la presencia de

colorante en el agua residual usado para la investigación, esto se fundamenta en lo dicho por (Estudio para conocer los potenciales impactos ambientales, 2016); donde se menciona que la etapa de curtido y tinturado provoca un aumento en la DBO5 y DQO de las aguas residuales por su alto contenido de sal en el cuero y pelo animal diluido a lodo, DQO con alto contenido orgánico.

Los valores usados para la elaboración de la investigación corresponden al muestreo 3, estas concentraciones se asemejan a los valores obtenidos por (Vallejo, 2017) en su trabajo sobre la biodegradación de colorantes azoicos del efluente de la industria textil. Donde los valores de DBO5 y DQO son superiores.

En cuanto al análisis microbiológico, el agua residual presentó heterótrofos totales, no se reportó la presencia de patógenos que inhiban el crecimiento de *Pleurotus ostreatus* o *Aspergillus niger*. Los heterótrofos se encuentran en el ambiente por lo que su incorporación al agua residual podría ser explicada por arrastre de contaminantes en el canal de salida del agua residual. No se presentó crecimiento de hongos filamentosos, pero si se evidenció el crecimiento de levaduras en cantidades variables en muestreos alrededor de 3% de la totalidad de las placas de agar PDA las cuales no inhibieron el desarrollo de los dos hongos antes mencionados.

3.1.2. Identificación macroscópica y microscópica

3.1.2.1. *Pleurotus ostreatus*

Tabla 2-3: Características macroscópicas de *Pleurotus ostreatus*

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	
Forma	Anillos concéntricos
Color frontal	Blanco
Color reverso	Blanco
Elevación	Alta
Textura	Algodonoso
Diámetro de colonias	9, 5 cm
Presencia de gotas de exudado y pigmento difusible	6%

Fuente: (Rodríguez, 1996)

Realizado por: Gabriela Medina. 2018.

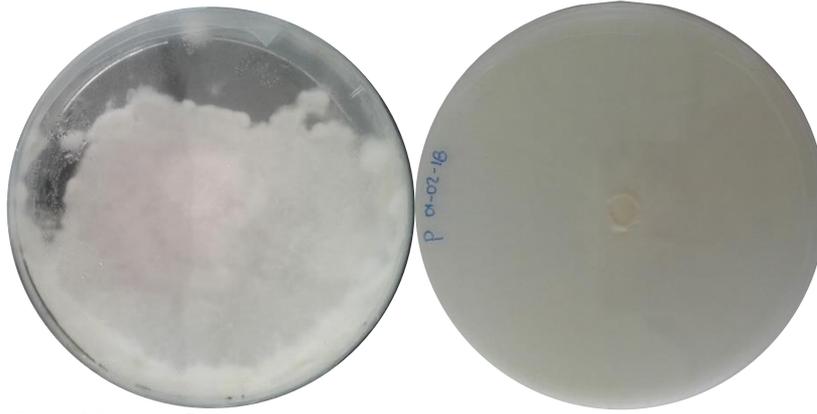


Figura 1-3: Hongo *Pleurotus ostreatus*
Fuente: Gabriela Medina. 2018.

Tabla 3-3: Características microscópicas de *Pleurotus ostreatus*

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	
Hifas	Hialinas septadas
Basidiosporas	Haploides externas
Conidiosporas	Artrosporas

Fuente: (Rodríguez, 1996)

Realizado por: Gabriela Medina 2018.

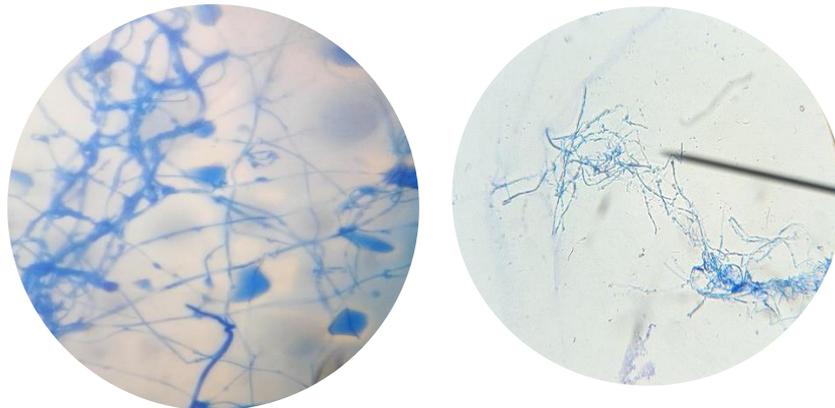


Figura 2-3: Hongo *Pleurotus ostreatus*
Fuente: Gabriela Medina.2018.

3.1.2.2. *Aspergillus niger*

Tabla 4-3: Características macroscópicas de *Aspergillus niger*

CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS	
Forma	Filamentoso
Color frontal	Colonias blancas con micelio aéreo de color negro
Color reverso	Cremoso
Levación	Baja
Textura	Globoso- Arenoso

Fuente: (Luna, y otros, 2010)

Realizado por: Gabriela Medina.2018.



Figura 3-3: Hongo *Aspergillus niger*

Fuente: Gabriela Medina. 2018.

Tabla 5-3: Características microscópicas de *Aspergillus niger*

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS	
Hifas	Septadas
Conidióforos	Incoloro largo liso con abundantes esporas y de pared gruesa
Métulas	Ramificado
Clamidosporas	Ausente
Fialides	Cortos con forma de botella

Fuente: (Luna, y otros, 2010)

Realizado por: Gabriela Medina.2018.

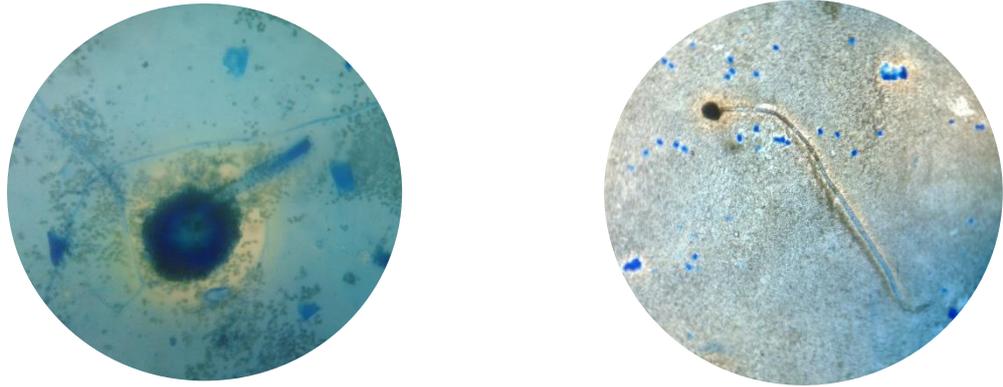


Figura 4-3: Hongo *Aspergillus niger*
Fuente: Gabriela Medina. 2018.

3.2. Biomasa de *Pleurotus ostreatus*

De acuerdo a la metodología se realizaron dos ensayos en diferentes sustratos denominados PL (*Pleurotus ostreatus* + *Luffa cylindrica*) y PT (*Pleurotus ostreatus* + trigo) cada ensayo fue incubado durante 8 y 10 días a 25° C; respectivamente con el fin de lograr el crecimiento de micelio, y a través del cálculo de la biomasa se determinó que el tratamiento PL mediante la inmovilización en medio sólido con estropajo vegetal (*Luffa cylindrica*) alcanzó la concentración de biomasa deseada para la degradación de CNR5. (Arias, y otros, 2005).

3.2.1. Determinación de peso húmedo

- Biomasa libre

La biomasa del soporte de trigo que se produjo en 50 ml de caldo PDA con 10 discos de agar de *Pleurotus ostreatus* luego de 8 días de incubación se filtró, esta biomasa retenida en el papel fue pesada y expresada como biomasa húmeda, teniendo en cuenta las ecuaciones (1) y (2).

$$W \text{ húmedo} = W \text{ papel con Bx} - W \text{ papel filtro} \quad (1)$$

$$W \text{ húmedo} = \frac{\text{gramos Bx húmeda}}{50 \text{ ml de extracto}} \quad (2)$$

- Biomasa inmovilizada

Se pesaron los cubos de estropajo vegetal *Luffa cylindrica* sin colonizar y sin previo tratamiento en horno de 80°C, a continuación, se realizó el procedimiento de inmovilización utilizando biomasa del soporte de trigo y nuevamente se pesaron los cubos de estropajo vegetal pero esta vez inmovilizados (sin tratamiento previo de secado), aplicando las ecuaciones correspondientes.

$$W \text{ húmedo} = W\bar{X} Bx \text{ inmovilizada inicial} - W\bar{X} \text{ cubos de Luffa} \quad (3)$$

$$W \text{ húmedo} = \frac{\text{gramos Bx humeda inmovilizada}}{\text{cubos de Luffa}} \quad (4)$$

- Biomasa resultante de los ensayos realizados

Se pesaron 9 cubos de *Luffa cylindrica* para cada uno de los ensayos y se realizó una diferencia entre la biomasa húmeda obtenida después de realizar el ensayo y la biomasa inmovilizada para cada uno de ellos, aplicando la ecuación (5).

$$W \text{ húmedo Final} = W\bar{X} Bx \text{ inmovilizado final} - W\bar{X} Bx \text{ inmovilizada inicial} \quad (5)$$

3.2.2. Determinación de peso seco

- Biomasa libre

Se determinó el peso del contenido micelial de *Pleurotus ostreatus* retenido por el papel filtro anteriormente pesado, este papel más la biomasa llevando a un horno de 80 °C hasta llegar a peso constante. Una vez logrado su peso constante se emplearon las ecuaciones (6) y (7).

$$W \text{ seco} = W \text{ papel con Bx seca} - W \text{ papel filtro seco} \quad (6)$$

$$W \text{ seco} = \frac{\text{gramos de Bx}}{50 \text{ ml de extracto}} \quad (7)$$

- Biomasa inmovilizada

Se tomaron 90 cubos de Luffa sin colonizar y se llevaron a un horno a 80°C hasta peso constante, colocando 9 cubos de Luffa en cada una de las cajas Petri para realizar la inmovilización de acuerdo a lo planteado en el numeral 2.9.3.

Posteriormente 90 cubos de Luffa inmovilizados con *Pleurotus ostreatus* son pesados y secados a 80°C hasta peso constante, se obtuvo la media entre ellos y finalmente se aplicaron las ecuaciones (8) y (9).

$$W_{seco} = W_{seco} Bx \text{ inmovilizada inicial} - W_{seco} \bar{X} \text{ cubos de Luffa} \quad (8)$$

$$W_{seco} = \frac{\text{gramos } Bx \text{ inmovilizada seca}}{\text{cubos de Luffa}} \quad (9)$$

- Biomasa inmovilizada resultante de cada ensayo

Cada uno de los cubos de Luffa del ensayo se pesó y secaron en horno hasta 80°C hasta peso constante para cada uno; posteriormente se aplicó la ecuación (10).

$$W_{seco \text{ final}} = W_{húmedo} Bx \text{ inmovilizada final} - W_{seco} Bx \text{ inicial} \quad (10)$$

Mediante la relación del peso húmedo con el peso seco se estandarizó la biomasa de los tratamientos del diseño experimental. Los resultados se detallan en la Tabla 7-3:

Tabla 6-3: Resultados biomasa inmovilizada utilizando el tratamiento PL

Determinación del peso húmedo	Fórmula	Resultados
Biomasa libre	$W_{húmedo} = \frac{\text{gramos } Bx \text{ húmeda}}{50 \text{ ml de extracto}}$	8,426x10 ⁻³ g/ml
Biomasa inmovilizada	$W_{húmedo} = \frac{\text{gramos } Bx \text{ húmeda inmovilizada}}{\text{cubos de Luffa}}$	17,48g
Biomasa resultante de los ensayos realizados	$W_{húmedo \text{ Final}} = W_{\bar{X}} Bx \text{ inmovilizado final} - W_{\bar{X}} Bx \text{ inmovilizada inicial}$	0,0542g

Determinación del peso seco	Fórmula	Resultados
Biomasa libre	$W_{seco} = \frac{\text{gramos de Bx}}{50 \text{ ml de extracto}}$	0,0166g/ml
Biomasa inmovilizada	$W_{seco} = \frac{\text{gramos Bx inmovilizada seca}}{\text{cubos de Luffa}}$	13,90g
Biomasa resultante de los ensayos realizados	$W_{seco \text{ final}} = W_{\text{húmedo Bx inmovilizada final}} - W_{seco \text{ Bx inicial}}$	0,0298g

Realizado por: Gabriela Medina.2018.

3.3. Conteo de esporas

Las medias de esporas/ml alcanzadas tras la masificación para *Aspergillus niger* se detalla en la Tabla 7-3.

Tabla 7-3: Resultados conteo de esporas

HONGO	MEDIA (esporas/ml)	CONCENTRACIÓN (esporas/ml)
A1	47x10 ⁶	4x10 ⁶
A2	47x10 ⁶	4x10 ⁶
A3	18x10 ⁶	1x10 ⁶
A4	24x10 ⁶	2x10 ⁶
A5	28x10 ⁶	3x10 ⁶
A6	25x10 ⁶	3x10 ⁶
A7	47x10 ⁶	4x10 ⁶
A8	28x10 ⁶	3x10 ⁶

Realizado por: Gabriela Medina.2018.

3.3.1. Preparación del inóculo de *Aspergillus niger*

A partir de pruebas iniciales se determinó que 150ml es el volumen apropiado de *Aspergillus niger* de acuerdo al número de esporas alcanzado después 5 días a 30 °C esto permitió calcular el volumen adecuado ajustando a la concentración inicial aproximada de 3x10⁶ esporas/ml, concentración recomendada por (Jaramillo, y otros, 2014). Para evaluar el porcentaje de degradación del colorante negro reactivo 5.



Figura 5-3: Masificación de *Aspergillus niger*
Fuente: Gabriela Medina. 2018.

3.4. Preparación del baño de efluente

Para controlar las condiciones ambientales apropiadamente se cubrió con una caja de poliestireno expandido, adaptando mangueras conectadas a un motor de pecera de 3.5 W para la oxigenación; con temperaturas que oscilan entre 35°-37°C.

3.5. Cinética de remoción de colorantes textiles por tratamientos biológicos

La cinética de remoción permitió la evaluación de los parámetros porcentaje de decoloración y concentración de colorante; bajo condiciones ambientales controladas por un periodo de 18 días dicha evaluación permitió determinar que *Pleurotus ostreatus* presenta mejores resultados de remoción del colorante, para el colorante negro reactivo 5.

Para esto se llevó a cabo una fase inicial de saturación de los cuadrados de *Luffa Cylindrica*, con el fin de descartar la posibilidad de que la remoción de los colorantes se genere por adsorción del soporte de inmovilización. Luego de esta fase de saturación se reajustó la concentración inicial de los colorantes para posteriormente evaluar la remoción de estos asociados con degradación, como se observa en la figura 6-3.



Figura6-3: Inmovilización de *Pleurotus ostreatus* con *Luffa Cylindrica*
Fuente: Gabriela Medina. 2018.

De acuerdo a las pruebas de saturación realizadas; para cada hongo se emplearon las mismas concentraciones en el ensayo de *Aspergillus niger* y *Pleurotus ostreatus* para el colorante negro reactivo 5. La fase de saturación se dio por un período de 5 horas y 30 minutos, luego fue ajustada nuevamente la concentración de la solución a la inicial, garantizando que la disminución de la concentración del colorante en la solución no ocurre por adsorción del soporte vegetal, sino por remoción de los hongos.

Durante todo el proceso se llevó a cabo al mismo tiempo una cinética usada como control abiótico, que tenía la misma cantidad de *Luffa Cylindrica*, pero sin ningún microorganismo inmovilizado.

3.6. Evaluación del porcentaje de decoloración

Las unidades de color se midieron en un espectrofotómetro marca Labo Med.Inc UV-2602 SPECTRO UV-VIS AUTO a una longitud de onda de 450nm empleando como blanco agua destilada la densidad óptica se transforma a unidades de color a través de la ecuación (11).

$$UC = \frac{500+A2}{A1} \quad (11)$$

Donde:

A1; corresponde a absorbancia de 500Uc estandarizada con una solución de platino cobalto (Absorbancia longitud de onda seleccionada por el espectro de absorción).

A2; corresponde a absorbancia del medio (Fernández, y otros, 2009). Para transformar la decoloración en porcentaje se aplicó la ecuación (12).

$$\%Decoloración = \frac{UC\ inicial - UC\ final}{UC\ inicial} * 100 \quad (12)$$

Tabla 8-3: Resultados porcentaje de remoción del colorante NR5

Tratamiento usado	Colorante usado	Concentración Inicial (mg/l)	Concentración Final (mg/l)	Porcentaje de Remoción (%)
P1	Negro Reactivo 5	93,75	15,39	83,58
P2	Negro Reactivo 5	110,49	13,84	87,47
P3	Negro Reactivo 5	79,89	18,45	76,90
P4	Negro Reactivo 5	145,34	14,99	89,68
P5	Negro Reactivo 5	140,72	19,25	86,32
P6	Negro Reactivo 5	155,81	14,12	90,93
P7	Negro Reactivo 5	195,98	122,71	37,38
P8	Negro Reactivo 5	196,07	56,10	71,38
P9	Negro Reactivo 5	171,75	68,74	59,97
A1	Negro Reactivo 5	94,31	10,89	88,45
A2	Negro Reactivo 5	101,37	16,87	83,35
A3	Negro Reactivo 5	95,55	18,47	80,66
A4	Negro Reactivo 5	134,31	54,32	59,55

A5	Negro Reactivo 5	151,67	69,32	54,29
A6	Negro Reactivo 5	175,59	66,80	61,95
A7	Negro Reactivo 5	182,99	98,78	46,01
A8	Negro Reactivo 5	199,25	96,93	51,35
A9	Negro Reactivo 5	186,64	100,87	45,95
C1	Negro Reactivo 5	109,37	104,78	4,19
C2	Negro Reactivo 5	111,74	109,47	2,03
C3	Negro Reactivo 5	89,99	86,78	3,56
C4	Negro Reactivo 5	160,79	158,48	1,43
C5	Negro Reactivo 5	152,67	149,74	1,91
C6	Negro Reactivo 5	143,73	140,89	1,97
C7	Negro Reactivo 5	189,92	188,12	0,94
C8	Negro Reactivo 5	191,21	189,39	0,95
C9	Negro Reactivo 5	197,35	197,00	0,17

Realizado por: Gabriela Medina. 2018.

En los resultados obtenidos de los diferentes tratamientos puede notarse como la remoción de cada uno de los colorantes varía de acuerdo al tratamiento dado. Los hongos lignolíticos *Pleurotus ostreatus* han sido estudiados ampliamente en la remoción de colorantes textiles principalmente de colorantes tipo azo. Pese a que estos hongos no han sido reportados para el colorante usado en este ensayo específicamente, si han sido reportados para la degradación de colorantes de su misma clase (azo, trimetilmetano, antraquinona), logrando así porcentajes de

degradación de 90% incluso 100% para algunos colorantes, en tiempos que varían de 7 a 20 días, esta variabilidad en tiempos y porcentaje se presentará en función de las condiciones del medio, el colorante empleado y su concentración.

Las constantes de remoción permitieron evaluar de forma directa el tiempo que tardó el hongo en retirar el colorante del medio, facilitando determinar que tratamiento es más eficiente en cuanto a velocidad de remoción; pues esta tiende a relacionarse de forma directa con el porcentaje de remoción. De esta forma este último parámetro y la tasa de remoción mayor se presentó para el hongo *Pleurotus ostreatus* con el tratamiento P6; El cual también presentó la tasa más alta de remoción para este colorante y velocidad de remoción con un valor de 90,93%.

Estos datos concuerdan con los reportados por (Fernández, y otros, 2009) , en donde los porcentajes de remoción mayores se presentaron durante el décimo día . Estos resultados podrían atribuirse al proceso de absorción realizado por el soporte, sin embargo durante esta investigación, las mallas con microorganismo inmovilizado fueron saturadas con colorante para posteriormente someterlas al proceso de degradación del colorante. De esta forma, la rápida remoción del colorante por parte de los hongos lignolíticos , así como por *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger*, podría ser atribuida a la acción de enzimas oxidativas producidas por estos microorganismos, en el caso de los hongos lignolíticos, se demostraría la eficacia de los sistemas usados, ya que logra porcentajes de degradación similares a los reportados por otros autores, pero sin el uso de ninguna fuente de carbono adicional, y en periodos cortos de tiempo.

3.6.1. Eficiencia del colorante negro reactivo 5

Se empleó un análisis univariante para identificar si existen diferencias en la concentración de colorante negro reactivo 5 (CNR5) por medio de los tratamientos aplicados. El resultado del test se muestra en la Tabla 9-3.

Tabla 9-3: Pruebas t de muestras relacionadas
Prueba de muestras relacionadas

	Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
				Inferior	Superior			
Par 1 CONCENTRACIÓN INICIAL - CONCENTRACIÓN FINAL	65,065 19	48,98344	9,42687	45,68798	84,44239	6,902	26	,000

Realizado por: Gabriela Medina.2018.

Decisión

Estadísticamente se rechaza la hipótesis nula porque el nivel de significancia es menor a 0,05 ($p=0,000$). Se acepta la hipótesis alternativa (H_1) lo que significa que existen diferencias significativas entre las medias de las concentraciones de colorante negro reactivo 5 porque al menos un tratamiento aplicado es diferente. Se justifica realizar pruebas t de dos muestras relacionadas y realizar comparaciones.

La Tabla 10-3 Indica los subconjuntos de acuerdo a las medias de las concentraciones de colorante negro reactivo 5 (CNR5) y el porcentaje de decoloración

Tabla10-3: Estadísticos de muestras relacionadas

Estadísticos de muestras relacionadas

	Media	N	Desviación típ.	Error típ. de la media
Par 1 CONCENTRACIÓN FINAL	81,5367	27	60,52004	11,64709
PORCENTAJE DE DECOLORACIÓN	47,1230	27	35,60703	6,85258

Realizado por: Gabriela Medina.2018.

Se muestran las medias de la concentración final y el porcentaje de decoloración

El término error es la media cuadrática (Error)= 1164709,00

- *Concentración de colorante negro reactivo5 vs Tratamientos aplicados*

Tabla11-3: Correlaciones de muestras relacionadas

Correlaciones de muestras relacionadas		N	Correlación	Sig.
Par 1	CONCENTRACIÓN FINAL y PORCENTAJE DE DECOLORACIÓN	27	-,920	,000

Realizado por: Gabriela Medina.2018.

El análisis de correlaciones muestra homogeneidad entre las medias obtenidas en los tratamientos que presentan menor concentración de colorante en estudio es el tratamiento *Pleurotus ostreatus* siendo P2 el tratamiento que reporta la menor concentración de colorante negro reactivo 5 por encontrarse a una dosis de 100 ppm como se observa en el Gráfico 2-3:

Concentración de colorante negro reactivo 5 vs Tratamiento de *Pleurotus ostreatus*

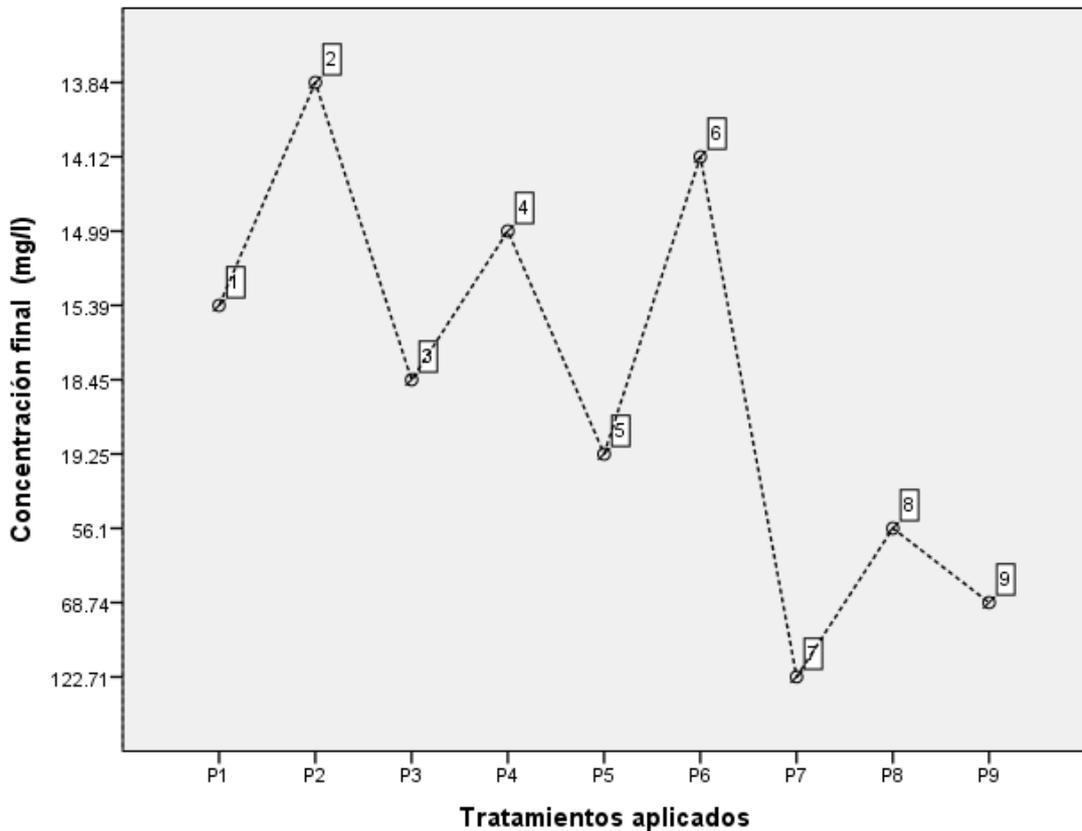


Gráfico2-3: Concentración de colorante negro reactivo5 vs Tratamiento *Pleurotus ostreatus*

Realizado por: Gabriela Medina.2018.

Para *Aspergillus niger* A1 es el que tratamiento que alcanzó menor concentración de colorante negro reactivo 5 (CNR5) al término de los 18 días de experimentación se evidencia también que este hongo es eficiente para la remoción de colorantes a una dosis de 100 ppm. Como se observa en el Gráfico 3-3.

Concentración de colorante negro reactivo 5 vs Tratamiento Aspergillus niger

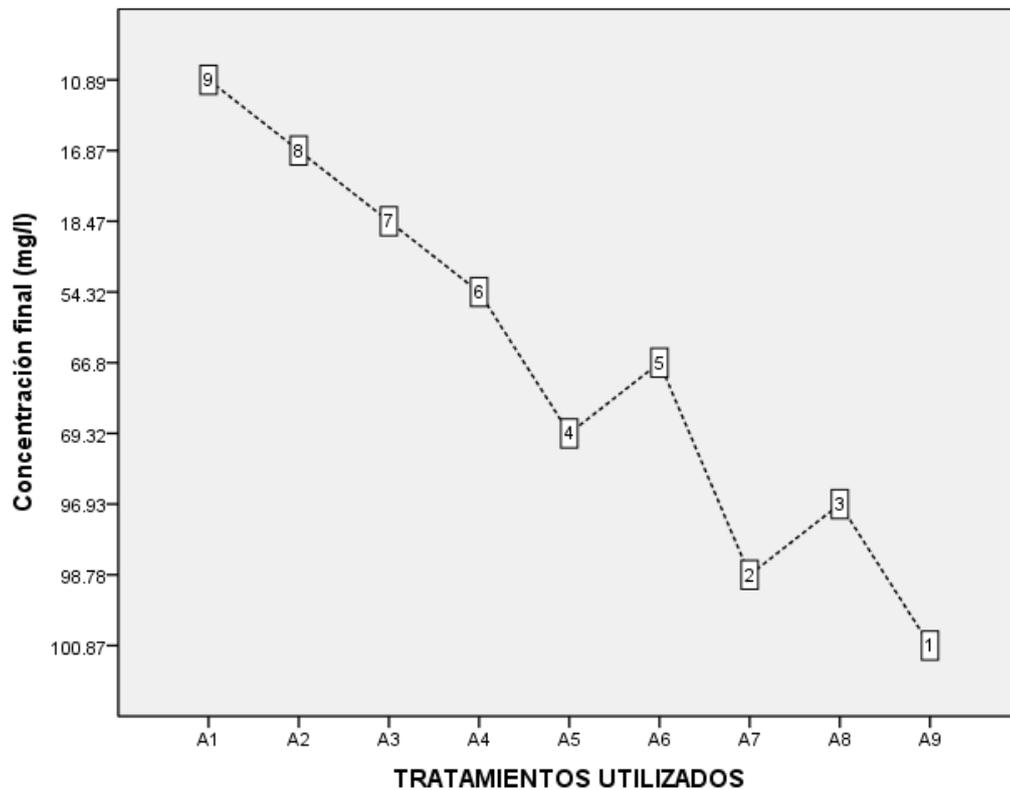


Gráfico3-3: Concentración de colorante negro reactivo5 vs Tratamiento Aspergillus niger
Realizado por: Gabriela Medina.2018.

- *Tiempo de experimentación*

Tabla 12-3: Diferencias relacionadas respecto a los días
Prueba de muestras relacionadas

	Diferencias relacionadas					t	gl	Sig. (bilateral)
	Media	Desviación típ.	Error típ. de la media	95% Intervalo de confianza para la diferencia				
				Inferior	Superior			
Par 1 CONCENTRACIÓN FINAL - Días	6,56000	7,12739	4,11500	-11,14542	24,26542	1,594	2	,252

Realizado por: Gabriela Medina.2018.

La prueba t de muestras relacionadas para la concentración del colorante negro reactivo 5 (mg/l) respecto a los días de tratamiento transcurridos, muestra homogeneidad entre las medias de (CNR5) en los días 1,9,18, la menor concentración de (CNR5) se

encuentra en el día 18 siendo el día cuando hubo la menor concentración como se observa en el Gráfico 4-3.

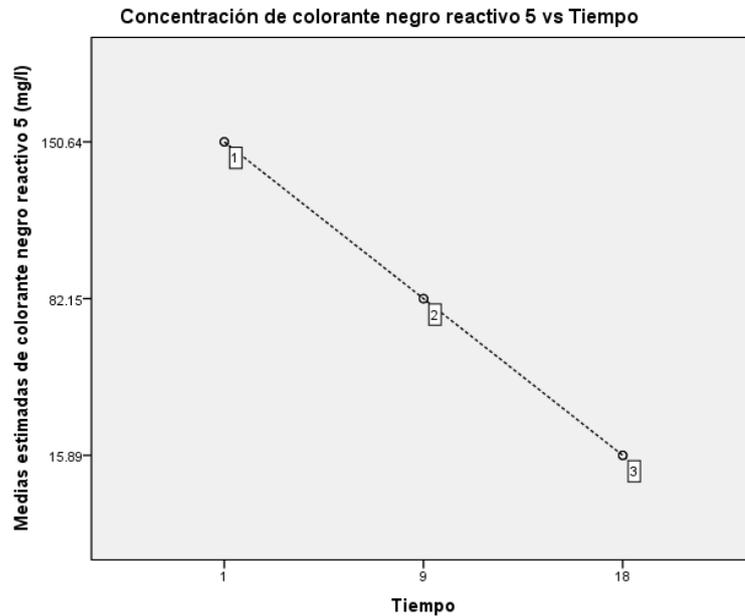


Gráfico4-3: Concentración de colorante negro reactivo5 vs Tiempo
Realizado por: Gabriela Medina.2018.

De acuerdo al análisis comparativo, la mayor reducción de colorante negro reactivo 5 se produjo con el tratamiento P2 y dosis de 100 ppm de (CNR5) al día 18

En el Gráfico 4-3 se presenta el comportamiento del colorante a lo largo del tiempo de experimentación. La línea horizontal segmentada muestra el parámetro inicial, se observa una disminución progresiva en la concentración de colorante negro reactivo 5 en los tratamientos *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger*.

- Porcentaje de decoloración

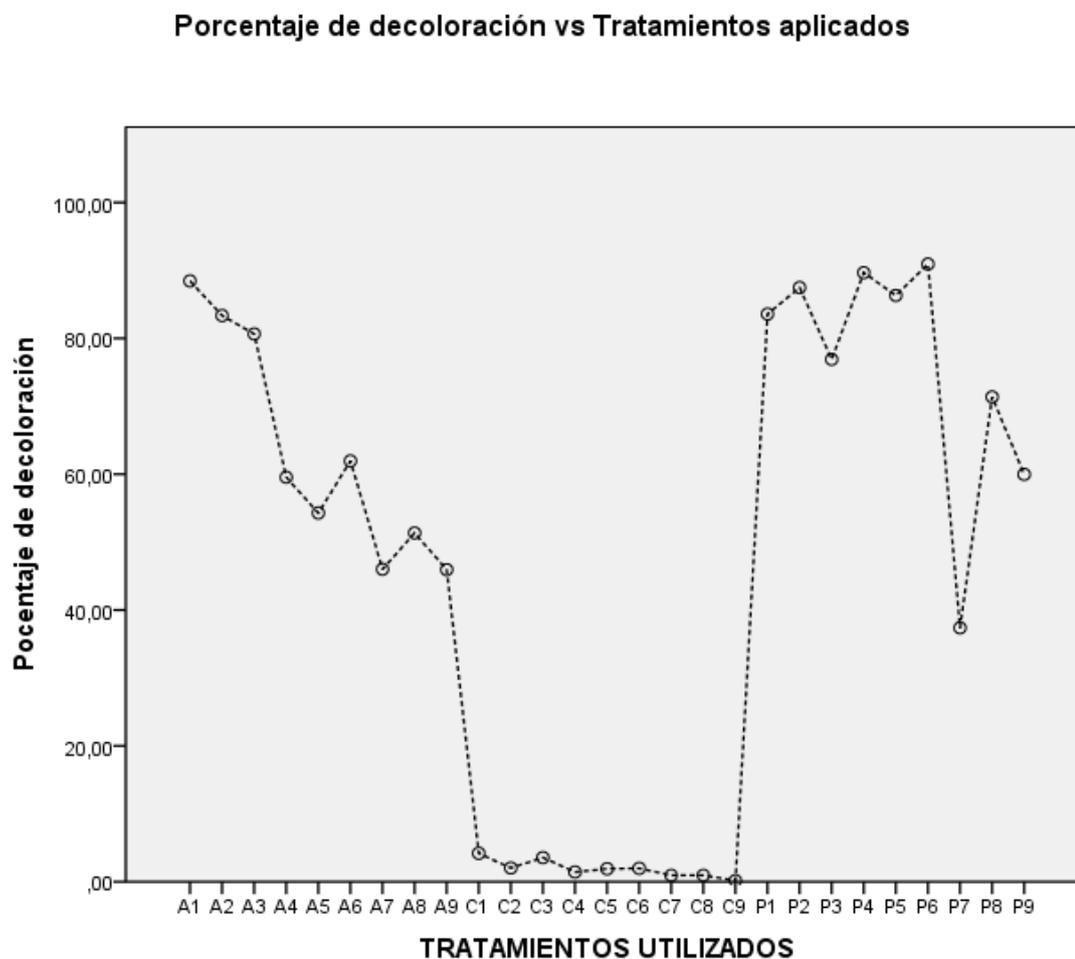


Gráfico5-3: Porcentaje de decoloración vs Tratamientos aplicados
Realizado por: Gabriela Medina.2018.

Todos los tratamientos, incluido el control redujeron la concentración de colorante negro reactivo 5, los tratamientos que presentaron mayor porcentaje de reducción fueron *Pleurotus ostreatus*, *Aspergillus niger* 90,93%, y 88,45% respectivamente confirmando la hipótesis que la utilización de hongos de podredumbre blanca degrada colorante negro reactivo 5 en aguas residuales generadas en la etapa de tinturado el tratamiento control llegó a una reducción de 4,19% , pese a esto se observa que la reducción no fue progresiva con respecto al tiempo.

Los porcentajes obtenidos asemejan resultados reportados por (Fernández, y otros, 2009) quienes mencionan un 95% y (Moreno, y otros, 2008) un 97% de reducción en la concentración de colorante negro reactivo 5 dicha investigación se realizó usando consorcios de hongos con actividad enzimática en aguas residuales de Curtición de pieles.

Los porcentajes de remoción de colorante negro reactivo 5 propuestos por los tratamientos *Pleurotus ostreatus*, *Aspergillus niger* confirman los resultados expuestos por (Moreno, y otros, 2008), (Liu, y otros, 2006) y (Garzón, 2009) quienes señalan a *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger* como productores de enzimas lignolíticas. El tratamiento con *Aspergillus niger* fue el que menor porcentaje de remoción de colorante negro reactivo5 presentó, aunque el hongo evidencio crecimiento en medio líquido con colorantes vegetales, el comportamiento no se replicó en las unidades experimentales, esto puede atribuirse a la facilidad de degradar la celulosa del colorante vegetal adicionalmente los datos llevan a pensar que esta enzima hubiese podido mostrar una mayor remoción si el medio líquido mas (CNR5) presentara un pH optimo como el sugerido por (Lucas, y otros, 2001) que oscila a 2.5, lo cual contrasta con esta investigación ya que el pH se mantuvo por encima de 2.5 . Otra causa posible la actividad de esta enzima es limitada por exceso de peróxido de hidrogeno generado de la acción de la glioxal oxidasa, la cual puede ser controlada con la adición de triptófano que cumple la misma función.

La remoción de colorante negro reactivo 5 en el tratamiento de control alcanzó el 4,19% debido a la oxigenación a la que estaban expuestas las unidades experimentales, la disminución del colorante pudo haber surgido debido a la velocidad de adsorción de las moléculas de la superficie que una vez colisionadas se adhieren a una temperatura fija, la adsorción está limitada por la cantidad de sitios en la superficie donde pueden ser adsorbidas las moléculas del colorante negro reactivo 5.

- *Análisis Adicionales*

Para determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos aplicados y las concentraciones finales de los parámetros DBO₅, DQO, oxígeno disuelto, solidos totales y pH se realizaron análisis estadísticos con pruebas de comparaciones de medias.

- *DBO₅*

En el Gráfico 6-3 se presentan las medias de DBO₅ obtenidas al final de la experimentación para cada tratamiento. La línea horizontal representa la concentración inicial del parámetro, se observa que el tratamiento *Pleurotus ostreatus* presentó la menor concentración lo que corresponde a un porcentaje 75% los tratamientos *Aspergillus niger* y el Control provocan una reducción del 51% y 13% respectivamente, sin embargo, a nivel estadístico todos los tratamientos generan resultados similares.

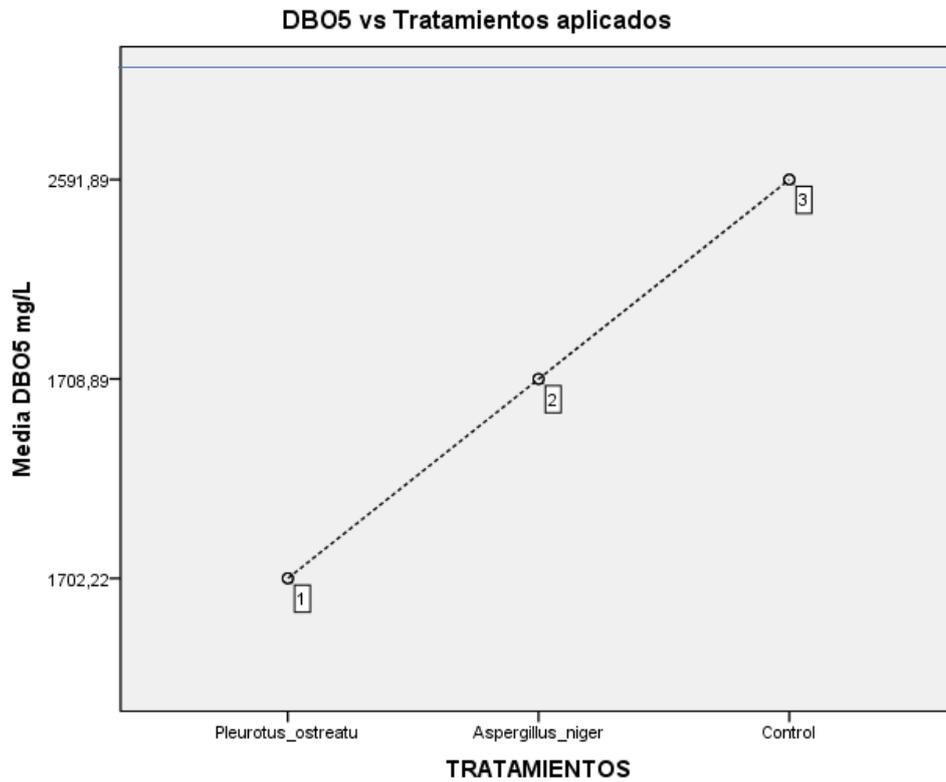


Gráfico6-3: DBO5 vs Tratamientos aplicados
Realizado por: Gabriela Medina.2018.

- *DQO*

En el Gráfico 7-3 se presentan las medias de DQO obtenidas al final de la experimentación para cada tratamiento. La línea horizontal representa la concentración inicial del parámetro, se observa que el tratamiento *Pleurotus ostreatus* presentó la menor concentración lo que corresponde a un porcentaje 63% los tratamientos *Aspergillus niger* y el Control provocan una reducción del 53% y 10% respectivamente, sin embargo, a nivel estadístico todos los tratamientos generan resultados similares.

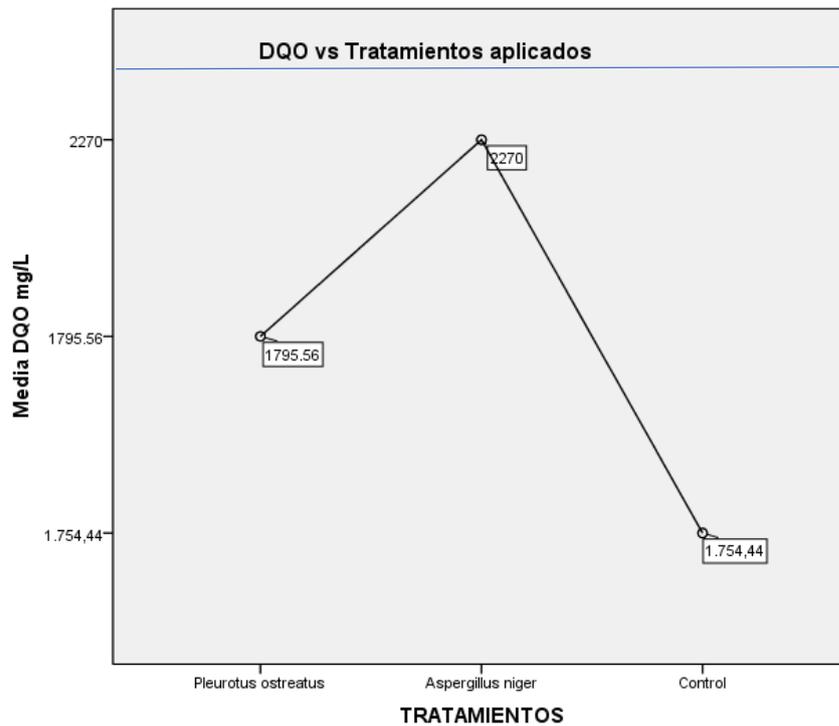


Gráfico 7-3: DQO vs Tratamientos aplicados
Realizado por: Gabriela Medina.2018

- *Oxígeno disuelto*

En el Gráfico 8-3 se presentan las medias de Oxígeno disuelto obtenidas al final de la experimentación para cada tratamiento. La línea horizontal representa la concentración inicial del parámetro, se observa que el tratamiento *Pleurotus ostreatus* presentó la menor concentración lo que corresponde a un porcentaje 63% los tratamientos *Aspergillus niger* y el Control provocan una reducción del 53% y 10% respectivamente, sin embargo, a nivel estadístico todos los tratamientos generan resultados similares.

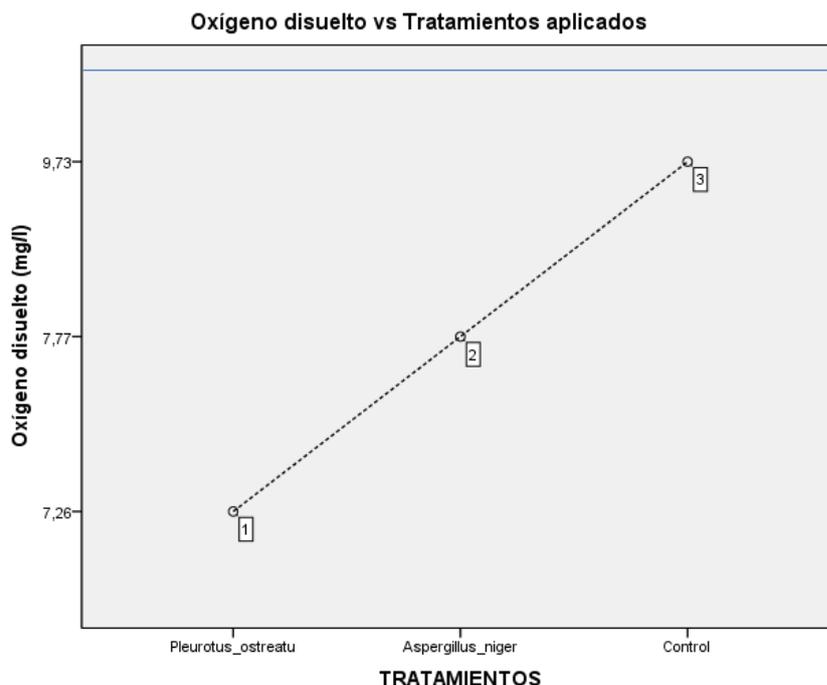


Gráfico 8-3: Oxígeno disuelto vs Tratamientos aplicados
Realizado por: Gabriela Medina.2018

- *Sólidos totales*

En el Gráfico 9-3 se presentan las medias de sólidos totales obtenidas al final de la experimentación para cada tratamiento. La línea horizontal representa la concentración inicial del parámetro, se observa que el tratamiento *Aspergillus niger* presentó la menor concentración lo que corresponde a un porcentaje 51% los tratamientos *Pleurotus ostreatus* y el Control provocan una reducción del 42% y 12% respectivamente, sin embargo, a nivel estadístico todos los tratamientos generan resultados similares.

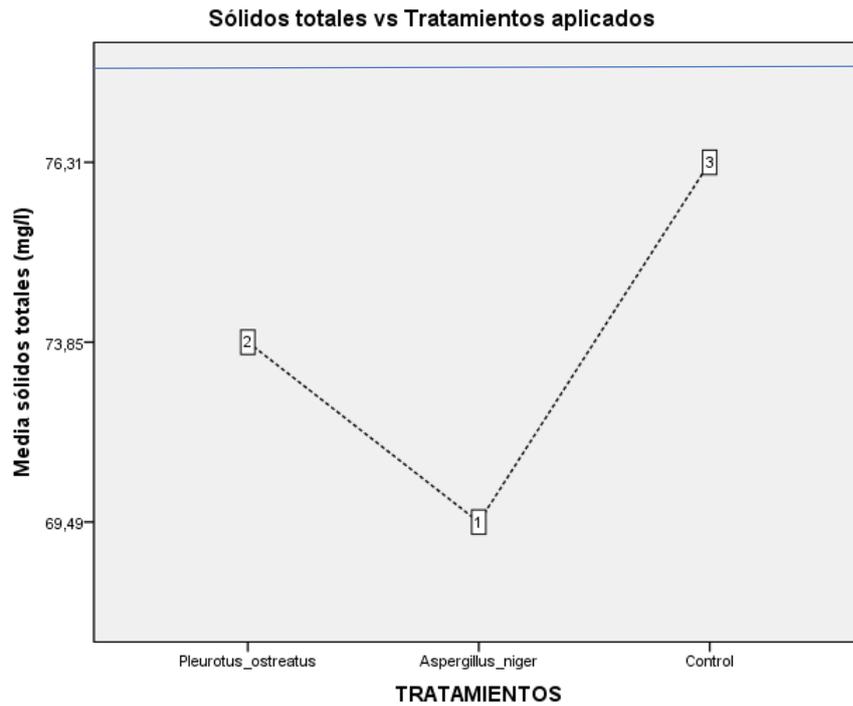


Gráfico 9-3: Sólidos totales vs Tratamientos aplicados
Realizado por: Gabriela Medina.2018

- *pH*

En el Gráfico 10-3 se presentan las medias de pH obtenidas al final de la experimentación para cada tratamiento. La línea horizontal representa la concentración inicial del parámetro, se observa que el tratamiento *Pleurotus ostreatus* presentó la menor concentración lo que corresponde a un porcentaje 63% los tratamientos *Aspergillus niger* y el Control provocan una reducción del 32% y 9% respectivamente, sin embargo, a nivel estadístico todos los tratamientos generan resultados similares.

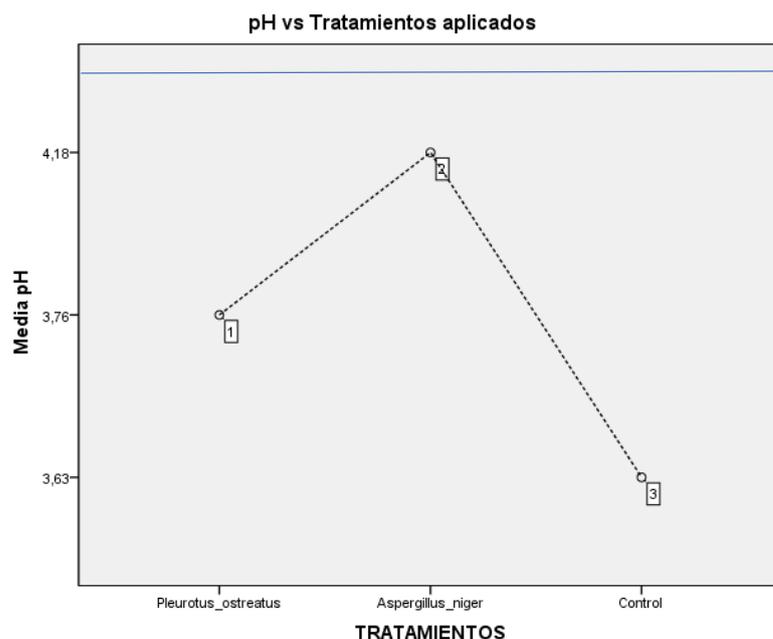


Gráfico 10-3: pH vs Tratamientos aplicados
Realizado por: Gabriela Medina.2018

3.6.2. Control crecimiento microbiano

Los resultados correspondientes a los cultivos del agua residual de las unidades experimentales a los 1, 9, 18 días de tratamiento se observan en la Tabla 13-3.

Tabla 13-3: Crecimiento de los hongos en las unidades experimentales

	<i>Pleurotus ostreatus</i>	<i>Aspergillus niger.</i>
DÍA 1	ALTO (+++)	MEDIO (++)
DÍA 9	BAJO (+)	BAJO (+)
DÍA 18	NO VISIBLE (-)	NO VISIBLE (-)

Realizado por: Gabriela Medina.2018.

Estos valores son semejantes a los reportados por varios autores (Fernández, y otros, 2009) para residuales de curtiembre. A nivel microbiológico la presencia de bacterias de la especie *bacillus*, heterótrofos totales 77000 UFC/100ml, y hongos filamentosos en diversas concentraciones.

CONCLUSIONES

- Los resultados de los parámetros medidos del agua residual presentaron los siguientes valores de 3,2 para pH, 24°C de temperatura, 48800 mg/l de sólidos totales, 22580 mg/l de sólidos disueltos, 89900 mg/l de DBO₅, 101000 mg/l de DQO, 4470 μS/cm de conductividad, 153,78 Utn de turbidez, 8014 Pt Co de color, 7,11 mg/l de oxígeno disuelto. De los resultados de la caracterización físico-química se determina que el agua residual requiere tratamiento biológico.
- Los hongos de podredumbre blanca han mostrado gran potencial para degradar colorantes, esta propiedad se debe a que poseen un complejo de enzimas oxidativas extracelulares que se emplea para la degradación de la lignina. *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger*, si tienen capacidad para degradar CNR5 debido al sistema de multienzimas que tiene. Para *Pleurotus ostreatus* 90,93% y *Aspergillus niger* 88,45% con concentraciones de 150 y 100ppm respectivamente en medio líquido para el colorante negro reactivo 5, después de 18 días de tratamiento a escala de laboratorio.
- La decoloración durante la cinética realizada, se dio principalmente durante los 9 primeros días, en el caso de *Pleurotus ostreatus* para todas las concentraciones del colorante negro reactivo 5. Y *Aspergillus niger* al término de los 18 días de experimentación
- Empleando un análisis univariante con el programa estadístico IBM SPSS versión 21 se encontraron diferencias significativas entre las medias de concentración de CNR5 respecto a los tratamientos utilizados. por medio de la prueba de comparación de medias t para muestras relacionadas el tratamiento P6 causó mayor remoción en la concentración del colorante negro reactivo 5 al finalizar los 18 días.
- De las cepas evaluadas se seleccionó a *Pleurotus ostreatus* inmovilizado con estropajo vegetal *Luffa cylindrica* colonizado en medio sólido (CMS), presentando elevada porosidad, adsorción y actividad biológica para la remoción de (CNR5). Siendo eficiente a diferentes concentraciones del colorante (100-150-200 ppm), y bajo condiciones de operación a escala de laboratorio fue capaz de remover el 90,93% mediante un sistema enzimático único que funciona en el ambiente extracelular, mecanismo que permite que estas enzimas sean catalíticamente activas sobre una gran diversidad de sustratos orgánicos, la biomasa fúngica se inmovilizó en soportes biodegradables y porosos que combinan las propiedades físicas de la matriz sólida con el potencial bioquímico del hongo inmovilizado.

RECOMENDACIONES

- Evaluar la remoción del color de efluentes textileros utilizando *P. ostreatus* inmovilizado con estropajo vegetal bajo las condiciones evaluadas en esta investigación a escala piloto.
- Determinar el número de ciclos operativos que puede resistir el soporte inmovilizado conformado en la investigación
- Desarrollar bioensayos con el fin de valorar la toxicidad en organismos vivos de los compuestos generados día a día durante la curva de remoción.
- Emplear residuos de plantas como el banano que poseen cantidades significativas de lignina, como potencial degradador de colorantes.
- Continuar desarrollando bioensayos con el fin de valorar la toxicidad en organismos vivos de los compuestos generados día a día durante la curva de remoción CNR5.

BIBLIOGRAFÍA

AGOSIN, Eduardo; et al. “Isolation, selection and characterization of Chilean ligninolytic fungi”. *Laboratorio de Biotecnología, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos* [en línea], 1990, (Chile) 23, pp.41-49. [Consulta: 29 agosto 2017]. Disponible en: http://www.biologiachile.cl/biological_research/VOL23_1990/N1/Herman_Silva_et_al.pdf.

ALEXANDER, M. “Biodegradation and bioremediation”, *Academic Press*, 1994, (USA), 2(2), pp. 56 [Consulta: 4 diciembre 2017]. Disponible en: <http://www.sci epub.com/reference/47260>

ALKORTA, Itziar; et al . “Biorremediación y Ecología”. *Ecosistemas Revista científica y técnica de ecología y medio ambiente* [en línea], 2002,(España)3. [Consulta: 31 agosto 2017]. Disponible en:

<https://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/viewFile/591/558>

AMAYA, Diana; et al. “Evaluación de tres hongos lignolíticos y de *Aspergillus niger* como alternativa para el tratamiento de aguas residuales del curtido de pieles” . *Revista internacional de contaminación ambiental* [en línea IMPRESA], 2008, (México) 24(3), pp.93-106. [Consulta: 2 septiembre 2017]. ISSN 0188-4999. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v24n3/v24n3a1.pdf>

AMES, Teresa; & CAÑEDO, Verónica. *Manual de Laboratorio para el manejo de Hongos Entomopatógenos.* [En línea]. Lima-Perú: CIP, 2004 [Consulta: 31 agosto 2017]. Disponible en: <http://cipotato.org/wp-content/uploads/2014/09/AN65216.pdf>

ANGULO, Luis; et al “issuu” *Colorantes* [en línea], 2017, México, [Consulta: 02 marzo 2018]. Disponible en: <https://issuu.com/euniceeunice/docs/colorantes>

ARANAÍ, Carmen; et al “Determinación de la biomasa en procesos biológicos” *Artículos Técnicos* [en línea], 2000, Sevilla, [Consulta: 02 marzo 2018]. Disponible en:

http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/tvolke/00_Determin-BM.pdf

APHA Method 2550. *Temperature. Parte B: Laboratory and Field Methods.*

APHA Method 4500-H+. *pH Value. Parte B: Electronic Method.*

ARIAS-CARBAJAL, G.; et al. “Biotransformación de Residuos Lignocelulósicos con hongo *Pleurotus*”. *CENIC Ciencias Biológicas*, [en línea], 2005, La Habana-Cuba 36. [Consulta: 10 abril 2018] ISSN: 0253-5688. Disponible en:

<http://www.redalyc.org/pdf/1812/181220525083.pdf>

ARAUJO, Ismenia.; et al. “Biorremediación de aguas contaminadas con derivados de hidrocarburos utilizando cepas bacterianas autóctonas “*Centro de Investigación del Agua*, [en línea], 2016, México [Consulta: 10 abril 2018] Disponible en:

https://www.researchgate.net/publication/228546637_Biorremediacion_de_aguas_contaminadas_con_derivados_de_hidrocarburos_utilizando_cepas_bacterianas_autoctonas.

ASGHER, M.; et al. “Laccase mediated decolorization of vat dyes by *Coriolus versicolor* IBL-4”. *International Biodeterioration & biodegradation*, vol.62, n°4 (2008), (Pakistan), pp.465-470.

BANAT, I; et al. “Microbial decolourization and degradation of textile dyes”. *Applied Microbiology Biotechnology*, [en línea], 2000, (USA)1(1975),pp.81-87. [Consulta: 13 septiembre 2017]. ISSN 1432-0614. Disponible en:

<https://link.springer.com/article/10.1007/s002530000587#citeas>

BAUDER, J.; & SIGLER, A. “Alcalinidad, pH y sólidos disueltos totales” *Well Educated*, [en línea], (USA). [Consulta: 13 septiembre 2017]. ISSN 1432-0614. Disponible en:

http://region8water.colostate.edu/PDFs/we_espanol/Alkalinity_pH_TDS%202012-11-15-SP.pdf

BARR, D.; & AUST, S. “Mechanisms White-rot fungi use to degrade pollutants”. *Environmental Science & Technology* vol.28, n°2 1994, (EE. UU) pp.78 A-87 A.

BERMUDEZ, Rosa; et al. “Tratamiento de efluentes industriales”. *Rev Iberoamericana de Micología* , [en línea], 2003, (Cuba), pp.164-168. [Consulta: 4 septiembre 2017]. ISSN 1130-1406 Disponible en:

<http://www.reviberoammicol.com/2003-20/164168.pdf>

BJÖRKQVIST, B. “Separation and determination of aliphatic and aromatic amines by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection”. *Journal of Chromatography A*, n°204 (2002), Finlandia pp. 109-114.

BUSTILLO, Alex. “Método para cuantificar suspensiones de esporas de hongos y otros organismos” *Centro de Investigación en Palma de Aceite, Cenipalma*, 2010 (Colombia). [Consulta: 4 septiembre 2017]. Disponible en:

https://www.researchgate.net/publication/277870402_METODO_PARA_CUANTIFICAR_SUSPENSIONES_DE_ESPORAS_DE_HONGOS_Y_OTROS_ORGANISMOS

CALAZA MARTINEZ, Pedro. *Revisión bibliográfica y análisis comparativo de métodos de evaluación de riesgo de arbolado urbano* [en línea] (tesis). (Doctorado) Universidad de Santiago de Compostela, Galicia, España. 2007. pp. 50-51 [Consulta: 20 septiembre 2017]. ISBN: 978-84-9750-871-1 Disponible en:

<http://hdl.handle.net/10347/2324>

CARDONA, Mariana; et al. “Degradación de colorantes industriales con hongos ligninolíticos.” *Revista Facultad de Ingeniería Universidad de Antioquia* , [en línea], 2009, (Colombia), pp.27-37. [Consulta: 2 septiembre 2017]. ISSN 0120-6230 Disponible en:

<http://www.redalyc.org/pdf/430/43016337003.pdf>

CASTRO, Javier; et al. “Decoloración de aguas residuales provenientes de la industria textil” *Avances.indd*, [en línea], 2011, (México), pp. 115-118 [Consulta: 20 septiembre 2017]. Disponible en:

https://www.uaeh.edu.mx/investigacion/productos/6199/decoloracion_de_aguas_residuales_provenientes_de_la_industria_textil.pdf

CERVANTES, Elsa; et al. “Degradación de negro reactivo adsorbido en un residuo queratinoso” *Centro de Investigación y de Estudios Avanzados* [en línea], (México) [Consulta: 20 septiembre 2017]. Disponible en:

http://asociacionmexicanamicrobiologia.org.mx/wpcontent/uploads/2016/08/CERVANTES_ELSA_400.pdf

CEPIS Publicaciones [en línea]. Lima. Informe técnico sobre minimización de residuos en una curtiembre. [Consulta: 23 septiembre 2017]. Disponible en:

<http://www.bvsde.paho.org/eswww/fulltext/gtz/infomini/minimiz1.html>

CHANAGÁ, Xiomara; et al. “Hongos Nativos con Potencial Degradador de Tintes Industriales en el Valle de Aburrá, Colombia” *Fac.Nac. Agron.* [En línea] ,65(2) (Colombia).2012. pp. 2-5[Consulta: 20 septiembre 2017]. ISBN: 6817-6827. Disponible en:

<https://revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/download/36485/38412>

CIDTA. “Características de las aguas residuales” [en línea]. [Consulta: 22 octubre2017]. Disponible en:

<http://cidta.usal.es/cursos/ETAP/modulos/libros/Caracteristicas.PDF>

CORONEL OLIVARES, Claudia; et al. “Contaminación generada por colorantes de la industria textil.” *Revista de la Universidad Autónoma de Hidalgo RIA-UAEH*, [en línea], s.f., (México), [Consulta: 15 septiembre 2017]. Disponible en:

<https://www.uaeh.edu.mx/scige/boletin/prepa4/n3/e1.html>

CORTÁZAR MARTÍNEZ, Adriana. “Decoloración del colorante rojo ácido 27 utilizando un cultivo mixto de *Trametes versicolor* y *Pseudomonas pútida*, diseñado para el tratamiento de efluentes textiles”. (Tesis) (Doctorado) [En línea], Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Área Académica de Química. (México). 2013. pp. 18-37. [Consulta: 13 de agosto 2017]. Disponible en:

<https://repository.uaeh.edu.mx/bitstream/bitstream/handle/123456789/15764/CORTAZAR%20OMA%20DOCTORADO%20EN%20CIENCIAS%20AMBIENTALES.pdf?sequence=2>

CORTÁZAR, Adriana.; et al. “Biotechnology applied to the degradation of textile industry dyes” *Universidad y Ciencia* [en línea], 2012, (México) vol28 (2). [Consulta: 18 octubre2017]. ISSN0186-2979 (Impresa) Disponible en:

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-29792012000200009

CORTON, E; & VIALE, A. “Solucionando grandes problemas ambientales con la ayuda de pequeños amigos: las técnicas de biorremediación” *Revista Científica y Tecnica de Ecología y Medio Ambiente* [en línea], 2006, (Argentina). vol 15(3). pp. 148-155 [Consulta: 2 octubre2017] ISSN 148-157 Disponible en:

<https://www.revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/download/499/476>

COSMOTEX. “Colorantes Sintéticos” *Cosmotex*, [en línea], 2014, España [Consulta: 18 octubre2017]. Disponible en:

<http://www.cosmotex.net/es/content/colorantes-sint%C3%A9ticos>

CRESPI ROSELL, Marti.; et al “Tratamiento electroquímico y reutilización de efluentes de tintura” *Revista Química Textil* [en línea], 2009, (España), pp.41-45. [Consulta: 18 octubre2017]. ISSN0300-3418 Disponible en:

<http://hdl.handle.net/2117/8487>

DER ZERR, F.; & VILLAVERDE, S. “Combined anaerobic-aerobic treatment of azo dyes-A short review of bioreactor studies”. *Water Research*, vol.39, nº8 (2005), (EE. UU) pp. 1424-1440.

DUQUE, N. “Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de *Miconia caudata*, *Miconia sp*, *Clidemia hirta* y *Hamelia patens*; frente a los hongos *Aspergillus niger* y *Candida albicans*.” (Tesis) [en línea], Universidad Tecnológica de Pereira, Facultad de Tecnología, Programa de Tecnología Química. Pereira (Colombia). 2008. pp 9-11. [Consulta: 22 octubre2017]. Disponible en:

<http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/1821/6602842D946.pdf?sequence=1>

ELLIS, David. *Micology Online* [en línea]. Australia, The University of Adelaide, [Consulta: 22 octubre2017]. Disponible en:

<https://mycology.adelaide.edu.au/descriptions/hyphomycetes/aspergillus/>

ESPARZA, Eliana.; & GAMBOA, Nadia. “Contaminación debida a la industria de la curtiembre” *Revista de Química*, 2001, (Perú). vol 15(1), pp. 42-44. [Consulta: 22 octubre2017]. Disponible en:

<http://revistas.pucp.edu.pe/index.php/quimica/article/viewFile/4756/4757>

FERNANDEZ, Jorge.; et al .” Inmovilización de hongos ligninolíticos para la remoción del colorante negro reactivo 5” *Revista colombiana de biotecnología*. [en línea],2009, (Colombia), pp. 59-72[Consulta: 22 octubre2017]. ISSN 1909-8758. Disponible en:

<https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/10322>

FLORES CEPEDA, José “Evaluación del impacto ambiental de los procesos de ribera, curtido y acabados de pieles en la empresa ecuatoriana de curtidos Salazar” (Tesis) [en línea], Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Facultad de Ciencias Pecuarias, Carrera de Ingeniería Zootécnica. Riobamba (Ecuador).2015. pp.5-8 [Consulta: 22 octubre2017]. Disponible en:

<http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/5235/1/Tesis.pdf>

FU, Y.; & VIRARAGHAVAN, T. “Removal of Congo Red from an aqueous solution by fungus *Aspergillus niger*”. *Advances in Environmental Research*, vol.7, n°1 (2002), (Canadá) pp. 239-247.

GARCÍA, Liliana. “Decoloración fúngica de efluentes industriales con colorantes azo en sistemas de biofiltración con diferentes empaques orgánicos” (Tesis) (Maestría) [en línea], Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Ingeniería. Campus Morelos (México).2007. pp. 61-79 [Consulta: 26 octubre2017]. Disponible en:

<http://www.ptolomeo.unam.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/132.248.52.100/1958/garciasanchez.pdf?sequence=1>

GARCÍA, Juan.; “Las Aguas Residuales en La Industria de Curtiembres” *SCRIBD*, 2016. [Consulta: 26 octubre2017]. Disponible en:

<https://es.scribd.com/document/326050992/Las-Aguas-Residuales-en-La-Industria-de-Curtiembres>

GARCÍA, Julián.; et al. *Research Gate* [Consulta: 26 octubre2017]. Disponible en:

https://www.researchgate.net/figure/Estructuras-quimicas-de-A-Cristal-Violeta-B-Negro-Reactivo-5-A-la-derecha-se_fig1_236965336

GARCÍA, Manuel.; “Características de las aguas residuales”, *Centro de Investigación y desarrollo tecnológico del agua*, (2001), (España) [en línea]. [Consulta: 26 octubre2017]. Disponible en:

<http://cidta.usal.es/cursos/ETAP/modulos/libros/Caracteristicas.PDF>

GARCÍA, Mariano et al. *Biotecnología Alimentaria* [en línea]. México, Limusa, 1993. [Consulta: 26 octubre2017]. ISBN: 9681845226. Disponible en:
https://books.google.com.ec/books?id=2ctdvBnTa18C&printsec=frontcover&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

GESTA-AGUA. “Informes Técnicos” *Digesa*, [en línea]. [Consulta: 26 octubre2017]. Disponible en:
http://www.digesa.minsa.gob.pe/DEPA/informes_tecnicos/GRUPO%20DE%20USO%201.pdf

GERMILLAC, Mercedes. “Curtiembre- Tanning”. *Virtual PRO*, (2007), (Argentina) ISSN 19006241

GÓMEZ-BERTEL.; et al. “Evaluación de *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor*, *Pleurotus ostreatus* y *Aspergillus niger* como alternativa para el tratamiento de aguas residuales del curtido de pieles”. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 2008 vol 24, pp. 93-106

GONZÁLEZ, Carmen. “Monitoreo de la Calidad del Agua” *Servicio de Extensión Agrícola*, [en línea], 2011, pp. 2-6. [Consulta: 19 octubre2017]. Disponible en:
<http://academic.uprm.edu/gonzalezc/HTMLobj-862/maguaph.pdf>

GOYENOLA, G. “Guía para la utilización de las Valijas Viajeras - Conductividad” *Red de Monitoreo Ambiental de Sistemas Acuáticos*, 2007, pp. 2-4. [Consulta: 19 octubre2017]. Disponible en:
http://imasd.fcien.edu.uy/difusion/educamb/propuestas/red/curso_2007/cartillas/3-planificacion.pdf

GUILLÉN, Griselda et al. “Producción de biomasa y enzimas lignolíticas por *Pleurotus ostreatus* en cultivo sumergido”. *Revista Iberoamericana de Micología* [en línea], 1998, 15, pp. 302-306. [Consulta: 19 octubre2017]. ISSN 1130-1406. Disponible en:
<http://reviberoammicol.com/1998-15/302306.pdf>

HACH Method 8000. *Oxygen Demand, Chemical USEPA Reactor Digestion Method (multi - range)*.

HACH Method 8025. *Color, True and Apparent. Platinum-Cobalt Method (500 units).*

HARO, Paolo. “Degradación del brodifacoum en suelos mediante el uso del hongo *Pleurotus ostreatus*” (Tesis) [en línea], Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Facultad de Ciencias. Escuela de Ciencias Químicas. Riobamba (Ecuador).2016. pp. 28-31 [Consulta: 12 agosto 2017]. Disponible en:
<http://dspace.epoch.edu.ec/bitstream/123456789/6660/1/236T0262.PDF>

HAEMMERLI,S.;et al. . “Oxidation of Benzo(a)pyrene by extracellular ligninases of *Phanerochaete chrysosporium*”. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 261,nº15 (1986), (United States of America)pp. 6900-6903.

HUANG,Zoe. “Qué son los colorantes reactivos” *Linkedin in* ,2016 [en línea], [Consulta: 13 de agosto 2017]. Disponible en:
<https://es.linkedin.com/pulse/qu%C3%A9-son-colorantes-reactivos-zoe-huang>

JARAMILLO, A.; et al. “Obtaining a fungal inoculum for degradation of an azo dye by solid state fermentation” *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*, vol. 17 (2), 2014, pp. 577-585. [Consulta: 12 agosto 2017]. Disponible en:
<http://www.scielo.org.co/pdf/rudca/v17n2/v17n2a29.pdf>

KEREM, Z.; et al. “Lignocellulose degradation during solid-state fermentation: *Pleurotus ostreatus* vs *Phanerochaete chrysosporium*”, *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 58, nº 4 (1992), EE. UU pp. 1121-1127.

KIRK, T.; et al. “Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*” *Enzyme Microb Technol*, vol 8, (1986), (EE. UU) pp. 27-32.

KOYANI,R.; et al. “Contribution of lignin degrading enzymes in decolourization and degradation of reactive textile dyes”.*International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 77 (2013), (EE.UU) pp.1-9. [Consulta: 12 marzo 2018]. ISSN 0964-8305 Disponible en:
http://agris.fao.org/agris-search/search.do?jsessionid=5CB3642D94B2AFEC4CD0999C1AB19FF7?request_locale=es&recordID=US201600062401&sourceQuery=&query=&sortField=&sortOrder=&agrovocString=&advQuery=¢erString=&enableField

KUHAD, R.; et al. “Developments in microbial methods for the treatment of dye effluents.” *Adv Appl Microbiol*, vol. 56. (2004) (India) pp. 185-213.

KUMM, P. “Clitocybe nebularis” (1871), (España) [Consulta: 12 de abril 2018]. Disponible en:

[http://www.biodiversidadvirtual.org/hongos/Clitocybe-nebularis-\(Batsch\)-P.-Kumm.-1871-img129653.html](http://www.biodiversidadvirtual.org/hongos/Clitocybe-nebularis-(Batsch)-P.-Kumm.-1871-img129653.html)

LIU, J.; et al. “Enhanced dye decolorization efficiency by citraconic anhydride-modified horseradish peroxidase”. *Journal of Molecular Catalysis B*, vol 41, n° 3-4 (2006), (China). pp. 81-86

LÓPEZ, Elizabeth & LOZANO, Adriana “Endopolygalacturonase and pectinesterase from *Aspergillus Niger*” *Revista Colombiana de Biotecnología* [en línea], s.f., (Colombia) 3 (2), pp.85-89. [Consulta: 23 septiembre 2017]. ISSN. 0123-3475 Disponible en:

<https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/viewFile/30079/30275>

LOZANO TORRES, Mónica “Aislamiento y purificación del hongo *aspergillus niger* para la obtención de enzimas clarificadoras aplicables en biotecnología de jugos” (Tesis) [en línea], Universidad del Azuay. Facultad de Ciencias y Tecnología. Escuela de Ingeniería en Alimentos. Cuenca (Ecuador).2011. pp.19-23. [Consulta: 20 de octubre 2017]. Disponible en:

<http://dspace.uazuay.edu.ec/bitstream/datos/6283/1/08097.pdf>

LUNA, M.; et al. “Isolation of strains of *Aspergillus niger* which produce ochratoxin A, isolated in stored green coffee (Coffee arabica)” *Revista Mexicana de Micología*, 2010, México, 32, pp. 63-68. [Consulta: 13 de agosto 2017]. Disponible en:

<http://www.scielo.org.mx/pdf/rmm/v32/v32a8.pdf>

MACÍAS HOLGUÍN, Willy “Evaluación del uso de enzimas lignolíticas para la degradación de colorantes industriales”. (Tesis) [en línea], Universidad Técnica de Manabí. Facultad de Ciencias Matemáticas Físicas y Químicas. Carrera de Ingeniería Química. Portoviejo (Ecuador).2017. pp. 62. [Consulta: 13 de agosto 2017]. Disponible en:

<http://repositorio.utm.edu.ec/bitstream/123456789/852/1/EVALUACION%20DEL%20USO%20DE%20ENZIMAS%20LIGNOLITICAS%20PARA%20LA%20DEGRADACION%20DE%20COLORANTES%20INDUSTRIALES.pdf>

MARTÍNEZ, M.; et al. “Evaluación de un sistema de biorremediación de aguas residuales porcícolas en la finca el porvenir, vereda suncunchoque, sector la laja, uvate – Cundinamarca, y su reutilización con fines agroambientales”. (Tesis) [en línea], Corporación Universitaria Minuto de Dios. Bogotá (Colombia). 2015. pp. 30-32 [Consulta: 10 octubre2017]. Disponible en:

http://repository.uniminuto.edu:8080/xmlui/bitstream/handle/10656/3339/TIAG_MartinezRomeroMacol_2015.pdf?sequence=1

MIJAYLOVA, P.; et al. “Evaluación de diferentes procesos de tratamiento para la remoción de colorantes sintéticos utilizados en la industria textil”. *Instituto Mexicano de Tecnología del Agua* [en línea], 2013 (México), pp. 10-14. [Consulta: 15 de abril 2018]. Disponible en:

<http://repositorio.imta.mx/bitstream/handle/20.500.12013/1406/TC-1223.1.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

MORENO SANDOVAL, Nataly; & OSPINA VELANDIA, Ximena. *Evaluación de inductores metálicos y co- sustratos para la remoción de negro reactivo 5 empleando Pleurotus ostreatus Inmovilizado en fique* [en línea] (tesis). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. 2008. pp. 17-51 [Consulta: 10 octubre2017]. Disponible en:

<http://javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis222.pdf>

NOVOTNY, C.; et al “Capacity of *Irpex lacteus* and *Pleurotus ostreatus* for decolorization of chemically different dyes” *J. Biotechnol*, 2001 (India) 89, pp. 113-122.

PASTI-GRIGSBY, M.; et al. “Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Streptomyces* spp. And *Phanerochaete Chrysosporium*”. *Applied Environmental Microbiology* [en línea], 1992 (Moscow), 58 (11), pp. 3605-3613. [Consulta: 15 de abril 2018]. Disponible en:

https://www.researchgate.net/publication/21673903_Influence_of_aromatic_substitution_patterns_on_azo_dye_degradability_by_Streptomyces_spp_and_Phanerochaete_chrysosporium

PATIÑO ÁLVAREZ, Belén. *Aspergillus niger*. s.f. [imagen digital en línea]. Bioimágenes. Madrid. [Consulta: 17 de agosto 2017]. Disponible en:

<http://bioimagen.bioucm.es/foto/3922>

PAUCAR MUÑOZ, Carmen. “Curtición de pieles de llama con la utilización de cuatro niveles de tanino mimosa en la obtención de cueros para talabartería” (Tesis) [en línea], Escuela

Superior Politécnica de Chimborazo. (Ecuador).2009. pp. 27-28. [Consulta: 13 de abril 2018].
Disponibile en:
<http://studylib.es/doc/7719755/c---dspace-epoch.---escuela-superior-polit%C3%A9cnica-de-chimborazo>.

PEDROZA, A.; et al. “Manual de Laboratorio de Introducción a la Biotecnología” *CEJA*, 2003, (Bogotá), pp. 50-55.

PERINAT, María. “Trabajos de ribera”, *Tecnología de la confección en piel*, [en línea],2009 (España), [Consulta: 23 septiembre 2017]. ISBN 978-84-88615 Disponible en:
http://www.edym.net/Confeccion_en_piel_gratis/part01/lecc04/capitulo1420.html

PEÑAFIEL, Sandra. “Influencia del suavizado con bases de ácidos grasos en el cambio de matiz en tejidos algodón 100% tinturados con colorantes reactivos de baja reactividad” (Tesis) [en línea], Universidad Técnica del Norte. (Ecuador).2011. pp. 3-5. [Consulta: 19 de abril 2018].
Disponibile en:
<http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/631/4/capitulo4.pdf>

RAISMAN, J & GONZALEZ, Ana. *El proceso de curtido* [en línea]. Argentina. [Consulta: 13 de noviembre 2017]. Disponible en:
http://www.biologia.edu.ar/tesis/forcillo/proceso_de_curtido.htm

RICO, Orlando. *Taxonomía de Aspergillus Niger* [en línea]. México. [Consulta: 13 de noviembre 2017]. Disponible en:
<https://es.scribd.com/document/340766366/Taxonomia-de-Aspergillus-Niger>

RODAS, Giovanna. *Protocolo de aislamiento de cepas de Aspergillus niger a par* [blog]. [Consulta: 18 de agosto 2017]. Disponible en:
<https://prezi.com/5wvhupccmd3c/protocolo-de-aislamiento-de-cepas-de-aspergillus-niger-a-par/>

RODRIGUEZ, Ramon. “Caracterización de cepas del hongo comestible *pleurotos spp.* En medios de cultivo y su evaluación en substratos lignocelulósicos forrajeros para la producción de carpóforos” (Tesis) [en línea]. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Agronomía. (México). 1996, pp. 14-18. 18 [Consulta: 26 de noviembre 2017]. Disponible en:
<http://eprints.uanl.mx/6210/1/1080071715.PDF>

ROSAS, María; &TERÁN, Diego “Obtención de ácido cítrico a partir de melaza o cachaza, mediante fermentación utilizando cepa de *Aspergillus niger* ATCC 16888” (Tesis) [en línea]. Universidad Técnica del Norte. Facultad de Ingeniería en Ciencias Agropecuarias y Ambientales. Ingeniería Agroindustrial. (Ecuador). 2015. pp. 15-18 [Consulta: 26 de noviembre 2017]. Disponible en:
<http://repositorio.utn.edu.ec/bitstream/123456789/4483/1/03%20EIA%20377%20TESIS.pdf>

SALCEDO, Sergio. “Caracterización de la actividad decolorante de cepas de basidiomicetos nativas sobre colorantes sintéticos” (Tesis) (Doctorado) [en línea]. Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas (México). 2009. pp. 45-47 [Consulta: 20 de abril 2018]. Disponible en:
<http://eprints.uanl.mx/2022/1/1080179426.pdf>

SANKAR, E.; et al. “Problems of dyes” *International Journal of Canadá*, (Canadá), 1999, 9(3), pp. 43-55. [Consulta: 18 de abril 2018].

TANIGUCHI, M.; et al. “Evaluation of pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for enzymatic hydrolysis of rice straw” *Journal of Bioscience and Bioengineering*, (Japón), 2005, 100 (6), pp. (637-643). [Consulta: 18 de abril 2018].

TORRES, A. “Análisis de aguas residuales” *Granada. org*, (España), 2012, pp. (6-55). [Consulta: 18 de abril 2018]. Disponible en:
http://a21-granada.org/red-gramas/images/Presentacion_ANTONIO.pdf

UNEP. “Tanneries and the Environment. A Technical Guide to Reducing the Environmental Impact of Tannery Operations”. *Technical Report Series* No. 4. United Nations Environment Programme Industry and Environment Office. (EE. UU), 1991. [Consulta: 20 de abril 2018].

VILLENA, Jordi. “Depuración, reutilización y abastecimiento hídrico en el interior septentrional de Alicante” [en línea]. *Instituto Universitario de Geografía* (España). 2008. pp 123-138 [Consulta: 20 de abril 2018]. Disponible en:
<http://depuracion-reutilizacion-y-abastecimiento-hidrico-en-el-interior-septentrional-de-alicante.pdf>

ANEXOS

ANEXO A: Recopilación Fotográfica



Fotografía 1A. *Pleurotus ostreatus* en agar PDA



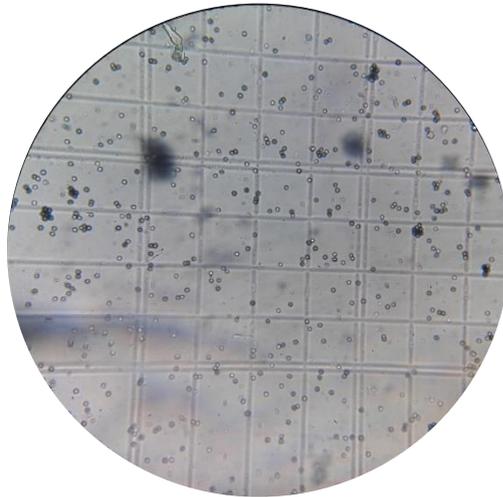
Fotografía 2A. *Aspergillus niger* en agar PDA



Fotografía 3A. Colonización en medio solido de *Pleurotus ostreatus*



Fotografía 4 A. Inmovilización de *Pleurotus ostreatus* en *Luffa cylindrica*



Fotografía 5 A. Conteo de esporas en cámara de Neubauer Improved



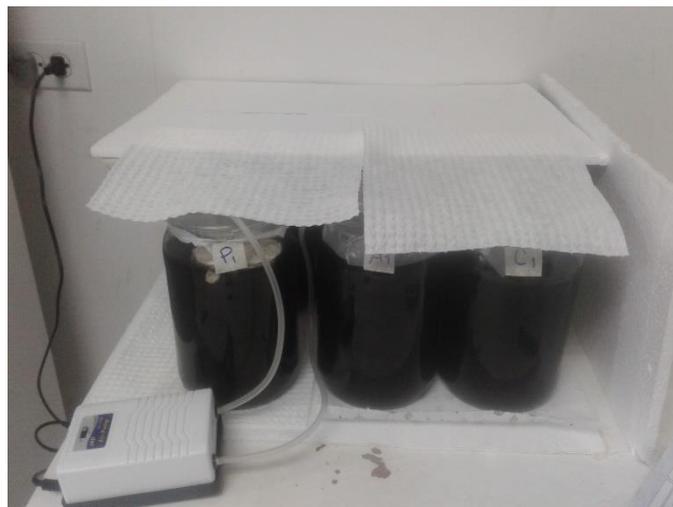
Fotografía 6 A. Muestreo del agua residual



Fotografía 7 A. Bombo de tinturado



Fotografía 8 A. Inoculación del agua residual



Fotografía 9 A. Unidades experimentales



Fotografía 10 A. Análisis físicos y químicos



Fotografía 11 A. Resultados de la remoción de colorante NR5

ANEXO B: Resultados fisicoquímicos finales

Tratamiento	Temperatura (°C)	pH	Conductividad (µS/cm)	Turbidez (Utn)	Sólidos Totales (mg/l)	Sólidos Suspendidos (mg/l)	DQO (mg/l) 5-100	DBO₅ (mg/l)
A1	16,1	3,4	960	138	84,52	69,31	1650	1550
A2	16,2	3,8	1024	157	77,83	70,64	1800	1650
A3	16,4	3,9	1009	429	79,85	71,59	2310	1890
A4	16,1	4,1	1030	178	80,36	78,87	1640	1630
A5	16,2	3,7	1034	137	76,25	76,71	1660	1650
A6	16,4	3,6	1603	139	78,7	74,73	1870	1640
A7	16,1	4,0	1030	178	80,85	70,81	1750	1800
A8	16,2	3,8	1024	167	73,31	74,21	1720	1700
A9	16,4	3,5	1789	239	72,89	77,75	1760	1810
P1	16,2	4,6	1150	398	44,49	69,51	1810	1820
P2	16,4	4,7	1070	1190	75,82	63,73	1630	1710
P3	16,2	4,7	1125	100	45,51	68,85	1670	1780
P4	16,3	3,5	1773	109	72,47	65,83	1890	1860

P5	16,1	3,9	2404	157	82,08	69,28	1630	1770
P6	16,3	3,2	1010	039	42,74	60,99	1540	1400
P7	16,2	4,6	1150	198	84,54	74,05	1750	1790
P8	16,4	4,3	1070	1190	70,9	77,73	1650	1640
P9	16,2	4,1	1125	100	78,79	75,46	2220	1610
C1	16,3	3,7	1773	109	76,80	81,84	2260	1810
C3	16,1	3,5	2404	157	74,34	82,77	2330	1960
C9	16,3	3,7	2212	135	77,79	83,98	2220	1920